

Tesis de Maestría

Hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas cultivadas en Argentina

Cárdenas Jarrin, Andrea Paola

2016

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Cárdenas Jarrin, Andrea Paola. (2016). Hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas cultivadas en Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6185_CardenasJarrin

Cita tipo Chicago:

Cárdenas Jarrin, Andrea Paola. "Hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas cultivadas en Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6185_CardenasJarrin

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de
Alimentos

**Hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y
manzanas cultivadas en Argentina**

Tesis presentada para optar al título de
Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Autor: Andrea Paola Cárdenas Jarrín

Director de tesis: Dra. Andrea Patriarca
Co-Director de tesis: Dra. Virginia Fernández Pinto
Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica,
Laboratorio de Microbiología de Alimentos

Buenos Aires, 2016.

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de esta tesis, ya que gracias a su ayuda y motivación fue posible la realización de este trabajo.

De manera especial quiero agradecer a mi Directora de tesis, Dra. Andrea Patriarca por la confianza depositada en mí durante estos meses, así como por su ayuda, paciencia y enseñanza en el laboratorio. Su guía y asesoramiento continuo han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Agradezco a mi Co-Directora de tesis, Dra. Virginia Fernández Pinto por haberme permitido ingresar en su grupo de trabajo, por sus sugerencias y apoyo para poder terminar este trabajo en el tiempo programado.

Así mismo agradecer a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación de la República del Ecuador por la beca otorgada para la realización de esta maestría.

Gracias a mis padres Vicente y América por apoyar y respetar cada una de mis decisiones y también a mis hermanas por suplir mi ausencia durante el tiempo que me tomó terminar este posgrado.

Quiero agradecer a mis compañeros de cursada y laboratorio, Claudio y Natalia, por todas las horas de trabajo, charlas, almuerzos y sin número de actividades realizadas.

A Diana, Lucía y Nilda, gracias por la predisposición y ayuda durante mi estadía en el laboratorio.

Y finalmente a todos y cada uno de mis compañeros con los cuales pasé muchas horas dentro y fuera de las aulas de clase, gracias por todos los momentos que hemos compartido.

Índice General

Resumen.....	viii
Abstract.....	x
CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción	1
1.1 Hongos	1
1.2 Deterioro fúngico de frutas	2
1.3 Micotoxinas.....	4
1.4 Géneros de hongos micotoxigénicos.....	5
1.5 Control de micotoxinas en las diferentes etapas de producción.....	6
1.6 Cítricos	8
1.6.1 Origen.....	8
1.6.2 Taxonomía y morfología	8
1.6.3 Principales Cítricos.....	9
1.6.4 Producción de cítricos en el mundo y en Argentina.....	9
1.6.5 Alteraciones fúngicas en cítricos	11
1.7 Manzanas	12
1.7.1 Origen.....	12
1.7.2. Taxonomía y morfología.....	13
1.7.3 Variedades	13
1.7.4 Producción de manzanas en el mundo y en Argentina	14
1.7.5 Alteraciones fúngicas en manzanas	16
1.8 <i>Alternaria</i> spp.	16
1.8.1 Antecedentes	16
1.8.2 Taxonomía	17
1.8.3 Características y condiciones de crecimiento.....	18
1.8.4 Clasificación	19
1.8.5 Alteraciones en cultivos vegetales.....	26
1.8.5.1 Alteraciones en cítricos	26
1.8.5.2 Alteraciones en rosáceas.....	28
1.8.6 Micotoxinas de <i>Alternaria</i> spp.	30
1.8.7 Ocurrencia de micotoxinas de <i>Alternaria</i> spp. en alimentos y piensos	35

1.8.8 Control y prevención.....	37
1.9 Objetivos.....	38
1.9.1 Objetivo General.....	38
1.9.2 Objetivos específicos.....	39
CAPÍTULO II – MATERIALES Y MÉTODOS	40
2. Materiales y métodos.....	40
2.1 Muestreo.....	40
2.2 Aislamiento de la micota total	41
2.3 Observación macroscópica y microscópica.....	41
2.4 Identificación a nivel de género	42
2.5 Aislamiento e identificación de especies de <i>Alternaria</i>	42
2.5.1 Aislamiento.....	42
2.5.2 Reaislamiento.....	43
2.5.3. Identificación	43
2.5.4 Caracterización morfológica	44
2.5.5 Conservación de los aislamientos	44
2.5.6 Identificación de <i>Alternaria</i> a nivel de grupos-especie o especie.	44
2.5.6.1 Caracterización macroscópica	46
2.5.6.2 Caracterización microscópica	46
2.6 Evaluación de diferentes técnicas para determinación de la capacidad toxicogénica de <i>Alternaria</i> spp.	47
2.7 Evaluación de diferentes técnicas para la extracción de micotoxinas. 48	
2.7.1 Procedimiento de microextracción para metabolitos secundarios (toxinas AOH, AME y TeA) (Andersen y col., 2015).	49
2.7.2 Procedimiento de extracción secuencial para las toxinas AOH, AME y TeA (modificado de Pose y col., 2010).....	50
2.8 Análisis de toxinas	53
2.9 Condiciones de detección.....	53
2.10 Determinación de la capacidad toxicogénica de <i>Alternaria</i> spp.....	53
2.11 Determinación de las toxinas.....	53

2.12 Ocurrencia natural de micotoxinas de <i>Alternaria</i> spp. en manzanas.	54
2.13 Análisis estadístico	54
CAPÍTULO III – RESULTADOS	56
3. Resultados.....	56
3.1 Estudio de la micota de manzanas y cítricos	56
3.2 Incidencia del género <i>Alternaria</i> en cítricos y manzanas	58
3.3 Aislamiento e Identificación morfológica de <i>Alternaria</i> a nivel de grupo-especie	58
3.4 Aislamiento e Identificación morfológica de <i>Alternaria</i> a nivel de especie	61
3.5 Capacidad toxicogénica de las cepas de <i>Alternaria</i>	64
3.5.1 Aislamientos de manzanas	64
3.5.2 Aislamientos de cítricos	70
3.6 Ocurrencia de micotoxinas en manzanas infectadas naturalmente	74
CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN	78
4. Discusión	78
4.1 Estudio de la micota de manzanas y cítricos.....	78
4.2 Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en cítricos y manzanas e Identificación morfológica de <i>Alternaria</i> spp. a nivel de grupo-especie y especie	80
4.3 Capacidad toxicogénica de las cepas de <i>Alternaria</i>	83
4.4 Ocurrencia de micotoxinas en manzanas infectadas naturalmente.	86
CAPÍTULO V – CONCLUSIONES	89
5. Conclusiones	89
5.1 Conclusión general	91
CAPÍTULO VI – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
6. Perspectivas futuras	92
CAPÍTULO VII - BIBLIOGRAFÍA.....	93
7. Bibliografía.....	93
ANEXOS	107

Índice de Figuras

Figura 1: Principales hongos contaminantes de alimentos (Bonifaz, 2012).	3
Figura 2: Cítricos.	8
Figura 3: Principales zonas productoras de cítricos en Argentina (Federcitrus, 2014).	11
Figura 4: Manzana.	12
Figura 5: Principales zonas productoras de manzanas en Argentina (INTA, 2012).	15
Figura 6: A) Colonia de <i>Alternaria</i> spp. en PCA; B) Conidios observados bajo microscopio estereoscópico (40x); C) Conidios observados bajo microscopio (400x); D) Conidios (dictiosporas) (1000x).	18
Figura 7: Conidios con pico redondeado y angosto	21
Figura 8: Conidios con pico filamentosos.	21
Figura 9: Formas de conidios y patrones de esporulación	23
Figura 10: Formas de conidios y patrones de esporulación.	24
Figura 11: Formas de conidios y patrones de esporulación.	25
Figura 12: Lesiones de <i>Alternaria</i> spp. en cítricos. A) Mancha marrón en hojas y B) frutos de mandarina; C) podredumbre negra en mandarina; D) mancha marrón en naranja; E) vista lateral de lesión elevada “en forma de cráter”; F) podredumbre negra en naranja.	28
Figura 13: Lesión de <i>Alternaria</i> spp. en hoja (A) y fruto (B) del manzano (Rotondo y col., 2012).	29
Figura 14: Corazón mohoso de manzana causado por <i>Alternaria</i> spp. A) seco; B) húmedo.	30
Figura 15: Estructura química de las principales toxinas de <i>Alternaria</i> spp. ...	33
Figura 16: A-D) Frutos con infecciones fúngicas; E) siembra directa en DCMA.	41
Figura 17: Crecimiento fúngico en placas de DCMA.	42
Figura 18: Esquema de aislamiento del género <i>Alternaria</i> spp. para identificación a nivel de especie.	45
Figura 19: A) Cadenas de conidios observadas en microscopio estereoscópico (40x); B-C) Modelos de esporulación según Simmons (2007).	46

Figura 20: Preparado de <i>Alternaria</i> con técnica de cinta adhesiva.	47
Figura 21: Inoculación de <i>Alternaria</i> en: A) DRYES; B) Agar manzana (AM); C) Manzana	48
Figura 22: Esquema de microextracción de toxinas AOH, AME y TeA	50
Figura 23: Esquema de extracción secuencial de AOH, AME y TeA	52
Figura 24: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de manzanas.....	56
Figura 25: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de cítricos.....	57
Figura 26: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de limones, mandarinas y naranjas.....	57
Figura 27: Grupo-especie <i>A. tenuissima</i> (400x)	59
Figura 28: Grupo-especie <i>A. alternata</i> (400x)	59
Figura 29: Distribución de grupos-especie de <i>Alternaria</i> en distintos tipos de lesión en manzanas y cítricos.	60
Figura 30: Aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de manzanas según el tipo de lesión.....	62
Figura 31: Aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de cítricos según el tipo de lesión	62
Figura 32: Especies de <i>Alternaria</i> aisladas de cítricos y manzanas.....	63
Figura 33: Producción de micotoxinas por <i>Alternaria</i> spp. aisladas de manzanas.....	64
Figura 34: Producción de toxinas de <i>Alternaria</i> por aislamientos de manzanas según el tipo de lesión y el grupo-especie.	65
Figura 35: Producción de AOH por <i>Alternaria</i> spp. de manzanas.	66
Figura 36: Producción de AME por <i>Alternaria</i> spp. de manzanas.	66
Figura 37: Producción de TeA por <i>Alternaria</i> spp. de manzanas.	67
Figura 38: Correlaciones entre micotoxinas producidas por aislamientos de <i>Alternaria</i> de manzanas.	68
Figura 39: Producción de micotoxinas por <i>Alternaria</i> spp. aisladas de cítricos.	70
Figura 40: Producción de AOH por <i>Alternaria</i> spp. de cítricos.	71
Figura 41: Producción de AME por <i>Alternaria</i> spp. de cítricos.	71
Figura 42: Producción de TeA por <i>Alternaria</i> spp. de cítricos.	72

Figura 43: Ocurrencia natural de micotoxinas de <i>Alternaria</i> spp. en manzanas.	74
Figura 44: Ocurrencia natural de AOH en manzanas.....	76
Figura 45: Ocurrencia natural de AME en manzanas.....	76
Figura 46: Ocurrencia natural de TeA en manzanas.	77

Índice de Tablas

Tabla 1: Producción mundial de cítricos (Federcitrus, 2014).....	10
Tabla 2: Producción de cítricos en Argentina (Federcitrus, 2014).	10
Tabla 3: Producción mundial de manzanas (FAO, 2013).	14
Tabla 4: Toxinas producidas por las principales especies toxigénicas del género <i>Alternaria</i>	34
Tabla 5: Frutas analizadas, variedades y cantidades	40
Tabla 6: Valores máximos, mínimos y promedio de producción de toxinas de <i>Alternaria</i> por aislamientos de manzana.	67
Tabla 7: Producción de micotoxinas por especies de <i>Alternaria</i> provenientes de manzanas.....	69
Tabla 8: Valores máximos, mínimos y promedio de producción de toxinas de <i>Alternaria</i> por aislamientos de cítricos.....	72
Tabla 9: Producción de micotoxinas por especies de <i>Alternaria</i> provenientes de cítricos.....	73
Tabla 10: Concentración de toxinas de <i>Alternaria</i> spp. en manzanas naturalmente contaminadas.....	75
Tabla 11: Valores máximos, mínimos y promedio de toxinas de <i>Alternaria</i> en manzanas infectadas naturalmente.	77

Hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas cultivadas en Argentina

Resumen

Las manzanas y los frutos cítricos son cultivos de gran importancia en Argentina, ya sean como materias primas o procesadas, no solamente para el mercado interno sino también para su exportación.

El deterioro fúngico es uno de los principales problemas que presentan los cultivos frutales pudiendo presentarse en las diferentes etapas agronómicas pre- o postcosecha. Por esta razón este trabajo tiene como objetivo principal la identificación de la micota presente en estos frutos, con especial interés en hongos toxicogénicos y sus metabolitos tóxicos, así como la evaluación del riesgo toxicológico derivado del consumo de frutos contaminados o productos derivados.

Se aislaron e identificaron hongos a partir de manzanas y frutos cítricos con deterioro visible externo o con deterioro interno, el cual se evidenció luego de que la fruta fuese cortada. Para el aislamiento se empleó la técnica de siembra directa, mediante la cual se obtuvieron 213 y 178 aislamientos a partir de manzanas y de frutos cítricos respectivamente. Para la identificación a nivel de género y especie, se utilizaron las claves taxonómicas correspondientes, tomando en consideración las características macroscópicas y microscópicas.

A partir de manzanas se identificaron 8 géneros fúngicos, mientras que en cítricos se obtuvieron 12. El género *Penicillium* fue el principal contaminante fúngico en ambos sustratos, coincidiendo con datos de literatura. Se tomó como objetivo de estudio para este trabajo el siguiente género fúngico toxicogénico con mayor incidencia en manzanas, *Alternaria*, ya que la información sobre este género y sus toxinas en estas frutas es muy escasa.

A nivel de grupo-especie, *Alternaria tenuissima* fue el de mayor incidencia, siendo el único presente en cítricos.

A nivel de especie, *A. mali* fue hallada con mayor incidencia en manzanas, mientras que en cítricos lo fue *A. limoniasperae*.

La producción de toxinas por las especies de *Alternaria* aisladas de ambos sustratos se evaluó *in vitro* en agar manzana (AM), a fin de evaluar el efecto matriz sobre los aislamientos procedentes de los distintos frutos estudiados.

Las toxinas evaluadas fueron Alternariol (AOH), Alternariol monometil éter (AME) y Ácido tenuazónico (TeA). Los valores máximos producidos por aislamientos provenientes de manzanas (*in vitro*) fueron 282.529, 1.541.219 y 79.764 µg/Kg para AOH, AME y TeA respectivamente. Mientras que para cítricos fueron 111.295, 1.477.352 y 8.913 µg/Kg para AOH, AME y TeA respectivamente.

Se analizó además la ocurrencia natural de toxinas de *Alternaria* en manzanas con y sin lesión o signos de deterioro evidente. Las concentraciones máximas de las toxinas en manzanas contaminadas naturalmente fueron 1.809, 21.764 y 55 µg/Kg para AOH, AME y TeA respectivamente.

Palabras claves: Hongos, micotoxinas, manzanas, cítricos, *Alternaria*, alternariol, alternariol monometil éter, ácido tenuazónico.

Spoilage and toxigenic fungi in citrus and apples grown in Argentina

Abstract

Apples and citrus fruits are major crops in Argentina, either as raw or processed materials, not only for the domestic market but also for export.

Fungal decay is one of the main problems affecting the fruit crops, which may arise at different agronomic stages, pre- or post-harvest. For this reason this work has as main objective the identification of the mycobiota from these fruits, with special interest in toxigenic fungi and their toxic metabolites as well as the assessment of the toxicological risk from consumption of contaminated fruits or fruit byproducts.

Fungal genera from apples and citrus fruit with visible external damage or internal spoilage were isolated and identified. Direct plating technique was used for isolation of 213 and 178 isolates from apples and citrus fruits, respectively. The corresponding taxonomic keys were used for identification to genus and species level, taking into consideration the macroscopic and microscopic characteristics.

Eight fungal genera were identified from apples, while 12 were obtained from citrus fruits. The genus *Penicillium* was the main fungal contaminant on both substrates, in agreement with literature data. The objective of study for this work was the second toxigenic fungal genus with high incidence in apples, *Alternaria*, due to the scarce information on this genus and its toxins in these fruits.

The *Alternaria tenuissima* species-group had the highest incidence in both substrates. At species level, *A. mali* was found with the highest incidence in apples, while *A. limoniasperae* was the main citrus fruit contaminant.

Toxin production by *Alternaria* species isolated from both substrates was evaluated *in vitro* in apple agar (AM), to assess the matrix effect on the isolates from different fruits.

The toxins evaluated were alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) and tenuazonic acid (TeA). The maximum concentrations produced by isolates from apples *in vitro* were 282.529, 1.541.219 and 79.764 µg/Kg for AOH, AME and TEA respectively. For citrus fruit isolates, levels found were 111.295, 1.477.352 and 8.913 µg/Kg for AOH, AME and TeA respectively.

The natural occurrence of *Alternaria* toxins in apples with and without evident signs of injury or spoilage was also analyzed. The maximum concentrations of toxins in naturally contaminated apples were 1.809, 21.764 and 55 µg/Kg for AOH, AME and TeA, respectively.

Keywords: Fungi, mycotoxins, apples, citrus fruit, *Alternaria*, alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid.

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Hongos

Los hongos son un grupo muy amplio y diverso de microorganismos. Se estima que en el planeta habitan alrededor de 1.500.000 especies, de las cuales solo se reconocen unas 80.000 (Hawksworth, 2001). Históricamente han sido comparados con las plantas e incluidos dentro del estudio de la botánica. Estudios contemporáneos indican que estos organismos están más estrechamente relacionados con los animales probablemente por un ancestro común similar a un coanoflagelado.

Los hongos han explotado exitosamente muchos hábitats para obtener sus nutrientes como compuestos orgánicos preformados, ya que son heterótrofos (Jacquot y Gadal, 2014). Se han adaptado a casi todos los medios y formas posibles de vida, tanto acuáticas como terrestres. Existen especies que viven bajo la nieve, en la Antártida se identificaron unas 75 especies; también habitan en aguas dulces y saladas, arenas tórridas del desierto y de las playas, estiércol, madera, tierra, además son el componente principal de la unidad liquénica.

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 el contrario, muchos metabolitos fúngicos presentan acciones terapéuticas, de ellos se obtienen compuestos 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, llegando a superar el billón de dólares por año (Hladki, 2009).

Desde hace siglos, el hombre ha utilizado los hongos que se desarrollan en los alimentos para obtener otros alimentos con características organolépticas diferentes al original. Existe una larga tradición del empleo de algunos hongos en la producción de quesos, salame, en la fermentación de cerveza, producción de vinos, etc. (Soriano y col., 2007).

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. Algunos de ellos pueden, además, acumular metabolitos secundarios tóxicos bioactivos en los cultivos infectados, las micotoxinas.

1.2 Deterioro fúngico de frutas

Las frutas tienen un rol importante en la nutrición humana ya que proveen de factores necesarios para el crecimiento, como son las vitaminas y minerales, esenciales en la dieta, y son una importante fuente de carbohidratos, antioxidantes y sustancias anticancerígenas. Uno de los factores limitantes que influye en el valor económico de la fruta es el periodo de vida corto, ocasionado por el ataque de patógenos. Se ha estimado que aproximadamente del 20 al 25% de las frutas cosechadas son deterioradas por patógenos durante el manejo postcosecha, incluso en países desarrollados (Droby, 2006; Zhu, 2006). En países en vías de desarrollo, las pérdidas postcosecha son frecuentemente mayores, debido a las inadecuadas condiciones de transporte y almacenamiento.

La infección fúngica puede ocurrir durante el desarrollo de la planta en el campo, cosecha, manipulación, transporte, almacenamiento, postcosecha, en el punto de expendio, o incluso después de ser adquirido por el consumidor. Además las frutas contienen altos niveles de azúcares; sus nutrientes esenciales y sus bajos valores de pH, las hacen altamente susceptibles al deterioro fúngico (Singh y Sharma, 2007).

Cuando la penetración en el huésped ocurre en el campo, el patógeno, el cual se encuentra entonces en su fase inicial o de reposo de la infección, puede llegar a la etapa de almacenamiento dentro del tejido del huésped sin provocar ningún síntoma de deterioro detectable. Además, aun cuando no haya existido una infección antes de la cosecha, las esporas fúngicas, que forman parte de la población de microorganismos transportados por el aire, pueden permanecer sobre las frutas y vegetales durante su crecimiento y continuar en su superficie hasta el almacenamiento.

Los géneros de hongos más comúnmente presentes en las superficies de ramas, hojas, partes de las flores, frutos y otros órganos de las plantas, después de la cosecha, son *Cladosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium* y otros (Figura 1).

