

Tesis Doctoral

Caracterización de poblaciones de *Alternaria* en productos de interés agroalimentarios en Argentina mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de estrategias alternativas de prevención y control del patógeno

da Cruz Cabral, Lucía

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

da Cruz Cabral, Lucía. (2018). Caracterización de poblaciones de *Alternaria* en productos de interés agroalimentarios en Argentina mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de estrategias alternativas de prevención y control del patógeno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6388_DaCruzCabral
da Cruz Cabral, Lucía. "Caracterización de poblaciones de *Alternaria* en productos de interés agroalimentarios en Argentina mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de estrategias alternativas de prevención y control del patógeno". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6388_DaCruzCabral

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**Caracterización de poblaciones de *Alternaria* en
productos de interés agroalimentario en Argentina
mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de
estrategias alternativas de prevención y control del
patógeno**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Orgánica

Lucía da Cruz Cabral

Directora de tesis: Dra. Andrea Patriarca

Consejera de Estudios: Dra. Virginia Fernández Pinto

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 20/03/18

RESUMEN

Caracterización de poblaciones de *Alternaria* en productos de interés agroalimentario en Argentina mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de estrategias alternativas de prevención y control del patógeno

Muchas especies de *Alternaria*, que contaminan cultivos tanto en pre- como post-cosecha, son capaces de producir micotoxinas. La primera etapa del trabajo consistió en caracterizar la diversidad poblacional de *Alternaria* en cultivos de importancia en Argentina. Se obtuvieron 293 aislamientos a partir de tomate, pimiento, trigo y arándanos, y se identificaron mediante un enfoque polifásico, abarcando morfología, potencial metabolómico y análisis filogenéticos. Los aislamientos se clasificaron en cuatro morfogrupos, uno solo de los cuales fue confirmado por el resto de los análisis. Los otros tres, que incluyeron las especies con mayor potencial toxicogénico, no pudieron ser diferenciados entre sí por técnicas de metabolómica o genómica. Se estudió además la micobiota de pimientos y se detectó por primera vez en Argentina la contaminación con toxinas de *Alternaria* spp. en los frutos. La segunda etapa consistió en la evaluación de estrategias de bajo impacto ambiental (levaduras y un péptido antifúngico) sobre el crecimiento y producción de micotoxinas de *Alternaria* spp. sobre medios formulados a base de los alimentos en los que se prevé su aplicación (tomate y trigo). Se evaluó además el efecto de estos tratamientos sobre la ruta de respuesta a estrés de la pared celular en el hongo, utilizando una metodología de qPCR previamente desarrollada en base a la expresión del gen *Rho1*. La aplicación de una cepa de *Debaryomyces hansenii* en tomate y del péptido antifúngico PgAFP en trigo mostraron resultados promisorios para el control de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas en dichos alimentos.

Palabras clave: *Alternaria*, micotoxinas, alimentos, caracterización polifásica, metabolómica, control biológico.

ABSTRACT

Characterization of *Alternaria* populations in relevant agricultural products in Argentina through a polyphasic approach for the development of alternative strategies for the pathogen's prevention and control

Alternaria is a mycotoxigenic fungal genus, which contaminates crops at both pre- and post-harvest stages. The first section of this work consisted in characterizing the *Alternaria* populations' diversity in relevant crops in Argentina. A total of 293 isolates were obtained from tomato, pepper, wheat and blueberries, and were identified by a polyphasic approach, including classical morphology, metabolomic profile and phylogenetic analyzes. The isolates were classified into four morphogroups, one of which was confirmed by the rest of the studies. The other three, which included the species with the highest toxicogenic potential, were not differentiated by metabolomic or genomic techniques. The mycota of peppers was also studied and the natural occurrence of *Alternaria* toxins in the fruits was detected for the first time in Argentina. The second stage consisted in the evaluation of environmentally friendly strategies (yeasts and an antifungal peptide) to prevent *Alternaria* growth and mycotoxin accumulation on food-based media (tomato and wheat). In addition, the effect of these treatments on the pathway related to cell wall stress was evaluated using a qPCR methodology based on the *Rho1* gene expression, previously developed. The application of a strain of *Debaryomyces hansenii* in tomato and the antifungal peptide PgAFP in wheat showed promising results for the control of *Alternaria* and its mycotoxins in those foods.

Keywords: *Alternaria*, mycotoxins, food, polyphasic characterization, metabolomics, biocontrol.

AGRADECIMIENTOS

A Andrea, por darme la oportunidad de hacer el doctorado, por transmitirme la pasión para trabajar, por acompañarme en diferentes situaciones que me tocó vivir durante estos años, por las largas horas de trabajo compartidas y, especialmente, por permitirme trabajar en un clima de confianza.

A Virginia, por invitarme a trabajar en el laboratorio de Microbiología de Alimentos, por todos los consejos y recomendaciones a lo largo de estos años y por su visión humana en todo momento.

A Nil, por ser una persona con la que se puede contar siempre y por cuidarme en todo.

A Agus, por el día a día en esta última etapa y por ser mi compañera de luchas.

A mis compañeros de laboratorio (y vecinos) de estos años, Ste, Pupe, Santi, Yani, Víctor, Diani, Malu, Gaby, Andreita por enseñarme, escucharme y por tantas risas compartidas.

A Marcela, por su ayuda desinteresada y su infinita paciencia para explicarme todo.

A Sebastián, por darme la oportunidad de trabajar con él y enseñarme mis primeros pasos en molecular.

A Alicia, por recibirme en España, por todo lo que aprendí con ella y por hacerme sentir parte del grupo desde el primer día.

A mis amigos de la UEx, Belén, Josué y Alberto, por su buena predisposición para ayudarme en el trabajo y por haberme hecho sentir en casa aunque estuviera lejos.

A mis amigas de toda la vida, a Pau y a Pablito, por tantas charlas, consejos, risas y especialmente, por escucharme, entenderme y estar presente en todos los momentos.

A los amigos que me llevo de estos años Marian, Vale, Diani, Mati, Pipi por formar parte de mi vida y por todas las cosas que compartimos, dentro y especialmente fuera de la facultad.

A mi familia, por el cariño, por acompañarme y por la comprensión. A mi mamá, por el apoyo incondicional. A mi hermano, por estar siempre atento a mí. A mi papá, porque todo lo que me enseñó me ayudó a llegar hasta acá.

A todos, sinceramente muchas gracias.

ABREVIATURAS

2.3-DHQG: 2,3-dihidroxi-quinolin-4-O-beta-D-glucopiranosido

3-OH-5-AME: 3-hidroxialternariol 5-O-metil éter

AAIt: ácido alternarienónico

ACR: altecromona

AFP: péptido antifúngico

ALAC: alterlactona

ALB: albrasitriol

ALL: altersolanol

ALN: altenusina

ALP: alterperilenol

ALS: altersetina

ALT: altenueno

AME: alternariol monometil éter

ANOVA: análisis de la varianza

AOH: alternariol

APD: agar papa dextrosa

APT: agar pulpa de tomate

APZ: agar papa zanahoria

ATL: altenuisol

ATR: 9,10-epoxi-8-OH-9-metildeca-2,4,6-ácido trienoico

ATX: altertoxina

a_w: actividad de agua

BPC: cromatograma corregido por línea de base

BRA: brasicadiol

CBS: Centraalbureau Voor Schimmelcultures

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CLO: clonostaquidiol

CPD: caldo papa dextrosa

Cq: ciclo de cuantificación de qPCR

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

CWI: integridad de la pared celular

DCMA: agar diclorán cloranfenicol malta

DES-B: homodestruixina B

DG18: agar diclorán 18 % glicerol

DHALN: dehidroaltenusina

DHCUR: cis-dehidrocurvularina

DHTEN: dihidrotentoxina

DiA: ácido diaportínico

DL₅₀: dosis letal 50

DMALN: demetilaltenusina

dNTP: desoxinucleósido trifosfato

DORAN: deoxiradicinina

DRYES: agar diclorán rosa de bengala extracto de levadura sacarosa

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EGS: Colección Emory G. Simmons

EM: espectrometría de masa

endoPG: endopoligalacturonasa

ERAD: 3-Epiradicinol

ESI: ionización por electrospray

GEF: factor de intercambio de guanosina

gr.-esp.: grupo-especie

h: horas

HOG: alta osmolaridad por glicerol

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HST: toxina específica de hospedador

INF: infectopirona

IsoTeA: ácido isopropil tetrámico

JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

LGL: Autoridad de Salud y Seguridad Alimentaria de Bavaria, Alemania

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

m/z: relación masa/carga

MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos

MEA: agar extracto de malta

min: minutos

MOERAD: 3-metoxi-3-epiradicinol

NZ-A: novae zelandina A

NZ-B: novae zelandina B

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PgAFP: péptido antifúngico producido por *P. chrysogenum*

PHO: phomapirona

PKC: proteína quinasa C

PyrA: ácido pirenocaético A

Rho: proteína G homóloga de Ras (GTPasa)

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RSD: desviación estándar relativa

RT-qPCR: PCR cuantitativa con retrotranscripción

secc.: sección

seg: segundos

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SNA: agar sintético bajo en nutrientes

STTX-III: stemphytoquina III

TeA: ácido tenuazónico

TEN: tentoxina

TF: factor de transcripción

Tm: temperatura de disociación

TOF: analizador de tiempo de vuelo

tr: tiempo de retención

TrcA: tricicloalternareno

TTC: umbral de preocupación toxicológica

U: metabolito de estructura desconocida

UHPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución

WA: agar trigo

YES: caldo extracto de levadura sacarosa

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Contaminación fúngica de alimentos.....	1
I.2. El género <i>Alternaria</i>	2
I.2.1.-Distribución y ecofisiología	2
I.2.2.-Metabolitos secundarios	3
I.2.2.a.-Clasificación estructural.....	3
I.2.2.b.-Efectos toxicológicos	5
I.2.2.c.-Incidencia de micotoxinas en alimentos.....	7
I.2.2.d.-Estado actual sobre la legislación de las toxinas	9
I.3. Cultivos de importancia agronómica en Argentina susceptibles a <i>Alternaria</i> spp.....	10
I.3.1.-Arándanos	10
I.3.2.-Pimiento.....	12
I.3.3.-Tomate.....	14
I.3.4.-Trigo.....	16
I.4. Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. y sus toxinas en Argentina	18
II. OBJETIVOS.....	20
II.1. Objetivo general	20
II.2. Objetivos específicos	20
III. CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA DE POBLACIONES DE <i>Alternaria</i>	22
III.1. Introducción	22
III.1.1.-Características morfológicas de <i>Alternaria</i> spp.	22
III.1.2.-Reseña histórica de la taxonomía de <i>Alternaria</i> spp.	22
III.1.3.-Enfoques alternativos para la clasificación subgenérica de <i>Alternaria</i>	25
III.1.3.a.-Genómica y análisis filogenéticos.....	25
III.1.3.b.-Metabolómica	26
III.1.3.c.-Caracterización polifásica	28
III.2. Materiales y métodos	29
III.2.1.-Muestro de <i>Alternaria</i> spp. a partir de distintos alimentos	29
III.2.1.a.-Arándano	29

III.2.1.b.-Pimiento	29
III.2.1.c.-Tomate.....	29
III.2.1.d.-Trigo.....	30
III.2.2.-Aislamiento de la micobiota	30
III.2.3.-Caracterización morfológica	31
III.2.3.a.-Cultivos monospóricos	31
III.2.3.b.-Identificación de patrones de esporulación	32
III.2.3.c.-Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	33
III.2.3.d.-Evaluación del estado teleomorfo.....	33
III.2.3.e.-Cepas de referencia	34
III.2.3.f.-Identificación de individuos de otros géneros fúngicos	35
III.2.3.g.-Mantenimiento y conservación de las cepas.....	35
III.2.4.-Caracterización metabólica	35
III.2.4.a.-Cepas	35
III.2.4.b.-Extracción	36
III.2.4.c.-Análisis por UHPLC-EM	36
III.2.4.d.-Análisis de datos	37
III.2.5.-Caracterización molecular	37
III.2.5.a.-Cepas	37
III.2.5.b.-Extracción de ADN.....	38
III.2.5.c.-PCR y secuenciación.....	38
III.2.5.d.-Análisis de datos y estudios filogenéticos	39
III.2.5.e.-Análisis simultáneo de datos de morfología y secuencias.....	40
III.2.5.f.-Comparación de secuencias de diferente origen geográfico	42
III.2.6.-Caso de estudio: pimiento	43
III.2.6.a.-Muestras.....	43
III.2.6.b.-Aislamiento e identificación de la micobiota	43
III.2.6.c.-Potencial toxicogénico de <i>Alternaria</i> spp.	43
III.2.6.d.-Contaminación con toxinas de <i>Alternaria</i> spp.	44
III.2.6.d.i.-Extracción.	44
III.2.6.d.ii.-Detección y cuantificación	44
III.2.6.d.iii.-Preparación de soluciones estándar y cuantificación	44
III.2.6.d.iv.-Evaluación del desempeño analítico del método.....	45

III.3. Resultados	46
III.3.1.-Aislamiento	46
III.3.2.-Caracterización morfológica	47
III.3.2.a.- <i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	48
III.3.2.b.- <i>A. arborescens</i> gr.-esp.	48
III.3.2.c.- <i>A. infectoria</i> gr.-esp.....	49
III.3.2.d.- <i>A. alternata</i> gr.-esp.....	50
III.3.3.-Caracterización metabólica	59
III.3.3.a.-Perfiles de producción de metabolitos secundarios.....	59
III.3.3.a.i.- <i>A. infectoria</i> gr.-esp.	61
III.3.3.a.ii.- <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> y <i>A. alternata</i> gr.-esp.	63
III.3.3.b.-Capacidad metabólica de <i>Alternaria</i> spp. de alimentos.....	65
III.3.3.c.- Evaluación del riesgo toxicológico asociado a los distintos alimentos	72
III.3.4.-Caracterización molecular y análisis filogenéticos	74
III.3.4.a.-Análisis filogenéticos	77
III.3.4.b.-Análisis simultáneo de datos de morfología y secuencias	81
III.3.4.c.-Comparación con secuencias de diferente origen geográfico	84
III.3.5.-Caso de estudio: pimienta	85
III.3.5.a.-Hongos filamentosos	86
III.3.5.b.-Potencial toxicogénico de <i>Alternaria</i> spp.....	86
III.3.5.c.-Contaminación con toxinas de <i>Alternaria</i> spp.....	87
III.3.5.c.i.-Desempeño analítico del método.	87
III.3.5.c.ii.-Contaminación de frutos de pimienta con toxinas de <i>Alternaria</i>	88
III.4. Discusión	90
III.4.1.-Distribución de <i>Alternaria</i> spp. en alimentos	90
III.4.2.-Caracterización morfológica de <i>Alternaria</i> spp. de alimentos	91
III.4.3.-Caracterización metabólica de <i>Alternaria</i> spp. de alimentos	94
III.4.4.-Caracterización molecular de <i>Alternaria</i> spp. de alimentos	98
III.4.5.-Enfoque polifásico y nuevas organizaciones subgenéricas en <i>Alternaria</i>	100
III.4.6.-<i>Alternaria</i> spp. en frutos de pimienta	103
IV. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE <i>Alternaria</i> SPP.	105
IV.1. Introducción	105

IV.1.1.-Control de la contaminación fúngica y con micotoxinas en alimentos	105
IV.1.2.-Vías intracelulares de respuesta a estrés en hongos	107
IV.1.3.-Estrategias alternativas de control	109
IV.1.3.a.-Desarrollo de antifúngicos de bajo impacto ambiental	109
IV.1.3.b.-Control biológico	110
IV.1.3.b.i.-Levaduras	110
IV.1.3.b.ii.-Péptidos antifúngicos producidos por hongos filamentosos	111
IV.1.4.-Estrategias alternativas para el control de <i>Alternaria</i> spp. en alimentos	112
IV.2. Materiales y métodos	114
IV.2.1.-Optimización de metodologías para los ensayos de control biológico	114
IV.2.1.a.-Diseño de PCR cuantitativa para evaluar la expresión de la ruta CWI	114
IV.2.1.a.i.-Diseño de cebadores	114
IV.2.1.a.ii.-Optimización de la reacción de qPCR	114
IV.2.1.a.ii.1.-Preparación del inóculo.....	114
IV.2.1.a.ii.2.-Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	114
IV.2.1.a.ii.3.-Especificidad y eficiencia de las reacciones de qPCR	115
IV.2.1.a.iii.-Evaluación de la aplicabilidad del método de RT-qPCR.....	116
IV.2.1.a.iii.1.-Obtención del péptido PgAFP	116
IV.2.1.a.iii.2.-Preparación del inóculo, siembra y condiciones de incubación....	117
IV.2.1.a.iii.3.-Evaluación del efecto de PgAFP sobre el crecimiento.....	117
IV.2.1.a.iii.4.-Extracción de ARN, síntesis de ADNc y reacciones de RT-qPCR	117
IV.2.1.b.-Método analítico para la determinación de micotoxinas	118
IV.2.1.b.i.-Extracción.....	118
IV.2.1.b.ii.-Detección y cuantificación.....	118
IV.2.1.b.iii.-Preparación de soluciones estándar y cuantificación.....	119
IV.2.1.b.iv.-Evaluación del desempeño analítico del método	119
IV.2.2.-Ensayos de control biológico	119
IV.2.2.a.-Evaluación de estrategias naturales para el control de <i>Alternaria</i> spp. en tomate ...	119
IV.2.2.a.i.-Estudio ecofisiológico	119
IV.2.2.a.i.1.-Cepas fúngicas.....	119
IV.2.2.a.i.2.-Medio de cultivo	119
IV.2.2.a.i.3.-Preparación del inóculo, siembra e incubación	119
IV.2.2.a.i.4.-Medición del crecimiento	120

IV.2.2.a.i.5.-Expresión de <i>Rho1</i> por RT-qPCR.....	120
IV.2.2.a.i.6.-Determinación de micotoxinas	120
<i>IV.2.2.a.ii.-Estudio de biocontrol con levaduras</i>	<i>120</i>
IV.2.2.a.ii.1.-Selección de las levaduras.....	120
IV.2.2.a.ii.2.-Ensayo en medio a base de tomate	121
<i>IV.2.2.a.iii.-Estudio de biocontrol con PgAFP</i>	<i>122</i>
IV.2.2.a.iii.1.-Selección de las concentraciones de PgAFP	122
IV.2.2.a.iii.2.-Ensayo en medio a base de tomate	122
IV.2.2.b.-Comparación de antifúngicos para el control de <i>Alternaria</i> spp. en trigo	123
<i>IV.2.2.b.i.-Cepa fúngica.....</i>	<i>123</i>
<i>IV.2.2.b.ii.-Medio de cultivo</i>	<i>123</i>
<i>IV.2.2.b.iii.-Antifúngicos.....</i>	<i>123</i>
<i>IV.2.2.b.iv.-Condiciones experimentales y determinaciones.....</i>	<i>123</i>
IV.2.3.-Análisis estadístico	124
IV.3. Resultados	125
<i>IV.3.1.-Optimización de metodologías para los ensayos de control biológico</i>	<i>125</i>
IV.3.1.a.-Diseño de RT-qPCR para evaluar la ruta CWI	125
<i>IV.3.1.a.i.-Diseño de cebadores</i>	<i>125</i>
<i>IV.3.1.a.ii.-Optimización, especificidad y eficiencia de la qPCR</i>	<i>125</i>
<i>IV.3.1.a.iii.-Evaluación de la aplicabilidad de la metodología</i>	<i>127</i>
IV.3.1.b.-Desempeño analítico del método para toxinas de <i>Alternaria</i> spp.....	129
<i>IV.3.2.-Ensayos de control biológico</i>	<i>131</i>
IV.3.2.a.-Evaluación de estrategias naturales para el control de <i>Alternaria</i> spp. en tomate...131	
<i>IV.3.2.a.i.-Estudio ecofisiológico</i>	<i>131</i>
IV.3.2.a.i.1.-Efecto de la temperatura sobre el crecimiento	131
IV.3.2.a.i.2.-Efecto de la temperatura sobre la expresión de <i>Rho1</i>	133
IV.3.2.a.i.3.-Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas	134
<i>IV.3.2.a.ii.-Evaluación de estrategias de bajo impacto ambiental</i>	<i>135</i>
IV.3.2.a.ii.1.-Estudio de biocontrol con levaduras.....	135
<i>IV.3.2.a.ii.1.1.-Selección de las levaduras</i>	<i>135</i>
<i>IV.3.2.a.ii.1.2.-Efecto sobre el crecimiento en medio tomate</i>	<i>136</i>
<i>IV.3.2.a.ii.1.3.-Efecto sobre la expresión de Rho1 en medio tomate</i>	<i>137</i>
<i>IV.3.2.a.ii.1.4.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio tomate.....</i>	<i>138</i>

IV.3.2.a.ii.2.-Estudio de biocontrol con PgAFP	139
IV.3.2.a.ii.2.1.-Selección de la concentración del péptido	139
IV.3.2.a.ii.2.2.-Efecto sobre el crecimiento en medio tomate	140
IV.3.2.a.ii.2.3.-Efecto sobre la expresión de Rho1 en medio tomate	141
IV.3.2.a.ii.2.4.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio tomate	142
IV.3.2.b.-Comparación de antifúngicos para el control de <i>Alternaria</i> spp. en trigo	143
IV.3.2.b.i.-Efecto sobre el crecimiento en medio trigo	143
IV.3.2.b.ii.-Efecto sobre la expresión de Rho1 en medio trigo	145
IV.3.2.b.iii.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio trigo	146
IV.4. Discusión	148
IV.4.1.-Diseño de un método de RT-qPCR para evaluar la vía CWI	148
IV.4.2.-Comportamiento ecofisiológico de <i>Alternaria</i> spp. en medio tomate	150
IV.4.3.-Estudios de control biológico sobre <i>Alternaria</i> spp.	153
IV.4.3.a.-Antifúngicos naturales para el control de <i>Alternaria</i> spp. en tomate	153
IV.4.3.b.-Comparación de antifúngicos para el control de <i>Alternaria</i> spp. en trigo	158
IV.4.4.-Consideraciones finales.....	160
IV.4.5.-Perspectivas futuras.....	161
V. CONCLUSIONES.....	162
V.1. Conclusiones específicas.....	162
V.2. Conclusión general.....	164
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	166
VII. ANEXOS.....	187
VII.1. Medios de cultivo	187
VII.2. Secuencias de cebadores	190
VII.3. Soluciones y reactivos.....	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Estructura química de las principales toxinas de <i>Alternaria</i> spp.	4
Figura I.2: Lesiones de <i>Alternaria</i> spp. en frutos de arándanos	12
Figura I.3: Lesiones de <i>Alternaria</i> spp. en frutos de pimiento.....	13
Figura I.4: Lesiones de <i>Alternaria</i> spp. en frutos de tomate.....	15
Figura I.5: Zonas productoras de trigo en Argentina	16
Figura I.6: Lesiones de <i>Alternaria</i> spp. en granos de trigo.....	18
Figura III.1: Esquema de siembra a partir de alimentos	31
Figura III.2: Esquema de obtención de cultivo monospórico	32
Figura III.3: Preparado para microscopio a partir de APZ.....	33
Figura III.4: Formas de los conidios de <i>Alternaria</i> spp.....	34
Figura III.5: Distribución de individuos de géneros de hongos dematiáceos	46
Figura III.6: Características microscópicas de <i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	51
Figura III.7: Características macroscópicas de <i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	52
Figura III.8: Características microscópicas de <i>A. arborescens</i> gr.-esp.	53
Figura III.9: Características macroscópicas de <i>A. arborescens</i> gr.-esp.	54
Figura III.10: Características microscópicas de <i>A. infectoria</i> gr.-esp.	55
Figura III.11: Características macroscópicas de <i>A. infectoria</i> gr.-esp.	56
Figura III.12: Características microscópicas de <i>A. alternata</i> gr.-esp.....	57
Figura III.13: Características macroscópicas de <i>A. alternata</i> gr.-esp.....	58
Figura III.14: Cromatograma con metabolitos secundarios de <i>Alternaria</i> spp.....	60
Figura III.15: Análisis de correspondencias múltiples sobre todas las cepas.	61
Figura III.16: Metabolitos comunes entre <i>A. infectoria</i> y otros gr.-esp.....	63
Figura III.17: Análisis de correspondencias múltiples excluyendo <i>A. infectoria</i> gr.-esp.....	64
Figura III.18: Producción semicuantitativa de micotoxinas.....	73
Figura III.19: Red de haplotipos a partir de secuencias de <i>endoPG</i>	79
Figura III.20: Filogenia Bayesiana a partir de secuencias de <i>endoPG</i>	80
Figura III.21: Árbol de máxima parsimonia a partir de secuencias de <i>endoPG</i>	80
Figura III.22: Árbol de máxima parsimonia a partir de datos morfológicos	83
Figura III.23: Filogenia Bayesiana a partir de datos morfológicos y de <i>endoPG</i>	84
Figura III.24: Filogenia Bayesiana a partir de secuencias de <i>endoPG</i> de distintas regiones.....	85
Figura III.25: Distribución de micotoxinas de <i>Alternaria</i> spp. en pimientos.....	89
Figura IV.1: Representación esquemática de la vía CWI	108

Figura IV.2: Diseño de cebadores sobre la secuencia de <i>Rho1</i>	125
Figura IV.3: Curvas de disociación	126
Figura IV.4: Curva estándar.....	127
Figura IV.5: Expresión absoluta de <i>Rho1</i> y $\mu_{\text{máx}}$ en <i>A. flavus</i> y <i>P. polonicum</i>	128
Figura IV.6: Crecimiento y nivel de esporulación en <i>A. flavus</i>	129
Figura IV.7: Curvas de crecimiento de <i>Alternaria</i> spp. a distintas temperaturas.....	132
Figura IV.8: Fase de latencia y velocidad de <i>Alternaria</i> spp. a distintas temperaturas.....	132
Figura IV.9: Expresión absoluta de <i>Rho1</i> en <i>Alternaria</i> spp. a distintas temperaturas	134
Figura IV.10: Producción de micotoxinas por <i>Alternaria</i> spp. a distintas temperaturas.....	135
Figura IV.11: Crecimiento de <i>A. tenuissima</i> gr.-esp. en presencia de levaduras.....	137
Figura IV.12: Expresión relativa de <i>Rho1</i> en <i>Alternaria</i> spp. en presencia de levaduras	138
Figura IV.13: % reducción del crecimiento de <i>Alternaria</i> spp. frente a PgAFP.....	140
Figura IV.14: Expresión relativa de <i>Rho1</i> en <i>Alternaria</i> spp. en presencia de PgAFP.....	141
Figura IV.15: Crecimiento de <i>A. tenuissima</i> gr.-esp. en agar trigo	144
Figura IV.16: Fase de latencia y velocidad de crecimiento de <i>Alternaria</i> spp. en agar trigo....	144
Figura IV.17: Expresión relativa de <i>Rho1</i> en <i>Alternaria</i> spp. en agar trigo	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III.1: Caracteres morfológicos y sus correspondientes estados.....	41
Tabla III.2: Secuencias de <i>endoPG</i> de distintas regiones geográficas.....	42
Tabla III.3: Distribución de <i>Alternaria</i> spp. por alimento	47
Tabla III.4: Metabolitos producidos por <i>A. infectoria</i> gr.-esp.....	62
Tabla III.5: Número de metabolitos producidos por <i>Alternaria</i> spp. <i>in vitro</i>	65
Tabla III.6: Número de aislamientos productores por alimento	66
Tabla III.7: Número de aislamientos productores de arándano por gr.-esp.	67
Tabla III.8: Número de aislamientos productores de pimiento por gr.-esp.	68
Tabla III.9: Número de aislamientos productores de tomate por gr.-esp.....	69
Tabla III.10: Número de aislamientos productores de trigo por gr.-esp.	70
Tabla III.11: Metabolitos minoritarios producidos por <i>Alternaria</i> spp.....	71
Tabla III.12: Metabolitos de <i>Alternaria</i> spp. que no fueron producidos <i>in vitro</i>	72
Tabla III.13: Aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. seleccionados para la caracterización molecular	75
Tabla III.14: Matriz morfológica.....	81
Tabla III.15: Micobiota aislada de pimientos.....	86
Tabla III.16: % recuperación de la metodología de detección de toxinas en pimiento.....	87
Tabla III.17: Parámetros de la metodología de detección de toxinas en pimiento.....	87
Tabla III.18: Contaminación de pimientos con toxinas de <i>Alternaria</i> spp.....	88
Tabla III.19: Características distintivas de las secc. <i>Alternaria</i> e <i>Infectoriae</i>	102
Tabla IV.1: Parámetros de la metodología UHPLC-EM para toxinas de <i>Alternaria</i> spp.	130
Tabla IV.2: % recuperación de toxinas en medio a base de tomate y de trigo	130
Tabla IV.3: Períodos de incubación para la expresión génica en medio tomate.....	133
Tabla IV.4: Fase de latencia y velocidad de crecimiento en presencia de levaduras	136
Tabla IV.5: Producción de micotoxinas en presencia de levaduras.....	139
Tabla IV.6: Fase de latencia y velocidad de crecimiento en presencia de PgAFP.....	141
Tabla IV.7: Producción de micotoxinas en presencia de PgAFP	142
Tabla IV.8: Producción de micotoxinas en agar trigo	147
Tabla IV.9: % de inhibición frente a levaduras y PgAFP por <i>Alternaria</i> spp. en medio tomate	157

I. INTRODUCCIÓN



I.1. Contaminación fúngica de alimentos

Los hongos son un grupo muy amplio y diverso de microorganismos que se han adaptado exitosamente a ambientes muy variados (Magan, 2007). Algunos de ellos pueden causar enfermedades en el hombre y animales (micosis), y numerosas esporas fúngicas presentes en el aire son fuente de cuadros alérgicos. Por otro lado, una gran cantidad de metabolitos fúngicos presentan acciones terapéuticas, hallándose entre ellos antibióticos, inmunosupresores, antifúngicos, hipocolesterolémicos, etc. Las enzimas fúngicas tienen gran valor comercial, y la industria de las mismas ha tenido un crecimiento continuado a escala mundial (Lange, 2017; Østergaard y Olsen, 2011).

Desde hace siglos, el hombre ha utilizado los hongos que se desarrollan en los alimentos para otorgarles características diferentes a las originales mediante procesos fermentativos. Existe una larga tradición del empleo de algunos hongos en la producción de quesos, derivados cárnicos, bebidas alcohólicas, etc. (Gori y col., 2011).

Sin embargo, ciertos hongos pueden colonizar los cultivos en condiciones agrometeorológicas favorables para su desarrollo, causando graves pérdidas económicas debido al deterioro de los vegetales tanto en las etapas de pre- como postcosecha. La infección fúngica puede ocurrir durante el desarrollo de la planta en el campo, cosecha, manipulación, transporte, almacenamiento, en el punto de expendio, o incluso en los hogares después de ser adquirido por el consumidor. Cuando la contaminación ocurre en el campo, el patógeno puede llegar a la etapa de almacenamiento dentro del tejido del hospedador sin provocar ningún síntoma de deterioro visible. Las esporas son fácilmente transportadas por vientos, lluvias, insectos en diferentes momentos (pre- o postcosecha) lo que genera una dispersión de la contaminación. Además, aun cuando no haya existido una infección antes de la cosecha, las esporas fúngicas que están en el aire pueden depositarse sobre las frutas y vegetales y permanecer en su superficie hasta el almacenamiento. Si se dan las condiciones apropiadas, pueden desarrollar y causar el deterioro en esta etapa.

Muchos de los hongos contaminantes de cultivos pueden acumular en los productos infectados gran cantidad de metabolitos secundarios. Estos compuestos son de bajo peso molecular y se producen hacia el final de la fase lineal y durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Sainz y col., 2015). Cada especie fúngica posee un perfil de metabolitos secundarios que le es propio. Muchos de estos compuestos poseen diferentes actividades biológicas, incluso se usan con aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo: penicilinas producidas por *Penicillium chrysogenum*; ácido cítrico por *Aspergillus niger*; ácido fumárico (*Rhizopus* spp.); ácido málico

(*P. brevicompactum*); entre otros (Samson y col., 2010). Sin embargo, algunos de los metabolitos fúngicos pueden ser tóxicos para seres vivos (microorganismos, plantas o animales). Cuando en baja concentración pueden ocasionar el desarrollo de alguna enfermedad aguda o crónica en animales vertebrados, se denominan micotoxinas (Jarvis y Miller, 2005). Desde el punto de vista de la contaminación de alimentos, las especies fúngicas más relevantes en cuanto a frecuencia de aislamiento y capacidad de producción de micotoxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Samson y col., 2010). Se conocen hasta el momento más de 400 micotoxinas, cuyos efectos tóxicos son muy variados. La mayoría de los casos de micotoxicosis, tanto en animales como en humanos, resultan del consumo de alimentos contaminados. La exposición humana puede ser directa, por consumo de cereales, frutas u hortalizas, o indirecta a través de la ingesta de productos animales derivados (carne, leche, huevo) (Richard y col., 2003). La mayoría de las micotoxinas son estables al calor dentro del rango de temperaturas comunes utilizadas para el procesamiento de alimentos (80-121 °C), por lo cual no se eliminan en los procesos industriales convencionales y pueden llegar al consumidor a través de alimentos procesados (Milićević y col., 2010). La contaminación fúngica de productos alimenticios es entonces un problema de importancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO), aproximadamente el 25 % de los cultivos mundiales destinados a alimento son afectados por hongos productores de micotoxinas y las pérdidas globales de alimentos por micotoxinas están en el rango de 1000 millones de toneladas al año (Neme y Mohammed, 2017; Patriarca y Fernández Pinto, 2017).

1.2. El género *Alternaria*

1.2.1.- Distribución y ecofisiología

Las especies del género *Alternaria* pertenecen a la familia *Pleosporaceae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*). Son ubicuas, capaces de contaminar desde semillas, plantas y suelos hasta animales. En humanos, algunas especies son capaces de provocar reacciones alérgicas y han sido asociadas a infecciones de la córnea, cavidad oral, tracto respiratorio superior, piel y uñas (Armitage y col., 2015; Lawrence y col., 2016). *Alternaria* spp. tienen importancia como patógenos humanos invasivos emergentes, especialmente en pacientes inmuno-comprometidos (Lawrence y col., 2016). Además, algunas especies se encuentran en el listado de plagas recomendadas para regulación por la Organización Europea y Mediterránea

para la Protección de los Cultivos (EPPO, 2018). Debido a su capacidad de colonizar plantas ocasiona graves pérdidas económicas en diferentes cultivos en todo el mundo.

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de *Alternaria* spp. se destacan la temperatura y la actividad de agua (a_w). Si bien las condiciones óptimas para el desarrollo varían entre las distintas especies, se puede establecer la temperatura óptima de crecimiento entre 22 y 28 °C, siendo 25 °C la temperatura idónea para la esporulación. Sin embargo, el intervalo de temperaturas en que *Alternaria* spp. puede desarrollar abarca desde -3 °C hasta los 35 °C (Sommer, 1985), por lo que puede ser responsable de alteraciones en alimentos vegetales almacenados en condiciones óptimas de refrigeración (Barkai-Golan y Paster, 2008). En relación a la a_w , el crecimiento de *Alternaria* spp. es óptimo a valores elevados (0,99), siendo 0,84 la a_w mínima necesaria para su desarrollo (Magan y Baxter, 1994; Magan y col., 1984).

1.2.2.- Metabolitos secundarios

Las especies de *Alternaria* son conocidas por su capacidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios derivados de diversas clases de compuestos químicos y con diferentes actividades biológicas, tales como insecticida, antiviral, antimicrobiana, teratogénica, mutagénica, antiprotozoal, zootoxicidad, citotoxicidad y fitotoxicidad. Al momento, se conocen más de 70 metabolitos secundarios producidos por especies de *Alternaria*, algunos de ellos químicamente caracterizados y cuya actividad tóxica para humanos o animales (micotoxinas) ha sido reportada (EFSA, 2016). Los metabolitos producidos durante la colonización de un cultivo pueden representar un riesgo para la salud humana y animal si los mismos se acumulan en las partes destinadas a la alimentación.

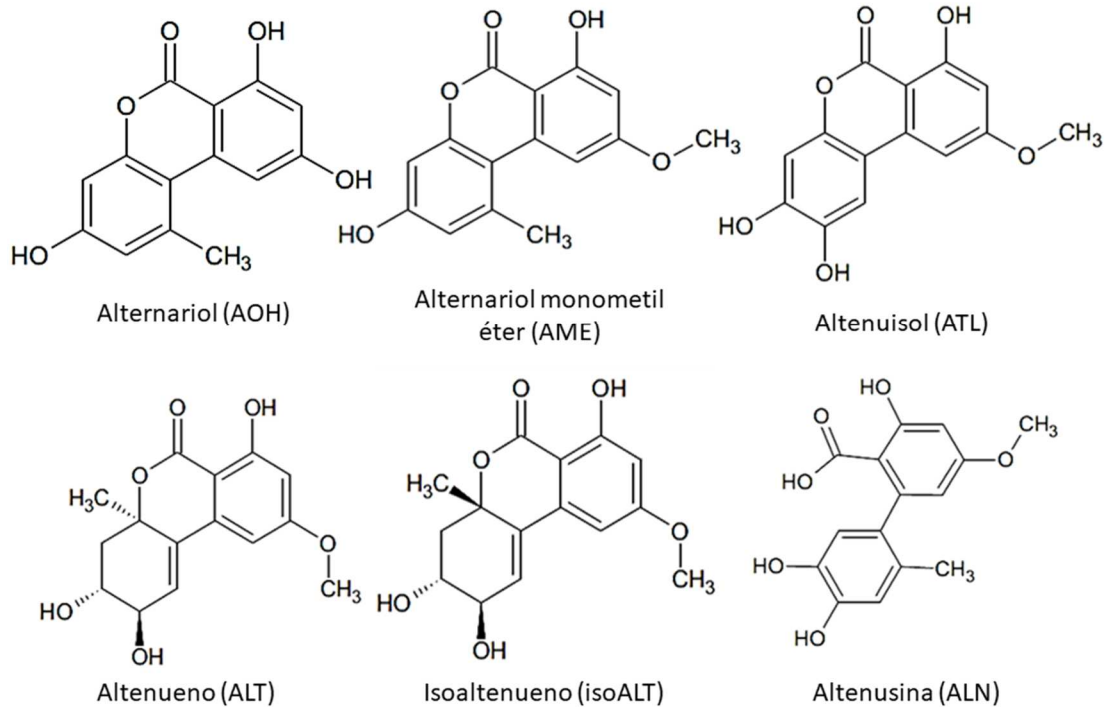
1.2.2.a.-Clasificación estructural

En función de su estructura química, se clasifican en cinco grupos (Figura I.1):

- i. Derivados de dibenzopironas: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), altenuisol (ATL), isoaltenueno (isoALT), altenusina (ALN).
- ii. Quinonas derivadas del perileno: altertoxinas I, II y III (ATX-I, -II, -III); alterperilenol (ALP); stemphytoxina III (STTX-III).
- iii. Derivados del ácido tetrámico: ácido tenuazónico (TeA), altersetina (ALS).
- iv. Estructuras misceláneas: tentoxina (TEN), un tetrapéptido cíclico; ácido alténico III (AA-III), un derivado del ácido resorcílico, entre otras.

- v. Análogos de la esfingosina (amino pentol ésteres): toxinas AAL (AAL-TA1, -TA2, -TB1, -TB2, -TC1, -TC2, -TD1, -TD2, -TE1, -TE2).

i- Derivados de dibenzopironas



ii- Quinonas derivadas del perileno

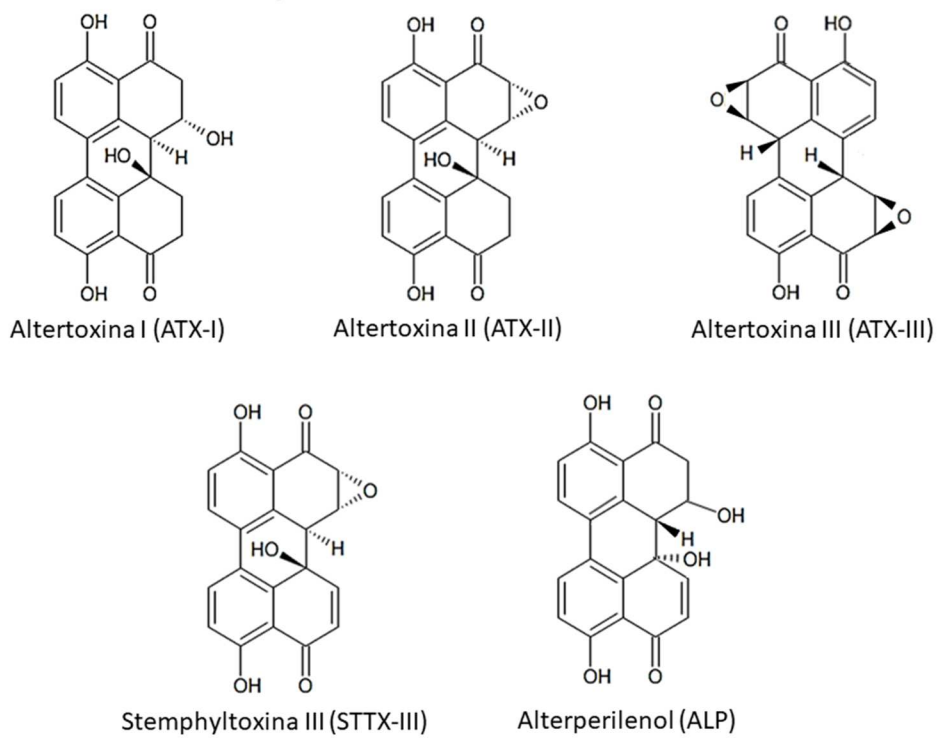
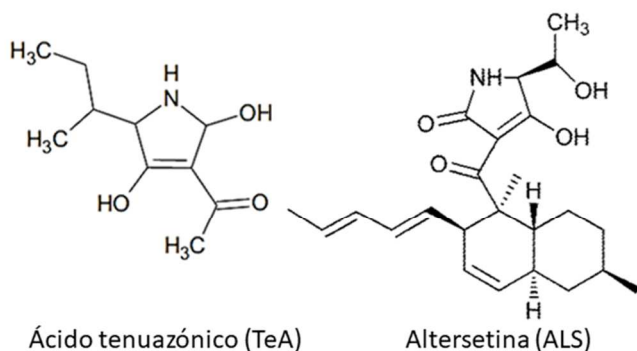
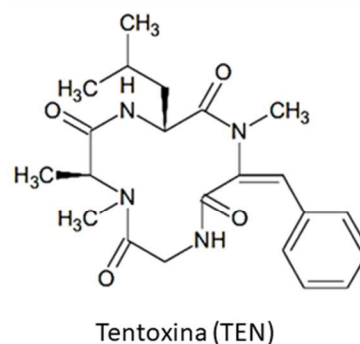


Figura I.1: Estructura química de las principales toxinas de *Alternaria* spp, adaptado de Zwickel y col. (2016).

iii- Derivados del ácido tetrámico



iv- Estructuras misceláneas



v- Derivados de la esfingosina

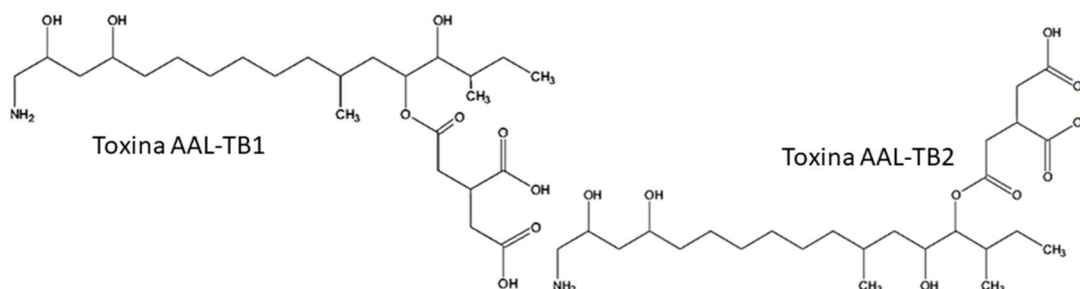


Figura I.1 (continuación): Estructura química de las principales toxinas de *Alternaria* spp, adaptado de Zwickel y col. (2016).

I.2.2.b.-Efectos toxicológicos

Si bien se sabe que *Alternaria* produce una gran cantidad y variedad de metabolitos secundarios, los estudios disponibles en bibliografía acerca de su toxicidad son limitados.

AOH y AME mostraron actividad mutagénica, citotóxica, estrogénica y genotóxica en células bacterianas y de mamíferos *in vitro*. En la mayoría de los estudios de genotoxicidad, AOH presentó mayor actividad que AME (Bensassi y col., 2012; Lehmann y col., 2006; Marko, 2007; Pfeiffer y col., 2007; Schreck y col., 2012; Solhaug y col., 2012). Ambas micotoxinas aumentaron significativamente la tasa de rupturas de las hebras de ADN en células de carcinoma de colon humano debido a sus efectos deletéreos sobre la actividad de topoisomerasas (Marko, 2007). Investigaciones recientes confirmaron la actividad de daño sobre el ADN, pero indicaron la necesidad de más estudios *in vivo*, especialmente focalizados en el tracto gastrointestinal (Solhaug y col., 2016; Solfrizzo, 2017). En cuanto al poder carcinogénico de estas micotoxinas, no existen estudios exhaustivos en animales. Sin embargo, en ratones alimentados con 50-100 mg de AME por kg de peso durante 10 meses, se desarrollaron alteraciones precancerosas en la mucosa esofágica (Yekeler y col., 2001). Además, su presencia ha sido relacionada con elevados

niveles de cáncer esofágico en humanos en Linxin, China por consumo de cereales contaminados (Liu y col., 1992; Ostry, 2008). Por otra parte, los trabajos acerca de la toxicidad de ALT muestran resultados contradictorios y poco concluyentes, pero hay cierta evidencia de toxicidad sobre algunas especies animales. Por un lado, su actividad citotóxica sobre larvas de *Artemia salina* presentó dosis letales medias (DL₅₀) de ALT muy superiores a las de TeA y AOH (Panigrahi y Dallin, 1994); mientras que su toxicidad aguda en ratones presentó una DL₅₀ muy inferior a la de ATX-I (50 y 200 mg/kg, respectivamente) (Fernández-Cruz y col., 2010).

Las ATXs presentaron actividad mutagénica en el test de Ames (Schrader y col., 2006; Scott y Stoltz, 1980; Stack y col., 1986; Stack y Prival, 1986). Dicha actividad en ratones fue superior a la de AOH y AME, siendo ATX-III la de mayor actividad dado que el potencial mutagénico de las ATXs aumenta con el número de grupos epóxido en la molécula, siendo ATX-I<ATX-II<ATX-III (Chelkowski y Visconti, 1992; Schrader y col., 2001 Scott, 2004; Stack y Prival, 1986). Fleck y col. (2012) mostraron que ATX-II es también un potente mutágeno en un sistema de células humanas *in vitro*, resultando esta propiedad al menos 50 veces más fuerte que la de AOH y AME. Además, se ha reportado que, a bajas dosis, ATX-II presenta un efecto citotóxico aditivo con AOH sobre líneas celulares humanas (Vejdovszky y col., 2017). Esta misma micotoxina fue la que mostró la mayor toxicidad contra células HeLa, seguida de AOH y ATL (Pero y col., 1973; Zwickel y col., 2016). Por otro lado, se ha demostrado la actividad promotora de tumores que presentan ATX-I y ATX-III en bioensayos con líneas celulares murinas y humanas (Osborne y col., 1988).

TeA es inhibidor de la síntesis proteica porque suprime la liberación de nuevas proteínas del ribosoma. Además de resultar tóxico para un amplio espectro de virus, bacterias, hongos y plantas, TeA causó emesis, salivación, taquicardia, hemorragias y gastroenteritis hemorrágica en ratas, ratones, perros y monos (Fraeyman y col., 2017). Debido a esto, es considerada la que presenta mayor toxicidad aguda entre las micotoxinas de *Alternaria* (Asam y Rychlik, 2013; Bottalico y Logriego, 1998). Existen pocos estudios actuales sobre la toxicidad de TeA en animales; en aquellos disponibles en la bibliografía, se reportaron DL₅₀ entre 81 y 225 mg/kg de peso corporal en ratones (Miller y col., 1963; Smith y col., 1968). En perros, la ingesta de dosis diarias de 10 mg/kg de peso corporal, provocó la aparición de hemorragias en diversos órganos. En pollos, una dosis sub-letal de 10 mg/kg en el pienso mostró toxicidad sub-aguda; pero el incremento progresivo hacia dosis letales disminuyó la eficiencia alimenticia, suprimió la ganancia de peso e incrementó las hemorragias internas en las canales. Además, el consumo de sorgo contaminado con TeA se ha relacionado con la aparición de un desorden hematológico en humanos conocido como Onyalai, una forma de trombocitopenia que parecería ocurrir solamente en zonas del sur y centro de África (Ostry, 2008; Steyn y Rabie, 1976). Sin embargo,

no se ha demostrado efecto mutagénico de TeA en cultivos bacterianos (Schrader y col., 2006; Scott y Stoltz, 1980). Al igual que con AME, los ratones que consumieron pienso contaminado con TeA durante 10 meses desarrollaron alteraciones en la mucosa esofágica, pero en este caso, la dosis diaria fue de 25 mg/kg de peso corporal (Yekeler y col., 2001).

En relación a sus efectos sobre las plantas, las toxinas de *Alternaria* spp. se dividen en toxinas no específicas de hospedador y toxinas específicas de hospedador (HSTs). Las primeras afectan a una amplia variedad de especies vegetales e incluyen por ejemplo a TEN, su derivado dihidrotentoxina (DHTEN), TeA y zinniol. El TeA inhibe la síntesis proteica, mientras que el zinniol afecta la permeabilización de la membrana y la TEN inhibe la fosforilación debido a que se une a la enzima ATP sintetasa del cloroplasto (Lou y col., 2013; Thomma, 2003). Las HSTs afectan a un menor número de especies vegetales; causando por lo general alteraciones severas en determinadas plantas donde se desarrolla la especie de *Alternaria* productora de las mismas. Entre éstas, se puede mencionar la toxina AM en manzanas, toxinas AAL en tomates, toxina AF en frutillas y toxina AK en pera japonesa (Lou y col., 2013; Tsuge y col., 2013). Aunque se han determinado los mecanismos de acción de algunas HSTs, todavía existen pocos estudios sobre su toxicidad en animales y en general se desconocen los efectos en humanos (Barkai-Golan y Paster, 2008).

Otros metabolitos con bioactividad reportados son altenuisol (ATL), que mostró efectos tóxicos en células de mamíferos *in vitro*, y altenusina (ALN), que presenta actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria (Cota y col., 2008; Lou y col., 2013; Nemecek y col., 2012).

I.2.2.c.-Incidencia de micotoxinas en alimentos

Como se mencionó anteriormente, la exposición a micotoxinas ocurre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, tanto para humanos como animales. Las toxinas de *Alternaria* se han hallado en una gran variedad de productos agrícolas y derivados.

En cereales, la presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. se ha reportado en numerosas ocasiones. Esto puede deberse a que algunas especies son fitopatógenas e infectan la planta en el campo; además de que si el almacenamiento de los granos se da en condiciones favorables para el crecimiento del hongo, éste también puede colonizar en la etapa postcosecha. Se han detectado AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I y TEN en granos de trigo, cebada, avena, mijo, centeno, arroz y maíz (Blandino y col., 2017; EFSA, 2016; Hertz y col., 2016; Logrieco y col., 2009; Scott, 2001). El procesado de los granos de cereales no elimina las micotoxinas presentes ya que muestras de cereales para desayuno, harina, pasta y cerveza contuvieron AOH, AME y/o TeA

(Aresta y col., 2003; Asam y col., 2011; Azcárate y col., 2008; Abd El-Aal, 1997; EFSA, 2011; Siegel y col., 2010). También se ha detectado la presencia de AME en papillas infantiles y TeA en alimentos infantiles que incluían cereales en su composición, lo cual causa especial preocupación, ya que la población destino de estos alimentos es particularmente susceptible, sobre todo teniendo en cuenta que suelen ser la base fundamental de su alimentación (EFSA, 2011).

En semillas de oleaginosas como colza, girasol, sésamo y lino también se ha detectado la presencia de AOH y AME. En las semillas de colza y lino se halló además ALT, y en las de girasol y sésamo, TeA. TEN se ha aislado a partir de semillas de girasol y ATX-I de semillas de sésamo. Por otra parte, las mismas toxinas que contaminaban las semillas se detectaron en muestras de aceite de girasol y sésamo (EFSA, 2011; Kralova y col., 2006; Skarkova y col., 2005). Asimismo, se han encontrado estas toxinas en legumbres como las lentejas y la soja; y en frutos secos como pistacho y avellanas (Barros y col., 2011; EFSA, 2016; Ostry y col., 2004).

En numerosas frutas (manzana, pera, melón, damasco, ciruelas, uvas, pasas de uva, frutilla, aceituna, cítricos e higos) y hortalizas (tomate, papa, pimiento y zanahoria) se ha reportado la presencia de AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I y TEN (Asam y col., 2011; Bottalico y Logrieco, 1998; EFSA, 2016; Logrieco y col., 2009; Stinson y col., 1981). El consumo directo de frutas y hortalizas con contaminación fúngica visible es poco probable. Sin embargo, no es infrecuente aislar toxinas de *Alternaria* spp. a partir de alimentos procesados como salsas de tomate, ketchup, tomates desecados, conservas, mermeladas, vino o jugos de frutas (manzana, tomate, uva, naranja, arándanos) (Ackermann y col., 2011; Da Motta y Soares, 2001; Delgado y Gomez-Cordovés, 1998; EFSA, 2016; Fente y col., 1988; Giryn y Szteke, 1995; Lau y col., 2003; Logrieco y col., 2009; Magnani y col., 2007; Noser y col., 2011; Scott, 2001; Scott y col., 1997; 2006; Scott y Kanhere, 1980; Stack y col., 1985; Solfrizzo y col., 2004). Esto podría deberse a que las industrias procesadoras no siempre disponen de métodos eficientes para detectar y eliminar completamente las materias primas con algún grado de alteración fúngica. Entonces, una incorrecta selección de la materia prima que se destina a industrialización podría conducir a productos finales contaminados. Es importante tener en cuenta que aunque se eliminen las zonas visiblemente afectadas por el hongo, las toxinas pueden difundir a los tejidos circundantes, permaneciendo en el producto final (Robiglio y López, 1995).

I.2.2.d.-Estado actual sobre la legislación de las toxinas

Teniendo en cuenta la falta de información con respecto a la toxicidad en humanos, es complicado determinar los niveles máximos permitidos para estas toxinas en alimentos que resulten seguros para el consumo, lo cual dificulta establecer límites regulatorios por las autoridades competentes. Sin embargo, la frecuencia de contaminación en diversos grupos de alimentos, especialmente en alimentos industrializados destinados a niños, es un motivo de preocupación que demanda una inminente atención por parte de las autoridades sanitarias y de control a nivel mundial. En los últimos años, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) ha reunido grupos de expertos para analizar la información de la que se dispone hasta el momento y establecer criterios para fijar los límites máximos permitidos de las toxinas de *Alternaria* en los alimentos más afectados, de los cuales surgieron dos informes sobre el tema (EFSA, 2011; 2016). En el informe de 2011 se concluyó que los datos de toxicidad y de exposición dietaria eran insuficientes para establecer límites en los alimentos susceptibles. Sin embargo, se pudo determinar que, en los países europeos, la mayor contribución de AOH, AME, TeA y TEN a la dieta está dada por el consumo de granos, frutas y vegetales, y entre estos últimos, particularmente, por productos a base de tomate (EFSA, 2011). En 2016, un nuevo informe de la EFSA evaluó la exposición dietaria a toxinas de *Alternaria* en la Unión Europea. En este último, se concluyó que, si bien los datos siguen siendo limitados, las personas con dietas vegetarianas tendrían una mayor exposición dietaria a dichas toxinas que la población general. Los mayores niveles de las cuatro toxinas principales de *Alternaria* (AOH, AME, TeA y TEN) están asociados, entre otros, a tomate y productos procesados derivados, alimentos para niños a base de cereales, aceites vegetales y frutas, como la pera (EFSA, 2016). Debido a la falta de datos de los efectos de las micotoxinas de *Alternaria* en humanos, en los informes de la EFSA se utilizó el enfoque de umbral de preocupación toxicológica "TTC" (del inglés, threshold of toxicological concern) para evaluar los niveles relativos que pueden ser preocupantes para la salud humana. Este enfoque deduce el riesgo potencial de un producto químico a partir de su estructura en comparación con sustancias con estructura similar y toxicidad conocida, utilizando también los datos de contaminación natural. Ha sido desarrollado para evitar ensayos innecesarios con animales y puede utilizarse para sustancias químicas de toxicidad desconocida o poco clara. Se basa en el concepto de que puede darse una garantía razonable de seguridad, incluso en ausencia de datos de toxicidad específicos, siempre que la ingesta sea menor a un valor umbral determinado por la evaluación basada en la estructura (Asam y Rychlik, 2013; JECFA, 2006; Munro y col., 2008). En el primer informe emitido por EFSA (2011), se estableció un valor de TTC de 2,5 ng/kg de peso corporal por día para AOH y AME

teniendo en cuenta su genotoxicidad. Por otro lado, TEN fue considerada como no dañina debido a los pocos datos de contaminación natural (EFSA, 2011; Zwickel y col., 2016). Con respecto a TeA, se recomendó un valor de TTC de 1500 ng/kg de peso corporal debido a su toxicidad aguda. Recientemente, se publicaron trabajos realizados en Alemania con el objetivo de dilucidar la exposición real de la población local a TeA, teniendo en cuenta la dieta y el nivel de contaminación (Hickert y col., 2016; Rychlik y col., 2016). En los mismos se concluyó que los alimentos para infantes basados en sorgo o mijo representan un riesgo potencial para la salud de los niños debido a la elevada contaminación con esta micotoxina. La autoridad sanitaria y de seguridad alimentaria de Bavaria, Alemania (LGL) decidió establecer un límite de 500 µg/kg para el contenido de TeA en esos alimentos, siendo esta la primera decisión oficial de autoridades en lo que respecta a micotoxinas de *Alternaria* en el mundo (Hickert y col., 2017; Rychlik y col., 2016).

I.3. Cultivos de importancia agronómica en Argentina susceptibles a *Alternaria* spp.

Se han descrito alteraciones provocadas por *Alternaria* spp. en una gran variedad de cereales, hortalizas y cultivos frutales, tanto leñosos como herbáceos (Logrieco y col., 2009; Ostry, 2008).

A continuación, se detalla la importancia de los cultivos analizados en el presente trabajo de Tesis en Argentina, así como los desórdenes que puede ocasionar *Alternaria* en los mismos.

I.3.1- Arándanos

Los arándanos (*Vaccinium angustifolium*) se agrupan dentro de los llamados “frutos rojos” o “frutas finas”, que representan aproximadamente el 2 % de la producción mundial de frutos (Del Río y col., 2010). Estos frutos han cobrado importancia en los últimos años entre los investigadores del ámbito de la salud con respecto a su rol en la prevención de enfermedades crónicas (Rao y Snyder, 2010). Sus beneficios incluyen la prevención de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, obesidad, infecciones y enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Dembinska-Kiec y col., 2008; Pappas y Schaich, 2009; Takikawa y col., 2010). Además, es una fruta baja en calorías y sodio, fuente de fibras y pectinas con una alta concentración en vitamina C. Los arándanos son tradicionalmente consumidos en Estados Unidos, Japón y algunos países de Europa, tanto como fruta fresca, congelados o manufacturados (jugos, tortas, mermeladas, salsas, helados). Durante los últimos años se ha registrado un significativo aumento de la superficie cultivada con frutos rojos en Argentina, debido a la creciente demanda comercial. La producción argentina de arándano es

relativamente nueva, aunque constituye uno de los principales cultivos en auge durante los últimos años. De hecho, el arándano ha logrado convertirse en la sexta fruta fresca exportada por Argentina en 2017, detrás de la pera, el limón, la naranja, la manzana y la mandarina (SENASA, 2017b). El consumo interno es bajo, por lo cual más del 90 % de la producción total se exporta, principalmente a Estados Unidos, seguido por Reino Unido y Europa continental y, en menor medida, Canadá y Asia (ABC, 2017; Greco y col., 2012). La principal ventaja comercial que presenta nuestro país es que se produce en contraestación con respecto a los principales productores y consumidores mundiales; la mayor parte de la cosecha comienza a mitad de septiembre y se extiende hasta mediados de diciembre, justo cuando el hemisferio Norte carece de frutos frescos por haber culminado su cosecha dos meses antes. El cultivo de arándano tiene gran desarrollo en el NEA (Entre Ríos, Corrientes), NOA (Tucumán, Salta, Catamarca) y, en menor medida, en el centro del país (Buenos Aires).

La pudrición por *Alternaria* spp. es una de las enfermedades postcosecha más comunes detectadas en distintas regiones productivas del país, además de atizomamiento de tallos y hojas (*Pestalotiopsis guepini*, *Glomerella cingulata*, *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp.), muerte de esquejes (*Fusarium* sp.) y marchitamiento (*Phytophthora* sp.) (Wright y col., 2005). En un estudio realizado entre 2003 y 2005, *A. tenuissima* fue el microorganismo de mayor incidencia y prevalencia en arándanos procedentes de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba, en todas las épocas del año (Wright y col., 2005). *A. tenuissima* es capaz de causar lesiones en el campo, tanto a nivel de hoja y tallo, como en los frutos ya maduros (Ramallo y col., 2009). La principal vía de ingreso de *Alternaria* al fruto es a través de la cicatriz peduncular que se produce durante el desprendimiento de la fruta en la cosecha. El signo inicial de esta enfermedad es la presencia de micelio blanco sobre alguna herida, que al cabo de 2 o 3 días es más tupido cubriendo al fruto en forma total o parcial. En esta etapa se observa la producción de micelio verde oliva, marrón o negro, según la cepa fúngica involucrada. La fruta infectada se vuelve blanda y arrugada (Ramallo y col., 2009). Las características de las lesiones de *Alternaria* spp. en los frutos se muestran en la Figura I.2.



Figura 1.2: Lesiones de *Alternaria* spp. en frutos de arándanos, tomado de la guía para la identificación de desórdenes en arándanos (Canada-BC Agri-Innovation Program, 2018).

1.3.2- Pimiento

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate, el tabaco y la papa. Se cosecha para consumo en el estado de frutos verdes (a completo desarrollo) o de frutos maduros (amarillos o rojos). El pimiento se destina a consumo en fresco, así como a industrialización (en conserva, molido). Además, tiene aplicación en la industria cosmética y farmacéutica (Javaid e Iqbal, 2014). Tiene un valor nutritivo elevado, especialmente en vitaminas A, C y E, así como un alto contenido de antioxidantes.

Argentina es el principal productor de pimientos de Sudamérica, con un rendimiento anual de más de 145.000 tn producidas en 6.500 ha cosechadas (FAOSTAT, 2017). En nuestro país existen cultivos en diversas regiones, desde el norte en Jujuy hasta el sur en Río Negro; las principales zonas productoras se localizan en Buenos Aires, Salta, Corrientes, Formosa, Mendoza, Jujuy. La mayor parte de la producción se destina a consumo interno, siendo las semillas de la planta y los productos industrializados como el pimentón los que se destinan a exportación. La mayor parte de la producción de la provincia de Buenos Aires se destina a consumo en fresco y corresponde al 22 % de los ingresos de este vegetal al Mercado Central. Posee una ventaja que es la cercanía al mayor centro de consumo (Capital Federal y Gran Buenos Aires), pero la

demanda de este gran mercado se contrae durante el período estival debido a las vacaciones, por lo que parte de la oferta platense es comercializada en ciudades como Rosario, Bahía Blanca, Córdoba y Mar del Plata. Una vez cosechados, los pimientos son almacenados a temperaturas cercanas a 7,5 °C, temperatura a la cual se maximiza su vida útil (3-5 semanas) (Cantwell, 1996). El almacenamiento a menor temperatura (5 °C), si bien reduce la pérdida de agua, favorece la aparición de síntomas de daño por frío, uno de los desórdenes fisiológicos más comunes en estos frutos (Cantwell, 1996).

El pimiento es susceptible a diferentes enfermedades pre- y postcosecha incluyendo antracnosis, causado por *Colletotrichum capsici*, e infecciones por *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp. (Edirisinghe y col., 2014; Troncoso y col., 2005). Diferentes especies de *Alternaria* se han aislado de pimientos en otras regiones del mundo, incluyendo *A. alternata*, *A. brassicae*, *A. solani*, *A. capsici*, *A. dauci*, *A. longipes*, *A. porri* y *A. tenuissima*, siendo *A. alternata* y *A. solani* las más frecuentemente reportadas (Nasehi y col., 2014). Además de las especies patógenas que colonizan la planta a través de las flores, especies saprófitas pueden también causar lesiones en los frutos a través de heridas en la piel causadas por insectos, enfriamiento, daño mecánico, quemado por el sol o deficiencia de calcio (Hochmuth y Hochmuth, 2009; Wall y Biles, 1993). El daño causado por *Alternaria* en los frutos se da en el campo o en la etapa de almacenamiento, siendo esta última más frecuente. Ocasiona una podredumbre que comienza como una lesión pequeña, circular y ligeramente hundida en los frutos de pimiento que presenten grietas u otras heridas; las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del fruto, incluyendo el cáliz. Las manchas se vuelven grises aterciopeladas a medida que se van produciendo más esporas y se van necrosando los tejidos adyacentes (Figura I.3). Cuando la infección se da en la flor, la lesión aparece en el interior del fruto como manchas oscuras, pequeñas y de márgenes bien delimitados en la cara interior del pericarpo, la placenta y las semillas (SINAVIMO, 2017).



Figura I.3: Lesiones de *Alternaria* spp. en frutos de pimiento.