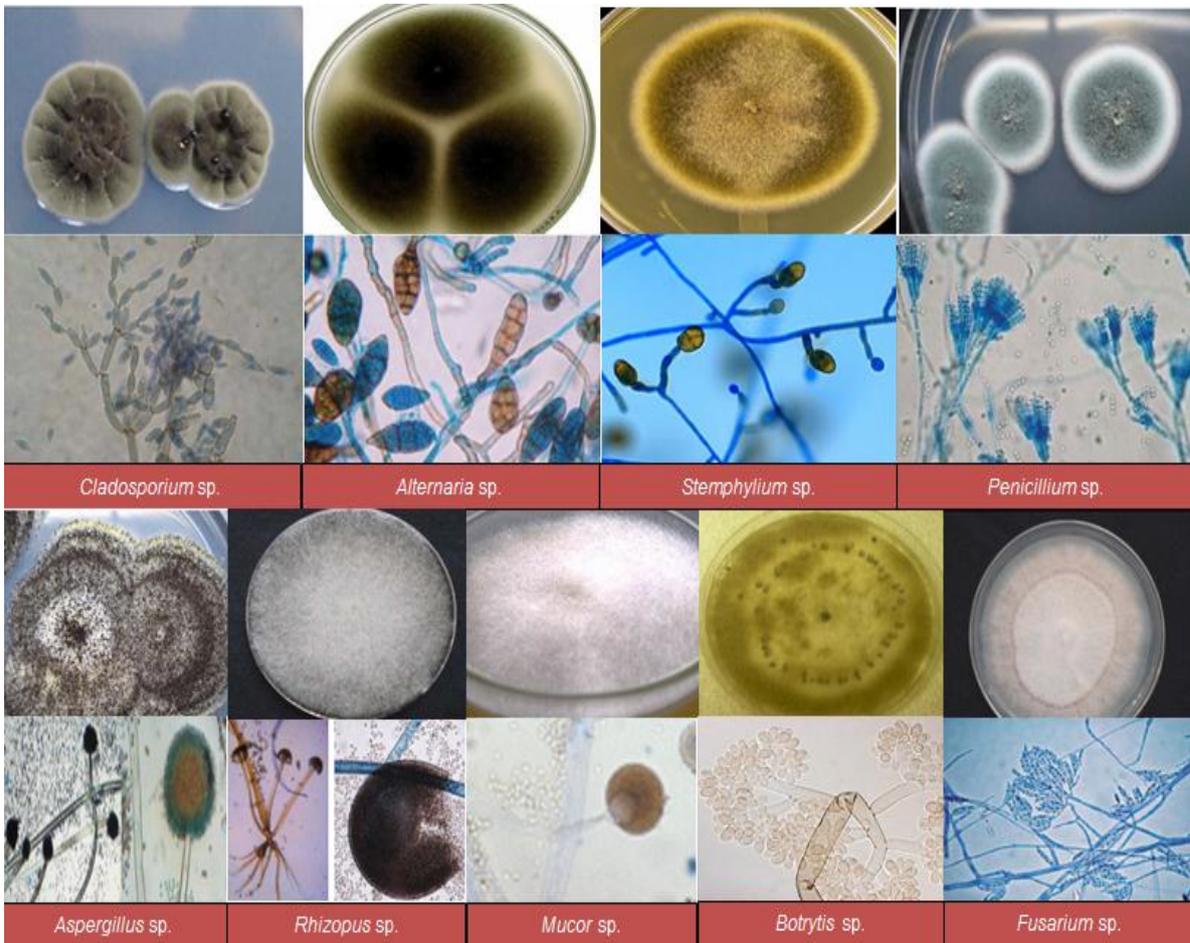


Figura 1: Principales hongos contaminantes de alimentos (Bonifaz, 2012).

Muchos de los hongos transportados por el aire son los agentes causales más importantes del deterioro de las frutas y vegetales cosechados; dadas las condiciones apropiadas, se desarrollan y causan el deterioro. Algunos patógenos luego de la cosecha se mantienen en los escombros, en el campo y pueden, en condiciones adecuadas, desarrollarse y producir nuevas esporas. Estas esporas son fácilmente transportadas por corrientes de aire, vientos, lluvias, o dispersadas por insectos a las flores y frutos jóvenes, en diferentes etapas de desarrollo, y constituyen una potencial fuente de contaminación. La

tierra, el agua de irrigación y los escombros de las plantas, son una importante fuente de infección en varios vegetales. A pesar de la gran diversidad de microorganismos que portan las frutas en su superficie durante el almacenamiento, solo unas pocas especies pueden atacarlas naturalmente, mientras que otras que residen en la superficie, en ocasiones en periodos prolongados, no logran penetrar y por ende no causan deterioro. El desarrollo de la enfermedad durante el almacenamiento depende, primordialmente, de la existencia de un microorganismo apropiado en un huésped determinado. Sin embargo, para que ocurra efectivamente la infección deben darse las condiciones adecuadas para que la espora germine en la superficie del huésped, y logre atravesar los tejidos vegetales, colonizando el fruto (Barkai-Golan, 2001).

1.3 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular ($P_m < 700$ kDa) producidos por determinadas especies fúngicas al final de la fase exponencial de crecimiento y durante la fase estacionaria (Soriano y col., 2007).

Las micotoxinas son contaminantes naturales de piensos, semillas y diversos alimentos de origen vegetal. Las especies de hongos que producen micotoxinas son muy comunes, y pueden crecer en una gran variedad de sustratos bajo un amplio rango de condiciones ambientales, por lo que se los encuentra frecuentemente en una amplia diversidad de productos agrícolas alrededor del mundo.

Estos metabolitos secundarios fúngicos presentan una amplia gama de efectos toxicológicos en el hombre y los animales. En bajas concentraciones, algunas de ellas pueden causar enfermedades autoinmunes, y tener propiedades alérgicas, mientras que otras son teratogénicas, carcinogénicas y mutagénicas (Bennett y Klich, 2003; CAST, 2003).

La exposición a micotoxinas puede ocurrir a través de la ingestión, inhalación y contacto dérmico, lo cual es casi siempre accidental. 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 derivados de animales (carne, leche, huevo) (CAST, 2003). La mayoría de las micotoxinas son estables al calor dentro del rango de temperatura convencional para el procesamiento de alimentos (80-121°C), por lo cual no se eliminan en los procesos industriales y pueden además llegar al consumidor a través de alimentos procesados (Milicevic y col., 2010).

Se conocen hasta el momento más de 400 micotoxinas. Sin embargo, la atención científica está principalmente enfocada en aquellas que han probado ser carcinogénicas y/o cuya toxicidad ha sido demostrada en humanos y animales (Huffman y col., 2010).

1.4 Géneros de hongos micotoxigénicos

Los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Stachybotrys*, son reconocidos como los principales micotoxigénicos (Milicevic y col., 2010; Reddy y col., 2010), y son responsables de la producción de las principales micotoxinas de relevancia agrícola (Magan y Olsen, 2004). La mayoría de estos hongos infectan las plantas antes de la cosecha y pueden ser clasificados como fitopatógenos, mientras que otros comúnmente se vuelven activos en etapas postcosecha, cuando las condiciones de almacenamiento favorecen el desarrollo fúngico. Las especies de *Fusarium* son fitopatógenos que se encuentran comúnmente en cosechas de cereales y otros productos, y estos producen toxinas, antes y después de la cosecha. Algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* son también patógenos de plantas o comensales, pero estos géneros son más comúnmente asociados con productos y alimentos durante el secado y el almacenamiento (Pitt, 2000).

Algunos hongos, como por ejemplo, los patógenos necróticos de trigo, *Stagonospora nodorum*, *Pyrenophora tritici-repentis* y *Alternaria alternata*, son capaces de sintetizar una variedad de compuestos tóxicos durante el desarrollo de la enfermedad (Solomon, 2011). Sin embargo, no todas las infecciones pueden ser consideradas como patogénicas, ya que muchas veces la invasión fúngica no se asocia con los síntomas de una enfermedad en la planta. Por esta razón, las micotoxinas pueden acumularse aún en productos vegetales sin aparente deterioro.

Los hongos, a través de la producción de micotoxinas, representan la mayor fuente de contaminación de piensos y alimentos a nivel mundial (Binder, 2007). La contaminación resultante de piensos y alimentos puede conducir a una amplia gama de síndromes agudos y crónicos, incluyendo la inhibición del crecimiento de animales de granja, pérdida de fertilidad, inmunosupresión, neurotoxicidad y diferentes tipos de cáncer (Binder, 2007; Bryden, 2007). Manejar el riesgo planteado por micotoxinas involucra varias estrategias para reducir los niveles de infección fúngica en el campo y los lugares de almacenamiento postcosecha. Un manejo adecuado de rotación de cultivo y administración de fungicidas, representa el rol más importante en la lucha contra las infecciones en campo, y en muchos casos el manejo de insectos a través del uso de insecticidas o cultivos genéticamente modificados, provee reducciones significativas en los niveles de micotoxinas, ya que los daños causados por los insectos representan una ruta primaria para la infección fúngica (Bakan y col., 2002; Binder, 2007; Wu, 2006).

1.5 Control de micotoxinas en las diferentes etapas de producción

La producción de micotoxinas es altamente susceptible a la temperatura, actividad de agua (a_w), pH y concentración de oxígeno, los mismos factores ambientales que afectan el crecimiento de los hongos toxicogénicos. Entre ellos, la humedad y temperatura son dos factores que tienen un efecto crucial en la proliferación de hongos y biosíntesis de toxinas (Paterson y Lima, 2010).

La incidencia y nivel de contaminación con micotoxinas están estrechamente relacionados a la posición geográfica y factores estacionales, así como también el cultivo, cosecha, almacenamiento y condiciones de transporte (Milicevic y col., 2010).

La contaminación con micotoxinas se puede dividir en aquella que se produce en los cultivos en desarrollo (precosecha) y la que se produce después de la maduración (postcosecha). En el periodo de precosecha, los cultivos que experimentaron un estrés significativo, ya sea por sequía o ataque de insectos, son altamente susceptibles a la contaminación. Las medidas preventivas se basan en buenas prácticas agrícolas, incluyendo técnicas para aumentar la resistencia de la planta, 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. Durante el periodo postcosecha, el control de la humedad y temperatura de los productos almacenados, determinan en gran medida el grado de actividad fúngica y consecuentemente la síntesis de micotoxinas (Bryden, 2007). El contenido de humedad en granos 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. Además de los métodos que modifican el ambiente para el desarrollo fúngico, pueden utilizarse compuestos inhibidores del crecimiento. Se han utilizado tratamientos con bisulfito de sodio, ozono, amonio, ácidos y bases, para el control del crecimiento fúngico y la biosíntesis de micotoxinas en granos almacenados (Bozoglu, 2009; Magan y Aldred, 2007). Los ácidos orgánicos, especialmente ácido propiónico, constituyen la base de numerosos antifúngicos comerciales usados en la industria de alimentos balanceados.

Más recientemente, nuevas estrategias naturales para el control de hongos micotoxigénicos han sido desarrolladas, usando productos a base de plantas (extractos y aceites esenciales) como fungicidas amigables con el medio ambiente.

Una vez formadas, las micotoxinas son muy estables, sobre todo a los tratamientos térmicos comúnmente aplicados en la industria alimentaria, como se mencionó previamente. Sin embargo, algunas prácticas del procesado pueden reducir el nivel de contaminación de las materias primas cuando estas son transformadas en productos derivados para el consumo humano.

1.6 Cítricos

1.6.1 Origen

El hábitat primitivo de las plantas de cítricos correspondía al entorno de árboles grandes que proporcionaban sombra, en los bosques lluviosos y tropicales del sudeste de Asia. Incluso antes de lo que registra la historia, movimientos de distintas especies de cítricos podrían haber ocurrido, y estas plantas fueron probablemente cultivadas en el Medio Este, como Omán, Persia y Palestina.



Figura 2: Cítricos.

Subsecuentemente, muchos cítricos podrían haber sido introducidos hacia la región del Mediterráneo (Italia y sus alrededores), por el Imperio Romano. Las naranjas fueron reintroducidas entre los años 1400 y 1500 A.C., a través de las rutas comerciales Genovesas. Pero fueron los portugueses quienes trajeron selecciones superiores de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) y naranjas dulces de China y sureste de Asia hacia el área del Mediterráneo, probablemente alrededor de los años 1500 A.C. durante los grandes viajes. Desde las áreas del Mediterráneo, muchos cítricos fueron llevados a nuevas tierras pertenecientes a colonias portuguesas y españolas, tales como Brasil e Hispano América (Hayat, 2014).

1.6.2 Taxonomía y morfología

La taxonomía de los cítricos es la más compleja entre los frutales. Los cítricos presentan, además de la característica de hibridarse fácilmente, incluso entre los diferentes géneros, la tendencia a las mutaciones a nivel de las yemas.

Las diferentes especies del género *Citrus*, pertenecen a la familia de las Rutáceas, la cual comprende otras 1600 especies.

En cuanto a su morfología, los cítricos son plantas de hoja perenne cuyo desarrollo, aunque intermitente, presenta alternancia de un periodo de crecimiento con un periodo de reposo. Bajo condiciones favorables, los árboles cítricos viven muchos años, pero en climas cálidos, las plagas y las enfermedades acortan considerablemente este periodo de vida.

Algunas especies como el limero, florecen casi continuamente y otras como el naranjo florecen en épocas definidas. Las flores de los cítricos son perfectas (con pistilos y estambres), autocompatibles (se polinizan a sí mismas) y algunas variedades producen frutas partenocárpicamente (sin fecundación) tales como la naranja Washington y el pomelo Marsh, cuyos frutos no tienen semillas.

Los frutos de casi todos los cítricos maduran lentamente y pueden permanecer en el árbol un cierto periodo después de haber alcanzado su grado óptimo de madurez, lo que a veces permite que el fruticultor coseche de acuerdo a su necesidad. Las hojas son simples o trifoladas, los pecíolos pueden ser con o sin alas.

1.6.3 Principales Cítricos

- ***Citrus aurantifolia***: lima, limón agrio, limón dulce, limón sutil
- ***Citrus aurantium***: naranja agria
- ***Citrus sinensis***: naranja dulce
- ***Citrus reticulata***: mandarina
- ***Citrus paradisi***: pomelo (Baraona y Barrantes, 2000)

1.6.4 Producción de cítricos en el mundo y en Argentina

La producción mundial de cítricos, en el año 2013, superó los 88 millones de toneladas, liderada por la producción de naranjas (Tabla 1).

Los principales países productores de cítricos, según lo reportado por FAO, en el año 2013 fueron los siguientes:

- **Limón y limas**: India, México, China, Argentina y Brasil.
- **Naranja**: Brasil, EEUU, China, India y México.

- **Mandarina:** China, España, Turquía, Brasil y Egipto.
- **Pomelo:** China, EEUU, Vietnam, México y Sudáfrica.

Tabla 1: Producción mundial de cítricos (Federcitrus, 2014).

Especies/Citrus	Producción 2013 (toneladas)
Naranja	50.447.000
Mandarina	24.576.000
Limón	7.133.000
Pomelo	5.955.000

La producción de cítricos en Argentina, durante el año 2013, superó los 2,8 millones de toneladas, siendo la producción de limones la que lideró la lista, con un total que representó el 20,83% de la producción mundial para este cítrico (Tabla 2). Además, Argentina es el primer productor y exportador de limones en el hemisferio sur.

Las principales regiones productoras de cítricos se encuentran ubicadas en el Noroeste Argentino, representadas por las provincias de Tucumán, Salta, Jujuy y Catamarca, con un aporte del 62% de la producción; en el Noreste Argentino (Entre Ríos, Corrientes y Misiones), junto con Buenos Aires, con un aporte del 37% y el 1% restante en otras regiones (Figura 3).

Tabla 2: Producción de cítricos en Argentina (Federcitrus, 2014).

Especies/Citrus	Producción 2013 (toneladas)
Limón	1.486.000
Naranja	860.000
Mandarina	365.000
Pomelo	114.000

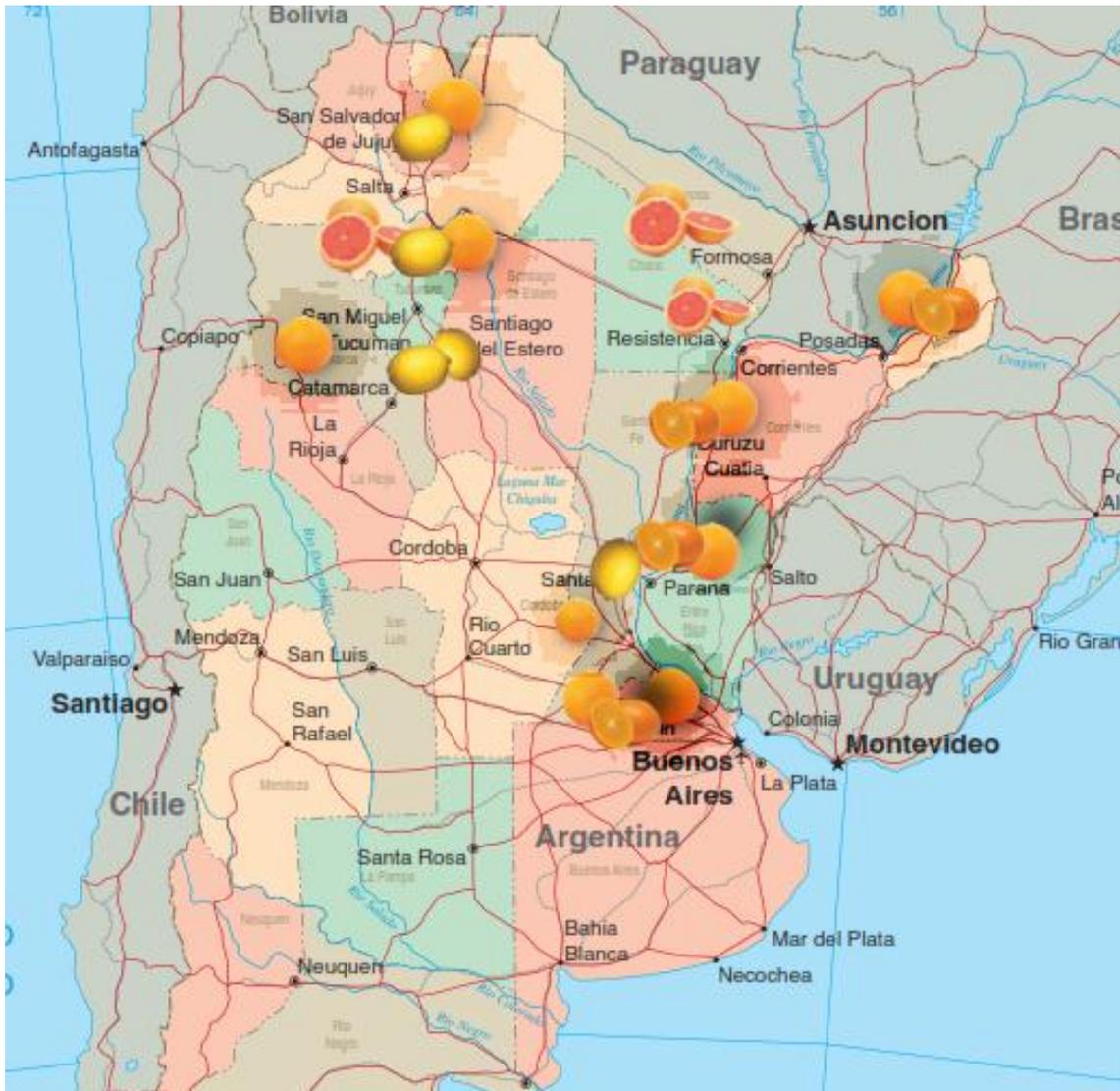


Figura 3: Principales zonas productoras de cítricos en Argentina (Federcitrus, 2014).

En Argentina se consumen en promedio 20,6 kg de cítricos por habitante y por año, de los cuales aproximadamente el 66% corresponde al consumo de naranjas, el 21% al de mandarinas, el 8% al de limones, y el 5% al de pomelos.

1.6.5 Alteraciones fúngicas en cítricos

Los cítricos son atacados por diversos hongos desde el momento de su recolección hasta su consumo, estos hongos producen una depreciación del producto, que en muchos casos debe ser desechado y no se puede comercializar. Los hongos que producen mayores pérdidas son los que

pertenece al género *Penicillium*. Otros hongos importantes en el deterioro son los de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum* o *Rhizopus*.

Las principales alteraciones fúngicas que afectan a los cítricos son las siguientes:

- **Podredumbre verde:** causada por *Penicillium digitatum*
- **Podredumbre azul:** causada por *Penicillium italicum*
- **Podredumbre negra:** causada por *Alternaria citri*
- **Podredumbre verde-gris:** causada por *Cladosporium herbarum*
- **Aguado:** causada por *Phytophthora citrophthora*
- **Podredumbre amarga:** causada por *Geotrichum candidum*
- **Antracnosis:** causada por *Colletotrichum gloeosporioides*
(Infoagro, 2011a)

1.7 Manzanas

1.7.1 Origen

Se desconoce el origen exacto del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Según V.V. Ponomarenko es *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem., una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media, la especie de la que se habrían originado, hace 15.000-20.000 años, las primeras variedades cultivadas de manzano. El manzano fue introducido en España por los pueblos del norte de África durante el proceso de romanización de la península.



Figura 4: Manzana.

1.7.2. Taxonomía y morfología

- **Familia:** Rosaceae.

- **Especie:** *Pyrus malus* L. (syn. *Malus domestica*)

- **Porte:** alcanza como máximo 12 m de altura y tiene una copa globosa. Tronco derecho que normalmente alcanza de 2 a 2,5 m de altura, con corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos y escamosa y gris parda sobre las partes viejas del árbol. Tiene una vida de unos 60-80 años. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo, de color verde oscuro, a veces tendiendo a negruzco o violáceo. Los brotes jóvenes terminan con frecuencia en una espina.

- **Sistema radicular:** raíz superficial, menos ramificada que en el peral.

- **Hojas:** ovales, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandas, con el haz verde claro, de doble longitud que el pecíolo, con 4-8 nervios alternados y bien desarrollados.

- **Flores:** grandes, casi sentadas o cortamente pedunculadas, que se abren unos días antes que las hojas. Son hermafroditas, de color rosa pálido, a veces blanco y en número de 3-6 unidas en corimbo.

- **Floración:** tiene lugar en primavera, generalmente por abril o mayo en el hemisferio Norte, las manzanas más precoces maduran en junio, aunque existen variedades que mantienen el fruto durante la mayor parte del invierno e incluso llegan a recogerse en marzo o abril.

- **Fruto:** pomo globoso, con pedúnculo corto y numerosas semillas de color pardo brillante.

1.7.3 Variedades

Las variedades de manzano son innumerables (pasan del millar), ya que ha acompañado al hombre desde tiempos remotos. Entre las principales tenemos: Golden Delicious (Deliciosa Dorada), Red Delicious (Deliciosa roja), Starking, Richared, Starkrimson, Reineta blanca del Canadá, Verde doncella, Galiaxis, Roma Beauty (Belleza de Roma), Esperiega de Ademuz, Gala, Granny Smith (Infoagro, 2011b).

1.7.4 Producción de manzanas en el mundo y en Argentina

Los principales países productores de manzanas son China, Estados Unidos, Turquía, Polonia e Italia. Argentina se ubica en el onceavo lugar a nivel mundial, cuya producción superó los 1,2 millones de toneladas, en el año 2013 según FAO, ocupando el segundo lugar como productor en América del Sur.

Tabla 3: Producción mundial de manzanas (FAO, 2013).

Países	Producción 2013 (toneladas)
1 China (Continental)	39.682.618
2 Estados Unidos de América	4.081.608
3 Turquía	3.128.450
4 Polonia	3.085.074
5 Italia	2.216.963
6 India	1.915.000
7 Francia	1.737.482
8 Chile	1.709.589
9 Irán (República Islámica)	1.693.370
10 Federación de Rusia	1.572.000
11 Argentina	1.245.018
12 Brasil	1.231.472

En Argentina, el 85% de la producción de manzana se concentra en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén y en el Valle Medio de Río Negro. El resto se genera en el Valle de Uco (Mendoza), 25 de Mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan), entre otros puntos. Se estima que la superficie cultivada con manzana supera las 27.000 ha.

El 65% de la cosecha nacional de manzana corresponde a la variedad Red Delicious y sus clones; el 15% a Gala y sus clones, coincidiendo este porcentaje con el de Granny Smith. El 5% restante se reparte entre Pink Lady, Rome Beauty, Golden Delicious, Fuji y Braeburn.

El eslabonamiento productivo y comercial en pomáceas (manzana y pera), ubicado en las provincias de Río Negro y Neuquén, representa el 71,2% de la superficie cultivada del país (53.500 has), así como el 84,7% de la producción y

el 95% de las exportaciones en fresco e industriales, superando el valor de las exportaciones de las regiones de Cuyo, NOA y NEA.

En el valle de Río Negro se distinguen en tres sectores principales bajo riego: Alto Valle, Valle Medio y Valle Inferior. Cada uno de estos posee una actividad productiva principal diferente siendo el Alto Valle la zona productora de peras y manzanas por excelencia. La actividad frutícola se concentra en cuatro zonas o microrregiones distintas: el Alto Valle, el Valle Medio, Gral. Conesa y Río Colorado (Figura 5).

Del total de la producción de manzanas, un 25% se destina a la exportación, un 35% al mercado interno y un 41% a la industrialización. El principal producto elaborado es el jugo concentrado y, en menor medida, la sidra y las conservas. El jugo representa el 71% de la producción industrial, seguido por la sidra con el 28%. La producción de jugo concentrado de manzana en el año 2013 fue de 44 mil toneladas (67% del total de la producción). Cabe destacar que el jugo es un producto fuertemente orientado al mercado de exportación al que se destina el 95% de la producción (FUNBAPA, 2013).

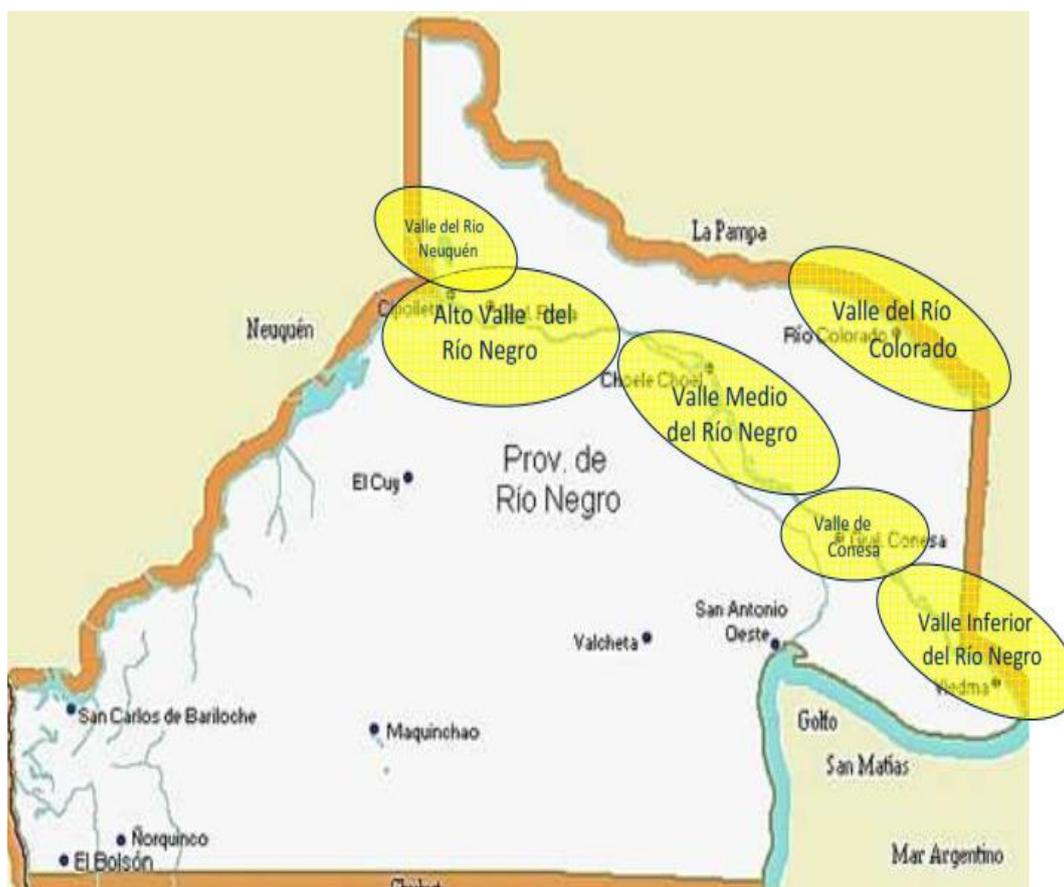


Figura 5: Principales zonas productoras de manzanas en Argentina (INTA, 2012).

En Argentina se consumen en promedio 8 kg de manzana por habitante y por año, valores bajos comparados con China y la Unión Europea. En el país son escasas las campañas nacionales de promoción del consumo. El 80% de la manzana consumida en el mercado interno corresponde a Red Delicious, el 12% a Granny Smith y el 5% a Gala (Cafi, 2013).

1.7.5 Alteraciones fúngicas en manzanas

Entre las principales alteraciones fúngicas se encuentran:

-Corazón Mohoso: causado por varios géneros fúngicos incluyendo *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Las manzanas Red Delicious son particularmente susceptibles debido a la abierta o profunda cavidad del seno. El baño de las manzanas (drenching) puede incrementar la incidencia del corazón mohoso.

-Moho azul y moho gris: las dos más importantes enfermedades de postcosecha de las manzanas Red Delicious son causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Ambos hongos son patógenos de heridas. La sanitización es crítica para el control de estas enfermedades. El baño de las manzanas (drenching) puede esparcir las esporas de *Penicillium* y *Botrytis* a las heridas producidas en la cosecha. El uso de fungicidas durante el baño de las manzanas (drenching) puede reducir la pudrición.

1.8 *Alternaria* spp.

1.8.1 Antecedentes

En 1816, Nees describió por primera vez este hongo, caracterizado por cadenas de esporas con pico apical, bajo el nombre de *Alternaria tenuis*. Posteriormente, Fries, en 1832, describió que las especies de *Alternaria* estaban caracterizadas por dictiosporas multicelulares que presentaban un pico y estaban producidas en cadenas. El género *Alternaria* fue establecido en base a la morfología conidial en 1933, unificando un grupo de hongos filamentosos que habían sido denominados previamente *Alternaria tenuis*, *Torula alternata* y *Macrosporium cheiranthi*, entre otros (Simmons, 2007).

1.8.2 Taxonomía

El género *Alternaria* fue ubicado en el Reino Fungi, Subreino Eumycotera, Filo Fungi Imperfecti, Clase Hypomycetes, Orden Moniliales, Familia Dematiaceae. Debido a la ausencia de un estado sexual identificado para la vasta mayoría de las especies, este género fue clasificado dentro del Filo de Hongos Imperfectos. Sin embargo, Simmons (2007) estableció posteriormente que todos los teleomorfos de *Alternaria* son miembros del género Ascomycete *Lewia* Barr & Simmons (*Pleosporaceae*; Simmons 1986). *Lewia* es un apartado de un heterogéneo grupo de especies con ascómata relativamente pequeños acumulados en *Pleospora* Rabh, (*sensu* Wehmeyer, 1961). La relación entre *Lewia* y los miembros del grupo-especie *A. infectoria* está en la actualidad claramente establecida.

El género *Alternaria* abarca un complejo grupo de especies fúngicas saprófitas y patógenas (Thomma, 2003). Muchas de ellas son saprófitas, comúnmente halladas en el suelo o en tejido vegetal en descomposición. Algunas especies son patógenas de plantas, generalmente oportunistas, que causan un amplio rango de enfermedades con un importante impacto económico en una gran variedad de plantas de relevancia agronómica, incluyendo cereales, oleaginosas, hortalizas y frutas. *Alternaria* spp. son también reconocidas patógenas en etapa post-cosecha, siendo capaces de deteriorar frutos y hortalizas en las etapas de almacenamiento y/o distribución.

Desde el punto de vista clínico, algunas especies son frecuentemente reportadas como alergénicas, y se consideran hongos oportunistas asociados con micosis en animales y humanos además de ser patógenos de plantas. *A. alternata*, en particular, ha ganado relevancia como un patógeno humano emergente, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Es de vital importancia su capacidad de producir metabolitos secundarios tóxicos, muchos de los cuales son micotoxinas, que han estado implicadas en el desarrollo de enfermedades en mamíferos y humanos. Estos metabolitos pueden acumularse en las partes comestibles de las plantas, cuando las especies toxicogénicas contaminan los cultivos, representando un riesgo para la salud de los consumidores.

1.8.3 Características y condiciones de crecimiento

La principal característica taxonómica del género es la producción de conidios grandes, multicelulares, de color oscuro (melanizados), con septos transversales y longitudinales (phaeodictiosporas). Estos conidios son más anchos en la base y gradualmente se afinan hacia un pico o ápice elongado, dándole un aspecto de clava (Figura 6.d). Se pueden producir aislados, o, generalmente en cadenas simples o ramificadas, a partir de conidióforos simples, 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 (Figura 6.b).

Las colonias son de crecimiento rápido y macroscópicamente presentan un aspecto veloso, al principio de color grisáceo, adquiriendo luego tonos negros oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia.

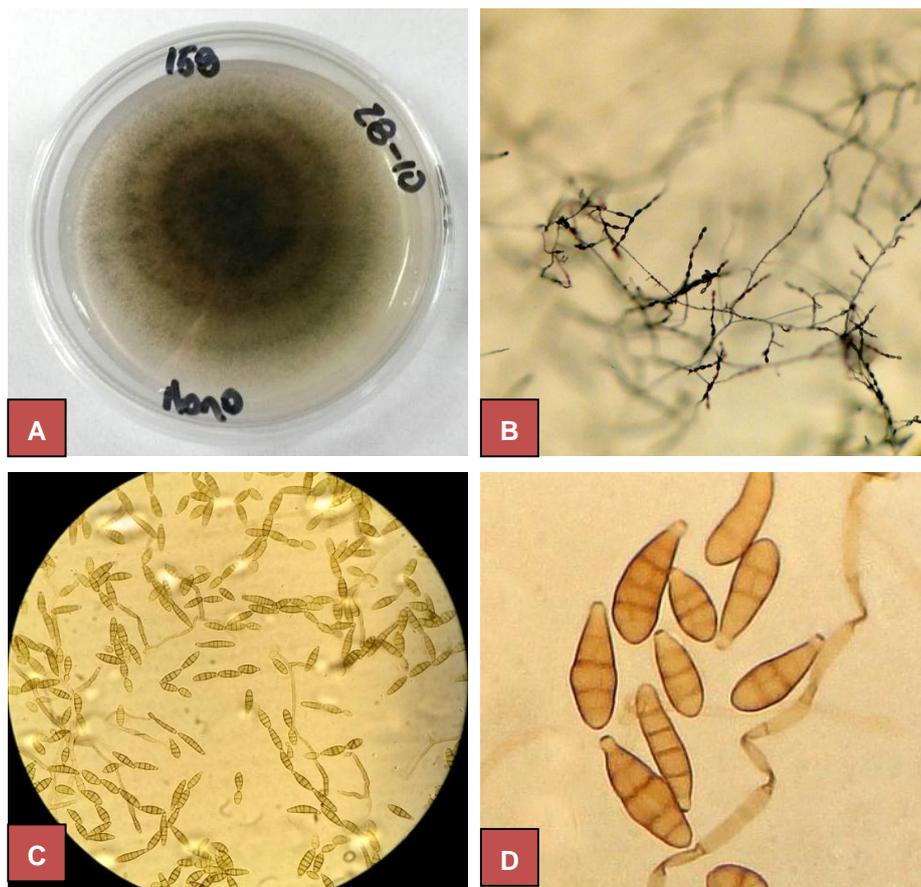


Figura 6: A) Colonia de *Alternaria* sp. en PCA; B) Conidios observados bajo microscopio estereoscópico (40x); C) Conidios observados bajo microscopio (400x); D) Conidios (dictiosporas) (1000x).

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de *Alternaria* spp. se destaca 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 su 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 crecer abarca desde -3°C hasta los 35°C (Sommer, 1985), por lo que con frecuencia es responsable de alteraciones en alimentos vegetales almacenados en condiciones óptimas de refrigeración o congelación (Barkai-Golan y Paster, 2008). Con relación a la actividad de agua (a_w), el crecimiento de *Alternaria* spp. es óptimo a valores elevados (0,99), pero la a_w mínima necesaria para su desarrollo es de 0,84 (Magan y Baxter, 1994; Magan y Lacey, 1984).

1.8.4 Clasificación

La clasificación taxonómica a nivel especie del género *Alternaria* se encuentra aún en discusión en el ambiente científico. Una clasificación basada en las características conidiales es complicada, debido a la extrema similitud, no solamente entre especies del género, sino también a la existencia de otros géneros fúngicos, como *Stemphylium* o *Ulocladium*, que producen dictiosporas similares a las de *Alternaria* (Thomma, 2003). Cerca de 300 especies han sido descritas a nivel mundial basadas en las características de los conidios. Sin embargo, es común que surjan errores debido a la variabilidad de los caracteres morfológicos, que se ven afectados tanto por factores intrínsecos, como por condiciones ambientales. Como resultado, en muchos casos, una determinada especie ha sido accidentalmente dividida en varias, debido a esta variabilidad. En otros, por el contrario, y con fines de simplificar la identificación, se han agrupado todas las especies con características similares a *A. alternata* en una única especie, con distinción de patotipos según el hospedador al cual se han asociado; estos patotipos son morfológicamente distinguibles, y ninguno puede ser identificado típicamente como *A. alternata*, ya sea por cultivo, morfología, producción de metabolitos o técnicas moleculares (Andersen y col., 2001; Simmons, 1999; Roberts y col., 2000).

Se propusieron muchos intentos de organizar el género en grupos para simplificar su clasificación. La primera y más común de las segregaciones es la distinción entre dos grandes grupos de acuerdo al tamaño de los conidios, el grupo de esporas grandes (conidios 60-100 μ) y el de esporas pequeñas (conidios <60 μ). Este último incluye especies saprótrofas, cosmopolitas, fitopatógenas y productoras de micotoxinas, y es el más comúnmente reportado en alimentos.

Más recientemente, Simmons (1992) desarrolló un sistema de clasificación organizando el género en un número de grupos-especie distinguibles por patrones tridimensionales de esporulación y morfología de conidios, cada uno de las cuales está tipificado por una especie representativa, por ej., *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. porri*, *A. brassicicola*. Esta clasificación subgenérica permite organizar la gran diversidad de especies en grupos de similitud morfológica. En trabajos posteriores, Simmons y Roberts (1993), continuaron esta organización extendiéndola a un gran número de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas, utilizando el patrón tridimensional de esporulación como herramienta para la categorización en grupos-especie. Se describieron 6 grupos principales, cada uno asociados con una especie representativa. Finalmente, Simmons (2007), en su manual de identificación recopiló toda esta información y describió 296 taxones basándose en la observación de aislamientos estables bajo condiciones de cultivo controladas.

La clasificación de Simmons (2007), basada en la morfología del conidio y el patrón de esporulación, divide inicialmente las especies de *Alternaria* en dos secciones:

Sección 1: Taxones de esporas grandes, caracterizadas de la siguiente manera.

- A. Conidios variables ampliamente ovoides, ob-ovoides, esferoides, elipsoides, sin pico (conidióforo secundario excluido).
- B. La mitad superior del conidio es angosta, con una región apical cónica o redonda; puede producir adicionalmente un pico angosto; sin filamentos angostos. Figura 7 (a. *A. brassicae*; b. *A. dianthicola*.; c. *A. sonchi*).
- C. La mitad superior del conidio es angosta y produce uno o más picos que se hacen más agostos, desde la base ancha hasta la punta más

estrecha; sin filamentos angostos. Figura 7 (d. *A. anagallidis*; e. *A. solani*; f. *A. dauci*).

D. La mitad superior del conidio es angosta y produce un pico filamentoso (ancho 1.5-2.5 μ en toda su longitud). Figura 8 (a. *A. zinniae*; b. *A. macrospora*; c. *A. anodae*; d. *A. sesami*; e. *A. rostellata*; f. *A. tomato*).

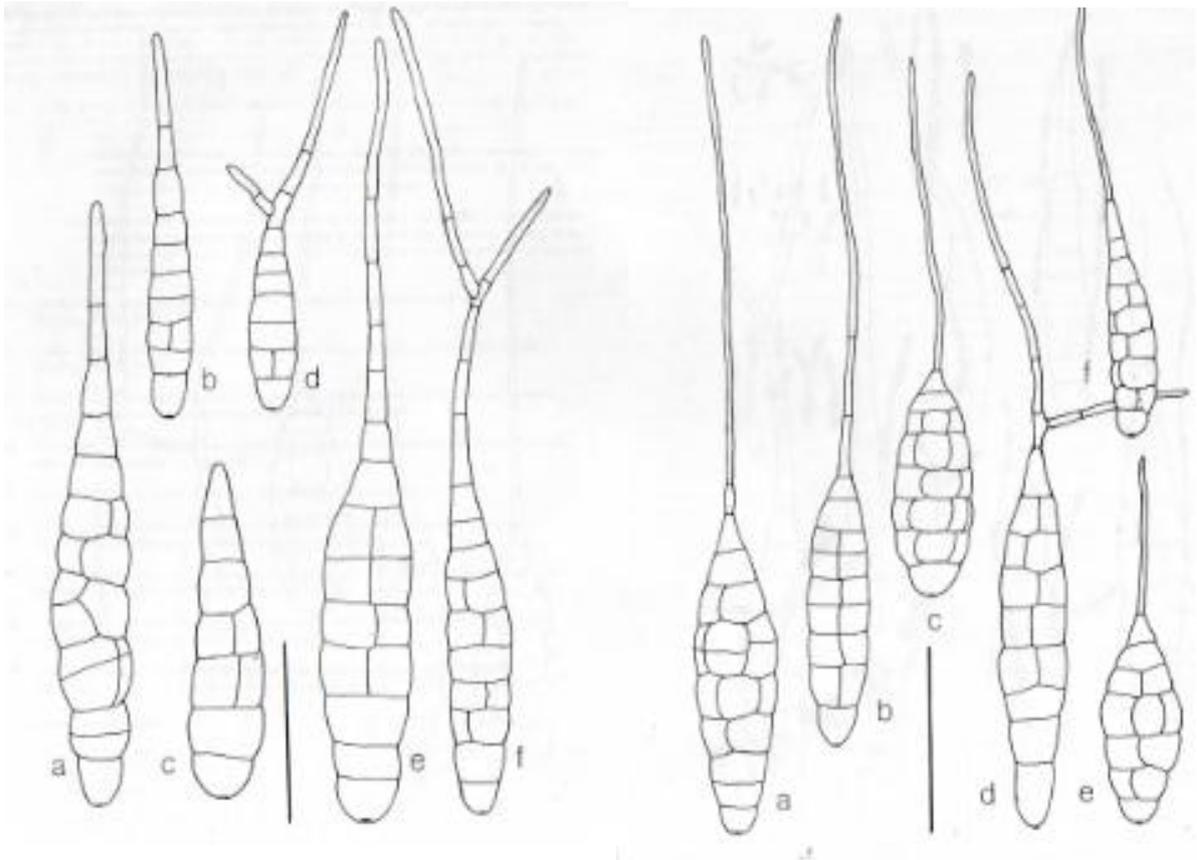


Figura 7: Conidios con pico redondeado y angosto.

Figura 8: Conidios con pico filamentoso.

Sección 2: Taxones de esporas pequeñas o medianas, caracterizadas de la siguiente manera.

A. Conidios variables ampliamente ovoides, ob-ovoides, esferoides, elipsoides, sin pico (conidióforo secundario excluido). Figura 9 (a. *A. radicina*; b. *A. cheiranthi*).

- E. Conidios solitarios; sin formación de cadenas o raramente presentes en cultivos. Figura 9 (c. *A. mouchaccae*; d. *A. molesta*).
- F. Conidios solitarios o en cadenas cortas de 2-3 conidios, algunas veces en varias pequeñas ramas de 3-10 conidios. Figura 9 (e. *A. geniostoma*; f. *A. toxicogenica*; g. *A. gaisen*).
- G. Conidios solitarios y en cadenas de (3-)4-8(-10) conidios; ramas laterales ausentes, o si ocasionalmente están presentes, no constituyen una porción dominante o consistente de la población. Figura 9 (h. *A. tenuissima*; i. *A. mali*).
- H. Conidios de (8-)10-25+ en cadenas sin ramas, ocasionalmente ramas laterales cortas, no es constituyen una porción dominante o consistente de la población. Figura 9 (j. *A. perangusta*).
- I. Conidios de 8 a 15+ en cadenas con múltiples ramas laterales cortas. Figura 10 (a. *A. yaliinficiens*).
- J. Conidios en aglomerados de cadenas ramificadas de manera variada; los conidióforos secundarios largos no son elementos conspicuos, dominantes de la arquitectura arbórea. Figura 10 (b. *A. mimicula*; c. *A. brassicicola*; d. *A. alternata*).
- K. Conidios en aglomerados de cadenas ramificadas; conidióforos secundarios comúnmente elementos conspicuos, determinantes de la forma ramificada. Figura 10 (e. *A. infectoria*; f. *A. postmessia*; g. *A. californica*).
- L. Conidios en las porciones aéreas de la colonia, nacen en matas abiertamente ramificadas cerca del ápice del elemento conidiógeno largo, erecto, solitario. Figura 11 (a. *A. arborescens*; b. *A. senecionicola*).
- M. Conidios en las porciones aéreas de la colonia, nacen en pequeños aglomerados en el ápice y en las puntas de las ramas laterales dispersas del eje conidiógeno largo, erecto, solitario. Figura 11 (c. *A. armoraciae*).