1.3.3- Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*, sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.) también pertenece a la familia Solanaceae y es uno de los cultivos de hortalizas más importantes a nivel mundial, tanto para consumo en fresco como para industrialización. En Argentina, es el segundo cultivo frutihortícola en importancia luego de la papa, con 406.000 tn producidas en 2016, cuyo destino mayoritario es el consumo interno (Argerich, 2017). Es uno de los principales productos hortícolas del mercado que se consume en fresco, lo cual en parte se debe a su producción continua a lo largo del año debido a la extensión en latitud de los cultivos. Las regiones productoras se ubican principalmente en el NOA, Cuyo, Río Negro y Buenos Aires. En esta última, se cultiva una variedad de tomate redondo, el tomate platense, destinada principalmente a consumo en fresco y que abastece los mercados de Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Gran Buenos Aires. Con respecto al tomate industrializado, si bien la mayor parte también se destina a consumo local, una fracción se exporta. En 2016, la exportación de salsas representó el 41 % del total exportado, siendo los principales destinos de este producto los mercados paraguayo y uruguayo. Le siguieron en importancia los concentrados de tomate (32 % sobre el total), cuyo principal destino fue Paraguay, y los tomates pelados (27 %), que se exportaron mayoritariamente a Brasil (Argerich, 2017).

Durante el almacenamiento de tomate es importante evitar las temperaturas muy bajas dado que este fruto es altamente susceptible a sufrir daño por frío. Por debajo de 10 °C, los síntomas observados incluyen defectos en la maduración y en el desarrollo de color y sabor, desarrollo de color irregular, ablandamiento prematuro y aumento de la susceptibilidad a enfermedades, especialmente la causada por *Alternaria* spp. Las lesiones ocasionadas por daño por frío son acumulativas y pueden comenzar en el campo antes de la cosecha. Los tomates cosechados verde maduro se almacenan a 12,5 °C sin pérdida en el desarrollo de color y caracteres sensoriales hasta 2 semanas, mientras que los frutos maduros se almacenan a temperaturas entre 7 y 12 °C (Suslow y Cantwell, 1997).

La contaminación del cultivo de tomate con *Alternaria* spp. está bien establecida y se sabe que hay especies fitopatógenas que infectan en el campo, mientras que otras, saprófitas, lo hacen en la etapa postcosecha. *A. solani* es el agente causal de la enfermedad conocida como tizón temprano. Esta enfermedad ataca desde el trasplante hasta la maduración de los frutos, afectando tallos, frutos y sobre todo el follaje, produciendo manchas irregularmente circulares con anillos concéntricos y rodeadas de un halo amarillento. Los frutos pueden presentar manchas necróticas oscuras, cóncavas, deprimidas en la zona peduncular. Las condiciones predisponentes para que se desarrolle son las altas temperaturas y la alta humedad. Además,

A. arborescens es el agente causal del cáncer del tallo, caracterizada por manchas marrón oscuras a negras con anillos concéntricos en la zona del tallo cercana al suelo, generalmente asociadas a heridas producidas por la poda de pecíolos. Estas lesiones pueden crecer hasta rodear el tallo y causar la muerte de la planta. Conforme progresa la enfermedad, se enroscan los bordes de las hojas y éstas mueren posteriormente. En el fruto primero aparecen pequeñas manchas grises que luego crecen y se vuelven oscuras, hundidas y con anillos concéntricos característicos. Los síntomas pueden no detectarse en el fruto en el momento de la cosecha pero pueden desarrollarse durante el almacenamiento (Grogan y col., 1975; Malathrakis, 1983; Witsenboer y col., 1992).

Por otro lado, debido a su delgada piel, los frutos de tomate son muy susceptibles a la contaminación con especies de *Alternaria* saprófitas (Pose y col., 2009). La lesión del hongo negro (conocida como “black mould”) puede ser causada por diferentes especies de *Alternaria* de esporas pequeñas en los frutos que tengan algún tipo de alteración fisiológica, como deficiencia nutricional, quemado por el sol, etc. La enfermedad se favorece con el clima cálido y húmedo, y es más severa si afecta frutos maduros en vez de verdes. Las lesiones se caracterizan por manchas circulares a irregulares, ligeramente hundidas, de color verde oscuro a negro correspondiente a la abundante esporulación del hongo (Logrieco y col., 2009; Figura I.4).



Figura I.4: Lesiones típicas de *Alternaria* spp. en frutos de tomate.

1.3.4- Trigo

El trigo es una monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceae). Este cultivo se clasifica en dos grupos: los trigos duros o fideo (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) y los trigos harineros o pan (*Triticum aestivum*, subsp. *vulgaris*). La región triguera típica de Argentina ocupa las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Buenos Aires, Córdoba y La Pampa. Sobre la base de condiciones agroecológicas homogéneas para los requerimientos del cultivo, esta región se ha subdividido en 5 regiones productivas (I a V), subdivididas a su vez en subregiones (N o S) (Figura I.5). Las regiones IIS, IV, VS y IIN son las principales áreas productivas, con máximos de temperatura y humedad incrementándose progresivamente de VS a IV, IIS y IIN. La siembra del trigo de ciclo largo comienza entre los meses de mayo y junio, y la floración se da en primavera, durante septiembre a noviembre, con temperaturas promedio en el campo de 15 a 25 °C, y alcanzando máximos de temperatura ocasionales de 35 °C en la región IIN (Patriarca y col., 2014). Durante el período 2015-2016, el cultivo de trigo de más de 11 millones de toneladas en alrededor de cuatro millones de hectáreas sembradas representó el 12 % de los cultivos extensivos sembrados en Argentina, siendo el segundo en importancia luego de la soja (Copati y Brihet, 2015; Trigo Argentino, 2017). A pesar de que el trigo es el principal cereal para consumo humano, con un consumo promedio de 85-90 kg por habitante por año, un elevado porcentaje se destina a exportación, con un total de 9,9 millones de toneladas exportadas en la campaña 2016-17 (Joseph, 2017; SENASA, 2017a).

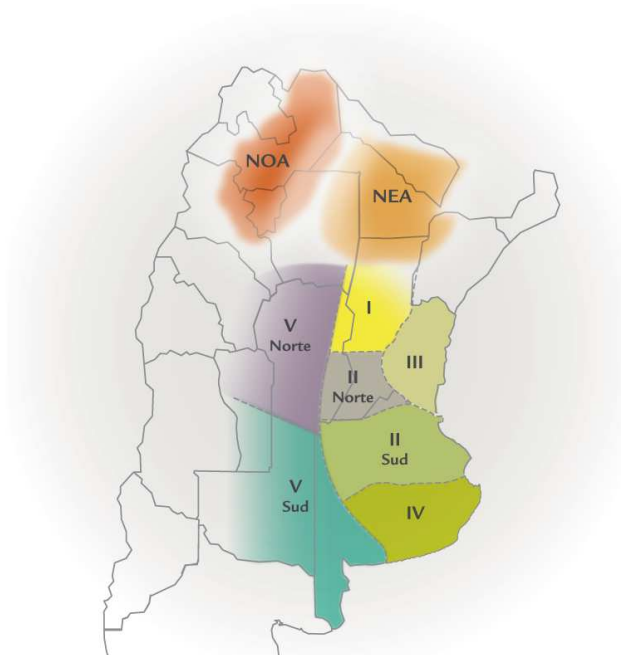


Figura I.5: Zonas productoras de trigo en Argentina, separado por subregiones. Tomado de Trigo Argentino, 2017.

Varias especies de *Alternaria* de esporas pequeñas han sido aisladas de trigo, siendo *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. triticina* y *A. infectoria* las predominantes (Joshi y Miedaner, 2003; Kosiak y col., 2004; Mercado Vergnes y col., 2006; Prasada y Prabhu, 1962). Éstas son las especies reconocidas como patógenas del trigo, ya que sus tubos germinativos pueden formar estructuras similares a apresorios, y penetrar la epidermis directamente o a través de los estomas (Magan y col., 1984; Rotem 1994). La germinación de las esporas, su distribución e infección puede producirse durante breves períodos húmedos, a pesar de ser interrumpidos por días secos. El resto de las especies de *Alternaria* halladas en trigo parecen ser principalmente saprófitas. *A. alternata* es frecuente en las espigas maduras desde la antesis hasta la cosecha (Müller y Korn, 2013).

Alternaria triticina es el agente causal de la plaga de la hoja (conocida como “*Alternaria leaf blight*”) y puede causar daño importante especialmente en condiciones de humedad elevada. La infección es evidente en un principio como lesiones pequeñas, ovaladas y descoloridas, irregularmente distribuidas en las hojas. Cuando las lesiones se agrandan, se vuelven de color marrón oscuro a gris y de forma irregular. Algunas están rodeadas por márgenes amarillos brillantes. A medida que la enfermedad progresa, varias lesiones se unen para cubrir grandes áreas, resultando en la muerte de toda la hoja. Si la infección ocurre en la etapa de pre-antesis, las semillas no se forman. La infección en la etapa de desarrollo de la semilla da lugar a la infección de la espiga y del grano. Los granos infectados con *A. triticina* a menudo son arrugados, con una decoloración marrón de su superficie, quedando además pequeños, con una reducción en peso del 46-75 % (Prabhu y Prasada, 1967; Raut y col., 1983). Se ha reportado que los granos de aspecto normal pueden también albergar el patógeno (Logrieco y col., 1990).

A. alternata y *A. infectoria* están asociadas a la enfermedad del punto negro del trigo (conocida como “black point”), que se caracteriza generalmente por la aparición de puntos marrón oscuro a negros cubriendo el embrión o gérmen del grano (Figura I.6). En los casos severos, la decoloración ocurre también en el epicarpio y en el tejido interno de la cubierta, y puede extenderse a lo largo de la ranura en el lado ventral del grano (Mónaco y col., 2004; Perelló y col., 2008; Williamson, 1997). Se ha sugerido que el “black point” afecta el procesamiento posterior del grano de trigo, ya que disminuiría su calidad panadera al modificar el perfil proteico, pero el alcance de este deterioro no es claro (Mak y col., 2006). Sin embargo, la disminución del valor nutritivo, la decoloración y la pérdida de sabor reducen la calidad de los productos de trigo contaminado (Vučković y col., 2012).



Figura 1.6: A. Granos de trigo afectados por “black point”. B. Espiga de trigo infectada con *Alternaria*. Tomado de banco de imágenes (Arkive, 2018).

I.4. Incidencia de *Alternaria* spp. y sus toxinas en Argentina

El desarrollo de *Alternaria* spp. causa en Argentina serias pérdidas en diversos cultivos, tales como arándanos, tomate, duraznos, manzanas, peras, uva, cítricos, trigo, maíz, semillas de amaranto, semillas de quínoa, girasol, sorgo, arroz, avena y semillas de soja (Bresler y col., 1995; Broggi y col., 2007; Da Rocha Rosa y col., 2002; Dobra y col., 2010; Greco y col., 2012; Gutiérrez y col., 2010; Pappier y col., 2008; Patriarca y col., 2007; Perelló y Sisterna, 2006; 2008; Peres y col., 2003; Pose y col., 2004; 2010b; Robiglio y Lopez, 1995; Sacchi y col., 2009; Somma y col., 2011; Torres y col., 1998; Vargas Trinidad y col., 2015).

Sin embargo, en nuestro país se dispone de muy pocos estudios sobre la contaminación natural de las toxinas de *Alternaria* en alimentos, ya sea en materias primas o productos procesados. Azcárate y col. (2008) detectaron la presencia de AOH, AME y TeA en altos niveles en trigo cultivado en las provincias de Buenos Aires y La Pampa en la cosecha correspondiente a 2004-2005. Además, Chulze y col. (1995) reportaron la presencia de las mismas micotoxinas en semillas de girasol (85, 47 y 65 % de las muestras contaminadas con AOH, AME y TeA, respectivamente). Un estudio realizado sobre 50 muestras de porotos de soja mostró que el 60 % presentaba contaminación con AME y/o AOH (Oviedo y col., 2012). Por otro lado, Terminiello y col. (2006) analizaron 80 muestras de puré de tomate comercializadas en supermercados de Buenos Aires, de las cuales el 49 % presentaba contaminación con al menos una de las toxinas analizadas (AOH, AME y TeA). Por último, Broggi y col. (2013) reportaron la presencia de AOH

en 13 muestras de vinos y jugos comercializadas en Entre Ríos, sobre un total de 177 muestras; AME fue detectado con menor frecuencia, sólo en 4 de las muestras.

A pesar de que *Alternaria* spp. es aislada frecuentemente de diferentes cultivos en Argentina, son escasos los datos acerca de la variabilidad y diferenciación de estas poblaciones en el país. Teniendo en cuenta que Argentina es uno de los mayores países agroexportadores del mundo, es necesario comprender el comportamiento fisiológico de estos patógenos en un contexto de seguridad alimentaria. Más aún, en la actualidad no hay límites de legislación ni recomendaciones para los metabolitos de *Alternaria* a nivel mundial que alcancen escala nacional o de comunidades económicas, aunque su relevancia en alimentos está en discusión y es posible que países europeos avancen con su regulación en un futuro inmediato. El primer antecedente ocurrió muy recientemente en una región de Alemania donde se establecieron los primeros límites para TeA (sección 1.2.2.d), y es probable que éstos se extiendan rápidamente a otras regiones hasta alcanzar nivel nacional e internacional. Por ello, es necesario un conocimiento profundo de las poblaciones autóctonas, su distribución en los distintos grupos de alimentos, su diversidad y capacidad toxicogénica, para establecer un programa de control en los alimentos susceptibles a la contaminación. De esta manera se podrán diseñar estrategias de prevención para reducir el riesgo asociado al consumo de alimentos contaminados, reducir pérdidas económicas en el sector productivo y evitar trabas comerciales en los mercados de exportación en un futuro cercano.

II. OBJETIVOS



II.1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es evaluar la incidencia de *Alternaria* spp. en diferentes cultivos de interés agroeconómico en Argentina (cereales, frutas y hortalizas) y caracterizar su distribución en los mismos, su capacidad toxicogénica y la respuesta a factores externos. Estos datos permitirán conocer el riesgo micotoxicológico que representa su presencia en alimentos y se utilizarán para desarrollar estrategias de prevención mediante técnicas amigables con el ambiente.

II.2. Objetivos específicos

- Determinar la incidencia y distribución de integrantes del género *Alternaria* en cuatro agroalimentos de importancia económica: arándanos, pimiento, tomate y trigo.
- Analizar la variabilidad de los perfiles de producción de metabolitos secundarios de los aislamientos y evaluar su uso como herramienta taxonómica.
- Determinar la capacidad de producción de metabolitos secundarios con conocida actividad biológica (micotoxinas y fitotoxinas) por los distintos grupos de aislamientos.
- Caracterizar la variabilidad genética de los aislamientos mediante la secuenciación de regiones conservadas.
- Evaluar la existencia de especificidad de sustrato en las cepas y/o aislamiento geográfico por comparación con otras regiones del mundo.
- Caracterizar a los aislamientos mediante un enfoque polifásico combinando diferentes tipos de datos (morfológicos, metabolómicos, moleculares) de manera de lograr una segregación en grupos robustos.
- Determinar la contaminación con las micotoxinas más importantes de *Alternaria* spp. en sustratos sobre los que aún no existen datos en Argentina, como el pimiento.
- Desarrollar una metodología por qPCR que permita estudiar cambios en la expresión de la vía de la integridad de la pared celular fúngica (CWI) frente a distintos factores externos.
- Evaluar el comportamiento ecofisiológico en medio modelo a base de tomate de cepas de *Alternaria* aisladas de ese sustrato en cuanto al crecimiento, expresión de la vía CWI y producción de micotoxinas.
- Estudiar la eficacia de diferentes agentes de biocontrol, tales como levaduras y péptidos antifúngicos, como estrategias de bajo impacto ambiental para el control del crecimiento y

la acumulación de micotoxinas de *Alternaria* spp. en tomate, así como su efecto sobre la expresión de la vía CWI.

- Comparar el efecto de un antifúngico natural (péptido de origen fúngico) con el de uno sintético sobre el crecimiento, expresión de la vía CWI y producción de micotoxinas en *Alternaria* spp. en medio modelo a base de trigo.

III. CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA DE POBLACIONES DE *ALTERNARIA*



III.1. INTRODUCCIÓN

III.1.1. *Características morfológicas de Alternaria spp.*

Las especies del género *Alternaria* forman parte del grupo de los hongos dematiáceos. Este grupo está constituido por una gran variedad de organismos que se caracterizan por la presencia de abundante melanina en la pared celular, lo que les otorga coloración oscura (marrón a negra) (Pappas, 2012). Esta última contribuye también a su patogenicidad (Richardson y Moore, 2017).

Una de las principales características taxonómicas de *Alternaria* es la producción de conidios grandes, multicelulares, de color oscuro (melanizados), con septos transversales y longitudinales (feodictiosporas). Estas esporas se caracterizan por ser más anchas en la base, afinándose gradualmente hacia un pico o ápice elongado, dándole un aspecto de clava. Se pueden producir aisladas, o más comúnmente, en cadenas simples o ramificadas, a partir de conidióforos tabicados y erectos. La reproducción ocurre por gemación de la célula apical, a partir de la cual se origina un nuevo conidio, generándose de esta manera cadenas de conidios de longitud variable (reproducción simpodial). La producción de ascomas ha sido reportada solamente para *A. infectoria* gr.-esp. (Johnson y col. 2002; Kwaśna y Kosiak 2003; Kwaśna y col. 2006; Simmons, 2007). La existencia de estado sexual en *A. alternata* ha sido propuesta y discutida en varias ocasiones, pero no se ha hallado en la naturaleza hasta el momento (Bock y col., 2005; Morris y col., 2000).

III.1.2. *Reseña histórica de la taxonomía de Alternaria spp.*

El término *Alternaria* fue establecido por Nees en 1816 y desde entonces su taxonomía y la de los géneros relacionados, descritos como “alternarioides”, ha sido disputada. En la actualidad, la clasificación a nivel de especie del género *Alternaria* es muy confusa. Varios sistemas de identificación coexisten, generando la controversia que muy frecuentemente acompaña su clasificación. La taxonomía basada en la descripción de caracteres morfológicos ha sufrido numerosas revisiones, que se pueden dividir en cuatro etapas. En la primera etapa (1816-1850) se describieron los géneros *Alternaria* Nees 1816, *Brachycladium* Corda 1838, *Macrosporium* Fr. 1832, *Stemphylium* Wallr. 1833, y *Ulocladium* Preuss 1851. Sólo unas pocas especies fueron detalladas y se tomó como especie tipo a *A. tenuis* Nees 1816. En la segunda etapa (1850s-1930s) se describieron alrededor de 400 especies de *Alternaria* y *Macrosporium*. Hacia el final del período, se publicó el primer intento de revisar la taxonomía de ambos géneros (Elliott, 1917). En éste, se clasificó a las especies en grupos morfológicos basados en características de los

conidios y se propusieron seis grupos morfológicos de *Alternaria* con una especie representativa de cada uno. A continuación, en el período 1930-1960, comienzan a aparecer los problemas de nomenclatura, ya que en cada intento de definir al género *Alternaria*, se encontraban numerosos taxones muy similares a las especies tipo de *Alternaria*, *Macrosporium*, o *Stemphylium*. Wiltshire (1933) publicó que *Macrosporium* debía ser suprimido como *nomen ambiguum* en favor de *Alternaria*, aunque esto no fue aceptado inmediatamente por la comunidad científica. Neergaard (1945) propuso tres secciones de *Alternaria*, basadas en la concatenación de los conidios: sección *Longicatenatae* tipificado por *A. tenuis* (= *A. alternata*) con cadenas de 10 o más conidios; sección *Brevicatenatae* tipificada por *A. tenuissima* con cadenas cortas de 3-5 conidios; y sección *Noncatenatae* tipificado por *A. brassicae* con conidios solitarios o que rara vez producen un conidio secundario. Joly (1964) basó su clasificación principalmente en el color, rigidez y simetría lateral de los conidios y dividió las especies de *Alternaria* en tres secciones: sección *Claro-seminae* con colores claros translúcidos a amarillentos; sección *Brunneo-seminae* con conidios oscuros, marrones a marrón-rojizos; y sección *Rigidae* con conidios que tienen un aspecto rígido con escasez de septos longitudinales. Los sistemas de clasificación mencionados no siguen las reglas de nomenclatura, no fueron ampliamente adoptados y no se utilizan hoy en día.

La etapa que va desde 1960s hasta la actualidad podría representarse a través de la figura de E. G. Simmons, quien realizó una reevaluación completa de todos los nombres y taxones relacionados con el género *Alternaria* a través del estudio minucioso de probablemente todas las descripciones publicadas, todas las muestras de colección y cepas viables. Al mismo tiempo, otros micólogos describieron varias especies nuevas, pero el número de las especies nuevas descritas por Simmons (aproximadamente 200) es el más grande de la historia de *Alternaria*. Hasta la década de 1970, todos los Hyphomycetes con phaeodictiosporas fueron divididos en tres grandes géneros: *Alternaria*, *Macrosporium* y *Stemphylium*, aunque los límites genéricos eran absolutamente confusos. Un cuarto género, *Ulocladium*, fue ignorado por los taxónomos por más de 100 años. Esta etapa dio lugar a la abolición definitiva de *Macrosporium* debido a que la especie tipo del género, *M. cheiranthi*, fue considerada una especie de *Alternaria* (Simmons, 1992). Los géneros *Alternaria*, *Stemphylium* y *Ulocladium* fueron tipificados por primera vez por Simmons en 1967, donde se declaró a *A. alternata* como la especie tipo del género (Simmons, 1967). La diferenciación de los taxones se basó en una serie de rasgos morfológicos, particularmente en la forma de los conidios. En su segunda clasificación, Simmons (1992) describe una de las segregaciones más comunes del género hasta la actualidad. Esta es la distinción entre dos grandes grupos de acuerdo al tamaño de los conidios, el grupo de esporas

grandes (conidios 60-100 μm , solitarios) y el de esporas pequeñas (conidios <60 μm , concatenados). Además, en el trabajo de Simmons (1992) se desarrolló un sistema de clasificación utilizando características novedosas, por ejemplo, patrones tridimensionales de esporulación, forma de los conidios jóvenes y características de los septos. Así, se organizó el género en grupos-especie (gr.-esp.), para cada uno de los cuales se describe una especie representativa: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. porri*, *A. brassicicola*. Simmons definió a los grupos-especie como un grupo de taxones que producen patrones de esporulación similares y que comparten muchas de las características de los conidios. Sin embargo, esta clasificación subgenérica no guarda ninguna relación con la filogenia ni sigue las reglas nomenclaturales. Teniendo en cuenta que la morfología de los conidios se ve fuertemente influenciada por las diversas condiciones de cultivo como se había publicado anteriormente (Leach y Aragaki 1970, Zitter y Hsu, 1990), Simmons y Roberts (1993) delinearon condiciones de crecimiento estandarizadas óptimas para producir patrones de esporulación consistentes y reproducibles en *Alternaria* y los géneros relacionados. En este trabajo, se extendió la organización del género a un gran número de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas, utilizando el patrón tridimensional de esporulación como herramienta principal para la categorización en grupos-especie. Finalmente, Simmons (2007), en su manual de identificación, recopiló toda esta información y describió 273 taxones organizados en 13 grupos-especie, basándose en la observación de aislamientos bajo condiciones de cultivo estrictamente controladas y estandarizadas.

Sin embargo, como se mencionó previamente, muchas de las morfoespecies de *Alternaria* presentan diferentes características fenotípicas debido a pequeñas variaciones en la formulación de los medios de cultivo, la humedad relativa y la intensidad de la luz (Andrew y col., 2009). Este hecho dificulta la clasificación ya que mínimos cambios en estos factores pueden llevar a una identificación errónea, con lo cual los caracteres morfológicos utilizados por Simmons en su clasificación suelen ser insuficientes para la delimitación a nivel de especie. En particular, las especies de esporas pequeñas estrechamente relacionadas con *A. alternata* (miembros de *A. alternata* gr.-esp., *A. arborescens* gr.-esp. y *A. tenuissima* gr.-esp.) son muy susceptibles a mostrar variabilidad fenotípica por pequeños cambios en el ambiente. Estos grupos incluyen especies saprófitas, cosmopolitas, fitopatógenas y productoras de micotoxinas, siendo los más comúnmente reportados en alimentos.

III.1.3. Enfoques alternativos para la clasificación subgenérica de *Alternaria*

Teniendo en cuenta los problemas en la identificación actual de las especies de *Alternaria* mencionados en la sección anterior, es de gran utilidad el desarrollo de nuevas metodologías de clasificación basadas en un enfoque que abarque la mayor cantidad de información biológica posible, incluyendo morfología, bioquímica y biología molecular, y que permitan una segregación confiable de las poblaciones de *Alternaria*. Este abordaje holístico puede incluir por ejemplo, información química (proteínas, metabolitos secundarios), fisiológica (características macroscópicas de cultivos bajo diferentes condiciones de incubación, fuentes de carbono, velocidad de crecimiento), de patogenicidad y de biología molecular (secuenciación de ácidos nucleicos, perfiles obtenidos por tratamientos con enzimas de restricción), sumado a los caracteres morfológicos en medios de cultivo incubados en condiciones estandarizadas (Andersen y col., 2002; Cai y col., 2009; Frisvad y col., 2008; Oliveri y col., 2008; Rodrigues y col., 2009; Santos y col., 2010).

III.1.3.1.- Genómica y análisis filogenéticos

En los últimos años, la taxonomía fúngica ha ido virando hacia sistemas de identificación basados en métodos moleculares diseñados sobre regiones específicas del genoma, en un intento por reducir la subjetividad. Para esto, se han utilizado diferentes metodologías según el género o población que se pretende estudiar. Algunas de ellas permiten además estudiar la historia evolutiva del grupo de aislamientos y, mediante análisis filogenéticos, determinar la diferenciación a nivel de especie.

Con respecto a *Alternaria*, algunos de los grupos-especie descritos en la clave taxonómica de Simmons (2007) demostraron estar soportados como linajes monofiléticos en diversos estudios moleculares contemporáneos a dicha clave. Basándose en los resultados de la secuenciación de ITS (región de ADN entre las subunidades grande y pequeña del ARNr, del inglés internal transcribed spacer) y 18S mtSSU (subunidad pequeña mitocondrial, del inglés mitochondrial small subunit) se logró obtener diferencias robustas entre algunos de los grupos morfológicos, como *A. porri*, *A. brassicicola* y *A. radicina* (Hong y col., 2006; Pryor y Bigelow, 2003; Pryor y Gilbertson, 2000). Se amplió entonces el concepto de grupo-especie a grupos de taxones que comparten caracteres morfológicos de los conidios y que se separan como grupos monofiléticos en análisis filogenéticos basados en la secuenciación de ciertas regiones de ADN.

Sin embargo, diferentes tipos de métodos moleculares han sido estudiados con el objetivo de segregar los grupos a nivel de especie, pero han presentado resultados poco satisfactorios. En particular, las especies de esporas pequeñas estrechamente relacionadas con *A. alternata* han

sido estudiadas en profundidad con la intención de desarrollar un método molecular confiable, ya que su identificación basada en un único tipo de caracteres es difícil. Para estos grupos, se han estudiado las secuencias de numerosas regiones conservadas que resultan útiles para la diferenciación a nivel de especie en otros géneros fúngicos, tales como ITS, mtSSU, mtLSU, β -tubulina, actina, calmodulina, entre otros (Andersen y col., 2002; Andersen y col., 2009; Chou y Wu, 2002; Peever y col., 2004; Polizzotto y col., 2012; Pryor y Gilbertson, 2000; Serdani y col., 2002; Stewart y col., 2013). No obstante, no mostraron ser útiles para distinguir estos grupos de taxones de *Alternaria*. Entonces, se ha explorado la secuenciación de regiones alternativas del genoma, tales como un segmento del gen que codifica para la endopoligalacturonasa (*endoPG*), el gen del mayor alérgeno en *Alternaria* (*Alt a 1*), una proteína asociada a la maquinaria de traducción (*TMA22*), la CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferasa (*PGS1*); la subunidad catalítica de la ADN polimerasa zeta (*REV3*), la ATPasa de la membrana plasmática (*ATPDF*) y dos regiones anónimas no codificantes, OPA10-2 y OPA1-3 (Andrew y col., 2009; Armitage y col., 2015; Lawrence y col., 2013). En particular, *endoPG* mostró variabilidad entre especies aisladas de cítricos (Andrew y col., 2009; Peever y col., 2004), y ha sido usado para caracterizar *Alternaria* spp. de esporas pequeñas aisladas de estos y otros sustratos, mostrando potencial para determinar las relaciones evolutivas entre las especies íntimamente relacionadas con *A. alternata* (Armitage y col., 2015; Stewart y col., 2013; 2014).

III.1.3.2.- Metabolómica

Los metabolitos son moléculas pequeñas que se producen durante el metabolismo celular; su presencia está directamente relacionada con el fenotipo expresado y la actividad bioquímica. Aquellos directamente implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción normales son metabolitos primarios; mientras que los que no participan en estos procesos, se denominan metabolitos secundarios. Estos últimos pueden ser producidos por un número limitado de especies de un género, familia, orden o división; suelen tener significancia ecológica, e incluyen antibióticos, toxinas y otros compuestos excretados (extrolitos). La metabolómica consiste en el estudio sistemático de los perfiles químicos únicos que resultan de procesos celulares específicos (Bhatnagar y col., 2008). En este contexto, el metaboloma se define como la colección dinámica de moléculas pequeñas producidas por las células, y da una foto instantánea de su fisiología, permitiendo evaluar el fenotipo celular en una determinada condición (Bhatnagar y col., 2008; Patti y col., 2012). De esta forma, esta herramienta presenta un elevado potencial para la búsqueda de metabolitos bioactivos cuya biosíntesis no estaba asociada previamente a un determinado organismo o grupo de organismos.

Las técnicas de metabolómica se pueden dividir en dos grupos: dirigidas, en las cuales se determina un grupo de metabolitos por lo general centrándose en una o más vías intracelulares de interés relacionadas, y no dirigidas. Estas últimas se basan en el análisis de tantos metabolitos como sea posible y las muestras se comparan sin un sesgo previo. Por esto, son de alcance global y generan datos relacionados con el metabolismo celular de forma integral. Estos análisis determinan una huella dactilar del metaboloma para cada organismo, que luego se analiza mediante métodos estadísticos multivariados a fin de comparar poblaciones fúngicas e identificar metabolitos propios de grupo (Andersen y col., 2015; Frisvad y col., 2008). En su sentido más amplio, la quimiotaxonomía es la utilización de la diversidad química como herramienta taxonómica. En el área de hongos filamentosos, la quimiotaxonomía hace referencia a la clasificación e identificación fúngica basándose en perfiles de producción de metabolitos secundarios, tanto de estructura conocida como desconocida (Andersen y col., 2002; Frisvad y col., 2008).

En los últimos años, el desarrollo de técnicas que permiten evaluar el metaboloma ha ido aumentando. Este hecho se vio favorecido por el desarrollo de metodologías analíticas, la mayoría de ellas utilizando cromatografía líquida (HPLC) acoplada a espectrometría de masa (EM), que permiten la rápida detección de numerosos metabolitos simultáneamente a partir de pequeñas cantidades de muestra. Para este tipo de ensayos, es importante que las condiciones experimentales, como temperatura, atmósfera, luz, y edad de los cultivos fúngicos, estén estandarizadas. Además, una producción satisfactoria de metabolitos secundarios depende mucho del medio de cultivo utilizado. Según Frisvad y col. (2008), cuanto más complejo es un medio, más diversidad química exhibirán los hongos. Así, medios que contienen altas cantidades de sacarosa y glucosa junto con extracto de levadura o de malta, y minerales y metales traza añadidos, generalmente dan la producción más variada de metabolitos y las mayores concentraciones de compuestos.

Ejemplos de grupos de hongos en que se han aplicado los perfiles de metabolitos como herramienta taxonómica incluyen diferentes especies de *Penicillium* (Frisvad y col., 2004, 2006, 2008; Kim y col., 2012), *Talaromyces* (Frisvad y col., 1990), *Aspergillus* (Frisvad y col., 2007; Hettick y col., 2008; Samson y col. 2004b), *Fusarium* (Schmidt y col., 2004), complejo *Rhizoctonia solani* (Aliferis y col., 2013); *Beauveria*, *Paecilomyces* (Kadlec y col., 1994), *Thamnomycetes* (Stadler y col., 2010), entre otros.

Con respecto a *Alternaria*, pocos estudios se han publicado acerca de su quimiotaxonomía. Andersen y col. (2008) utilizaron los perfiles de metabolitos secundarios para discernir entre especies de esporas grandes, incluyendo *A. dauci*, *A. porri*, *A. solani*, y *A. tomatophila*. En

relación a los grupos de *Alternaria* de esporas pequeñas, el estudio metabólico es importante no sólo desde el punto de vista quimiotaxonómico, sino también para evaluar el potencial riesgo toxicológico teniendo en cuenta que son las especies más frecuentemente asociadas a la producción de micotoxinas en alimentos. Al momento del inicio del presente trabajo, sólo tres publicaciones se encontraban disponibles en bibliografía acerca de la clasificación quimiotaxonómica de algunos grupos de *Alternaria* de esporas pequeñas (Andersen y col., 2001; 2002; Serdani y col., 2002), en los cuales se analizó la producción de un bajo número de metabolitos de estructura conocida (<10 compuestos), mostrando resultados poco concluyentes acerca de la utilidad de esta herramienta.

III.1.3.3.-Caracterización polifásica

Los nombres de los hongos pueden basarse en diferentes características, incluyendo caracteres morfológicos, asociaciones geográficas, especificidad de sustrato, y una ubicación filogenética específica basada en datos de ADN, entre otras. Así, estos pueden ir cambiando a lo largo del tiempo, a medida que se obtiene mayor información con respecto a la biología de un organismo (Lawrence y col., 2016). La identificación de hongos es uno de los aspectos más importantes debido a que el conocimiento de un conjunto de caracteres propio de un género o una especie hace posible predecir la producción de metabolitos secundarios y su comportamiento fisiológico. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, el conocimiento del patógeno permite evaluar el riesgo y desarrollar estrategias de prevención (Andersen y col., 2002; Stewart y col., 2014). Teniendo en cuenta las dificultades que existen en la actualidad en la clasificación subgenérica de *Alternaria*, un esquema de identificación polifásica podría contribuir a aportar claridad acerca de la clasificación de estos organismos. En el mismo se deberían incluir diferentes metodologías, abarcando las descritas anteriormente, de manera de disponer de la mayor cantidad de información biológica posible de los organismos bajo estudio.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Muestreo de *Alternaria* spp. a partir de distintos alimentos

El muestreo se llevó a cabo durante el período 2012-2014 a partir de cuatro cultivos sembrados en diferentes regiones de producción agrícola de la provincia de Buenos Aires. Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración al ser recibidas en el laboratorio hasta el momento de la siembra por un período máximo de 24 h.

III.2.1.a.-Arándano

Se muestrearon a campo frutos de arándanos (*Vaccinium angustifolium*, variedad O'Neal) asintomáticos. Las muestras fueron recolectadas en diez distritos de la región productora de la provincia de Buenos Aires durante la cosecha de 2012, a razón de 200 frutos por muestra.

III.2.1.b.-Pimiento

Se seleccionaron a campo 66 frutos de pimiento (*Capsicum annuum*) con evidente contaminación fúngica durante la cosecha 2013 en dos huertas de productores orgánicos en La Plata, provincia de Buenos Aires. Se tomaron muestras en ambos estadios de maduración (11 pimientos verdes y 55 pimientos rojos).

III.2.1.c.-Tomate

Se muestrearon frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) a campo de dos variedades del cinturón verde platense:

- Platense, adquiridos en tres campos de productores orgánicos (40 tomates, cosecha 2012).
- Cherry, adquiridos en ocho campos de productores orgánicos (65 tomates, cosecha 2012).

Además, se muestrearon tomates redondos en puntos de expendio (adquiridos en verdulerías y supermercados de CABA) en el período 2012-2014 (27 tomates).

En todos los casos se seleccionaron frutos visiblemente contaminados.

III.2.1.d.-Trigo

Se muestrearon granos de trigo (*Triticum aestivum*) asintomáticos durante las cosechas 2011 a 2013. Las muestras fueron recolectadas a campo inmediatamente después de la cosecha. La zona de recolección abarcó las diferentes regiones productoras de la provincia de Buenos Aires, incluyendo localidades correspondientes a la zona II-Sur (Las Flores, Baradero, Lobos, Chivilcoy, Zárate, San Pedro, Saladillo y Arrecifes), IV (Tandil, Tres Arroyos y Adolfo González Chaves) y V-Sur (Coronel Dorrego y Coronel Pringles). El tamaño de muestra fue de 1 kg para cada una de las localidades.

III.2.2. Aislamiento de la micobiota

El aislamiento de las cepas fúngicas se realizó en medio Diclorán Cloranfenicol Malta Agar (DCMA). El medio se distribuyó en placas de Petri de 90 mm de diámetro a razón de 20 mL por placa.

En el caso de tomates y pimientos, se sembraron las placas con porciones de tejido visiblemente lesionado, además de la zona interna de cada fruto. Los frutos de arándanos se colocaron enteros en las cajas, a razón de cinco frutos por placa.

En el caso de trigo, se sembraron los granos enteros utilizando dos metodologías. La primera consistió en el plaqueo directo de los granos sin tratamiento previo sobre las placas de DCMA. En la segunda, se evaluó únicamente la micobiota interna de los granos, para lo cual se realizó un tratamiento de desinfección superficial previo al plaqueo. Este tratamiento consistió en sumergir los granos en una solución acuosa de hipoclorito de sodio 0,4 % v/v durante 2 minutos con agitación manual. A continuación, se los sumergió en agua estéril para su enjuague, y, por último, se secaron bajo aire filtrado en flujo laminar y se colocaron sobre las cajas de DCMA. Para ambas metodologías, las placas se sembraron a razón de 7 granos cada una. Para cada muestra se sembraron cuatro placas con la técnica de plaqueo directo y ocho con la de desinfección superficial, obteniéndose un total de 12 placas y 84 granos por muestra.

Todas las placas se incubaron de 5 a 7 días a 25 °C en oscuridad. Las colonias desarrolladas con características morfológicas correspondientes a *Alternaria*, a saber, de color negro, gris, marrón o verdoso; de aspecto algodonoso o aterciopelado fueron aisladas en placas de Agar V8® para su purificación, las cuales se incubaron de 5 a 7 días a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h oscuridad). Estas condiciones favorecen la esporulación de *Alternaria* spp. Las colonias aisladas que presentaron conidios de *Alternaria* fueron seleccionadas para su posterior identificación.

III.2.3. Caracterización morfológica

El esquema completo desde el aislamiento a partir de alimentos hasta la siembra en los medios para caracterización morfológica se muestra en la Figura III.1.

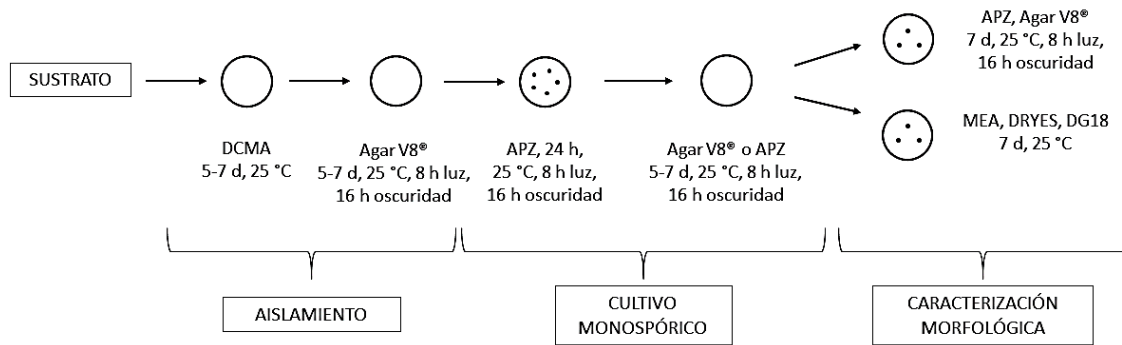


Figura III.1: Esquema de siembra a partir de alimentos para la identificación morfológica de *Alternaria* spp.

III.2.3.a.-Cultivos monospóricos

Para la caracterización morfológica, y de manera de asegurar que las observaciones se realizaran sobre un único aislamiento, se realizó un cultivo monospórico (cultivos a partir de una única espora). Para la obtención de los mismos, se utilizaron los cultivos aislados en Agar V8® con 7 días de incubación. El esquema de este procedimiento se muestra en la Figura III.2. Sobre una placa de 90 mm de Agar Papa Zanahoria (APZ), se colocaron cinco gotas de agua estéril distribuidas uniformemente en los bordes de la caja. Con un ansa de rulo, se tomó una porción del aislamiento de *Alternaria* en Agar V8®, se emulsionó sobre la primera gota de agua y se distribuyó hacia el centro de la placa hasta absorción de la gota, procurando tocar una única vez cada punto de la superficie. Sin quemar el ansa, se realizó el mismo procedimiento sobre las restantes gotas de agua. Durante este procedimiento, la carga de esporas sobre el ansa va disminuyendo y repartiéndose sobre la superficie de la placa. Luego de una incubación por 24 h a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h oscuridad), se observó en lupa con aumento de 16x hasta hallar un campo donde se ubicase únicamente un conidio de *Alternaria* con desarrollo de hifas germinativas. Utilizando una aguja estéril y bajo observación en lupa, se cortó la porción de agar contenedora de este conidio, el cual se subcultivó en una placa de APZ o de Agar V8®. La incubación de esta segunda placa se realizó a 25 °C de 5 a 7 días con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h oscuridad).

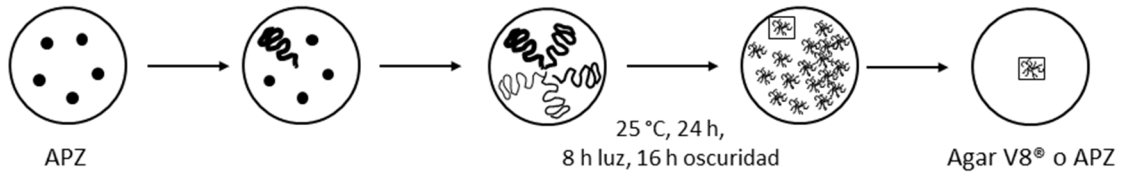


Figura III.2: Esquema del procedimiento para realizar un cultivo monospórico.

III.2.3.b.-Identificación de patrones de esporulación

La clasificación morfológica de las especies de *Alternaria* aisladas se realizó siguiendo la clave de Simmons (2007). Para esto, a partir de un cultivo monospórico de 7 días de cada cepa se sembró una placa de 90 mm de APZ en tres puntos. Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C sin control de humedad, lo cual generó una atmósfera gradualmente secante en las placas sin sellar, previniendo la condensación. La iluminación dentro de la incubadora fue controlada mediante un temporizador, de forma de obtener un ciclo exacto de 8 h de luz/16 h de oscuridad. La fuente de luz utilizada fueron tubos fluorescentes de luz blanca fría de 34 W. Las bandejas con placas se mantuvieron siempre a una distancia de 40 cm debajo de la fuente de luz para evitar variaciones de temperatura. Al quinto día de incubación, un rectángulo de 0,5 cm x 2 cm de agar con micelio fue retirado de la zona más externa de la colonia y perpendicular al radio de la misma. Este corte se realizó previo a que las placas recibieran el período de luz correspondiente al día 5. Luego de esto, las placas se continuaron incubando hasta el día 7.

Luego del período de incubación, el estudio de los patrones tridimensionales de esporulación se realizó mediante la observación de las colonias bajo microscopio estereoscópico (lupa) (Hertel & Reuss Optik Kassel STE6, Alemania), con una magnificación de 8x y 16x. Se registró en cada caso la longitud y ramificaciones de las cadenas de conidios. Además, se realizó la observación de las características de los conidios bajo microscopio óptico con una magnificación de 400x y 1000x (Carl Zeiss, Axiostar Plus, EEUU). Para esto, se tomó una muestra del crecimiento en las placas de agar APZ utilizando una tira de cinta adhesiva transparente, la cual se presionó sobre la superficie de la colonia, de forma de obtener detalles de los patrones de esporulación en los diferentes estadios de crecimiento (desde el centro hacia el borde de la colonia). La cinta con el micelio se colocó sobre un portaobjetos con una gota de ácido láctico y se secó el excedente de líquido con un papel absorbente (Figura III.3). En la observación microscópica se registraron las características de los conidios, teniendo en cuenta color, forma, tamaño, características de las paredes y frecuencia y característica de conidióforos secundarios. Para la forma de los conidios, se utilizó como referencia el diagrama de la Figura III.4. Por último, se realizó la observación

macroscópica de las colonias desarrolladas en las placas de APZ, considerando color, tamaño, textura y presencia de anillos concéntricos de crecimiento micelial y esporulación.

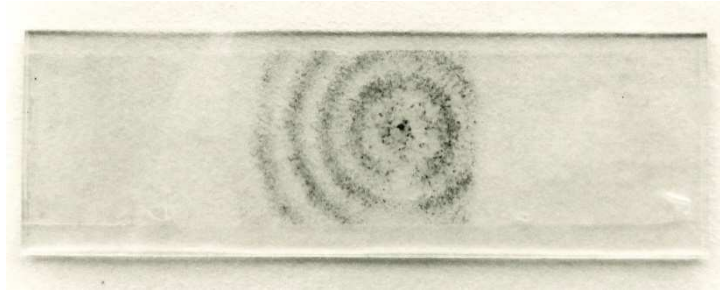


Figura III.3: Preparado sobre placas de APZ incubadas 7 días a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h de luz y 16 h de oscuridad), montado con ácido láctico y cinta adhesiva transparente.

III.2.3.c.-Caracterización macroscópica de los aislamientos

Las características macroscópicas de los aislamientos de *Alternaria* spp. fueron observadas en los siguientes medios de cultivo: Agar V8®, Agar Diclorán 18 % Glicerol (DG18), Agar Extracto de Malta (MEA), y Agar Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura y Sacarosa (DRYES), además de Agar APZ, anteriormente descrito. Las condiciones de incubación fueron 7 días a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h oscuridad) en el caso de Agar V8® y en oscuridad en el resto de los medios. Se observó tamaño, color y textura de las colonias en cada uno de ellos.

III.2.3.d.-Evaluación del estado teleomorfo

Para evaluar la expresión del estado perfecto o teleomorfo del grupo-especie *A. infectoria*, se sembraron todos los aislamientos pertenecientes a este grupo en distintas condiciones de cultivo, según Kwaśna y col. (2006) y Andersen y col. (2009).

En cada caso, se partió de inóculos de 7 días en APZ, incubados a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h oscuridad). Las técnicas de siembra e incubación fueron las siguientes:

- a- Tubos con Agar Sintético bajo en Nutrientes (SNA) inclinado, siembra en el centro del tubo, incubación a 6 °C en oscuridad.
- b- Tubos con agar SNA inclinado, siembra en el centro del tubo, incubación a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h de oscuridad) durante 7 días, y luego a 6 °C en oscuridad por el resto del período de incubación.

- c- Placas de APZ con un palillo de madera en el centro, siembra en dos puntos, uno a cada lado del palillo, incubación a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h de oscuridad) durante 14 días. Luego, las placas fueron selladas con Parafilm® y se continuó la incubación con las placas invertidas a 6 °C en oscuridad.

Cada condición fue incubada durante ocho meses, realizándose observaciones microscópicas mensuales de cada cultivo.

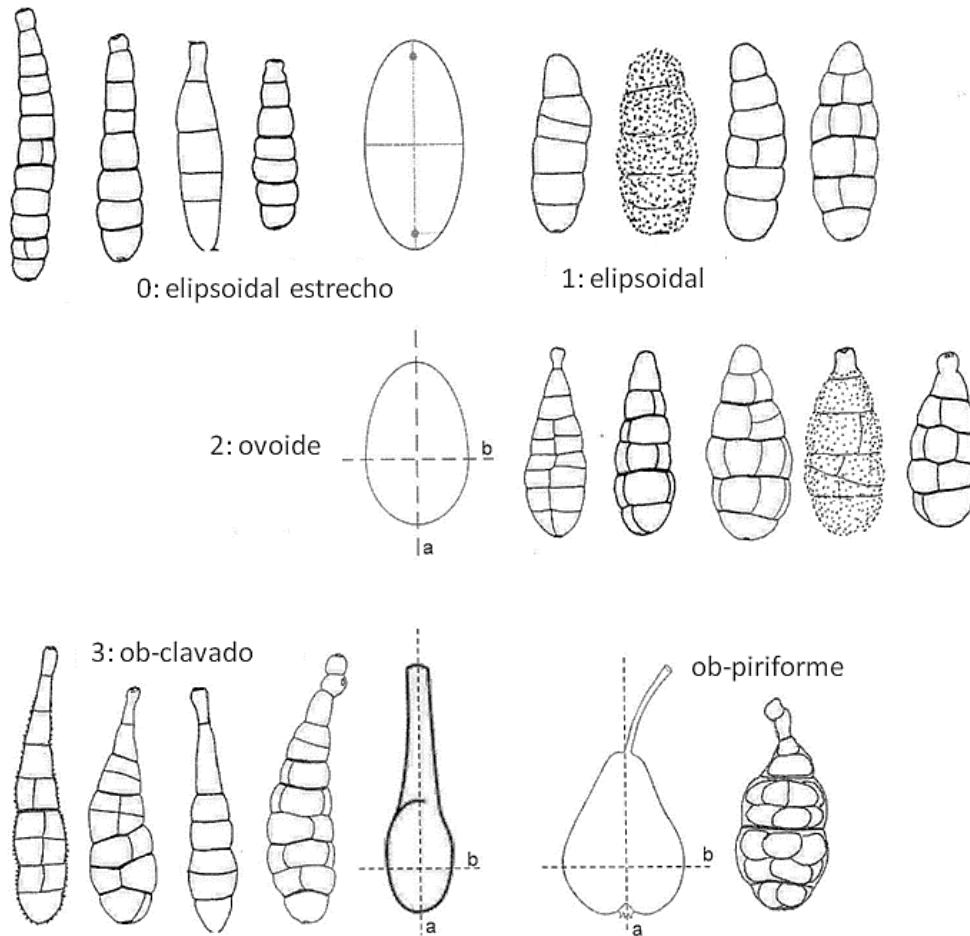


Figura III.4: Esquema de las formas de conidios de *Alternaria* spp. y su nomenclatura (Adaptado de Comunicación Personal, Dra. Birgitte Andersen, Universidad Técnica de Dinamarca).

III.2.3.e.-Cepas de referencia

Además de la caracterización morfológica de los aislamientos obtenidos de alimentos, se estudiaron en paralelo las características de cepas de referencia a modo comparativo. Para esto, se utilizaron cepas representativas de las siguientes especies obtenidas de la colección EGS del

Dr. Emory G. Simmons (Wabash College, Crawfordsville, Indiana, EEUU): *A. alternata* EGS 34016, *A. arborescens* EGS 39128, *A. infectoria* EGS 27198 (ex type), *A. infectoria* grp.-esp. EGS 91044 y *A. tenuissima* EGS 34015. Las condiciones de cultivo y conservación fueron las mismas que para los aislamientos de alimentos.

III.2.3.f.-Identificación de individuos de otros géneros fúngicos

Los aislamientos del grupo de los dematiáceos diferentes de *Alternaria* que se obtuvieron siguiendo el esquema de la Figura III.1, se identificaron a nivel de género siguiendo las claves de Ellis (1971; 1976); Pitt y Hocking (2009) y Samson y col. (2004a).

III.2.3.g.-Mantenimiento y conservación de las cepas

Para su conservación, todos los aislamientos monospóricos de *Alternaria* spp. fueron sembrados en tres puntos en placas de 90 mm de APZ e incubados a 25 °C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h de oscuridad) durante 7 días. Con la ayuda de un ansa en ángulo recto estéril, se cortaron cubos de agar con abundante crecimiento de aproximadamente 1 cm de lado. Estos cubos fueron colocados en forma aséptica en viales plásticos de 2 mL de capacidad con 1 mL de agua estéril. Cada cepa fue conservada en dos tubos diferentes, conteniendo entre cinco y ocho cubos de agar cada uno. Los viales fueron almacenados en refrigeración (6 °C). Se realizaron controles anuales de pureza de los cultivos.

III.2.4. Caracterización metabólica

La sección III.2.4.c fue realizada en la Universidad Técnica de Dinamarca (Technical University of Denmark, Department of Systems Biology, Kgs. Lyngby, Dinamarca), en colaboración con el Dr. Kristian Fog Nielsen.

III.2.4.a.-Cepas

Para la determinación del perfil de metabolitos secundarios se seleccionaron 227 cepas representativas del total de *Alternaria* spp. aisladas. A partir de cultivos de 7 días en APZ, se sembraron placas de Agar Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES) en tres puntos. Este medio fue seleccionado para el estudio del perfil de metabolitos secundarios debido a que se ha demostrado que *Alternaria* puede expresar una gran variedad de compuestos en estas condiciones (Andersen y col., 2009; 2015). Las placas se incubaron a 25 °C durante 14 días en oscuridad; transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción. En los casos en que la

extracción no se realizó al final del período de incubación, las placas fueron almacenadas a -18 °C para su posterior análisis.

III.2.4.b.-Extracción

La extracción de metabolitos se realizó a micro escala, basándose en el método descrito por Andersen y col. (2005). Para ello, tres cilindros de agar y micelio de 6 mm de diámetro fueron cortados con sacabocados del centro de cada colonia desarrollada en DRYES. Los nueve cilindros recolectados de una misma placa fueron colocados en un vial de 4 mL de capacidad, donde se agregó 1 mL de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico v/v. La mezcla se extrajo en un agitador ultrasónico (TestLab, Argentina) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, el extracto se transfirió a un vial limpio y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Cada residuo seco se resuspendió en 400 µL de metanol grado HPLC y se disolvió en agitador ultrasónico por 10 minutos. Por último, se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de tamaño de poro 0,45 µm, transfiriendo el extracto a un vial limpio de 1,5 mL de capacidad para su análisis por UHPLC-EM. Los extractos se mantuvieron a -18 °C hasta el momento del análisis.

III.2.4.c.-Análisis por UHPLC-EM

El análisis se realizó por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) UV/Visible con detector de arreglo de diodos (DAD) y espectrómetro de masas de alta resolución (HR-EM) maXis HD qTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). El sistema UHPLC Ultimate 3.000 (Dionex, EEUU) cuenta con una columna Kinetex 2,6 µm C₁₈, de 100 mm × 2,1 mm (Phenomenex, EEUU).

Se utilizó un gradiente lineal de agua:acetonitrilo (tamponado con ácido fórmico 20 mM), comenzando con 10 % v/v de acetonitrilo y aumentando a 100 % en 10 minutos, esta condición se mantuvo durante 3 minutos antes de volver a las condiciones iniciales. El espectro de masa fue realizado en ESI en modo positivo (ESI⁺), con un rango de búsqueda de masa/carga (m/z) de 100 a 1.000, con una exactitud de masa <1,5 ppm. Los espectros UV/Visible fueron recolectados a longitudes de onda entre 200 y 700 nm. El procesamiento de datos se realizó mediante el paquete de programas provisto por el fabricante, Data Analysis 4.2 y Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonics), utilizando el enfoque de “de-replicación agresiva” (Klitgaard y col., 2014) que consiste en la comparación simultánea con estándares e información bibliográfica. Para este estudio, se utilizó una base de datos de 678 compuestos de *Alternaria*, *Lewia*, *Ulocladium*, *Stemphylium* y otros géneros relacionados, los cuales fueron identificados tentativamente en base a su masa exacta (desviación <1,5 ppm), su patrón isotópico (desviación <50) y los datos

del espectro UV/Visible. En el caso de los compuestos para los que no se disponía de los patrones de referencia, se realizaron estudios de EM tándem (EM/EM) de modo de evaluar las fragmentaciones en relación a la estructura molecular y comparando con datos de librerías (Andersen y col., 2015; Nielsen y Larsen, 2015). El análisis por EM tándem se realizó en un UHPLC Agilent 1290 UV/Visible con DAD y acoplado a espectrómetro de masas ESI qTOF (Agilent 6550, EEUU). Los compuestos que no se pudieron asociar a una estructura conocida luego del procedimiento descrito, se designaron como “desconocidos” (U, “unknown”) y se identificaron por su relación m/z y su tiempo de retención (tr). Las áreas obtenidas en este análisis para algunos metabolitos identificados fueron utilizadas con fines comparativos para evaluar la producción semi-cuantitativa de cada uno de ellos por las cepas provenientes de cada sustrato.

III.2.4.d.-Análisis de datos

Los datos obtenidos para cada aislamiento fueron organizados en una matriz binaria para proceder a su análisis, indicando ausencia/presencia de cada compuesto. El análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS v.22.0 (IBM Corporation, EEUU), mediante un análisis de correspondencias múltiples, considerando los metabolitos como las variables principales de análisis y las variables grupo-especie y sustrato como las variables suplementarias. Se utilizó como método de normalización el modelo principal por objeto, el cual optimiza las distancias entre los casos (aislamientos), basándose principalmente en las diferencias y similitudes entre ellos. Cada análisis se agrupó en función de las categorías de las variables suplementarias.

III.2.5. Caracterización molecular

Las secciones III.2.5.b y c fueron desarrolladas en el Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Azul, Buenos Aires), bajo la dirección del Dr. Sebastián Stenglein. Además, la sección III.2.5.d se realizó en el Departamento de Ecología, Genética y Evolución (FCEN, UBA), bajo la dirección de la Dra. Marcela Rodruigero.

III.2.5.a.-Cepas

Para la caracterización a nivel molecular, se seleccionó un subgrupo representativo del total de las cepas aisladas: 45 aislamientos nativos y 3 cepas de referencia pertenecientes a los grupos-especie *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens* (Tabla III.13). Cada cepa fue subcultivada en placas de 90 mm de APZ, las cuales se incubaron 7 días a 25 °C con alternancia de iluminación (8

h de luz, 16 h de oscuridad). El micelio desarrollado en estas placas fue utilizado para la extracción de ADN.

III.2.5.b.-Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó según Stenglein y Balatti (2006). Para ello, se tomó el total del micelio desarrollado en la placa de APZ con una espátula y se colocó en un mortero. Se agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino, favoreciendo la lisis mecánica de las células. Luego, se agregaron 800 μL de mezcla tampón CTAB y 0,01 g de polivinilpirrolidona (PVP). La mezcla tampón CTAB consistió en 800 μL de tampón CTAB + 200 μL de tampón CTAB 10 % + 1 μL de β -mercaptoetanol. La mezcla tampón fue preparada antes de comenzar la extracción, en cantidad acorde al número de muestras. La muestra con la mezcla tampón fue transferida a un microtubo de 1,5 mL de capacidad e incubada a 60 °C en un baño seco por 30 minutos. A continuación, se agregó un volumen igual al inicial de cloroformo con alcohol isoamílico (12+1, v/v) y se centrifugó 5 minutos a 10.000 g. La fase acuosa (superior) conteniendo los ácidos nucleicos, fue transferida a un microtubo limpio de la misma capacidad, al cual se agregó isopropanol frío hasta completar el volumen de 1,5 mL. La mezcla permaneció a -18 °C durante toda la noche para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 7 minutos a 10.000 g y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue lavado con 200 μL de una mezcla de etanol 75 % con acetato de amonio 10 mM por centrifugación durante 7 minutos a 10.000 g. El sobrenadante fue descartado y sobre el sedimento se agregaron 200 μL de etanol 70 % frío. La mezcla se centrifugó nuevamente por 7 minutos a 10.000 g y el sobrenadante fue descartado. El sedimento fue secado a temperatura ambiente durante una hora y resuspendido en 50 μL de tampón TE. El ADN extraído constituyó la solución de reserva y fue conservado a -18 °C hasta el análisis. A partir de la solución de reserva, se realizaron diluciones de trabajo 1/10 para los análisis subsecuentes.

III.2.5.c.-PCR y secuenciación

Para el estudio de la variabilidad a nivel molecular de los aislamientos de *Alternaria*, se procedió a realizar una reacción de PCR para amplificar una región conservada. Se utilizó una porción del gen que codifica la enzima endopoligalacturonasa. Para esto se utilizaron cebadores específicos para *Alternaria* spp.: PG3 y PG2b (Integrated DNA Technologies, EEUU) (Andrew y col., 2009). Los cebadores fueron resuspendidos con un volumen de tampón TE estéril suficiente para alcanzar una concentración 50 μM y fueron mantenidos a -18 °C hasta el momento de su uso. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla de 50 μL de volumen final, que contenía

1-15 ng de ADN genómico (1 µL de la solución de trabajo); 5 mM MgCl₂; 0,03 mM de cada dNTP; 10X de tampón de PCR; 0,4 mg/mL de cresol; 1 µM de cada cebador; 1 u de DNA Taq polimerasa (Higway Molecular Biology, InBio-UNICEN, Tandil); 0.0005 % (m/v) de Tween 20; 0.0005 % (m/v) de Nonidet P-40 y agua destilada estéril hasta completar el volumen. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador XP (BioerTechnology Co.), siguiendo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C, 2 min; seguido de 29 ciclos de desnaturalización (95 °C, 30 seg), apareamiento (55 °C, 30 seg) y extensión (72 °C, 45 seg); y extensión final a 72 °C, 2 min. La presencia del producto de amplificación fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % m/v, por comparación con patrón de peso molecular (peso del amplicón=500 pb). El producto de PCR fue posteriormente purificado (PureLink Quick Gel Extraction y PCR Purification Combo Kit, Invitrogen, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante, mediante sucesivos lavados y pasaje a través de columna de sílica para remover cebadores, dNTPs, enzimas y sales remanentes de la reacción de PCR. Posteriormente, se procedió a la cuantificación del ADN doble cadena obtenido en la reacción de PCR mediante la utilización de un fluorómetro (Qubit®, Invitrogen, EEUU). Se calibró previamente el equipo usando dos estándares provistos por el fabricante. Para el ensayo, se preparó una solución de trabajo conteniendo un reactivo fluorogénico, cuya fluorescencia se observa al unirse específicamente al ADN doble cadena y su intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. Luego de incubar la mezcla por 2 minutos a temperatura ambiente, se leyeron los tubos en el equipo, obteniéndose directamente la concentración en µg de ADN doble cadena/mL.

Finalmente, la secuenciación de la región amplificada en ambas direcciones fue realizada comercialmente en un secuenciador a gran escala modelo 3730 XL (Macrogen, Corea).

III.2.5.d.-Análisis de datos y estudios filogenéticos

Las secuencias fueron editadas usando el programa BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999) y alineadas con ClustalW (Thompson y col., 1994). Con el objetivo de inferir la cantidad de haplotipos presentes en la muestra, las relaciones entre ellos y evaluar el nivel de diversidad genética, se construyó una red de haplotipos usando el programa TCS v1.21 (Clement y col., 2000). Además, se realizaron análisis filogenéticos usando una secuencia representativa de cada haplotipo y las cepas de referencia. Para ello se aplicaron dos métodos diferentes, inferencia Bayesiana y máxima parsimonia.

Para el caso del análisis Bayesiano, en una primera instancia se estimó el modelo óptimo de sustitución de nucleótidos a ser aplicado en este grupo de secuencias. Para esto, se utilizó el

programa jModelTest v2.1.7 (Darriba y col. 2012; Posada, 2008), que fue ejecutado a través del servidor Phylemon v2.0 (Sánchez y col., 2011). Se seleccionó el modelo calculado según el criterio de información Bayesiana (BIC, del inglés Bayesian Information Criterion), el cual fue Kimura 80 (también conocido como Kimura 2 parámetros, K80 o K2P). El análisis Bayesiano fue llevado a cabo en MrBayes v3.2.3 (Ronquist y col., 2012) usando el algoritmo 'Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo' (MCMCMC o MC3). Se ejecutaron dos corridas independientes usando cuatro cadenas, una fría y tres calientes, comenzando con un árbol aleatorio durante 1.000.000 de generaciones, muestreando cada 500 generaciones. Para evaluar la convergencia del análisis, se utilizó la estabilización de la desviación estándar promedio de las frecuencias de escisión de los clados entre ambas corridas en una diferencia menor al 1 % y los parámetros indicados en el programa Tracer v1.6.0 (Rambaut y col., 2008-2013). Las 250.000 generaciones iniciales de cada corrida fueron descartadas al resumir los parámetros del árbol al finalizar el análisis. El nivel de soporte de cada grupo fue evaluado mediante la probabilidad posterior del nodo. La topología del árbol obtenido fue visualizada en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2006-2014).

El análisis de máxima parsimonia fue llevado a cabo a través de una búsqueda heurística en el programa TNT v1.1 (Goloboff y Catalano, 2016; Goloboff y col., 2008). Se utilizaron pesos equivalentes y no se usaron caracteres aditivos; los eventos de inserción/delección (gaps) se trataron como datos faltantes. Antes de la búsqueda, todos los caracteres no informativos fueron desactivados. Los análisis se realizaron utilizando TBR múltiple + TBR (del inglés, "tree bisection reconnection") como método de intercambio de ramas, aplicado a series de 1.000 secuencias de adición aleatorias, reteniendo 10 cladogramas por réplica. Los valores de bootstrap se calcularon a partir de 1.000 repeticiones.

La secuencia de *endoPG* de *Alternaria tomato* BMP 2031 (N° de colección CBS 114.35) fue utilizada como grupo externo en todos los análisis (Stewart y col., 2014; N° de acceso en GenBank KF699423).