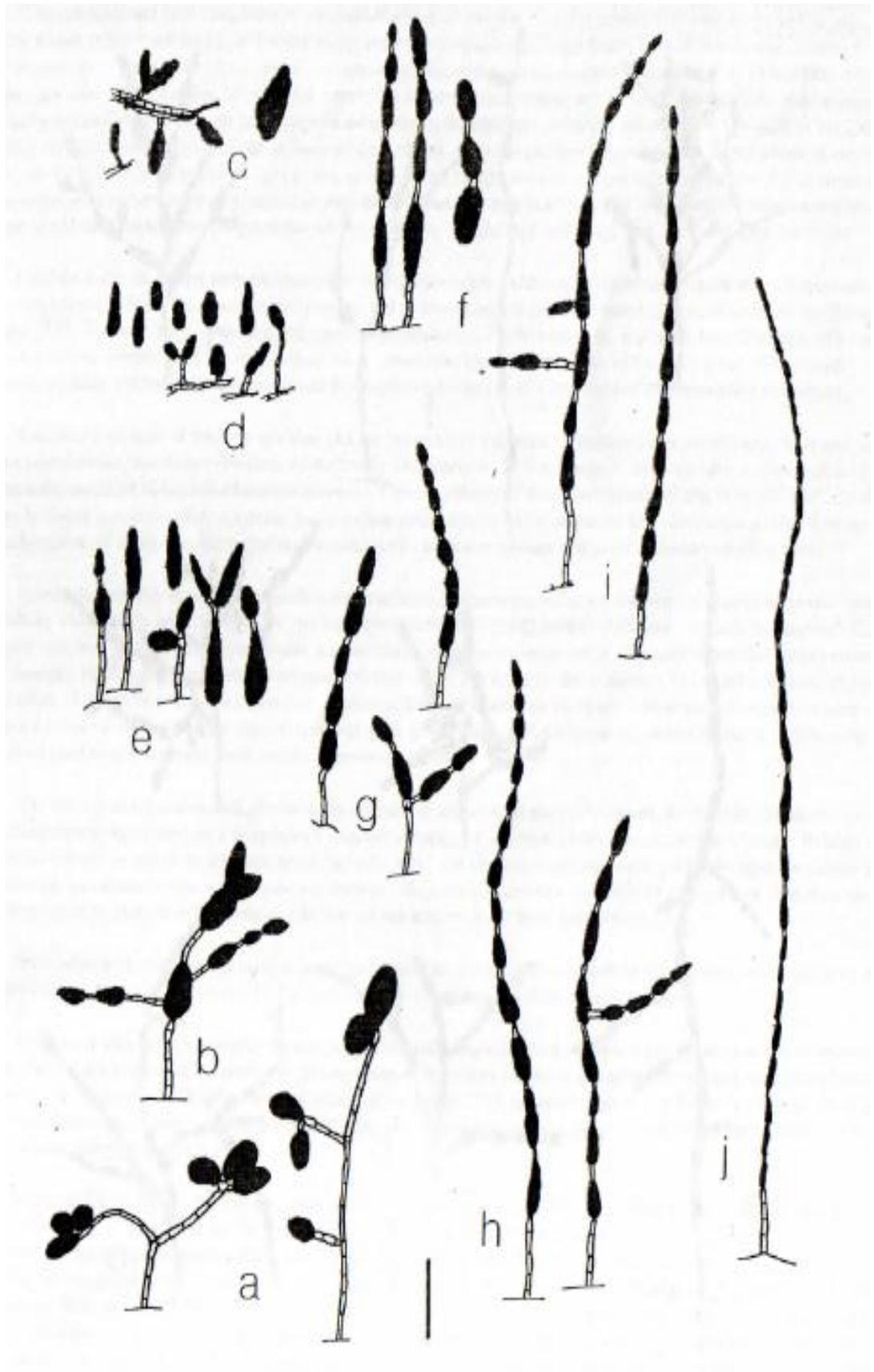


Figura 9: Formas de conidios y patrones de esporulación.

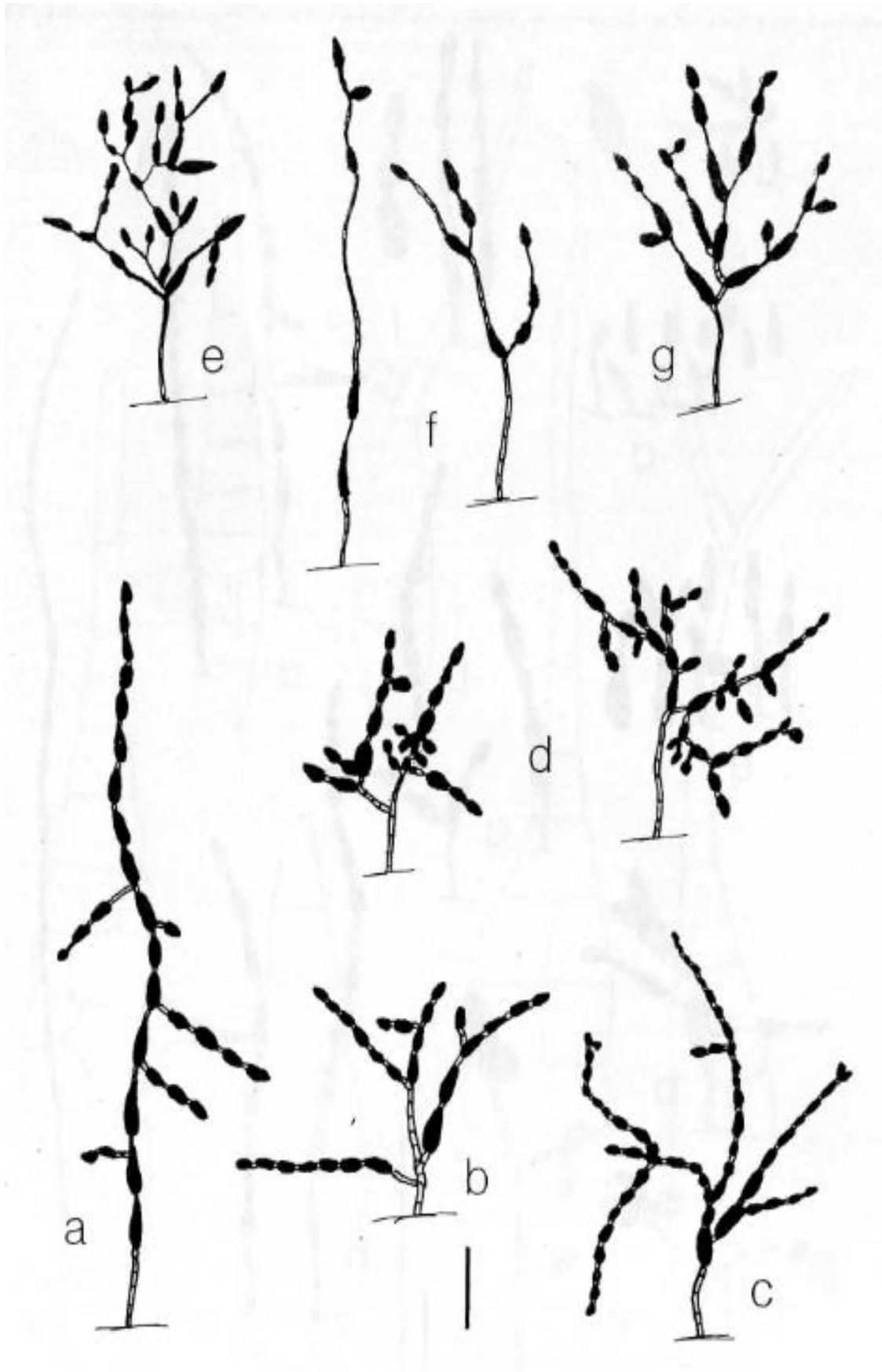


Figura 10: Formas de conidios y patrones de esporulación.

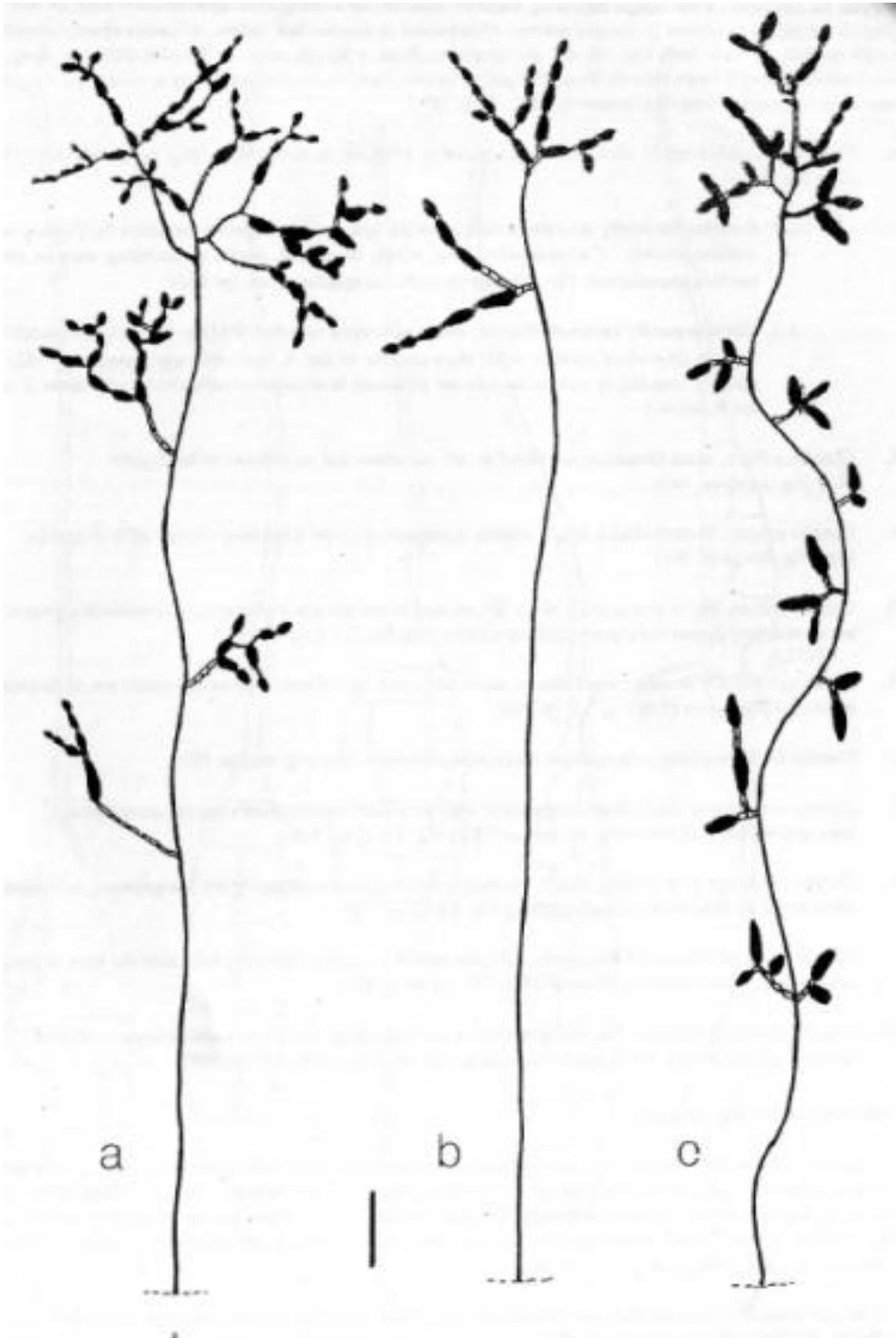


Figura 11: Formas de conidios y patrones de esporulación.

1.8.5 Alteraciones en cultivos vegetales

Alternaria puede invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y es responsable de pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento. 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; Pitt y Hocking, 1997).

1.8.5.1 Alteraciones en cítricos

Las especies de *Alternaria* producen diversas podredumbres en los frutos, entre las cuales se encuentran: 1) la mancha marrón de las mandarinas (*Citrus reticulata*), tangerinas (*Citrus tangerina*) y otros híbridos; 2) la mancha foliar en limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.); 3) la podredumbre negra de los cítricos; 4) la mancha foliar en lima mejicana (*Citrus aurantifolia*).

La mancha marrón producida por *Alternaria* spp. en las mandarinas afecta tanto al fruto como a las hojas del árbol, provocando su caída prematura. Las hojas jóvenes presentan manchas necróticas redondeadas de color marrón, rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienden a seguir las venas de la hoja, lo que les proporciona una forma que recuerda a un ojo (Timmer y col., 2000). En el fruto, las lesiones van del marrón al negro, variando desde pequeños puntos a grandes lesiones que se elevan de la superficie semejando un cráter.

La mancha foliar en limón rugoso produce en las hojas síntomas similares a los que se observan en mandarinas y lesiones puntuales, oscuras y redondeadas en los frutos.

La podredumbre negra de los cítricos afecta a la columela central del cítrico. Las lesiones, no siempre evidentes externamente, cuando aparecen se presentan como pequeños puntos marrones o negros en la parte final del pecíolo. Los frutos afectados generalmente tienen un color más claro que la fruta normal debido a la generación de etileno en respuesta a la infección. En etapas avanzadas de la enfermedad la superficie se oscurece comenzando

desde el pecíolo y la fruta suele caer al suelo. Esta enfermedad ataca a todos los cítricos y está ampliamente distribuida a nivel mundial.

Por último, la mancha foliar de los cítricos es una enfermedad que afecta principalmente a la lima mejicana, produciendo pequeñas lesiones marrón-rojizas en las hojas, rodeadas por halos cloróticos. En los frutos se observan pequeñas lesiones elevadas que desaparecen cuando la fruta madura. También se produce en pomelos, naranjas de ombligo y limas de Tahití.

La primera especie de *Alternaria* asociada a enfermedades en cítricos fue descrita como *A. citri* y se la consideró el agente causal de la podredumbre negra. En estudios posteriores realizados sobre la mancha marrón en mandarinas y la mancha foliar en limón rugoso también se identificó al patógeno como *A. citri* debido a la similitud de los síntomas observados en estos cítricos y a las características morfológicas de los aislamientos. Posteriormente, Simmons (1999) describió diez especies de *Alternaria* morfológicamente diferentes entre los patógenos de cítricos. Sin embargo, los estudios moleculares llevados a cabo por Peever y col. (2005) no demostraron diferencias genéticas significativas entre las cepas de *Alternaria* aisladas, por lo que recomendaron colapsar todas las especies de esporas pequeñas asociadas a alteraciones en cítricos en una única especie filogenética, *A. alternata*. Gran parte de la literatura posterior adoptó esta decisión, simplificando la identificación y a lo sumo distinguiendo entre diferentes patotipos de *A. alternata* según el hospedador. En algunos trabajos se mencionaron otras especies de esporas pequeñas, morfológicamente distinguibles de *A. alternata*, como causantes de estas enfermedades, entre ellas *A. arborescens* y *A. tenuissima* (Kang y col., 2002, Mojerlou y col., 2012). Por el contrario, en las frutas afectadas por la mancha foliar de los cítricos solamente se han aislado cepas de *A. limicola*, una especie de esporas grandes, morfológicamente distinguible de las otras patógenas de cítricos (Timmer y col., 2000, 2003).

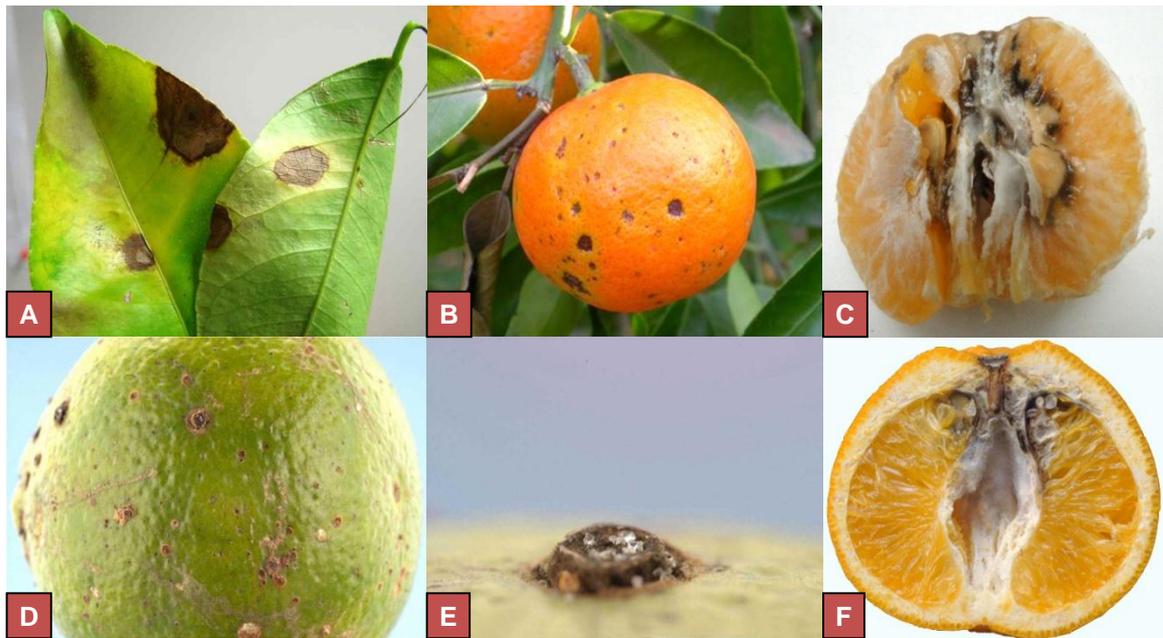


Figura 12: Lesiones de *Alternaria spp.* en cítricos. A) Mancha marrón en hojas y B) frutos de mandarina; C) podredumbre negra en mandarina; D) mancha marrón en naranja; E) vista lateral de lesión elevada “en forma de cráter”; F) podredumbre negra en naranja.

1.8.5.2 Alteraciones en rosáceas

La podredumbre provocada por *A. mali* es una enfermedad grave que afecta a los manzanos. Las lesiones aparecen en las hojas, en forma de manchas pequeñas, redondeadas y marrones, que aumentan de tamaño adquiriendo una forma de ojo de rana. Cuando las lesiones se producen en los pecíolos, las hojas se vuelven amarillas y se puede producir hasta un 50% de defoliación en los árboles que no se traten con fungicidas. Algunos autores informaron que las lesiones no son frecuentes en los frutos (Jones y Aldwinckle, 2002; Rollemberg y col., 2011). Sin embargo, en 2002 se describió una enfermedad en manzanas de la variedad Gala, en Italia, cuyos síntomas eran similares en las hojas, pero estaban acompañados de pequeñas manchas marrones circulares en los frutos, de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente centrados en las lenticelas, y rodeados por un halo rojizo, a menudo resultante en una ligera suberificación. Los aislamientos de *Alternaria* recuperados de las lesiones se ubicaron en los grupos-especie *A. alternata*, *A. arborescens*, y *A. tenuissima*, el último de los cuales incluye a la especie *A. mali* (Rotondo y col., 2012). Resultados similares se obtuvieron en plantaciones de manzanas en Australia (Harteveld y col., 2013).

El corazón mohoso es una de las más importantes enfermedades de la manzana y se define como una podredumbre que se inicia en el lóculo, donde se alojan las semillas, y se extiende hacia el mesocarpio del fruto, pudiendo devenir en el corazón mohoso seco (CMS) o el corazón mohoso húmedo (CMH). Los frutos afectados por el CMS se caracterizan por un lóculo con tejido marrón oscuro, seco y de textura similar al corcho. Los síntomas se desarrollan lentamente y la podredumbre se restringe al lóculo y el tejido adyacente al mismo. El CMH se caracteriza también por el tejido marrón oscuro, aunque la enfermedad se propaga más rápidamente hacia el interior del mesocarpio. Los síntomas externos no son evidentes hasta la cosecha, pero la podredumbre puede progresar durante el almacenamiento prolongado, llegando en algunos casos a evidenciarse en la epidermis del fruto. Sin embargo, en la mayoría de los casos la enfermedad pasa desapercibida hasta que el fruto es cortado (Ntasiou y col., 2015). La infección del corazón ocurre cuando los agentes causales se establecen en las partes senescentes de la flor y penetran a través del seno después de la formación del fruto o en etapas tardías de desarrollo del mismo (Reuveni y col., 2002). Tras la recolección, el hongo penetra en los frutos cuando se sumergen en agua contaminada en las naves de empaquetado (Jones y Aldwinckle, 2002; Niem y col., 2007).



Figura 13: Lesión de *Alternaria spp.* en hoja (A) y fruto (B) del manzano (Rotondo y col., 2012).

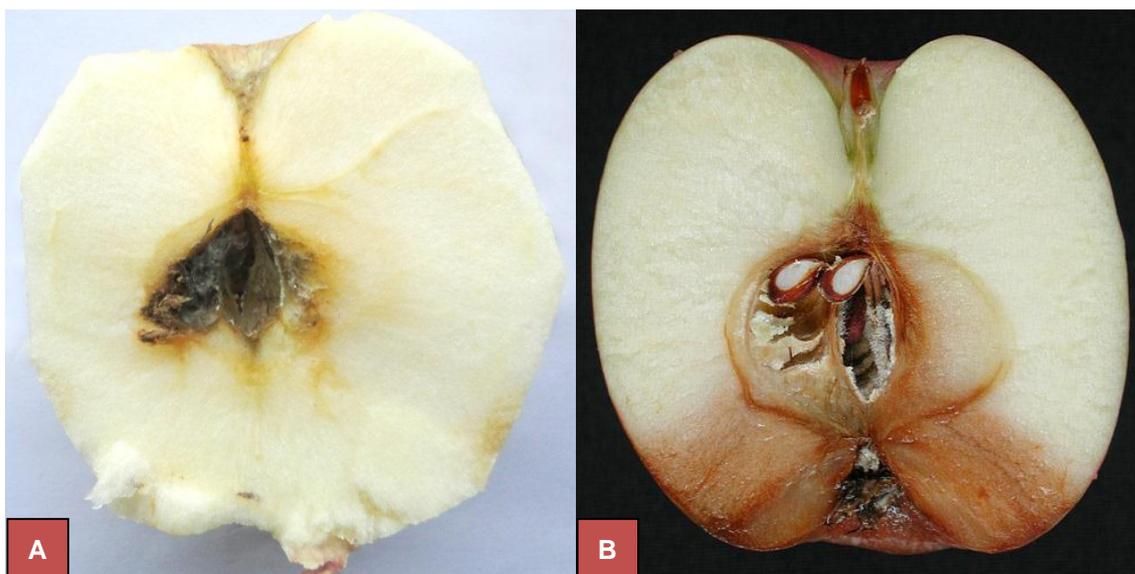


Figura 14: Corazón mohoso de manzana causado por *Alternaria* spp. A) seco; B) húmedo.

1.8.6 Micotoxinas de *Alternaria* spp.

Las especies del género *Alternaria* sintetizan más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (fitotoxinas), pero solamente una pequeña parte de ellos se han caracterizado químicamente e identificado como compuestos tóxicos para personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas (Tabla 4) (Barkai-Golan, 2008; EFSA, 2011; Ostry, 2008).

En función a su estructura química, se clasifican en cinco grupos (Figura 15):

- Derivados de dibenzopironas: Alternariol (AOH), Alternariol monometil éter (AME) y Altenueno (ALT).
- Quinonas derivadas del perileno: Altertoxinas (ATX-I, -II, -III).
- Derivados del ácido tetrámico: Ácido tenuazónico (TeA).
- Análogos de la esfingosina: toxinas AAL: AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2, AAL-TC1, AAL-TC2, AAL-TD1, AAL-TD2, AAL-TE1, AAL-TE2.
- Otras estructuras: Tentoxina (TEN).

Derivados de dibenzopironas

AOH y AME son mutagénicos, genotóxicos, carcinogénicos y citotóxicos en cultivos celulares animales y bacterianos. Presentan una actividad mutagénica elevada tanto en cultivos de *Bacillus subtilis* (Kada y col., 1984), como de *Escherichia coli* (An y col., 1989; Zhen y col., 1991), y baja en cultivos de *Salmonella typhimurium* (Davis y Stack, 1994; Scott y Slotz, 1980). Los estudios de genotoxicidad demuestran que AOH tiene mayor actividad que AME (Lehmann y col., 2006; Marko, 2007; Pfeiffer y col., 2007; Solhaug y col., 2012). 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). Su presencia en alimentos ha sido asociada con altos niveles de cáncer de esófago en China (Liu y col., 1992).

Por otra parte, los estudios de toxicidad de ALT en larvas de camarón en salmuera, demostraron que las dosis letales medias de ALT (375 g/ml) son muy superiores a las de TeA (75 mg/ml) y AOH (200 mg/ml) (Panigrahi y Dallin, 1994).

Ácido tenuazónico

La toxicidad de TeA se ha demostrado en plantas, embriones de pollo y en otras especies animales (Azcarate y col., 2008). En perros, la ingesta de dosis diarias de 10 mg/kg de peso, provocó la aparición de hemorragias en diversos órganos. En las aves domésticas, una dosis de 10 mg/kg en el pienso disminuyó tanto la eficiencia alimenticia como la ganancia de peso e incrementó las hemorragias internas en las canales. Sin embargo, no se ha demostrado efecto mutagénico de TeA en cultivos bacterianos (Schradler y col., 2001; 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 (Yekeler y col., 2001). Además, el consumo de sorgo contaminado con TeA se ha relacionado con la aparición de un desorden hematológico en humanos conocido como Onyalai (Ostry, 2008).

Alttoxinas

Las ATXs presentan actividad mutagénica en el test de Ames (Schrader y col., 2006; Scott y Stoltz, 1980; Stack y col., 1986; Stack y Prival, 1986). La actividad mutagénica de las ATXs (ATX-I, II, III) en ratones es superior a la de AOH y AME, siendo la ATX-III la de mayor actividad (Chelkowski y Visconti, 1992; Schrader y col., 2001). El potencial mutagénico de ATX-III es 10 veces inferior al de la aflatoxina B1, que es la micotoxina con mayor actividad mutagénica en la especie humana (Stack y col., 1986; Stack y Prival, 1986). Fleck y col. (2012) encontraron que ATX-II es también un potente mutágeno en un sistema de células humanas *in vitro*, resultando al menos 50 veces más potente que AOH y AME. La potencia mutagénica de las ATXs aumenta con el número de grupos epóxido en la molécula, siendo ATX-I < ATX-II < ATX-III (Stack y Prival, 1986). También se ha demostrado que ATX-I y ATX-III son genotóxicas en cultivos celulares de ratón (Osborne y col., 1988).

Toxinas AAL

Las toxinas AAL están estructuralmente relacionadas a la esfingosina y son muy semejantes en su estructura química a la micotoxina fumonisina B1, una toxina sintetizada por el género *Fusarium*. Al igual que la fumonisina B1, las toxinas AAL inhiben la biosíntesis de esfingolípidos (ceramida) tanto en plantas como en tejidos animales. Son conocidas fitotoxinas y, a diferencia de las otras micotoxinas de este género, sólo son producidas por una especie, *A. arborescens* (syn. *A. alternata* f. sp. *lycopersici*), un patógeno de tomate, responsable del cáncer del tallo en esta planta. Estas micotoxinas inducen a la muerte celular y eventos neoplásicos en cultivos celulares de mamíferos.

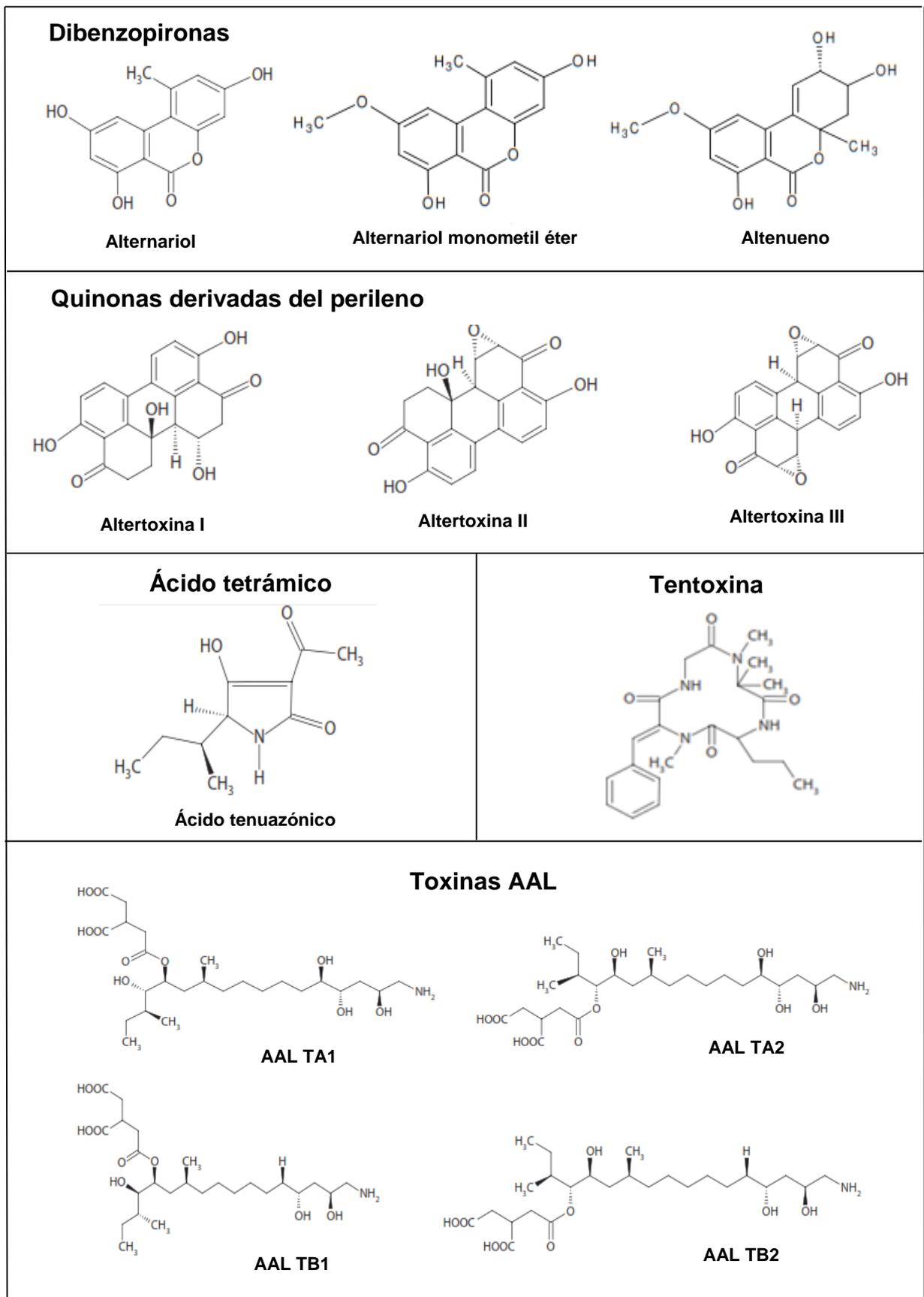


Figura 15: Estructura química de las principales toxinas de *Alternaria* spp.

Tabla 4: Toxinas producidas por las principales especies toxicogénicas del género *Alternaria*.

Especie	Toxina
<i>Alternaria alternata</i>	AOH, AME, ALT, Altenusina, ATX-I, ATX-II, ATX-III, Tentoxina, Toxinas AAL, Toxina AS, Toxina AF, Toxina ACR, Toxina ACTG
<i>A. arborescens</i>	AOH, AME, ALT, ATX-I, TeA
<i>A. brassicae</i>	AOH, AME, TeA
<i>A. brassicicola</i>	AOH, AME, TeA, ATX-I
<i>A. citri</i>	AOH, AME, ALT, TeA
<i>A. cucumerina</i>	AOH, AME, Macrosporina
<i>A. dauci</i>	AOH, AME, Macrosporina, Zinniol
<i>A. gaisen</i>	AOH, AME, ALT, Altenusina, TeA, ATX-I
<i>A. infectoria</i>	Infectopironas, Novae-zelandinas
<i>A. longipes</i>	AME, TeA, ATX-I
<i>A. mali</i>	TeA, ATX-I, ATX-II, ATX-III, Tentoxina, Toxina AM
<i>A. porri</i>	AOH, AME, ALT, TeA, Altersolanol, Tentoxina, Macrosporina, Zinniol
<i>A. radicina</i>	ALT, TeA, ATX-I, Radicinina, Radicinol
<i>A. solani</i>	AOH, AME, Altersolanol, Macrosporina, Zinniol
<i>A. tenuissima</i>	AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I, Tentoxina

AOH: Alternariol; AME: Alternariol monometil éter; ALT: Altenueno; TeA: Ácido tenuazónico; ATX: Alvertoxina; TEN: Tentoxina.

En relación a sus efectos sobre las plantas, las toxinas de *Alternaria spp.* se agrupan en toxinas no específicas de hospedador y toxinas específicas de hospedador. Las toxinas no específicas de hospedador afectan a una amplia variedad de especies vegetales, aunque en muchos casos su modo de acción no ha sido identificado. Sin embargo, sí se ha determinado la actividad fitotóxica de toxinas no específicas como el zinniol, TeA y tentoxina. TeA inhibe la síntesis proteica, mientras que el zinniol afecta la permeabilización de la membrana y la tentoxina inhibe la fosforilación debido a que se une a la cloroplasto ATP sintetasa (Thomma, 2003). Muchas de estas toxinas no específicas, como AOH, AME, ALT, TeA y ATX presentan además probada toxicidad en humanos y animales (EFSA, 2011).

Las toxinas específicas de hospedador afectan a un menor número de especies vegetales. Por lo general, causan alteraciones severas en determinadas plantas donde se desarrolla la especie de *Alternaria* productora de estas toxinas. Aunque se han determinado los mecanismos de acción de algunas toxinas específicas de hospedador, ya que desempeñan un papel crucial en la patogenicidad de la especie que colonizan, todavía existen pocos estudios sobre su toxicidad en animales y en general se desconocen los efectos en humanos (Barkai-Golan, 2008).

1.8.7 Ocurrencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos y piensos

Las toxinas de *Alternaria* spp. se aíslan con frecuencia de una gran variedad de productos vegetales frescos y procesados. Debido a que muchas especies son patógenas de plantas, y dada su capacidad de producir numerosos metabolitos tóxicos, estas micotoxinas se suelen acumular en las partes comestibles de la planta infectada, llegando así a humanos y animales mediante el consumo de las mismas.

La presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en cereales es muy común, debido al almacenamiento de los granos en condiciones favorables para el crecimiento del hongo. Se ha detectado AOH, AME, ALT, TeA y TEN en granos de trigo, cebada, avena, centeno, arroz y maíz. El procesamiento de los granos de cereales no evita la presencia de micotoxinas, como lo demuestra el hecho de que las muestras de cereales de desayuno, harina, pasta o cerveza analizadas por diversos investigadores, contenían AOH, AME o TeA (Abd El-Aal, 1997; Aresta y col., 2003; Asam y col., 2010; Azcarate y col., 2008; EFSA, 2011; Siegel y col., 2010). También se ha detectado la presencia de AME en papillas infantiles y TeA en alimentos infantiles que contenían cereales en su composición, lo cual causa especial preocupación, ya que estos alimentos son la base fundamental de la alimentación en las primeras etapas de la vida (EFSA, 2011).

En semillas de oleaginosas como colza, girasol, sésamo y linaza también se han determinado la presencia de AOH y AME. En las semillas de colza y linaza se ha detectado 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 las muestras de aceite de girasol y sésamo (EFSA, 2011; Skarkova y col., 2005; Kralova y col., 2006). Asimismo, se ha encontrado AOH y AME en legumbres como las lentejas y la soja (Barros y col., 2011; Ostry y col., 2004).

En numerosas frutas (manzana, pera, melón, damasco, uvas, pasas de uva, frutilla, aceituna, cítricos e higos desecados), hortalizas (tomate, pimiento y zanahoria) y tubérculos (papa) se ha puesto de manifiesto la presencia de AOH, AME, ALT, TeA y TEN (Asam y col, 2010; Bottalico y Logrieco, 1998; Logrieco y col., 1990, 2009). 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; 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; Scott y col., 2006; Scott y Kanhere, 1980; Stack y col., 1985; Solfrizzo y col., 2004).

En Argentina, se han aislado *Alternaria* spp. toxicogénicas a partir de una amplia variedad de sustratos, como manzana (Robiglio y López, 1995), uva (Da Rocha Rosa y col., 2002, Vargas Trinidad, 2015), pera (Dobra y col., 2012), duraznos (Pose y col., 2010), arándanos (Greco y col., 2012), tomate (Pose y col., 2004), maíz (Torres y col., 1998), semillas de amaranto (Bresler y col., 1995), semillas de quinoa (Pappier y col., 2008), girasol (Poverene y col., 2009), avena para alimentos balanceados de caballos de carreras (Sacchi y col., 2009), granos de sorgo, maíz, arroz, semillas de soja y trigo (Broggi y col., 2007; Gutiérrez y col., 2010; Patriarca y col., 2007; Perelló y Sisterna, 2006, 2008).

Sin embargo, se dispone de muy pocos estudios sobre la ocurrencia natural de las toxinas de *Alternaria* en alimentos, ya sea en materias primas o productos procesados en Argentina. Azcarate 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. Terminiello y col. (2006) hallaron estas mismas toxinas en muestras de

puré de tomate comercializadas en supermercados de Buenos Aires. De 80 muestras analizadas, el 49% presentaba contaminación con al menos una de las toxinas analizadas.

La presencia de micotoxinas en alimentos procesados puede ser consecuencia de la utilización de materias primas con alteraciones fúngicas cuyos síntomas afectan solo a la parte interna, como ocurre en la putrefacción de las manzanas y los cítricos. Además, aunque se eliminen las zonas visiblemente alteradas, las toxinas se pueden transferir a los tejidos circundantes (Robiglio y López, 1995). Por otra parte, las industrias procesadoras no siempre disponen de métodos eficientes para detectar y eliminar completamente las materias primas afectadas con algún grado de alteración fúngica.

Debido a la falta de datos respecto de la toxicidad en humanos es difícil determinar los niveles máximos permitidos para estas toxinas en alimentos. Sin embargo, la frecuencia de ocurrencia en diversos grupos de alimentos, y especialmente en los alimentos infantiles, es un motivo de preocupación que demanda una inminente atención por parte de las autoridades sanitarias y de control.

1.8.8 Control y prevención

La contaminación de los alimentos con micotoxinas se produce de manera natural y su concentración puede aumentar como resultado de las condiciones ambientales o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración de los productos alimentarios. Por ello, es necesario disponer de programas de control que eviten la contaminación con hongos toxicogénicos. Asimismo, se deben aplicar medidas preventivas que minimicen el desarrollo fúngico en los alimentos, tales como el almacenamiento en condiciones idóneas de temperatura, humedad relativa y atmósfera. En este sentido, las autoridades oficiales de control están continuamente estableciendo programas preventivos y procedimientos para minimizar los riesgos asociados a la contaminación de los alimentos con micotoxinas. Dentro de estos programas se incluyen las buenas prácticas agrícolas (GAP: “*Good Agricultural Practice*”) e industriales (GMP: “*Good Manufacturing Practice*”) y la aplicación

del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Es necesario contar con herramientas capaces de detectar de una forma rápida y precoz la presencia de *Alternaria* spp. en alimentos, debido especialmente a que no existe hasta el presente una normativa que regule los niveles máximos permitidos de las micotoxinas de *Alternaria* en alimentos.

Por otro lado, es necesario disponer de datos sobre la incidencia de especies toxicogénicas de *Alternaria* en los distintos productos agrícolas, para establecer monitoreos tanto en las etapas de precosecha como postcosecha, estudiar la capacidad de producción de metabolitos tóxicos por estas especies autóctonas, a fin de realizar estudios de incidencia de las principales toxinas que pueden acumularse en estos productos, y evaluar el efecto que las distintas etapas del proceso pueden ejercer sobre las mismas, a fin de establecer límites y regulaciones para proteger la salud del consumidor.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo General

La presencia de hongos y sus metabolitos tóxicos es uno de los problemas sanitarios y económicos que no se han evaluado suficientemente en productos frutihortícolas cultivados en nuestro país. Por lo tanto el objetivo general del presente proyecto es el estudio de la incidencia de hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas. Para alcanzar este objetivo es necesario desarrollar metodologías adecuadas para una correcta y rápida identificación de las especies fúngicas y los perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de las poblaciones infectantes. El logro de este objetivo permitirá conocer el riesgo micotoxicológico que representa la presencia de las distintas especies fúngicas y sus metabolitos tóxicos en las frutas cítricas, manzanas y en los productos de la industrialización de las mismas.

1.9.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Determinar la incidencia de cepas de hongos deteriorantes y toxicogénicos en frutas cítricas y manzanas cultivadas en nuestro país.

Objetivo 2: Determinar la capacidad de producción de toxinas de las cepas aisladas.

Objetivo 3: Estudiar la ocurrencia natural de las toxinas de *Alternaria* en manzanas cultivadas en Argentina dada la alta incidencia de éste género en productos frutihortícolas y los escasos datos existentes en nuestro país.

CAPÍTULO II – MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y métodos

2.1 Muestreo

Para la realización de los ensayos se utilizaron frutos cítricos (naranjas, mandarinas, limones) y manzanas. En el caso de los cítricos se seleccionaron aquellos frutos que presentaban lesiones externas características de deterioro fúngico. En el caso de las manzanas se incluyeron tantos frutos visiblemente deteriorados (daño externo en el cuerpo del fruto o el pecíolo), como, en el caso de manzanas con corazón mohoso, frutos de aspecto externo sano, en los cuales las lesiones se observaron luego de que la fruta fuese cortada.

Las muestras fueron obtenidas en los diferentes supermercados, verdulerías, y comercios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Adicionalmente se contó con la colaboración del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires, quienes proporcionaron manzanas, de la variedad requerida, provenientes del Alto Valle de Río Negro. Las variedades y cantidades de cada tipo de muestra se especifican en la Tabla 5.

Las muestras fueron obtenidas durante los meses de Abril a Septiembre de 2015 y llevadas al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Aquellas muestras que no se analizaron inmediatamente, fueron colocadas en bolsas estériles y conservadas en refrigeración (4°C).

Tabla 5: Frutas analizadas, variedades y cantidades.

Frutos	Variedad	Cantidad
Limonos	Rugoso	25
Naranjas	Washington Navel, Lane Late	27
Mandarinas	Satsuma, Clementina Fina	32
Manzanas	Red delicious	92

2.2 Aislamiento de la micota total

Para el aislamiento de los hongos contaminantes a partir de los frutos, se empleó el agar Diclorán-Cloranfenicol-Malta-Agar (DCMA, Anexo I). Utilizando utensilios estériles, se tomó una pequeña porción de la fruta, seleccionando el tejido visiblemente infectado, y se colocó directamente sobre una placa de Petri de DCMA. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 25°C durante 7 días.

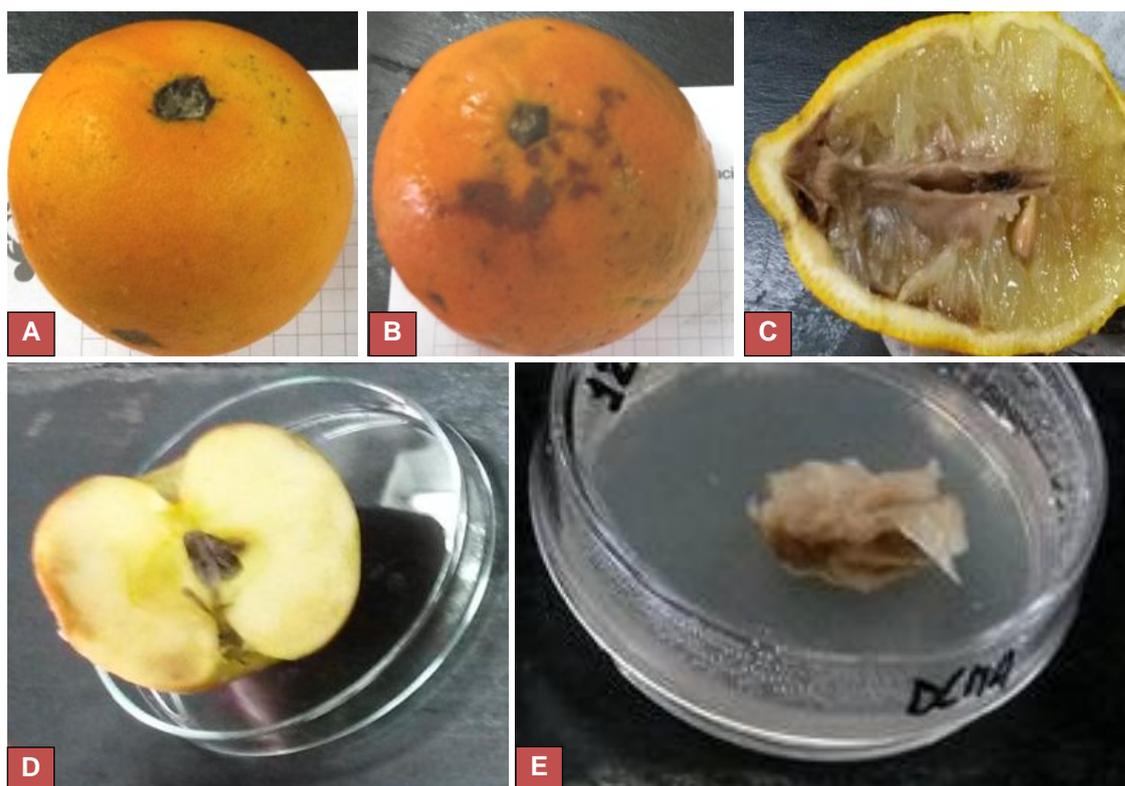


Figura 16: A-D) Frutos con infecciones fúngicas; E) siembra directa en DCMA.