III.2.5.e.-Análisis simultáneo de datos de morfología y secuencias

Para estudiar los aislamientos desde un enfoque polifásico, se incluyeron en el análisis los datos morfológicos. Se construyó una matriz morfológica a fin de sistematizar la información obtenida en datos discretos y objetivos de las cepas. Se trabajó con los 48 aislamientos utilizados en la sección III.2.5.a (Tabla III.13). La descripción completa de todos los caracteres evaluados para construir la matriz morfológica y sus correspondientes estados se muestra en la Tabla III.1. Se evaluaron un total de 19 caracteres, 11 microscópicos y 8 macroscópicos. Los caracteres microscópicos se observaron a partir del crecimiento en una placa de APZ incubada 7 días a 25

°C con alternancia de iluminación (8 h luz, 16 h de oscuridad), mediante un preparado realizado según la técnica descrita en la sección III.2.3.b. Se observaron como mínimo 10 campos diferentes en distintas zonas del preparado. Los caracteres macroscópicos se evaluaron sobre la misma placa de APZ y sobre una placa de DRYES incubada 7 días a 25 °C en oscuridad. Los caracteres morfométricos se registraron 15 veces, se realizó el promedio y se dividió por rangos. Los caracteres no susceptibles a medición (colores, forma, etc.) se observaron 50 veces y se registró el estado más frecuente.

Tabla III.1: Lista de caracteres morfológicos y sus correspondientes estados y código de calificación utilizados para la construcción de la matriz morfológica.

#	Caracteres micro y macroscópicos	Calificación de cada estado
1	Patrón de esporulación tridimensional	Conidios solitarios (0); ramificación apical (1); ramificación lateral (2)
2	Longitud de cadena de conidios	≤3 conidios (0); 4-7 conidios (1); ≥8 conidios (2)
3	Longitud del extremo apical de conidios	≤7 μm (0); >7 μm (1)
4	Longitud de conidióforos primarios	≤100 μm (0); >100 μm (1)
5	Posición de conidióforos secundarios	Ausente (0); desde la base del conidio (1); desde el extremo apical del conidio (2)
6	Longitud de conidióforos secundarios	Ausente (0); ≤15 μm (1); >15 μm (2)
7	Longitud de conidios	≤26 μm (0); >26 μm (1)
8	Morfología de conidios	Elipsoidal estrecho (0); elipsoidal (1); ovoide (2); ob-clavado (3)
9	Color de conidios	Gris claro a marrón (0); Gris oscuro a marrón oscuro (1)
10	Ornamentación de la pared de conidios	Lisas (0); rugosas (1)
11	Micelio aéreo	Poco o ausente (0); abundante (1)
12	Color de colonia en placas de APZ	Gris claro (0); gris (1); gris oscuro (2)
13	Diámetro de colonia en placas de APZ	≤60 mm (0); >60 mm (1)
14	Textura de colonia en placas de APZ	Velosa (0); pulverulenta (1)
15	Anillos concéntricos de esporulación en placas de APZ	Poco marcados (0); bien definidos (1)
16	Color de colonia en placas de DRYES	Verde (0); verde oscuro (1); verde grisáceo (2)
17	Diámetro de colonia en placas de DRYES	≤48 mm (0); >48 mm (1)
18	Textura de colonia en placas de DRYES	Flocosa (0); velutinosa (1)
19	Colonias surcadas en placas de DRYES	No (0); sí (1)

El conjunto de datos morfológicos se estudió mediante un análisis de máxima parsimonia realizado como se describió anteriormente, y utilizando los mismos parámetros de soporte de clado (sección III.2.5.d).

Además, se analizaron en conjunto los datos obtenidos para el grupo de 48 aislamientos seleccionados combinando la información de la matriz morfológica con la información de las secuencias genómicas de *endoPG* mediante un análisis Bayesiano. El análisis se realizó utilizando el programa MrBayes v3.2.3. Se construyó una matriz con ambos tipos de datos y se trabajó en el programa con un modelo particionado. Para las secuencias de ADN se usó el modelo K80 descrito anteriormente (sección III.2.5.d). Para los datos de morfología, se trabajó con un modelo morfológico basado en Nylander y col. (2004), teniendo en cuenta que la cantidad de estados posibles para cada carácter es variable y asumiendo que el modelo es simétrico, en el cual la frecuencia es igual para cada estado. El resto de los parámetros programados en MrBayes fueron iguales a los descriptos en la sección anterior (III.2.5.d).

III.2.5.f.-Comparación de secuencias de diferente origen geográfico

Se infirieron las filogenias por métodos Bayesiano en base a secuencias de ADN correspondientes al gen *endoPG* utilizando muestras provenientes de distintas regiones del mundo con el fin de evaluar el posible aislamiento geográfico de las especies halladas en Argentina. Se utilizaron las secuencias publicadas por Stewart y col. (2014), obtenidas de GenBank (NCBI NIH, EEUU) (Tabla III.2). Ambos análisis filogenéticos se realizaron como se describió anteriormente (sección III.2.5.d), utilizando K80 como modelo de sustitución de nucleótidos para la inferencia Bayesiana.

Tabla III.2: Secuencias de *endoPG* utilizadas para la comparación geográfica de los aislamientos.

Código	N° de acceso GenBank	País de origen
ST_H10_C2	KF699418.1	Argentina
ST_H12_C1	KF699415.1	Israel
ST_H6_C3	KF699412.1	Italia
ST_H8_C1	KF699411.1	Italia
ST_H11_C1	KF699409.1	España
ST_H1_C3	KF699404.1	Irán

Todas las secuencias corresponden a aislamientos de *A. alternata* gr.-esp. (grupo J de Simmons, 2007) y fueron obtenidas de frutos de cítricos. El código de las secuencias corresponde a: iniciales de autor_haplotipo_clado, según está descrito en la Figura 1 del trabajo de Stewart y col. (2014).

Tabla III.2 (continuación): Secuencias de *endoPG* utilizadas para la comparación geográfica de los aislamientos.

Código	N° de acceso GenBank	País de origen
ST_H2_C3	KF699403.1	Irán
ST_H4_C3	KF699399.1	Perú
ST_H5_C3	KF699398.1	Perú
ST_H13_C3	KF699394.1	Turquía
ST_H3_C3	KF699393.1	Sudáfrica
ST_H9_C2	KF699391.1	Brasil
ST_H7_C3	KF699390.1	Australia

Todas las secuencias corresponden a aislamientos de *A. alternata* gr.-esp. (grupo J de Simmons, 2007) y fueron obtenidas de frutos de cítricos. El código de las secuencias corresponde a: iniciales de autor_haplotipo_clado, según está descrito en la Figura 1 del trabajo de Stewart y col. (2014).

III.2.6. Caso de estudio: pimienta

III.2.6.a.-Muestras

Las muestras de pimientos analizadas se encuentran descritas en la sección III.2.1.b.

III.2.6.b.-Aislamiento e identificación de la microbiota

Para estudiar la microbiota de los frutos de pimienta, se sembró el centro de una placa de DCMA con una porción representativa del tejido visiblemente contaminado, así como de la zona interna de cada fruto. Las placas fueron incubadas de 5 a 7 días a 25 °C en oscuridad. El crecimiento fúngico fue aislado en Agar Papa Dextrosa (APD). La identificación de los aislamientos a nivel de género se realizó por observación macro y microscópica siguiendo las claves de Pitt y Hocking (2009) y Samson y col. (2010). Los aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* fueron identificados y caracterizados como se describió en la sección III.2.3.

III.2.6.c.-Potencial toxicogénico de *Alternaria* spp.

Para evaluar la capacidad de los aislamientos de *Alternaria* spp. de producir las principales toxinas *in vitro*, se utilizó la metodología analítica descrita en la sección III.2.4.

III.2.6.d.-Contaminación con toxinas de *Alternaria* spp.

III.2.6.d.i.-*Extracción*

Para estudiar la presencia de las principales micotoxinas de *Alternaria* en los pimientos, se seleccionaron 48 frutos luego del aislamiento de la microbiota y se almacenaron a -18 °C hasta el comienzo del análisis. La extracción de micotoxinas se realizó siguiendo el método descrito por Terminiello y col. (2006) para productos de tomate. Cada fruto entero fue cortado en porciones pequeñas y licuado con 150 mL de metanol durante 3 minutos. Luego, se agregaron 60 mL de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 % (m/v), y se mezcló por agitación mecánica a 300 rpm por 10 minutos. La mezcla se filtró por gravedad y se desgrasó en ampolla de decantación con 40 mL de hexano. Luego de descartar la fase orgánica, se agregaron 50 mL de agua fría a la fase acuosa y se extrajo con 20 mL de CHCl_3 dos veces para recolectar la fracción contenedora de las toxinas neutras (AOH y AME). La fase acuosa remanente en la ampolla fue acidificada hasta pH=2 con HCl 6 N. A continuación, se realizaron 2 extracciones con 20 mL de CHCl_3 . Ambas fracciones clorofórmicas, conteniendo las toxinas ácidas (TeA), fueron recolectadas en una ampolla limpia, se lavaron con 30 mL de agua y se filtraron a través de Na_2SO_4 anhidro. Ambas fracciones (neutra y ácida) fueron evaporadas en evaporador rotatorio a 40 °C y resuspendidas en 2 mL de metanol grado HPLC. Los extractos fueron almacenados a -18 °C hasta el análisis.

III.2.6.d.ii.-*Detección y cuantificación*

La cuantificación de las toxinas se realizó en un sistema HPLC-UV, que consiste en un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-6A (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una válvula Rheodyne compuesta por un loop de 20 μL y un detector UV Shimadzu modelo SPD-6A. La columna analítica utilizada fue Júpiter 4,6 x 250 mm 5 μm C_{18} (Phenomenex, EEUU). La fase móvil consistió en metanol:agua (80:20) con 300 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para AOH y AME y metanol:agua (90:10) con 300 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para TeA. Se trabajó con un flujo de 0,4 mL/min. La longitud de onda para la detección de AOH y AME fue de 258 nm y para TeA de 280 nm.

III.2.6.d.iii.-*Preparación de soluciones estándar y cuantificación*

Estándares de TeA (como sal de cobre), AOH y AME fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). A partir de cada estándar sólido, se prepararon gravimétricamente soluciones de reserva en metanol de 0,5 mg/mL. Estas soluciones se mantuvieron a -18 °C. La sal de cobre fue reconvertida en ácido tenuazónico, siguiendo la metodología descrita por Scott y Kanhere (1980), con ligeras modificaciones. Para ello, se pesaron 2 mg de tenuazonato de cobre, se disolvieron en 500 μL de CH_2Cl_2 y se pasaron a través de una columna de intercambio catiónico ácida de 1,5 cm de longitud empaquetada con Dowex® 50WX8. El acondicionamiento de la

resina se realizó por lavado de la columna con 4 mL de CH_2Cl_2 . Se agregó el tenuazonato diluido y se eluyó con 8 mL de CH_2Cl_2 . El solvente se evaporó a sequedad y el TeA se resuspendió en metanol.

Con fines de cuantificación, se construyeron curvas de calibración para cada toxina, correlacionando la concentración de diluciones sucesivas de los estándares preparadas con precisión analítica versus el área de pico detectada. La concentración exacta de cada solución incluida dentro del rango de linealidad de la Ley de Lambert-Beer, fue confirmada por espectroscopía UV (ϵ AOH/AME=38.000; ϵ TeA=12.980). Para las tres toxinas se prepararon soluciones de trabajo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

III.2.6.d.iv.-Evaluación del desempeño analítico del método

Para determinar la recuperación del método se utilizaron pimientos rojos no contaminados obtenidos de los mismos productores orgánicos, los cuales fueron adicionados con cada toxina a 4 niveles (10, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cada nivel se analizó por triplicado. La repetibilidad del método se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) para cada nivel adicionado. Los límites de detección (LODs) del método de HPLC-UV, se establecieron como la mínima concentración de toxinas en las muestras que permitió confirmación por el detector de arreglo de diodos. Los límites de cuantificación (LOQs) de las toxinas se establecieron como tres veces el valor de la ordenada al origen de la regresión lineal de la curva de calibración.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Aislamiento

Se aislaron un total de 292 cepas de *Alternaria*: 57 de tomate, 128 de trigo, 64 de pimientos y 43 de arándanos. La técnica de aislamiento en DCMA (Figura III.1) fue elegida para favorecer la recuperación de las cepas del género *Alternaria*, ya que presenta buen desarrollo en dicho medio de cultivo, al igual que individuos de otros géneros de hongos dematiáceos. En el caso de tomate, trigo y arándanos, alimentos cuya microbiota había sido previamente estudiada por diferentes autores en Argentina, se subcultivaron únicamente en Agar V8® las colonias oscuras, con distintas texturas, potencialmente pertenecientes a este género. En estas condiciones, se aislaron además otras cepas pertenecientes a géneros de mohos dematiáceos tales como *Stemphylium*, *Drechslera*, *Ulocladium*, *Stachybotrys*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Harzia* y *Curvularia*. Los arándanos fueron el único sustrato a partir del cual se aisló únicamente *Alternaria* entre las colonias de pigmentación oscura. En la Figura III.5 se muestra la distribución de estas cepas para las muestras de trigo y tomate. En el caso de pimientos, se realizó un estudio completo de la microbiota que se encuentra descrita en la sección III.3.5.a. En trigo, todas las cepas de géneros de dematiáceos distintos de *Alternaria* fueron aislados de los granos a los que no se les aplicó el tratamiento de desinfección superficial.

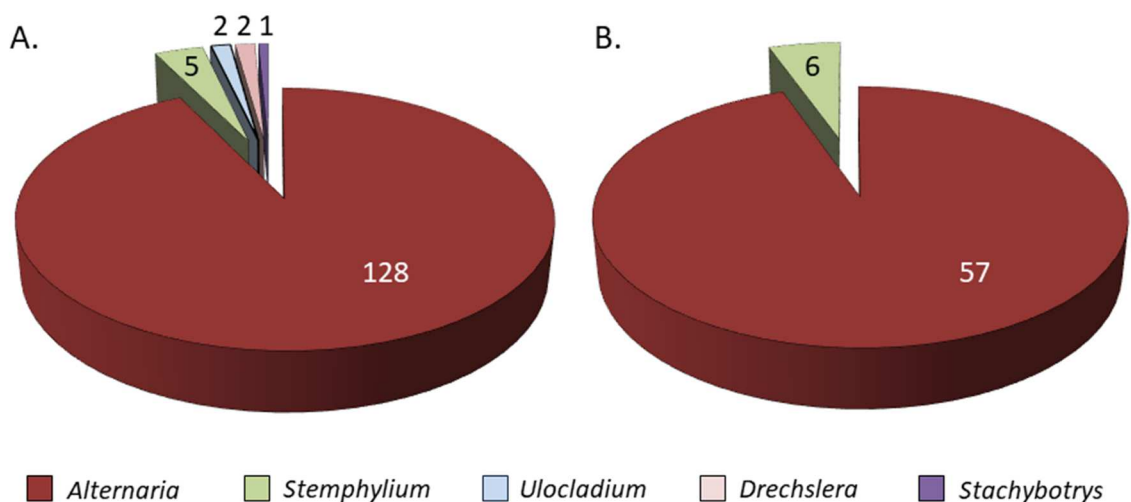


Figura III.5: Distribución de hongos dematiáceos hallados en los distintos sustratos. A. trigo; B. tomate. Los números sobre cada región indican el número de aislamientos.

III.3.2. Caracterización morfológica

Los aislamientos de *Alternaria* fueron identificados a nivel de grupo-especie (gr.-esp.) siguiendo la clave taxonómica de Simmons (2007). En los alimentos analizados, se encontraron únicamente *Alternaria* del grupo de esporas pequeñas. Del total de aislamientos, 78 % se identificaron como pertenecientes al gr.-esp. *A. tenuissima* (228), mientras que el 8 % correspondieron a *A. arborescens* gr.-esp. (24), 7 % a *A. infectoria* gr.-esp. (20) y 3 % a *A. alternata* gr.-esp. (8) (Tabla III.3). El resto de los aislamientos (12) presentaron características intermedias entre los grupos-especie *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata*, por lo cual, al no poder ser atribuidos unívocamente a un determinado grupo-especie, fueron clasificados como *Alternaria* sp.

El grupo-especie *A. infectoria* fue únicamente aislado de trigo; su incidencia en este sustrato fue del 16 % y fue recuperado principalmente de los granos que habían sido desinfectados superficialmente (16 aislamientos de muestras con desinfección superficial y 4 aislamientos de muestras sin este tratamiento). En arándanos sólo se aislaron cepas del grupo-especie *A. tenuissima*, con la excepción de una clasificada como *A. alternata* gr.-esp. La Tabla III.3 muestra la distribución de los grupos-especie de *Alternaria* en los distintos alimentos analizados.

Tabla III.3: Número de aislamientos de *Alternaria* spp., indicando origen y grupo-especie.

Grupo-especie	Arándanos	Pimientos	Tomate	Trigo	Total
<i>A. tenuissima</i>	42	49	39	98	228
<i>A. arborescens</i>	0	4	16	4	24
<i>A. infectoria</i>	0	0	0	20	20
<i>A. alternata</i>	1	4	2	1	8
<i>Alternaria</i> sp.	0	7	0	5	12
Total	43	64	57	128	292

A continuación, se describen las características más relevantes de cada grupo que permitieron su clasificación.

III.3.2.a.-A. *tenuissima* gr.-esp.

La mayoría de los aislamientos hallados en los alimentos analizados pertenecieron al grupo-especie *A. tenuissima* (228/292), correspondiente al grupo morfológico “H” definido por Simmons (2007). Este grupo se caracterizó por presentar un patrón tridimensional de esporulación formado por cadenas de conidios relativamente largas (de entre 6 y 15 conidios). Estas cadenas se originaron de conidióforos primarios de longitud variable, aunque resultaron ser cortos en la mayoría de los casos (30-50 μm). La presencia de conidióforos secundarios fue poco frecuente, indicando que las cadenas de conidios presentan escasas ramificaciones. En caso de estar presentes, los conidióforos secundarios se originaron de la zona basal del conidio, dando lugar a ramificaciones cortas (2-3 conidios). Los conidios presentaron mayoritariamente forma elipsoidal, con coloración grisácea a marrones claros o tostado, y con paredes lisas. Las características microscópicas típicas observadas para este grupo-especie se muestran en la Figura III.6. Con respecto a las características macroscópicas, en APZ se observaron colonias de diámetro de 5,5-6,5 cm. Las mismas fueron de color gris a marrón grisáceo con 2 a 4 anillos concéntricos de crecimiento y esporulación de medianamente a poco definidos, mientras que en Agar V8® el color también fue grisáceo, de diámetros similares a las colonias en APZ y de aspecto vellosos. Por otro lado, en DRYES se observaron colonias de color verde claro a grisáceo, con textura flocosa, de 5-6 cm de diámetro. En MEA, las colonias fueron de 6-6,5 cm de diámetro, de color gris verdoso con centro de tonalidad más oscura, y cuya característica más distintiva fue su aspecto algodonoso. En DG18 se obtuvieron colonias grises a amarronadas con bordes irregulares y claros en tonalidades amarillentas, de 2-3,5 cm de diámetro, con reverso claro. En la Figura III.7 se muestran placas con colonias típicas obtenidas para aislamientos de este grupo-especie.

III.3.2.b.-A. *arborescens* gr.-esp.

Los aislamientos clasificados como *A. arborescens* gr.-esp. (24), pertenecientes al morfogrupo “L” del manual de Simmons (2007), fueron hallados principalmente en las muestras de tomate (16/24 provinieron de este sustrato). Las principales características microscópicas observadas en este grupo se muestran en la Figura III.8 y fueron conidióforos primarios largos (200-500 μm), con una agrupación arbórea terminal de cadenas de conidios con múltiples ramificaciones. Dichas ramificaciones se deben a la presencia de conidióforos secundarios que fueron observados con elevada frecuencia en los preparados, originándose mayoritariamente de la zona apical del conidio y presentando geniculaciones en alta proporción. La mayoría de los conidios de este grupo presentaron forma ovoide con tabiques bien marcados causantes de

constricciones que modifican el contorno de la espora. Una característica distintiva de este grupo fue el color oscuro de sus conidios, así como sus paredes rugosas. En cuanto a las características macroscópicas, en APZ se observaron colonias oscuras (grises a negras), de 6-6,5 cm de diámetro, de aspecto pulverulento, con 4 a 6 anillos concéntricos de crecimiento y esporulación claramente definidos. En Agar V8® también se observaron colonias negras, con presencia de micelio aéreo de coloración grisácea y de tamaño similar al observado en APZ. Las colonias en DRYES fueron de color verde oscuro y surcadas, de 4,5-5,1 cm de diámetro, de textura velutinosa; mientras que en MEA se observaron colonias de color gris oscuro con centro negro de 6-6,5 cm de diámetro. Por último, en DG18 se obtuvieron colonias de color gris oscuro a marrón-anaranjado, con bordes irregulares y reverso oscuro, de 2,1 a 3 cm de diámetro. Las placas de cada medio de cultivo con colonias típicas de este grupo especie se muestran en la Figura III.9.

III.3.2.c.-A. *infectoria* gr.-esp.

El grupo-especie *A. infectoria* (grupo "K" dentro de la clave taxonómica de Simmons, 2007) se diferenció claramente del resto de los aislamientos de *Alternaria* de esporas pequeñas hallados, tanto por sus características macro como microscópicas (Figuras III.10 y III.11). El patrón tridimensional de esporulación observado fue muy ramificado, presentando conidióforos primarios cortos, con nuevas cadenas de esporas emergiendo a lo largo de toda la longitud del conidióforo. Los conidios fueron de color gris claro, con paredes lisas y formas ob-clavado a ob-piriforme. En preparados de este grupo fue frecuente encontrar conidios de menor tamaño y sin septos, que son estados inmaduros de las dictiosporas características del género. Los conidióforos secundarios se registraron en la mayoría de los campos de un preparado, generalmente originándose de la zona apical del conidio, observándose claramente el poro a partir del cual surge una nueva espora. Una característica muy distintiva de los conidióforos secundarios de este grupo fue su longitud, siendo estos los más largos observados entre los grupos-especie aislados y generando más de una nueva cadena de conidios por geniculación en la mayoría de los casos. Macroscópicamente, en APZ se observaron colonias grises, de aspecto pulverulento, de 6 cm de diámetro en promedio. En Agar V8®, los colores de las colonias fueron más claros que para el resto de los grupos. Otra característica muy llamativa y diferente al resto de los aislamientos fue el aspecto de las colonias en DRYES, medio en el cual este gr.-esp. fue el único que presentó colonias color gris claro a blanco y aspecto flocoso, de 4,5-5,3 cm de diámetro. A su vez, en MEA y en DG18, no se observó esporulación y las colonias fueron de

colores claros (grises pálidos a blanco). En el último medio, éstas fueron las más pequeñas, de 1,5-2,1 cm de diámetro.

Por otro lado, con todos los aislamientos de *A. infectoria* gr.-esp. se llevaron a cabo tres ensayos en paralelo con el objetivo de observar la expresión de su estado sexual. Las observaciones microscópicas realizadas mensualmente sobre las tres placas de cada aislamiento no mostraron el desarrollo de ascomas maduros ni de proascomas. Todos los conidios observados mostraron una estructura correspondiente al estado anamorfo y no se detectó la presencia de estructuras de reproducción sexual en ningún campo de los preparados, lo que permitió inferir que el estado perfecto no se expresó en ningún caso.

III.3.2.d.-A. *alternata* gr.-esp.

El grupo-especie *A. alternata*, correspondiente al morfogrupo "J" descrito en Simmons (2007), fue el hallado con menor frecuencia (8 aislamientos en total). Su patrón tridimensional de esporulación se caracterizó por un alto grado de ramificación, al igual que *A. arborescens* gr.-esp., pero con conidióforos primarios mucho más cortos (40-70 μm). Las cadenas estuvieron constituidas por 4 a 10 conidios. La forma de los conidios de los aislamientos clasificados en este grupo presentó una gran variabilidad, incluso entre los de un mismo aislamiento. Una gran proporción fueron de color gris a marrón tostado, forma elipsoidal y paredes lisas, similar a lo observado en *A. tenuissima* gr.-esp.; mientras que otra morfología muy frecuente correspondió a conidios más oscuros (colores negros a marrones oscuros), de paredes rugosas y forma ovoide, similares a los hallados en los aislamientos clasificados como *A. arborescens* gr.-esp. La presencia de conidióforos secundarios en los preparados fue muy frecuente, en consecuencia con las ramificaciones observadas en tres dimensiones. Las características microscópicas típicas de este grupo se observan en la Figura III.12. Macroscópicamente, las colonias observadas en APZ fueron grandes (6-6,5 cm de diámetro), oscuras, con 5 a 6 anillos concéntricos claramente delimitados y de aspecto pulverulento. En Agar V8® se observaron colonias negras y de aspecto velutinoso. En DRYES, las colonias presentaron un aspecto muy similar al observado para *A. arborescens* gr.-esp., siendo de color verde oscuro, surcadas y de textura velutinoso, de 4,5-6 cm de diámetro. Además, en MEA se observaron colonias color gris oscuro, y en DG18 se observaron colonias de color gris con tonalidades amarronadas y bordes bien definidos, de 2,3-3,0 cm de diámetro. Las características de las colonias típicas observadas en cada medio de cultivo se muestran en la Figura III.13.

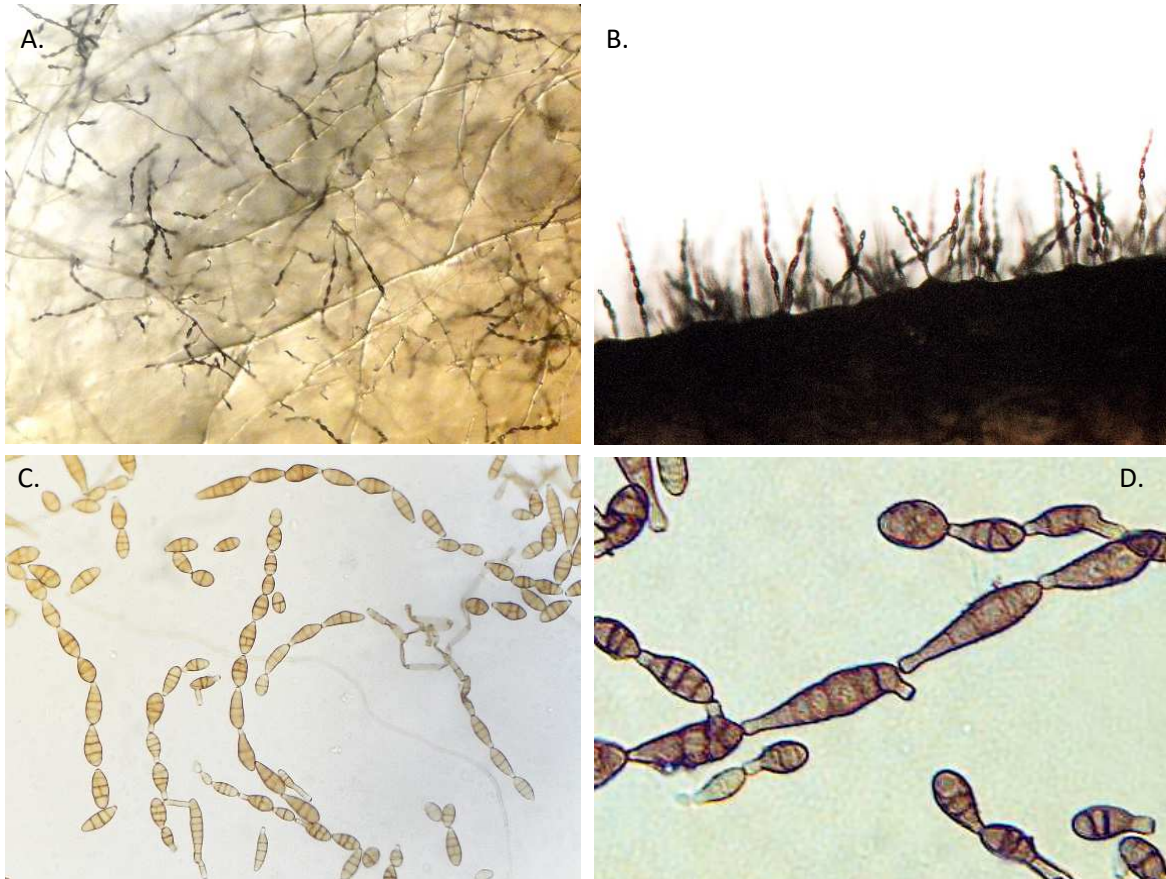


Figura III.6: Observaciones de aislamientos típicos de *A. tenuissima* grupo-especie en placa de APZ. A. patrones tridimensionales de esporulación a 16x; B. visión lateral de corte a 100x; C. preparado con ácido láctico a magnificación 400x; D. detalle de conidios a 1000x.

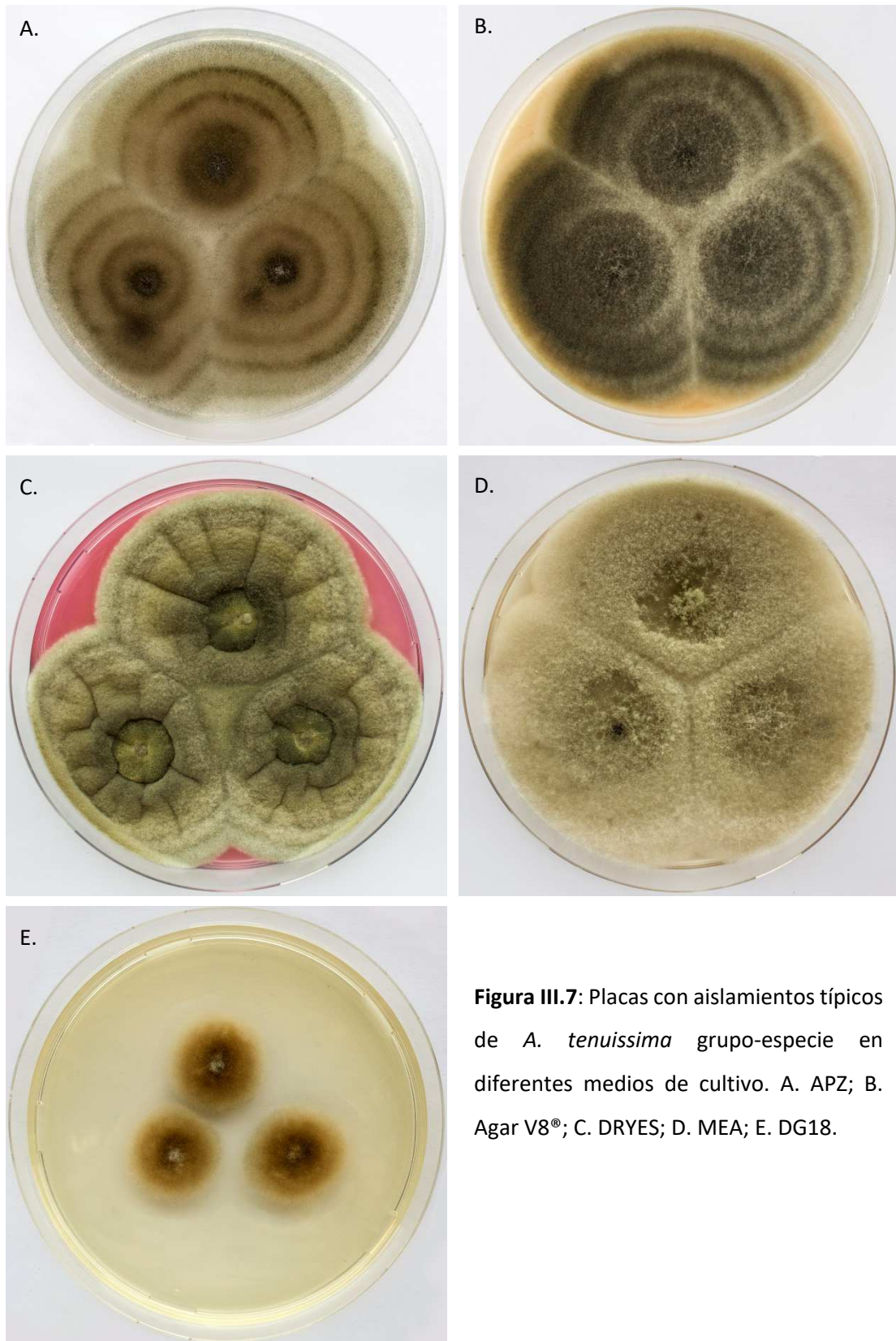


Figura III.7: Placas con aislamientos típicos de *A. tenuissima* grupo-especie en diferentes medios de cultivo. A. APZ; B. Agar V8®; C. DRYES; D. MEA; E. DG18.

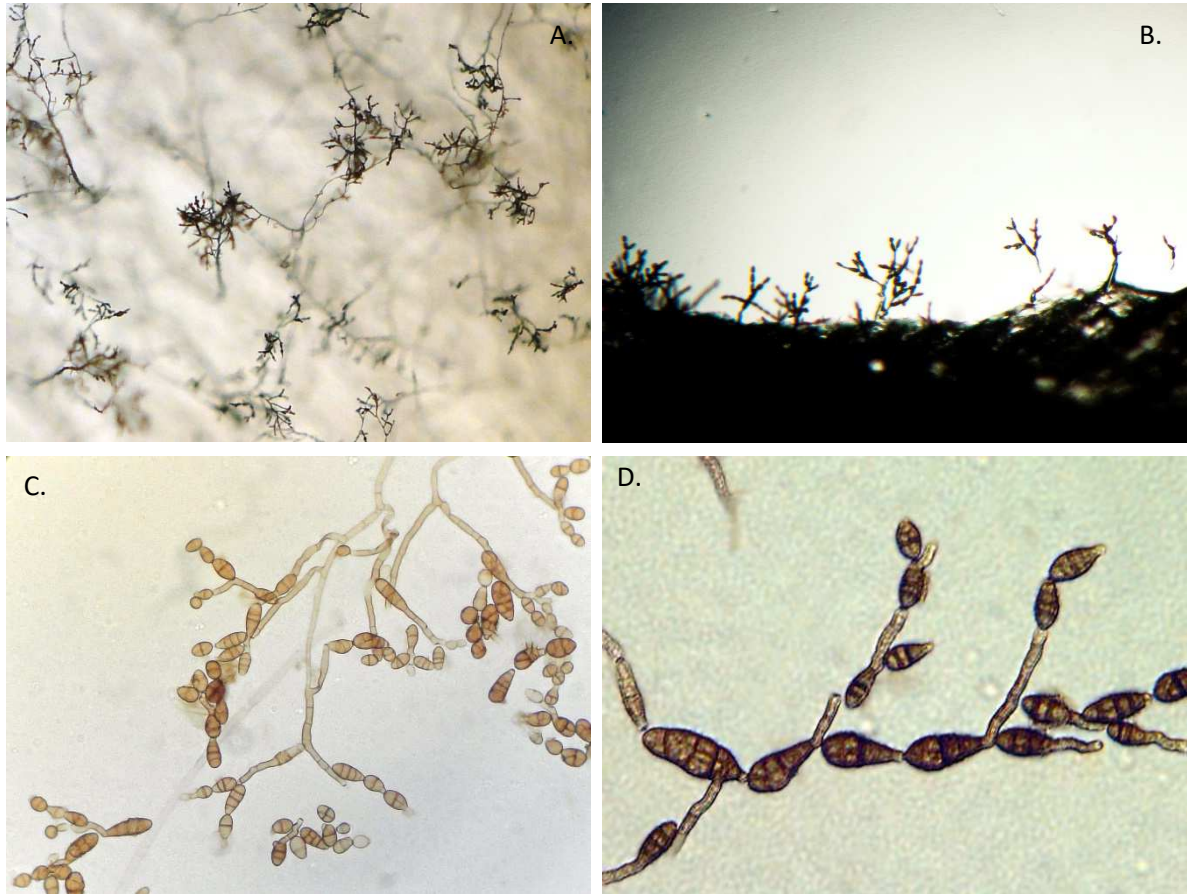


Figura III.8: Observaciones de aislamientos típicos de *A. arborescens* grupo-especie en placa de APZ. A. patrones tridimensionales de esporulación a 16x; B. visión lateral de corte a 100x; C. preparado con ácido láctico a magnificación 400x; D. detalle de conidios a 1000x.

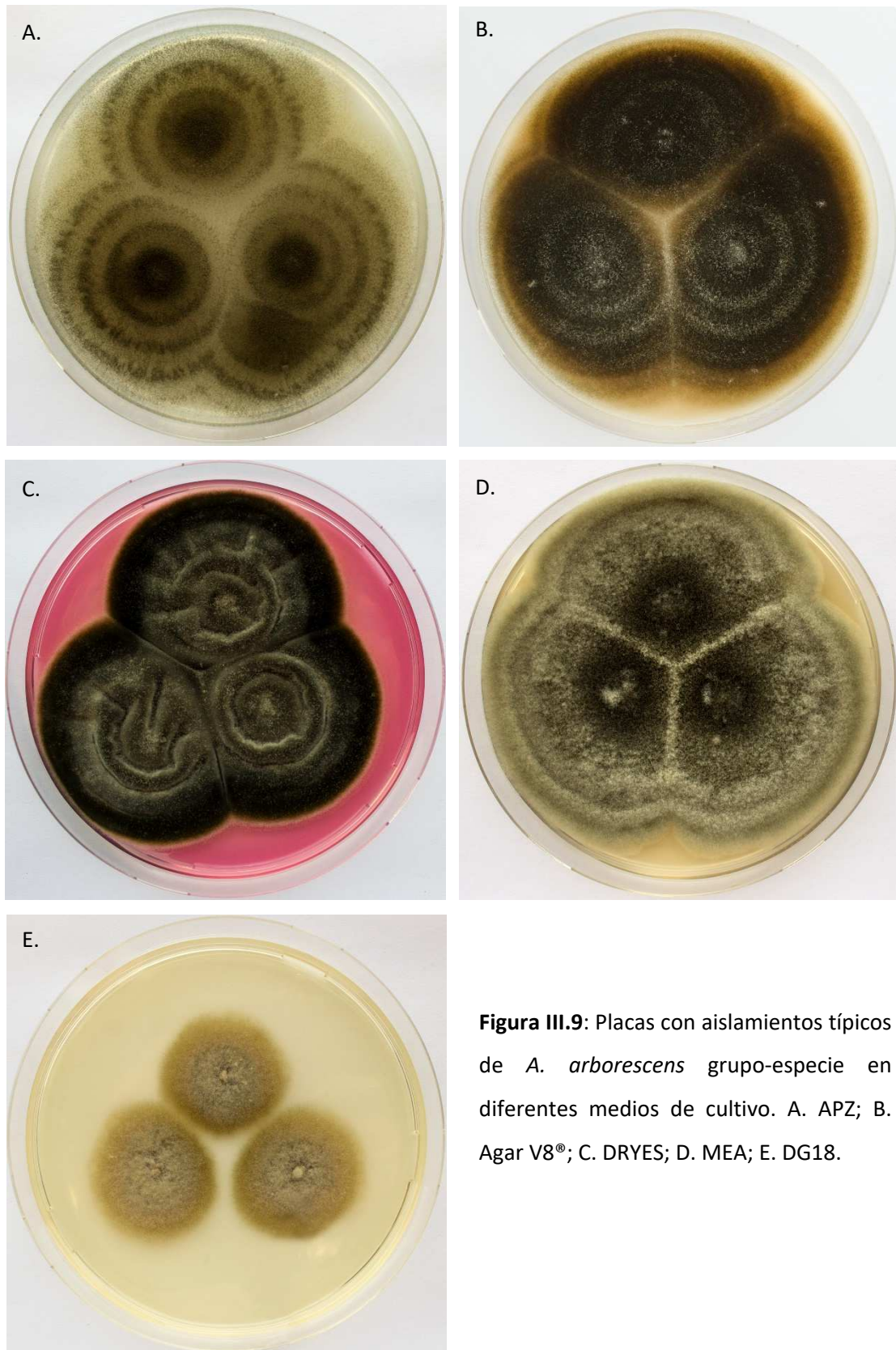


Figura III.9: Placas con aislamientos típicos de *A. arborescens* grupo-especie en diferentes medios de cultivo. A. APZ; B. Agar V8®; C. DRYES; D. MEA; E. DG18.

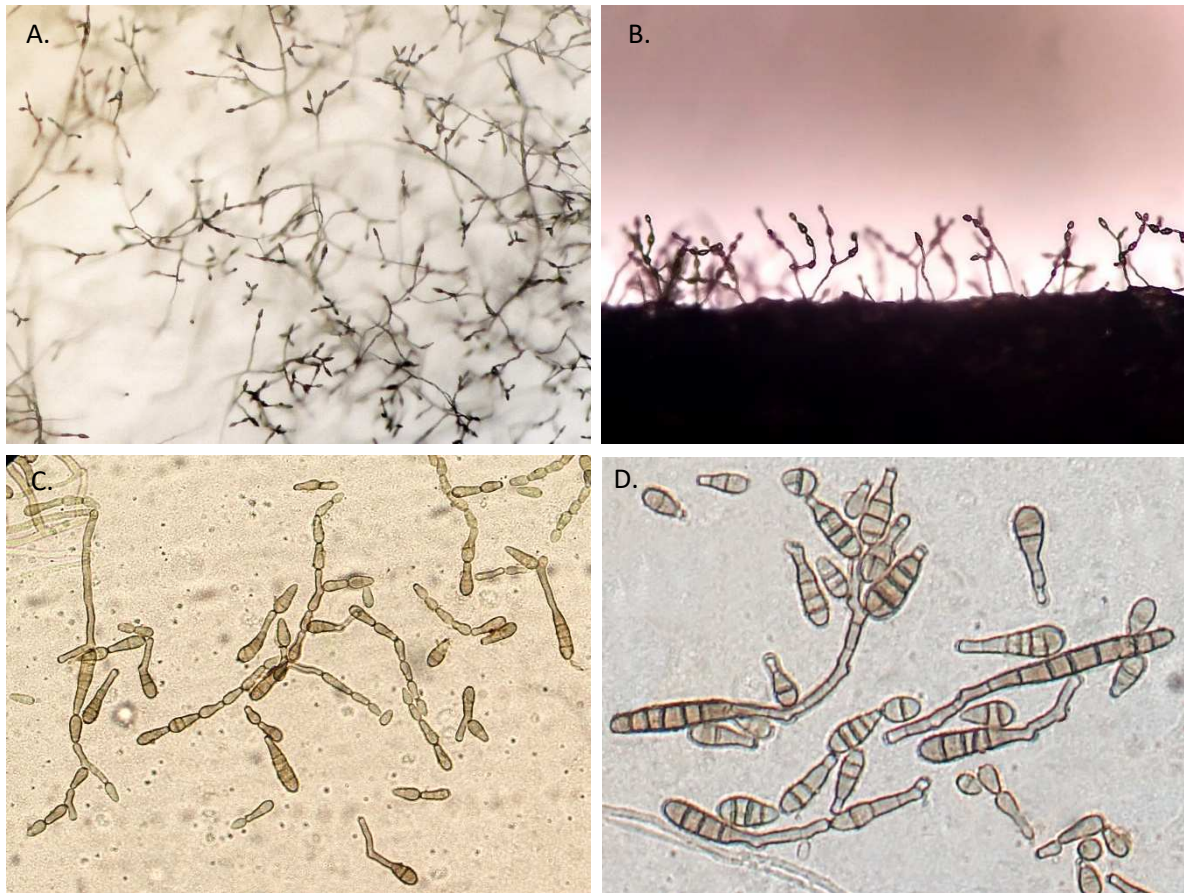


Figura III.10: Observaciones de aislamientos típicos de *A. infectoria* grupo-especie en placa de APZ. A. 16x; B. corte a 100x; C. preparado con ácido láctico a magnificación 400x; D. detalle de conidios a 1000x.

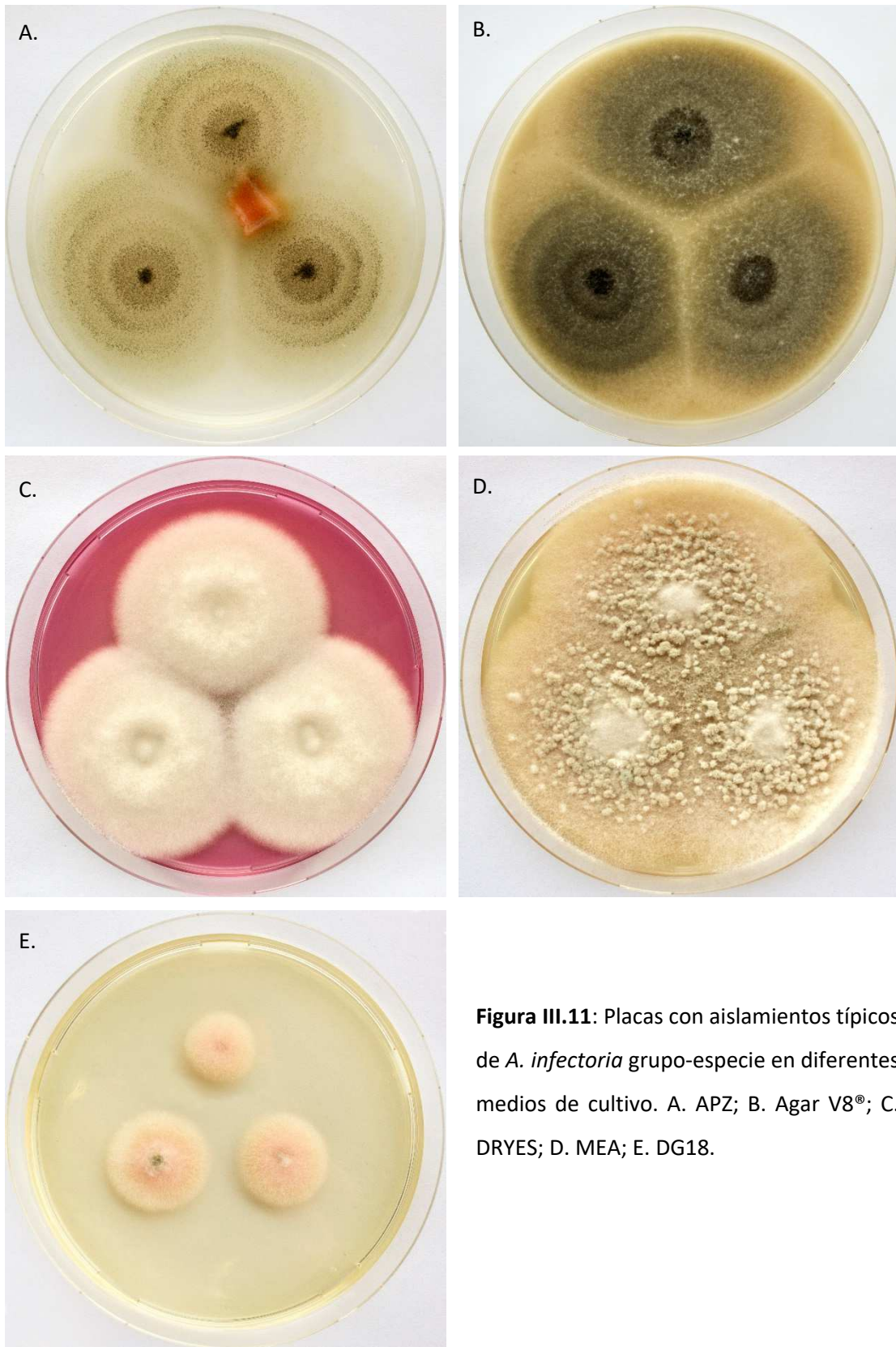


Figura III.11: Placas con aislamientos típicos de *A. infectoria* grupo-especie en diferentes medios de cultivo. A. APZ; B. Agar V8®; C. DRYES; D. MEA; E. DG18.

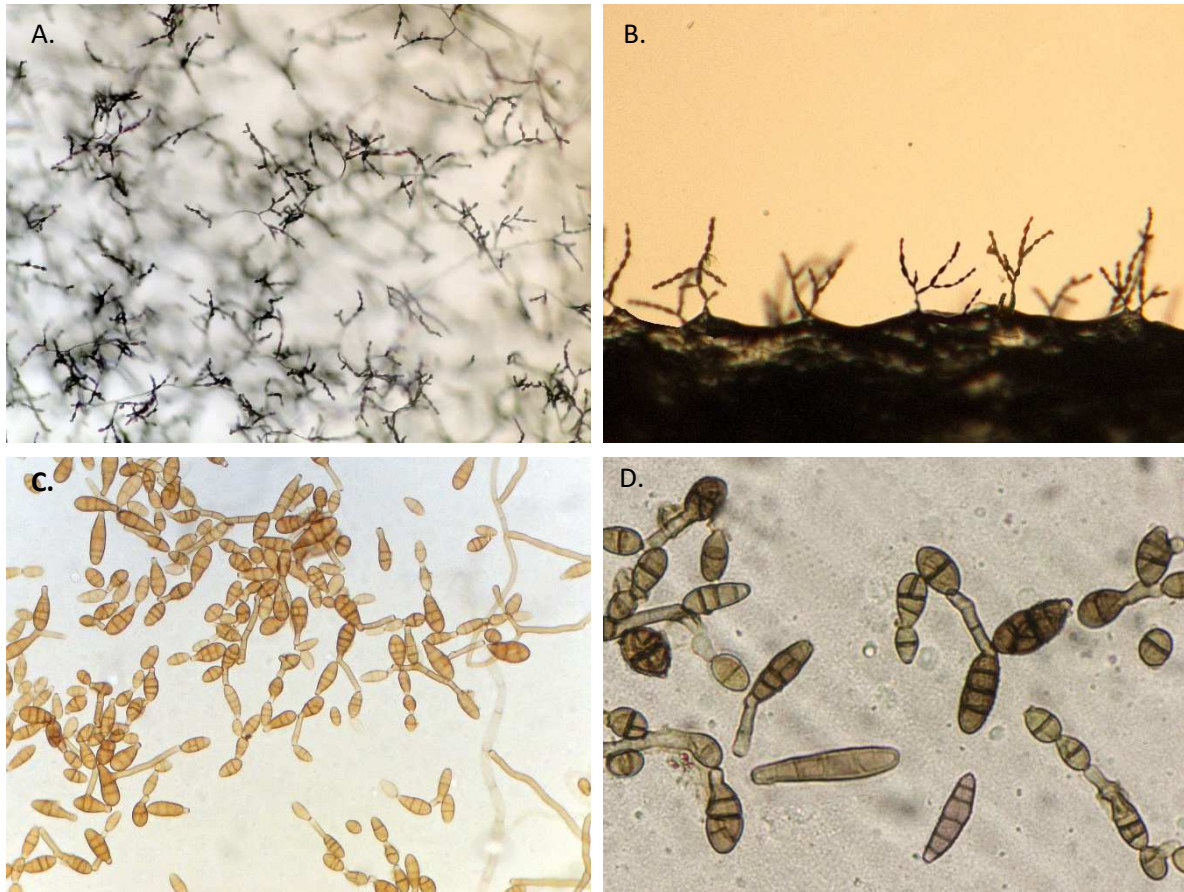


Figura III.12: Observaciones de aislamientos típicos de *A. alternata* grupo-especie en placa de APZ. A. 16x; B. corte a 100x; C. preparado con ácido láctico a magnificación 400x; D. detalle de conidios a 1000x.

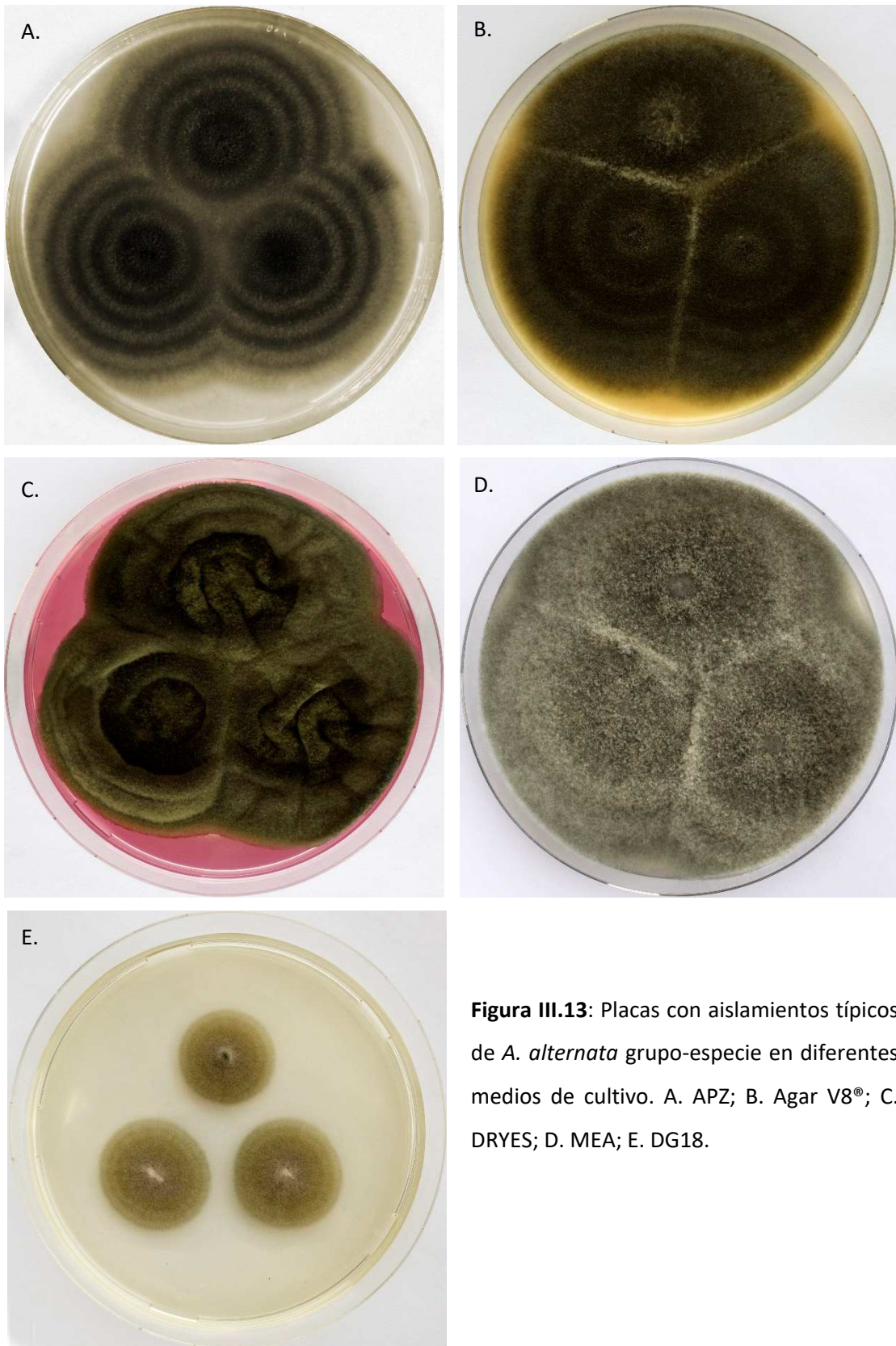


Figura III.13: Placas con aislamientos típicos de *A. alternata* grupo-especie en diferentes medios de cultivo. A. APZ; B. Agar V8®; C. DRYES; D. MEA; E. DG18.

III.3.3. Caracterización metabolómica

III.3.3.a.-Perfiles de producción de metabolitos secundarios

Un subgrupo representativo formado por 227 aislamientos de *Alternaria* spp. fue seleccionado para determinar su perfil de metabolitos secundarios en condiciones estandarizadas *in vitro*. Este grupo estuvo conformado por 33 cepas obtenidas de arándanos, 64 de pimientos, 57 de tomate y 73 de trigo. La base de datos utilizada abarcó 678 compuestos fúngicos, incluyendo metabolitos producidos por *Alternaria* spp. y especies de géneros relacionados y/o de importancia en alimentos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stemphylium*, *Ulocladium*. Para la generación de perfiles de metabolitos secundarios se seleccionaron solamente aquellos cuya identificación preliminar realizada mediante su tiempo de retención, su masa exacta, su patrón isotópico y los datos de espectroscopía UV/Vis, fue confirmada por el patrón de fragmentación en EM/EM. En función de dichas confirmaciones, se seleccionaron 50 metabolitos secundarios de estructura conocida para los posteriores análisis. Además, se incluyeron otros 43 metabolitos de estructura desconocida, que fueron consistentemente producidos por algunos de los aislamientos, y cuya unicidad fue confirmada por sus tiempos de retención y su masa exacta. La Figura III.14 muestra un ejemplo de la asignación de metabolitos de estructura conocida en un cromatograma de UHPLC-EM.

Los perfiles de producción de los 93 metabolitos secundarios fueron evaluados para determinar si constituyen una herramienta taxonómica idónea para segregar los grupos-especie de *Alternaria* de esporas pequeñas aislados de alimentos y como soporte de la clasificación morfológica. Para ello, se realizó un análisis de correspondencias múltiples a partir de una matriz binaria de los metabolitos (ausencia/presencia). El resultado de este análisis se muestra en la Figura III.15. El porcentaje total de varianza explicado por estas dos dimensiones fue del 25,6 %. Se observó claramente la separación de los aislamientos pertenecientes al grupo-especie *A. infectoria*, mientras que el resto de los aislamientos se agruparon en una nube sin evidente distinción según los grupos-especie en los que fueron clasificados ni los alimentos de los que fueron obtenidos.

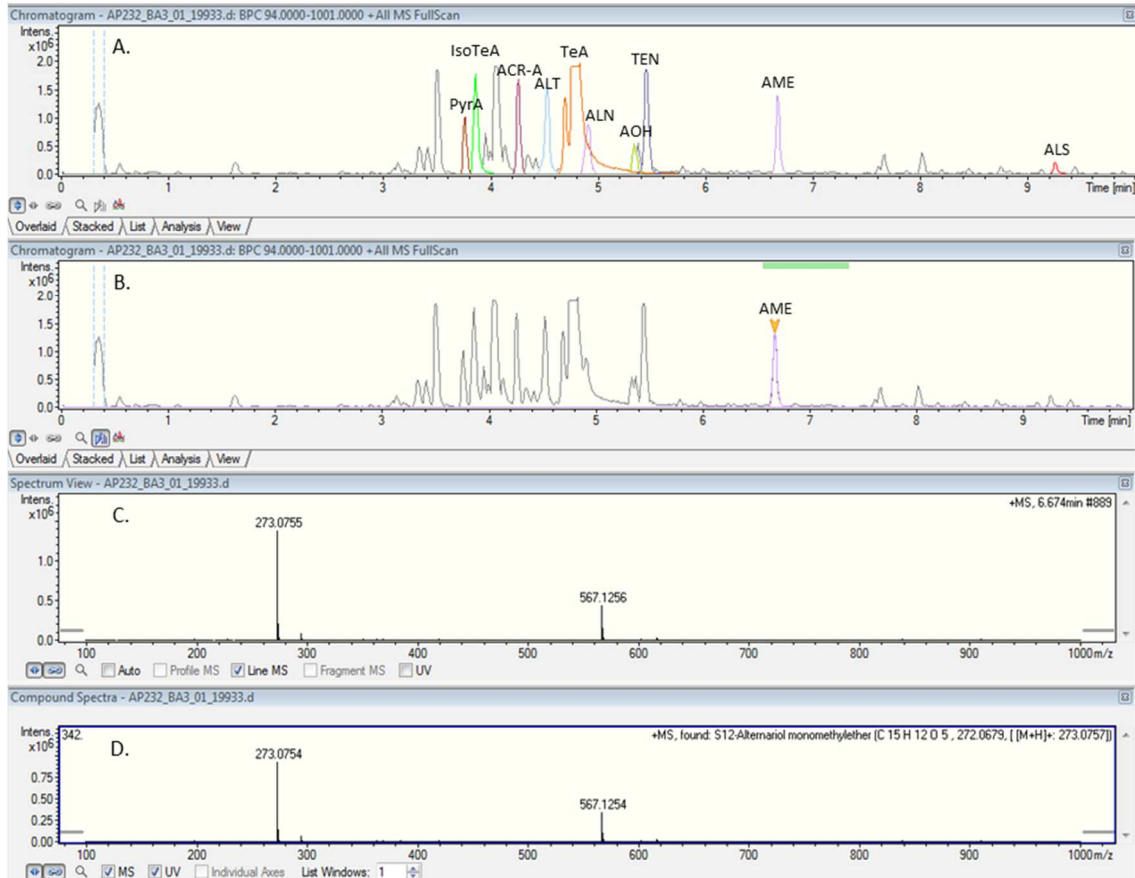


Figura III.14: Ejemplo de asignación de compuestos a partir de un extracto fúngico en DRYES analizado en UHPLC-EM en modo ESI⁺. A. Cromatograma (BPC) de *Alternaria* con los picos de los compuestos mayoritarios detectados superpuestos a color. B-D. Ejemplo de asignación de la identidad del pico de AME por su tiempo de retención y masa exacta comparado contra patrón. B. BPC con el pico de AME señalado (tr=6,67 min); C. Espectro de masa del pico con tr=6,67 min. D. Espectro de masa del patrón de AME (obtenido de base de datos).

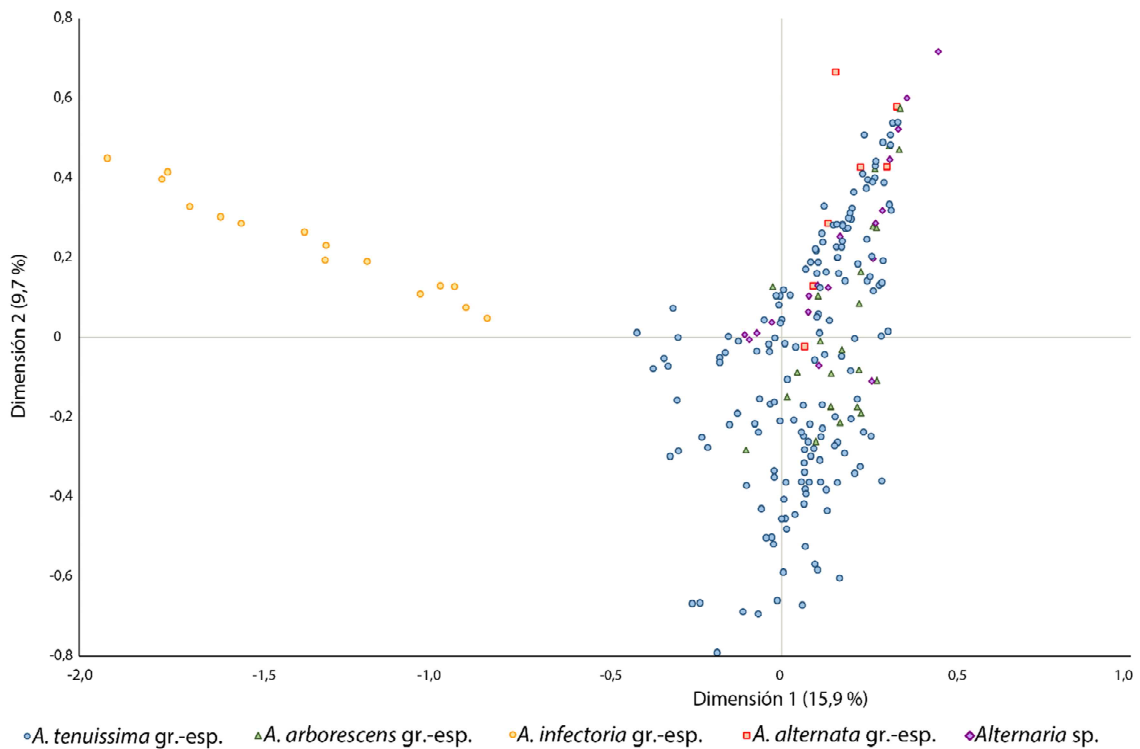


Figura III.15: Distribución de casos (aislamientos identificados por grupo-especie) en el análisis de correspondencias múltiples en dos dimensiones utilizando 93 metabolitos secundarios como variables. El valor entre paréntesis de los ejes indica el porcentaje de varianza explicado por cada dimensión.

III.3.3.a.i.- *A. infectoria* gr.-esp.

Los aislamientos analizados pertenecientes al grupo-especie *A. infectoria* produjeron 15 metabolitos específicos de este grupo, que no fueron sintetizados por ninguno de los otros grupos-especie (Tabla III.4). Además, estas cepas fueron capaces de sintetizar siete compuestos más, en común con el resto de los grupos. La Figura III.16 muestra la proporción de aislamientos de *A. infectoria* productores de estos últimos, respecto del total de aislamientos productores.

Tabla III.4: Metabolitos producidos por aislamientos del grupo-especie *A. infectoria*.

Metabolito	N° de aislamientos productores (n=15)
Infectopirona	15
Novae zelandina B	15
Novae zelandina A	14
8R.9S-9.10-Epoxi-8-hidroxi-9-metildeca-2E.4Z.6E-acido-trienoico	14
3-Epiradicinol	11
3-Metoxi-3-epiradicinol	10
Albrasitriol	10
Phomapirona A	10
Tricicloalternareno 7a/7c	10
Phomapirona B	9
Tricicloalternareno E	9
Homodestruixina B	8
Phomapirona D	8
Clonostaquidiol	5
Ácido pirenocaético A	4
Tricicloalternareno 5a/5b	4
Brasicadiol	3
Phomapirona G/E	3
Altersetina	2
Deoxiradicinina	1
Phomapirona F	1
Tricicloalternareno 1a/1b	1

Los compuestos señalados en negrita fueron producidos únicamente por cepas de este gr.-esp.