2.3 Observación macroscópica y microscópica

Luego del periodo de incubación, las placas fueron analizadas para la identificación de los géneros fúngicos aislados.

Se observaron las características morfológicas de las colonias a ojo desnudo y bajo lupa estereoscópica (40x y 80x). Adicionalmente se realizaron preparados para cada género fúngico encontrado, y se observaron al microscopio (400x y 1000x) para confirmar la identificación previa.

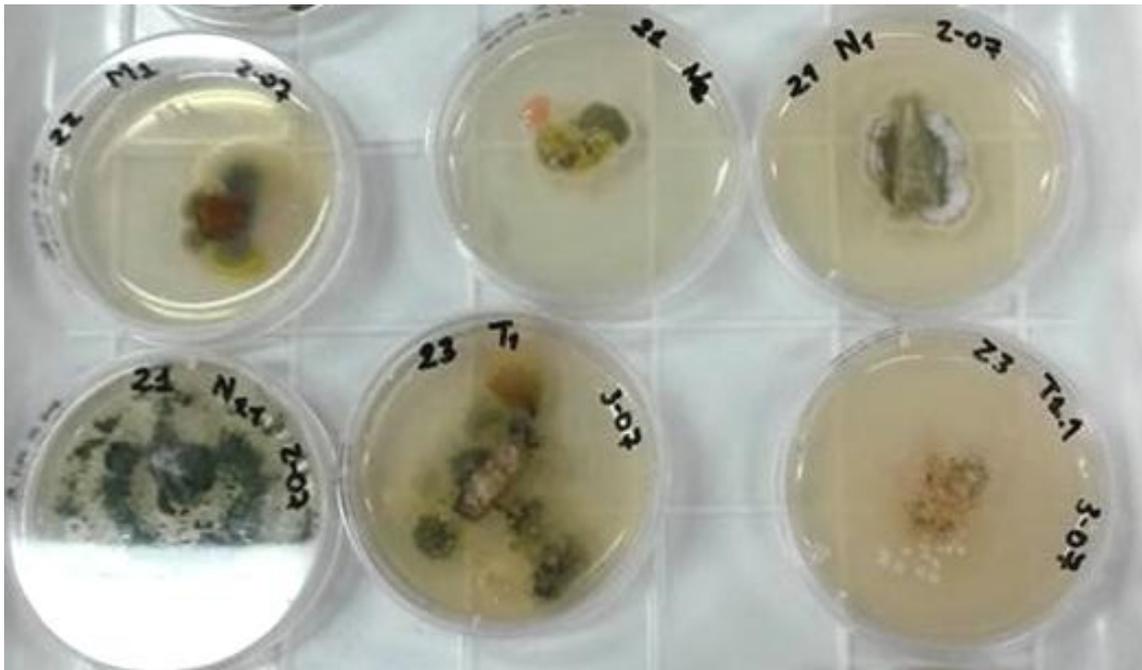


Figura 17: Crecimiento fúngico en placas de DCMA.

2.4 Identificación a nivel de género

Para la identificación de hongos a nivel de género se utilizaron las claves taxonómicas propuestas por Pitt y Hocking (1997), Samson y col. (2001) y Simmons (2007), comparando la descripción reportada por los autores con la observación macro y microscópica realizada.

2.5 Aislamiento e identificación de especies de *Alternaria*

2.5.1 Aislamiento

La confirmación de la presencia de *Alternaria* se estableció mediante la observación macroscópica y microscópica de características específicas de este género, colonias oscuras, de tonalidad grisácea a negra con reverso negro y presencia de dictiosporas.

Luego de la confirmación, se procedió a realizar el aislamiento con el objetivo de obtener un cultivo puro, libre de contaminación, para su posterior identificación a nivel de especie. Se tomó un fragmento de micelio y/o esporas y se inoculó en placas de Petri provistas con Agar Papa Dextrosa (PDA, Anexo I). Las placas se incubaron a una temperatura de 25°C durante 7 días.

2.5.2 Reaislamiento

Una vez obtenidos cultivos puros del género *Alternaria*, los aislamientos fueron sembrados en Agar Papa Zanahoria (PCA, Anexo I) o Agar V8 (V8, Anexo I), medios que favorecen el crecimiento y promueven la esporulación en este género (Simmons, 1992). Las placas se incubaron a una temperatura de 25°C durante 7 días, con ciclos alternantes de luz-oscuridad consistentes en 16 h de oscuridad/8 h de luz bajo luz blanca fría.

2.5.3. Identificación

Para asegurar la homogeneidad genética en la identificación de los grupos-especie, se recurrió a un cultivo monospórico.

La técnica se detalla a continuación (modificada de Nelson y col., 1983)

1. Se esterilizó a llama un ansa ojal y se sumergió en un tubo provisto de solución Tween 80 estéril (0,05%), cargando el anillo con la solución.
2. Sobre placas de PDA, y con ayuda del ansa se colocaron cinco gotas de solución Tween 80, espaciadas de manera equidistante.
3. Se cargó el ansa nuevamente con la solución y se frotó suavemente sobre la colonia de interés con el objeto de recoger conidios y/o fracciones de micelio.
4. Se descargó el ansa sumergiéndola en el tubo, homogeneizando la solución.
5. Con el ansa cargada con la suspensión de esporas/micelio se realizó una estría ancha hacia el centro de la placa sobre una de las gotas de solución colocadas inicialmente en la misma.
6. Se repitió este último procedimiento sucesivamente sobre cada una de las gotas restantes (efecto de dilución).
7. Se incubó a una temperatura de 25°C durante 24 horas.
8. Se examinó bajo microscopio estereoscópico (40x) la presencia de esporas aisladas germinadas.

9. Se recortó una porción de agar conteniendo una espora aislada germinada.
10. Se sembró la porción de agar conteniendo la espora sobre placas de Petri provistas con PCA o V8, y se incubó a 25°C durante 7 días, con ciclos alternantes de luz-oscuridad.

2.5.4 Caracterización morfológica

A partir del cultivo monospórico, los aislamientos fueron sembrados nuevamente en placas con PCA y llevadas a incubación manteniéndose las mismas condiciones de tiempo, temperatura y ciclos de luz anteriormente detallados en el ítem 2.5.2.

Luego de los 7 días de incubación se realizó el examen morfológico y se los caracterizó hasta llegar a identificación de especie o grupo-especie.

2.5.5 Conservación de los aislamientos

Paralelamente, a partir de las placas de cultivo monospórico, se cortaron pequeños trozos de agar (plugs) conteniendo micelio y/o esporas, y los mismos fueron colocados en un vial provisto con agua estéril. Estos viales se almacenaron en la heladera a 4°C, para su conservación.

2.5.6 Identificación de *Alternaria* a nivel de grupos-especie o especie.

A partir de las placas de PCA, se realizó la identificación de los grupos-especie y especies del género *Alternaria*. Se utilizó la clave taxonómica detallada por Simmons (2007), basada en los distintos modelos de esporulación.

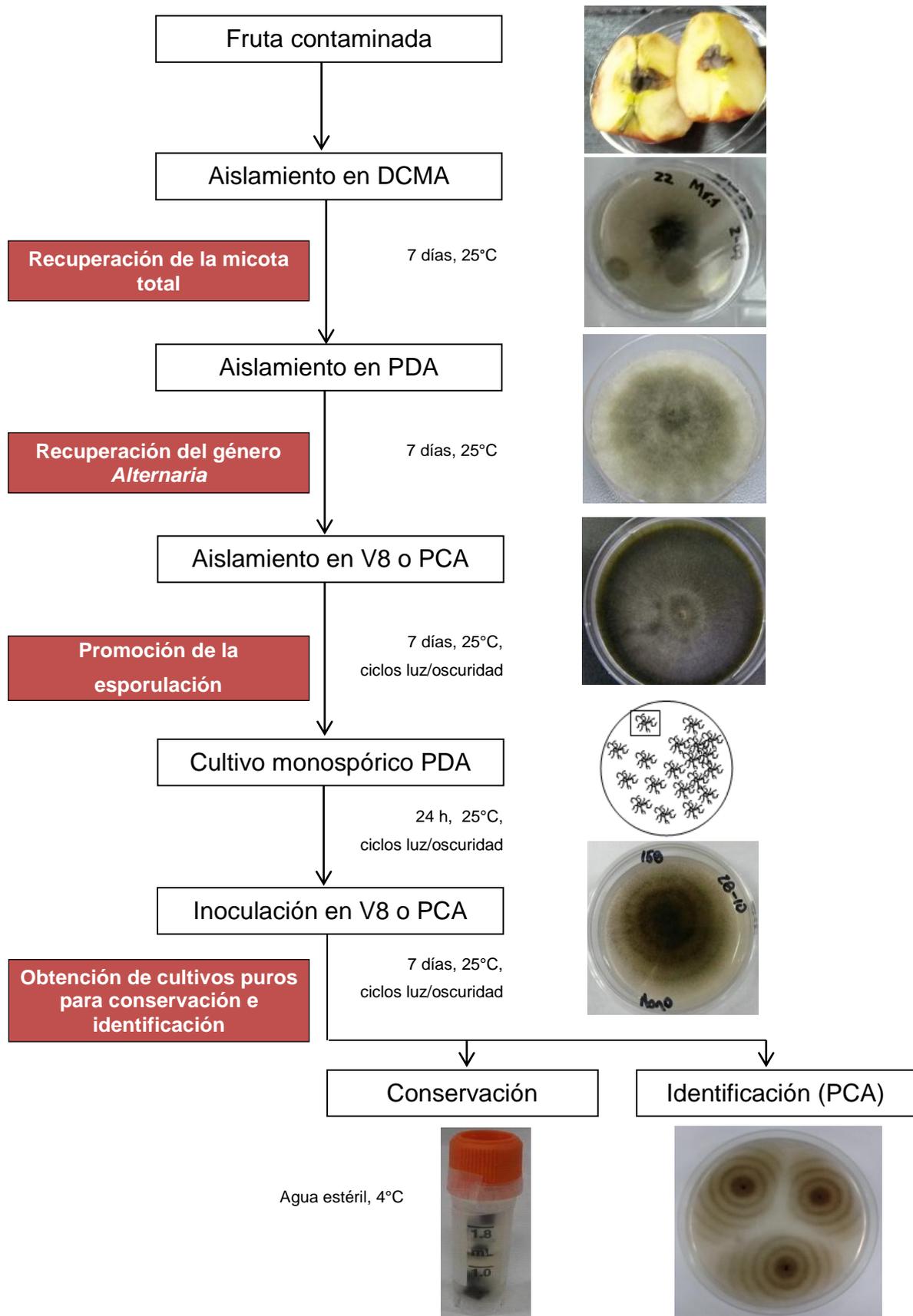


Figura 18: Esquema de aislamiento del género *Alternaria* spp. para identificación a nivel de especie.

2.5.6.1 Caracterización macroscópica

Las placas fueron observadas del anverso y el reverso. Se midió el diámetro y se registró la presencia o ausencia de anillos concéntricos bien diferenciados debido al crecimiento bajo ciclos alternantes de luz y el número de anillos en caso de ser visibles.

Con ayuda de un microscopio estereoscópico a una magnificación de 40x se observó el patrón de esporulación. Datos como la forma del conidio, cantidad de conidios en la cadena, forma de distribución de los conidios en la cadena, presencia o ausencia de ramas laterales, fueron características que se compararon con las detalladas en la clave morfológica para determinar el grupo especie de cada aislamiento.

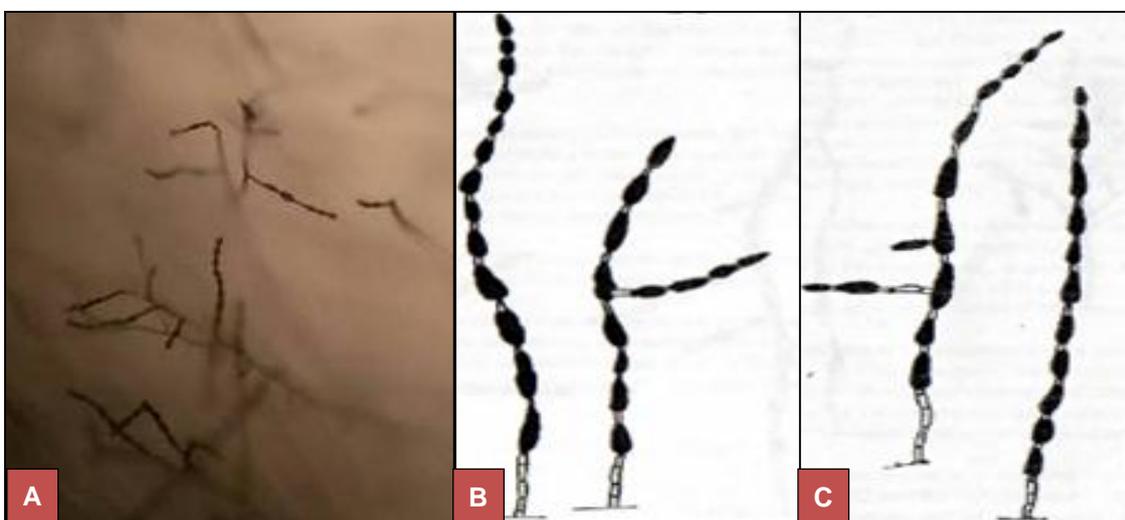


Figura 19: A) Cadenas de conidios observadas en microscopio estereoscópico (40x); B-C) Modelos de esporulación según Simmons (2007).

2.5.6.2 Caracterización microscópica

Se realizaron preparados para la observación microscópica empleando la técnica de cinta adhesiva, debido a que permite una mejor conservación de las estructuras de ramificación en sus posiciones originales. Para realizarlo, se tomó una tira de cinta de un largo superior al del portaobjetos, con el lado adhesivo hacia afuera y sosteniendo de los extremos, se procedió a presionar suavemente sobre la superficie de la colonia. Posteriormente, la tira de cinta se colocó en un portaobjeto provisto con una gota de ácido láctico. El preparado fue observado en microscopio óptico a una magnificación de 400x.



Figura 20: Preparado de *Alternaria* con técnica de cinta adhesiva.

Los datos registrados fueron:

a) Características del conidio: forma, tamaño, textura de la pared, color, cantidad de septos longitudinales, presencia y/o cantidad de septos transversales, presencia o ausencia de conidióforos secundarios, ubicación de los conidióforos secundarios en el cuerpo del conidio (apical, central, basal, etc.).

b) Características de los conidióforos: longitud del conidióforo primario, presencia de ramificaciones, presencia de conidióforos secundarios, frecuencia de aparición, longitud del conidióforo secundario, presencia y frecuencia de ramificaciones, ángulos de ramificación.

En los casos en que los datos registrados mostraron total coincidencia con las descripciones del cultivo tipo de la especie según Simmons (2007) se procedió a identificar el aislamiento a nivel de especie. En el caso de coincidencia parcial, o solapamiento de las características entre dos o más especies estrechamente relacionadas se identificó únicamente a nivel grupo-especie.

2.6 Evaluación de diferentes técnicas para determinación de la capacidad toxicogénica de *Alternaria* spp.

Para analizar la capacidad de producción de metabolitos secundarios tóxicos se probaron distintas técnicas.

En primer lugar se evaluaron tres tipos de matrices: a) un medio que favorece la producción de metabolitos secundarios, el Agar Diclorán-Rosa de Bengala-Extracto de Levadura-Sacarosa (DRYES, Anexo I) (Frisvad, 1983); b)

Agar manzana (AM, Anexo I), para evaluar el efecto de la matriz en la producción de metabolitos, c) frutos de manzana inoculados artificialmente, para simular la producción *in vivo* en los frutos contaminados.

Se partió de cultivos puros obtenidos a partir de los cultivos monospóricos conservados, que fueron inoculados en placas de PCA o V8, para luego ser incubados a 25°C durante 7 días, con ciclos alternantes de luz-oscuridad.

A partir de los cultivos frescos, se procedió a inocular en las matrices previamente descritas. Las placas de AM y DRYES fueron inoculadas en tres puntos con una porción de micelio y esporas tomadas con un ansa recta. En las manzanas, las cuales fueron previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70%, se realizaron varias lesiones por punción con una aguja, y se inoculó sobre ellas con un ansa de ojal cargada con una porción de micelio y esporas.

Tanto las placas como las manzanas inoculadas fueron incubadas a 25°C durante 14 días, en oscuridad, condiciones que favorecen la producción de metabolitos secundarios por *Alternaria*.

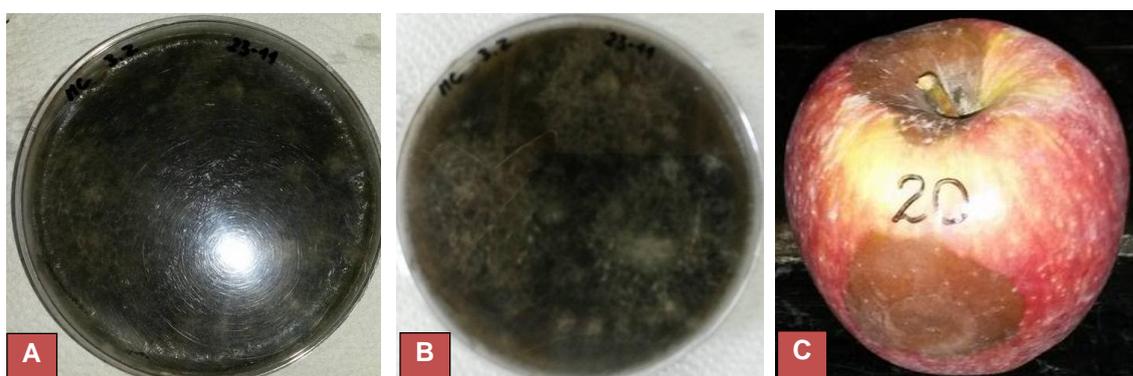


Figura 21: Inoculación de *Alternaria* en: A) DRYES; B) Agar manzana (AM); C) Manzana.

2.7 Evaluación de diferentes técnicas para la extracción de micotoxinas

Luego del período de incubación se llevó a cabo el procedimiento de extracción de las toxinas. Para ello se evaluaron dos técnicas, una microextracción y una extracción secuencial a mayor escala, según la matriz a evaluar.

Las placas de DRYES fueron sometidas a microextracción. Esta técnica ha sido utilizada por Andersen y col. (2008; 2009; 2015) para la determinación de

perfiles de producción de metabolitos secundarios de distintas especies de *Alternaria*. Presenta las ventajas de ser una técnica simple, rápida, y que utiliza bajos volúmenes de solvente. La desventaja es que, al no involucrar sucesivas etapas de limpieza (clean-up), se extraen de manera no selectiva gran cantidad de metabolitos, que luego pueden presentar interferencias en la etapa de detección si la misma no se realiza por un método que involucre técnicas combinadas como HPLC-UV-MS. Con esta misma técnica se realizó la extracción a partir de las placas de AM.

Por otro lado, se evaluó una técnica de extracción secuencial, que involucra sucesivas etapas de clean-up, desgrasado, y acidificación para incrementar la recuperación de las toxinas ácidas. Este método ha sido utilizado previamente, con ligeras modificaciones, por el grupo de investigación, para la detección de toxinas de *Alternaria* en matrices complejas, como trigo (Azcarate y col., 2008), tomate y derivados (Terminiello y col., 2006), y agar tomate (Pose y col., 2010; Vaquera y col., 2016). Si bien es más largo y trabajoso, e involucra la utilización de mayores volúmenes de solvente orgánico, se obtiene un extracto final muy limpio, enriquecido en los metabolitos de interés, que permite una detección fácil e inequívoca mediante una corrida isocrática en HPLC-UV. Esta técnica se evaluó sobre el AM y sobre las manzanas inoculadas artificialmente.

2.7.1 Procedimiento de microextracción para metabolitos secundarios (toxinas AOH, AME y TeA) (Andersen y col., 2015).

1. Se cortaron 3 plugs de agar de 6 mm de diámetro (con sacabocado) del centro de cada una de las 3 colonias de una misma placa y se colocaron los 9 plugs en un tubo eppendorf de 2 ml.
2. Se agregó 1 ml de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico (vol/vol) y se agitó en sonicador por 60 min.
3. Se transfirió el extracto a otro tubo limpio y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
4. Se resuspendió el extracto seco en 400 µl de metanol grado HPLC, y se sonicó por 15 min.
5. Se filtró a través de filtro de jeringa de poro 0,2 µm a un vial limpio para HPLC.

- Se conservó el vial con el extracto final en freezer a -18°C hasta el análisis por HPLC.