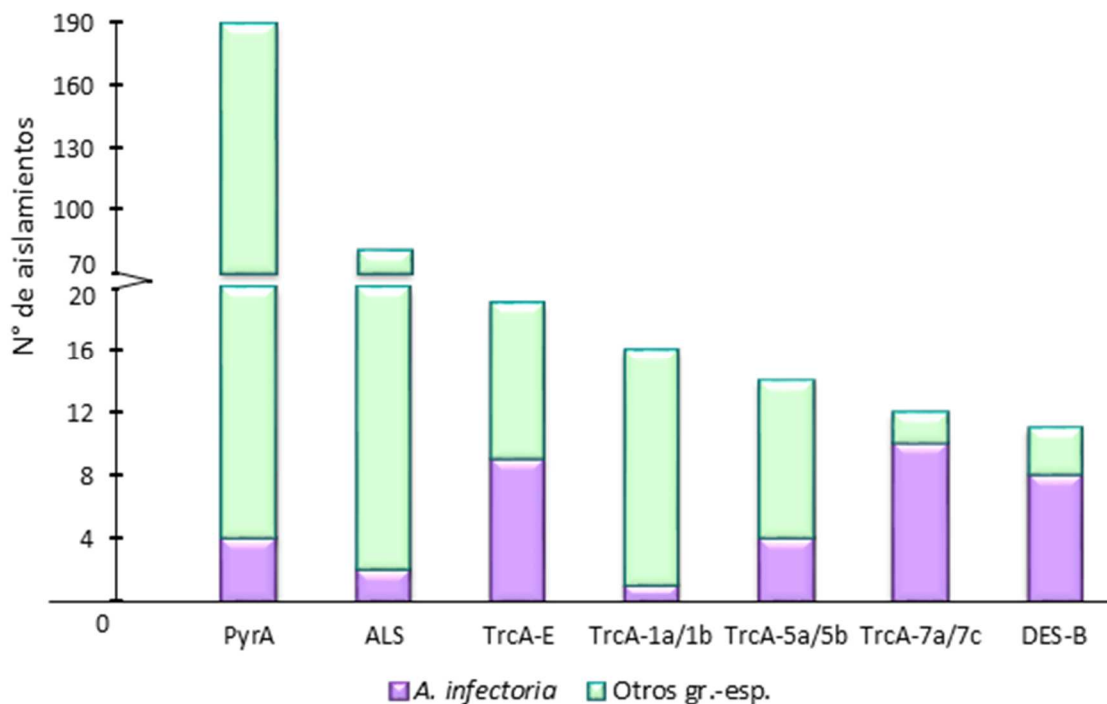


Figura III.16: Metabolitos en común entre aislamientos de *A. infectoria* gr.-esp. y otros grupos-especie. La barra completa representa el número total de cepas de *Alternaria* productoras de cada compuesto. PyrA: ácido pirenocaético; ALS: altersetina; TrcA: tricicloalternareno; DES-B: homodestruxina B.

III.3.3.a.ii.-*A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata* gr.-esp.

El resto de los aislamientos produjeron metabolitos comunes a todos los grupos-especie. No se pudo identificar ningún compuesto específico de grupo que permita discriminar los morfogrupos establecidos según la clave taxonómica de Simmons (2007). En función de estos resultados, se realizó un segundo análisis de correspondencias múltiples sobre estos aislamientos (excluyendo los 15 metabolitos específicos del grupo-especie *A. infectoria*) para evaluar posibles agrupaciones en el perfil de metabolitos de estos grupos, ya sea coincidente con las diferencias morfológicas o de alguna otra índole. El resultado de este análisis realizado con 78 metabolitos como variables se muestra en la Figura III.17. Todos los aislamientos se distribuyeron aleatoriamente en el gráfico en dos dimensiones en posiciones cercanas al origen de coordenadas, sin detectarse ningún tipo de segregación.

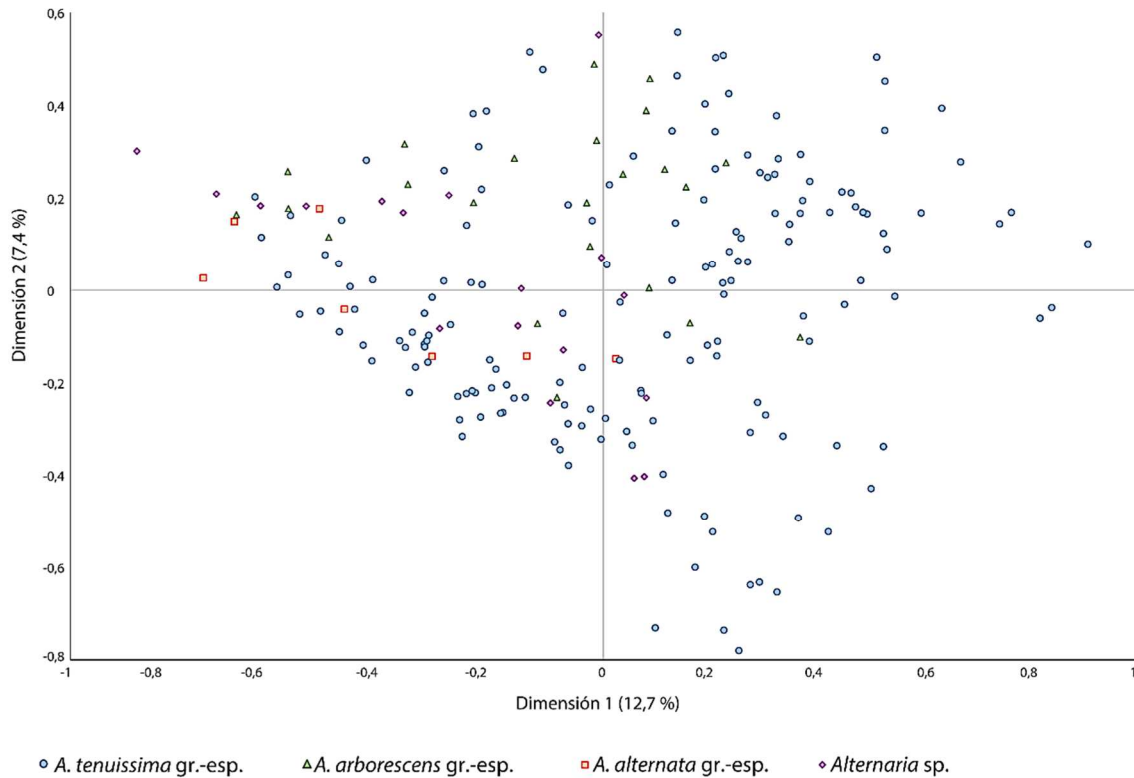


Figura III.17: Distribución de casos (aislamientos identificados por grupo-especie) en el análisis de correspondencias múltiples en dos dimensiones utilizando 78 metabolitos como variables, 35 conocidos y 43 de estructura desconocida. El valor entre paréntesis de los ejes indica el porcentaje de varianza explicado por cada dimensión.

Si bien no se observó la formación de subgrupos entre los aislamientos analizados, algunos de ellos presentaron perfiles particularmente distintos del resto. Entre ellos, se puede mencionar a un aislamiento de trigo clasificado como *A. tenuissima* gr.-esp., que resultó el único que no fue capaz de sintetizar ninguno de los metabolitos de estructura conocida en las condiciones ensayadas. Otra cepa también identificada como *A. tenuissima* gr.-esp., obtenida de tomate, fue la única que produjo un solo metabolito de estructura identificada, TEN. Luego, una tercera cepa de *A. tenuissima* gr.-esp. aislada de pimiento produjo únicamente TeA y su derivado isoTeA. Más aún, sobre un total de cuatro cepas productoras de sólo tres metabolitos de estructura conocida, dos de ellas (ambas *A. tenuissima* gr.-esp., una de pimiento y otra de arándano), produjeron los tres metabolitos antes mencionados (TEN, TeA e isoTeA).

III.3.3.b.-Capacidad metabolómica de *Alternaria* spp. de alimentos

La mayoría de las cepas fue capaz de sintetizar *in vitro* un elevado número de metabolitos secundarios (Tabla III.5). La moda estadística fue de 19 compuestos producidos. El máximo fue 33, correspondiente a una cepa de *Alternaria* sp. obtenida de pimiento, de los cuales 17 fueron metabolitos de estructura conocida y 16 desconocida. Además, 32 aislamientos fueron capaces de producir más de 25 compuestos. El valor mínimo de metabolitos detectados fue 1, que correspondió a la cepa de trigo que no produjo ninguno de los metabolitos de estructura conocida, mencionada anteriormente. Sólo cuatro aislamientos fueron productores de menos de 5 metabolitos. En cuanto a los metabolitos de estructura conocida particularmente, la cepa que fue capaz de sintetizar la mayor cantidad fue una *A. tenuissima* gr.-esp. aislada de trigo, con un total de 22, siendo este valor el doble del más frecuente para dichos metabolitos (11).

Tabla III.5: Valores mínimo, máximo y moda estadística de producción de metabolitos totales (93) y de estructura conocida (50) por aislamientos de *Alternaria* spp. de alimentos *in vitro*.

	Mínimo	Máximo	Moda
Metabolitos totales	1	33	19
Metabolitos de estructura conocida	0	22	11

La Tabla III.6 muestra el número de aislamientos productores de los compuestos de estructura conocida sintetizados por al menos el 10 % del total de aislamientos estudiados. Los metabolitos producidos por al menos el 10 % de los aislamientos de cada sustrato discriminados por grupo-especie se muestran en las Tablas III.7, III.8, III.9 y III.10. En la Tabla III.11 se listan los compuestos minoritarios producidos por los aislamientos estudiados y en la Tabla III.12 los compuestos de *Alternaria* incluidos en la base de datos utilizada, pero que no fueron producidos por ninguna de las cepas. Los compuestos detectados con mayor frecuencia en todos los sustratos fueron AOH, AME, ALT, PyrA y ACR-A. Sobre estos dos últimos, existen muy pocos datos acerca de su toxicidad o contaminación en alimentos en la bibliografía. Las micotoxinas preponderantes fueron los alternarioles (AOH y AME), independientemente del sustrato de origen de los aislamientos productores. Los aislamientos de arándanos los produjeron en una frecuencia del 82 % (AME) y 73 % (AOH), mientras que en el resto de los sustratos dicha frecuencia fue de entre 90 y 98 % para ambos compuestos. ALT, TEN y TeA fueron las siguientes toxinas con mayor frecuencia de producción por los aislamientos de todos los alimentos (82-95 % para ALT; 53-76 % para TEN y 53-66 % para TeA). Por otra parte, las altertoxinas fueron sintetizadas por un menor

número de aislamientos provenientes de todos los sustratos y correspondientes a todos los grupos-especie analizados. En particular, ATX-III sólo fue producida por dos aislamientos clasificados como *A. tenuissima* gr.-esp., uno obtenido de tomate y el otro de trigo. ATX-I fue, en general, más frecuentemente detectada que ATX-II, excepto para los aislamientos de trigo, donde esta última fue la que prevaleció. Por último, las toxinas específicas de hospedador (AAL, AK, AF y AM) no fueron detectadas en ningún caso (Tabla III.12).

Tabla III.6: Número de aislamientos de *Alternaria* spp. productores de los metabolitos más frecuentes por alimento de origen.

Metabolito	Total (227)	Arándanos (33)	Pimientos (64)	Tomate (57)	Trigo (73)
Alternariol monometil éter	195	27	59	55	54
Alternariol	191	24	59	56	52
Ácido pirenocaético	189	28	55	51	55
Altenueno	183	27	54	54	48
Altecromona A	182	25	59	52	46
Tentoxina	138	25	46	36	31
Ácido tenuazónico	121	18	41	30	32
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	108	8	38	37	25
Altenuisol	104	11	30	31	32
Ácido isopropil tetrámico	100	18	34	26	22
Tricicloalternareno A	82	25	25	9	23
Altersetina	82	7	27	31	17
Altenusina	73	10	25	23	15
Altertoxina I	64	19	17	12	16
Alterlactona	63	10	13	24	16
Alterperilenol	59	13	12	12	22
2,3-DiOH-quinolin-4-O-β-D-glucopiranosido	50	1	17	32	0
Altersolanol	48	5	17	21	5
Dihidrotentoxina	43	8	21	6	8
Altecromona B	40	4	12	14	10
Tricicloalternareno C	38	11	13	6	8
Altertoxina II	33	4	4	6	19

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por alimento en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.7: Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de arándano, productores de los metabolitos más frecuentes por grupo-especie.

Metabolito	Total (33)	<i>A. tenuissima</i> gr.- esp. (32)	<i>A. alternata</i> gr.- esp. (1)
Ácido pirenocaético A	28	27	1
Alternariol monometil éter	27	26	1
Altenueno	27	26	1
Altecromona A	25	24	1
Tentoxina	25	25	0
Tricicloalternareno A	25	24	1
Alternariol	24	23	1
Altertoxina I	19	19	0
Ácido tenuazónico	18	18	0
Ácido isopropil tetrámico	18	18	0
Alterperilenol	13	13	0
Altenuisol	11	10	1
Tricicloalternareno C	11	10	1
Altenusina	10	9	1
Alterlactona	10	9	1
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	8	7	1
Dihidrotentoxina	8	8	0
Altersetina	7	6	1
Altersolanol	5	5	0
Altecromona B	4	3	1
Altertoxina II	4	4	0
Tricicloalternareno E	4	3	1
Tricicloalternareno 5a/5b	4	3	1

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por grupo-especie en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.8: Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de pimiento, productores de los metabolitos más frecuentes por grupo-especie.

Metabolito	Total (64)	<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. (49)	<i>A. arborescens</i> gr.-esp. (4)	<i>A. alternata</i> gr.-esp. (4)	<i>Alternaria</i> sp. (7)
Alternariol monometil éter	59	44	4	4	7
Alternariol	59	44	4	4	7
Altecromona A	59	44	4	4	7
Ácido pirenocaético A	55	40	4	4	7
Altenueno	54	40	3	4	7
Tentoxina	46	39	1	3	3
Ácido tenuazónico	41	33	2	1	5
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	38	25	3	3	7
Ácido isopropil tetrámico	34	30	1	0	3
Altenuisol	30	20	2	3	5
Altersetina	27	21	1	2	3
Tricicloalternareno A	25	19	2	2	2
Altenucina	25	15	1	3	6
Dihidrotentoxina	21	18	1	1	1
Altertoxina I	17	16	0	0	1
2,3-DiOH-quinolin-4-O-β-D-glucopiranosido	17	15	0	1	1
Altersolanol	17	12	1	2	2
Alterlactona	13	9	1	1	2
Tricicloalternareno C	13	12	0	0	1
Alterperilenol	12	12	0	0	0
Altecromona B	12	7	2	1	2
Ácido alternarienónico	8	5	1	1	1

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por grupo-especie en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.9: Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de tomate, productores de los metabolitos más frecuentes por grupo-especie.

Metabolito	Total (57)	<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. (39)	<i>A. arborescens</i> gr.-esp. (16)	<i>A. alternata</i> gr.-esp. (2)
Alternariol	56	38	16	2
Alternariol monometil éter	55	37	16	2
Altenueno	54	37	15	2
Altecromona A	52	34	16	2
Ácido pirenocaético A	51	34	15	2
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	37	24	11	2
Tentoxina	36	27	9	0
2,3-DiOH-quinolin-4-O-β-D-glucopiranosido	32	26	6	0
Altenuisol	31	20	9	2
Altersetina	31	16	13	2
Ácido tenuazónico	30	14	14	2
Ácido isopropil tetrámico	26	12	13	1
Alterlactona	24	21	2	1
Altenusina	23	19	3	1
Altersolanol	21	20	1	0
Altecromona B	14	7	7	0
Altertoxina I	12	12	0	0
Alterperilenol	12	12	0	0
Tricicloalternareno A	9	9	0	0
Ácido diaportínico	7	5	1	1
Dihidrotentoxina	6	4	2	0
Tricicloalternareno C	6	6	0	0
Altertoxina II	6	6	0	0

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por grupo-especie en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.10: Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de trigo, productores de los metabolitos más frecuentes por grupo-especie.

Metabolito	Total (73)	<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. (48)	<i>A. arborescens</i> gr.-esp. (4)	<i>A. infectoria</i> gr.-esp. (15)	<i>A. alternata</i> gr.-esp. (1)	<i>Alternaria</i> sp. (5)
Ácido pirenocaético A	55	41	4	4	1	5
Alternariol monometil éter	54	44	4	0	1	5
Alternariol	52	42	4	0	1	5
Altenueno	48	38	4	0	1	5
Altecromona A	46	37	4	0	1	4
Ácido tenuazónico	32	27	2	0	0	3
Altenuisol	32	25	4	0	1	2
Tentoxina	31	26	3	0	0	2
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	25	17	4	0	1	3
Tricicloalternareno A	23	20	1	0	1	1
Ácido isopropil tetrámico	22	20	2	0	0	0
Alterperilenol	22	11	0	10	0	1
Altertoxina II	19	18	0	0	0	1
Altersetina	17	11	3	2	0	1
Alterlactona	16	12	2	0	1	1
Altertoxina I	16	15	0	0	0	1
Novae zelandina B	15	0	0	15	0	0
Altenusina	15	12	2	0	1	0
Infectopirona	15	0	0	15	0	0
Novae zelandina A	14	0	0	14	0	0
9,10-Epoxi-8-OH-9-metildeca-2,4,6-ácido trienoico	14	0	0	14	0	0
Tricicloalternareno E	11	2	0	9	0	0
Altecromona B	10	6	3	0	0	1
Tricicloalternareno 7a/ 7c	10	0	0	10	0	0
Homodestruxina B	10	1	0	8	0	1
3-Metoxi-3-epiradicinol	10	0	0	10	0	0

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por grupo-especie en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.10 (continuación): Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de trigo, productores de los metabolitos más frecuentes por grupo-especie.

Metabolito	Total (73)	<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. (48)	<i>A. arborescens</i> gr.-esp. (4)	<i>A. infectoria</i> gr.-esp. (15)	<i>A. alternata</i> gr.-esp. (1)	<i>Alternaria</i> sp. (5)
3-Epiradicinol	10	0	0	10	0	0
Phomapirona A	10	0	0	10	0	0
Phomapirona B	9	0	0	9	0	0
Albrasitriol	9	0	0	9	0	0
Dihidrotentoxina	8	6	1	0	0	1
Tricicloalternareno C	8	8	0	0	0	0
Phomapirona D	8	0	0	8	0	0

Los números entre paréntesis indican el total de aislamientos por grupo-especie en cada columna. Los compuestos señalados en negrita son considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017).

Tabla III.11: Metabolitos secundarios producidos *in vitro* por menos del 10% de los aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de arándano, pimiento, tomate y trigo de Argentina.

Metabolito	N° de productores
Tricicloalternareno 1a/1b	16
Tricicloalternareno 8a	9
Demetilaltenusina	6
cis-Dehidrocurvularina	6
Clonostaquidiol	5
Dehidroaltenusina	5
Stemphyltoxina III	5
Phomapirona G/E	3
Brasicadiol	3
Altertoxina III	2
Phomapirona F	1
Deoxiradicinina	1

Tabla III.12: Metabolitos secundarios reportados para *Alternaria* spp. que no fueron producidos *in vitro* por los aislamientos obtenidos de arándano, pimienta, tomate y trigo de Argentina.

Metabolito	Metabolito
7-Oxo-brefeldina B	Toxina AAL-TA
Ácido alténuico II	Toxina AAL-TB1
Alterlosina II	Toxina AAL-TB2
Alternaramida	Toxina AAL-TC1
Deoxiuidina B	Toxina AAL-TD1
Radicina	Toxina AAL-TD2
Raistrick fenol	Toxina AAL-TE1
Resveratrol	Toxina AAL-TE2
Solanapirona C	Toxina AF-III
Tetrahidroaltersolanol	Toxina AK-II
Zinnimidina	Toxina AK-III
	Toxina AM-I

III.3.3.c.-Evaluación del riesgo toxicológico asociado a los distintos alimentos

Teniendo en cuenta la elevada capacidad metabólica detectada en los aislamientos de *Alternaria* spp. contaminantes de alimentos, se decidió comparar las producciones relativas de los compuestos reportados como micotoxinas de especies de este género (Solfrizzo, 2017) por aislamientos provenientes de cada uno de los sustratos, con el fin de realizar una evaluación de riesgo sobre cada uno de los alimentos analizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.18. Los valores de producción fueron determinados en forma semicuantitativa en función del área de los picos detectados por UHPLC-EM, por lo tanto no pueden compararse entre distintos metabolitos, sino únicamente para una determinada toxina entre los distintos sustratos.

III- Caracterización polifásica de poblaciones de *Alternaria*

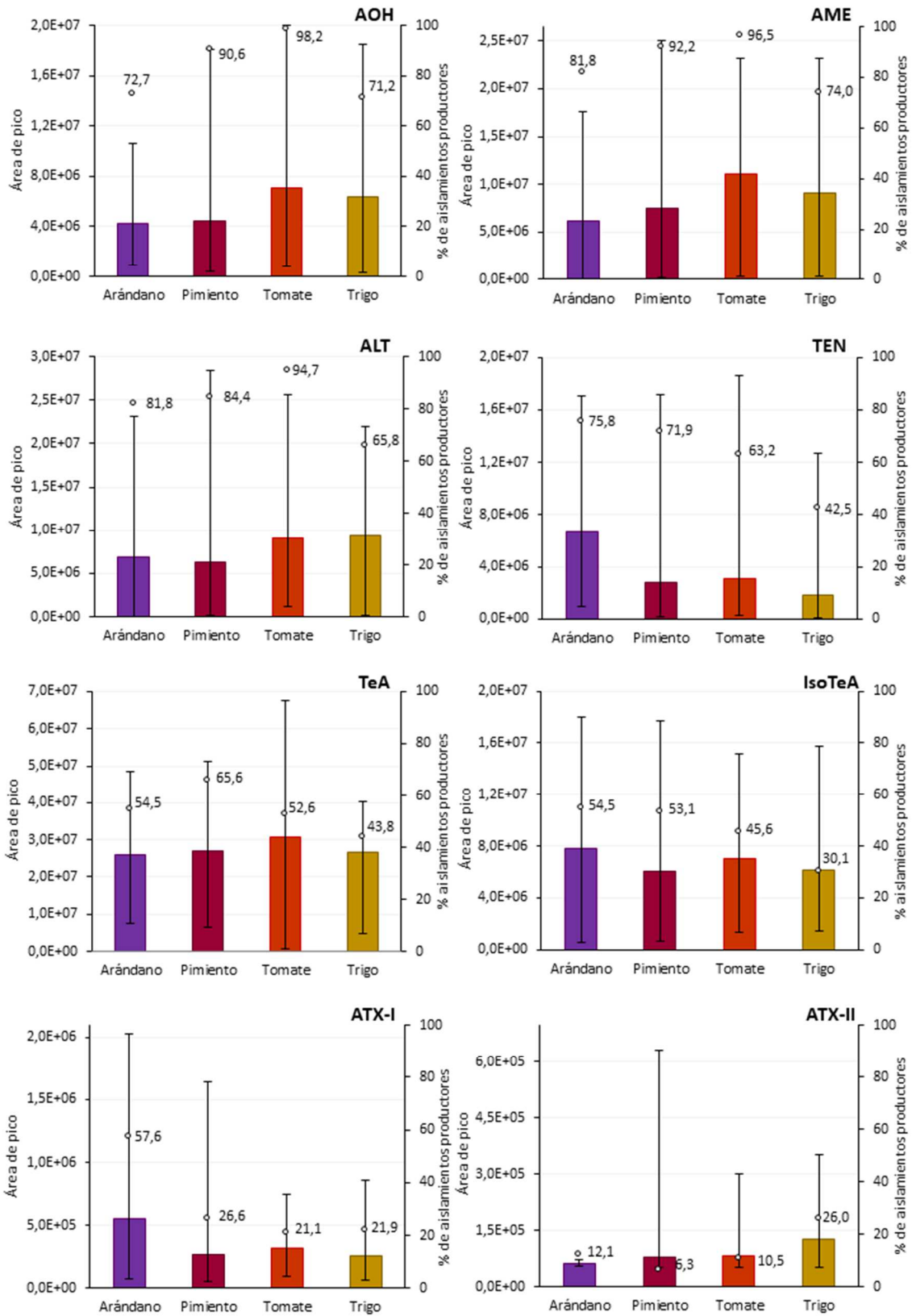


Figura III.18: Producción semicuantitativa de ocho metabolitos seleccionados por los aislamientos de *Alternaria* spp. en función del sustrato. La altura de las barras indica la mediana de las áreas y las líneas indican el rango. Los valores indicados con un punto muestran el % de aislamientos productores de ese sustrato. Nótese que la escala del eje “y” es diferente según el metabolito. AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter; ALT: altenueno; TEN: tentoxina; TeA: ácido tenuazónico; isoTeA: ácido isopropil tetrámico; ATX-I: alvertoxina I; ATX-II: alvertoxina II.

La distribución de las concentraciones de ambos alternarioles en los distintos sustratos fue similar. Los mayores niveles de ambos correspondieron a cepas de tomate, siendo también este sustrato junto con pimientos aquellos de los que se aislaron mayor porcentaje de aislamientos productores. En el caso de ALT, los niveles de producción también fueron uniformes entre los aislamientos de los cuatro alimentos estudiados. Por otro lado, los mayores niveles de TEN se hallaron en aislamientos provenientes de arándanos. Para el resto de los sustratos, si bien los niveles de la mediana de TEN no fueron muy elevados, los rangos de concentraciones se encuentran desplazados hacia valores mucho mayores debido a la presencia de escasas cepas altamente productoras. Con respecto a TeA, los niveles de toxina fueron comparables entre los aislamientos de los cuatro sustratos, observándose la presencia de muchas cepas fuertemente productoras, especialmente obtenidas de tomate. Esta tendencia no se observó para su derivado isoTeA, el cual fue producido en niveles parejos por los aislamientos de los cuatro alimentos. En cuanto a las alvertoxinas, los aislamientos obtenidos de arándanos fueron los capaces de producir los mayores niveles de ATX-I. Asimismo, fue de este sustrato del que se obtuvo el mayor porcentaje de cepas productoras. ATX-II, en cambio, fue sintetizada en mayores niveles por las cepas de trigo, sustrato a partir del cual se obtuvo el mayor porcentaje de aislamientos productores. Además, el rango de esta toxina de las cepas provenientes de pimiento es muy amplio debido a la presencia de un único aislamiento altamente productor de ATX-II.

III.3.4. Caracterización molecular y análisis filogenéticos

Para la caracterización molecular de los aislamientos se realizó la amplificación y secuenciación de una región del gen de la endopoligalacturonasa (*endoPG*), reportado en bibliografía como una herramienta útil para diferenciar los grupos de *Alternaria* de esporas pequeñas estrechamente relacionados con *A. alternata* (Andrew y col., 2009). Los cebadores utilizados

para la reacción de PCR no fueron amplificadas por los aislamientos del grupo-especie *A. infectoria*, grupo que resultó previamente segregado por los otros aspectos del enfoque polifásico (sección III.3.2 y III.3.3). El análisis se realizó sobre un subgrupo de 45 aislamientos representativo de los cuatro sustratos y de los otros tres grupos-especie (*A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata* gr.-esp.; Tabla III.13). La amplificación parcial del gen *endoPG* resultó en amplicones de longitud entre 418 a 470 pb. Las secuencias alineadas tuvieron una longitud de 473 pb. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos de GenBank (NCBI NIH, EEUU), con los números de acceso KY969535 a KY969582.

Tabla III.13: Aislamientos de *Alternaria* seleccionados para la caracterización molecular, indicando sustrato, clasificación morfológica, haplotipo y N° de acceso a la secuencia de *endoPG* en GenBank.

Código	Sustrato	<i>Alternaria</i> gr.-esp.	Haplotipo	N° de acceso
alter34016_J*	Maní	<i>A. alternata</i>	4	KY969535
arbo39128_L*	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5c	KY969538
ten34015_H*	Clavel	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969552
B_31_H	Arándano	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969553
B_32_H	Arándano	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969554
P_33_H*	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969555
P_34_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969556
P_35_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969557
P_36_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969558
P_37_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969559
P_38_L*	Pimiento	<i>A. arborescens</i>	HG-5e	KY969539
P_39_J*	Pimiento	<i>A. alternata</i>	HG-5f	KY969536
P_40_H*	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	HG-5d	KY969560
P_41_sp	Pimiento	<i>Alternaria</i> sp.	HG-5e	KY969549
P_42_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969561
P_43_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969562

Los aislamientos señalados en negrita y con * corresponden a las secuencias seleccionadas para los análisis filogenéticos.

El grupo externo fue obtenido de Stewart y col. (2014).

El código de las cepas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimiento; T: tomate; W: trigo.

Tabla III.13 (continuación): Aislamientos de *Alternaria* seleccionados para la caracterización molecular, indicando sustrato, clasificación morfológica, haplotipo y N° de acceso a la secuencia de *endoPG* en GenBank.

Código	Sustrato	<i>Alternaria</i> gr.-esp.	Haplotipo	N° de acceso
P_44_sp	Pimiento	<i>Alternaria</i> sp.	HG-5d	KY969550
P_45_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969563
P_46_H	Pimiento	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969564
T_1_H*	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969582
T_10_L	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5e	KY969543
T_11_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969567
T_12_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969568
T_2_L*	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5b	KY969581
T_3_L*	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5a	KY969540
T_47_L	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5d	KY969544
T_48_L*	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5c	KY969545
T_49_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969569
T_5_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	HG-5e	KY969565
T_50_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969570
T_7_L	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5d	KY969541
T_8_H	Tomate	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969566
T_9_L	Tomate	<i>A. arborescens</i>	HG-5e	KY969542
W_14_J*	Trigo	<i>A. alternata</i>	HG-5g	KY969537
W_16_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969571
W_18_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969572
W_20_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969573
W_21_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969574
W_22_L	Trigo	<i>A. arborescens</i>	2	KY969546
W_23_L	Trigo	<i>A. arborescens</i>	HG-5d	KY969547
W_25_sp	Trigo	<i>Alternaria</i> sp.	2	KY969551
W_26_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	HG-5e	KY969575
W_29_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969576

Los aislamientos señalados en negrita y con * corresponden a las secuencias seleccionadas para los análisis filogenéticos.

El grupo externo fue obtenido de Stewart y col. (2014).

El código de las cepas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimiento; T: tomate; W: trigo.

Tabla III.13 (continuación): Aislamientos de *Alternaria* seleccionados para la caracterización molecular, indicando sustrato, clasificación morfológica, haplotipo y N° de acceso a la secuencia de *endoPG* en GenBank.

Código	Sustrato	<i>Alternaria</i> gr.-esp.	Haplotipo	N° de acceso
W_51_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969577
W_52_H*	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	1	KY969578
W_53_L	Trigo	<i>A. arborescens</i>	HG-5e	KY969548
W_54_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	3	KY969579
W_55_H	Trigo	<i>A. tenuissima</i>	2	KY969580
A. tomato_2031*	Tomate	<i>A. tomato</i>	grupo externo	KF699423.1

Los aislamientos señalados en negrita y con * corresponden a las secuencias seleccionadas para los análisis filogenéticos.

El grupo externo fue obtenido de Stewart y col. (2014).

El código de las cepas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimiento; T: tomate; W: trigo.

III.3.4.a.- Análisis filogenéticos

Como primer análisis para evaluar la variabilidad génica en la subpoblación en estudio se construyó una red de haplotipos, la cual se muestra en la Figura III.19. La muestra estudiada estuvo compuesta por 11 haplotipos. El haplotipo ancestral (“W_52_H”), representado por un rectángulo en la red, estuvo conformado por un solo aislamiento proveniente de trigo y clasificado morfológicamente como *A. tenuissima* gr.-esp. Uno de sus derivados, representado en la figura como “T_1_H” estuvo formado por 6 aislamientos de trigo, 4 de tomate y 2 de arándanos (12 aislamientos en total), pertenecientes principalmente al grupo-especie *A. tenuissima*, excepto 2 aislamientos, clasificados como *A. arborescens* gr.-esp. y *Alternaria* sp. El haplotipo denominado “P_33_H” incluyó 15 aislamientos, todos pertenecientes al grupo morfológico “H” descrito en el manual de Simmons (2007), obtenidos de pimiento, trigo y tomate (9, 4 y 2, respectivamente) y la cepa de referencia *A. tenuissima* EGS 34015. El resto de los aislamientos mostraron estar más emparentados entre sí que con los anteriormente descritos, conformando un haplogrupo que se denominó HG-5, comprendido por siete haplotipos. Dos de ellos, “T_2_L” y “T_3_L”, estuvieron formados por un único aislamiento, ambos clasificados como *A. arborescens* gr.-esp. y obtenidos de tomate. El haplotipo “T_45_L” estuvo conformado únicamente por 2 cepas también de *A. arborescens* gr.-esp., una de ellas aislada de fruto de tomate, y la otra fue la cepa de referencia *A. arborescens* EGS 39128, obtenida de hoja del mismo vegetal. Los haplotipos “P_39_J” y “W_14_J” estuvieron

constituidos por un único aislamiento cada uno, ambos clasificados en el grupo-especie *A. alternata*. El haplotipo “P_40_H” estuvo formado por cepas clasificadas en los grupos “L” (3), “H” (1) y sp. (1), obtenidas de pimiento, trigo y tomate (2, 1 y 2 aislamientos, respectivamente). Los siete aislamientos restantes conformaron el haplotipo “P_38_L”, y pertenecen a los morfogrupos *A. arborescens* gr.-esp. (4), *A. tenuissima* gr.-esp. (2) y *Alternaria* sp. (1), provenientes de pimiento, trigo y tomate (2, 2 y 3 aislamientos, respectivamente). En general, la red de haplotipos mostró muy bajos niveles de diversidad genética dentro de los aislamientos y no se observó una correlación entre haplotipos y sustrato de origen o morfogrupos.

Una secuencia representativa de cada haplotipo fue seleccionada aleatoriamente para los análisis subsiguientes. Estas 11 secuencias se indican con negrita y (*) en la Tabla III.13. Con ellas, se construyeron las filogenias basadas en dos escuelas de pensamiento diferentes: la escuela cladística (método basado en máxima parsimonia) y la escuela probabilística (métodos de máxima verosimilitud y Bayesianos). El árbol obtenido a partir del análisis Bayesiano se muestra en la Figura III.20. El análisis por máxima parsimonia generó un árbol de 24 pasos evolutivos que se muestra en la Figura III.21. Ambas topologías coincidieron con las relaciones representadas en la red de haplotipos. Incluso los siete haplotipos comprendidos en el haplogrupo HG-5 resultaron estar más relacionados entre ellos que con cualquier otra secuencia. La confiabilidad de los grupos fue evaluada a través de los valores de probabilidad posterior y de bootstrap de los nodos en cada análisis; ambas medidas de soporte resultaron ser muy bajas, como es esperable entre entidades con niveles muy bajos de divergencia (Ballard y Whitlock, 2004).

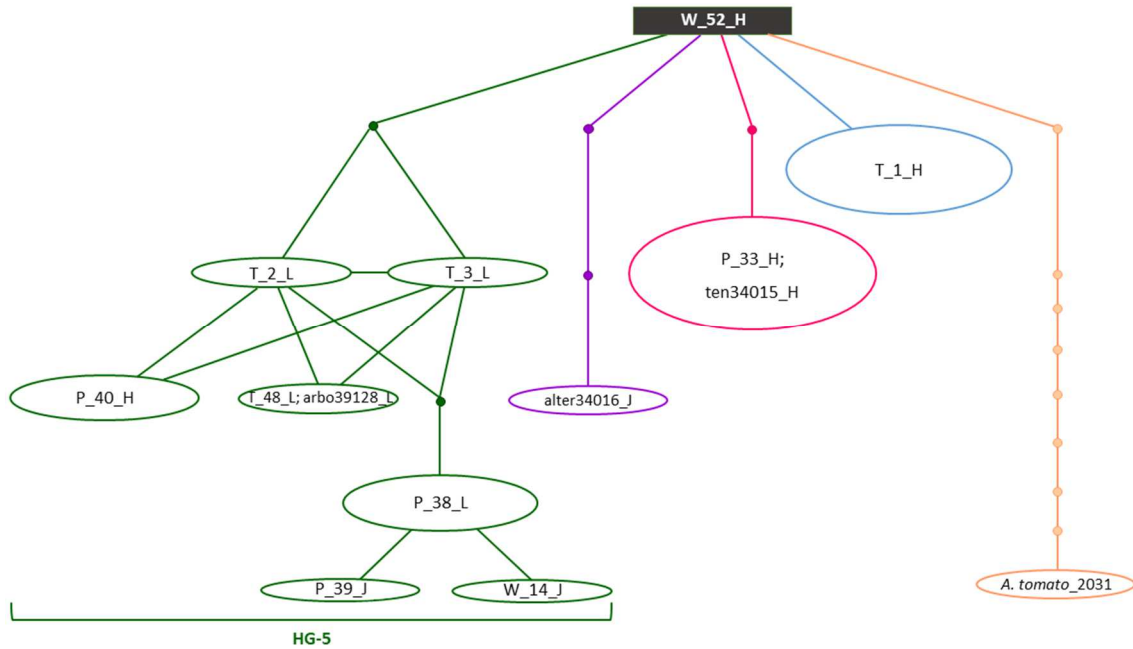


Figura III.19: Red de haplotipos obtenida a partir de 45 aislamientos de *Alternaria* de alimentos de Argentina y tres cepas de referencia de *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata*. Cada haplotipo está representado con un color diferente; el haplogrupo se muestra como HG-5. Los aislamientos incluidos en cada haplotipo se muestran en la Tabla III.13. El haplotipo ancestral se indica con un rectángulo. Los círculos pequeños representan haplotipos intermedios ausentes (no fueron muestreados o se extinguieron). Las líneas entre dos haplotipos representan pasos mutacionales. El código de las cepas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimienta; T: tomate; W: trigo.

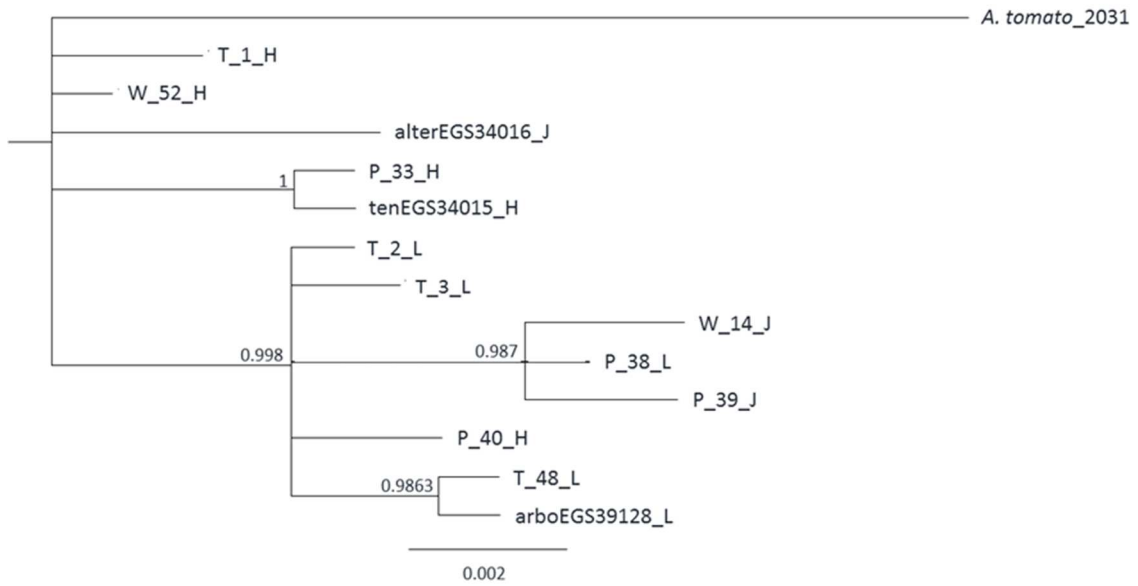


Figura III.20: Filogenia Bayesiana estimada a partir los haplotipos de *endoPG* de los aislamientos de *Alternaria* spp. Los números sobre las ramas indican la probabilidad posterior Bayesiana. La longitud de las ramas indica el número de sustituciones por sitio.

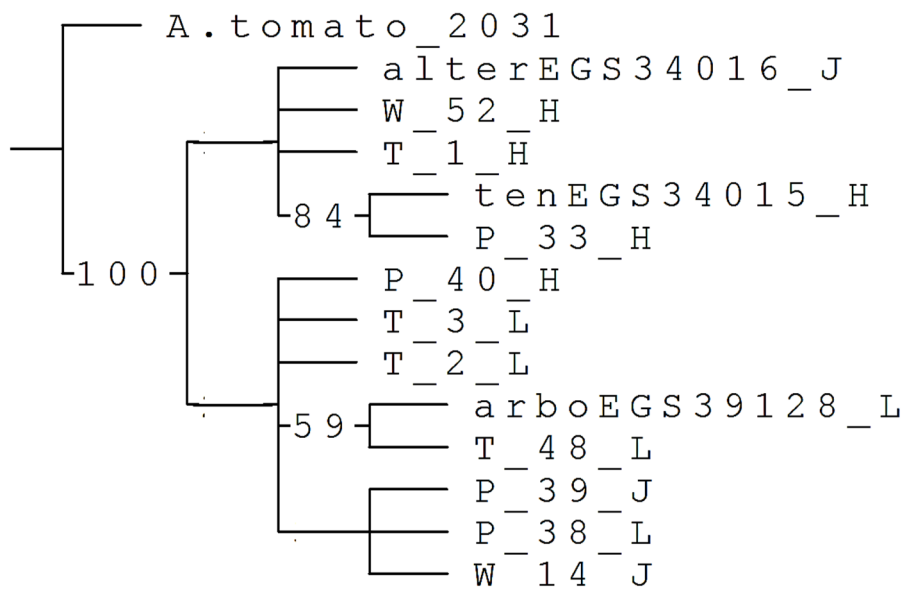


Figura III.21: Árbol de máxima parsimonia estimado a partir de los haplotipos de *endoPG* de los aislamientos de *Alternaria* spp. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap (sólo se reportan los valores mayores a 50 %).

III.3.4.b.-Análisis simultáneo de datos de morfología y secuencias

Para organizar objetivamente las observaciones morfológicas a nivel macro y microscópico, se construyó una matriz morfológica con los 45 aislamientos utilizados para los análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN y las tres cepas de referencia. Dicha matriz se muestra en la Tabla III.14. Con estos datos, se realizó un análisis de máxima parsimonia, el cual rindió 1.257 árboles, de 152 pasos. El árbol de consenso estricto, que resume las relaciones congruentes entre todos los arboles obtenidos, mostró sólo dos grupos con un soporte extremadamente bajo (Figura III.22).

El árbol Bayesiano obtenido a partir del análisis simultáneo de los datos moleculares y morfológicos se muestra en la Figura III.23. En el mismo se observó la misma topología que la que había sido obtenida utilizando únicamente los datos moleculares (sección III.3.4.a, Figuras III.20 y III.21).

Tabla III.14: Matriz de datos morfológicos de los 45 aislamientos de *Alternaria*, las 3 cepas de referencia y el grupo externo.

Cepa	Codificación de caracteres morfológicos	Cepa	Codificación de caracteres morfológicos
T_1_H	11011 11200 11000 0010	W_21_H	22001 10200 12100 0011
T_2_L	21012 21111 00110 1011	W_22_L	21112 20210 11100 0111
T_3_L	11012 10210 02011 1101	W_23_L	21002 20200 02011 1011
T_5_H	21102 20211 11000 0011	W_25_sp	11001 21200 11100 2100
T_7_L	11012 21111 00011 0101	W_26_H	21101 20200 11100 2100
T_8_H	12000 01200 11111 0011	W_29_H	12001 20200 12111 0011
T_9_L	21012 21111 02011 0101	B_31_H	11001 10200 02011 2100
T_10_L	11001 21101 02011 1011	B_32_H	12000 00200 12000 2000
T_11_H	12000 01300 10100 2100	P_33_H	21000 01100 11011 2000
T_12_H	12001 11200 11111 0010	P_34_H	21001 10200 11100 2100
W_14_J	11002 10210 11100 0011	P_35_H	12000 01100 00011 2001
W_16_H	21000 00200 12000 2000	P_36_H	11001 11100 02111 2100
W_18_H	12001 10200 10100 0010	P_37_H	12011 11100 12011 0111
W_20_H	11010 01000 10100 2000	P_38_L	10110 01111 11110 1011

Los datos faltantes (estados de carácter desconocidos) figuran como “?”. El código de las cepas corresponde a: sustrato_ número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimiento; T: tomate; W: trigo.

Tabla III.14 (continuación): Matriz de datos morfológicos de los 45 aislamientos de *Alternaria*, las 3 cepas de referencia y el grupo externo.

Cepa	Codificación de caracteres morfológicos	Cepa	Codificación de caracteres morfológicos
P_39_J	21012 11100 10100 2000	T_50_H	11100 00200 11001 0100
P_40_H	12000 01200 01011 0011	W_51_H	12000 01100 10110 2000
P_41_sp	11002 20210 10000 2101	W_52_H	21000 01100 11011 0010
P_42_H	22001 10100 01111 2100	W_53_L	21012 21210 10110 0011
P_43_H	22000 01100 02111 2100	W_54_H	22011 10100 02111 2100
P_44_sp	21012 10110 02111 1011	W_55_H	21001 21000 11100 2100
P_45_H	11011 11100 12011 2100	alter34016_J	21002 10211 02011 2010
P_46_H	21000 01000 12101 1111	arbo39128_L	11012 21211 01010 1011
T_47_L	11011 11311 01011 1011	ten34015_H	12000 01100 10110 2100
T_48_L	21102 20211 10100 0100	<i>A. tomato_2031</i>	001?0 01300 ????? ?????
T_49_H	11100 01100 11000 2000		

Los datos faltantes (estados de carácter desconocidos) figuran como “?”. El código de las cepas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimiento; T: tomate; W: trigo.

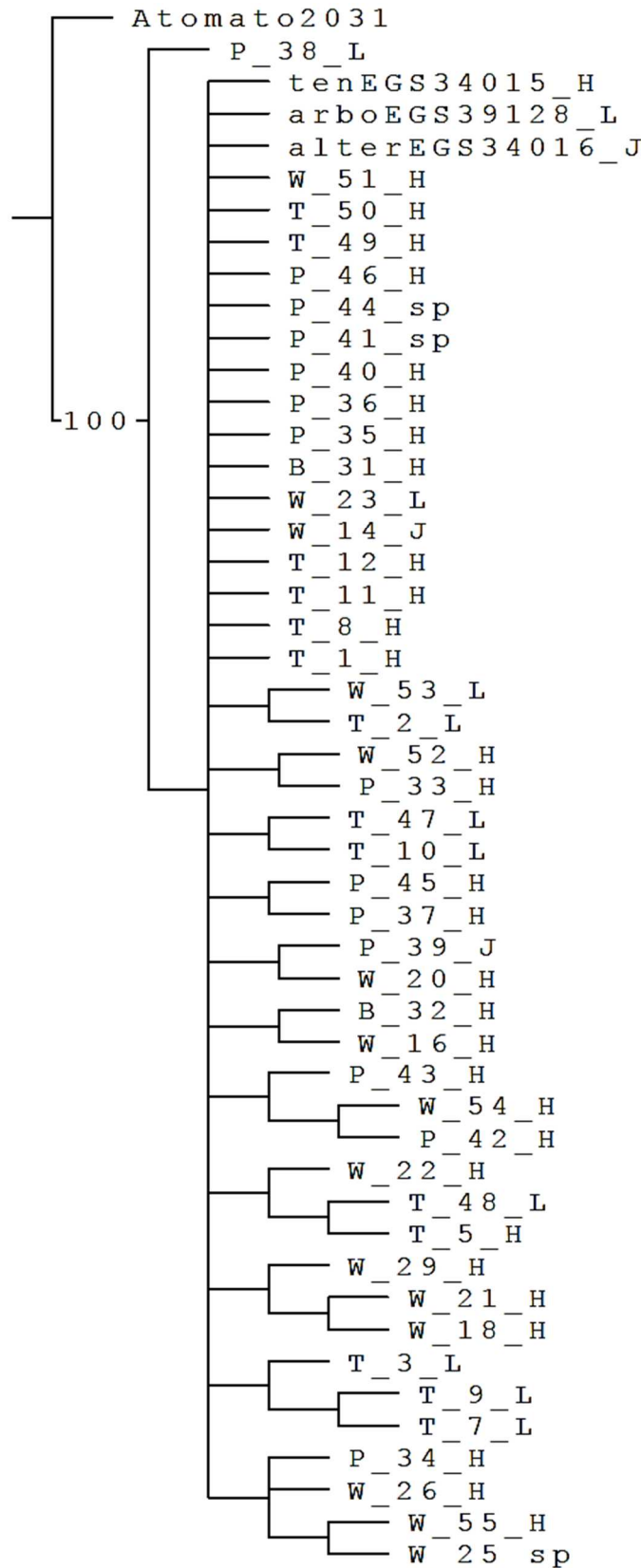


Figura III.22: Árbol de consenso estricto de máxima parsimonia estimado a partir de los datos morfológicos de los aislamientos de *Alternaria* spp. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap (sólo se reportan los valores mayores a 50 %).

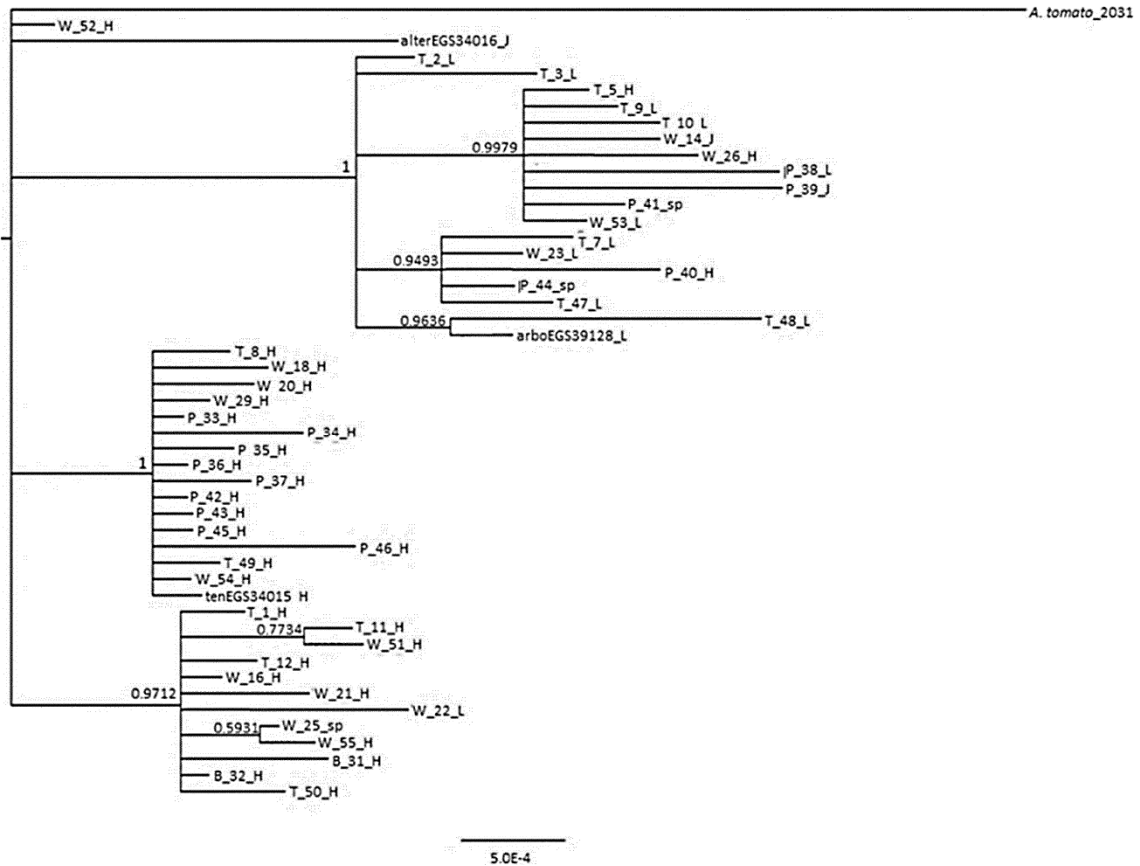


Figura III.23: Filogenia Bayesiana estimada a partir de los haplotipos de *endoPG* y las características morfológicas de los aislamientos de *Alternaria* spp. Los números sobre las ramas indican la probabilidad posterior Bayesiana. La longitud de las ramas indica el número de sustituciones por sitio.

III.3.4.c.-Comparación de secuencias de diferente origen geográfico

La filogenia Bayesiana obtenida con secuencias de *endoPG* de diversas regiones del mundo se muestra en la Figura III.24. Todos los aislamientos argentinos se distribuyeron en los clados 1 y 3 descritos por Stewart y col. (2014). El haplotipo "P_33_H", que incluye además la cepa de referencia *A. tenuissima* EGS34015, resultó más estrechamente relacionado con las secuencias del clado 3 de cítricos que los otros aislamientos.

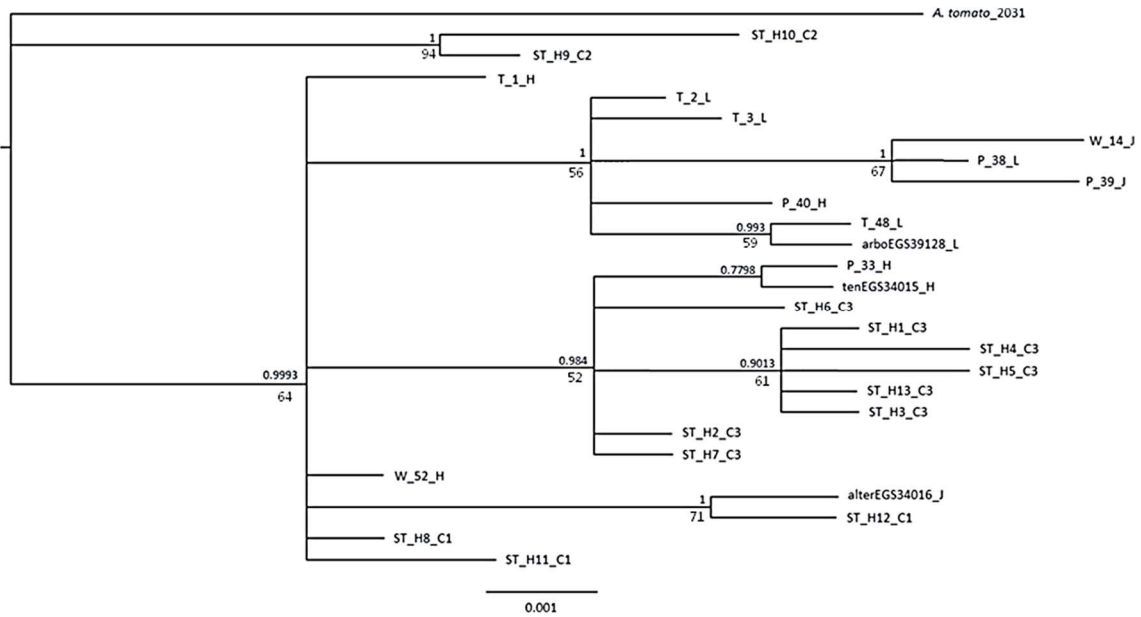


Figura III.24. Filogenia Bayesiana estimada a partir de datos de secuencias de *endoPG* de 10 haplotipos de *Alternaria* de esporas pequeñas aisladas de alimentos en Argentina, tres cepas de referencia y 13 secuencias obtenidas de aislamientos de cítricos en diversas regiones geográficas (Stewart y col., 2014). Grupo externo: *A. tomato*. Los números sobre las ramas indican valores de probabilidad posterior del análisis Bayesiano y los números debajo indican los valores de bootstrap de la estimación del árbol de máxima parsimonia. La longitud de las ramas indica el número de sustituciones por sitio. El código de las secuencias argentinas corresponde a: sustrato_número de cepa_grupo morfológico (según Simmons, 2007). Código de sustrato: B: arándano; P: pimienta; T: tomate; W: trigo. El código de las secuencias de Stewart y col. (2014) corresponde a: iniciales de autor_haplotipo_clado, según está descrito en la Figura 1 de dicho trabajo.

III.3.5. Caso de estudio: pimienta

Dado que el pimienta es un cultivo de importancia agroeconómica en el cinturón verde de la Provincia de Buenos Aires y cuya diversidad fúngica no había sido estudiada en Argentina hasta el inicio del presente trabajo, se realizó un análisis de esta matriz abarcando el aislamiento y caracterización de los hongos causantes de deterioro y la detección de toxinas de *Alternaria* spp. en los frutos.

III.3.5.a.-Hongos filamentosos

Al analizar la microbiota presente en las muestras de pimientos con visibles daños por deterioro fúngico, se observó que *Alternaria* spp. fueron predominantes; 33 frutos de un total de 66 (50 %) estuvieron contaminados con al menos una cepa de *Alternaria*. Se obtuvieron un total de 64 aislamientos, todos de esporas pequeñas y clasificados dentro de los grupos-especie *A. arborescens*, *A. alternata* y *A. tenuissima*; o como *Alternaria* sp. La distribución de los aislamientos en los grupos-especie hallados en este sustrato se muestra en la Tabla III.3. Además, se aislaron cepas pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Cladosporium*, pero en una frecuencia mucho menor (8 y 6 aislamientos, respectivamente), y otros minoritarios. No se pudo establecer ningún tipo de correlación entre el estado de maduración de los frutos (rojo/verde) y la microbiota presente. El total de los aislamientos fúngicos obtenidos de pimientos se muestra en la Tabla III.15.

Tabla III.15: Número de aislamientos fúngicos obtenidos de pimientos cultivados en Argentina.

Género fúngico	N° de aislamientos
<i>Alternaria</i>	64
<i>Fusarium</i>	8
<i>Cladosporium</i>	6
<i>Geotrichum</i>	1
<i>Curvularia</i>	1
<i>Epicoccum</i>	1
<i>Harzia</i>	1
Total	82

III.3.5.b.-Potencial toxicogénico de *Alternaria* spp.

La capacidad toxicogénica de los aislamientos se muestra en función del morfogrupo productor en la Tabla III.8. Ambos alternarios fueron producidos por la mayoría de los aislamientos (92 %). Además, TeA, ALT y TEN fueron detectados con elevada frecuencia, resultando 41 (66 %), 54 (84 %) y 46 (72 %) aislamientos productores, respectivamente.

III.3.5.c.-Contaminación con toxinas de *Alternaria* spp.

Para evaluar la contaminación natural con las micotoxinas de *Alternaria* spp. en frutos de pimiento, se tuvieron en cuenta los datos de toxicidad reportados en humanos para los metabolitos más frecuentemente producidos por los aislamientos. En función de esto, se seleccionaron las toxinas AOH, AME y TeA.

III.3.5.c.i.-Desempeño analítico del método

Para detectar y cuantificar la contaminación con toxinas de *Alternaria* spp. en pimientos, fue necesario poner a punto una metodología analítica adecuada. Para ello se evaluó el desempeño analítico de un método de extracción previamente descrito para productos de tomate (Terminiello y col., 2006) sobre la matriz pimientos. La recuperación promedio de los triplicados de TeA, AOH, y AME para cada nivel de adición y sus correspondientes coeficientes de variación (RSDs) se muestran en la Tabla III.16. Los parámetros de desempeño analítico obtenidos para el método de detección por HPLC-UV se muestran en la Tabla III.17. Todas las concentraciones de toxina informadas en los pimientos fueron corregidas por el valor de recuperación del método.

Tabla III.16: Porcentajes de recuperación (% R) y coeficientes de variación (RSD %) obtenidos para cada toxina en muestras de pimientos con distintos niveles de adición de cada una.

Nivel de adición de toxina (µg/kg)	TeA		AOH		AME	
	% R	RSD %	% R	RSD %	% R	RSD %
10	77,7	8,6	83,3	8,0	84,0	7,4
100	89,7	4,5	89,3	4,7	90,0	6,2
250	92,7	4,9	95,3	3,7	97,0	4,7
500	85,3	2,9	93,0	4,7	96,7	2,6
Promedio	86,4	-	90,2	-	91,9	-

Tabla III.17: Parámetros del desempeño analítico para la detección de toxinas de *Alternaria* spp. por HPLC-UV.

Parámetro	TeA	AOH	AME
LOD (µg/kg)	2,8	1,1	2,9
LOQ (µg/kg)	5,7	2,8	5,8
Rango lineal (ng)	3-2.178	1-2.126	3-2.236

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

III.3.5.c.ii.-Contaminación de frutos de pimiento con toxinas de *Alternaria*

De los 48 pimientos analizados, 32 resultaron estar contaminados con al menos una de las toxinas de *Alternaria* investigadas (67 % de las muestras). En la Tabla III.18 se resumen los resultados. TeA fue la micotoxina hallada con mayor frecuencia (50 % de las muestras estudiadas) y en las mayores concentraciones. Cabe destacar que el elevado valor correspondiente al extremo superior del rango de concentraciones de TeA corresponde a una muestra contaminada en niveles mucho mayores que el resto de las analizadas. Ambos alternarios fueron detectados en un menor número de frutos (21 % para AOH y 29 % para AME) y en menores concentraciones.

Se evaluó además la contaminación simultánea con estas toxinas teniendo en cuenta la posibilidad de efectos toxicológicos sinérgicos entre estos compuestos. Los resultados se muestran en la Figura III.25. En 44 % de las muestras contaminadas, se detectó más de una micotoxina. TeA se halló como el único contaminante en 12 de las 32 muestras contaminadas (38 %) y en combinación con los alternarios en 12 muestras más, cuatro con AOH (13 %), seis con AME (19 %) y dos con ambos (6 %). Es decir que TeA se halló en combinación con otra de las micotoxinas en el 50 % de los frutos contaminados con este compuesto. AOH fue detectado como único contaminante en 2 muestras (6 %), pero co-occurió con las otras dos toxinas en 8 muestras. Por último, AME fue hallado como único contaminante en 4 de los frutos analizados (13 %), y junto con las otras toxinas en otros 10 frutos más.

Tabla III.18: Contaminación con micotoxinas de *Alternaria* spp. en pimientos.

Toxina	N° (%) de frutos positivos	Rango (µg/kg) ^a	Media (µg/kg) ^a	Mediana (µg/kg) ^a
TeA	24 (50)	8-11.422	1.344	96
AOH	10 (21)	3-98	29	26
AME	14 (29)	7-262	56	14

^a concentración de toxinas en µg de toxina por kg de pimiento.

TeA: ácido tenuazónico; AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter

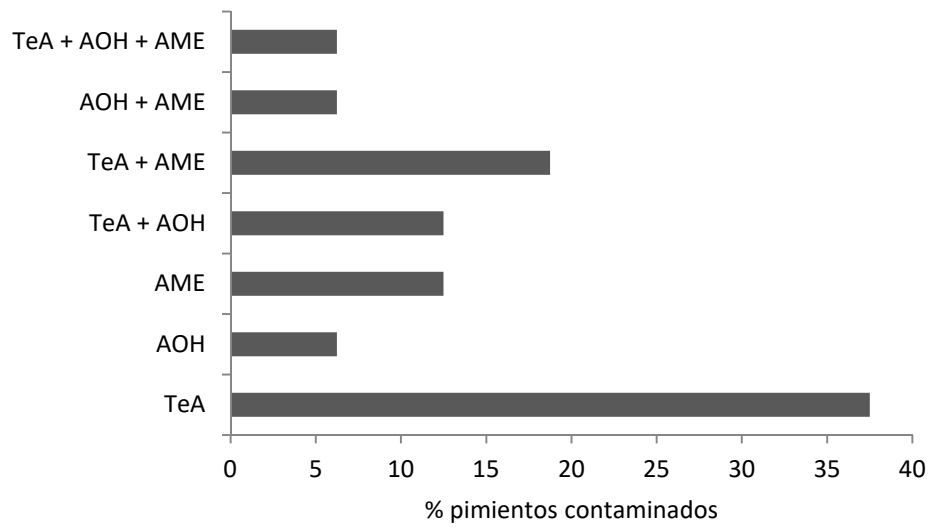


Figura III.25: Distribución y contaminación simultánea de micotoxinas de *Alternaria* spp. en pimientos contaminados. Las barras representan el porcentaje sobre el total de frutos contaminados con al menos una toxina.

III.4. DISCUSIÓN

III.4.1. Distribución de *Alternaria* spp. en alimentos

En el presente trabajo se estudiaron las poblaciones de *Alternaria* spp. de cuatro agroalimentos cultivados en Argentina: arándanos, tomate, trigo y pimiento. La micobiota completa de los primeros tres había sido previamente descrita en Argentina por diferentes autores (Basílico y col., 2010; González y col., 1998; 2008; Pose, 2007; Ramallo y col., 2009; Wright y col., 2005), mientras que la de pimientos fue analizada en este trabajo y será discutida en una sección posterior. Si bien no se realizó el estudio de la micobiota total de aquellos alimentos para los cuales existen datos en bibliografía, el procedimiento de aislamiento dirigido hacia especies del género *Alternaria* permitió comprobar la alta incidencia del mismo en todos los sustratos estudiados. Sin embargo, en las mencionadas descripciones previas no se presenta un estudio detallado de dicho género. Este trabajo de Tesis constituye la primera descripción polifásica de aislamientos de *Alternaria* de diversos alimentos cultivados en Argentina.

Todas las cepas obtenidas a partir de los cuatro alimentos estudiados fueron clasificadas dentro del grupo de *Alternaria* de esporas pequeñas. La identificación morfológica a nivel de grupo-especie las atribuyó a sólo cuatro de ellos, de acuerdo con la clave de Simmons (2007). Una amplia mayoría de los aislamientos obtenidos a partir de los alimentos analizados pertenecieron al grupo-especie *A. tenuissima* (228/292), siendo éste el predominante en las poblaciones de *Alternaria* de los cuatro sustratos. Por otro lado, el grupo-especie menos frecuente fue *A. alternata* gr.-esp. (8/292), a pesar de que la especie representativa de este grupo suele ser reportada en bibliografía como la más frecuente en alimentos (Armitage y col., 2015; Graf y col., 2012; Sanzani y col., 2016). Esto último puede deberse a que la mayoría de las claves taxonómicas anteriores a Simmons (2007) llevan a clasificar casi todos los aislamientos de esporas pequeñas como *A. alternata* (Ellis, 1971; Pitt y Hawcking, 1997; Samson y col., 2000). Sin embargo, estudios recientes indican que *A. alternata sensu stricto* es una especie rara y que la mayoría de las cepas clasificadas como *A. alternata* son en realidad miembros de *A. tenuissima* gr.-esp., *A. arborescens* gr.-esp., o incluso otros gr.-esp. de *Alternaria* (Andersen y col., 2015).

Con respecto a la distribución de los grupos-especie en cada alimento, arándanos fue el sustrato que presentó menor diversidad; todos los aislamientos excepto uno se clasificaron como *A. tenuissima* gr.-esp., en coincidencia con distintos estudios previos en Argentina que reportaron que esta especie era la mayoritaria en los frutos (Greco y col., 2012; Munitz y col., 2013; Wright y col., 2008).

Los aislamientos de *A. arborescens* gr.-esp., pertenecientes al morfogrupo “L” del manual de Simmons (2007), fueron obtenidos principalmente de tomate (16/24 aislamientos totales). *A. arborescens*, denominada *A. alternata* f. sp. *lycopersici* en clasificaciones previas a la de Simmons (2007), se consideraba la especie patotipo específica de tomate (Tsuge y col., 2013), con lo cual el resultado obtenido en este estudio coincide con lo esperado. Sin embargo, en la actualidad se sabe que es capaz de contaminar otros alimentos, tal como se desprende de los resultados del presente trabajo y de datos bibliográficos (Andersen y col., 2015; Polizzotto y col., 2012; Rotondo y col., 2012). Asimismo, diversos estudios muestran que otros grupos-especie distintos de *A. arborescens* son los predominantes en tomate. Andersen y Frisvad (2004) reportaron que *A. tenuissima* gr.-esp. fue el mayoritario en frutos de tomate de España y Dinamarca, en coincidencia con los resultados del presente estudio; mientras que en el sur de Italia la especie más frecuentemente aislada fue *A. alternata* (Logrieco y col., 2009). Por otro lado, en las muestras de Argentina analizadas no se detectó en ningún caso *A. solani*, una especie de *Alternaria* de esporas grandes reportada en frutos de tomate en Rusia, India y Corea (Gannibal y col., 2014; Kumar y col., 2008; Lee y col., 2015).

El grupo-especie *A. infectoria* fue aislado únicamente de trigo, lo cual coincide con datos de la bibliografía que indican que el hospedador más frecuente de este grupo-especie son los granos de cereales (Andersen y col., 2009; Lawrence y col., 2014). Sin embargo, no fue éste el grupo-especie predominante en este sustrato (20 *A. infectoria* gr.-esp./128 aislamientos de trigo). En cambio, en otras regiones del mundo, como Alemania y Rusia, la incidencia de *A. infectoria* gr.-esp. es mucho mayor, mientras que en Noruega fue reportado como el grupo-especie predominante (Kahl y col., 2015; Kosiak y col., 2004). En acuerdo con los resultados del presente estudio, aislamientos de *A. tenuissima* gr.-esp. fueron los más frecuentemente reportados en trigo en países mediterráneos, Estonia, Eslovaquia, y un estudio previo en Argentina (Bensassi y col., 2009; Kütt y col., 2010; Logrieco y col., 1990; Maškova y col., 2012; Patriarca y col., 2007; Vučković y col., 2012). Además, *A. triticina*, una especie predominante en India (Prasada y Prabhu, 1962) y previamente reportada en Argentina (Perelló y Sisterna, 2006) no fue hallada en el presente estudio.

III.4.2. Caracterización morfológica de *Alternaria* spp. de alimentos

La identificación a nivel de especie es dificultosa y sumamente confusa en *Alternaria* si se utilizan claves taxonómicas basadas únicamente en caracteres morfológicos. En particular, la clave de Simmons (2007), la más actual y completa para este género, se basa principalmente en

observaciones macro y microscópicas en dos medios de cultivo (APZ y Agar V8®), ambos bajo una única condición de incubación (7 días, 25 °C, con ciclos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad). Si bien existe un consenso en el sector científico acerca de que esta clave es la más adecuada para la identificación de cepas de este género (Gannibal, 2015; Lawrence y col., 2016), las descripciones suelen resultar escasas para cada especie tratada y carece de datos adicionales útiles, como podrían ser descripciones a nivel macroscópico en mayor número de medios de cultivo y diferentes condiciones de incubación, o la inclusión de fotografías de las observaciones, como sucede para otros géneros (Frisvad y Samson, 2004; Hubka y col., 2013). Además, en la clave de Simmons (2007) algunas especies se definieron a partir de observaciones microscópicas únicamente, sin contar con el aislamiento viable para su subcultivo, por lo cual las correspondientes descripciones en los medios no están disponibles (Gannibal, 2015). Adicionalmente, muchos de los caracteres microscópicos detallados en dicha clave taxonómica se solapan entre las distintas especies descritas, tanto dentro de un mismo grupo-especie como entre ellos, dificultando aún más una clasificación unívoca. Por otra parte, es importante tener presente que la variabilidad geográfica de las poblaciones fúngicas puede afectar algunos de sus caracteres morfológicos, atendiendo a diferentes mecanismos de adaptación desarrollados para colonizar un ambiente específico. Las descripciones de los grupos morfológicos en la clave de Simmons (2007) se basaron en cepas de otras regiones del mundo, principalmente del hemisferio Norte, lo que hace aún más compleja la clasificación de cepas nativas argentinas. Las observaciones realizadas en las cepas de Argentina indicaron que el uso de caracteres morfológicos como única herramienta taxonómica no es suficiente para diferenciar las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas contaminantes de alimentos según Simmons (2007), lo cual también fue reportado en otros estudios sobre cepas de diversas regiones geográficas (Andrew y col., 2009; Armitage y col., 2015; Lawrence y col., 2013). Debido a esto, la clasificación morfológica fue realizada a nivel de grupo-especie.

Únicamente los aislamientos clasificados como *A. infectoria* gr.-esp. presentaron características morfológicas claramente distinguibles del resto de los aislamientos obtenidos en el presente estudio. Entre ellas, las más relevantes comprenden el color de la colonia en DRYES (gris claro a blanco, Figura III.11) y la longitud de los conidióforos secundarios (Figura III.10). Estas características fueron reportadas como distintivas de este grupo-especie en estudios recientes (Gannibal y Lawrence, 2016; Lawrence y col., 2014). Además, diversos trabajos mostraron que *A. infectoria* gr.-esp. posee otras características diferentes del resto de los grupos de esporas pequeñas. Desde un punto de vista filogenético, se ha separado consistentemente como un clado distinto con considerable distancia filogenética de otros grupos-especie de *Alternaria*

(Pryor y Bigelow 2003; Lawrence y col., 2012; 2014); en cambio está estrechamente relacionado con especies de otros géneros, entre los que se incluyen *Chalastospora*, *Embellisia* y *Nimbya* (Lawrence y col., 2016). Por otra parte, el grupo-especie *A. infectoria* es el único dentro de *Alternaria* para el cual se reportó la existencia de estructuras sexuales (Simmons, 2007). Kwaśna y col. (2006) reportaron el desarrollo de ascomas en SNA después de 8 meses a 4 °C; mientras que Andersen y col. (2009) mostraron que algunas cepas de *A. infectoria* gr.-esp. presentaron proascomas (ascomas sin ascosporas maduras) después de 6 meses de incubación a 7 °C en APZ. En el presente estudio, se incubaron las cepas de *A. infectoria* gr.-esp. obtenidas de trigo por un tiempo total de ocho meses bajo distintas condiciones, pero en ningún caso se observó la producción de estructuras sexuales. La dificultad de obtener ascomas *in vitro* ha sido reportado con anterioridad por otros autores, lo cual lleva a suponer que su producción en la naturaleza sea una estrategia de supervivencia (Andersen y col., 2009; Kwaśna y col., 2006).

Con respecto a los otros tres grupos-especie hallados en los alimentos analizados (*A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata* gr.-esp.), si bien se describieron los rasgos distintivos observados en cada grupo, muy frecuentemente se obtuvieron individuos que presentaban varias características de un grupo, pero algunas en discordancia, lo cual dificultó su identificación incluso a nivel grupo-especie. Por ejemplo, las colonias en DRYES abarcaron rangos de colores desde verdes grisáceos a verdes muy oscuros, presentando en muchos casos tonos intermedios, que se solapan entre los grupos-especie. Asimismo, los colores observados en el resto de los medios de cultivo adicionales a la clave de Simmons (2007), MEA y DG18, presentaron gamas superpuestas entre los grupos-especie, indicando que no permiten una diferenciación unívoca de los mismos. Adicionalmente, si bien la mayor longitud de los conidióforos primarios fue una de las características más distintivas de *A. arborescens* gr.-esp., en muchos casos la presencia conjunta y en gran cantidad de conidióforos primarios de menor altura indicaba un patrón tridimensional de esporulación típico de *A. alternata* gr.-esp. Otra característica solapada fue la longitud de las cadenas de conidios de *A. arborescens* gr.-esp., cuyo rango fue mayor que el descrito para este grupo por Simmons (2007) (2 a 6 conidios), generando confusión con *A. alternata* gr.-esp. Con respecto al patrón de esporulación de *A. tenuissima* gr.-esp., si bien su característica más destacada es la longitud de las cadenas de conidios y la escasa presencia de ramificaciones, fue común la observación de cadenas más cortas. Más aún, algunos aislamientos de este grupo presentaron conidios con morfología diferente a la típica (elipsoidal con paredes lisas mayoritariamente), de formas ovoides y paredes rugosas, y con conidióforos secundarios largos emergiendo de la zona apical del conidio, similar a lo observado para los grupos morfológicos con patrones de esporulación más ramificados (*A. alternata* y *A. arborescens* gr.-

esp.). En algunos casos, estas características atípicas observadas fueron muy determinantes, ocasionando que 12 de los aislamientos no pudieran ser asignados a ningún grupo-especie y se identificaran como *Alternaria* sp. En un intento por sistematizar las observaciones morfológicas, se llevó a cabo un análisis por parsimonia a partir de una matriz de datos morfológicos de un subgrupo de 45 *Alternaria* pertenecientes a estos tres grupos-especie (sección III.3.4.b). El resultado no mostró grupos claramente definidos en la topología del árbol (Figura III.22); las divisiones observadas estuvieron soportadas por valores de bootstrap muy bajos, indicando que estos caracteres no son suficientes para la delimitación de grupos dentro de los aislamientos de *Alternaria* analizados.

Por todo lo expuesto, los caracteres morfológicos no resultaron útiles como única herramienta taxonómica para caracterizar las poblaciones de *Alternaria* de los cuatro alimentos estudiados. Por ello, se procedió a la evaluación de técnicas complementarias para la segregación de los grupos morfológicos.

III.4.3. Caracterización metabólica de *Alternaria* spp. de alimentos

La caracterización metabólica se realizó sobre un subgrupo de los aislamientos obtenidos en la primera etapa. Aquellos provenientes de pimienta y tomate fueron estudiados en su totalidad, mientras que de arándanos y trigo se seleccionó un subgrupo, teniendo en cuenta que los aislamientos de arándanos fueron muy similares morfológicamente, y que de trigo se obtuvieron más que del resto de los alimentos, resultando en un total de 227 cepas.

El estudio de una población fúngica en función de utilizar sus perfiles de metabolitos secundarios como herramienta taxonómica requiere de una muestra de gran tamaño, ya que es necesario contar con muchos individuos representantes de cada taxón (Andersen y col., 2008). La caracterización metabólica había sido reportada previamente como una herramienta útil para diferenciar otros grupos-especie de *Alternaria* de esporas grandes, como ser *A. dauci*, *A. solani* y *A. tomatophila* (Andersen y col., 2008). Sin embargo, este es el primer estudio de perfiles de metabolitos secundarios sobre un elevado número de individuos de los grupos-especie de *Alternaria* de esporas pequeñas aislados en Argentina, y utilizando una estrategia experimental que permitió la detección simultánea de numerosos compuestos; 678 metabolitos fúngicos fueron incluidos en la base de datos original para su búsqueda en los extractos de *Alternaria* spp. analizados.

Si bien, como se mencionó previamente, los caracteres morfológicos permitieron una diferenciación de los aislamientos de *A. infectoria* gr.-esp., se ha reportado que en algunos casos

esta división puede no ser tan clara debido a la variabilidad de los mismos por pequeñas modificaciones en las condiciones de cultivo, que pueden llevar a confundir este grupo con otros de esporas pequeñas (Gannibal, 2015). En el presente trabajo, los aislamientos clasificados como *A. infectoria* gr.-esp. presentaron un perfil de producción de metabolitos propio y claramente diferente al del resto de las cepas (Figura III.15). Esta constituye entonces una herramienta robusta para la segregación de este grupo del resto de los aislamientos de esporas pequeñas hallados, ya sea por la búsqueda dirigida de alguno de los metabolitos o familias de metabolitos específicos de grupo (Tabla III.4) o mediante la comparación de los perfiles de producción con los de cepas de referencia de otros grupos-especie. Ninguno de los metabolitos reconocidos como micotoxinas de *Alternaria* fue producido por los aislamientos de *A. infectoria* gr.-esp., tal como se reportó en un estudio reciente (Andersen y col., 2015). De todos modos, es importante tener en cuenta que existen indicios de que algunos de los metabolitos exclusivos de este grupo presenten actividad biológica sobre distintos sistemas. En cuanto a INF, NZ-A y NZ-B, los compuestos más frecuentemente producidos, no hay información disponible acerca de su bioactividad, aunque debido a su estrecha relación estructural con otros compuestos conocidos (pirenocinas, α -pironas), se ha sugerido que podrían ser fitotoxinas y posibles micotoxinas, particularmente INF, que mostró citotoxicidad contra células murinas (Christensen y col., 2005; Geiseler y Podlech, 2012; Ivanova y col., 2010; Larsen y col., 2003). Además, la producción de ATR fue también muy frecuente y exclusiva de este grupo, siendo dicho compuesto un precursor de la toxina AK, la toxina hospedador-específica de pera japonesa (Nakatsuka y col., 1990; Tsuge y col., 2013). Otros compuestos sintetizados exclusivamente por *A. infectoria* gr.-esp. fueron las phomapironas (A, B, D, E, F, G), las cuales presentaron citotoxicidad frente a *Artemia salina* y actividad insecticida, mientras que los resultados acerca de su fitotoxicidad son contradictorios (Geiseler y Podlech, 2012; Pedras y Chumala, 2005; Pedras y Park, 2015). La contaminación natural con los metabolitos específicos de *A. infectoria* gr.-esp. en cultivos de importancia agronómica o en alimentos ha sido poco investigada. En el único estudio disponible en bibliografía (Blandino y col., 2017) se detectó INF en trigo cosechado en el norte de Italia. La frecuencia de producción de los mismos por las cepas aisladas de trigo en el presente estudio sugiere la necesidad de incluirlos en futuras investigaciones en cereales. Por otro lado, el grupo-especie *A. infectoria* produjo muy pocos metabolitos en común con el resto de los grupos de esporas pequeñas. Entre ellos, podemos destacar los tricicloalternarenos, cuya función biológica no ha sido completamente dilucidada pero están estrechamente relacionados estructuralmente con toxinas ACTG, por lo que se considera que actuarían como fitotoxinas no específicas (Liebermann y col., 2000; Qiao y col., 2007). Además, DES-B presenta actividad insecticida, inmunosupresora y fitotóxica (Liu y Tzeng, 2012; Lou y col., 2013).

Con respecto a los otros tres grupos-especie, los resultados obtenidos en este estudio indican que la detección de un compuesto o la determinación del perfil de producción de metabolitos secundarios no serían herramientas taxonómicas de utilidad para diferenciar estos grupos íntimamente relacionados (*A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens* gr.-esp.). Andersen y col. (2002) reportaron que, si bien *A. tenuissima* y *A. arborescens* gr.-esp. tienen metabolitos en común en sus perfiles, algunos compuestos de estructura desconocida permiten diferenciarlos. Este resultado difiere con lo hallado en el presente trabajo, sin embargo es necesario destacar que dicho estudio fue realizado utilizando una metodología analítica diferente (HPLC-UV), con una base de datos más pequeña (seis metabolitos de estructura conocida) y sobre un menor número de aislamientos de *Alternaria* spp. Más recientemente, Polizzotto y col. (2012) trabajaron con 20 aislamientos de brotes de vid, que los distinguieron metabolómicamente en dos grupos; uno de ellos formado mayoritariamente por *A. tenuissima* gr.-esp. y el otro por un mayor porcentaje de *A. arborescens* gr.-esp. Si bien la mayoría de los aislamientos se distribuyó en el grupo metabolómico concordante con su grupo morfológico, existieron algunas cepas cuya distribución fue contraria. Esto lleva a suponer que si se analizara un mayor número de individuos, la segregación no sería precisa. Por otro lado, en dicho trabajo se incluyeron tres cepas de colección de *A. alternata*, todas ellas incapaces de producir TeA. Teniendo en cuenta que en el presente estudio tres cepas clasificadas como *A. alternata* gr.-esp. fueron capaces de producir esta micotoxina, la afirmación de Polizzotto y col. (2012) no sería de carácter universal y no podría utilizarse como característica distintiva de este grupo-especie. Esta salvedad es importante ya que advierte sobre el riesgo asociado a la producción de TeA por este grupo. Más aún, considerando los problemas de identificación con respecto a *A. alternata* anteriormente mencionados que llevan a que sea ésta la especie más frecuentemente asociada a alimentos, la falsa creencia de que sería incapaz de producir una de las principales toxinas asociadas a especies de este género representa un peligro desde el punto de vista sanitario.

Dada la importante capacidad metabolómica de las cepas contaminantes de alimentos cultivados en Argentina, se procedió a analizar cuáles eran los metabolitos más frecuentemente producidos por ellas. De este análisis se desprende la elevada capacidad toxicogénica de los aislamientos, ya que la mayoría de los compuestos considerados micotoxinas (Solfrizzo, 2017) se detectaron en muy alta frecuencia (Tabla III.6). Los alternarioles (AOH y AME) fueron los metabolitos tóxicos producidos por un mayor porcentaje de cepas de todos los alimentos. Además, el derivado 3-OH-5-AME y ALT fueron también frecuentemente detectados, lo que muestra que esta vía de síntesis es muy activa. Pimientos y tomates parecen ser los sustratos más susceptibles a la contaminación por AOH y AME, dado que de ellos se obtuvieron los

mayores porcentajes de aislamientos productores (muy cercano a 100 % en todos los casos) y estos fueron capaces de sintetizarlos en mayores niveles relativos (Figura III.18). Desde un punto de vista toxicológico, es de relevancia que en ningún caso AOH y/o AME fueron los únicos metabolitos producidos por una misma cepa. Esto indica la importancia de estudiar la interacción con otros compuestos, con respecto tanto a las rutas biosintéticas intracelulares como a sus efectos sobre la salud. Estudios previos reportaron que la toxicidad de extractos complejos fue mucho más elevada que la de cada micotoxina de *Alternaria* spp. evaluada individualmente, sugiriendo que existe interacción sinérgica en cuanto a la toxicidad de sus metabolitos (Pero y col., 1973; Zwickel y col., 2016).

El TeA es considerado una de las tres micotoxinas más importantes de *Alternaria* spp.; su presencia ha sido reportada en diversos alimentos y es el único metabolito de *Alternaria* contemplado por legislación hasta el momento (EFSA, 2011; 2016; Rychlik y col., 2016). En el presente trabajo, si bien fue uno de los compuestos más frecuentemente producidos por cepas de los cuatro alimentos, el porcentaje de productoras de este compuesto fue menor que para los alternarios. TEN fue otro de los metabolitos sintetizados por un gran número de cepas, siendo elevado el porcentaje de aislamientos productores a partir de arándanos, tomate y pimiento. De todas formas, es un compuesto con probada fitotoxicidad pero sin actividad reportada en otros sistemas celulares, con lo cual su presencia en alimentos supondría un riesgo menor.

Con respecto a las ATX, éstas fueron las toxinas producidas en menor frecuencia por los aislamientos estudiados, ATX-I por el 28 %, ATX-II por el 15 % y ATX-III solamente por dos cepas (*A. tenuissima* gr.-esp., obtenidas de tomate y trigo). Asimismo, son las micotoxinas menos tratadas por la bibliografía, siendo ATX-I la más estudiada en cuanto sus efectos tóxicos y producción por cepas de *Alternaria* de alimentos, así como la única detectada como contaminante natural de los mismos. Su presencia ha sido reportada en manzana y derivados, y diversos cereales y harinas (Abd El-Aal, 1997; Liu y Rychlik, 2015; Stinson y col., 1981). Los pocos estudios disponibles muestran mayores porcentajes de cepas productoras de alimentos de diferentes regiones del mundo, que los observados para las cepas argentinas. Andersen y col. (2002) reportaron que el 61 % de los aislamientos de los grupos-especie *A. tenuissima* y *A. arborescens* de cereales y frutas de diversas zonas geográficas fueron capaces de sintetizar ATX-I; mientras que Serdani y col. (2002) detectaron frecuencias similares (58 %) en aislamientos de manzanas de Sudáfrica pertenecientes a los mismos grupos. A su vez, Kahl y col., (2015) reportaron que el 87 % de los aislamientos de trigo de Alemania y Rusia analizados eran capaces

de producir ATX-I. Por último, las 11 cepas de *A. alternata* de colza del sur de Italia estudiadas por Visconti y col. (1992), fueron capaces de producir ATX-I y II.

Las HSTs no fueron producidas *in vitro* por ninguno de los aislamientos analizados. Estos compuestos son factores de patogenicidad que el hongo requiere para invadir el tejido del hospedador y causar la enfermedad (Lou y col., 2013). Es posible que en condiciones de laboratorio no hayan sido detectadas ya que su biosíntesis implica una compleja interacción entre el vegetal y el hongo fitopatógeno.

Sorprendentemente, algunos de los metabolitos con mayores frecuencias de producción no fueron los comúnmente asociados a *Alternaria* spp. en alimentos. PyrA, un compuesto producido por *Pyrenochaeta terrestris* con efectos fitotóxicos (Sato y col., 1981), fue uno de los cinco metabolitos más producidos por cepas obtenidas de los cuatro sustratos, al igual que ACR-A, un compuesto con actividad antimicrobiana reportado previamente para *A. brassicicola* (Gu, 2009; Königs y col., 2010). Además, ATL, otro compuesto de *Alternaria* sobre el cual existen algunos reportes acerca de su toxicidad en células de mamíferos *in vitro* (Nemecek y col., 2012; Pero y col., 1973) fue también hallado entre los más frecuentes. Estos resultados son de importancia ya que a la fecha no existen datos de contaminación de alimentos con estos compuestos debido a que todos los trabajos se centran en las micotoxinas anteriormente mencionadas (EFSA, 2016; Solfrizzo, 2017). Entonces, es de gran necesidad profundizar los estudios acerca de la toxicidad de dichos metabolitos, para decidir cuáles de ellos deberían incluirse en futuros estudios de contaminación natural en alimentos.

III.4.4. Caracterización molecular de *Alternaria* spp. de alimentos

Para la caracterización molecular de los aislamientos, se utilizó la secuenciación de una región conservada del gen que codifica para la enzima endopoligalacturonasa (endoPG). A pesar de que el análisis multilocus es generalmente recomendado, la filogenia estimada a partir de secuencias de *endoPG* fue reportada en bibliografía como una herramienta útil para segregar poblaciones de *Alternaria* de esporas pequeñas estrechamente relacionadas con *A. alternata* (Andrew y col., 2009; Woudenberg y col., 2015). El grupo-especie *A. infectoria* no amplificó con los cebadores utilizados, tal como había sido reportado en un trabajo previo (Peever y col., 2004). No obstante, datos de bibliografía mostraron que otras regiones conservadas, como calmodulina o ATPasa de membrana plasmática, pueden ser utilizadas para lograr una separación concluyente de *A. infectoria* gr.-esp. del resto de las *Alternaria* de esporas pequeñas (Lawrence y col., 2013). De todas formas, como este grupo pudo diferenciarse claramente mediante la caracterización

morfológica y, especialmente, metabolómica, se decidió dirigir la caracterización molecular hacia la diferenciación de los grupos-especie más relacionados entre sí, excluyendo así los aislamientos de *A. infectoria* gr.-esp. Además, las relaciones filogenéticas existentes entre los grupos-especie íntimamente asociados con *A. alternata* es, en la actualidad, un tema de interés para la comunidad científica especializada debido a su difícil clasificación.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios filogenéticos indicaron que todos los aislamientos estudiados están muy cercanamente emparentados. En el caso de la estimación Bayesiana, la corta longitud de las ramas demostró que hay muy poco cambio evolutivo acumulado en esta población de individuos. Además, los bajos valores de probabilidad posterior obtenidos en este análisis y los bajos valores de bootstrap obtenidos en el análisis de máxima parsimonia indican lo poco robustos que son los grupos representados en la topología del árbol, otra señal de la escasa diferenciación entre las cepas aisladas en el presente trabajo. Los valores de bootstrap fueron incluso menores que los valores de probabilidad posterior obtenidos en el árbol Bayesiano; esta observación es algo frecuente cuando se comparan ambas metodologías (Alfaro y col., 2003; Douady y col., 2003).

Previamente, Andrew y col. (2009) analizaron *Alternaria* spp. de esporas pequeñas, pertenecientes a los mismos morfogrupos y aisladas de diferentes sustratos (pistacho, nuez, cítricos y manzana) de distintas regiones del mundo, secuenciando la misma porción del gen *endoPG*. Ellos pudieron obtener un clado con buen soporte estadístico formado predominantemente por aislamientos pertenecientes al grupo-especie *A. arborescens*, mientras que las cepas clasificadas morfológicamente como *A. alternata* y *A. tenuissima* aparecieron dispersas a lo largo de todo el árbol y no pudieron ser asociadas a un clado específico. Esta distinción no pudo observarse en el presente análisis, sino que los aislamientos de los tres grupos-especie se distribuyeron aleatoriamente, sin agruparse por morfogrupo o por sustrato de origen. Además, Hartevelt y col. (2013) construyeron una filogenia por medio del método de máxima verosimilitud con aislamientos de *Alternaria* de manzana de Australia sobre la base de secuencias concatenadas de los genes *Alt a 1* y *endoPG*, obteniendo cuatro clados diferentes. El primero contenía aislamientos clasificados como *A. arborescens* y como "símil-*A. arborescens*"; el clado 2 estaba formado por *A. tenuissima/A. mali*; el 3 por *A. alternata/A. tenuissima*; y el clado 4 por *A. longipes* y "símil-*A. longipes*". A pesar de las segregaciones descritas, los autores remarcaron la estrecha relación entre estos grupos-especie, lo cual también se observó para los aislamientos argentinos. En dicho trabajo, la cepa de referencia *A. alternata* EGS 34016 se ubicó en una rama separada del árbol, al igual que ocurrió en el presente trabajo al comparar esta cepa con las argentinas (Figura III.19). Armitage y col. (2015) construyeron una filogenia

Bayesiana para aislamientos de *A. alternata* gr.-esp. obtenidos de diferentes matrices (pera, manzana, cítricos, frutilla) y regiones geográficas basada en cinco loci diferentes, incluyendo *endoPG*. Con ello, propusieron tres linajes evolutivos que representan subespecies en divergencia: *A. alternata* ssp. *arborescens*, *A. alternata* ssp. *tenuissima* y *A. alternata* ssp. *gaisen*. Este resultado no respalda la clasificación taxonómica de Simmons (2007), en la cual estos organismos son considerados especies diferentes. Con respecto a los resultados del presente trabajo, la diferenciación en subespecies no es evidente dentro de los aislamientos argentinos. Tal como se ha sugerido anteriormente (Rotondo y col., 2012, Stewart y col., 2013; 2014), es posible que estas poblaciones representen especies incipientes que no pueden separarse de forma confiable debido a una divergencia reciente de estos taxones, influenciada por eventos como reparto de linajes incompleto y recombinación.

Dado que el aislamiento geográfico es uno de los procesos que conduce a la divergencia en linajes discretos en especies asexuales (Fontaneto y col., 2007, Harrington y Rizzo 1999), se realizó un análisis comparando las secuencias de las cepas argentinas con otras de diferentes regiones. Las secuencias fueron obtenidas del trabajo publicado por Stewart y col. (2014), en el cual se estudiaron las relaciones filogenéticas de cepas del complejo *A. alternata* aisladas de cítricos. Si bien los aislamientos no prevenían de los mismos alimentos, se decidió realizar la comparación ya que no se observó segregación por sustrato en los estudios previos. La topología Bayesiana basada en la secuenciación de *endoPG* reveló los tres linajes filogenéticos obtenidos por Stewart y col. (2014). Las cepas aisladas en el presente trabajo pertenecerían a un grupo polifilético descrito por estos autores, correspondientes a los clados 1 y 3 de dicho trabajo. Curiosamente, el clado 2, que incluía un aislamiento argentino obtenido de cítricos, permaneció separado y ninguna de las cepas estudiadas en este trabajo correspondieron a dicho grupo. El hecho de no haberse detectado aislamiento geográfico entre *Alternaria* de esporas pequeñas podría implicar una dispersión muy reciente alrededor del mundo, probablemente producto del intercambio comercial. Debido a esto, tanto la divergencia evolutiva descrita anteriormente como la dispersión geográfica parecen ser eventos contemporáneos.

III.4.5. Enfoque polifásico y nuevas organizaciones subgenéricas en *Alternaria*

La clasificación de las especies fúngicas es un punto crítico para entender sus procesos de adaptación a nuevos ambientes, establecer medidas de cuarentena, evaluar la resistencia de una planta a patógenos y estudiar la evolución de la patogenicidad y la emergencia de nuevas enfermedades infecciosas (Harrington y Rizzo, 1999; Stewart y col., 2013; 2014). El análisis

conjunto de datos moleculares y morfológicos (polifásico) es útil para este fin ya que permite el estudio de la población teniendo en cuenta una mayor cantidad de información.

En el presente estudio, el enfoque polifásico se llevó a cabo utilizando los datos morfológicos y de secuencias de *endoPG* de 45 aislamientos nativos y 3 cepas de colección. Los metabolitos secundarios se excluyeron de este análisis ya que no pueden ser utilizados para establecer relaciones filogenéticas. Esto se debe a que la presencia de los genes necesarios para la producción de un metabolito secundario puede deberse a eventos de transferencia horizontal o puede haber surgido en forma independiente, con lo cual especies filogenéticamente no relacionadas pueden haber llegado a producir los mismos metabolitos secundarios debido a la ventaja selectiva de estos compuestos bioactivos (Frisvad y col., 2008).

Tal como sucedió en los análisis anteriores, cuando se analizaron los caracteres morfológicos en conjunto con los datos de secuencias de ADN no se obtuvieron grupos claramente diferenciados. Estos resultados indican que el cambio evolutivo acumulado es escaso y que las diferencias macro y microscópicas observadas entre los aislamientos corresponderían entonces a la plasticidad fenotípica propia de estos grupos, descrita previamente.

Muy recientemente se han publicado varios trabajos que aspiran a una reorganización completa de todo el género *Alternaria*. Lawrence y col. (2013) modificaron el concepto de los grupos-especie mediante la introducción del rango taxonómico de sección, basándose principalmente en estudios filogenéticos utilizando cinco loci. Una de ellas, llamada sección *Alternaria*, incluye las especies *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. tenuissima*, así como los aislamientos pertenecientes a los tres grupos-especie. Inmediatamente posterior a esto, Woudenberg y col. (2013) revisaron las relaciones filogenéticas entre las especies con el objetivo de obtener una clasificación taxonómica robusta. Apoyaron la propuesta de Lawrence y col. (2013) de división del género en secciones, incluyendo en una de ellas la mayor parte de las especies con conidios concatenados, que comprende casi 60 morfoespecies de *Alternaria*. Luego, Gannibal (2015) realizó una revisión de esta sección específicamente, concluyendo que todas las cepas incluidas en la sección *Alternaria* son indistinguibles por análisis filogenéticos. Paralelamente, Woudenberg y col. (2015) propusieron que la sección *Alternaria* estuviera formada por 11 especies filogenéticas y 1 complejo de especies, en base a comparaciones genómicas y transcriptómicas y filogenias moleculares. En dicho trabajo, 35 morfoespecies, indistinguibles incluso con filogenia multilocus, se unificaron bajo el nombre de *A. alternata*. Más recientemente, Lawrence y col. (2016) describieron morfológicamente la sección *Alternaria*, que consta de aproximadamente 60 morfoespecies de esporas pequeñas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con estas organizaciones recientes del género, dado el alto nivel

de semejanza observado entre los aislamientos de *A. alternata* gr.-esp., *A. arborescens* gr.-esp. y *A. tenuissima* gr.-esp., todas ellas pertenecientes a la nueva sección *Alternaria*, a lo largo de la caracterización polifásica realizada. Aunque no está claro si los clados detectados por los análisis filogenéticos pueden considerarse linajes discretos o simplemente variantes de la misma especie, es evidente que todos los aislamientos de esporas pequeñas similares a *A. alternata* están estrechamente relacionados, por lo que deberían considerarse dentro del mismo grupo (nivel de sección) hasta que se recopile más evidencia para lograr soportar la clasificación morfológica a nivel de especie.

En base a todos los resultados obtenidos y las nuevas clasificaciones recientemente propuestas para el género, se pudo establecer que los alimentos de Argentina se encuentran contaminados con miembros de dos secciones del género *Alternaria*, secc. *Alternaria* y secc. *Infectoriae*. Estas secciones resultaron ser claramente diferentes desde un punto de vista toxicológico. La sección *Alternaria* es capaz de producir todas las micotoxinas reportadas para el género, por lo que la contaminación de alimentos con cualquier miembro de ella implica un elevado riesgo sanitario. Además, no se observó especificidad de sustrato para esta sección, encontrándose en todos los alimentos analizados. En cambio, la sección *Infectoriae* representaría un riesgo menor ya que sus miembros no fueron capaces de producir ninguno de los metabolitos considerados micotoxinas y su presencia parecería estar restringida a cereales. De todos modos, como se mencionó previamente, se debe tener en cuenta que los datos de toxicidad acerca de los metabolitos específicos de esta sección son escasos en la actualidad.

La propuesta más reciente para la reorganización del género (Lawrence y col., 2016) se basa en características morfológicas y filogenéticas de cada sección. A partir del presente trabajo, se propone incorporar nuevos caracteres basados en otros aspectos del enfoque polifásico para contribuir con dicha clasificación, siendo éstos el color de la colonia en DRYES y la producción de los metabolitos específicos más relevantes de cada sección (Tabla III.19).

Tabla III.19: Características distintivas de las secciones *Alternaria* e *Infectoriae* (Lawrence y col., 2016) obtenidas en el presente estudio.

Característica	Sección <i>Alternaria</i>	Sección <i>Infectoriae</i>
Color de la colonia en DRYES	verde grisáceo a verde oscuro	gris claro a blanco
Metabolitos más frecuentes	AME, AOH, PyrA, ALT, ACR-A	INF, NZ-B, NZ-A, ATR
Producción de micotoxinas	AOH, AME, ALT, TeA, TEN, ATXs	-

III.4.6. *Alternaria* spp. en frutos de pimiento

Dado que el cultivo de pimientos es uno de los más importantes en el cinturón verde platense y que es una matriz poco estudiada en cuanto a su contaminación con hongos y micotoxinas, se realizó un análisis exhaustivo de la misma, incluyendo el aislamiento de las cepas fúngicas causantes de deterioro. Además, se llevó a cabo la caracterización y capacidad toxicogénica de los aislamientos del género predominante, *Alternaria*, y la detección de sus toxinas en el fruto.

En cuanto a la microbiota, los resultados indicaron que *Alternaria* spp. fueron predominantes en pimientos y su frecuencia fue mucho mayor que la de aislamientos de otros géneros. Esto difiere de lo publicado en la literatura, donde *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum capsici* son consideradas las principales especies contaminantes de frutos de pimiento, seguidos por *Alternaria* spp. (Edirisinghe y col., 2014; García y col., 2015; Sahitya y col., 2014). Un estudio sobre arándanos cultivados en Argentina (Greco y col., 2012) halló *Alternaria* spp. con mayor frecuencia que los principales patógenos reportados en la bibliografía, tales como *Rhizopus* spp. y *Botrytis* spp., sugiriendo que las cepas de *Alternaria* tienen prevalencia en cultivos de este país.

Con respecto a la presencia de las micotoxinas de *Alternaria* spp. en este vegetal, hay muy pocos datos disponibles en la bibliografía. Logrieco y col. (2009) reportaron concentraciones de hasta 54 µg/kg para TeA, 49 µg/kg para AOH y 640 µg/kg para AME en pimientos cultivados en la zona sur de Italia. Estos niveles fueron superiores a los detectados en Argentina para AOH y AME, pero inferiores a los detectados para TeA. Además, Chung y col. (1998) hallaron concentraciones mucho más elevadas de estas micotoxinas en pimientos de Corea, en rangos desde pequeñas cantidades hasta 440 mg/kg de AOH, 249–342 mg/kg de TeA y 206–294 mg/kg de AME. Más recientemente, Van de Perre y col. (2014) reportaron la presencia de AOH en 6,7 % de 47 pimientos contaminados de Bélgica, España, Egipto, Brasil, India y Sudáfrica, una frecuencia muy inferior al 21 % de muestras contaminadas con esta toxina en Argentina.

El análisis de la contaminación de los alimentos con las micotoxinas es imprescindible para una correcta evaluación de riesgo, ya que los componentes del alimento o las condiciones de almacenamiento podrían interferir en la biosíntesis de metabolitos secundarios por parte del hongo contaminante. Se sabe que es difícil establecer una correlación estricta entre la capacidad de la cepa de producir alguna toxina *in vitro* y su presencia en el alimento (Pitt y col., 2000). Sin embargo, la búsqueda de micotoxinas en alimentos requiere la optimización de metodologías específicas para cada matriz y técnicas analíticas cuantitativas de alta precisión. Por ello, la evaluación de la capacidad toxicogénica *in vitro* de las cepas contaminantes es una herramienta útil como estrategia previa para abarcar un amplio rango de metabolitos que el hongo sería

capaz de producir y resulta una orientación sobre el riesgo toxicológico potencial de un alimento en función de las especies fúngicas contaminantes del mismo. En el presente estudio, AOH y AME fueron producidos por más del 90 % de los aislamientos de pimiento en DRYES, aunque la incidencia de ambos alternarioles como contaminantes en los frutos de pimiento fue menor. Esto podría indicar que algún componente del alimento interferiría en su ruta biosintética, disminuyendo el potencial de producción por los aislamientos. En el caso de TeA, la relación entre la capacidad toxicogénica de las cepas y la contaminación natural de los pimientos mostró una tendencia opuesta. TeA fue la toxina detectada en un mayor número de pimientos, a pesar de que un menor número de cepas aisladas de este alimento fueron capaces de producirlo *in vitro*. Este resultado muestra que el pimiento es un sustrato predisponente para la producción de TeA. En coincidencia con esto, un estudio muy reciente sobre la contaminación de pimientos cultivados en Basilicata, Italia reportó que la toxina de *Alternaria* más frecuente en los frutos fue TeA (Gambacorta y col., 2018). Contrariamente, Siciliano y col. (2015) observaron que el 80 % de las cepas de *Alternaria* aisladas de rúcula y repollo en el norte de Italia eran capaces de producir al menos una toxina *in vitro*, pero los mismos aislamientos “perdían” esa habilidad para sintetizar TeA *in vivo*, mientras que esta tendencia no fue observada para los alternarioles. Esto sugiere la necesidad de estudiar las poblaciones nativas de cada región geográfica y en cada sustrato en particular, ya que no es posible extrapolar resultados de una región o de un determinado sustrato a otros.

Los resultados del presente trabajo constituyen el primer reporte sobre la contaminación con micotoxinas de *Alternaria* spp. en frutos de pimiento en Argentina. La prevalencia de aislamientos pertenecientes a este género en los mismos, la alta capacidad toxicogénica de las cepas contaminantes y la frecuencia de contaminación con sus toxinas representan un elevado riesgo desde el punto de vista sanitario. Teniendo en cuenta que el consumo en fresco de pimientos visiblemente contaminados es poco probable, este riesgo es particularmente elevado cuando se usan frutos enmohecidos para la elaboración de productos industrializados debido a que las micotoxinas no son destruidas por tratamientos térmicos convencionales y permanecen en el alimento.

IV. ESTRATEGIAS
ALTERNATIVAS PARA
EL CONTROL DE
ALTERNARIA



IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. Control de la contaminación fúngica y con micotoxinas en alimentos

La caracterización de los hongos que pueden afectar negativamente a un cultivo de importancia agronómica es el punto de partida para desarrollar estrategias que permitan evitar su crecimiento y la acumulación de sus metabolitos en los alimentos. La estrategia más utilizada en la actualidad se focaliza en la aplicación de fungicidas sintéticos tanto a campo (pre cosecha) como en etapas de almacenamiento y distribución (post cosecha), siempre que no afecten negativamente la apariencia o calidad de los alimentos tratados (Amiri y col., 2008). Productos químicos tales como benzimidazoles (tiabendazol), hidrocarburos aromáticos (o-fenilfenato de sodio) e inhibidores de la síntesis de esterol (imazalil) se han usado durante décadas para el control de enfermedades fúngicas de cultivos. Más recientemente, otros dos fungicidas, cada uno con un modo de acción diferente, han cobrado mayor importancia en el mercado: pirimetanil (anilino pirimidina) y fludioxonil (fenilpirrol).

El uso indiscriminado y excesivo de fungicidas sintéticos en los cultivos ha sido una causa importante del desarrollo de poblaciones de patógenos resistentes, lo que deriva en el uso de mayores concentraciones de estos antifúngicos y el consecuente aumento de sus residuos tóxicos en los alimentos (Prakash y col., 2017). Dado que muchos de estos compuestos no son biodegradables, pueden acumularse en el suelo, las plantas y el agua y, en consecuencia, afectar a los seres humanos a través de la cadena alimentaria. El tipo y concentración de fungicidas permitidos están restringidos debido a su largo período de degradación y los posibles efectos sobre la salud humana (tales como carcinogenicidad, teratogenicidad, toxicidad aguda, desequilibrio hormonal y espermatoxicidad). Además, la preocupación pública sobre la contaminación de alimentos con residuos de fungicidas se ha incrementado considerablemente en los últimos tiempos (Rivera Calo y col., 2015).

Si bien la mayoría de los antifúngicos comerciales presentan efectos fungicidas contra ciertas especies, en algunos casos su efectividad se reduce a una inhibición parcial del crecimiento del hongo (efecto fungistático). Esto último es de relevancia en cuanto a la seguridad alimentaria, ya que podría causar un aumento en la acumulación de micotoxinas, el cual es el principal problema de la contaminación fúngica de alimentos desde un punto de vista sanitario. Esto se debe a que la producción de micotoxinas se incrementa naturalmente bajo diferentes condiciones externas, como ser frente al estrés causado por la presencia del compuesto fungistático (Medina y col., 2017). Un adecuado control del riesgo planteado por las micotoxinas

debe involucrar diversas estrategias tanto en pre- como postcosecha, siendo imprescindible el manejo integrado a lo largo de toda la cadena de producción (Pitt, 2008). Sin embargo, éste es muy difícil de lograr, sobre todo en países en vías de desarrollo y pequeñas economías regionales, donde los recursos y el acceso a la tecnología son escasos. Si bien estrategias preventivas tales como buenas prácticas agrícolas, control de enfermedades de los cultivos y condiciones adecuadas de almacenamiento pueden limitar los niveles de micotoxinas, no siempre son suficientes para eliminarlas por completo de la cadena alimentaria (Patriarca y Fernández Pinto, 2017).

En el período precosecha, los cultivos pueden sufrir distintos tipos de estrés, como ser por sequía o por ataque de insectos o aves, generando un aumento en la susceptibilidad a la contaminación fúngica; estos daños en el tejido vegetal representan una de las rutas primarias para la colonización. Las medidas preventivas para evitar la proliferación del hongo y la acumulación de micotoxinas se basan en buenas prácticas agrícolas, incluyendo técnicas para aumentar la resistencia de la planta, rotación de cultivos, un uso adecuado de insecticidas y fungicidas, control de la irrigación para prevenir el estrés hídrico, cosechar al momento de la madurez y programas de mejoramiento genético de los varietales para resistir a la invasión fúngica (Binder, 2007; Reddy y col., 2010; Wagacha y Muthomi, 2008; Zhu y col., 2016).

En la etapa postcosecha, el control de la humedad y temperatura de los productos almacenados, determinan en gran medida el grado de desarrollo fúngico (Neme y Mohammed, 2017; Reddy y col., 2010). En particular, en granos, el contenido de humedad depende directamente del contenido de agua al momento de la cosecha, y puede modificarse mediante el secado, aireación y rotación de los mismos antes o después del almacenamiento.

Los niveles finales de micotoxinas en productos industrializados pueden verse afectados durante el procesamiento normal de los alimentos, dependiendo de factores específicos de cada proceso, la matriz alimentaria y la estabilidad de la micotoxina. Tratamientos tales como lavados, molienda, fermentación, horneado, asado, fritura, nixtamalización y extrusión, fueron estudiados en función de su eficiencia de disminuir el grado de contaminación con distintos niveles de éxito (Karlovsky y col., 2016; Patriarca y Fernández Pinto, 2017; Solfrizzo, 2017).

Por todo lo expuesto, la búsqueda de estrategias efectivas, seguras y económicamente viables para el control de hongos micotoxicogénicos y sus toxinas en los alimentos es un tema que se mantiene vigente, tanto en cuanto a los esfuerzos en investigación por parte del sector científico, como por constituir una permanente preocupación para las autoridades sanitarias. Para ello, es útil entender los cambios en la adaptación y el crecimiento de éstos en las distintas

etapas del proceso de producción de alimentos, así como conocer cuáles son las condiciones que favorecen su crecimiento y la producción de sus toxinas.

IV.1.2. Vías intracelulares de respuesta a estrés en hongos

Los hongos, al igual que otros organismos eucariotas, cuentan con diferentes vías metabólicas intracelulares que los ayudan a superar condiciones ambientales desfavorables. Después de la detección de una señal determinada, se desencadena una cascada de fosforilaciones mediada por MAP quinasas (MAPK); la MAPK activada puede luego trasladarse al núcleo e inducir cambios como la activación de algún factor de transcripción, la regulación del ciclo celular o la activación de otras quinasas, obteniéndose una respuesta adaptativa al estrés. Las vías de la alta osmolaridad por glicerol (HOG, del inglés “high osmolarity glicerol”) y la de la integridad de la pared celular (CWI, del inglés “cell wall integrity”) son particularmente importantes en los hongos para responder a los estreses osmótico, oxidativo y de la pared celular (Hayes y col., 2014).

La vía CWI está involucrada en la detección de distintos tipos de estrés sobre la pared celular (incluyendo estrés oxidativo, cambios en la presión osmótica, daño a la pared celular, alteración de la temperatura de crecimiento, entre otros) y es responsable del mantenimiento de la integridad de la misma mediando su regeneración (Levin, 2011). En general, los componentes de la ruta CWI están conservados en los hongos, y comprenden sensores localizados en la superficie de la célula, factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), Rho GTPasas, proteínas quinasa C (PKC) y MAPKs (Fuchs y Mylonakis, 2009; Malavazi y col., 2014). Un esquema con los componentes básicos de esta vía se muestra en la Figura IV.1. Además, la vía CWI puede responder frente a otros eventos estresantes dada la interrelación que existe con otras rutas de respuesta a estrés; varios mecanismos de retroalimentación intrínseca han sido descritos (Fuchs y Mylonakis, 2009). Si bien se requiere una actividad basal de esta vía en condiciones normales de crecimiento, su activación se produce en respuesta al estrés que es detectado por las proteínas transmembrana ya que es una vía energéticamente costosa para la célula (Dichtl y col., 2016).

Rho1, una pequeña proteína G acoplada a una familia de sensores de la membrana celular, es considerada una de las principales responsables de la regulación de la señalización de la vía CWI (Levin, 2011), siendo su principal función la de integrar señales desde la superficie de la célula. La activación de Rho1 requiere el cambio de estado de la forma citosólica unida a GDP a la forma activa, asociada a la membrana y unida a GTP (Xu y col., 2016). Luego, Rho1 activa PKC, asociada

a la cascada de MAPKs, lo que deriva en la activación transcripcional de la ruta CWI. Además, regula procesos tales como la síntesis de β -glucano y la organización del citoesqueleto de actina (Levin, 2011; Dichtl y col., 2016). Los intentos de bloquear *Rho1* en diferentes especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*) fallaron, lo que sugiere que este gen es esencial para la supervivencia celular (Dichtl y col., 2012; Kwon y col., 2011; Richthammer y col., 2012; Vogt y Seiler, 2008).

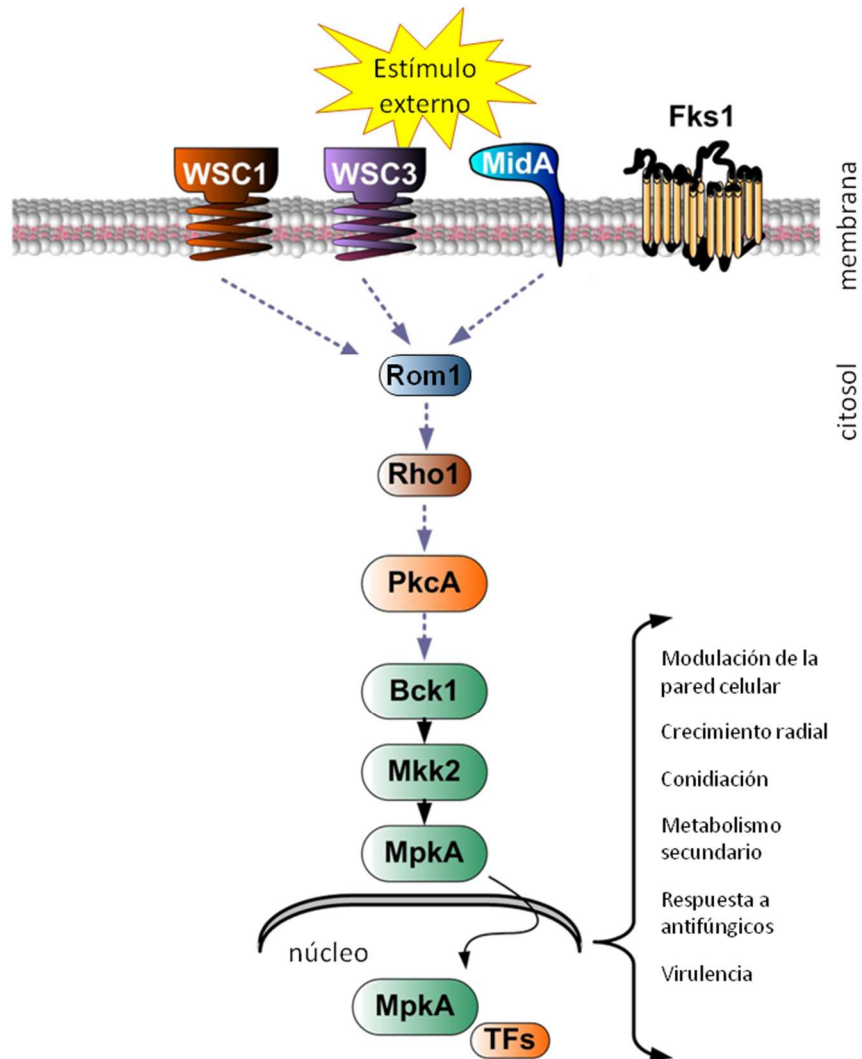


Figura IV.1: Representación esquemática de la vía de señalización de la integridad de la pared celular (CWI), adaptado de Valiante y col. (2015).

Por otra parte, la vía CWI está particularmente relacionada con la tolerancia de los hongos a compuestos antifúngicos. La pared celular fúngica tiene una estructura única, diferente de la de otros eucariotas, por lo cual es un blanco común de los tratamientos antifúngicos (Jabes y col., 2016). En particular, la cantidad relativa de la proteína Rho1 cambia en función de su respuesta a dicho tratamiento (Hayes y col., 2014). Guest y col. (2004) reportaron que las células de *Aspergillus nidulans* que carecen de RhoA (un homólogo de Rho1) muestran hipersensibilidad a fármacos que afectan la pared celular. De aquí la importancia de estudiar los mecanismos regulatorios implicados en la biosíntesis y mantenimiento de la pared celular para comprender la adaptación de los hongos a diferentes entornos y para la optimización de tratamientos antifúngicos existentes, así como para el desarrollo de nuevas alternativas.

Numerosos autores han descrito que la activación de las vías de respuesta a estrés puede influir en las vías biosintéticas de micotoxinas. Cambios en el ambiente externo que constituyan una situación estresante para el hongo, desencadenan una cascada de señales en el interior celular que culmina con modificaciones a nivel transcripcional, muchas de las cuales están relacionadas con la regulación de la biosíntesis de micotoxinas (Geisen y col., 2017; Graf y col., 2012; Kohut y col., 2009; Malavazi y col., 2014; Ochiai y col., 2007; Stoll y col., 2013). Es por esto importante conocer estas interrelaciones intracelulares al momento de proponer un nuevo tratamiento antifúngico.

IV.1.3. Estrategias alternativas de control

IV.1.3.a.-Desarrollo de antifúngicos de bajo impacto ambiental

Como se mencionó anteriormente, el recurso más utilizado en la actualidad para combatir la contaminación fúngica es la aplicación de fungicidas en el campo o en la etapa postcosecha, lo cual conlleva las numerosas desventajas previamente mencionadas (desarrollo de poblaciones de microorganismos resistentes, residuos tóxicos en los alimentos, contaminación de cursos de agua y suelos, entre otras). Diferentes estrategias de bajo impacto ambiental han sido evaluadas para reemplazar el uso de estos compuestos en el control de la contaminación fúngica y la producción de micotoxinas en alimentos. Éstas pueden involucrar tratamientos físicos (como aplicación de radiación UV, ozono, altas presiones), químicos (extractos de plantas, sales de ácidos orgánicos, compuestos antioxidantes de origen natural) y biológicos (utilización de microorganismos viables o compuestos producidos por ellos). El desarrollo de nuevas estrategias para mitigar la acumulación de micotoxinas en alimentos debería priorizar

tecnologías de bajo costo, eficientes y de fácil aplicación (Zhu y col., 2016). Sin embargo, muchos de los tratamientos propuestos resultan demasiado costosos, poco eficientes o difíciles de escalar a campo o industria; de aquí la importancia de continuar la búsqueda de nuevas alternativas.

IV.1.3.b.-Control biológico

El control biológico es una alternativa emergente para reducir de manera eficiente el desarrollo de hongos fitopatógenos y la producción de micotoxinas. Entre las ventajas del uso de agentes de control biológico se puede mencionar que son amigables con el medio ambiente, permiten retener las propiedades nutricionales y organolépticas del alimento y que podrían utilizarse en conjunto con fungicidas, reduciendo así los niveles necesarios de estos últimos para controlar el crecimiento fúngico (Gil-Serna y col., 2011; Zhu y col., 2016). Los microorganismos más frecuentemente utilizados incluyen bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos filamentosos, muchos de los cuales son microbiota normal de los alimentos en los que se aplicarán (Delgado y col., 2016b). El control biológico de plagas se considera una herramienta muy beneficiosa en el manejo sanitario de los cultivos hortícolas ya que con su utilización, además de lograr una producción que garantice la inocuidad de los productos cosechados, también se reduce sensiblemente el impacto ambiental de la producción hortícola y contribuye a fortalecer los cinturones verdes como áreas estratégicas de producción (Polack y Mas, 2017). El uso de agentes de biocontrol contra hongos micotoxicogénicos se ha centrado principalmente en reducir la germinación, crecimiento y colonización de los hongos en alimentos crudos o procesados, pero son mucho menos frecuentes los trabajos que apuntan a la reducción en la producción de micotoxinas (Medina y col., 2017).

IV.1.3.b.i.-Levaduras

Las levaduras se consideran uno de los agentes de control biológico más potentes debido a que su utilización presenta ciertas ventajas, tales como su mayor velocidad de crecimiento con respecto a los hongos filamentosos, sus básicos requerimientos nutricionales, y sus propiedades no tóxicas (Grzegorzcyk y col., 2017; Pimenta y col., 2009). El mecanismo más probablemente involucrado en el control biológico por levaduras es la competencia por el espacio y los nutrientes, aunque también se ha descrito el parasitismo, la inducción del desarrollo de resistencia en la planta hospedadora a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de compuestos inhibidores del crecimiento fúngico, incluyendo toxinas “killer” (del inglés, asesinas), enzimas que hidrolizan la pared celular y compuestos volátiles

(alcoholes, ácidos, ésteres) (Gil-Serna y col., 2011; Hernández-Montiel y col., 2010; Izgu y col., 2011; Pfliegler y col., 2015; Virgili y col., 2012).

Por otro lado, algunas levaduras son capaces de reducir la concentración de micotoxinas. Esto se debe no sólo a la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa productora, sino que puede haber otros mecanismos involucrados. Entre ellos, se ha reportado que ciertas levaduras pueden adsorber las micotoxinas en su pared celular, otras son capaces de producir enzimas que las transformen en metabolitos derivados menos tóxicos, y otras pueden producir compuestos que tienen un efecto supresor significativo en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas (Binder, 2007; Gil-Serna y col., 2011; Pfliegler y col., 2015).

Es importante tener en cuenta que no todas las levaduras son capaces de biocontrolar todos los hongos alterantes ni todas las micotoxinas que pueden ser producidas por ellos. Más aún, muchas veces la presencia de micotoxinas en el medio resulta en efectos deletéreos sobre el crecimiento de la levadura (Pfliegler y col., 2015). Debido a esto, la búsqueda de levaduras para su uso como agentes de biocontrol en alimentos debe tener en cuenta la principal microbiota contaminante del sustrato a tratar, la diversidad de especies dentro del género predominante y las posibles micotoxinas que las mismas pueden acumular en el alimento.

IV.1.3.b.ii.-Péptidos antifúngicos producidos por hongos filamentosos

El uso de hongos filamentosos como agentes de biocontrol a aplicar en el campo ha sido ampliamente estudiado (Glare y col., 2012; Zeng y col., 2012). En cuanto a su aplicación en alimentos procesados, se ha demostrado la eficacia de especies de hongos no toxicogénicos como cultivos protectores en productos como lácteos y cárnicos (Delgado y col., 2016b). Sin embargo, su utilización en postcosecha y almacenamiento de frutas y hortalizas para consumo en fresco es más complicada por las alteraciones que puede causar su desarrollo sobre los mismos. El uso de compuestos fúngicos, tales como enzimas o péptidos, además de presentar ventajas como estabilidad, seguridad, buenos rendimientos y viabilidad económica, tienen mayor facilidad de manejo en comparación con el uso de los microorganismos intactos (Zhu y col., 2016).

Durante las últimas décadas, se han aislado y caracterizado una amplia gama de péptidos antimicrobianos con diferentes características estructurales producidos por diversos organismos. En procariotas y eucariotas inferiores, los péptidos antifúngicos (AFPs) pueden conferir una ventaja ecológica para el organismo productor en la competencia por los nutrientes (Hegedüs y Marx, 2013; Skouri-Gargouri y col., 2010). Entre la gran cantidad de péptidos antifúngicos existentes, algunos hongos filamentosos son capaces de producir péptidos

pequeños (5,5-10 kDa), dotados de una potente actividad antifúngica, que se caracterizan por tener carácter básico y ser ricos en cisteína. Tienen una estructura compacta de láminas β estabilizada por 3-4 puentes disulfuro internos, lo que los hace altamente estables a pH bajos, calor y proteólisis (Delgado y col., 2015a; 2016b; Skouri-Gargouri y col., 2010). Si bien el mecanismo de acción de estos péptidos no está completamente dilucidado, se sabe que su toxicidad está mediada por la interacción con distintas moléculas o receptores en la pared celular o membrana plasmática. Los efectos deletéreos pueden ser inducidos por la transmisión de señales desde las capas externas de la célula, o por la internalización activa del péptido y su interacción con moléculas del interior celular (Binder y col., 2011). Los AFPs pueden alterar la síntesis de quitina, afectar la homeostasis de Ca^{2+} , aumentar los niveles de ROS intracelulares, permeabilizar la membrana celular y desencadenar la muerte celular programada (apoptosis) (Binder y col., 2011; Delgado y col., 2016b; Hagen y col., 2007).

Si bien la investigación sobre péptidos antifúngicos para su aplicación en alimentos es muy reciente, su uso como técnica de biocontrol es una estrategia promisoría por todas las ventajas mencionadas anteriormente. Sin embargo, el efecto de AFPs sobre la acumulación de micotoxinas en especies de hongos toxicogénicos aún no ha sido evaluado. Por ello se requieren estudios que aporten datos acerca del comportamiento de cepas de hongos contaminantes de alimentos frente a este tipo de compuestos en cuanto a su desarrollo y producción de metabolitos secundarios.

IV.1.4. Estrategias alternativas para el control de Alternaria spp. en alimentos

Si bien *Alternaria* es un contaminante frecuente de cultivos de importancia agronómica, los trabajos disponibles en la literatura con respecto al desarrollo de nuevos antifúngicos amigables con el ambiente para su control son limitados.

Trinetta y col. (2013), por ejemplo, reportaron la fumigación de tomates y papas con dióxido de cloro para controlar el crecimiento de *A. alternata* y *Stemphylium vesicarium*, obteniendo buenos resultados en la inhibición del crecimiento micelial. La luz es un factor con profunda influencia en el crecimiento y la biosíntesis de AOH por *Alternaria* spp. Rotem y col. (1988) postularon que la exposición a la luz solar desencadenó la conversión de infecciones asintomáticas de *A. alternata* en lesiones visibles en plantas de algodón, sumado a otros estudios que mostraron un aumento en la velocidad de crecimiento de *Alternaria* spp. en condiciones de luz (Schmidt-Heydt y col., 2011). Por otro lado, sus efectos sobre la producción de AOH son contradictorios; Häggblom y Unestam (1979) demostraron que la luz, especialmente

la azul, tiene un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de AOH. Contrariamente, Pruß y col. (2014) detectaron un aumento en la producción de AOH después de la irradiación con luz azul.

Adicionalmente, diversos metabolitos secundarios de plantas mostraron actividad inhibitoria frente a *Alternaria* spp. en distintas matrices alimentarias. El ácido clorogénico, un polifenol que se encuentra en frutas y verduras como el tomate, tuvo un fuerte efecto inhibitor sobre la biosíntesis de AOH por *A. alternata* (Wojciechowska y col. 2014), mientras que otros ácidos fenólicos de tomate mostraron inhibición sobre el desarrollo de *A. alternata* en estos frutos (Ruelas y col. 2006). Asimismo, extractos foliares crudos de *Capsicum annuum* afectaron el crecimiento micelial y la germinación de conidios en *A. alternata*, además de reducir la lesión de este hongo en tomates cherry, lo cual fue adjudicado a los compuestos fenólicos presentes en los extractos (Pane y col., 2016). En una investigación previa al presente trabajo de Tesis se observó que extractos de *Eucalyptus globulus* fueron capaces de disminuir la acumulación de las micotoxinas de *Alternaria* (TeA, AOH y AME) *in vitro* y de reducir la agresividad de la lesión de *A. alternata* y *A. arborescens* en frutos de tomate (da Cruz Cabral y col., 2016). Además, la producción de ascorbato en *Arabidopsis* redujo la severidad de la infección con *A. brassicicola* (Botanga y col. 2012) y dos metabolitos de la zanahoria, 6-methoximeleina y falcarindiol, le confirieron resistencia frente al ataque de *A. dauci* (Lecomte y col., 2012).

Por último, se evaluaron algunos enfoques de control biológico sobre *A. alternata*. Sempere y Santamarina (2007) utilizaron una cepa clasificada como *Trichoderma harzianum* (hoy *T. afroharzianum*, Chavarri y col., 2015) para controlar su crecimiento en medio a base de arroz. Además, Gveroska y Ziberoski (2012) demostraron la alta capacidad de biocontrol de *T. harzianum* contra *A. alternata* en plantas de tabaco. En otro estudio, *T. harzianum* y *Trichoderma piluliferum* mostraron actividad inhibitoria contra esta especie de *Alternaria* en Akarkara, una planta medicinal india (Thakur y Harsh, 2014).

De lo anteriormente expuesto, se desprende que existen pocos métodos cuya efectividad haya sido suficientemente comprobada para el control de *Alternaria* en alimentos. Los datos de bibliografía se aplican a unas pocas especies fitopatógenas y un reducido grupo de alimentos, además de que algunos de los resultados obtenidos son poco concluyentes y hasta contradictorios. Sumado a esto, en la mayoría de los estudios no se tiene en cuenta el efecto del agente aplicado sobre el comportamiento fisiológico del hongo bajo diversas condiciones ambientales ni sobre su capacidad de producir micotoxinas. Esto justifica entonces la búsqueda de nuevas estrategias, que consideren estos parámetros y combinen efectividad con bajo impacto ambiental.

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las secciones descritas a continuación fueron realizadas en el Grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura, España, durante una estadía financiada por una beca del Programa BEC.AR, dirigida por la Dra. Alicia Rodríguez.

IV.2.1. Optimización de metodologías para los ensayos de control biológico

IV.2.1.a.-Diseño de PCR cuantitativa (RT-qPCR) para evaluar la expresión de la ruta CWI

En este ensayo se llevó a cabo la optimización de una metodología por PCR cuantitativa con retrotranscripción (RT-qPCR) basada en *Rho1*, gen clave de la ruta CWI, abarcando el diseño de cebadores, puesta a punto de las condiciones de reacción y evaluación de la aplicabilidad de la herramienta a través de un ensayo en presencia de un compuesto estresor de la pared celular.

IV.2.1.a.i.-Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron tomando secuencias de GenBank (NCBI NIH, EEUU). Las secuencias fueron editadas y alineadas usando el programa Clustal W (Thompson y col., 1994). Las regiones conservadas entre todas las especies se seleccionaron para diseñar los cebadores utilizando el programa Primer3Plus (Rozen y col., 2000). Los cebadores fueron verificados *in silico*, comparando sus secuencias con la base de datos de secuencias de nucleótidos en GenBank mediante la herramienta BLAST (2015).

IV.2.1.a.ii.-Optimización de la reacción de qPCR

IV.2.1.a.ii.1.-Preparación del inóculo

Para optimizar el método de qPCR se utilizaron tres especies fúngicas, *A. arborescens* EGS 39128, *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Penicillium polonicum* CECT 20933. Las mismas se sembraron en Caldo Papa Dextrosa (CPD) y se incubaron durante cinco días a 25 °C con agitación (200 rpm). El micelio obtenido se filtró a través de un filtro Miracloth (Merck, Alemania) y se almacenó a -80 °C hasta su extracción.