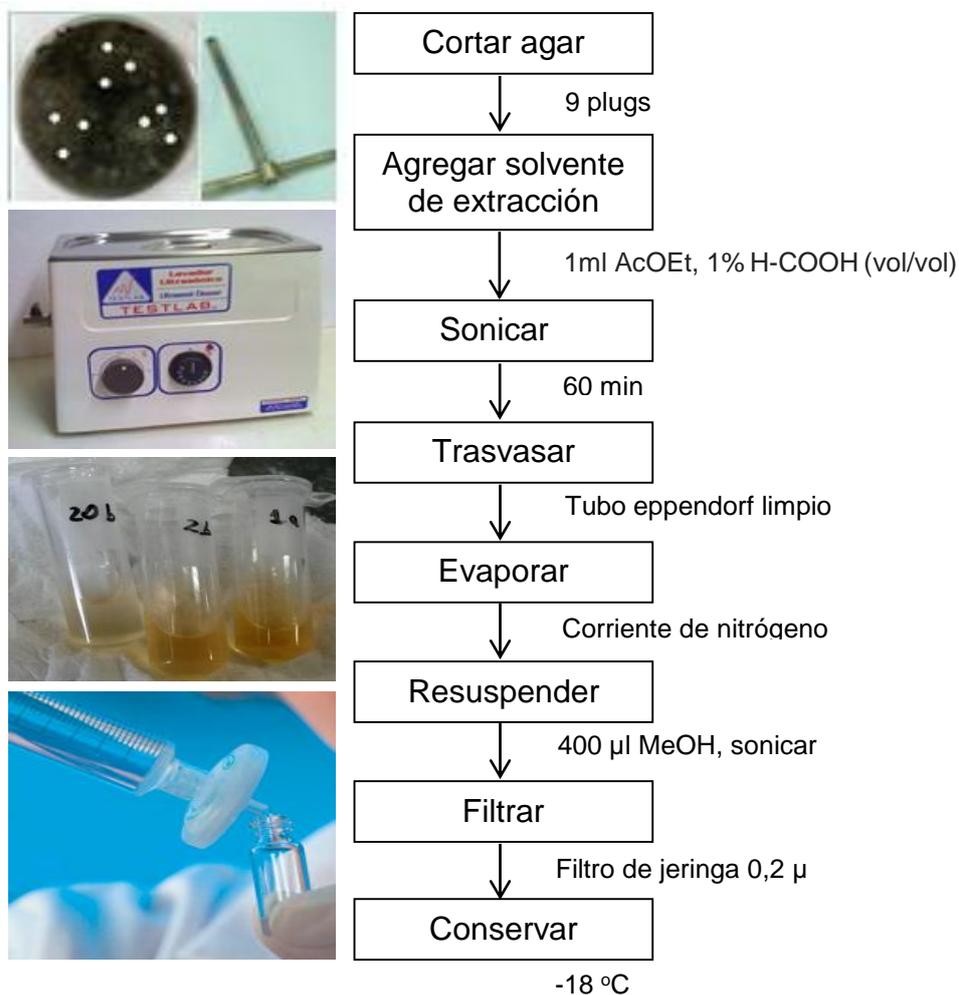


Figura 22: Esquema de microextracción de toxinas AOH, AME y TeA.

2.7.2 Procedimiento de extracción secuencial para las toxinas AOH, AME y TeA (modificado de Pose y col., 2010)

- Se cortó la muestra en pequeños trozos (agar) o se trituró (manzana) y se colocó en un erlenmeyer.
- Se adicionaron 80 ml de metanol (extracción de la matriz).
- Se agitó mecánicamente durante 30 min a 300 rpm.
- Se agregaron 25 ml de sulfato de amonio acuoso al 10% y se agitó la mezcla (clarificación).
- Se filtró recogiéndose en una ampolla de decantación.

6. Se adicionaron 20 ml de hexano y se agitó durante 1 min (desgrasado).
7. Se recogió la fase metanólica en una nueva ampolla de decantación.
8. Se agregaron 25 ml de agua destilada a la ampolla con hexano y se agitó durante 1 min.
9. Se decantó la fase acuosa hacia la ampolla conteniendo la fase metanólica (fase metanol-agua).
10. Se agregaron 20 ml de cloroformo a la fase metanol-agua y se agitó por un minuto (extracción de toxinas neutras, AOH y AME).
11. Se filtró la fase clorofórmica, a través de un lecho de sulfato de amonio anhidro (eliminación de agua residual en la fase orgánica).
12. Se repitieron los ítems 10 y 11.
13. La fase clorofórmica conteniendo AOH y AME se evaporó a sequedad bajo vacío en rotavapor a 40°C.
14. El extracto seco se reconstituyó en 1 ml de metanol y se transfirió a un vial limpio para su posterior análisis por HPLC.
15. La fase metanólica restante conteniendo TeA se acidificó hasta pH=2 con ácido clorhídrico 6N.
16. Se agregaron 20 ml de cloroformo a la fase metanol-agua y se agitó por un minuto (extracción de toxina ácida, TeA).
17. Se filtró la fase clorofórmica a través de un lecho de sulfato de amonio anhidro.
18. Se repitieron los ítems 16 y 17.
19. La fase clorofórmica conteniendo TeA fue evaporada a sequedad bajo vacío en rotavapor a 40°C.
20. El extracto seco se reconstituyó en 1 ml de metanol y se transfirió a un vial limpio para su posterior análisis por HPLC.
21. Los viales se conservaron en freezer a -18°C hasta el momento del análisis por HPLC.

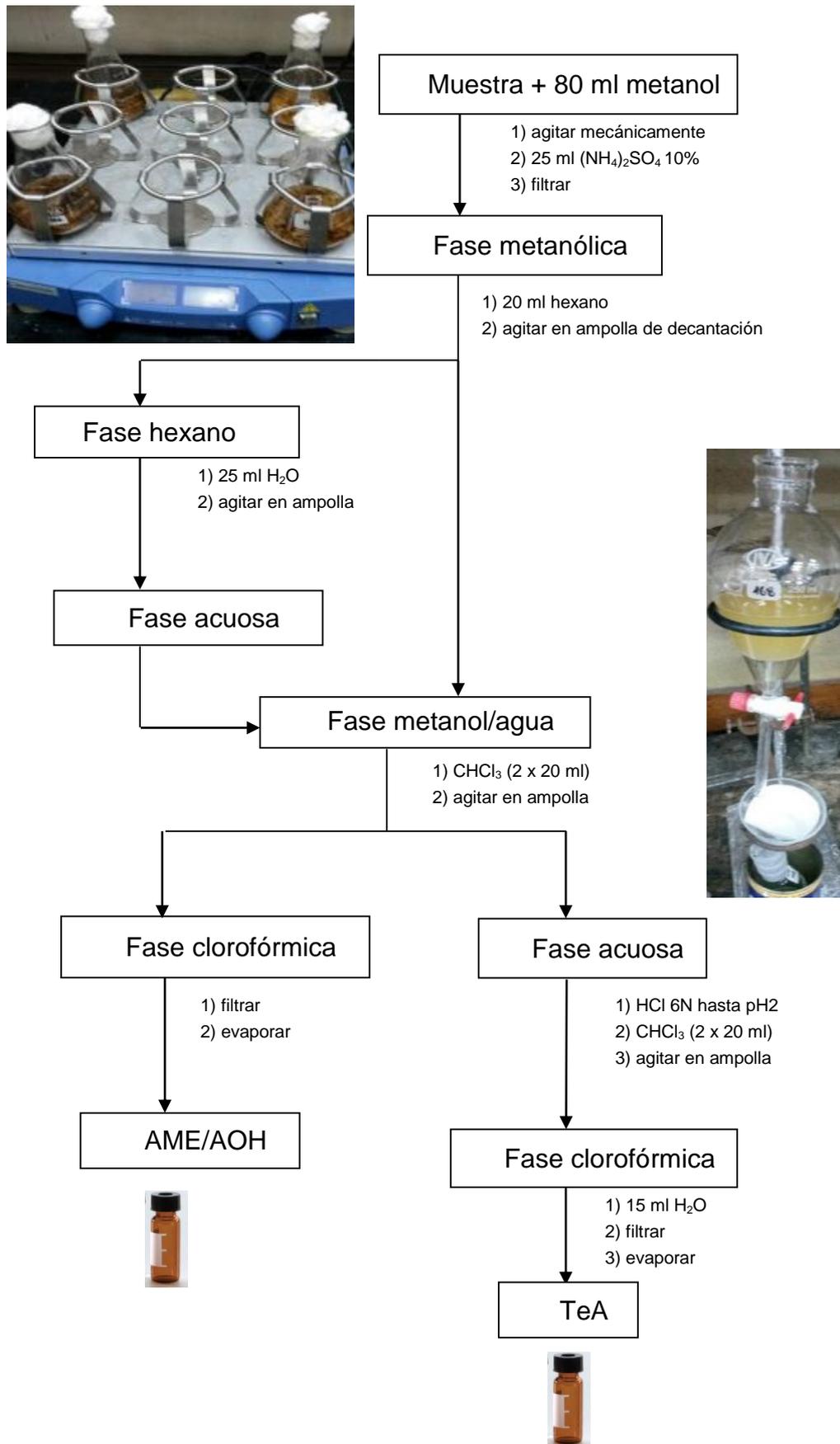


Figura 23: Esquema de extracción secuencial de AOH, AME y TeA.

2.8 Análisis de toxinas

Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El cromatógrafo utilizado fue un equipo Shimadzu LC-6A (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con inyector automático y un detector de fluorescencia. Para la determinación cromatográfica se utilizó una columna C₁₈ marca Cogent 250 x 4,6 mm x 5 μm (MicroSolv, USA).

2.9 Condiciones de detección

Para el análisis de las toxinas neutras, AOH y AME, se utilizó una fase móvil constituida por metanol:agua (80:20), con 300 mg de ZnSO₄.7H₂O por litro. La longitud de onda empleada para la detección fue de 258 nm. El flujo de la corrida cromatográfica fue de 0,4 ml/min.

Para el análisis de la toxina ácida, TeA, se utilizó una fase móvil constituida por metanol:agua (90:10), con 300 mg de ZnSO₄.7H₂O por litro. La longitud de onda empleada para la detección fue de 280 nm. El flujo de la corrida cromatográfica fue de 0,8 ml/min para todas las matrices y tipos de extracciones.

2.10 Determinación de la capacidad toxicogénica de *Alternaria* spp.

Luego de realizados los ensayos y analizados los cromatogramas obtenidos a partir de las pruebas preliminares, se decidió utilizar como medio para la producción de metabolitos secundarios el Agar Manzana (AM), empleando la extracción completa, por ser la combinación que arrojó los cromatogramas más limpios, con menor ruido y mejor resolución de picos.

2.11 Determinación de las toxinas

A fin de cuantificar la concentración de las toxinas se realizaron curvas de calibración con soluciones estándar de cada una de ellas en diferentes concentraciones (niveles entre 100 y 1000 μg/kg). Los estándares de TeA (como sal de cobre), y de AOH y AME fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TeA fue reconvertido a partir de la sal de cobre mediante el procedimiento descrito por Scott y Kanhere (1980). Se pesó 1 mg de

tenuazonato de cobre, se disolvió en 250 µl de cloruro de metileno y se pasó a través de una columna de intercambio iónico empaquetada con Dowex 50W Dry Mesh 100-200 de 1,5 cm de longitud. El acondicionamiento de la resina se realizó por lavado de la columna con 4 ml de cloruro de metileno. Se agregó el tenuazonato diluido y se eluyó con 8 ml de cloruro de metileno. El solvente se evaporó a sequedad y el ácido tenuazónico se resuspendió en metanol. Para calcular la concentración del ácido se utilizó el factor de conversión 0,72. A partir de los estándares sólidos se prepararon soluciones de trabajo en metanol a una concentración de 0,5 mg/ml, y se almacenaron a -18°C.

Se determinó la concentración de micotoxinas en las muestras analizadas mediante las curvas de calibración construidas para este fin. La identidad de los picos fue confirmada mediante la co-inyección con el correspondiente estándar. Los límites de detección, calculados como 5 veces la señal del ruido determinado en la línea de base en la zona cercana a la señal correspondiente a cada toxina respectivamente, fueron 5 µg/kg para AOH, 2 µg/kg para AME y 11 µg/kg para AT.

2.12 Ocurrencia natural de micotoxinas de *Alternaria* spp. en manzanas.

A un total de 30 manzanas, algunas sin lesiones externas visibles hasta antes de ser cortadas (corazón mohoso) y otras con lesiones características externas, se les realizó el procedimiento de extracción completa para determinar las toxinas AOH, AME y TeA, detallado en el ítem 2.7.2. Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tal como se detalla en el ítem 2.8. Las condiciones de corrida, fase móvil, longitud de onda de detección, etc. fueron las descritas en el ítem 2.9.

La cuantificación de las toxinas, se realizó de la misma manera que se detalla en el ítem 2.11.

2.13 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico que se utilizó fue un análisis exploratorio de datos. Se emplearon gráficos de barras, de dispersión e histogramas, para determinar

la incidencia de la micota general, los grupos-especie y/o especies y las principales micotoxinas de *Alternaria*. El software utilizado fue SPSS Statistics, versión 21 (IBM).

CAPÍTULO III – RESULTADOS

3. Resultados

3.1 Estudio de la micota de manzanas y cítricos

En total se obtuvieron 213 aislamientos de manzanas correspondientes a 8 géneros fúngicos. Los géneros de mayor incidencia en manzanas fueron: *Penicillium* (31%), *Alternaria* (24%) y *Geotrichum* (18%). En menor proporción se aislaron *Mucor* (10%), *Cladosporium* (8%), *Rhizopus* (4%), *Aspergillus* (3%) y *Fusarium* (2%). La figura 24 muestra el porcentaje de incidencia de los distintos géneros fúngicos contaminantes de manzana.

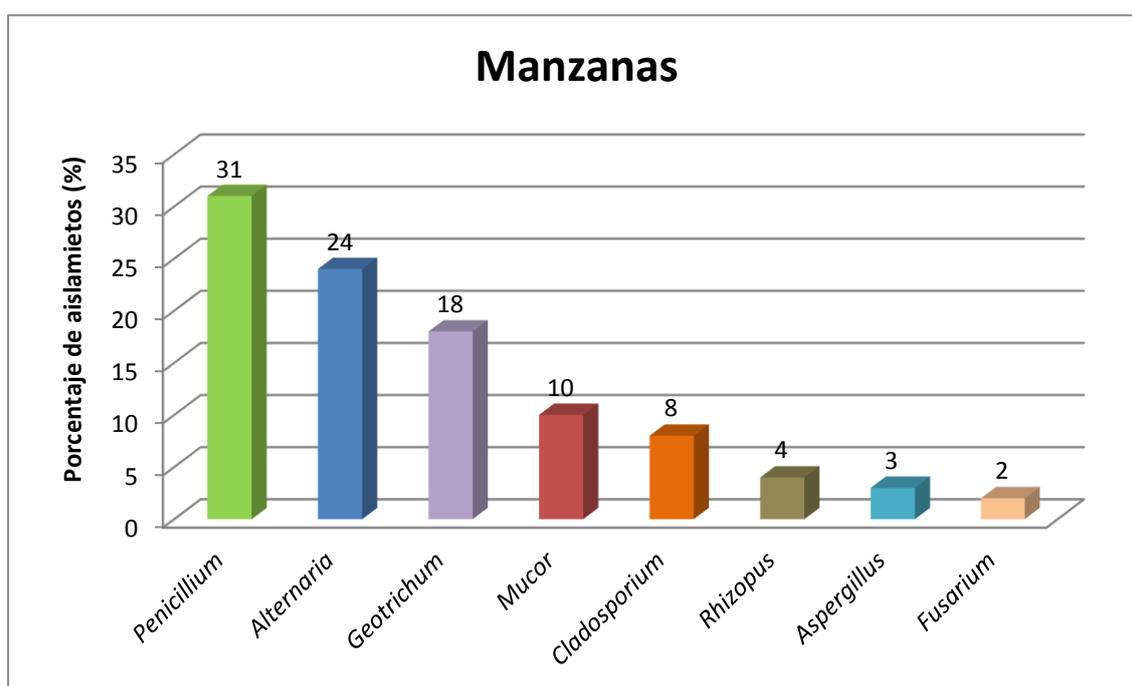


Figura 24: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de manzanas.

En la figura 25 se muestran los géneros de mayor incidencia en cítricos. Sobre un total de 178 aislamientos de cítricos, *Penicillium* (40%), *Colletotrichum* (16%) y *Geotrichum* (14%) fueron los géneros más frecuentemente aislados, seguidos en menor proporción por *Fusarium* (8%), *Cladosporium* (7%), *Alternaria* (7%) y *Aspergillus* (4%). Los géneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Monascus* y *Trichoderma* fueron hallados también aunque en bajas proporciones (<3%).

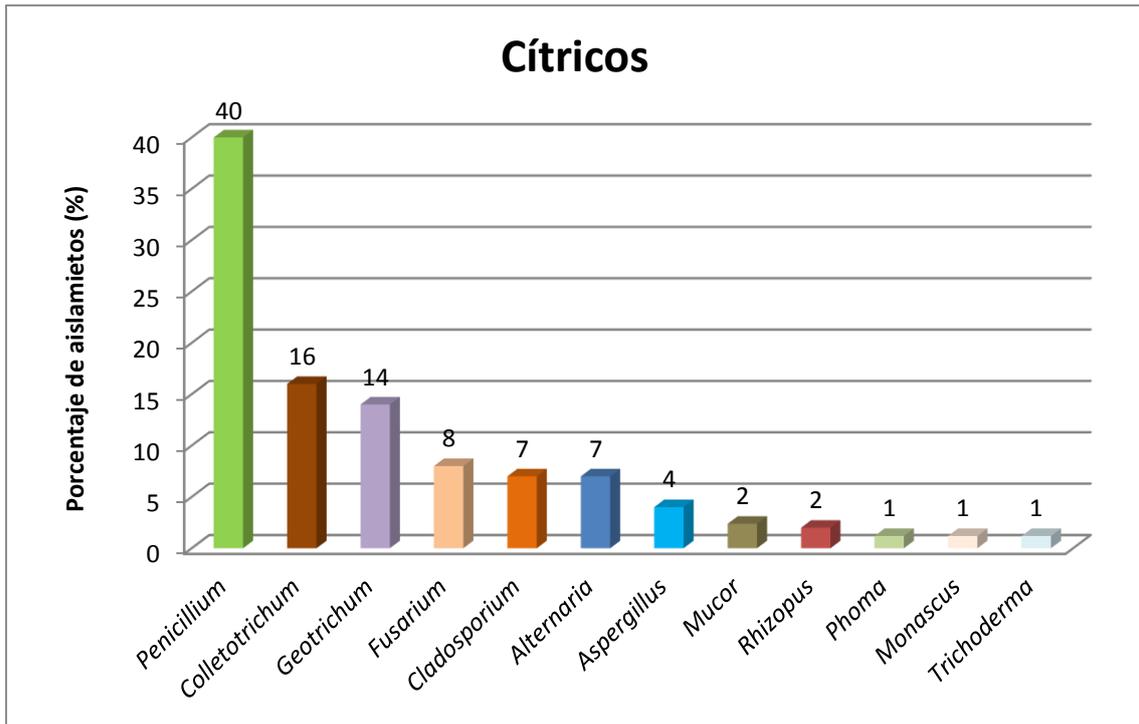


Figura 25: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de cítricos.

La distribución de los géneros fúngicos en los distintos tipos de frutos cítricos estudiados se muestran en la figura 26.

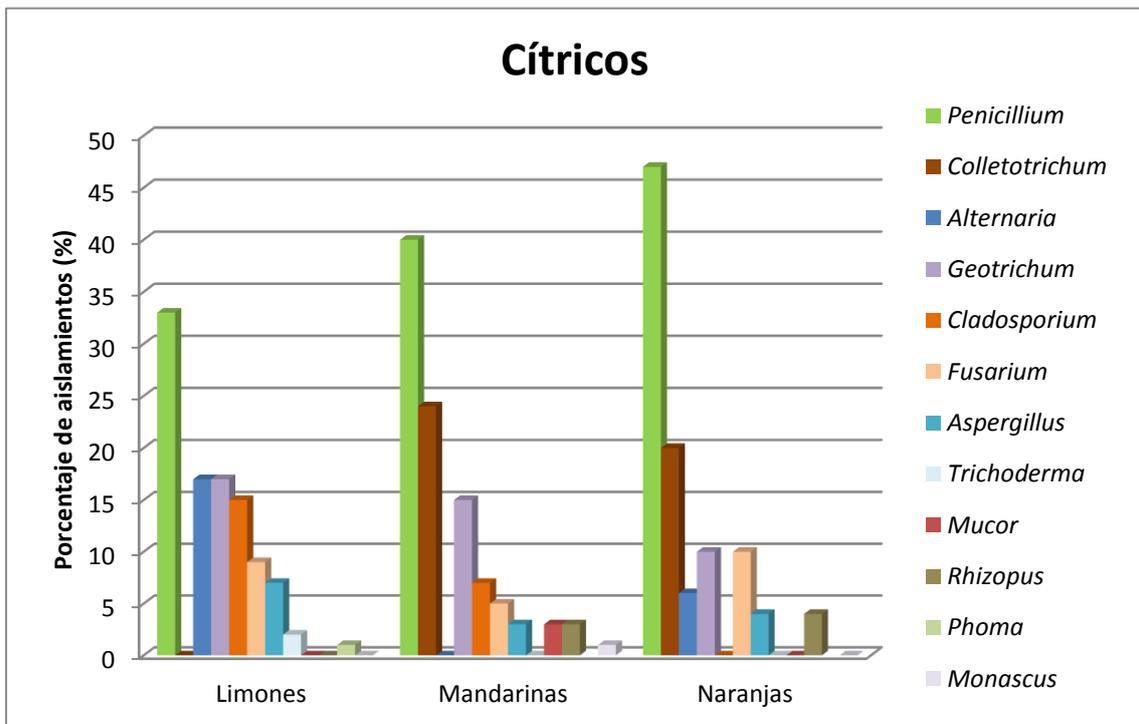


Figura 26: Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos aislados de limones, mandarinas y naranjas.

El género *Penicillium* spp. fue el principal componente de la micota tanto en manzanas como en cítricos, confirmando los datos previos existentes en bibliografía, la cual comprende numerosos estudios sobre la incidencia de este género y sus toxinas en dichas frutas.

Entre los géneros toxicogénicos, *Alternaria* fue el segundo más frecuente en manzanas, causando en todos los casos lesiones, con visible deterioro en los frutos. En el caso de los cítricos, *Alternaria* se aisló en menor proporción, si se los considera en su conjunto. Al analizar cada tipo de fruto separadamente se observó que fue el segundo género en importancia en limones, junto con *Geotrichum* y el quinto más frecuente en naranjas junto con *Aspergillus*. No se obtuvo ningún aislamiento de este género a partir de mandarinas.

Dada la escasa información sobre la incidencia de este género y sus toxinas en las frutas analizadas se decidió profundizar el estudio sobre los aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de manzanas y cítricos, con especial interés en manzanas, dada la alta frecuencia relativa de este género en las mismas.

3.2 Incidencia del género *Alternaria* en cítricos y manzanas

De todas las frutas analizadas, se obtuvieron en total 63 aislamientos del género *Alternaria*, 51 de ellos provenientes de manzanas y 12 a partir de cítricos (limones y naranjas).