IV.2.1.a.ii.2.-Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El micelio fue congelado con nitrógeno líquido y molido con la ayuda de un mortero. El ARN se extrajo utilizando el kit Spectrum® Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante (Protocolo A). La concentración y la pureza de ARN (relación

A_{260}/A_{280}) se determinaron usando una alícuota de 1,5 μL en un espectrofotómetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Las muestras se diluyeron a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se trataron con DNase I (Thermo Fisher Scientific) para eliminar el ADN genómico que pudo haberse co-extraído. Las muestras de ARN se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La reacción de retrotranscripción (RT) del ARN total (500 ng) se llevó a cabo con el kit PrimeScript® RT (Takara Bio Inc., Japón), utilizando cebadores aleatorios y oligodT, siguiendo las indicaciones del fabricante (incubación a 37 °C durante 15 min y 85 °C por 5 seg). Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

IV.2.1.a.ii.3.-Especificidad y eficiencia de las reacciones de qPCR

Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo de PCR en tiempo real ViiA® 7 (Applied Biosystems, Life Technologies, EEUU) utilizando la metodología SYBR Green®. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de 12,5 μL de volumen final por duplicado, incluyendo 6,25 μL de SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus; Takara Bio Inc., Japón), 0,125 μL de ROX plus (Takara Bio Inc., Japón), cada cebador, 2,5 μL de ADN y agua milli-Q hasta alcanzar el volumen final. Se evaluaron diferentes concentraciones de cebadores entre 50 y 300 nM. Además se incluyeron dos blancos (mezcla de reacción sin ADNc molde) en cada corrida de qPCR. Para optimizar las condiciones de amplificación en el protocolo de qPCR, se ensayaron diferentes temperaturas de hibridación (55, 58 y 60 °C). La determinación del ciclo de cuantificación (Cq), definido como la intersección entre la curva de fluorescencia de cada muestra y una línea umbral que corresponde a una acumulación de producto suficiente para producir una señal fluorescente detectable, fue realizada automáticamente por el instrumento utilizando los parámetros por defecto del programa ViiA7 RUO v.1.2.4. (Applied Biosystems, Life Technologies, EEUU).

Después de la reacción de PCR, se verificó la especificidad de unión del reactivo SYBR Green® al producto obtenido tras la amplificación del gen *Rho1* mediante la construcción de la curva de disociación. Para ello, el producto de PCR fue calentado lentamente en una rampa entre 60 y 95 °C, con incrementos de 0,5 °C cada 5 seg. La temperatura de disociación (T_m) fue calculada automáticamente por el programa y se comparó con la deducida a partir de la secuencia del fragmento esperado. Además, el tamaño de los productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % m/v. Los geles fueron teñidos con Safe-Red® (Applied Biological Materials, Canadá) y el tamaño del producto de PCR se determinó con el programa de análisis de imágenes GeneSnap v.7.09.02 (Syngene, Reino Unido), con la ayuda de un marcador de peso molecular de ADN de 2,1-0,15 kpb (Promega BioSciences, EEUU).

Las curvas estándar se construyeron usando los productos de qPCR obtenidos para *A. arborescens*, *A. flavus* y *P. polonicum*. En primer lugar, se midieron las concentraciones de los amplicones obtenidos en el NanoDrop® y se calculó el número de copias en cada caso, utilizando la siguiente fórmula (Hyeon y col., 2010):

$$\text{N}^\circ \text{ de copias} = W_{\text{PCR}} / [(660 \text{ g/mol}) \times (L_{\text{PCR}}) / \text{NA}]$$

Siendo:

W_{PCR} = concentración del producto de PCR medido en el NanoDrop® (g/μL)

660 g/mol = peso molecular de un par de bases de ADN

L_{PCR} = número de pb del fragmento de PCR

NA = N° de Avogadro = $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Con esta solución madre de producto de qPCR de cada hongo, se prepararon diluciones seriadas, que se utilizaron como soluciones estándar (con número de copias conocido) para la qPCR. Luego, se graficó el \log_{10} del número de copias calculado versus los valores de Cq para obtener las curvas estándar. Los criterios considerados para la confiabilidad del método diseñado fueron el coeficiente de regresión del ajuste lineal (R^2) y la eficiencia de amplificación (E) calculada a partir de la fórmula $E = (10^{-1/m}) - 1$, siendo m la pendiente del ajuste lineal en la curva estándar (Rodríguez y col., 2015).

IV.2.1.a.iii.-Evaluación de la aplicabilidad del método de RT-qPCR

IV.2.1.a.iii.1.- Obtención del péptido PgAFP

El péptido antifúngico PgAFP producido por *Penicillium chrysogenum* CECT 20922 (Rodríguez-Martín y col., 2010), cuyo mecanismo de acción se ha asociado a estrés de la pared celular, se utilizó para evaluar la aplicabilidad del método de RT-qPCR diseñado. Se obtuvo a partir de un cultivo líquido de *P. chrysogenum* en CPD, pH 4,5, a 25 °C durante 21 días. El caldo se filtró a través de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,22 μm (Sartorius, Alemania) para obtener un medio libre de células. El filtrado fue inyectado en un sistema FPLC (cromatografía líquida para purificación de proteínas) ÄKTA® con columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP, equipado con un detector UV ($\lambda=214 \text{ nm}$) y un colector de fracciones FRAC-950 (Amersham Biosciences, Suecia). La fracción contenedora de PgAFP fue luego sometida a una segunda separación cromatográfica por exclusión molecular en una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 para FPLC (Amersham Biosciences) para obtener el péptido purificado (Acosta y col., 2009). Los extractos de PgAFP purificado de varios lotes se combinaron en una única solución madre. La cantidad de

proteína en dicha solución se cuantificó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). La solución madre de PgAFP se congeló a -20 °C hasta el momento de uso.

IV.2.1.a.iii.2.-Preparación del inóculo, siembra y condiciones de incubación

Se prepararon suspensiones fúngicas de *A. flavus* y *P. polonicum* a partir de cultivos de 7 días en APD. Estas cepas fueron seleccionadas por haber presentado diferente comportamiento frente al compuesto estresor de la pared celular, PgAFP. Se tomaron 5 mL de tampón fosfato salino (PBS) y se extendieron sobre la superficie de cada colonia de *A. flavus* y *P. polonicum* en APD con una espátula de Drigalsky estéril. Las suspensiones de esporas formadas se dispusieron en microtubos estériles y se contaron utilizando una cámara de Thoma (Blaubrand®, Alemania). La concentración de las suspensiones para este experimento se ajustó a 10^6 esporas/mL, mediante diluciones en PBS.

Los experimentos se realizaron en placas de APD conteniendo PgAFP a una concentración de 10 µg/mL. Las placas se sembraron centralmente con 2 µL de la suspensión de esporas y se incubaron a 25 °C hasta 9 días. Paralelamente, se sembraron placas control de APD sin PgAFP. Todas las condiciones fueron evaluadas por triplicado.

IV.2.1.a.iii.3.-Evaluación del efecto de PgAFP sobre el crecimiento

El crecimiento radial se registró diariamente, midiendo dos diámetros perpendiculares de las colonias. Los datos se graficaron, representando el diámetro de la colonia (mm) versus el tiempo de incubación (días). La pendiente de la fase lineal de este gráfico se expresó como la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$, mm/día) (García y col., 2009). El nivel de esporulación de cada hongo fue estimado mediante observación macroscópica.

IV.2.1.a.iii.4.-Extracción de ARN, síntesis de ADNc y reacciones de RT-qPCR

Las muestras para extracción de ARN se tomaron a los 3 y a los 9 días de incubación (inicio y punto medio de la fase lineal de crecimiento). La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevaron a cabo como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.2.

Para las reacciones de RT-qPCR, se utilizó una dilución 1/10 del ADNc sintetizado para ambas cepas. Los valores de expresión absoluta del gen *Rho1* en las muestras tratadas y no tratadas con PgAFP se extrapolaron a partir de las curvas estándar construidas como se indicó previamente (sección IV.2.1.a.ii.3).

IV.2.1.b.-Método analítico para la determinación de micotoxinas

IV.2.1.b.i.-Extracción

Para la extracción de las toxinas en los ensayos de control biológico en medio agar pulpa de tomate (APT) y agar trigo (WA) se utilizó un procedimiento QuEChERS (del inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe; que corresponde a Rápido, Sencillo, Económico, Efectivo, Robusto, Seguro) basado en la metodología descrita por Kamala y col. (2015), con ligeras modificaciones. Se cortaron nueve discos de agar de 7 mm de diámetro de las colonias en las placas del medio correspondiente y se pesaron en un tubo Falcon de 50 mL de capacidad. Se agregaron 2 mL de agua milli-Q con ácido fórmico 1 % v/v y se homogeneizó en vórtex por 30 seg. Luego se completó la extracción agregando 2 mL de acetonitrilo grado EM con ácido fórmico 1 % v/v. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 min. La separación de las fases se llevó a cabo mediante la adición de $0,40 \pm 0,01$ g de NaCl y $1,60 \pm 0,01$ g de $MgSO_4$ anhidro, mezclando vigorosamente por inversión inmediatamente después del agregado. La mezcla se centrifugó por 5 min a 5300 rpm y 4 °C (Diglicen 21R, Ortoalresa, Madrid, España). Una alícuota de 1 mL fue tomada de la fase orgánica superior, filtrada a través de filtro de nylon de tamaño de poro 0,2 μ m, y conservada a -18 °C para los siguientes análisis.

IV.2.1.b.ii.-Detección y cuantificación

Los extractos fueron analizados en un sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa (EM) con trampa de iones modelo Amazon SL (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se utilizó una columna de fase reversa C_{18} de 10 cm de longitud, 2,1 mm de diámetro interno y 1,8 μ m de tamaño de partícula (Agilent Technologies, EEUU). Las fases móviles fueron (A) agua milli-Q acidificada con ácido fórmico grado EM 20 mM y (B) acetonitrilo acidificado con ácido fórmico grado EM 20 mM. La separación se llevó a cabo con un flujo de 0,3 mL/min usando un gradiente de solvente lineal, comenzando por 10 % B (v/v) e incrementando hasta 85 % B (v/v) en 12 min, seguido de un lavado con 100 % B por 1,5 min previo al reacondicionamiento de la columna con las condiciones iniciales. El análisis por EM fue realizado en ESI⁺, estableciendo diferentes ventanas de m/z a escanear en cada rango de tiempo, teniendo en cuenta el tiempo de retención de cada toxina: 0-7,50 min, m/z 190-200 para TeA; 7,51-9,90 min, m/z 255-261 para AOH; 9,91-15,0 min, m/z 268-278 para AME. Los tiempos de retención para TeA, AOH y AME fueron $7,3 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,2$ y $10,1 \pm 0,2$ min, respectivamente. El procesamiento de datos se realizó en el programa DataAnalysis v4.1 (Bruker Daltonics) y las áreas de los picos fueron delimitadas manualmente.

IV.2.1.b.iii.-Preparación de soluciones estándar y cuantificación

Este punto se realizó como se describe en la sección III.2.6.d.iii.

IV.2.1.b.iv.-Evaluación del desempeño analítico del método

Para determinar la recuperación del método se adicionó cada toxina en tres niveles en placas de cada medio de cultivo, correspondientes a valores cercanos al punto mínimo, medio y máximo de la curva de calibración de cada micotoxina. Cada nivel se evaluó por triplicado. La repetibilidad del método se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD %) para cada nivel adicionado. Los límites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) fueron calculados a partir de la curva de calibración (Long y Winefordner, 1983).

IV.2.2. Ensayos de control biológico

IV.2.2.a.-Evaluación de estrategias naturales para el control de *Alternaria* spp. en tomate

IV.2.2.a.i.-Estudio ecofisiológico

Se evaluó el efecto de diferentes temperaturas (5, 12, 25, 35 °C) sobre el crecimiento, la expresión del gen *Rho1* y la producción de micotoxinas de *Alternaria* spp. aisladas de tomate.

IV.2.2.a.i.1.-Cepas fúngicas

Se utilizaron dos cepas de *Alternaria* de esporas pequeñas aisladas de tomate, una de ellas clasificada como *A. arborescens* gr.-esp. (de aquí en adelante, T_2_L) y la otra como *A. tenuissima* gr.-esp. (de aquí en adelante, T_50_H).

IV.2.2.a.i.2.-Medio de cultivo

Para simular las condiciones del fruto de tomate, los ensayos se realizaron en un medio de cultivo modelo elaborado a base de pulpa de tomate fresco (Agar Pulpa de tomate, APT; Pose y col., 2009; Vaquera y col., 2014). La pulpa se obtuvo en una procesadora Thermomix® a partir de tomates frescos que no tuvieran defectos superficiales ni contaminación visible, previamente lavados con agua corriente. Se tomaron 800 mL de la pulpa obtenida y se diluyeron con 200 mL de agua destilada. Luego se agregaron 15 g de agar calidad bacteriológica y se esterilizó en autoclave. El pH final del medio fue de 4,34 y su actividad de agua (a_w) de $0,981 \pm 0,003$.

IV.2.2.a.i.3.- Preparación del inóculo, siembra e incubación

A partir de cultivos en APZ de 7 días, se preparó una suspensión de esporas en tampón PBS para cada cepa. Las suspensiones fueron contadas en una cámara de Thoma. Las placas de APT se

sembraron centralmente con 2 μ L de una suspensión de 10^6 esporas/mL y se incubaron a 5, 12, 25 y 35 °C por un período adecuado para que cada combinación cepa x temperatura alcanzara la fase estacionaria de crecimiento (tiempo máximo de incubación = 35 días). Todas las determinaciones en cada condición se realizaron por triplicado.

IV.2.2.a.i.4.-Medición del crecimiento

Se registró el crecimiento radial de las colonias diariamente, mediante la medición de dos diámetros perpendiculares. Se graficó el diámetro (mm) en función del tiempo de incubación (días) y se determinó la fase de latencia (λ , días) como la abscisa al origen y la velocidad de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$, mm/día) como la pendiente de la fase de crecimiento lineal (García y col., 2009).

IV.2.2.a.i.5.-Expresión de *Rho1* por RT-qPCR

Las muestras para los ensayos de expresión fueron tomadas durante la fase lineal de crecimiento y al inicio de la fase estacionaria. La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevaron a cabo como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.2. La evaluación del efecto de las distintas temperaturas sobre la expresión del gen *Rho1*, implicado en la ruta CWI, fue realizada siguiendo la metodología de RT-qPCR optimizada en la sección IV.2.1.a.ii. La expresión absoluta se calculó como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.3.

IV.2.2.a.i.6.- Determinación de micotoxinas

Las muestras para la cuantificación de micotoxinas se tomaron al inicio de la fase estacionaria de crecimiento y la determinación se realizó de acuerdo con la descripción de la sección IV.2.1.b.

IV.2.2.a.ii.-Estudio de biocontrol con levaduras

IV.2.2.a.ii.1.-Selección de las levaduras

Se utilizaron tres cepas de *Debaryomyces hansenii* (253H, 10552 y 10553) de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España), que habían sido previamente aisladas de tomate, para evaluar su efectividad contra el crecimiento de *Alternaria* spp. Las levaduras se sembraron en 10 mL de caldo extracto de levadura sacarosa (YES) y se incubaron por 72 h a 25 °C con agitación. A partir de estos cultivos se preparó una suspensión de células de cada una de ellas en PBS, la cual fue contada en una cámara de Thoma. Por otro lado, se prepararon suspensiones de esporas de las cepas de *Alternaria* como se describe en la sección IV.2.2.a.i.3. El ensayo se realizó en placas de APD de 90 mm, sobre las cuales se evaluaron dos métodos de siembra para el agente de biocontrol. En el primer caso, las placas se sembraron centralmente con 2 μ L de

una suspensión de 1×10^6 células de *D. hansenii*/mL; seguida por 2 μ L de una suspensión de 1×10^6 esporas de *Alternaria*/mL. En el segundo caso, las placas de APD se sembraron con 100 μ L de una suspensión de 1×10^4 células de *D. hansenii*/mL, que se distribuyeron uniformemente en toda la superficie de la placa con una espátula de Drigalsky y se dejaron absorber durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se sembraron en el centro de la placa 2 μ L de una suspensión de 1×10^6 esporas de *Alternaria*/mL. Cada combinación *D. hansenii* x *Alternaria* x método de siembra se evaluó por triplicado. Las placas fueron incubadas a 25 °C por 7 días, durante los cuales se midió el crecimiento como se detalla en la sección IV.2.1.a.iii.3.

IV.2.2.a.ii.2.-Ensayo en medio a base de tomate

Las placas de APT se sembraron de acuerdo al segundo método ensayado en la sección anterior con las levaduras seleccionadas. En paralelo, se evaluaron controles para cada cepa de *Alternaria* en ausencia de las levaduras. Todas las placas se incubaron hasta 18 días a 12 °C. Sobre ellas se evaluó el efecto de la presencia del agente de biocontrol sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. como se describe en la sección IV.2.2.a.i.4. Además, se estudió el efecto del tratamiento sobre la ruta CWI a los 12 y a los 18 días de incubación, correspondientes a las fases lineal y estacionaria de crecimiento, respectivamente. La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevaron a cabo como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.2. La reacción de qPCR sobre el gen *Rho1* fue realizada siguiendo la metodología optimizada en la sección IV.2.1.a. La expresión relativa se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak y Schmittgen, 2001), teniendo en cuenta que:

$$\Delta\Delta Cq = (Cq_{\text{gen target}} - Cq_{\text{gen endógeno}})_{\text{tratamiento}} - (Cq_{\text{gen target}} - Cq_{\text{gen endógeno}})_{\text{control}}$$

Siendo:

$Cq_{\text{gen target}}$ = Cq obtenido por la amplificación del gen *Rho1*

$Cq_{\text{gen endógeno}}$ = Cq obtenido por la amplificación del gen β -tubulina

Tratamiento = presencia del agente de biocontrol

Control = ausencia del agente de biocontrol

Para las reacciones de qPCR del gen endógeno (β -tubulina), se utilizaron los cebadores A-BTF y A-BTR (Estiarte y col., 2016). Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo de PCR en tiempo real ViiA® 7 (Applied Biosystems, Life Technologies, EEUU) en una mezcla de 12,5 μ L de volumen final por duplicado, incluyendo 6,25 μ L de SYBR® Premix Ex TaqTM (Tli RNAsaH Plus; Takara Bio Inc.), 0,125 μ L de ROX plus (Takara Bio Inc.), 300 nM de cada cebador, 2,5 μ L de ADN y agua milli-Q hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de reacción consistieron en un período inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min. Una vez

finalizada cada una de las reacciones de qPCR, la curva de disociación fue construida para comprobar la especificidad del producto amplificado, como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.3. Por último, las muestras para la cuantificación de micotoxinas se tomaron a los 18 días de incubación (fase estacionaria), y la determinación se realizó de acuerdo a la descripción de la sección IV.2.1.b. Todos los ensayos descritos en este ítem se realizaron por triplicado.

IV.2.2.a.iii.-Estudio de biocontrol con PgAFP

IV.2.2.a.iii.1.-Selección de las concentraciones de PgAFP

Se evaluó el efecto del péptido antifúngico PgAFP sobre el crecimiento de cuatro cepas de *Alternaria*: dos cepas de referencia (*A. arborescens* EGS 39128 y *A. alternata* EGS 34016) y dos aisladas de tomate (T_2_L y T_50_H, sección IV.2.2.a.i.1). Para ello, se prepararon suspensiones de 10^6 esporas/mL de cada una. Alícuotas de 2 μ L de las mismas fueron sembradas en una placa multipocillo con CPD suplementado con siete diluciones seriadas al medio de PgAFP, desde 75 a 1,17 μ g/mL. Las placas se incubaron a 25 °C durante 96 h y se realizaron lecturas de absorbancia a 595 nm cada 24 h en un lector de microplacas. Cada condición se evaluó por sextuplicado.

IV.2.2.a.iii.2.-Ensayo en medio a base de tomate

Se prepararon suspensiones de 10^6 esporas/mL de los aislamientos T_2_L y T_50_H. Luego, 2 μ L de estas suspensiones fueron sembradas en el centro de las placas de APT suplementado con dos niveles de PgAFP, 10 y 40 μ g/mL, seleccionados en base a los resultados de la sección anterior (IV.2.2.a.iii.1). Paralelamente, se sembraron placas de APT sin suplementar. Todas las placas se incubaron hasta 18 días a 12 °C. Sobre ellas se evaluó el efecto de la presencia del compuesto de biocontrol sobre el crecimiento de *Alternaria* como se describe en la sección IV.2.2.a.i.4. Además, se estudió el efecto del tratamiento sobre la expresión del gen *Rho1* a los 12 y a los 18 días de incubación, correspondientes a las fases lineal y estacionaria de crecimiento, respectivamente. La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevaron a cabo como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.2. Los estudios de expresión sobre dicho gen mediante RT-qPCR fueron realizados siguiendo la metodología optimizada en la sección IV.2.1.a. La expresión relativa se calculó como se indica en la sección IV.2.2.a.ii.2, tomando como situación control las placas sin suplementar con PgAFP. Por último, las muestras para la cuantificación de micotoxinas se tomaron a los 18 días de incubación (fase estacionaria), y la determinación se realizó de acuerdo a la descripción de la sección IV.2.1.b. Todos los ensayos descritos en este ítem se realizaron por triplicado.

IV.2.2.b.-Comparación de antifúngicos para el control de *Alternaria* spp. en trigo

IV.2.2.b.i.-Cepa fúngica

Para evaluar el efecto de antifúngicos en trigo se seleccionó una cepa de este sustrato clasificada como *A. tenuissima* gr.-esp. (W_29_H), cuyo comportamiento ecofisiológico en medio trigo había sido previamente evaluado (Patriarca y col., 2014).

IV.2.2.b.ii.-Medio de cultivo

Los ensayos se realizaron en un medio a base de trigo molido al 2 % (WA). Para ello, se seleccionaron muestras de trigo de diferentes localidades de la región II-S, sobre las que previamente se confirmó la ausencia de toxinas de *Alternaria* (AOH, AME y TeA) por la metodología descrita por Azcárate y col. (2008). Se pesaron 20 g de trigo molido, al que se agregaron 20 g de agar calidad bacteriológica y 1 L de agua destilada, y se esterilizó en autoclave. El pH final del medio fue de 5,50. El medio se ajustó a dos niveles de a_w diferentes mediante el agregado de glicerol, los cuales se determinaron en un medidor de a_w Novasina Lab Master (Novasina AG, Suiza). Las a_w finales fueron: $0,981 \pm 0,003$ (alta disponibilidad de agua) y $0,953 \pm 0,003$ (condición de estrés hídrico intermedio).

IV.2.2.b.iii.-Antifúngicos

Se evaluaron dos tipos de tratamientos antifúngicos en WA. Por un lado, se probó el antifúngico comercial CELEST XL® (Syngenta, España), que contiene dos compuestos activos, fludioxonil 2,5 % y metalaxil-M 1 %. Se aplicó en una concentración de 0,5 µg/mL, siendo este el máximo nivel con efecto fungistático sobre *Alternaria*. Por otro lado, se evaluó el efecto de un antifúngico de bajo impacto ambiental, el péptido PgAFP (sección IV.2.1.a.iii.1), con el cual se suplementó el medio WA a 10 µg/mL, concentración seleccionada en la sección IV.2.2.a.iii.1.

IV.2.2.b.iv.-Condiciones experimentales y determinaciones

Se preparó una suspensión en tampón PBS de 10^6 esporas/mL de la cepa W_29_H. Las placas de WA suplementadas con ambos antifúngicos y a ambos niveles de a_w , se sembraron centralmente con 2 µL de la suspensión y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante un máximo de 14 días en recipientes cerrados con soluciones salinas sobresaturadas de la a_w correspondiente, de manera tal de generar una humedad relativa constante durante todo el período. Paralelamente se sembraron placas de WA a ambas a_w sin suplementar con antifúngico. Se evaluó el efecto de los antifúngicos sobre el crecimiento de *Alternaria* en WA como se describe en la sección IV.2.2.a.i.4. Además, se estudió el efecto de cada tratamiento sobre la expresión del gen *Rho1*

durante las fases lineal y estacionaria de crecimiento. Para ello, se tomaron muestras a diferentes días de incubación para cada condición, teniendo en cuenta la curva de crecimiento. La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevaron a cabo como se describe en la sección IV.2.1.a.ii.2. Los estudios de expresión sobre dicho gen mediante RT-qPCR fueron realizados siguiendo la metodología optimizada en la sección IV.2.1.a. La expresión relativa se calculó como se indica en la sección IV.2.2.a.ii.2, tomando como situación control las placas sin suplementar para cada a_w . Por último, las muestras para la cuantificación de micotoxinas se tomaron al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, y la determinación se realizó de acuerdo a la descripción de la sección IV.2.1.b. Todos los ensayos descritos en este ítem se realizaron por triplicado.

IV.2.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS v.22.0 (IBM Corporation, EEUU). Sobre cada conjunto de datos, se evaluó la normalidad con el test de Shapiro-Wilk. Para las poblaciones de datos normales y homocedásticos según el test de Levene, se realizó un ANOVA. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizó una comparación de medias posterior utilizando el test de Bonferroni o el test de Dunnet en el caso de realizar comparaciones contra una situación control. Cuando la distribución de los datos no fue normal, los análisis se llevaron a cabo con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas. Luego, se aplicó el test U de Mann-Whitney para la comparación posterior de medias. En todos los casos la significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. Optimización de metodologías para los ensayos de control biológico

IV.3.1.a.-Diseño de RT-qPCR para evaluar la ruta CWI

IV.3.1.a.i.-Diseño de cebadores

Dos pares de cebadores *Rho1*-F1/R1 y *Rho1*-F1/R2 se diseñaron sobre la base de 34 secuencias parciales del gen *Rho1* de diferentes especies fúngicas (incluyendo *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. pseudograminearum*, *Giberella fujikuroi*, *Talaromyces marnefeii*, *Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. terreus*) tomadas de GenBank (NCBI NIH, EEUU). El cebador directo (*Rho1*-F1) corresponde a una unión exón-exón y los cebadores reversos (*Rho1*-R1 y *Rho1*-R2) a un exón (Figura IV.2).

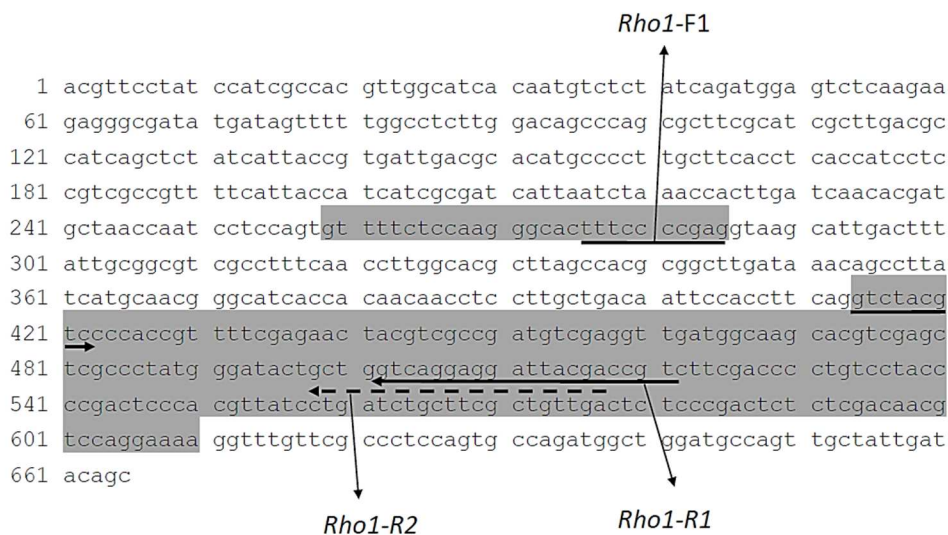


Figura IV.2: Diseño de los cebadores *Rho1*-F1, *Rho1*-R1 y *Rho1*-R2 basados en la secuencia parcial del gen *Rho1* de *Fusarium oxysporum* (número de acceso de GenBank KC017392.1). Las regiones sombreadas corresponden a exones. Los cebadores están subrayados por una flecha. El tamaño del producto de PCR amplificado con *Rho1*-F1/R1 es de 119 pb. El tamaño del producto de PCR amplificado con *Rho1*-F1/R2 es de 115 pb.

IV.3.1.a.ii.-Optimización, especificidad y eficiencia de la qPCR

La temperatura de hibridación se optimizó para las dos parejas de cebadores diseñados (*Rho1*-F1/R1 y *Rho1*-F1/R2). Dado que no se detectó amplificación ni a 60 ni a 58 °C, 55 °C fue la temperatura de hibridación seleccionada para la qPCR.

De los dos pares de cebadores, la pareja *Rho1*-F1/R2 fue seleccionada para los ensayos posteriores ya que el control sin ADN molde no mostró amplificación inespecífica en ningún caso. Además, el Cq observado con este par fue menor para la misma concentración de ADNc. Las concentraciones óptimas de cebador se eligieron de forma de obtener el valor Cq más bajo y la señal fluorescente más alta para una concentración de ADNc fija. En estas condiciones, la concentración de cebadores utilizada para la qPCR fue de 200 nM de cada uno. El análisis de las curvas de disociación mostró un solo amplicón, con un valor de Tm de 84,1 °C para *P. polonicum* y 85,9 °C para *A. arborescens* y *A. flavus* (Figura IV.3). La especificidad de la pareja de cebadores seleccionada también se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR, donde sólo se observó un único amplicón de ~ 115 pb.

En la Figura IV.4 se muestra una de las curvas estándar construida utilizando los valores Cq y log₁₀ del número de copias del gen *Rho1* con el método optimizado. Las curvas estándar para las tres especies fúngicas mostraron un alto coeficiente de regresión (R² > 0,999) confirmando un ajuste lineal confiable. Sus pendientes fueron -3,38; -3,37 y -3,31 para *A. arborescens*, *A. flavus* y *P. polonicum*, que corresponden a eficiencias de amplificación de 97,5; 98,1 y 100,5 %, respectivamente.

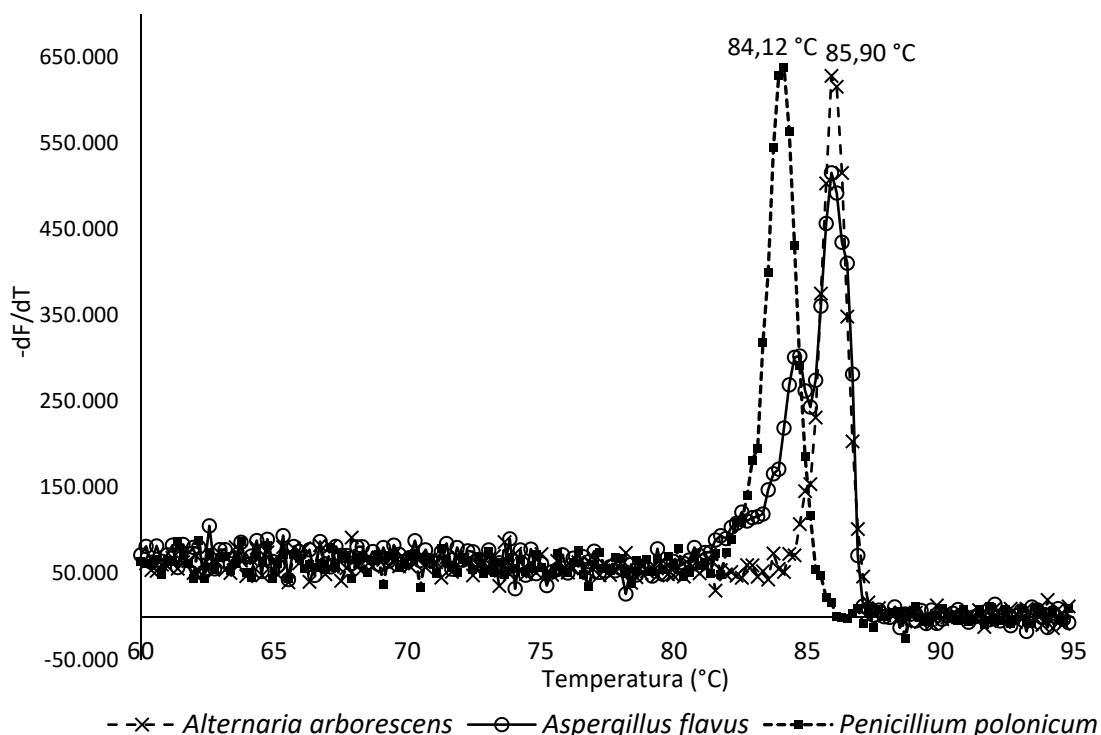


Figura IV.3: Curvas de disociación representativas del producto de qPCR del gen *Rho1* con los cebadores específicos *Rho1*-F1/R2. Los números sobre el gráfico indican la temperatura de disociación correspondiente (Tm).

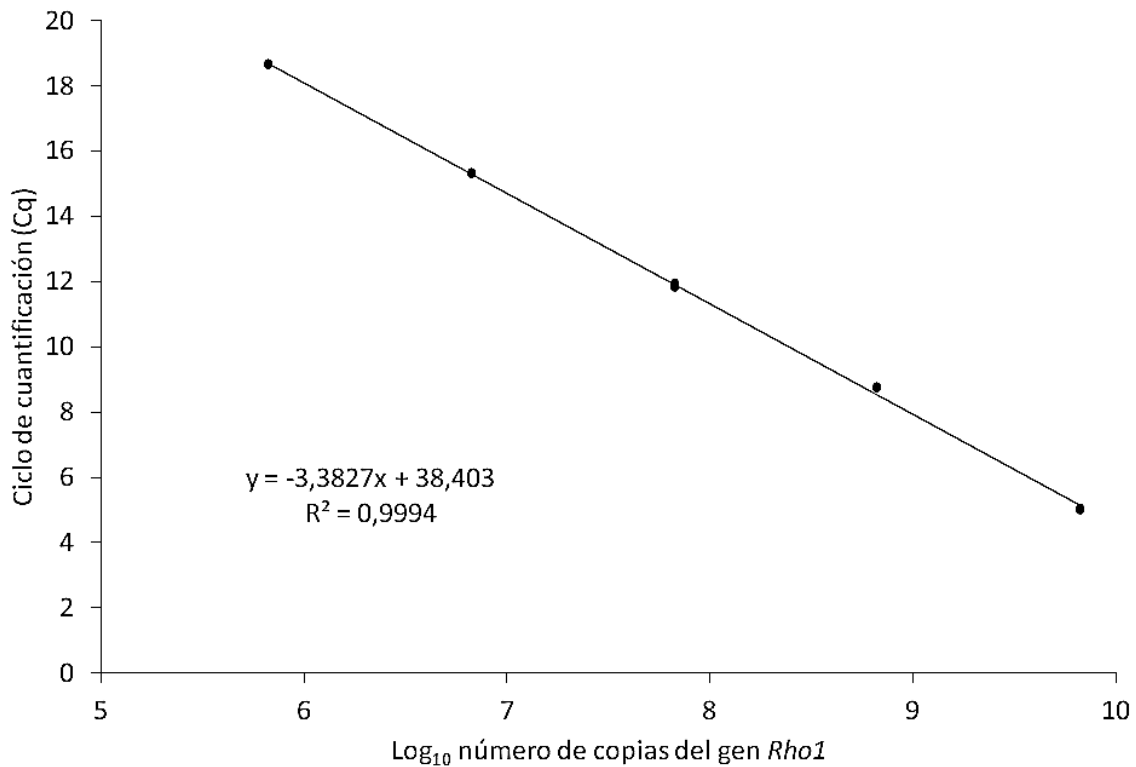


Figura IV.4: Ejemplo de la curva estándar para *A. arborescens* EGS 39128 que muestra la correlación entre el log₁₀ del número de copias del gen *Rho1* y los valores de Cq.

IV.3.1.a.iii.-Evaluación de la aplicabilidad de la metodología

La aplicabilidad del método de RT-qPCR diseñado fue probada usando el péptido antifúngico PgAFP, un compuesto estresor de la pared celular, frente a una cepa sensible, *A. flavus*, y otra resistente, *P. polonicum*, a este tratamiento (Delgado y col., 2015b; 2016a).

La expresión absoluta del gen *Rho1* fue evaluada luego de 3 y 9 días de incubación a 25 °C y no se observaron diferencias significativas entre ambos tiempos para ninguna de las cepas. Las velocidades de crecimiento y los niveles de expresión absoluta a los 3 días de incubación para *A. flavus* y *P. polonicum* en APD con y sin PgAFP se muestran en la Figura IV.5. Ambas especies de hongos mostraron diferencias entre sí en su crecimiento en las condiciones experimentales ensayadas (Figura IV.5). La presencia de PgAFP en el medio de cultivo causó un ligero incremento en la tasa de crecimiento de *A. flavus* ($\mu_{\text{máx}}$), pero una disminución en el nivel de esporulación en este hongo (Figura IV.6). Al analizar la expresión absoluta del gen *Rho1*, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para *A. flavus* ($p > 0,05$; Figura IV.5). Por otro lado, para *P. polonicum* no se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre muestras tratadas con PgAFP y el control (Figura IV.5). Tampoco se detectaron

diferencias en el nivel de esporulación para este hongo (datos no mostrados). Por el contrario, se detectó un aumento estadísticamente significativo en el número de copias del gen *Rho1* para *P. polonicum* en presencia de PgAFP cuando se comparó con la muestra no tratada ($p < 0,05$).

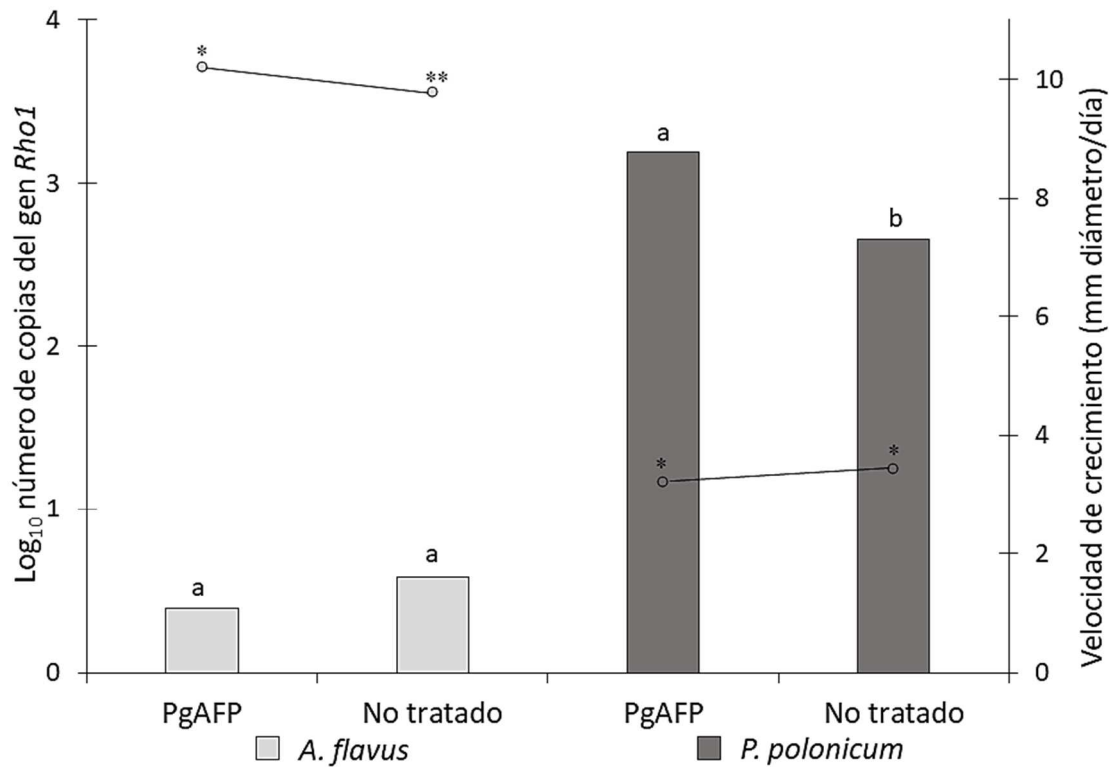


Figura IV.5: Velocidad de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$, en línea) y niveles de expresión absoluta del gen *Rho1* (en barras) para *Aspergillus flavus* y *Penicillium polonicum* en APD tratados y no tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PgAFP después de 3 días de incubación a 25 °C. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos para la expresión génica y el número de asteriscos, para la velocidad de crecimiento para cada cepa fúngica ($p < 0,05$).

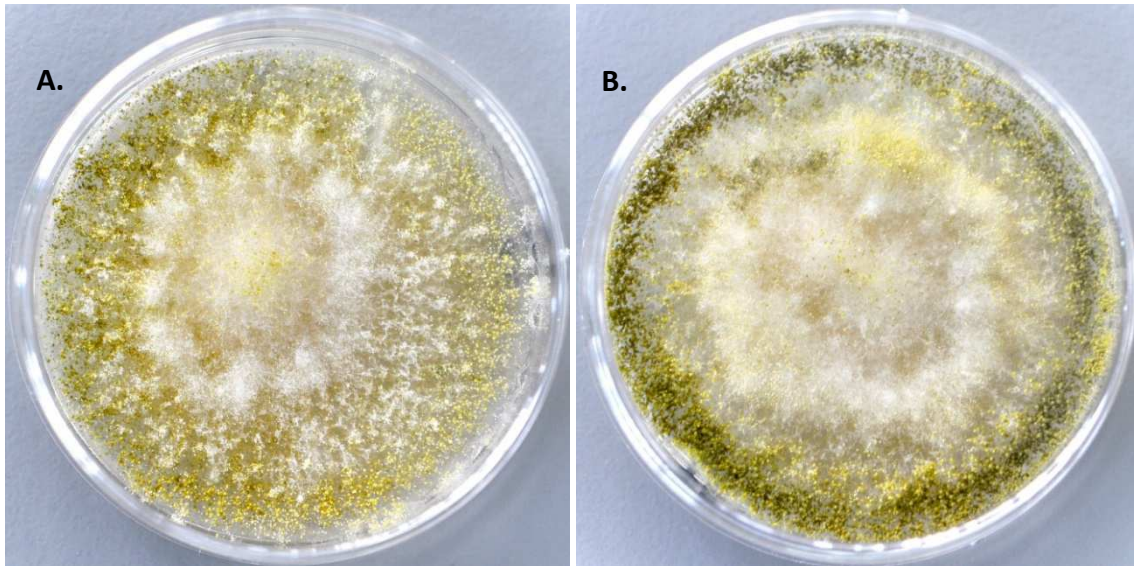


Figura IV.6: Nivel de esporulación de *Aspergillus flavus* después de 9 días de incubación a 25 °C en placas de APD. A. tratado con 10 µg/mL de PgAFP; B. control (no tratado).

IV.3.1.b.-Desempeño analítico del método para toxinas de *Alternaria* spp.

Para detectar y cuantificar la producción de toxinas de *Alternaria* spp. en los distintos ensayos de control biológico, fue necesario poner a punto una metodología analítica adecuada para cada medio de cultivo. Para ello se evaluó el desempeño analítico de un método de extracción previamente descrito para otras micotoxinas (entre ellas fumonisinas, aflatoxinas y ocratoxina A) (Kamala y col., 2015) con ligeras modificaciones para adaptarlo a las micotoxinas a detectar. Los parámetros del desempeño analítico obtenidos para el método de detección por UHPLC se muestran en la Tabla IV.1. La recuperación promedio de los triplicados de TeA, AOH, y AME en cada medio de cultivo para cada nivel de adición y sus correspondientes coeficientes de variación (RSD %) se muestran en la Tabla IV.2. Todas las concentraciones de toxina en los ensayos subsiguientes fueron corregidas por su correspondiente valor de recuperación.

Tabla IV.1: Parámetros del desempeño analítico para la detección de toxinas de *Alternaria* spp. por UHPLC-EM.

Parámetro	TeA	AOH	AME
LOD (µg/kg)	72,5	33,3	26,7
LOQ (µg/kg)	220,5	101,2	81,1
Rango lineal (ng)	0,4-75,1	0,3-28,0	0,2-20,0

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

Tabla IV.2: Porcentajes de recuperación (% R) y coeficientes de variación (RSD%) obtenidos para cada toxina en diferentes medios de cultivo con distintos niveles de adición de cada una.

a- Agar pulpa de tomate (APT)

Nivel de adición de toxina	TeA			AOH			AME		
	µg/g	% R	RSD %	µg/g	% R	RSD %	µg/g	% R	RSD %
Mínimo	0,6	77,6	11,2	0,8	93,0	7,0	0,4	93,8	2,8
Medio	3,0	70,0	9,9	2,4	100,8	3,9	1,2	105,6	4,1
Máximo	9,9	60,8	7,1	4,2	87,7	2,6	2,4	89,3	2,9
Promedio	-	69,5	-		93,8	-		96,3	-

b- Agar trigo (WA)

Nivel de adición de toxina	TeA			AOH			AME		
	µg/g	% R	RSD %	µg/g	% R	RSD %	µg/g	% R	RSD %
Mínimo	0,4	122,2	3,5	0,4	89,7	3,2	0,4	78,4	7,3
Medio	3,0	112,7	6,6	2,4	90,8	2,9	1,2	66,7	5,9
Máximo	9,9	105,8	4,9	4,2	94,6	4,8	2,4	89,8	2,7
Promedio	-	113,6	-		91,7	-		78,3	-

IV.3.2. Ensayos de control biológico

IV.3.2.a.-Evaluación de estrategias naturales para el control de *Alternaria* spp. en tomate

IV.3.2.a.i.-Estudio ecofisiológico

En este ensayo preliminar en medio modelo a base de tomate (APT) se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, la expresión de *Rho1* (gen clave de la ruta CWI) y la producción de micotoxinas en *Alternaria* spp. aisladas de tomate a fin de evaluar las condiciones adecuadas para la aplicación de los agentes de control biológico.

IV.3.2.a.i.1.-Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

Las curvas de crecimiento de *A. arborescens* T_2_L y *A. tenuissima* T_50_H en APT a las temperaturas evaluadas (5, 12, 25 y 35 °C) se presentan en la Figura IV.7. La Figura IV.8 muestra las fases de latencia y las velocidades de crecimiento promedio obtenidas para cada condición. Ambas cepas presentaron comportamientos similares en cuanto a la relación de los parámetros de crecimiento (λ y $\mu_{\text{máx}}$) con la temperatura, aunque se observaron algunas diferencias específicas entre ellas.

Con respecto a la fase de latencia, la disminución de la temperatura ocasionó un incremento en este parámetro. En el caso de *A. arborescens* T_2_L, los menores valores se obtuvieron a 25 y 35 °C (0,12 y 0,88 días, respectivamente), mientras que el mayor valor fue de 5,8 días a 5 °C. Por otro lado, las λ obtenidas para *A. tenuissima* gr.-esp T_50_H fueron mayores que las de *A. arborescens* gr.-esp. a todas las temperaturas, detectándose el mayor valor también a 5 °C (13,5 días). A diferencia de lo observado para T_2_L, a 35 °C el valor de λ fue similar al de 12 °C y estadísticamente diferente al mínimo, que se observó a 25 °C (0,90 días).

Para ambas cepas, la velocidad máxima de crecimiento ocurrió a una temperatura cercana a los 25 °C ($\mu_{\text{máx } 25^{\circ}\text{C}} = 7,0$ y $9,8$ mm/día para T_2_L y T_50_H, respectivamente). Al aumentar la temperatura, la velocidad disminuyó rápidamente. Por el contrario, hacia temperaturas menores a la óptima, el descenso de $\mu_{\text{máx}}$ fue más paulatino. Para la cepa T_2_L, las temperaturas mínima y máxima evaluadas (5 y 35 °C) resultaron igualmente desfavorables sobre este parámetro, siendo $\mu_{\text{máx}} \approx 2$ mm/día. En cambio, para la cepa T_50_H el menor valor se obtuvo a 35 °C (1,7 mm/día).

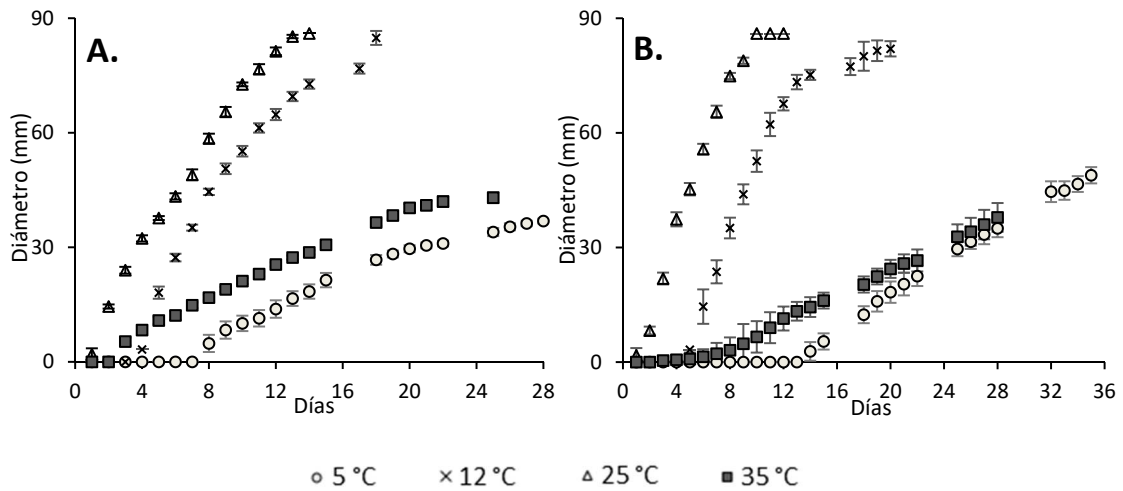


Figura IV.7: Curvas de crecimiento para *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L (A) y *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H (B) en agar pulpa de tomate (APT) a distintas temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C). Las barras indican el desvío estándar.

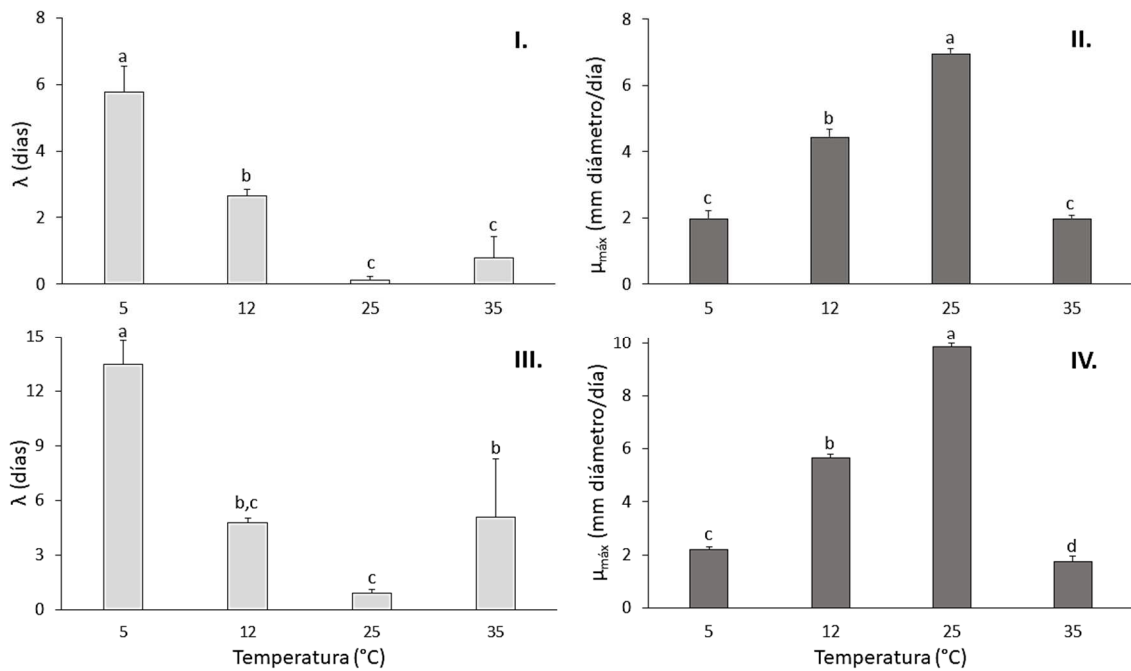


Figura IV.8: I. Fase de latencia (λ) y II. velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{máx}$) de *Alternaria arborescens* gr.-esp. T_2_L; III. fase de latencia (λ) y IV. velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{máx}$) de *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H, a diferentes temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C) en agar pulpa de tomate (APT). Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada parámetro de cada cepa ($p < 0,05$).

IV.3.2.a.i.2.-Efecto de la temperatura sobre la expresión de *Rho1*

La Tabla IV.3 muestra el período de incubación en APT correspondiente a cada cepa de *Alternaria* spp. necesario para evaluar la expresión de la ruta CWI en las respectivas fases de crecimiento (lineal y estacionaria) a cada temperatura estudiada.

La expresión absoluta del gen *Rho1* en cada condición se muestra en la Figura IV.9. En el caso de *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L, durante su fase lineal de crecimiento se detectó una máxima expresión del gen *Rho1* a 35 °C, mientras que la mínima expresión fue detectada a la menor temperatura evaluada, 5 °C. Por otro lado, al medir la expresión de *Rho1* al inicio de la fase estacionaria, se observó una tendencia opuesta. Los máximos niveles de expresión ocurrieron a las menores temperaturas (5 y 12 °C), mientras que los menores números de copias se detectaron con las más altas (25 y 35 °C).

Con respecto a la fase lineal de crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H, no se detectaron diferencias significativas entre las cuatro temperaturas evaluadas. En cuanto a la expresión al inicio de la fase estacionaria, a 12 °C se detectó el mayor nivel de expresión de *Rho1* para esta cepa, mientras que el menor se observó a 35 °C. Las temperaturas de 5 y 25 °C presentaron valores de expresión intermedios, no significativamente diferentes entre ellas.

Tabla IV.3: Período de incubación (días) para la evaluación de la expresión génica, correspondientes a las fases lineal y estacionaria de cada cepa de *Alternaria* a distintas temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C) en agar pulpa de tomate (APT).

Cepa	Fase de crecimiento	Temperatura (°C)			
		5	12	25	35
<i>A. arborescens</i> gr.-esp.	Lineal	18	12	9	12
	Estacionaria	28	18	14	25
<i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	Lineal	25	12	9	18
	Estacionaria	35	18	12	28

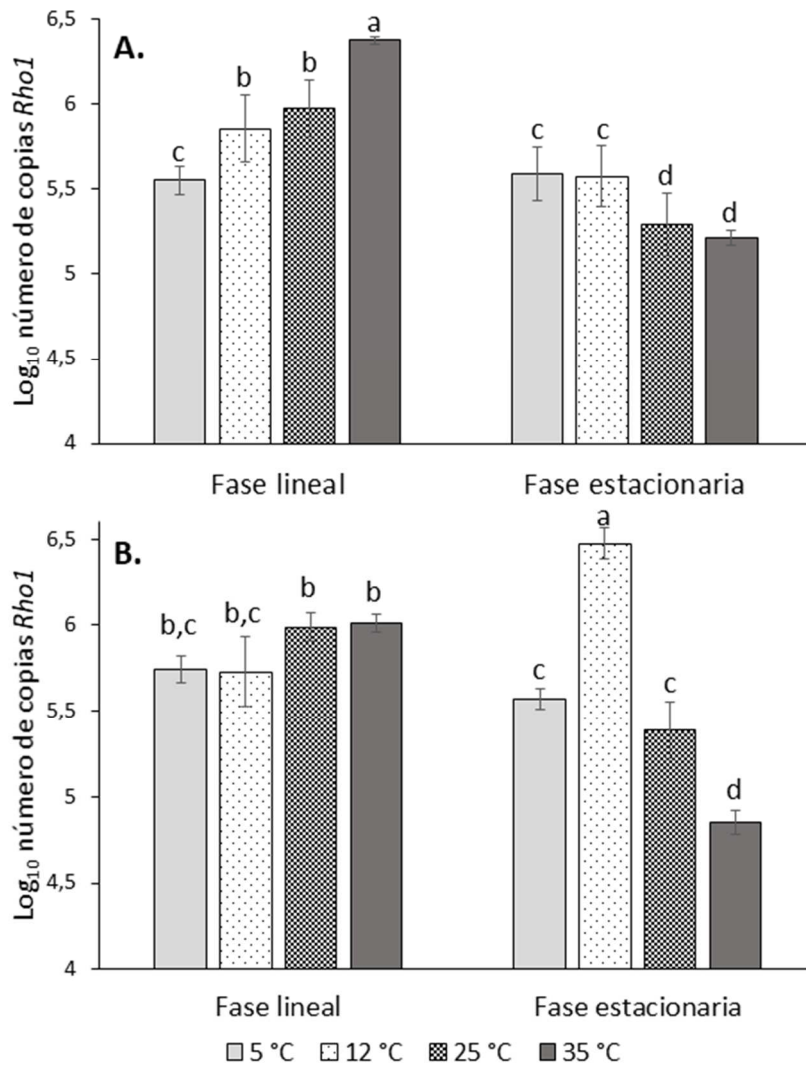


Figura IV.9: Niveles de expresión absoluta del gen *Rho1* para *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L (A) y *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H (B) en agar pulpa de tomate (APT) a diferentes temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C) y fases de crecimiento. Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada cepa ($p < 0,05$).

IV.3.2.a.i.3.-Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas

La producción de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y de AME por *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H fue evaluada en APT a diferentes temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C) luego de un período de incubación correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento de cada cepa en cada condición. Los resultados de la producción de micotoxinas se muestran en la Figura IV.10. La cepa T_2_L produjo grandes cantidades de TeA a todas las temperaturas ensayadas, con una temperatura óptima para la producción entre 12 y 25 °C. Por otro lado, la mayor temperatura estudiada (35 °C) fue la condición en la cual se acumuló la menor cantidad de esta toxina.

Por otra parte, *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H fue capaz de producir AME únicamente a las menores temperaturas evaluadas; esta toxina no fue detectada a 25 ni a 35 °C. La máxima producción se obtuvo a 12 °C, observándose una marcada disminución al descender la temperatura.

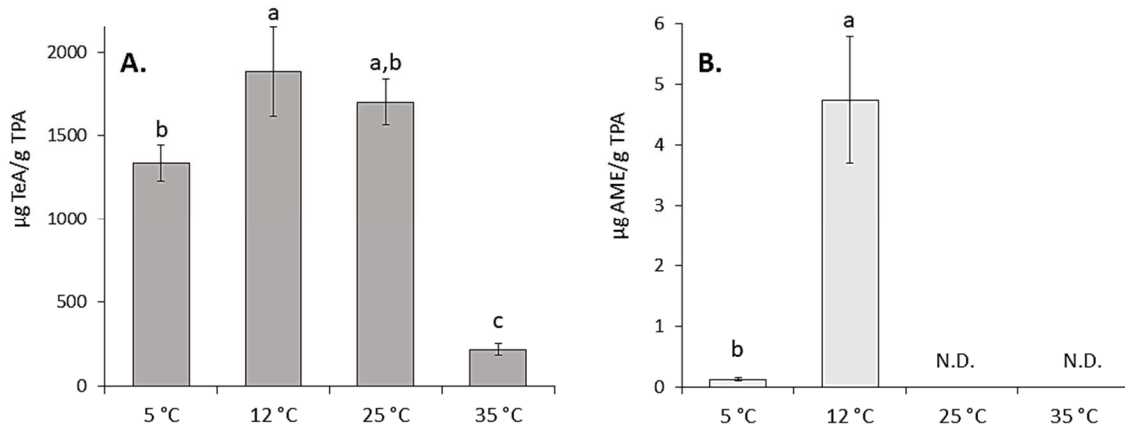


Figura IV.10: Producción de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L (A) y de AME por *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H (B) en agar pulpa de tomate (APT) a diferentes temperaturas (5, 12, 25 y 35 °C) en la fase estacionaria de crecimiento. N.D.: No detectado (<LOD). Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada cepa ($p < 0,05$).

IV.3.2.a.ii.-Evaluación de estrategias de bajo impacto ambiental

Se evaluó el efecto de dos estrategias de biocontrol, levaduras y el péptido antifúngico PgAFP, sobre las cepas de *Alternaria* de tomate a 12 °C, temperatura seleccionada en función de los resultados del ensayo ecofisiológico, y por ser ésta de uso frecuente en las cámaras de almacenamiento de estos frutos. Para cada tratamiento, se evaluó la influencia del agente de biocontrol sobre el crecimiento, la expresión del gen *Rho1* y la producción de micotoxinas por las cepas T_2_L y T_50_H.

IV.3.2.a.ii.1.-Estudio de biocontrol con levaduras

IV.3.2.a.ii.1.1.-Selección de las levaduras

En un ensayo preliminar, se evaluó el efecto de tres cepas de *D. hansenii* sobre el crecimiento de *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H para seleccionar aquellas que mostraran efectos inhibitorios sobre las mismas. Dos de las tres cepas de *D. hansenii* evaluadas (10552 y 10553) presentaron mayores efectos en la inhibición del crecimiento de ambas cepas

de *Alternaria* (33-58 % de inhibición a los 7 días de incubación con respecto al control). La levadura 253H mostró un máximo de 13 % de reducción, por lo que fue descartada para los siguientes ensayos. Con respecto a la siembra de las levaduras, se evaluaron dos metodologías diferentes y se observó que distribuir el agente de biocontrol en toda la superficie de la placa resultó más efectivo que la siembra central de los dos microorganismos (*D. hansenii* y *Alternaria* spp.), siendo además esta técnica la que podría aplicarse en los frutos de tomate a futuro. Es por ello que fue la seleccionada para los ensayos posteriores.

IV.3.2.a.ii.1.2.-Efecto sobre el crecimiento en medio tomate

Se evaluó el efecto de las cepas de *D. hansenii* seleccionadas sobre el crecimiento de *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en APT a 12 °C. Los valores de λ y $\mu_{\text{máx}}$ de *Alternaria* spp. en presencia de las cepas 10552 y 10553 de *D. hansenii* se muestran en la Tabla IV.4. Las cepas de *D. hansenii* no influyeron de forma significativa sobre la λ de *Alternaria* spp. Si bien *A. tenuissima* gr.-esp. mostró valores promedio de λ superiores en presencia de la levadura, los mismos no tuvieron significancia estadística. Con respecto a la velocidad de crecimiento, para ambas cepas de *Alternaria* $\mu_{\text{máx}}$ se redujo entre un 15 y un 35 % en presencia de las levaduras, siendo este valor estadísticamente diferente al correspondiente control únicamente para el caso de *A. arborescens* gr.-esp. con Dh 10552. Es importante resaltar que, si bien los parámetros de crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. en presencia de cualquiera de las levaduras, no fueron significativamente diferentes al correspondiente control, macroscópicamente se observó una disminución en el crecimiento, como se muestra en la Figura IV.11 (menor biomasa, crecimiento aéreo, colonia poco tupida).

Tabla IV.4: Fase de latencia (λ , días) y velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$, mm/día) para *Alternaria* spp. en presencia de *Debaryomyces hansenii* (Dh) en agar APT incubado a 12 °C.

Tratamiento	<i>A. arborescens</i> gr.-esp.		<i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	
	λ (días)	$\mu_{\text{máx}}$ (mm/día)	λ (días)	$\mu_{\text{máx}}$ (mm/día)
Control	2,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,6 ± 0,2
Dh 10552	2,1 ± 0,7	2,9 ± 0,5*	7,8 ± 1,3	3,7 ± 0,2
Dh 10553	2,3 ± 1,0	3,7 ± 0,7	5,9 ± 0,4	4,0 ± 0,2

Los valores corresponden al promedio ± un desvío estándar para cada condición.

*Valor significativamente diferente a su correspondiente control ($p < 0,05$).

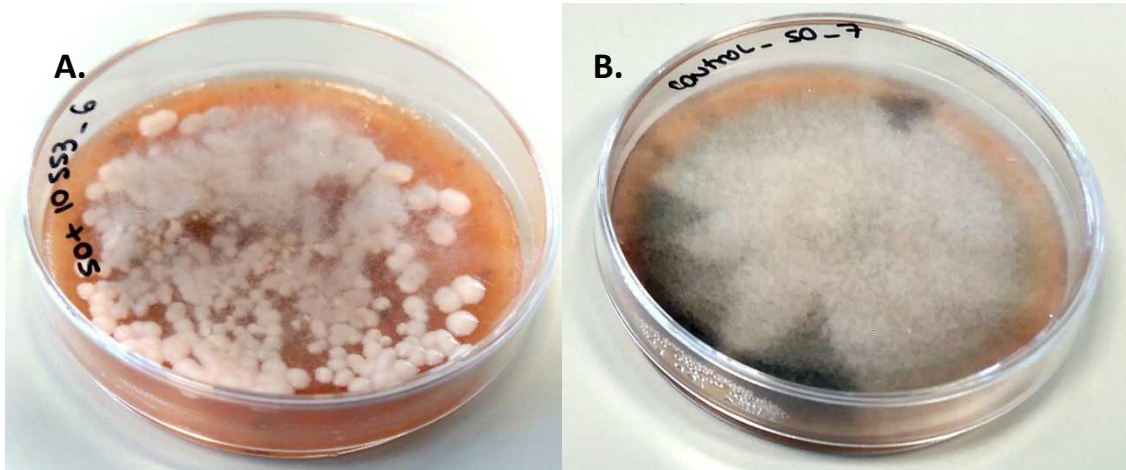


Figura IV.11: Crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en agar pulpa de tomate (APT), luego de 17 días de incubación a 12 °C. A. en presencia de *Debaryomyces hansenii* 10553; B. control.

IV.3.2.a.ii.1.3.-Efecto sobre la expresión de *Rho1* en medio tomate

Se determinó la expresión relativa del gen *Rho1* en *A. arborescens* gr.-esp. y *A. tenuissima* gr.-esp. en APT a 12 °C en ambas fases de crecimiento (lineal y estacionaria) y en presencia de ambas cepas de *D. hansenii*. Los resultados obtenidos para cada condición se muestran en la Figura IV.12. La presencia de las levaduras en el medio no tuvo una marcada influencia sobre la expresión de este gen con respecto a la condición control; sólo se detectaron diferencias significativas en dos casos. Durante la fase lineal de crecimiento, *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L mostró una sobreexpresión con respecto al control en presencia de *D. hansenii* 10553. En contraposición, la presencia de la cepa *D. hansenii* 10552 ocasionó una inhibición de los niveles de expresión del gen *Rho1* en *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en su etapa estacionaria de crecimiento.

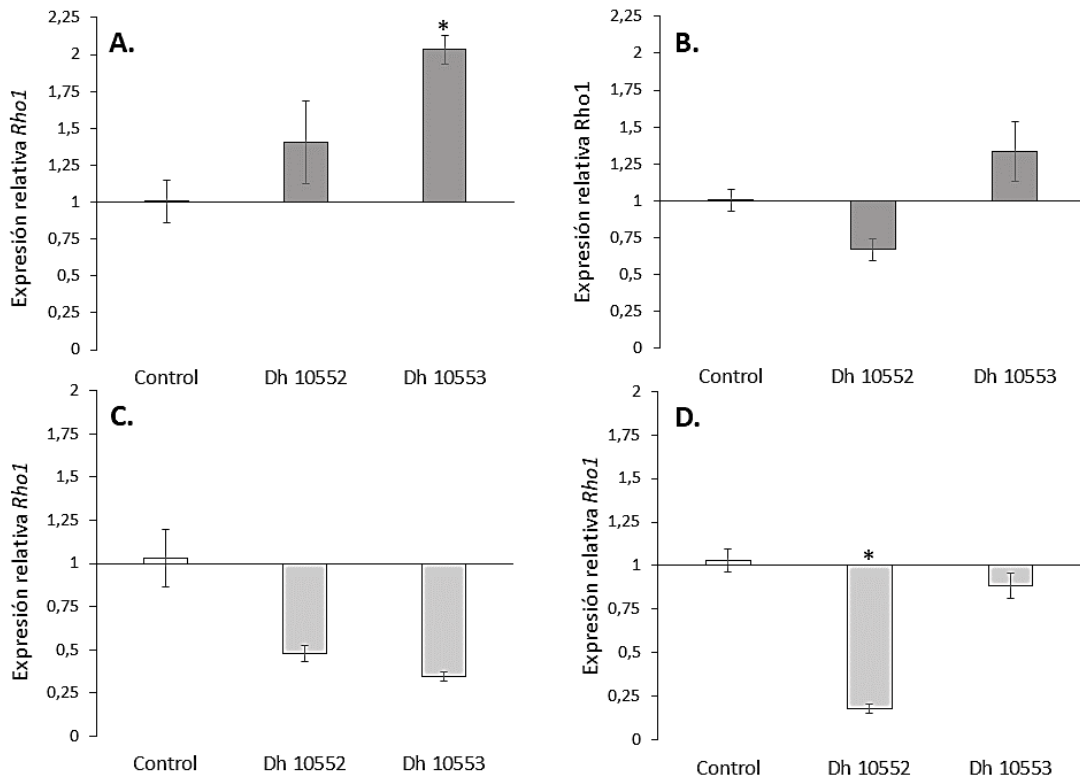


Figura IV.12: Expresión relativa del gen *Rho1* para *Alternaria* spp. en presencia de *Debaryomyces hansenii* (Dh) en agar pulpa de tomate (APT) incubado a 12 °C. A. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase lineal de crecimiento; B. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase estacionaria de crecimiento; C. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase lineal de crecimiento; D. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase estacionaria de crecimiento. Las placas control se usaron como calibradores para los cálculos (expresión relativa≈1). Las líneas indican el desvío estándar. Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas con respecto al control correspondiente ($p < 0,05$).

IV.3.2.a.ii.1.4.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio tomate

El efecto de la presencia de levaduras sobre la producción de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y de AME por *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en APT a 12 °C se muestra en la Tabla IV.5. La acumulación de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en presencia de *D. hansenii* con respecto al control (86 % de reducción con Dh 10552 y 88 % con Dh 10553). Por otro lado, AME no fue detectado en ninguna de las placas de *A. tenuissima* gr.-esp. en presencia de cualquiera de las cepas de *D. hansenii* ensayadas durante el período evaluado.

Tabla IV.5: Concentración de toxinas (μg toxina/g APT) producidas por *Alternaria* spp. en presencia de *Debaryomyces hansenii* en agar pulpa de tomate (APT) incubado a 12 °C durante 18 días.

Tratamiento	$\mu\text{g/g}$ TeA (<i>A. arborescens</i> gr.-esp. T_2_L)	$\mu\text{g/g}$ AME (<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. T_50_H)
Control	363,6 \pm 61,5	4,8 \pm 1,0
Dh 10552	43,0 \pm 7,6*	N.D.
Dh 10553	52,5 \pm 15,4*	N.D.

Los valores corresponden a la concentración promedio \pm un desvío estándar para cada condición.

*Valores significativamente diferentes a su correspondiente control ($p < 0,05$).

N.D.: no detectado ($< \text{LOD}$).

IV.3.2.a.ii.2.-Estudio de biocontrol con PgAFP

IV.3.2.a.ii.2.1.-Selección de la concentración del péptido

En un ensayo preliminar en medio líquido (CPD), se evaluó el efecto de distintas concentraciones del péptido PgAFP sobre las dos cepas de *Alternaria* de tomate (T_2_L y T_50_H) y dos cepas de referencia (*A. arborescens* EGS 39128 y *A. alternata* EGS 34016) para seleccionar las concentraciones de dicho compuesto a aplicar en el medio a base de tomate. La Figura IV.13 muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento obtenidos para *Alternaria* evaluadas frente a distintos niveles de PgAFP a las 96 h de incubación a 25 °C. La cepa más sensible al tratamiento fue *A. arborescens* EGS 39128, que presentó porcentajes de reducción del crecimiento superiores a 60 % a todas las concentraciones evaluadas. La menos sensible resultó ser *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L, presentando una reducción máxima de 33 % a 9,375 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP. Las otras dos cepas mostraron valores de reducción intermedios, obteniéndose un porcentaje de disminución máximo de 49,7 % con 9,375 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP para *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H y de 46,7 % con 75 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP para *A. alternata* EGS 34016. Se observó que la concentración de 9,375 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP fue la mínima necesaria para lograr una reducción significativa del crecimiento de *Alternaria* spp. para las 4 cepas estudiadas; un incremento mayor en la concentración de PgAFP no redundó en un aumento del porcentaje de inhibición.

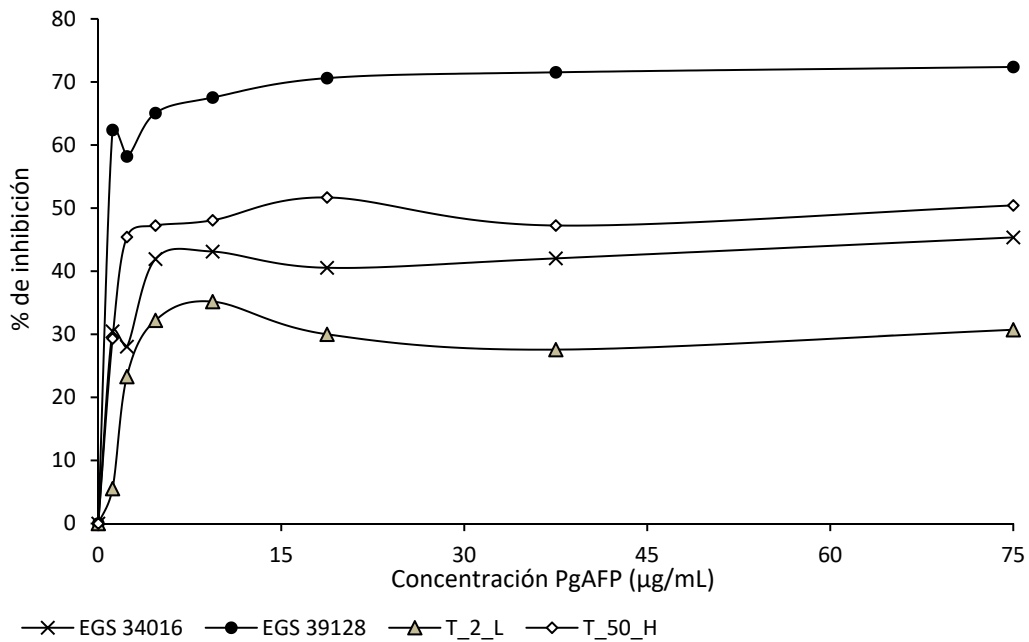


Figura IV.13: Porcentaje de reducción del crecimiento de cuatro cepas de *Alternaria spp.* en presencia de concentraciones incrementales del péptido antifúngico PgAFP en Caldo Papa Dextrosa (CPD) a 25 °C por 96 h, medidas como absorbancia a 595 nm, respecto de los respectivos controles.

IV.3.2.a.ii.2.2.-Efecto sobre el crecimiento en medio tomate

Se estudió el efecto de PgAFP sobre el crecimiento de *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en APT a 12 °C. Para este estudio, se seleccionaron las concentraciones de 10 y 40 µg/mL del péptido, teniendo en cuenta la mínima concentración inhibitoria obtenida en el ensayo previo, y un valor de cuatro veces superior a éste atendiendo a posibles efectos negativos de la matriz tomate. Los valores de λ y $\mu_{\text{máx}}$ de *Alternaria spp.* en APT en presencia de PgAFP en concentraciones de 10 y 40 µg/mL se muestran en la Tabla IV.6. La fase de latencia de *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L se incrementó en un 29 % en presencia de 10 µg/mL de PgAFP, mientras que su velocidad de crecimiento se redujo en un 23 % en esta condición con respecto al control ($p < 0,05$). Por otro lado, el péptido no influyó de forma significativa sobre la fase de latencia ni la velocidad de crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H.

Tabla IV.6: Fase de latencia (λ , días) y velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$, mm/día) para *Alternaria* spp. en presencia de 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP en agar APT incubado a 12 °C.

Tratamiento	<i>A. arborescens</i> gr.-esp.		<i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	
	λ (días)	$\mu_{\text{máx}}$ (mm/día)	λ (días)	$\mu_{\text{máx}}$ (mm/día)
Control	2,7 \pm 0,2	4,4 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	5,6 \pm 0,2
PgAFP 10	3,9 \pm 0,6*	3,4 \pm 0,3*	4,4 \pm 0,9	5,5 \pm 0,3
PgAFP 40	2,3 \pm 0,2	4,1 \pm 0,3	4,7 \pm 0,1	5,5 \pm 0,2

Los valores corresponden al promedio \pm un desvío estándar para cada condición.

*Valores significativamente diferentes a su correspondiente control ($p < 0,05$).

IV.3.2.a.ii.2.3.-Efecto sobre la expresión de *Rho1* en medio tomate

Se determinó la expresión relativa del gen *Rho1* para *Alternaria* spp. en APT a 12 °C en presencia de 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP en ambas fases de crecimiento (lineal y exponencial). Los resultados obtenidos para cada condición se muestran en la Figura IV.14. La presencia de cualquiera de las concentraciones de PgAFP evaluadas no produjo diferencias significativas en la expresión relativa con respecto al control en *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L. En cuanto a *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H, se detectó una subexpresión de este gen en presencia de PgAFP a 10 $\mu\text{g/mL}$ a ambas fases de crecimiento (lineal y estacionaria).

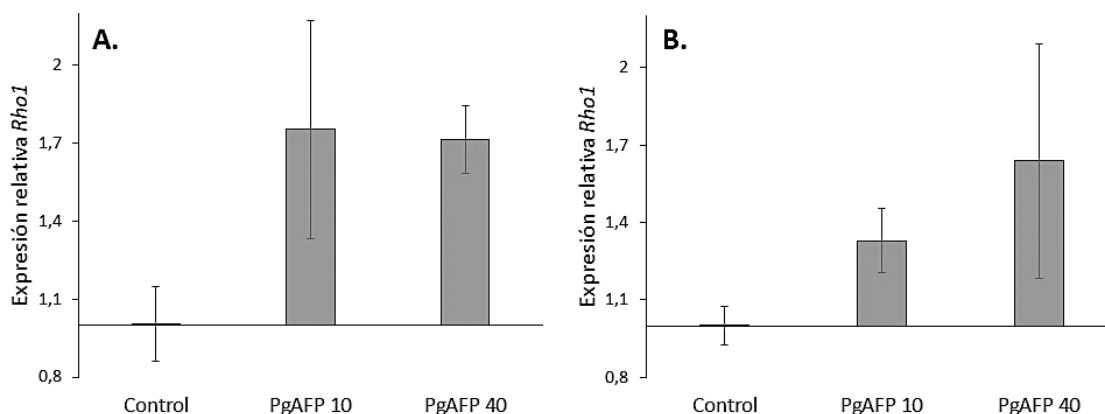


Figura IV.14: Expresión relativa del gen *Rho1* para *Alternaria* spp. en presencia de 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de PgAFP en agar APT incubado a 12 °C. A. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase lineal de crecimiento; B. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase estacionaria de crecimiento; C. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase lineal de crecimiento; D. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase estacionaria de crecimiento. Las placas control se usaron como calibradores para los cálculos (expresión relativa \approx 1). Las líneas indican el desvío estándar. Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas con respecto al control correspondiente ($p < 0,05$).

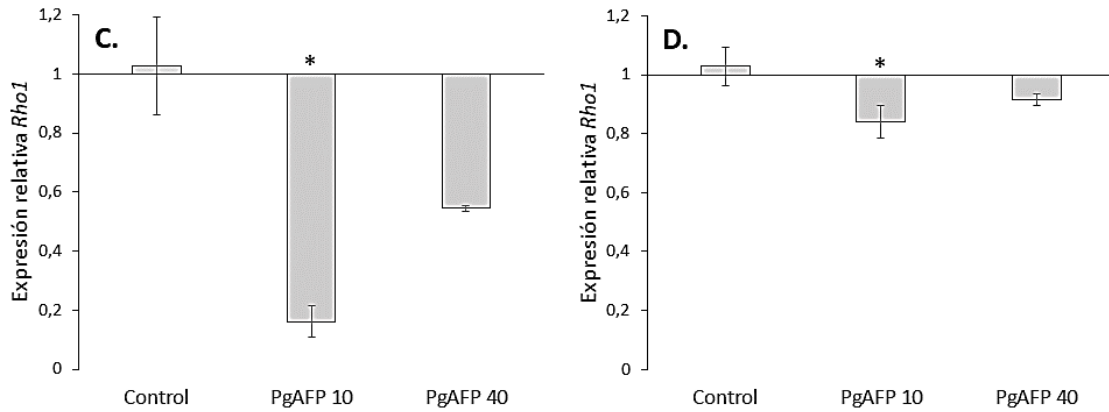


Figura IV.14 (continuación): Expresión relativa del gen *Rho1* para *Alternaria* spp. en presencia de 10 y 40 µg/mL de PgAFP en agar APT incubado a 12 °C. A. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase lineal de crecimiento; B. *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L en fase estacionaria de crecimiento; C. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase lineal de crecimiento; D. *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en fase estacionaria de crecimiento. Las placas control se usaron como calibradores para los cálculos (expresión relativa≈1). Las líneas indican el desvío estándar. Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas con respecto al control correspondiente ($p<0,05$).

IV.3.2.a.ii.2.4.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio tomate

El efecto de la presencia de PgAFP sobre la producción de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. T_2_L y de AME por *A. tenuissima* gr.-esp. T_50_H en APT a 12 °C se muestra en la Tabla IV.7. En cuanto a TeA, su acumulación disminuyó significativamente en presencia de 10 µg/mL de PgAFP (27 % de reducción con respecto al control). En cambio, con 40 µg/mL del antifúngico, no se obtuvieron diferencias significativas entre el control y el tratamiento. En relación a AME, se observaron disminuciones significativas en la producción con ambas concentraciones del péptido (58 y 92 % de inhibición con 10 y 40 µg/mL de PgAFP, respectivamente).

Tabla IV.7: Concentración de toxinas (µg toxina/g APT) producidas por *Alternaria* spp. en presencia de 10 y 40 µg/mL de PgAFP en agar pulpa de tomate (APT) incubado a 12 °C durante 18 días.

Tratamiento	µg/g TeA (<i>A. arborescens</i> gr.-esp. T_2_L)	µg/g AME (<i>A. tenuissima</i> gr.-esp. T_50_H)
Control	363,6 ± 61,5	4,8 ± 1,0
PgAFP 10	267,0 ± 32,6*	2,0 ± 0,7*
PgAFP 40	305,8 ± 61,9	0,4 ± 0,5*

Los valores corresponden a la concentración promedio ± un desvío estándar para cada condición.

*Valores significativamente diferentes a su correspondiente control ($p<0,05$).

IV.3.2.b.-Comparación de antifúngicos para el control de *Alternaria* spp. en trigo

Los efectos del péptido antifúngico PgAFP a un nivel de 10 µg/mL y de un antifúngico comercial, CELEST XL® a 0,5 µg/mL, sobre el crecimiento, la expresión del gen *Rho1* y la producción de micotoxinas por una cepa de *A. tenuissima* gr.-esp. (W_29_H) aislada de trigo fueron evaluados en un medio modelo a base de trigo (WA) a 25 °C, bajo dos condiciones de a_w , 0,98 y 0,95.

IV.3.2.b.i.-Efecto sobre el crecimiento en medio trigo

El crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en WA se vio afectado por los tratamientos antifúngicos evaluados. La Figura IV.15 muestra el grado de desarrollo observado bajo las distintas condiciones y tratamientos luego de 6 días de incubación a 25 °C. Como era de esperarse, la a_w tuvo una fuerte influencia en el desarrollo fúngico. El diámetro de las colonias en las placas control de WA incubadas a 0,95 a_w fue inferior a 30 mm al final del período de incubación (14 días), mientras que a 0,98 a_w alcanzó los bordes de las placas al cabo de una semana de incubación.

El efecto de los tratamientos antifúngicos sobre la fase de latencia (λ) y la velocidad de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) en todas las condiciones estudiadas se muestra en la Figura IV.16. A 0,95 a_w , la presencia de PgAFP o CELEST XL® en el medio produjo un retraso significativo en el inicio del crecimiento respecto del control ($p < 0,05$), siendo el efecto del péptido antifúngico mayor que el del antifúngico comercial, con un valor de $\lambda = 6,8$ días con PgAFP versus 3,7 días con CELEST XL®. Además, la $\mu_{m\acute{a}x}$ se redujo 29 y 33 % con respecto al control en presencia de PgAFP y CELEST XL®, respectivamente; aunque no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

A 0,98 a_w , las λ fueron muy cortas, tanto para el control como con ambos tratamientos evaluados (1,2; 0,9 y 1,7 en el control, PgAFP y CELEST XL®, respectivamente). El efecto de los antifúngicos sobre la velocidad de crecimiento mostró la misma tendencia que a 0,95 a_w , aunque fue mucho más pronunciado. La $\mu_{m\acute{a}x}$ se redujo en un 66 % en presencia de cualquiera de los antifúngicos con respecto al control.

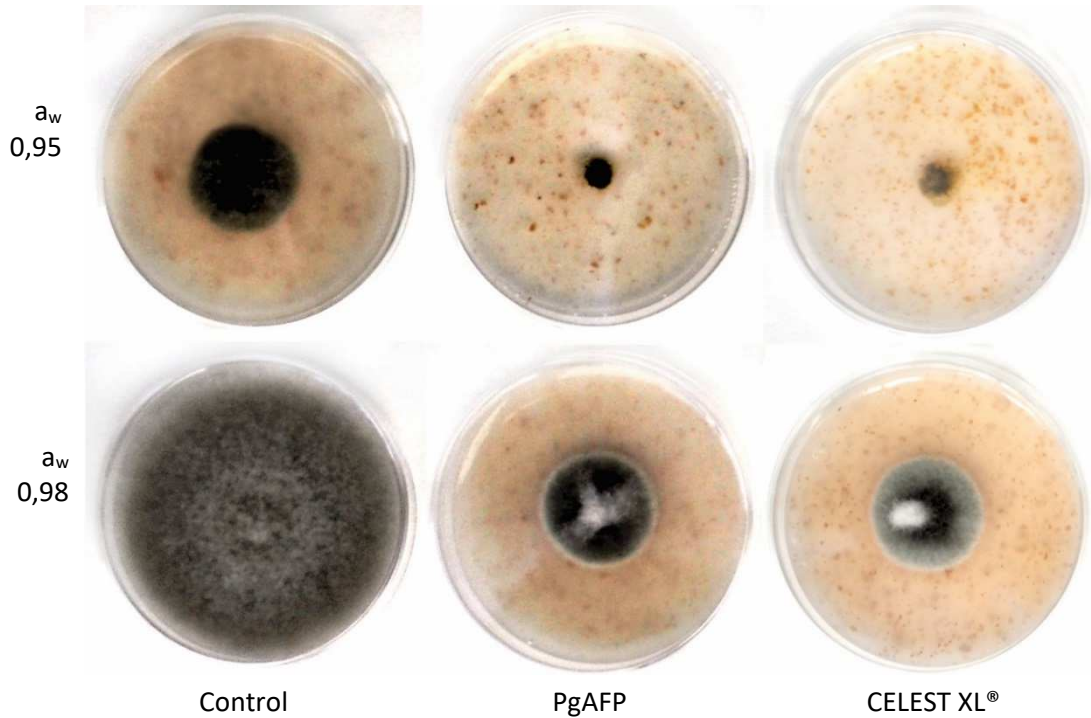


Figura IV.15: Colonias de *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en agar trigo (WA) en presencia de dos tratamientos antifúngicos (10 µg/mL de PgAFP y 0,5 µg/mL de CELEST XL®) a dos niveles de a_w (0,95 y 0,98) después de 6 días de incubación a 25 °C.

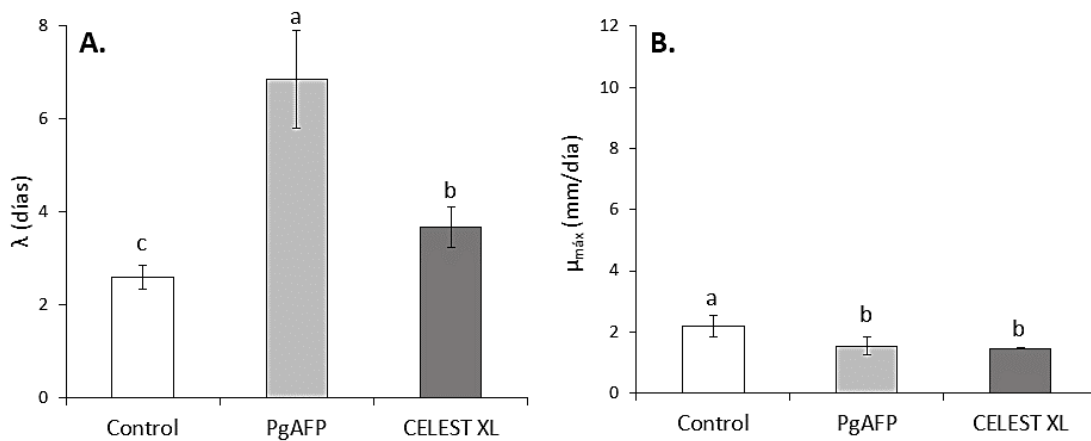


Figura IV.16: Fase de latencia (λ , días) y velocidad de crecimiento ($\mu_{máx}$, mm/día) de *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en agar trigo (WA) a 0,95 y 0,98 a_w y 25 °C, con dos tratamientos antifúngicos (PgAFP 10 µg/mL y CELEST XL® 0,5 µg/mL). A. λ a $a_w=0,95$; B. $\mu_{máx}$ a $a_w=0,95$; C. λ a $a_w=0,98$; D. $\mu_{máx}$ a $a_w=0,98$. Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada parámetro a cada a_w ($p < 0,05$).

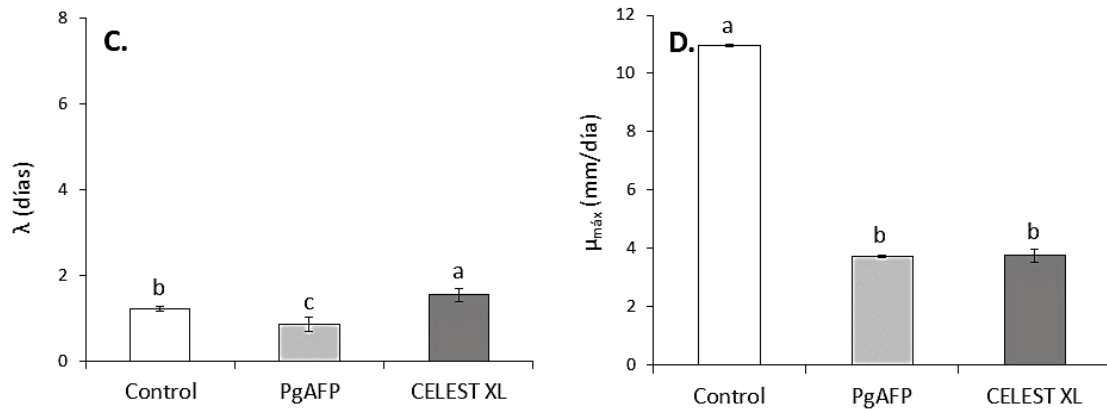


Figura IV.16 (continuación): Fase de latencia (λ , días) y velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$, mm/día) de *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en agar trigo (WA) a 0,95 y 0,98 a_w y 25 °C, con dos tratamientos antifúngicos (PgAFP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y CELEST XL[®] 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A. λ a $a_w=0,95$; B. $\mu_{\text{máx}}$ a $a_w=0,95$; C. λ a $a_w=0,98$; D. $\mu_{\text{máx}}$ a $a_w=0,98$. Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada parámetro a cada a_w ($p < 0,05$).

IV.3.2.b.ii.-Efecto sobre la expresión de *Rho1* en medio trigo

Se evaluó el efecto de la presencia de PgAFP y CELEST XL[®] sobre la expresión del gen *Rho1* por *A. tenuissima* gr.-esp. en WA en ambas fases de crecimiento (lineal y estacionaria) a 25 °C y dos niveles de a_w (0,95 y 0,98). Los resultados se muestran en la Figura IV.17.

A 0,95 a_w , la presencia de cualquiera de los compuestos antifúngicos en el medio causó una subexpresión del gen *Rho1* durante la fase lineal de crecimiento. Esta subexpresión se mantuvo en la fase estacionaria de crecimiento en presencia del antifúngico CELEST XL[®]. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las muestras con PgAFP y el control en la etapa estacionaria.

A 0,98 a_w , también se observó una subexpresión del gen *Rho1* durante la fase lineal de crecimiento en presencia de ambos antifúngicos evaluados. Sin embargo, el comportamiento en la fase estacionaria del crecimiento fue diferente para cada tratamiento. Mientras que en presencia de PgAFP la expresión relativa no fue significativamente diferente al control, en presencia de CELEST XL[®] se detectó una sobreexpresión de *Rho1*.

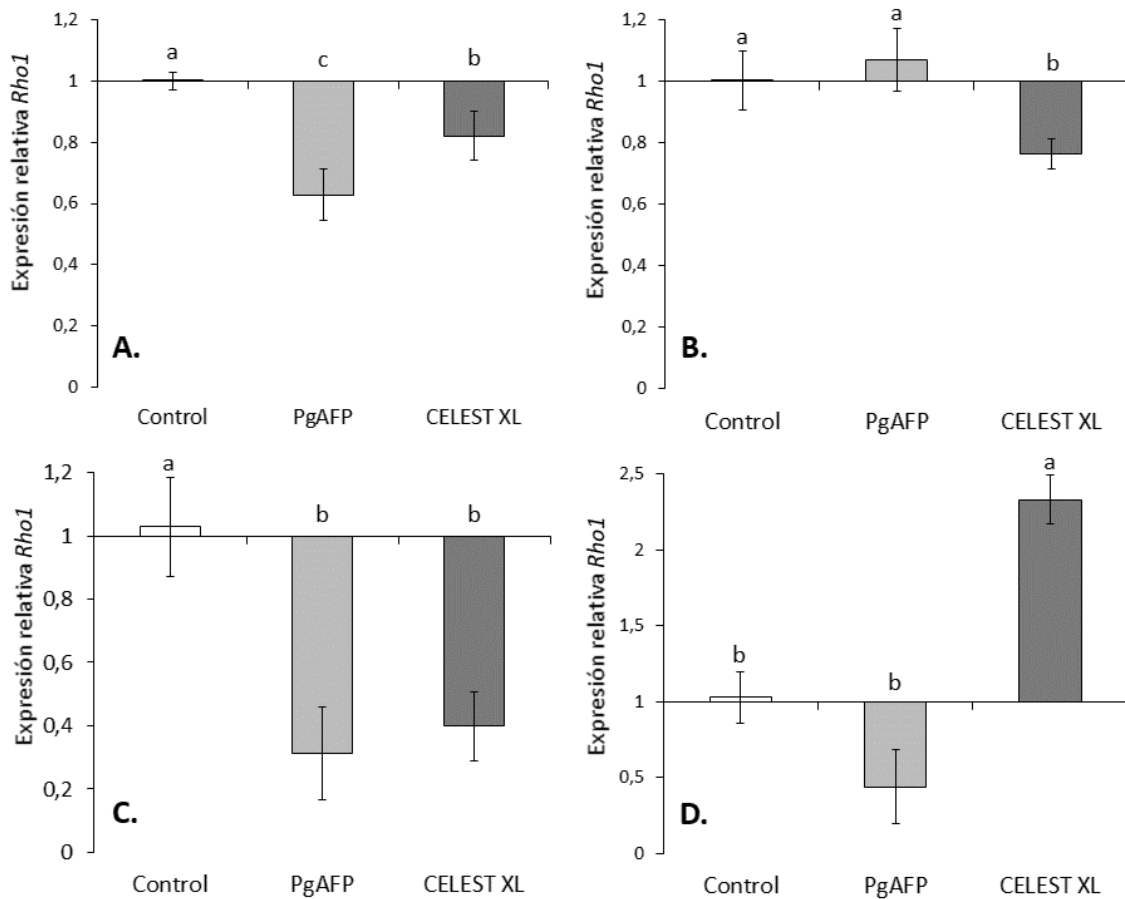


Figura IV.17: Expresión relativa del gen *Rho1* por *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en agar trigo (WA) a 0,95 y 0,98 a_w y 25 °C, con dos tratamientos antifúngicos (PgAFP 10 µg/mL y CELEST XL® 0,5 µg/mL) durante dos etapas de crecimiento (fase lineal y estacionaria). A. a_w=0,95, fase lineal; B. a_w=0,95, fase estacionaria; C. a_w=0,98, fase lineal; D. a_w=0,98, fase estacionaria. Las placas control de cada a_w se usaron como calibradores para los cálculos (expresión relativa≈1). Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3.2.b.iii.-Efecto sobre la producción de toxinas en medio trigo

Se estudió el efecto de PgAFP y CELEST XL® sobre la producción de TeA, AOH y AME por *A. tenuissima* gr.-esp. en WA a 0,95 y 0,98 a_w y 25 °C. La producción de micotoxinas estuvo fuertemente influenciada por el de nivel a_w; a 0,95 se detectaron concentraciones más bajas de las tres toxinas que a 0,98 en todas las condiciones evaluadas. Este efecto fue más pronunciado para los alternarios; AOH no se detectó a 0,95 a_w y AME se encontró en niveles muy bajos y sólo en las placas control. Las concentraciones de micotoxinas obtenidas con los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla IV.8.

La producción de TeA se redujo en presencia de ambos compuestos antifúngicos. A 0,95 a_w , se detectó una disminución significativa en la producción tanto con CELEST XL[®] como con PgAFP (99 y 84 % de reducción con respecto al control, respectivamente). A 0,98 a_w , la mayor inhibición se obtuvo con PgAFP (66 % de reducción); mientras que el tratamiento con CELEST XL[®] no mostró diferencias significativas con respecto al control.

En cuanto a la producción de AOH a 0,98 a_w , se detectó una menor acumulación de esta toxina en presencia de PgAFP (59 % de reducción con respecto al control), mientras que con CELEST XL[®] se obtuvo un valor no significativamente diferente al control.

Por último, a 0,98 a_w , ambos antifúngicos causaron un efecto opuesto en la acumulación de AME. Mientras que la concentración de esta toxina en presencia de PgAFP fue significativamente menor que en las placas control (62 % de reducción con respecto al control), en el caso de CELEST XL[®] se detectó un incremento significativo (57 % más que en el control).

Tabla IV.8: Concentración de micotoxinas (en μg toxina/g WA) acumulada por *A. tenuissima* gr.-esp. W_29_H en agar trigo (WA) a 0,95 y 0,98 a_w y 25 °C en la fase estacionaria de crecimiento con dos tratamientos antifúngicos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PgAFP y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CELEST XL[®]).

a_w	μg TeA/g		
	Control	PgAFP	CELEST XL [®]
0,95	38,0 \pm 2,8 ^a	6,1 \pm 0,5 ^b	0,25 \pm 0,05 ^c
0,98	162,2 \pm 27,4 ^a	56,0 \pm 4,9 ^b	120,4 \pm 21,4 ^a

a_w	μg AOH/g		
	Control	PgAFP	CELEST XL [®]
0,95	N.D.	N.D.	N.D.
0,98	3,0 \pm 0,6 ^a	1,2 \pm 0,5 ^b	3,07 \pm 0,09 ^a

a_w	μg AME/g		
	Control	PgAFP	CELEST XL [®]
0,95	0,04 \pm 0,01*	N.D.	N.D.
0,98	1,2 \pm 0,5 ^b	0,5 \pm 0,2 ^c	3,2 \pm 0,2 ^a

Los valores corresponden a la concentración promedio \pm un desvío estándar.

Las letras en superíndice indican los grupos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

N.D.: no detectado (<LOD); *: valor entre LOD y LOQ.

IV.4. DISCUSIÓN

IV.4.1. *Diseño de un método de RT-qPCR para evaluar la vía CWI*

El potencial que presentan los hongos para adaptarse a diferentes condiciones y colonizar alimentos de muy diversa composición ha sido extensamente estudiado (Medina y col., 2015, Rodríguez y col., 2014, Schmidt-Heydt y col., 2007, 2013). Dicha capacidad se ha asociado con la activación de mecanismos intracelulares específicos que les permiten tolerar y superar diversos tipos de estrés (Fuchs y Mylonakis, 2009, Magan 2007, Schmidt-Heydt y col., 2013). Si bien se han descrito diferentes proteínas específicas de las vías de respuesta a estrés, el conocimiento completo de cómo funcionan en conjunto aún no ha sido completamente dilucidado (Hayes y col., 2014). Entre ellas, la ruta CWI es una de las principales responsables del mantenimiento de la integridad celular a través de la reparación y/o fortificación de la pared celular. Distintas metodologías por RT-qPCR se utilizan en la actualidad para examinar genes relacionados con el estrés bajo diferentes condiciones ambientales, que pueden estar relacionados con el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas en los alimentos (Rodríguez y col., 2016). El método de RT-qPCR basado en la expresión del gen *Rho1*, desarrollado en el presente trabajo, ofrece la posibilidad de estudiar los cambios en la vía CWI en hongos filamentosos bajo diversas condiciones externas.

El diseño de cebadores apropiados es el primer punto crítico en el desarrollo de un método de qPCR exitoso. En este trabajo, las secuencias seleccionadas fueron probadas *in silico* con diferentes especies fúngicas relacionadas a alimentos, incluyendo especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Giberella* y *Talaromyces*. La optimización de las condiciones de reacción se llevó a cabo con tres especies, *A. flavus*, *P. polonicum* y *A. arborescens* gr.-esp. Los parámetros obtenidos para la reacción optimizada (los coeficientes de regresión del ajuste lineal, las pendientes y las eficiencias) estuvieron dentro del rango recomendado (Rodríguez y col., 2015), indicando que la metodología es específica, sensible y reproducible en especies de diferentes géneros. Por lo tanto, la técnica de qPCR desarrollada cumple con las premisas para ser un método robusto, capaz de detectar y cuantificar de forma adecuada la respuesta fúngica a factores de estrés de la pared celular.

La aplicabilidad de la metodología basada en el gen *Rho1* se evaluó sobre *A. flavus* y *P. polonicum*, en presencia del péptido antifúngico PgAFP, teniendo en cuenta resultados de estudios previos. Delgado y col., (2015b) demostraron que el mecanismo de acción de PgAFP involucra cambios en los niveles de proteínas asociadas a la integridad de la pared celular, incluyendo a la proteína *Rho1*, en la biosíntesis de quitina y en la permeabilidad celular en

hongos sensibles; es decir que es un compuesto estresor de la pared celular fúngica. En dichos estudios, las dos especies utilizadas habían mostrado un comportamiento diferente en presencia del antifúngico. *A. flavus*, sensible al tratamiento con PgAFP, presentó menores cantidades de la proteína Rho1 en comparación con el control no tratado (Delgado y col., 2015b). Por otro lado, la cepa de *P. polonicum* resultó ser resistente al tratamiento con PgAFP, exhibiendo mayores niveles relativos de la proteína Rho1 y contenido de quitina en presencia de PgAFP que en ausencia de este péptido (Delgado y col., 2016a). En estos trabajos se hipotetiza que una mayor cantidad relativa de la proteína Rho1 se relaciona con una mayor resistencia del hongo al tratamiento antifúngico.

Los resultados del presente trabajo han demostrado que también existe un diferente comportamiento en respuesta a PgAFP para ambas cepas estudiadas en cuanto a los niveles de expresión del gen *Rho1*. Para *P. polonicum*, se observó una sobreexpresión de *Rho1*, mientras que no se observaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento entre las placas tratadas con PgAFP y el control. Este resultado respalda la hipótesis de que en *P. polonicum* la vía CWI se activa en presencia de PgAFP, causando que el hongo no se vea afectado por dicho péptido. Con respecto a *A. flavus*, las muestras tratadas con PgAFP presentaron una velocidad de crecimiento baja, pero significativamente mayor que las del control. Sin embargo, el diámetro de la colonia como único indicador del crecimiento fúngico podría no reflejar toda la influencia de un determinado factor en estudio; la biomasa y el nivel de esporulación en la colonia también son parámetros importantes a tener en cuenta para medir el crecimiento fúngico (Schmidt-Heydt y col., 2012). La colonia de *A. flavus* tratada con PgAFP presentó menos micelio aéreo y una considerable disminución de la esporulación (Figura IV.6). Con respecto a la expresión del gen *Rho1*, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con PgAFP y el control para esta cepa. Esto parece indicar que la vía CWI no se activa en esta especie en presencia del péptido antifúngico, lo cual concuerda con el estudio previo en el que se informa la susceptibilidad de la misma al tratamiento (Delgado y col., 2015b). De manera similar a las observaciones de este trabajo, otro estudio previo demostró que un mutante condicional de *Rho1* de *Aspergillus fumigatus* presentó una esporulación fuertemente reducida en condiciones restrictivas (Dichtl y col., 2012).

La medición de la expresión del gen *Rho1* en el ensayo de evaluación de la aplicabilidad de la metodología de RT-qPCR fue realizada a dos tiempos distintos, 3 y 9 días, correspondientes al inicio y mitad de la fase lineal de crecimiento para ambas especies estudiadas. Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias significativas entre estos dos días, para evaluar el efecto de factores externos sobre el crecimiento fúngico y la expresión de la vía CWI en

Alternaria en los ensayos subsiguientes, se seleccionó un período de incubación tal que permita alcanzar la mitad de la fase lineal. De este modo, el hongo alcanzó un mayor grado de desarrollo, permitiendo contar con mayor cantidad de ARN para extraer, lo que redundó en un aumento de la sensibilidad del método.

La estructura de la pared celular fúngica suele ser un blanco común de los tratamientos antifúngicos por sus características netamente diferenciadas de las de otros organismos (Jabes y col., 2016). Conocer los mecanismos regulatorios implicados en su biosíntesis y mantenimiento es crucial, tanto para comprender la adaptación de los hongos a diferentes entornos alimentarios, como para la optimización de los tratamientos antifúngicos existentes y el desarrollo de nuevas estrategias de control. La inactivación de las vías de respuesta a estrés representa un método potencial para aumentar la eficacia de moléculas con actividad antifúngica (Hayes y col., 2014). La técnica diseñada en el presente trabajo sería útil para estos propósitos.

Por otra parte, la producción de metabolitos tóxicos por los hongos micotoxigénicos está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales, y varía según el organismo y los compuestos implicados, siendo incluso utilizados por el hongo como una estrategia de adaptación en ambientes desfavorables (Graf y col., 2012; Schmidt-Heydt y col., 2012). Por lo tanto, los factores ecológicos estresantes pueden desencadenar la acumulación de metabolitos secundarios en los alimentos. En base a esto, se ha postulado que la sobreexpresión de las vías para la respuesta al estrés y las de biosíntesis de micotoxinas podrían estar relacionadas (Geisen y col., 2017). Esta relación podría ser monitoreada mediante la metodología desarrollada en este estudio.

IV.4.2. Comportamiento ecofisiológico de *Alternaria* spp. en medio tomate

Para conocer el comportamiento de *Alternaria* spp. bajo diferentes condiciones ambientales en un medio modelo a base de tomate, se realizó un estudio ecofisiológico previo a la evaluación de las estrategias de biocontrol. Para ello, se seleccionaron dos cepas salvajes aisladas de dicho fruto en la etapa anterior del presente trabajo de Tesis (capítulo III), una de ellas clasificada como *A. arborescens* gr.-esp., productora de TeA, y otra como *A. tenuissima* gr.-esp., productora de AME. Teniendo en cuenta que las rutas biosintéticas de estas micotoxinas aún no están completamente dilucidadas y que además no se sabe si ambas vías están co-reguladas, se eligieron estas cepas de forma de evaluar los efectos de las condiciones externas individualmente sobre cada una de ellas.

El estudio ecofisiológico se realizó a cuatro temperaturas, las cuales tienen importancia durante el manejo postcosecha de los frutos de tomate: 5 °C representa la temperatura de almacenamiento en refrigeración, principalmente en los hogares; 12 °C es una temperatura común en las cámaras de almacenamiento de tomate; mientras que 35 °C representa una temperatura media habitual en el campo durante la época de cosecha del tomate (entre los meses de noviembre a abril en la región central de Argentina), la cual es especialmente importante cuando el almacenamiento se retrasa y los frutos cosechados permanecen en el campo. Además, se evaluó 25 °C, ya que datos de bibliografía la señalan como la condición óptima para el crecimiento de *Alternaria* spp. y es una temperatura ambiente intermedia que se puede encontrar durante la venta al por menor de los frutos.

Hay pocos datos disponibles en bibliografía acerca del crecimiento y producción de micotoxinas de *Alternaria* de esporas pequeñas bajo distintas condiciones ambientales. En cuanto al crecimiento, las temperaturas óptimas se reportaron entre 21 y 30 °C, en coincidencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Patriarca y col., 2014; Pose y col., 2009; Vaquera y col., 2014). En dichos estudios se observó que un descenso de la temperatura resultó desfavorable para el desarrollo fúngico, al igual que en el presente trabajo.

En cuanto a la producción de micotoxinas, TeA fue sintetizado por *A. arborescens* gr.-esp. a las cuatro temperaturas evaluadas, obteniéndose los máximos niveles entre 12 y 25 °C. Varios estudios coinciden en que este rango abarca las condiciones óptimas para la producción de dicha micotoxina. Young y col. (1980) reportaron la máxima producción a 20 °C por *A. tenuissima*; mientras que Magan y Baxter (1994) mostraron los mayores niveles de producción a temperaturas cercanas a 25 °C en cepas de *A. alternata*. Además, Pose y col. (2010a) y Vaquera y col. (2016), ambos trabajos realizados en medio a base de tomate, indicaron que los máximos niveles fueron detectados a 25 °C para *A. alternata* y 21 °C para *A. arborescens*, respectivamente.

Con respecto a AME, esta micotoxina no fue detectada a 25 ni a 35 °C, observándose un pico de producción a 12 °C por la cepa de *A. tenuissima* gr.-esp. Este resultado difiere con la escasa bibliografía disponible, en la que se informa que los máximos niveles fueron detectados a temperaturas entre 30 y 35 °C para *A. alternata* y *A. arborescens* (Pose y col., 2010a; Vaquera y col., 2016).

Los estímulos externos modulan las vías metabólicas y de señalización que definen la composición de la pared celular, lo cual influye en diferentes procesos en función de la fase de desarrollo del hongo, incluyendo el crecimiento, la conidiación, el apareamiento, la virulencia y

la producción de metabolitos secundarios (Malavazi y col., 2014). La expresión del gen *Rho1* fue evaluada a dos tiempos diferentes para cada combinación cepa x temperatura, correspondientes a la mitad de la fase lineal y el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. El primero permite relacionar el crecimiento del hongo con la vía CWI, mientras que el segundo permite asociar dicha ruta con la producción de micotoxinas, que por ser metabolitos secundarios son producidos en esta última fase.

Las cepas de *Alternaria* evaluadas mostraron un mayor nivel de expresión de *Rho1* a las temperaturas más altas durante su fase lineal de crecimiento. Se ha reportado en bibliografía, para otras especies fúngicas, que un aumento de la temperatura de 15 °C a 37 °C causa una activación de la ruta CWI. Esto se debe a su interrelación con la vía de respuesta a estrés térmico mediante uno de los sensores de membrana de la vía CWI, capaz de detectar el cambio de temperatura y activar la cascada de CWI, que se relaciona lateralmente con la vía de respuesta a estrés térmico río abajo de *Rho1* (Fuchs y Mylonakis, 2009; Hayes y col., 2014; Levin, 2011). En el presente trabajo este efecto fue observado más marcadamente en *A. arborescens* gr.-esp., que presentó el mayor nivel de expresión a 35 °C en la etapa lineal de crecimiento.

En la fase estacionaria, el perfil de expresión de *Rho1* en función de la temperatura no mostró correlación con la producción de TeA por *A. arborescens* gr.-esp., lo cual indica que la temperatura no sería un factor vinculante entre ambas vías intracelulares. Datos de bibliografía muestran que la temperatura ejerce un efecto menos pronunciado sobre la síntesis de TeA, el cual es producido generalmente a niveles más elevados que otras micotoxinas de *Alternaria*, sugiriendo que la biosíntesis de este metabolito en la naturaleza sería igualmente importante bajo diferentes condiciones ambientales (Sanzani y col., 2016; Wojciechowska y col., 2014).

Por otro lado, para *A. tenuissima* gr.-esp., la expresión de *Rho1* en la fase estacionaria de crecimiento a 12 °C fue significativamente mayor que para el resto de las temperaturas. Notablemente, esta temperatura fue también la condición a la cual se detectó el mayor nivel de AME, sugiriendo que ambas vías podrían estar correlacionadas. La ruta biosintética de los alternarioles ha sido previamente asociada a otras vías de respuesta a estrés en *Alternaria*, tales como la vía HOG de respuesta a estrés osmótico y la vía PacC de respuesta a cambios en el pH del medio (Geisen y col., 2015; Graf y col., 2012). Bajo condiciones ambientales específicas, un incremento en los niveles de transcripción de estas vías se correspondió con la acumulación de mayores concentraciones de alternarioles. Los autores de estos trabajos justifican esta interacción debido a la actividad de los alternarioles en la naturaleza como factores de colonización, lo cual requiere que su biosíntesis esté finamente regulada. El resultado del presente trabajo constituye el primer indicio de correlación entre esta vía biosintética de

producción de micotoxinas y la vía de la integridad de la pared celular, CWI. El hecho de haber detectado esta correlación para una sola de las micotoxinas estudiadas no es llamativo, ya que se sabe que los mecanismos de respuesta no son universales; la misma ruta puede actuar de manera positiva para una determinada especie y micotoxina, y negativa, ya sea para otra especie y la misma toxina u otra micotoxina producida por la misma especie por una vía biosintética diferente (Geisen y col., 2017).

IV.4.3. Estudios de control biológico sobre *Alternaria* spp.

El estudio de estrategias de biocontrol amigables con el medio ambiente sobre *Alternaria* spp. se llevó a cabo en el presente trabajo en medios modelo simulando las condiciones del alimento. El uso de sistemas modelo simplificados es un paso previo necesario en este tipo de estudios porque permite aislar mecanismos, bajo condiciones altamente controladas, que de otro modo quedarían ocultos en los sistemas naturales (Crowther y col., 2017). Además, el uso de cepas provenientes del mismo sustrato en el que serán aplicados los tratamientos es importante ya que los organismos pueden haber adquirido mecanismos de adaptación a los ambientes que son capaces de colonizar. Por ejemplo, la diferente sensibilidad osmótica que presentan las cepas provenientes de vegetales o cereales indican que están pre-adaptadas de alguna manera a sus respectivos hábitats (Graf y col., 2012).

El estudio del efecto de antifúngicos naturales incluyó no sólo la evaluación de su efecto sobre el crecimiento fúngico, sino que abarcó también la producción de micotoxinas y los efectos sobre la ruta CWI mediante la metodología de RT-qPCR previamente optimizada. Este enfoque novedoso permite una mejor comprensión de la fisiología del hongo frente a un compuesto externo. Además, es importante tener presente que un efecto fungistático sobre el crecimiento puede ocasionar un incremento en la biosíntesis de micotoxinas, lo cual podría estar correlacionado con la activación de vías intracelulares de respuesta a estrés (Medina y col., 2017). Entonces, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, el impacto sobre la producción de micotoxinas es un factor clave a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas estrategias para el control de hongos contaminantes de alimentos.

IV.4.3.a.-Antifúngicos naturales para el control de *Alternaria* spp. en tomate

Los ensayos de biocontrol en el medio modelo a base de tomate fueron realizados a 12 °C utilizando las mismas dos cepas de *Alternaria* que en el estudio ecofisiológico previo. Esta temperatura fue seleccionada ya que es una de las más altas del rango normalmente utilizado en las cámaras de almacenamiento postcosecha de los frutos de tomate (7-12 °C), etapa en la

cual se aplicarían los agentes de control biológico en estudio. Además, en dicho estudio previo, se detectaron altas tasas de crecimiento y niveles de producción de micotoxinas para ambas cepas de *Alternaria* en temperaturas cercanas a 12 °C, lo cual indica que es muy importante un eficiente control del hongo bajo esta condición ambiental. Por último, es importante resaltar que a esta temperatura fue a la cual se detectó la correlación entre la sobreexpresión de la vía CWI y la acumulación de AME. Es entonces necesario asegurar que los antifúngicos propuestos para este alimento no causen la activación de la vía CWI, ya que esto podría ocasionar un incremento en la biosíntesis de dicha micotoxina.

Los primeros agentes de bajo impacto ambiental evaluados para el control de *Alternaria* spp. en tomate fueron dos cepas de *Debaryomyces hansenii*. Esta levadura es un agente biológico calificado como presuntamente seguro (QPS, del inglés “qualified presumption of safety”) según EFSA, por lo que puede ser utilizado en la industria alimentaria sin necesidad de ser evaluado individualmente (EFSA, 2017). Su actividad inhibitoria fue demostrada sobre especies de *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monilinia* y *Penicillium*, entre otros, en distintos alimentos de origen vegetal (Grzegorzczuk y col., 2017; Hernández-Montiel y col., 2010; Medina-Córdova y col., 2016). Las levaduras utilizadas en el presente estudio fueron originalmente aisladas de tomate, lo cual les otorga una ventaja adicional ya que están pre-adaptadas a ese ambiente. Entre las tres cepas disponibles que cumplían con esa condición, dos de ellas mostraron capacidad para disminuir el crecimiento de *Alternaria* spp. y fueron seleccionadas para su evaluación como potenciales agentes de control biológico.

La incubación en presencia de la cepa de *D. hansenii* 10552 produjo una reducción significativa de la velocidad de crecimiento y la acumulación de TeA por *A. arborescens* gr.-esp. En paralelo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen *Rho1* en ambas etapas de crecimiento evaluadas (lineal y estacionaria) sobre esta cepa. Con respecto a *A. tenuissima* gr.-esp., si bien los parámetros λ y $\mu_{\text{máx}}$ no mostraron diferencias con respecto al control en presencia de la levadura, se observó macroscópicamente reducción de la biomasa fúngica (Figura IV.11), aspecto que no se vio reflejado en la medición del diámetro como parámetro de crecimiento. En presencia de la levadura, *A. tenuissima* gr.-esp. no fue capaz de producir AME, mientras que esta toxina fue detectada en el control. Además, se observó una menor expresión del gen *Rho1* en la fase estacionaria, indicando que la vía CWI no fue activada en estas condiciones. Los resultados indican que el tratamiento con *D. hansenii* 10552 afecta el crecimiento y la acumulación de toxinas en ambas cepas de *Alternaria* spp., con lo cual es una estrategia promisoriosa para su aplicación en alimentos. Más aún, en ningún caso se detectó una

sobreexpresión de la vía CWI, lo cual representa una ventaja debido al riesgo sanitario que implica su interacción con la biosíntesis de los alternarioles.

En el caso del tratamiento con la cepa *D. hansenii* 10553, no se observaron diferencias en el crecimiento con respecto al control en *A. arborescens* gr.-esp. Además, en la fase lineal de crecimiento, se detectó una sobreexpresión significativa del gen *Rho1* en esta cepa. Este resultado parece indicar que la vía CWI se activa en *A. arborescens* gr.-esp. en presencia de la levadura, permitiéndole superar la presencia de este factor de estrés. Sin embargo, en la fase estacionaria no se detectaron cambios en la expresión de *Rho1* con respecto al control. Además, en esta última etapa se detectó una menor concentración de TeA, indicando que la presencia de la levadura en el medio afecta la producción de metabolitos secundarios en esta cepa. Se han reportado distintos mecanismos acerca de la capacidad de levaduras de reducir la concentración de micotoxinas sin afectar el crecimiento fúngico, incluyendo la adsorción en su pared celular y la producción de enzimas que las biotransformen en metabolitos derivados, entre otros (Binder, 2007; Gil-Serna y col., 2011; Pfliegler y col., 2015). Por otro lado, el efecto de esta cepa de *D. hansenii* sobre *A. tenuissima* gr.-esp. fue análogo al descrito con la cepa 10552 en cuanto al crecimiento, activación de la vía CWI en ambas fases de crecimiento y producción de AME.

La segunda estrategia de bajo impacto ambiental evaluada para el control de *Alternaria* spp. en tomate fue el péptido antifúngico PgAFP. Este compuesto presenta un mecanismo de acción que involucra cambios en proteínas asociadas a la pared celular, tal como se describió anteriormente. Un estudio previo evaluó el efecto de este compuesto sobre el crecimiento de 38 especies fúngicas micotoxigénicas, contaminantes frecuentes de alimentos, las cuales mostraron diferentes niveles de sensibilidad a este tratamiento (Delgado y col., 2015a). Sin embargo, el efecto de este péptido sobre la acumulación de micotoxinas o sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. no se había investigado hasta el momento.

Las concentraciones de PgAFP ensayadas no afectaron significativamente el crecimiento de *Alternaria* spp. en medio a base de tomate, excepto por una ligera reducción observada para *A. arborescens* gr.-esp. con 10 µg/mL de PgAFP. Sin embargo, la vía CWI no fue sobreexpresada en la fase lineal de crecimiento de ninguna de las dos cepas estudiadas en presencia de cualquiera de las concentraciones de PgAFP (10 y 40 µg/mL). Una posible explicación sería que no es esta ruta que se activa como respuesta fúngica a la presencia del péptido en el medio. Algunos estudios reportaron que en especies del género *Aspergillus*, la vía CWI no es el único mecanismo compensatorio para reparar daños en la pared celular, sino que algunos péptidos antifúngicos activan la ruta de señalización de Ca²⁺/calcineurina, que culmina en un incremento de la síntesis de quitina (Fiedler y col., 2014). Otra posible explicación podría estar relacionada a la influencia

de la matriz, ya que en el estudio previo en CPD se observó una inhibición en el crecimiento de estas cepas de *Alternaria* por el péptido, la cual no se mantuvo en el medio a base de tomate. Entre las distintas características de la matriz, el pH es un parámetro que podría afectar la efectividad del tratamiento. Delgado y col. (2015a) mostraron que la actividad de PgAFP se mantenía estable en un rango muy amplio de pH (1-12), por lo cual la escasa efectividad no podría atribuirse a posibles degradaciones del péptido o inhibición de la actividad debido al ambiente ácido del APT. Es posible, sin embargo, que en condiciones ácidas, otra ruta intracelular prevalezca sobre CWI y le permita al hongo sobrellevar el estrés causado por PgAFP, sin incidir significativamente sobre su crecimiento. Se ha reportado en la bibliografía que la vía de señalización regulada por el factor de transcripción *PacC* está directamente asociada a la activación y/o represión de genes en función del pH ambiental, lo cual influye sobre el crecimiento, fisiología, procesos de diferenciación y patogenicidad en hongos filamentosos (Peñalva y col., 2008; Soares y col., 2014).

En cambio, la presencia de PgAFP ocasionó una disminución en la acumulación de micotoxinas. AME se redujo significativamente a ambos niveles del péptido, mientras que la concentración de TeA fue menor sólo en las placas con 10 µg/mL de PgAFP. Además, el péptido no ocasionó un incremento en la expresión de la vía CWI en la fase estacionaria en ningún caso, al igual que se observó en presencia de la levadura *D. hansenii* 10552. Si bien existen estudios recientes acerca de péptidos antifúngicos como una herramienta promisorio para el control de hongos no deseados (patógenos o contaminantes), hasta el momento no se cuenta en la bibliografía con trabajos acerca de la influencia de este tipo de compuestos sobre la producción de toxinas por especies de hongos micotoxigénicas, o su mecanismo de acción. El presente trabajo constituye el primer estudio que relaciona una reducción en la acumulación de micotoxinas con la presencia de un péptido antifúngico en el medio.

Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento y la acumulación de micotoxinas para ambas cepas de *Alternaria* estudiadas frente a los distintos agentes de biocontrol en medio a base de tomate se encuentran resumidos en la Tabla IV.9.

Tabla IV.9: Porcentajes de inhibición sobre la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y la acumulación de toxinas por *Alternaria arborescens* gr.-esp. y *A. tenuissima* gr.-esp. en agar pulpa de tomate (APT), a 12 °C frente a diferentes tratamientos de control biológico, con respecto a los correspondientes controles.

Tratamiento	<i>A. arborescens</i> gr.-esp.		<i>A. tenuissima</i> gr.-esp.	
	$\mu_{\text{máx}}$	TeA	$\mu_{\text{máx}}$	AME
<i>D. hansenii</i> 10552	34	88	-*	100
<i>D. hansenii</i> 10553	-	86	-*	100
PgAFP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	23	27	-	58
PgAFP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	-	-	92

TeA: ácido tenuazónico; AME: alternariol monometil éter

-: no significativamente diferente al correspondiente control

*: menor biomasa fúngica en la placa

Ambos tipos de tratamientos evaluados mostraron ser efectivos en la disminución de la acumulación de dos de las toxinas más importantes de *Alternaria* spp., cuya producción se da por vías biosintéticas diferentes. Este efecto reductor es un resultado que reviste de gran importancia teniendo en cuenta que, como se mencionó anteriormente, no se puede asegurar una disminución de la producción de micotoxinas frente a un agente con efectos fungistáticos. Esta reducción fue incluso más pronunciada en presencia de cualquiera de las cepas de *D. hansenii* que del péptido PgAFP. Si bien no se dispone de bibliografía acerca de la influencia de péptidos antifúngicos sobre *Alternaria* spp., es frecuente encontrar estudios sobre control biológico con levaduras orientados únicamente a reducir el crecimiento de *Alternaria* spp. en etapa postcosecha, pero no de sus toxinas (Huang y col., 2015; Pfliegler y col., 2015; Yan y col., 2014; Zhang y col., 2015). Otras cepas de *D. hansenii* han sido evaluadas con éxito frente a otras micotoxinas, como fumonisinas por *Fusarium subglutinans* y ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae* (Gil-Serna y col., 2011; Medina-Córdova y col., 2016), pero este es el primer estudio en el que se evalúan frente a toxinas de *Alternaria* spp. Más aún, esta inhibición ocurrió a un valor de temperatura utilizado en las cámaras de almacenamiento de tomate, lo cual resulta promisorio para su aplicación en las mismas. Además, dicha levadura no ocasionó en ningún caso una sobreexpresión de la vía CWI, lo cual es importante desde el punto de vista sanitario teniendo en cuenta su vinculación con la biosíntesis de los alternariolos. Por todo lo expuesto, el tratamiento más efectivo se consiguió en presencia de *D. hansenii* 10552, la cual constituye la mejor estrategia para evaluar *in vivo* en frutos de tomate destinados a industrialización.

IV.4.3.b.-Comparación de antifúngicos para el control de *Alternaria* spp. en trigo

Para el control de *Alternaria* spp. en un medio modelo a base de trigo, se compararon dos tratamientos diferentes, uno de origen natural y otro de origen sintético. El antifúngico natural fue el péptido PgAFP producido por *P. chrysogenum*, previamente descrito. Este tratamiento fue aplicado en medio a base de trigo a 10 µg/mL, teniendo en cuenta que un incremento en su concentración no implicó mayores inhibiciones del crecimiento de *Alternaria* en CPD a 25 °C ni en APT a 12 °C. El antifúngico comercial utilizado fue CELEST XL[®], un fungicida de amplio espectro comercializado en España y aprobado en Argentina para el tratamiento de semillas bajo el nombre comercial MAXIM[®]. Sus compuestos activos son fludioxonil (fenilpirrol) y metalaxil-M (fenilamida), con diferentes mecanismos de acción. Fludioxonil inhibe la germinación de esporas, la elongación del tubo germinal, el crecimiento micelial y también induce distorsiones del tubo germinal y estallido de células (Avenot y Michailides, 2015; Kanetis y col., 2008; Rosslénbroich y Stuebler, 2000); mientras que el mecanismo primario de acción de metalaxil-M implica la alteración de la biosíntesis de ARN fúngico, con un efecto concomitante sobre la mitosis (Barak y col., 1984; Fisher y Hayes, 1982). Su eficacia en la reducción del crecimiento de *Alternaria* de esporas pequeñas ha sido descrita previamente (Barak y col., 1984; da Cruz Cabral y col., 2012; Malandrakis y col., 2015), aunque Avenot y Michailides (2015) reportaron la resistencia a fludioxonil en otra especie de *Alternaria*, *A. brassicicola*. En el presente trabajo, el nivel aplicado de CELEST XL[®] (0,5 µg/mL) fue el máximo al cual se observó desarrollo fúngico, niveles superiores resultaron fungicidas. De acuerdo a datos de bibliografía, las dosis efectivas de los antifúngicos naturales suelen ser mayores que las equivalentes de sus análogos sintéticos.

En base al rango de a_w reportado para el crecimiento de *Alternaria* de esporas pequeñas, los niveles elegidos para el presente estudio fueron seleccionados como condiciones que representan estrés hídrico intermedio (0,95) y mayor disponibilidad de agua (0,98) (Patriarca y col., 2014). Estas condiciones corresponden además a diferentes estadios durante la maduración del grano de trigo, que abarca etapas de humedad intermedia, como la floración, fase en la que la infección fúngica, principalmente por *Alternaria* y *Fusarium*, puede ocurrir.

Trabajos previos sobre la ecofisiología de *A. tenuissima* gr.-esp. en medio a base de trigo (Patriarca y col., 2014) mostraron que la misma es capaz de desarrollar tanto a 0,98 como a 0,95 a_w , y que las condiciones óptimas para su desarrollo están entre 25 y 30 °C para ambas a_w . La evaluación de la efectividad de los tratamientos antifúngicos se realizó a 25 °C por ser esta una temperatura cercana a la óptima, es decir, el peor escenario en cuanto al riesgo de colonización.

El nivel de a_w influyó en el crecimiento y producción de micotoxinas por *A. tenuissima* gr.-esp. Tal como se encuentra reportado en bibliografía, ambos parámetros disminuyeron al bajar la a_w (Magan y col., 1984; Sanchis y Magan 2004, Vaquera y col., 2014; 2016; Young y col., 1980). Este efecto fue más pronunciado sobre los alternarios que sobre TeA, que nuevamente mostró una respuesta menos marcada frente a un cambio en las condiciones ambientales. AOH no fue detectado en ningún caso a 0,95 a_w , mientras que AME se detectó en muy bajo nivel y sólo en ausencia de los antifúngicos. Los trabajos de Sanzani y col. (2016) y Graf y col. (2012) muestran que la actividad de agua tiene un efecto reductor muy fuerte sobre la biosíntesis de AOH/AME. Ambos antifúngicos evaluados en el presente estudio mostraron ser efectivos en la reducción del crecimiento de *A. tenuissima* gr.-esp. El efecto de PgAFP sobre el desarrollo fue diferente a cada nivel de a_w ; a 0,95 ocasionó un significativo incremento en la fase de latencia, mientras que a 0,98 el efecto más notorio se observó en la disminución de la velocidad de crecimiento. Estos resultados sugieren que la acción de PgAFP estaría mediada por mecanismos intracelulares diferentes en función de la condición hídrica del medio. Además, se observó una subexpresión del gen *Rho1* en la fase lineal de crecimiento en presencia del péptido a ambas a_w , lo que indica que PgAFP estaría ocasionando una inhibición de la vía CWI. En estudios previos, se ha reportado que algunos compuestos que inhiben el desarrollo fúngico, como tioridazina y curcumina, son capaces de interferir con la respuesta de la vía CWI, ocasionando menores niveles de expresión de los genes asociados a dicha ruta (Jabes y col., 2016; Kumar y col., 2014).

En cuanto a la biosíntesis de micotoxinas por *A. tenuissima* gr.-esp. en WA, a 0,98 a_w la presencia de PgAFP ocasionó una considerable reducción en la concentración de las tres toxinas estudiadas. A 0,95 a_w , la acumulación de TeA también fue menor en las placas tratadas, mientras que AOH no fue detectado en ningún caso (control o tratamiento) y AME solamente en el control, pero no en presencia de PgAFP. Este último resultado indica que esta a_w no resulta completamente restrictiva para la biosíntesis de los alternarios, por lo que PgAFP tendría un efecto inhibitorio sobre esta vía de síntesis. Además, no se detectaron diferencias en la expresión de *Rho1* entre el control y PgAFP a ambas a_w en la fase estacionaria.

Por otro lado, el tratamiento con el antifúngico comercial CELEST XL® produjo menores tasas de crecimiento que el control a ambas a_w evaluadas, similares a las obtenidas en presencia de PgAFP. Con respecto a la expresión del gen *Rho1*, se obtuvieron menores valores en las placas con CELEST XL® en la fase de crecimiento lineal a ambas condiciones de a_w , indicando que el hongo no fue capaz de activar la vía CWI para superar el estrés causado por la presencia del antifúngico en el medio. Al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, esta subexpresión de *Rho1* se mantuvo a 0,95 a_w , condición a la cual se detectó una menor concentración de TeA que

en el control, mientras que AOH y AME no fueron detectados. En cambio, a 0,98 a_w se observó una sobreexpresión de *Rho1* en la etapa estacionaria. Se ha propuesto que el compuesto fludioxonil, uno de los compuestos activos de CELEST XL[®], es capaz de activar la vía CWI en *Cryptococcus neoformans* (Hayes y col., 2014; Kojima y col., 2006). Más aún, el tratamiento con el antifúngico comercial a 0,98 a_w no produjo reducciones en la acumulación de ninguna de las tres micotoxinas estudiadas. Mientras que TeA y AOH no mostraron diferencias significativas con respecto al control, AME se detectó en concentraciones mayores en presencia del antifúngico. Este resultado apoya la hipótesis previamente descrita de que la vía CWI y la ruta biosintética de los alternarioles estarían relacionadas, teniendo en cuenta que en la fase estacionaria se detectó una sobreexpresión de *Rho1* y una mayor acumulación de AME.

Teniendo en consideración todos los resultados obtenidos en medio a base de trigo, se observa que la aplicación de ambos antifúngicos evaluados produjo un efecto fungistático similar sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. Sin embargo, hay que tener presente que el péptido PgAFP es de origen natural, por lo tanto su aplicación a campo implicaría un bajo impacto a nivel ambiental, lo cual le confiere una ventaja sobre el fungicida comercial CELEST XL[®]. Más aún, la presencia de PgAFP produjo reducciones significativas en la acumulación de micotoxinas de *Alternaria* spp., mientras que con CELEST XL[®] este efecto no fue observado. Como se mencionó anteriormente, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, la disminución de la acumulación de micotoxinas en los alimentos es un punto clave en el desarrollo de antifúngicos que no siempre es tenido en cuenta en los estudios reportados en bibliografía. Por todo esto, la aplicación del péptido PgAFP sería una estrategia natural promisorio para su aplicación en trigo para el control de *Alternaria* spp.

IV.4.4. Consideraciones finales

El hecho de haber detectado diferente efectividad sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. en el tratamiento con PgAFP en ambas matrices estudiadas (tomate y trigo) no es sorprendente. Tanto el mecanismo de acción como la efectividad de cada tratamiento son dependientes de diferentes factores, incluyendo la naturaleza del sustrato. Un estudio reciente mostró que la efectividad en la reducción del crecimiento de *Aspergillus flavus* por este mismo péptido PgAFP es diferente en función de la matriz, mostrando mayores efectos inhibitorios del crecimiento en carne que en queso debido a la presencia de Ca²⁺ en este último, lo cual favorece el desarrollo de un mecanismo compensatorio en el hongo que le permite sobreponerse al factor de estrés (Delgado y col., 2017).

En el presente trabajo se demostró la interacción entre la vía CWI y la biosíntesis de los alternarioles. Los resultados obtenidos permiten afirmar que dicha relación se manifiesta a 0,98 a_w a distintos niveles de temperatura y pH (12 °C, pH 4,3 y 25 °C, pH 5,5), pero no al disminuir la a_w . Este hecho parece razonable desde un punto de vista biológico teniendo en cuenta el rol de estas micotoxinas en la naturaleza como factores de colonización de vegetales. La biosíntesis de AOH/AME representa un esfuerzo energético para el hongo, por lo cual se producen solamente en condiciones externas que señalan un posible ambiente a colonizar (alta a_w), mientras que no se sintetizan en condiciones de a_w reducidas, asociadas a condiciones de ambientes secos. Esta regulación se logra mediante la influencia de diferentes vías de señalización sobre la síntesis de los alternarioles, incluyendo las previamente descritas HOG y PacC (Geisen y col., 2015; Graf y col., 2012) y la CWI, de acuerdo con los resultados del presente estudio.

IV.4.5. Perspectivas futuras

De acuerdo a los resultados del presente trabajo de Tesis se justifican futuros estudios para evaluar la aplicación *in vivo* de las estrategias de control más efectivas, la levadura *D. hansenii* 10552 en tomate destinado a industrialización y el péptido antifúngico PgAFP en trigo. Ambos tratamientos son muy prometedores debido principalmente a su efecto en la reducción de la acumulación de las micotoxinas de *Alternaria* spp. En los ensayos *in vivo* se deberá evaluar su aptitud en condiciones naturales, teniendo en cuenta la interacción con el resto de la microbiota presente en estos alimentos, su combinación con otras estrategias de bajo impacto ambiental (tecnologías de barrera) y sus efectos sobre los caracteres organolépticos de los alimentos, entre otros.

V. CONCLUSIONES



V.I. Conclusiones específicas

- En los cuatro alimentos de Argentina estudiados (arándano, pimiento, tomate y trigo) se hallaron sólo cepas de *Alternaria* del grupo de esporas pequeñas, pertenecientes a cuatro grupos-especie según Simmons (2007): *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*.
- La utilización de caracteres morfológicos como única herramienta taxonómica no resultó suficiente para identificar unívocamente los grupos-especie del género *Alternaria* de los alimentos estudiados.
- Las diferencias morfológicas observadas entre los grupos-especie *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. tenuissima* corresponderían a la plasticidad fenotípica propia de estos individuos y no estuvieron soportadas por el concepto filogenético de especie.
- Se logró asignar un perfil específico de producción de metabolitos secundarios para el grupo-especie *A. infectoria*, lo cual permitió diferenciarlo claramente del resto de los grupos de esporas pequeñas frecuentes en alimentos.
- El perfil metabolómico no sería una herramienta taxonómica útil para discriminar los aislamientos de los grupos-especie *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. tenuissima* entre sí.
- No se observaron señales de aislamiento geográfico entre las secuencias de ADN analizadas de distintas regiones, lo que podría implicar una dispersión muy reciente alrededor del mundo, probablemente asociada al intercambio comercial.
- Los resultados del presente estudio coinciden con la nueva organización del género *Alternaria* propuesta por Lawrence y col. (2016), dado el alto nivel de semejanza hallado entre los grupos-especie de la sección *Alternaria*.
- Los aislamientos contaminantes de alimentos en Argentina pertenecen a dos secciones de la nueva organización: secc. *Alternaria* y secc. *Infectoriae*.
- Se propone el agregado de características adicionales para contribuir con la diferenciación de las secciones *Alternaria* e *Infectoriae*: el aspecto macroscópico de la colonia en el medio DRYES y la producción de metabolitos específicos de sección.

- La identificación a nivel de sección *Alternaria* es suficiente a fin de predecir el riesgo toxicológico asociado a un alimento contaminado con estos microorganismos, debido a que los perfiles de producción de metabolitos secundarios son similares entre los miembros de esta sección.
- No se detectaron segregaciones por sustrato entre los aislamientos de la sección *Alternaria* en cuanto a su capacidad de producción de metabolitos o sus relaciones filogenéticas, lo que implica un riesgo toxicológico equivalente para todos los alimentos estudiados.
- El potencial micotoxigénico de los aislamientos de la sección *Alternaria* de alimentos cultivados en Argentina es muy elevado.
- La frecuente detección de algunos metabolitos, como PyrA, ACR-A y ATL, para los cuales no se dispone de datos en alimentos, representa un riesgo potencial y deberían ser incluidos en futuros estudios toxicológicos y de contaminación de alimentos.
- Se detectó por primera vez en Argentina la incidencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. (TeA, AOH y AME) en pimientos.
- Los datos de contaminación de pimientos con micotoxinas de *Alternaria* spp. contribuyen con la información necesaria para establecer límites regulatorios a nivel internacional, de acuerdo a los últimos informes de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA 2011; 2016).
- La técnica de RT-qPCR basada en el gen *Rho1* es una estrategia metodológica sencilla y robusta para estudiar cambios en la expresión de la ruta CWI en hongos filamentosos frente a distintas condiciones externas.
- El estudio de la ruta CWI en *Alternaria* spp., realizado por primera vez en este trabajo, mostró que la temperatura tiene influencia en dicha vía.
- La vía CWI estaría vinculada con la ruta biosintética de los alternarioles en condiciones de alta actividad de agua, a distintas temperaturas y valores de pH.
- La cepa de *D. hansenii* 10552 es un agente de biocontrol prometedor para su aplicación *in vivo* en la etapa postcosecha de tomate destinado a industrialización, por su eficaz inhibición sobre la producción de micotoxinas en los frutos.

- El péptido antifúngico PgAFP podría ser utilizado en trigo como estrategia de control de bajo impacto ambiental para reducir el desarrollo y la acumulación de micotoxinas de *Alternaria* spp. en este alimento.

V.II. Conclusión general

El grupo de *Alternaria* de esporas pequeñas está ampliamente distribuido en diversos cultivos de Argentina, incluyendo cereales y productos frutihortícolas. Los aislamientos hallados en mayor frecuencia demostraron una elevada capacidad micotoxigénica, por lo cual el riesgo toxicológico asociado es elevado. Si bien el consumo de frutos visiblemente contaminados con hongos es poco probable, existe un alto riesgo sanitario cuando éstos se destinan a industrialización, ya que dichos metabolitos no se destruyen con tratamientos térmicos convencionales. La utilización de estrategias de control con agentes de bajo impacto ambiental, como levaduras o péptidos antifúngicos, presentó resultados prometedores para su aplicación en alimentos como tomate y trigo. Su efectividad fue demostrada en cuanto a la reducción del crecimiento fúngico y la acumulación de micotoxinas de *Alternaria* spp.

Del presente trabajo de Tesis surgieron las siguientes publicaciones:

- 1) "Detection of changes in mould cell wall stress-related gene expression by a novel reverse transcription real-time PCR method". da Cruz Cabral, L.; Delgado, J.; Andrade, M.J.; Rodríguez, M.; Rodríguez, A. Enviado a International Journal of Food Microbiology, noviembre 2017.
- 2) "Characterization of small-spored *Alternaria* from Argentinean crops through a polyphasic approach" (2017). da Cruz Cabral, L.; Rodriguero, M.; Stenglein, S.; Nielsen, K. F.; Patriarca, A. International Journal of Food Microbiology, 257, 206-215.
- 3) "Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers" (2016). da Cruz Cabral, L.; Terminiello, L.; Fernández Pinto, V.; Nielsen, K. F.; Patriarca, A. International Journal of Food Microbiology, 236, 155-160.

VI. BIBLIOGRAFÍA



- ABC, 2017. Argentinean Blueberry Committee. <http://www.argblueberry.com> (último acceso diciembre 2017).
- Abd El-Aal, S. S., 1997. Effect of gamma radiation, temperature and water activity on the production of *Alternaria* mycotoxins. *Egyptian Journal of Microbiology* 32: 379-396.
- Ackermann, Y., Curtui, V., Dietrich, R., Gross, M., Latif, H., Märtlbauer, E., Usleber, E., 2011. Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6360-6368.
- Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Martín, A., Núñez, F., Asensio, M.A., 2009. Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 135, 39-46.
- Alfaro, M.E., Zoller, S., Lutzoni, F., 2003. Bayes or bootstrap? A simulation studying comparing the performance of Bayesian markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 2, 255–266.
- Aliferis, K.A., Cubeta, M.A., Jabaji, S., 2013. Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling. *Metabolomics* 9, 159-169.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, G., 2008. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 126, 13-19.
- Andersen, B., Dongo, A., Pryor, B.M., 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological research* 112, 241-250.
- Andersen, B., Frisvad, J.C., 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7507-7513.
- Andersen, B., Hansen, M.E., Smedsgaard, J., 2005. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology* 95, 1021–1029.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G., 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105, 291-299.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G., 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* 106, 170-182.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., 2015. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology* 196, 1-10.
- Andersen, B., Sørensen, J.L., Nielsen, K.F., van den Ende, B.G., de Hoog, S., 2009. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology* 46, 642-656.
- Andrew, M., Peever, T.L., Pryor, B.M., 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia* 101 (1), 95-109.
- Aresta, A., Cioffi, N., Palmisano, F., Zambonin, C.G., 2003. Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5232-5237.
- Argerich, C., 2017. Estado de la producción mundial del tomate para industria. IV Encuentro Argentino del tomate. San Juan, Argentina. Disponible en: [http://www.tomate-argentino.com.ar/Presentaciones/Estado %20Produccion%20Mundial.pdf](http://www.tomate-argentino.com.ar/Presentaciones/Estado%20Produccion%20Mundial.pdf)
- Arkive, 2018. Banco de imágenes. <https://www.arkive.org/common-wheat/triticum-aestivum/image-G122037.html>

- Armitage, A.D., Barbara, D.J., Harrison, R.J., Lane, C.R., Sreenivasaprasad, S., Woodhall, J.W., Clarkson, J.P., 2015. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal Biology* 119, 994-1006.
- Asam, S., Konitzer, K., Rychlik, M., 2011. Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. *Mycotoxin Research* 27, 23-28.
- Asam, S., Rychlik, M., 2013. Potential health hazards due to the occurrence of the mycotoxin tenuazonic acid in infant food. *European Food Research and Technology* 236, 491-497.
- Avenot, H. F., Michailides, T. J., 2015. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. *Crop Protection*, 78, 214-221.
- Azcárate, M.P., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., 2008. *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection* 71, 1262-1265.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Barak, E., Edgington, L., Ripley, B., 1984. Bioactivity of the fungicide metalaxyl in potato tubers against some species of *Phytophthora*, *Fusarium*, and *Alternaria*, related to polyphenoloxidase activity. *Canadian Journal of Plant Pathology* 6, 304-308.
- Barkai-Golan, R., Paster, N., 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin Journal* 1, 147-159.
- Barros, G.G., Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Chulze, S.N., 2011. Safety aspects in soybean food and feed chains: fungal and mycotoxins contamination, Soybean-biochemistry, chemistry and physiology. InTech Open, 7-20.
- Basílico, M.L.Z., Pose, G., Ludemann, V., Pinto, V.E.F., Aríngoli, E.E., Ritieni, A., Basílico, J.C., 2010. Fungal diversity and natural occurrence of fusaproliferin, beauvericin, deoxynivalenol and nivalenol in wheat cultivated in Santa Fe Province, Argentina. *Mycotoxin Research* 26, 85-91.
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Hajlaoui, M.R., Bacha, H., Lemaire, C., 2012. Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicology in vitro* 26, 915-923.
- Bensassi, F., Zid, M., Rhouma, A., Bacha, H., Hajlaoui, M.R., 2009. First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. *Annals of microbiology* 59, 465-467.
- Bhatnagar, D., Rajasekaran, K., Payne, G., Brown, R., Yu, J., Cleveland, T., 2008. The 'omics' tools: genomics, proteomics, metabolomics and their potential for solving the aflatoxin contamination problem. *World Mycotoxin Journal* 1, 3-12.
- Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal feed science and technology* 133, 149-166.
- Binder, U., Bencina, M., Eigentler, A., Meyer, V., Marx, F., 2011. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP NN5353 activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiology* 11: 209, 1-13.
- Blandino, M., Scarpino, V., Sulyok, M., Krska, R., Reyneri, A., 2017. Effect of agronomic programmes with different susceptibility to deoxynivalenol risk on emerging contamination in winter wheat. *European Journal of Agronomy* 85, 12-24.
- BLAST, 2015. Base de datos de secuencias de nucleótidos de GenBank, NCBI, NIH. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Bock, C.H., Thrall, P.H., Burdon, J.J., 2005. Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. *Mycological Research* 109, 227-236.

Botanga, C.J., Bethke, G., Chen, Z., Gallie, D.R., Fiehn, O., Glazebrook, J., 2012. Metabolite profiling of *Arabidopsis* inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 1628-1638.

Bottalico, A., Logrieco, A., 1998. Toxicogenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 65, 108.

Bresler, G., Brizzio, S.B., Vaamonde, G., 1995. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 25, 101-108.

Broggi, L., Reynoso, C., Resnik, S., Martinez, F., Drunday, V., Bernal, Á.R., 2013. Occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages from the Entre Rios Province market, Argentina. *Mycotoxin Research* 29, 17-22.

Broggi, L.E., González, H.H.L., Resnik, S.L., Pacin, A., 2007. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Rios, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología* 24, 47.

Cai, L., Hyde, K., Taylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M., Zhang, J., Yang, Y., Phoulivong, S., Liu, Z., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39, 183-204.

Canada-BC Agri-Innovation Program, 2018. Guía para la identificación de desórdenes en arándanos. <http://bb.bluesticker.com/alternaria-fruit-rot/> (último acceso enero 2018).

Cantwell, M., 1996. Bell pepper: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Center, University of California. Disponible en: http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Vegetables_English/?uid=5&ds=799.

Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J., 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.

Chełkowski, J., Visconti, A., 1992. *Alternaria: Biology, Plant Diseases, and Metabolites* (Vol. 3). Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Chou, H.-H., Wu, W.-S., 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological research* 106, 164-169.

Christensen, K.B., Van Klink, J.W., Weavers, R.T., Larsen, T.O., Andersen, B., Phipps, R.K., 2005. Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9431-9435.

Chulze, S.N., Torres, A.M., Dalcero, A.M., Etcheverry, M.G., Ramirez, M.L., Farnochi, M.C., 1995. *Alternaria* mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of the toxins in oil and meal. *Journal of food protection* 58, 1133-1134.

Chung, I.-M., Ju, H.-J., Sim, S.-C., Paik, S.-B., Yu, S.-H., 1998. Agriculture: survey and control of the occurrence of mycotoxins from postharvest vegetables in Korea (2) detection of major mycotoxins from diseased spice vegetables (onions, garlics and peppers). *Analytical Science and Technology* 11, 206-206.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.

Copati, E., Brihet, J., 2015. El cultivo de trigo en Argentina. Bolsa de cereales. Disponible en: http://www.bolsadecereales.com/imagenes/retaa/201608/2015/Mesa_institucional_CABC_y_Acopiados_res_-_ReTAA_PAS_BC_031115.pdf

Cota, B.B., Rosa, L.H., Caligiorne, R.B., Rabello, A.L.T., Almeida Alves, T.M., Rosa, C.A., Zani, C.L., 2008. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters* 285, 177-182.

Crowther, T.W., Boddy, L., Maynard, D.S., 2017. The use of artificial media in fungal ecology. *Fungal Ecology*. En prensa.

da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., 2016. Control of infection of tomato fruits by *Alternaria* and mycotoxin production using plant extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 145(2), 363-373.

da Cruz Cabral, L., Patriarca, A., Sánchez, M., 2012. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos de 'Eucaliptus' contra *Alternaria*. III Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano: Diversidad Química y Biológica, Punta Arenas, Chile, p. 58.

da Motta, S., Valente Soares, L.M., 2001. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives & Contaminants* 18, 630-634.

Da Rocha Rosa, C., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M., Rekson, A.D.O., Magnoli, C., Dalcero, A.M., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives & Contaminants* 19, 408-414.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772-772.

Del Rio, M.G., Klasmer, P., Lanteri, A.A., 2010. Gorgojos (Coleoptera: Curculionidae) perjudiciales para "frutos rojos" en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69, 101-110.

Delgado, J., Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Bermúdez, E., Núñez, F., Asensio, M.A., 2015a. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology* 205, 23-29.

Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F., 2015b. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 8701-8715.

Delgado, J., Owens, R. A., Doyle, S., Asensio, M. A., Núñez, F., 2016a. Increased chitin biosynthesis contributes to the resistance of *Penicillium polonicum* against the antifungal protein PgAFP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 371-383.

Delgado, J., Owens, R. A., Doyle, S., Núñez, F., Asensio, M. A., 2017. Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. *Food Microbiology*, 66, 1-10.

Delgado, J., Peromingo, B., Núñez, F., Asensio, M.A., 2016b. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion in Food Science* 11, 40-45.

Delgado, T., Gómez-Cordovés, C., 1998. Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *Journal of Chromatography A* 815, 93-97.

Dembinska-Kiec, A., Mykkänen, O., Kiec-Wilk, B., Mykkänen, H., 2008. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition* 99, ES109-ES117.

Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F., Wagener, J., 2012. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular Microbiology* 83, 506-519.

Dichtl, K., Samantaray, S., Wagener, J., 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cellular Microbiology* 18, 1228-1238.

Dobra, C., Sosa, M., Lutz, M., Rodriguez, G., Greslebin, A., Vélez, M., 2010. Fruit rot caused by *Phytophthora* sp. in cold-stored pears in the valley of Rio Negro and Neuquén, Argentina, XI International Pear Symposium 909, 505-510.

Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F., Douzery, E.J.P., 2003. Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap Measures of Phylogenetic Reliability. *Molecular Biology and Evolution* 20, 248-254.

Edirisinghe, M., Ali, A., Maqbool, M., Alderson, P., 2014. Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. *Journal of Food Science and Technology* 51, 4078-4083.

EFSA, 2011. Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Cravedi, J., Di Domenico, A., Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9, 2407-2504.

EFSA, 2016. Arcella, D., Eskola, M., Gómez Ruiz, J.A. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal* 14 (12): 4654.

EFSA, 2017. Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Koutsoumanis, K., Herman, L., Lindqvist, R., Nørrung, B. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. *EFSA Journal* 15 (3): 4663.

Elliott, J.A., 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany*, 439-476.

Ellis, M.B., 1971. Dematiaceous *Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Londres, Reino Unido.

Ellis, M. B., 1976. More dematiaceous *Hypomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Londres, Reino Unido.

EPPO, 2018. List of pests recommended for regulation as quarantine pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization. <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA1.htm> (último acceso enero 2018).

Estiarte, N., Lawrence, C., Sanchis, V., Ramos, A., Crespo-Sempere, A., 2016. LaeA and VeA are involved in growth morphology, asexual development, and mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *International Journal of Food Microbiology* 238, 153-164.

FAOSTAT, 2017. FAO Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (último acceso diciembre 2017).

Fente, C.A., Jaimez, J., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., 1998. Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst* 123, 2277-2280.

Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., Tadeo, J. L., 2010. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.

Fiedler, M.R., Lorenz, A., Nitsche, B.M., van den Hondel, C.A., Ram, A.F., Meyer, V., 2014. The capacity of *Aspergillus niger* to sense and respond to cell wall stress requires at least three transcription factors: RlmA, MsnA and CrzA. *Fungal Biology and Biotechnology* 1: 5, 1-16.

Fisher, D. J., Hayes, A. L., 1982. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pest Management Science*, 13(3), 330-339.

Fleck, S.C., Burkhardt, B., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2012. *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters* 214, 27-32.

Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C., Barraclough, T.G., 2007. Independently Evolving Species in Asexual Bdelloid Rotifers. *PLOS Biology* 5, e87.

Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M., Antonissen, G., 2017. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins* 9 (7), 228, 1-30.

Frisvad, J., Filtenborg, O., Samson, R., Stolk, A., 1990. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 57, 179-189.

- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U., 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research* 112, 231-240.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Dalsgaard, P.W., Seifert, K.A., Louis-Seize, G., Lyhne, E.K., Jarvis, B.B., Fettingner, J.C., Overy, D.P., 2006. Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1427-1437.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F., Ehrlich, K., Samson, R., 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology* 59, 31-37.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49, 1-174.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 49, 201-241.
- Fuchs, B.B., Mylonakis, E., 2009. Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryotic Cell* 8, 1616-1625.
- Gambacorta, L., Magistà, D., Perrone, G., Murgolo, S., Logrieco, A.F., Solfrizzo, M., 2018. Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. *World Mycotoxin Journal*, en prensa.
- Gannibal, P.B., 2015. Distribution of *Alternaria* species among sections. 2. Section *Alternaria*. *Mycotaxon* 130, 941-949.
- Gannibal P. B., Lawrence D. P., 2016. Distribution of *Alternaria* species among sections. 3. Sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria*. *Mycotaxon* 131, 781-790.
- Gannibal, P.B., Orina, A.S., Mironenko, N.V., Levitin, M.M., 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology* 139, 609-623.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology* 26, 757-769.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., Díaz, J., 2015. Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology* 176, 202-209.
- Geiseler, O., Podlech, J., 2012. Total synthesis of infectopyrone, aplysiopsenes A–C, ent-aplysiopene D, phomapyrones A and D, 8, 9-dehydroxylarone, and nectriapyrone. *Tetrahedron* 68, 7280-7287.
- Geisen, R., Graf, E., Schmidt-Heydt, M., 2015. HogA and PacC regulated alternariol biosynthesis by *Alternaria alternata* is important for successful substrate colonization. *Acta Horticulturae* 1144, 141-148.
- Geisen, R., Touhami, N., Schmidt-Heydt, M., 2017. Mycotoxins as adaptation factors to food related environments. *Current Opinion in Food Science* 17, 1-8.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2011. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology* 151, 113-118.
- Giry, H., Szeke, B., 1995. Determination of *Alternaria* mycotoxins in selected raw and processed fruit and vegetable products. *Roczniki Panstwowege Zakladu Higieny* 46, 129-133.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A., 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250-258.
- Goloboff, P.A., Catalano, S.A., 2016. TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* 32, 221-238.

- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774-786.
- González, H., Martínez E., Pacin A., Resnik, S., 1998. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. *Mycopathologia* 144, 97-102.
- González, H., Moltó, G., Pacin, A., Resnik, S., Zelaya, M., Masana, M., Martínez, E., 2008. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. *Mycopathologia* 165, 105-114.
- Gori, K., Cantor, M.D., Jakobsen, M., Jespersen, L., 2011. Production of Bread, Cheese and Meat, in: Hofrichter, M. (Ed.), *Industrial Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 3-27.
- Graf, E., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2012. HOG MAP kinase regulation of alternariol biosynthesis in *Alternaria alternata* is important for substrate colonization. *International Journal of Food Microbiology* 157, 353-359.
- Greco, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Pose, G., 2012. Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology* 154, 187-191.
- Grogan, R., Kimble, K., Misaghi, I., 1975. Stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f-sp *Lycopersici*. *Phytopathology* 65, 880-886.
- Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology* 61, 93-101.
- Gu, W., 2009. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1677.
- Guest, G.M., Lin, X., Momany, M., 2004. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genetics and Biology* 41, 13-22.
- Gutiérrez, S.A., Carmona, M.A., Reis, E.M., 2010. Methods for detection of *Alternaria padwickii* in rice seeds. *Journal of Phytopathology* 158, 523-526.
- Gveroska, B., Ziberoski, J., 2012. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *ATI-Applied Technologies & Innovations* 7, 67-76.
- Hagen, S., Marx, F., Ram, A.F., Meyer, V., 2007. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2128-2134.
- Hägglom, P., Unestam, T., 1979. Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 1074-1077.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series Vol. 41*, 41, 95-98.
- Harrington, T.C., Rizzo, D.M., 1999. Defining species in the Fungi, en: Worrall, J.J. (Ed.), *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Kluwer Press, Dordrecht, Países Bajos.
- Harteveld, D.O.C., Akinsanmi, O.A., Drenth, A., 2013. Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology* 62, 289-297.
- Hayes, B.M.E., Anderson, M.A., Traven, A., van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R., 2014. Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 2651-2666.
- Hegedüs, N., Marx, F., 2013. Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 132-145.

Hernández-Montiel, L.G., Ochoa, J.L., Troyo-Diéguez, E., Larralde-Corona, C.P., 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology* 56, 181-187.

Hertz, M., Jensen, I.R., Jensen, L.Ø., Thomsen, S.N., Winde, J., Dueholm, M.S., Sørensen, L.H., Wollenberg, R.D., Sørensen, H.O., Sondergaard, T.E., Sørensen, J.L., 2016. The fungal community changes over time in developing wheat heads. *International Journal of Food Microbiology* 222, 30-39.

Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D., Beezhold, D.H., 2008. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry* 380, 276-281.

Hickert, S., Bergmann, M., Ersen, S., Cramer, B., Humpf, H.-U., 2016. Survey of *Alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach. *Mycotoxin Research* 32, 7-18.

Hickert, S., Hermes, L., Marques, L.M.M., Focke, C., Cramer, B., Lopes, N.P., Flett, B., Humpf, H.U., 2017. *Alternaria* toxins in South African sunflower seeds: cooperative study. *Mycotoxin Research* 33, 309-321.

Hochmuth, G.J., Hochmuth, R.C., 2009. Blossom-end rot in bell pepper: causes and prevention. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/ss497>.

Hong, S.G., Maccaroni, M., Figuli, P.J., Pryor, B.M., Belisario, A., 2006. Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. *Mycological research* 110, 1290-1300.

Huang, K., Zou, Y., Luo, J., Liu, Y., 2015. Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 14307-14313.

Hubka, V., Kolařík, M., Kubátová, A., Peterson, S.W., 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* 105, 912-937.

Hyeon, J.-Y., Park, C., Choi, I.-S., Holt, P.S., Seo, K.-H., 2010. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 144, 177-181.

Ivanova, L., Petersen, D., Uhlig, S., 2010. Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. *Toxicon* 55, 1107-1114.

Izgu, D.A., Kepekci, R.A., Izgu, F., 2011. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and in planta with Panomycocin, a novel exo- β -1, 3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 85-91.

Jabes, D.L., de Freitas Oliveira, A.C., Alencar, V.C., Menegidio, F.B., Reno, D.L.S., Santos, D.S., Barbosa, D.A., Vilas Boas, R.O., de Oliveira Rodrigues Cunha, R.L., Rodrigues, T., Costa de Oliveira, R., Nunes, L.R., 2016. Thioridazine inhibits gene expression control of the cell wall signaling pathway (CWI) in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Genetics and Genomics* 291, 1347-1362.

Jarvis, B.B., Miller, J.D., 2005. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 367-372.

Javid, A., Iqbal, D., 2014. Management of collar rot of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) by extracts and dry biomass of *Coronopus didymus* shoot. *Biological Agriculture & Horticulture* 30, 164-172.

JECFA, 2006. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Sixty-Fifth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO). Ginebra, Suiza, WHO Technical Report Series, No. 934. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO TRS 934.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_934.pdf).

Johnson, D.A., Simmons, E.G., Miller, J.S., Stewart, E.L., 2002. Taxonomy and pathology of *Macrospora/Nimbya* on some North American bulrushes (*Scirpus* spp.). *Mycotaxon* 84, 413-428.

Joly, P., 1964. Le genre *Alternaria*; recherches physiologiques, biologiques et systematiques. Encyclopédie Mycologique 33, 1–250.

Joseph, K., 2017. Argentina. Grain and Feed Annual. GAIN (Global Agriculture Information Network) Report, USDA, EEUU. Disponible en: https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Update_Buenos%20Aires_Argentina_2-1-2017.pdf

Joshi, A., Miedaner, T., 2003. Occurrence and host preference of foliar blight pathogens in different growth stages of rye and wheat in Southwest Germany. Journal of Plant Diseases and Protection, 350-358.

Kadlec, Z., Šimek, P., Heydová, A., Jegorov, A., Mařha, V., Landa, Z., Eyal, J., 1994. Chemotaxonomic discrimination among the fungal genera *Tolypocladium*, *Beauveria* and *Paecilomyces*. Biochemical Systematics and Ecology 22, 803-806.

Kahl, S., Ulrich, A., Kirichenko, A., Müller, M., 2015. Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. Journal of Applied Microbiology 119, 1637-1650.

Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., De Meulenaer, B., 2015. Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. Food Control 54, 208-215.

Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J. E., 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. Plant disease, 92(2), 301-310.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I.P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. Mycotoxin Research 32, 179-205.

Kim, H.Y., Park, H.M., Lee, C.H., 2012. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. Journal of Microbiological Methods 90, 327-335.

Klitgaard, A., Iversen, A., Andersen, M.R., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., 2014. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 1933-1943.

Kohut, G., Ádám, A.L., Fazekas, B., Hornok, L., 2009. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. International Journal of Food Microbiology 130, 65-69.

Kojima, K., Bahn, Y.-S., Heitman, J., 2006. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 152, 591-604.

Königs, P., Rinker, B., Maus, L., Nieger, M., Rheinheimer, J., Waldvogel, S., 2010. Structural revision and synthesis of altechromone A. Journal of Natural Products 73, 2064-2066.

Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Andersen, B., 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study. International Journal of Food Microbiology 93, 51-62.

Kralova, J., Hajslova, J., Poustka, J., Hochman, M., Bjelkova, M., Odstrcilova, L., 2006. Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: Monitoring pilot study. Czech Journal of Food Sciences, 24(6), 288-296.

Kumar, A., Dhamgaye, S., Maurya, I. K., Singh, A., Sharma, M., Prasad, R., 2014. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(1), 167-175.

- Kumar, V., Haldar, S., Pandey, K.K., Singh, R.P., Singh, A.K., Singh, P.C., 2008. Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1003-1009.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150-163.
- Kütt, M., Lõiveke, H., Tanner, R., 2010. Detection of alternariol in Estonian grain samples. *Agronomy Research* 8, 317-322.
- Kwaśna, H., Kosiak, B., 2003. *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycological Research* 107, 371-376.
- Kwaśna, H., Ward, E., Kosiak, B., 2006. *Lewia hordeicola* sp. nov. from barley grain. *Mycologia* 98, 662-668.
- Kwon, M.J., Arentshorst, M., Roos, E.D., van den Hondel, C.A.M.J.J., Meyer, V., Ram, A.F.J., 2011. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Molecular Microbiology* 79, 1151-1167.
- Lange, L., 2017. Fungal Enzymes and Yeasts for Conversion of Plant Biomass to Bioenergy and High-Value Products. *Microbiology Spectrum* 5, 1.
- Larsen, T.O., Perry, N.B., Andersen, B., 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron Letters* 44, 4511-4513.
- Lau, B.P.-Y., Scott, P.M., Lewis, D.A., Kanhere, S.R., Cléroux, C., Roscoe, V.A., 2003. Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *Journal of Chromatography A* 998, 119-131.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Dugan, F.M., Pryor, B.M., 2014. Characterization of *Alternaria* isolates from the infectoria species-group and a new taxon from *Arrhenatherum*, *Pseudoalternaria arrhenatheria* sp. nov. *Mycological Progress* 13, 257-276.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105, 530-546.
- Lawrence, D.P., Park, M.S., Pryor, B.M., 2012. *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress* 11, 799-815.
- Lawrence, D.P., Rotondo, F., Gannibal, P.B., 2016. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15: 3, 1-22.
- Leach, C.M., Aragaki, M., 1970. Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. *Mycologia* 62, 1071-1076.
- Lecomte, M., Berruyer, R., Hamama, L., Boedo, C., Hudhomme, P., Bersihand, S., Arul, J., N'guyen, G., Gatto, J., Guilet, D., 2012. Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and falcarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 80, 58-67.
- Lee, H.B., Patriarca, A., Magan, N., 2015. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology* 43, 93-106.
- Lehmann, L., Wagner, J., Metzler, M., 2006. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology* 44, 398-408.
- Levin, D.E., 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189, 1145-1175.
- Liebermann, B., Nussbaum, R.-P., Günther, W., 2000. Bicycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 55, 987-992.

- Liu, B.-L., Tzeng, Y.-M., 2012. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30, 1242-1254.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., Guo, H., 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal* 105, 394-400.
- Liu, Y., Rychlik, M., 2015. Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(5), 1357-1369.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Solfrizzo, M., Mule, G., 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia* 82, 501-505.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M., 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* 2, 129-140.
- Long, G.L., Winefordner, J.D., 1983. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry* 55, 712A-724A.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L., 2013. Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities. *Molecules* 18, 5891-5935.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Magan, N., 2007. Fungi in Extreme Environments, en: Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (Eds.), *Environmental and Microbial Relationships*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania, 85-103.
- Magan, N., Baxter, E., 1994. Environmental factors and tenuazonic acid production by *Alternaria* spp. isolated from sorghum. *Stored Product Protection*, 1043-1046.
- Magan, N., Cayley, G.R., Lacey, J., 1984. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1113-1117.
- Magnani, R.F., De Souza, G.D., Rodrigues-Filho, E., 2007. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4980-4986.
- Mak, Y., Willows, R.D., Roberts, T.H., Wrigley, C.W., Sharp, P.J., Copeland, L., 2006. Black Point is associated with reduced levels of stress, disease-and defence-related proteins in wheat grain. *Molecular Plant Pathology* 7, 177-189.
- Malandrakis, A.A., Apostolidou, Z.A., Markoglou, A., Flouri, F., 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology* 142, 489-499.
- Malathrakis, N., 1983. *Alternaria* stem canker of tomato in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 33-38.
- Malavazi, I., Goldman, G.H., Brown, N.A., 2014. The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Briefings in Functional Genomics* 13, 456-470.
- Marko, D., 2007. Mechanisms of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins, en: Gesellschaft für Mykotoxin Forschung (Ed.), *Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop*. Stuttgart-Fellbach, Alemania, p. 48.
- Mašková, Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Felšöciová, S., Cíсарová, M., 2012. Comparison of occurrence and toxinogenicity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1, 552-562.

- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A.I., Angulo, C., 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control* 97, 70-79.
- Medina, A., Mohale, S., Samsudin, N.I.P., Rodríguez-Sixtos, A., Rodríguez, A., Magan, N., 2017. Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. *Current Opinion in Food Science* 17, 41-48.
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Rodríguez, A., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2015. Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. *Current Genetics* 61, 325-334.
- Mercado Vergnes, D., Renard, M.E., Duveiller, E., Maraite, H., 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55, 485-493.
- Milićević, D.R., Škrinjar, M., Baltić, T., 2010. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins* 2(4), 572-592.
- Miller, F.A., Rightsel, W.A., Sloan, B.J., Ehrlich, J., French, J.C., Bartz, Q.R., Dixon, G.J., 1963. Antiviral Activity of Tenuazonic Acid. *Nature* 200, 1338.
- Mónaco, C., Sisterna, M., Perelló, A., Dal Bello, G., 2004. Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 285-290.
- Morris, P.F., Connolly, M.S., St Clair, D.A., 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research* 104, 286-292.
- Müller, M.E., Korn, U., 2013. *Alternaria* mycotoxins in wheat—A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control* 34, 191-197.
- Munitz, M.S., Garrido, C.E., Gonzalez, H.H., Resnik, S.L., Salas, P.M., Montti, M.I., 2013. Mycoflora and potential mycotoxin production of freshly harvested blueberry in Concordia, Entre Ríos Province, Argentina. *International Journal of Fruit Science* 13, 312-325.
- Munro, I. C., Renwick, A. G., Danielewska-Nikiel, B., 2008. The threshold of toxicological concern (TTC) in risk assessment. *Toxicology Letters*, 180(2), 151-156.
- Nakatsuka, S., Feng, B., Goto, T., Tsuge, T., Nishimura, S., 1990. Biosynthetic origin of (8R, 9S)-9, 10-epoxy-8-hydroxy-9-methyl-deca-(2E, 4Z, 6E)-trienoic acid, a precursor of AK-toxins produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 29, 1529-1531.
- Nasehi, A., Kadir, J., Abed Ashtiani, F., Nasr-Esfahani, M., Wong, M., Rambe, S., Ghadirian, H., Mahmodi, F., Golkhandan, E., 2014. *Alternaria capsicicola* sp. nov., a new species causing leaf spot of pepper (*Capsicum annum*) in Malaysia. *Mycological Progress* 13, 1041-1048.
- Neergaard, P., 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press, Londres, Reino Unido.
- Neme, K., Mohammed, A., 2017. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategy. A review. *Food Control* 78, 412-425.
- Nemecek, G., Cudaj, J., Podlech, J., 2012. Revision of the Structure and Total Synthesis of Altenuisol. *European Journal of Organic Chemistry* 2012, 3863-3870.
- Nielsen, K.F., Larsen, T.O., 2015. The importance of mass spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis. *Frontiers in Microbiology* 6:71, 1-15.
- Noser, J., Schneider, P., Rother, M., Schmutz, H., 2011. Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin Research* 27, 265-271.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves-Aldrey, J., 2004. Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Systematic Biology* 53, 47-67.

Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., Kimura, M., 2007. Genetically engineered *Fusarium* as a tool to evaluate the effects of environmental factors on initiation of trichothecene biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 275, 53-61.

Oliveri, C., Torta, L., Catara, V., 2008. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. *International Journal of Food Microbiology* 127, 147-154.

Osborne, L., Jones, V., Peeler, J., Larkin, E., 1988. Transformation of C3H/10T12 cells and induction of EBV-early antigen in Raji cells by altertoxins I and III. *Toxicology in vitro* 2, 97-102.

Østergaard, L.H., Olsen, H.S., 2011. Industrial Applications of Fungal Enzymes, en: Hofrichter, M. (Ed.), *Industrial Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania, 269-290.

Ostry, V., 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1, 175-188.

Ostry, V., Skarkova, J., Ruprich, J., 2004. Occurrence of *Alternaria* mycotoxins and *Alternaria* spp. in lentils and human health, Abstracts 26th Mycotoxin-Workshop, Herrsching, Alemania, p.87.

Oviedo, M., Barros, G., Chulze, S., Ramirez, M., 2012. Natural occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in soya beans. *Mycotoxin Research* 28, 169-174.

Pane, C., Fratianni, F., Parisi, M., Nazzaro, F., Zaccardelli, M., 2016. Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts. *Crop Protection* 84, 81-87.

Panigrahi, S., Dallin, S., 1994. Toxicity of the *Alternaria* spp. metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-i, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp (*Artemia salina* L) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 66, 493-496.

Pappas, E., Schaich, K., 2009. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 741-781.

Pappas, P.G., 2012. Dematiaceous Fungal Infections, en: Schafer, A.I. (Ed.), *Goldman's Cecil Medicine (Twenty-Fourth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, EEUU, 2007-2008.

Pappier, U., Fernández Pinto, V., Larumbe, G., Vaamonde, G., 2008. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Microbiology* 125, 153-157.

Patriarca, A., Azcarate, M., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., 2007. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119, 219-222.

Patriarca, A., Fernández Pinto, V., 2017. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science* 14, 50-60.

Patriarca, A., Medina, A., Fernández Pinto, V., Magan, N., 2014. Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal* 7, 329-334.

Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G., 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 263-269.

Pedras, M.S.C., Chumala, P.B., 2005. Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. *Phytochemistry* 66, 81-87.

Pedras, M.S.C., Park, M.R., 2015. Metabolite diversity in the plant pathogen *Alternaria brassicicola*: factors affecting production of brassicicolin A, depudecin, phomapyrone A and other metabolites. *Mycologia* 107, 1138-1150.

- Peever, T.L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L.W., 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96, 119-134.
- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H. N., 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 16(6), 291-300.
- Perelló, A., Sisterna, M., 2006. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathology* 55, 303-303.
- Perelló, A., Sisterna, M., 2008. Formation of *Lewia infectoria*, the teleomorph of *Alternaria infectoria*, on wheat in Argentina. *Australasian Plant Pathology* 37, 589-591.
- Perello, A., Moreno, M., Sisterna, M., 2008. *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology*, 57(2), 379.
- Peres, N.A.R., Agostini, J.P., Timmer, L.W., 2003. Outbreaks of *Alternaria* Brown Spot of Citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease* 87, 750-750.
- Pero, R.W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D., Spalding, J.W., 1973. Toxicity of metabolites produced by the "*Alternaria*". *Environmental Health Perspectives* 4, 87-94.
- Pfeiffer, E., Eschbach, S., Metzler, M., 2007. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotoxin Research* 23, 152.
- Pfliegler, W.P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., 2015. Mycotoxins—prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology* 55, 805-818.
- Pimenta, R., Morais, P., Rosa, C., Correa, A., 2009. Utilization of yeasts in biological control programs, en: Satyanarayana, T., Kun, G. (Eds.), *Yeast biotechnology: diversity and applications*, Springer, Berlin, Alemania, 199-214.
- Pitt, J., Basílico, J., Abarca, M., Lopez, C., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology* 38, 41-46.
- Pitt, J., Hocking, A., 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional. New South Wales, Australia.
- Pitt, J.I., 2008. Understanding Plant-Fungus Associations as a Key to Mycotoxin Control, *Food Contaminants*. American Chemical Society, 96-108.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer, Nueva York, EEUU.
- Polack, L., Mas, D., 2017. Control biológico en tomate, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Disponible en: <https://inta.gov.ar/noticias/control-biologico-en-tomate>.
- Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., Musetti, R., 2012. A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of Microbiological Methods* 88, 162-171.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256.
- Pose, G. 2007. Caracterización de hongos fitopatógenos-toxicogénicos en productos frutihortícolas. El modelo *Alternaria* causante de 'enmohecimiento negro' en tomates cultivados en Argentina. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Quilmes.
- Pose, G., Ludemann, V., Segura, J., Fernández Pinto, V., 2004. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by Blackmold in Argentina. *Mycotoxin Research* 20 (2), 80.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V., 2009. Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology* 135, 60-63.

Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V., 2010a. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology* 142, 348-353.

Pose, G.N., Ludemann, V., Fernandez, D., Segura, J.A., Fernández Pinto, V., 2010b. *Alternaria* species associated with 'moldy heart' on peaches in Argentina. *Tropical Plant Pathology* 35, 174-177.

Prabhu, A., Prasada, R., 1967. Evaluation of seed infection caused by *Alternaria triticina* in Wheat, *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 647-654.

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., Dubey, N. K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.

Prasada, R., Prabhu, A., 1962. Leaf blight of Wheat caused by a new species of *Alternaria*. *Indian Phytopathology* 15, 292-293.

Pruß, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C.B., Fischer, R., 2014. Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 2582-2591.

Pryor, B.M., Bigelow, D.M., 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia* 95, 1141-1154.

Pryor, B.M., Gilbertson, R.L., 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104, 1312-1321.

Qiao, L.R., Yuan, L., Gao, J.M., Zhao, P.J., Kang, Q.J., Shen, Y.M., 2007. Tricycloalternarene derivatives produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. *Journal of Basic Microbiology* 47, 340-343.

Ramallo, A., Hongn, S., Celiz, C., Pasteris, L., Gil Fourquet, M., Bains, O., 2009. Pudriciones de poscosecha en arándano: localización y cuantificación del inóculo. *Avances en la Producción Vegetal y Animal del NOA 2007-2009*, 514-518.

Rambaut, A., 2006–2014. FigTree Tree Figure Drawing Tool Version v1.4.2. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2008–2013. Tracer MCMC Trace. Analysis Tool Version v1.6.0. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rao, A.V., Snyder, D.M., 2010. Raspberries and human health: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3871-3883.

Raut, J., Guldhe, S., Wangikar, P., 1983. Seed-borne infection of *Alternaria triticina* in wheat and its control. *Indian Phytopathology* 36, 274-277.

Reddy, K., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H., Abel, C., Shier, W., 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews* 29, 3-26.

Richard, J.L., Payne, G.A., Desjardins, A.E., Maragos, C., Norred, W., Pestka, J., 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. *CAST Task Force Report* 139, 101-103.

Richardson, M.D., Moore, C.B., 2017. Superficial and Subcutaneous Fungal Pathogens. Cohen, Jonathan, ed: *Powderly, W.G., Opal, S.M. (Eds.), Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Elsevier, Países Bajos, 1710-1724.

Richthammer, C., Enseleit, M., Sanchez-Leon, E., März, S., Heilig, Y., Riquelme, M., Seiler, S., 2012. RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 85, 716-733.

- Rivera Calo, J., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Robiglio, A.L., Lopez, S.E., 1995. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 24, 413-417.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N., 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129, 187-193.
- Rodríguez-Martín, A., Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A., 2010. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* 31, 541-547.
- Rodríguez, A., Medina, Á., Córdoba, J.J., Magan, N., 2014. The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 178, 113-119.
- Rodríguez, A., Medina, Á., Córdoba, J. J., Magan, N., 2016. Development of a HOG-based real-time PCR method to detect stress response changes in mycotoxigenic moulds. *Food Microbiology*, 57, 109-115.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods, en: Basu, C. (Ed.), *PCR Primer Design*. Springer, Nueva York, EEUU, 31-56.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61, 539-542.
- Rosslénbroich, H. J., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8), 557-561.
- Rotem, J., 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. American Phytopathological Society, EEUU.
- Rotem, J., Wendt, U., Kranz, J., 1988. The effect of sunlight on symptom expression of *Alternaria alternata* on cotton. *Plant Pathology* 37, 12-15.
- Rotondo, F., Collina, M., Brunelli, A., Pryor, B.M., 2012. Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AM-toxin producing strains. *Phytopathology* 102, 1130-1142.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Krawetz, S., Misener, S., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Misener S., Krawetz S.A. (Eds). *Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, EEUU. Vol. 132, 365-386.
- Ruelas, C., Tiznado-Hernández, M., Sánchez-Estrada, A., Robles-Burgueño, M., Troncoso-Rojas, R., 2006. Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit. *Journal of Phytopathology* 154, 236-244.
- Rychlik, M., Lepper, H., Weidner, C., Asam, S., 2016. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* 68, 181-185.
- Sacchi, C., González, H., Broggi, L., Pacin, A., Resnik, S., Cano, G., Taglieri, D., 2009. Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina. *Animal Feed Science and Technology* 152, 330-335.
- Sahitya, U.L., Deepthi, S., Kasim, P., Suneetha, P., Krishna, M., 2014. Anthracnose, a prevalent disease in *Capsicum*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5, 1583-1604.
- Sainz, M.J., Alfonso, A., Botana, L.M., 2015. Considerations about international mycotoxin legislation, food security, and climate change. *Climate Change and Mycotoxins*, 153.

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., 2010. Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Países Bajos.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004a. Introduction to food and airborne fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos.

Samson R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 2000. Introduction to food and airborne fungi. 6ta Edición. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos.

Samson, R.A., Houbraken, J., Kuijpers, A.F., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004b. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology* 50, 45-61.

Sánchez, R., Serra, F., Tárraga, J., Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., de María, A., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Dopazo, J., Dopazo, H., 2011. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Research* 39, W470-W474.

Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. En: Magan, N. y Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing, Inglaterra. 8, 174-189.

Santos, C., Paterson, R., Venâncio, A., Lima, N., 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108, 375-385.

Sanzani, S.M., Reverberi, M., Geisen, R., 2016. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology* 122, 95-105.

Sato, H., Konomi, K., Sakamura, S., 1981. Three new phytotoxins produced by *Pyrenochaeta terrestris*: pyrenochaetic acids A, B and C. *Agricultural and Biological Chemistry* 45, 1675-1679.

Scott, P., 2004. Other mycotoxins, en: Magan, N. y Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing, Inglaterra. 17, 406-440.

Scott, P., Lawrence, G., Lau, B.P., 2006. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research* 22, 142-147.

Scott, P., Stoltz, D., 1980. Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 78, 33-40.

Scott, P., Weber, D., Kanhere, S., 1997. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography A* 765, 255-263.

Scott, P.M., 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International* 84, 1809-1817.

Scott, P.M., Kanhere, S.R., 1980. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acids in tomato paste. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 63, 612-621.

Schmidt-Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R., Magan, N., 2007. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology* 119, 277-283.

Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., Geisen, R., 2012. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology* 29, 233-241.

Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., Geisen, R., 2011. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International Journal of Food Microbiology* 145, 229-237.

Schmidt-Heydt, M., Stoll, D.A., Mrohs, J., Geisen, R., 2013. Intraspecific variability of HOG1 phosphorylation in *Penicillium verrucosum* reflects different adaptation levels to salt rich habitats. *International Journal of Food Microbiology* 165, 246-250.

Schmidt, H., Adler, A., Holst-Jensen, A., Klemsdal, S., Logrieco, A., Mach, R., Nirenberg, H., Thrane, U., Torp, M., Vogel, R., 2004. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *International Journal of Food Microbiology* 95, 341-349.

Schrader, T., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., 2006. Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 606, 61-71.

Schrader, T., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., Vijay, H., 2001. Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 21, 261-274.

Schreck, I., Deigendesch, U., Burkhardt, B., Marko, D., Weiss, C., 2012. The *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether induce cytochrome P450 1A1 and apoptosis in murine hepatoma cells dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Toxicology* 86, 625-632.

Sempere, F., Santamarina, M., 2007. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia* 163, 183-190.

SENASA, 2017a. Informes y estadísticas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/cereales/informacion/informes-y-estadisticas> (último acceso enero 2018).

SENASA, 2017b. Informes y estadísticas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/informacion/informes-y-estadisticas> (último acceso enero 2018).

Serdani, M., Kang, J.-C., Andersen, B., Crous, P.W., 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106, 561-569.

Siciliano, I., Ortu, G., Gilardi, G., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2015. Mycotoxin Production in Liquid Culture and on Plants Infected with *Alternaria* spp. Isolated from Rocket and Cabbage. *Toxins* 7, 743-754.

Siegel, D., Merkel, S., Koch, M., Nehls, I., 2010. Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. *Food Chemistry* 120, 902-906.

Simmons, E.G., 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59, 67-92.

Simmons, E.G., 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge, en: Chelkowski J., Visconti A. (Eds.), *Alternaria: biology, plant diseases, and metabolites*, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos. 1, 1-35.

Simmons, E.G., 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Países Bajos.

Simmons, E.G., Roberts, R., 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48, 109-140.

SINAMIVO, 2017. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. <http://www.sinavivo.gov.ar/cultivo/capsicum-annuum>.

Skarkova, J., Ostry, V., Prochazkova, I., 2005. Planar chromatographic determination of *Alternaria* toxins in selected foodstuffs, en: Proceedings of the international symposium on planar separations, planar chromatography, milestones in instrumental TLC, Siofok, Hungría, 29-31.

Skouri-Gargouri, H., Jellouli-Chaker, N., Gargouri, A., 2010. Factors affecting production and stability of the AcAFP antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 535-543.

Smith, E.R., Fredrickson, T.N., Hadidian, Z., 1968. Toxic effects of the sodium and the N,N'-dibenzylethylenediamine salts of tenuazonic acid (NSC-525816 and NSC-82260). *Cancer Chemotherapy Reports* 52, 579-585.

- Soares, M. A., Nogueira, G. B., Bazzolli, D. M. S., de Araújo, E. F., Langin, T., de Queiroz, M. V., 2014. PacCl, a pH-responsive transcriptional regulator, is essential in the pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum*, a causal agent of anthracnose in bean plants. *European Journal of Plant Pathology*, 140(4), 769-785.
- Solfrizzo, M., 2017. Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 17, 57–61.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., van den Bulk, R., 2004. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *Journal of AOAC International* 87, 101-106.
- Solhaug, A., Eriksen, G. S., Holme, J. A., 2016. Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin alternariol: A review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(6), 533-539.
- Solhaug, A., Vines, L., Ivanova, L., Spilsberg, B., Holme, J., Pestka, J., Collins, A., Eriksen, G., 2012. Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 738, 1-11.
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Fernández Pinto, V., Moretti, A., Logrieco, A.F., 2011. AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology* 145, 414-419.
- Sommer, N.F., 1985. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7, 331-339.
- Stack, M.E., Mazzola, E.P., Page, S.W., Pohland, A.E., Highet, R.J., Tempesta, M.S., Corley, D.G., 1986. Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II, and III. *Journal of Natural Products* 49, 866-871.
- Stack, M.E., Mislivec, P.B., Roach, J.A., Pohland, A.E., 1985. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 68, 640-642.
- Stack, M.E., Prival, M.J., 1986. Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 718-722.
- Stadler, M., Fournier, J., Læssøe, T., Chlebicki, A., Lechat, C., Flessa, F., Rambold, G., Peršoh, D., 2010. Chemotaxonomic and phylogenetic studies of *Thamnomycetes* (*Xylariaceae*). *Mycoscience* 51, 189-207.
- Stenglein, S.A., Balatti, P.A., 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68, 158-167.
- Stewart, J.E., Thomas, K.A., Lawrence, C.B., Dang, H., Pryor, B.M., Peever, T.L., 2013. Signatures of recombination in clonal lineages of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata* sensu lato. *Phytopathology* 103 (7), 741-749.
- Stewart, J.E., Timmer, L.W., Lawrence, C.B., Pryor, B.M., Peever, T.L., 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evolutionary Biology* 14:38, 1-14.
- Steyn, P.S., Rabie, C.J., 1976. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. *Phytochemistry* 15, 1977-1979.
- Stinson, E.E., Osman, S.F., Heisler, E.G., Siciliano, J., Bills, D.D., 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29, 790-792.
- Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2013. Differences in the Regulation of Ochratoxin A by the HOG Pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in Response to High Osmolar Environments. *Toxins* 5 (7), 1282-1298.

Suslow T., Cantwell M., 1997. Tomato: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Center, University of California. Disponible en: http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Vegetables_English/?uid=36&ds=799.

Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., Tsuda, T., 2010. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *The Journal of Nutrition* 140, 527-533.

Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., Fernández Pinto, V., 2006. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research* 22, 236.

Thakur, S., Harsh, N., 2014. Phylloplane fungi as biocontrol agent against *Alternaria* leaf spot disease of (Akarkara) *Spilanthes oleracea*. *Bioscience Discovery* 5, 139-144.

Thomma, B.P., 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4, 225-236.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

Torres, A., González, H., Etcheverry, M., Resnik, S., Chulze, S., 1998. Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Additives & Contaminants* 15, 56-60.

Trigo Argentino, 2017. www.trigoargentino.com.ar (último acceso diciembre 2017).

Trinetta, V., Linton, R.H., Morgan, M.T., 2013. Use of chlorine dioxide gas for the postharvest control of *Alternaria alternata* and *Stemphylium vesicarium* on Roma tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3330-3333.

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.

Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Mayumi, E., Yamamoto, M., Otani, H., 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 44-66.

Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M., Brakhage, A.A., 2015. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Frontiers in Microbiology* 6, 325, 1-12.

Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., 2014. Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control* 37, 165-170.

Vaquera, S., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., 2014. Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. *International Journal of Food Microbiology* 185, 136-139.

Vaquera, S., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., 2016. Influence of environmental parameters on mycotoxin production by *Alternaria arborescens*. *International Journal of Food Microbiology* 219, 44-49.

Vargas Trinidad, A., Ganoza, F.Q., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., 2015. Determination of mycotoxin profiles characteristic of *Alternaria* strains isolated from Malbec grapes, BIO Web of Conferences. EDP Sciences, p. 02004.

Vejdovszky, K., Sack, M., Jarolim, K., Aichinger, G., Somoza, M.M., Marko, D., 2017. *In vitro* combinatory effects of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and altertoxin II and potentially involved miRNAs. *Toxicology Letters* 267, 45-52.

- Virgili, R., Simoncini, N., Toscani, T., Camardo Leggieri, M., Formenti, S., Battilani, P., 2012. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. *Toxins* 4, 68-82.
- Visconti, A., Sibilia, A., Sabia, C., 1992. *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Research* 8, 9-16.
- Vogt, N., Seiler, S., 2008. The RHO1-specific GTPase-activating Protein LRG1 Regulates Polar Tip Growth in Parallel to Ndr Kinase Signaling in *Neurospora*. *Molecular Biology of the Cell* 19, 4554-4569.
- Vučković, J.N., Brkljača, J.S., Bodroža-Solarov, M.I., Bagi, F.F., Stojšin, V.B., Čulafić, J.N., Aćimović, M.G., 2012. *Alternaria* spp. on small grains. *Food and Feed Research*, 39(2), 79-88.
- Wagacha, J., Muthomi, J., 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124, 1-12.
- Wall, M.M., Biles, C.L., 1993. *Alternaria* fruit rot of ripening chile peppers. *Phytopathology* 83, 324-328.
- Wiltshire, S., 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society* 18, 135IN131-160IN133.
- Williamson, P., 1997. Black point of wheat: *in vitro* production of symptoms, enzymes involved, and association with *Alternaria alternata*. *Australian Journal of Agricultural Research* 48, 13-20.
- Witsenboer, H.M., Kloosterziel, K.M., Hateboer, G., Nijkamp, H.J.J., Hille, J., 1992. Tomato susceptibility to *Alternaria* stem canker: parameters involved in host-specific toxin-induced leaf necrosis. *Plant Science* 81, 127-134.
- Wojciechowska, E., Weinert, C.H., Egert, B., Trierweiler, B., Schmidt-Heydt, M., Horneburg, B., Graeff-Hönniger, S., Kulling, S.E., Geisen, R., 2014. Chlorogenic acid, a metabolite identified by untargeted metabolome analysis in resistant tomatoes, inhibits the colonization by *Alternaria alternata* by inhibiting alternariol biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology* 139, 735-747.
- Woudenberg, J., Seidl, M., Groenewald, J., de Vries, M., Stielow, J., Thomma, B., Crous, P., 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82, 1-21.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W., 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75, 171-212.
- Wright, E.R., Beatriz, P., Fernández, R.L., Ascitutto, K., Rivera, M.C., Murillo, F., Vasquez, P., Divo de Sesar, M., Pérez, A., 2005. Conocimiento actual sobre enfermedades de arándano. 980-985. Disponible en: <http://agro.faua.info/files/u1/wright.pdf>.
- Wright, E.R., Fernández, R., Benva, M., Pérez, J., Rivera, M.C., Roncoroni, S., Nicolini, F., Vásquez, P., Ciarca, P., Pérez, B.A., 2008. Deterioro poscosecha de arándano en Entre Ríos y Buenos Aires, Argentina, Simposio Internacional de Arándanos y Berries, 63-68.
- Xu, X., Wang, Y., Tian, C., Liang, Y., 2016. The *Colletotrichum gloeosporioides* RhoB regulates cAMP and stress response pathways and is required for pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 96, 12-24.
- Yan, F., Xu, S., Chen, Y., Zheng, X., 2014. Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 97, 32-35.
- Yekeler, H., Bitmiş, K., Özçelik, N., Doymaz, M.Z., Çalta, M., 2001. Analysis of Toxic Effects of *Alternaria* Toxins on Esophagus of Mice by Light and Electron Microscopy. *Toxicologic Pathology* 29, 492-497.
- Young, A., Davis, N., Diener, U., 1980. The effect of temperature and moisture on tenuazonic acid production by *Alternaria tenuissima*. *Phytopathology* 70, 607-609.
- Zeng, W., Kirk, W., Hao, J., 2012. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control* 60, 141-147.

Zhang, X., Sun, Y., Yang, Q., Chen, L., Li, W., Zhang, H., 2015. Control of postharvest black rot caused by *Alternaria alternata* in strawberries by the combination of *Cryptococcus laurentii* and Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester. *Biological Control* 90, 96-101.

Zhu, Y., Hassan, Y.I., Watts, C., Zhou, T., 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology* 216, 19-29.

Zitter, T., Hsu, L., 1990. A leaf spot of cucumber caused by *Ulocladium cucurbitae* in New York. *Plant Disease* 74, 824-827.

Zwickel, T., Klaffke, H., Richards, K., Rychlik, M., 2016. Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification of various *Alternaria* toxins in wine, vegetable juices and fruit juices. *Journal of Chromatography A* 1455, 74-85.

VII. ANEXOS



VII.1. MEDIOS DE CULTIVO**Agar Papa Dextrosa (APD)**

Papa blanca	200 g
D-glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Agar Papa Zanahoria (APZ)

Papa blanca	20 g
Zanahoria	20 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Agar Pulpa de Tomate (APT)

Pulpa de tomate	800 mL
Agar	15 g
Agua destilada	200 mL

Agar Trigo (WA)

Trigo molido	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

$a_w=0,981$

Para ajustar la a_w a 0,95, agregar 19 mL de glicerol cada 100 mL de medio de cultivo.

Agar V8®

Jugo V8®	175 mL
CaCO ₃	3 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Agua destilada	825 mL

Caldo Papa Dextrosa (CPD)

Papa blanca	200 g
D-glucosa	20 g
Agua destilada	1 L

Caldo extracto de levadura sacarosa (YES)

Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	150 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agua destilada	885 mL

Diclorán Cloranfenicol Malta Agar (DCMA)

Extracto de malta	10 g
Diclorán	2 mg
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Diclorán 18 % Glicerol Agar (DG18)

D-glucosa	10 g
Peptona	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Diclorán	2 mg
Cloranfenicol	0,1 g
Glicerol	220 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES)

Extracto de Levadura	20 g
Sacarosa	150 g
Diclorán	2 mg

Rosa de Bengala	25 mg
Cloranfenicol	0,05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Agua destilada	885 mL

Extracto de Malta Agar (MEA)

Extracto de malta	20 g
D-glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Sintético-bajo en Nutrientes-Agar (SNA)

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
D-glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

VII.2. SECUENCIAS DE CEBADORES

Nombre del cebador	Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')
PG3	TACCATGGTTCTTTCCGA
PG2b	GAGAATTCRCARTCRTCYTGRIT
<i>Rho1-F1</i>	CTTTCCCGAGGTCTACGTC
<i>Rho1-R1</i>	ACGGTCGTAATCCTCCTGAC
<i>Rho1-R2</i>	TCGTAATCCTCCTGACCAGC
A-BTF	ACAACTTCGTCTTCGGCCAGT
A-BTR	ACCCTTTGCCAGTTGTTACCAG

VII.3. SOLUCIONES Y REACTIVOS**Tampón CTAB**

Bromuro de cetiltrimetilamonio $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3]Br$	2 % m/v
Tris-HCl	100 mM
EDTA	20 mM
NaCl	1,4 M
pH=8,0	

Tampón fosfato salino (PBS)

NaH_2PO_4	0,32 g
Na_2HPO_4	1,0 g
NaCl	9 g
Agua destilada	1 L
pH=7,2	

Tampón TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH=8,0	