De los 51 aislamientos provenientes de manzanas, un total de 27 (52,9%) fueron obtenidos a partir de lesión externa de la fruta y 24 (47,1%) fueron de lesión interna (corazón mohoso).

De los 12 aislamientos de cítricos, 8 (66,7%) se obtuvieron de lesión externa y 4 (33,3%) de lesión interna.

3.3 Aislamiento e Identificación morfológica de *Alternaria* a nivel de grupo-especie

Los aislamientos del género *Alternaria* fueron identificados a nivel de grupo-especie según los modelos de esporulación establecidos por Simmons (1999, 2007). Todos los aislamientos correspondieron a dos grupos-especie dentro del conjunto de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas.

a) Grupo-especie *A. tenuissima*: Los aislamientos correspondientes a este grupo-especie presentaron conidios de (8-)10-25+ en cadenas sin ramas, ocasionalmente ramas laterales cortas, las cuales no constituyen una porción dominante o consistente de la población (Figura 27).



Figura 27: Grupo-especie *A. tenuissima* (400x)

b) Grupo-especie *A. alternata*: Los aislamientos correspondientes a este grupo-especie presentaron conidios en aglomerados de cadenas ramificadas de manera variada e irregular; los conidióforos secundarios presentes fueron cortos y no se observaron conidióforos secundarios largos como elementos conspicuos, dominantes de la arquitectura arbórea (Figura 28).



Figura 28: Grupo-especie *A. alternata* (400x)

De los 63 aislamientos obtenidos, un total de 59 (93,7%) correspondieron al grupo-especie *A. tenuissima* y solamente 4 (6,3%) al grupo-especie *A. alternata*.

Entre los 51 aislamientos provenientes de manzanas, se obtuvieron 47 (92,2%) correspondientes al grupo especie *A. tenuissima* y 4 (7,8%) al grupo especie *A. alternata*, mientras que los 12 aislamientos provenientes de cítricos correspondieron en su totalidad al grupo especie *A. tenuissima*.

Considerando el tipo de lesión que presentaron las frutas, se determinó la distribución de los grupos-especie en referencia a este aspecto. Los resultados se muestran en la figura 29. De los 51 aislamientos de manzanas, 27 correspondieron a lesión externa, entre los cuales se obtuvieron 24 (88,9%) del grupo especie *A. tenuissima* y 3 (11,1%) de *A. alternata*. De los 24 aislamientos restantes, correspondientes a lesión interna (corazón mohoso), se obtuvieron un total de 23 (95,8%) que pertenecieron a *A. tenuissima* y 1 (4,2%) a *A. alternata*.

En cuanto a los 12 aislamientos provenientes de cítricos, todos ellos identificados como miembros del grupo-especie *A. tenuissima*, 8 fueron aislados de lesión externa y 4 de lesión interna. Los aislamientos de lesión interna fueron obtenidos únicamente de limones (Figura 29).

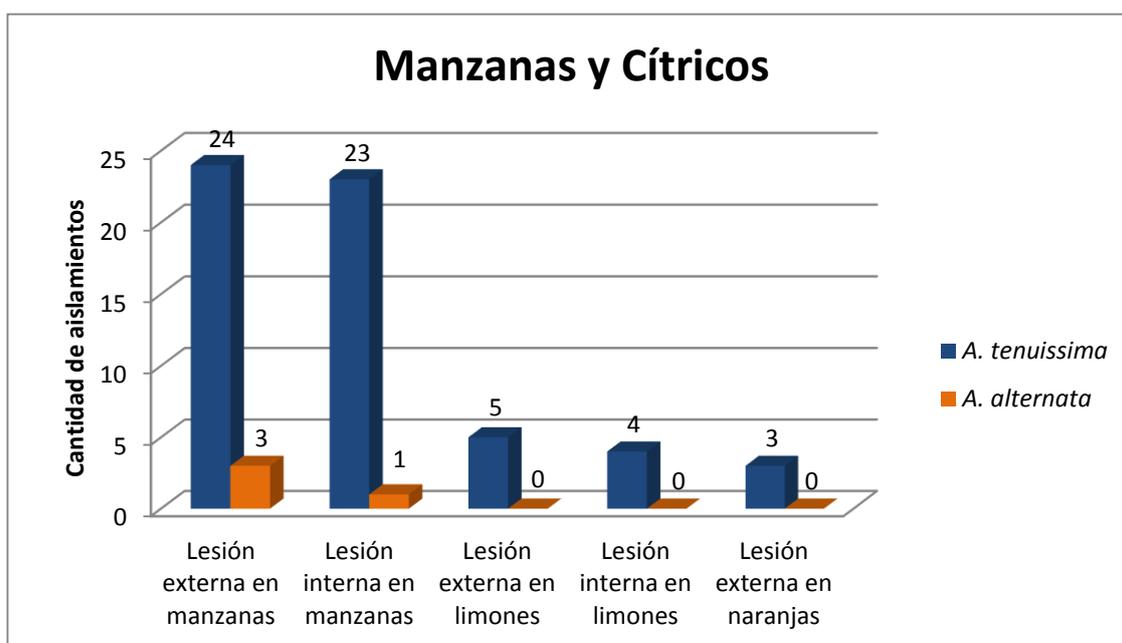


Figura 29: Distribución de grupos-especie de *Alternaria* en distintos tipos de lesión en manzanas y cítricos.

3.4 Aislamiento e Identificación morfológica de *Alternaria* a nivel de especie

Se continuó la caracterización de los aislamientos obtenidos de los frutos para identificarlos a nivel de especie en los casos en que fue posible a partir de sus características morfológicas.

De los 51 aislamientos de *Alternaria* obtenidos de manzana, 13 (25,5%) correspondieron a *A. mali*; 7 (13,7%) a *A. broussonetiae*; 4 (7,8%) a *A. longipes*; 1 (2%) a *A. caudata*; 1 (2%) a *A. alternata*; 1 (2%) a *A. dumosa*. Los aislamientos cuyas características se solaparon entre más de una especie, o cuya descripción no correspondió a ninguna de las especies descritas por Simmons (2007), fueron identificados únicamente a nivel de grupo-especie, siendo 22 de ellos (43,1%) correspondientes al grupo-especie *A. tenuissima* y 2 (3,9%) al grupo especie *A. alternata*.

Los aislamientos en función del tipo de lesión de la manzana se presentaron de la siguiente manera. De los 27 aislamientos externos, 8 (29,6%) correspondieron a *A. mali*, 4 (14,8%) a *A. broussonetiae*, 1 (3,7%) a *A. caudata*, 1 (3,7%) a *A. alternata*, 1 (3,7%) a *A. dumosa*, 11 (40,7%) se mantuvieron como grupo-especie *A. tenuissima* y 1 (3,7%) como grupo-especie *A. alternata*. De los 24 aislamientos de lesión interna (corazón mohoso), 5 (20,8%) correspondieron a *A. mali*, 4 (16,7%) a *A. longipes*, 3 (12,5%) a *A. broussonetiae*, 11 (45,8%) se mantuvieron como grupo-especie *A. tenuissima* y 1 (4,2%) como grupo-especie *A. alternata* (Figura 30).

De los 12 aislamientos de *Alternaria* en cítricos, 6 (50,0%) correspondieron a *A. limoniasperae*, 3 (25,0%) a *A. citrimacularis*, 2 (16,7%) a *A. longipes* y 1 (8,3%) a *A. broussonetiae*; 9 (75%) fueron obtenidos de lesiones externas y solo 3 (25%) de internas, de los cuales 2 fueron identificados como *A. limoniasperae* y 1 como *A. broussonetiae*. Esta última fue la única especie que solo fue aislada de lesión interna (Figura 31).

Las especies *A. mali*, *A. alternata*, *A. caudata*, y *A. dumosa*, se aislaron únicamente a partir de manzanas, mientras que *A. limoniasperae* y *A. citrimacularis* fueron aisladas solamente de cítricos.

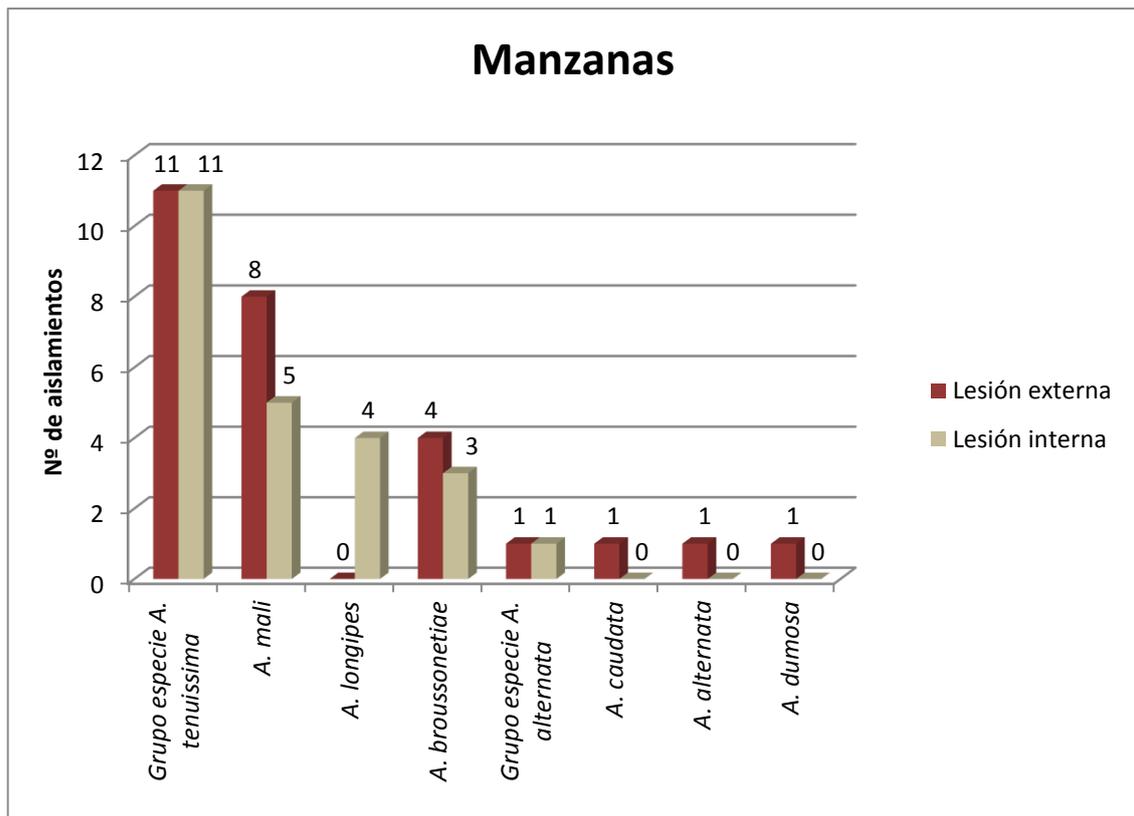


Figura 30: Aislamientos de *Alternaria* spp. de manzanas según el tipo de lesión.

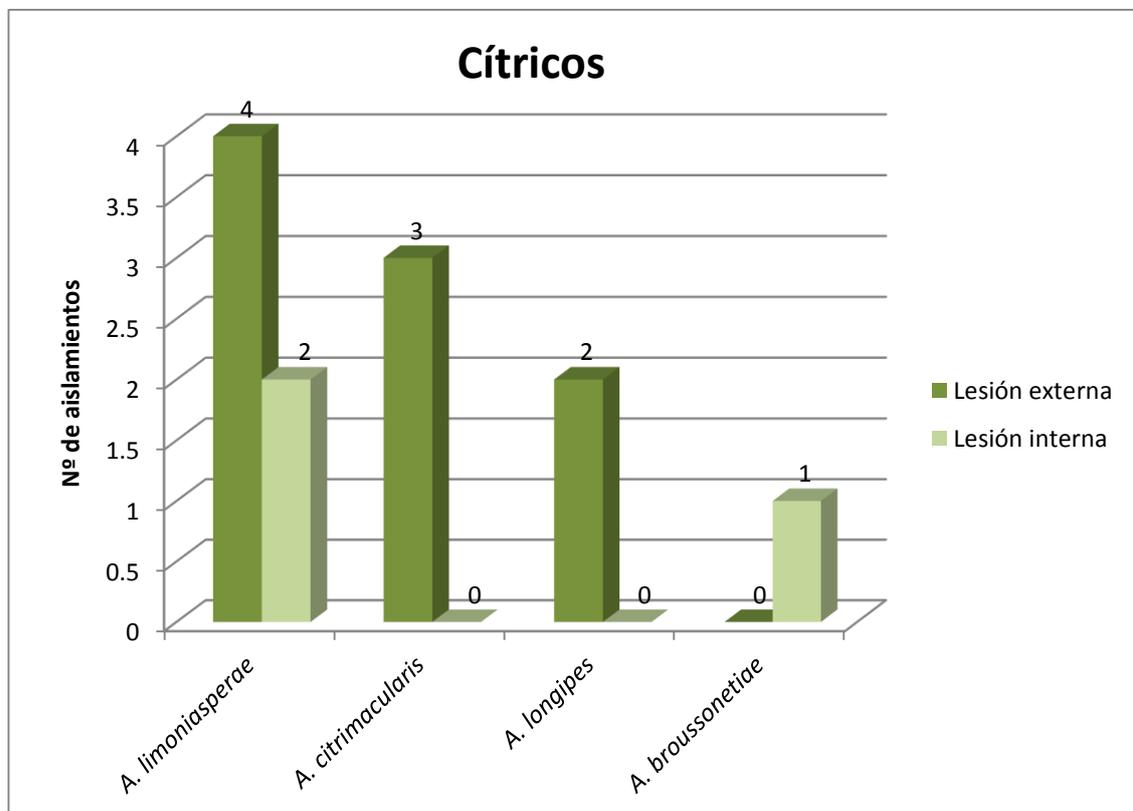


Figura 31: Aislamientos de *Alternaria* spp. de cítricos según el tipo de lesión.

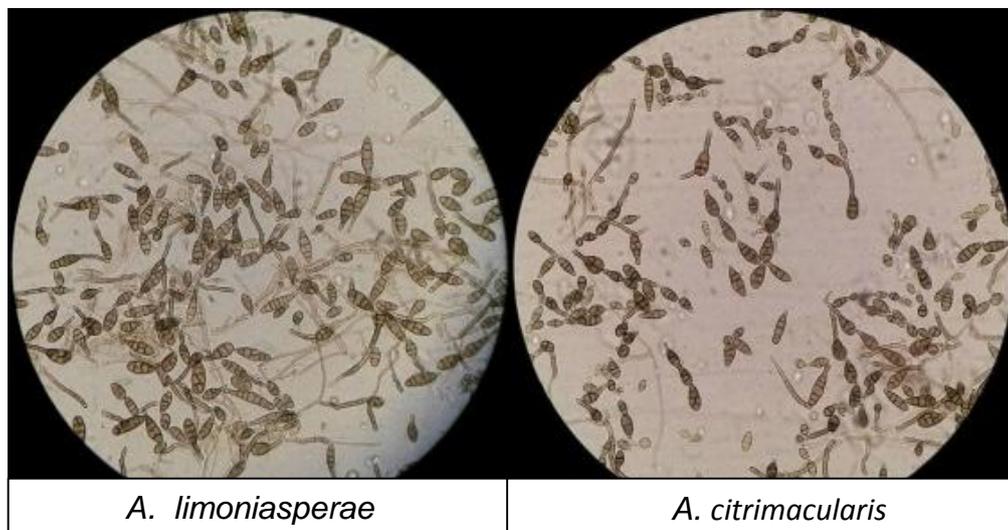
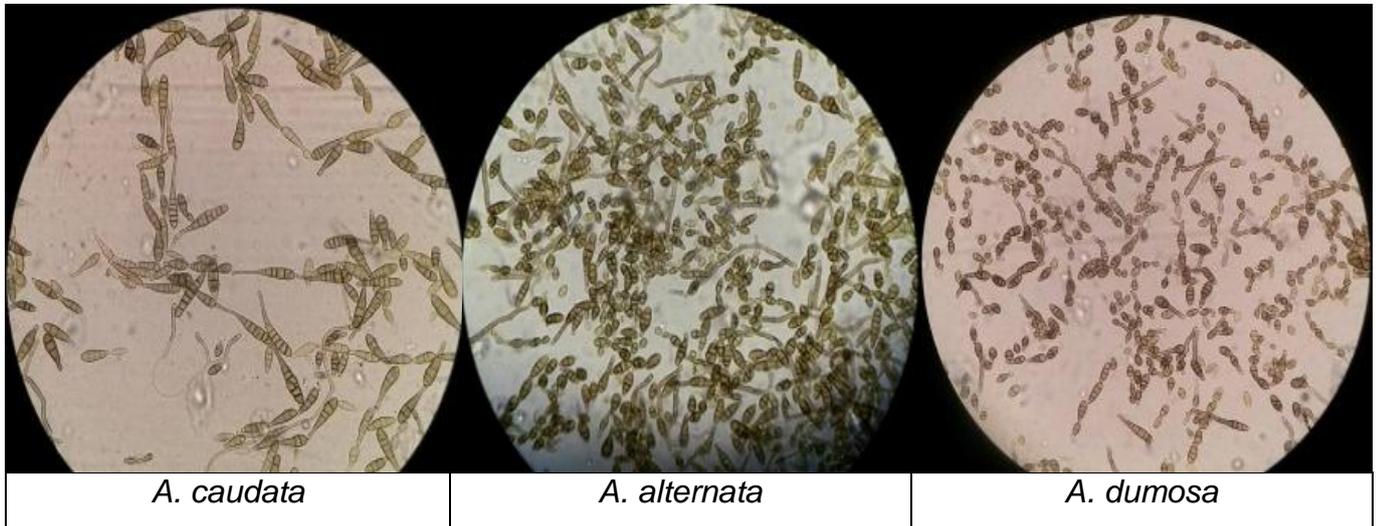


Figura 32: Especies de *Alternaria* aisladas de cítricos y manzanas

3.5 Capacidad toxicogénica de las cepas de *Alternaria*

Las 63 cepas aisladas, tanto las provenientes de manzanas como las de cítricos, fueron inoculadas en agar manzana (AM) para evaluar el efecto matriz en la producción de toxinas. Se determinaron las principales toxinas de *Alternaria*, AOH, AME y TeA.

3.5.1 Aislamientos de manzanas

Del total de 51 aislamientos de manzanas, 41 (80%) fueron capaces de producir las tres toxinas investigadas, AOH, AME y TeA; 9 (18%) produjeron AOH y AME y solo uno (2%) no produjo ninguna de las tres toxinas.

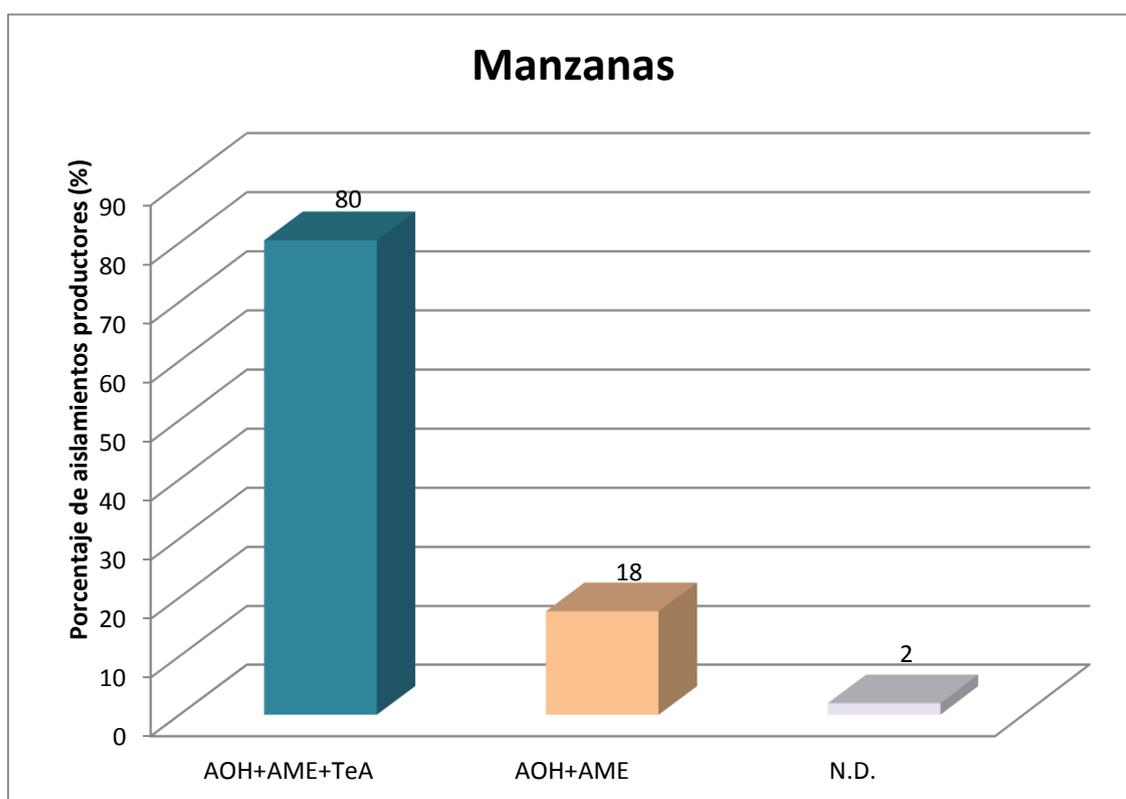


Figura 33: Producción de micotoxinas por *Alternaria* spp. aisladas de manzanas.

Teniendo en cuenta el tipo de lesión, de los 27 aislamientos obtenidos a partir de lesión externa, 26 resultaron productores de AME y AOH, y 20 de ellos dieron positivo además para TeA. De los 24 aislamientos obtenidos de lesión interna (corazón mohoso), el 100% dieron positivo para AME y AOH, y 21 resultaron productores de TeA.

Según el grupo-especie, de los 47 aislamientos correspondientes al grupo especie *A. tenuissima*, 46 resultaron productores de AME y AOH, y 37 de ellos fueron además capaces de producir TeA. Los 4 aislamientos correspondientes al grupo especie *A. alternata* dieron positivo para las tres toxinas investigadas.

La figura 34 muestra la producción de las tres toxinas de *Alternaria* por aislamientos de manzana en función del tipo de lesión y el grupo-especie correspondiente.

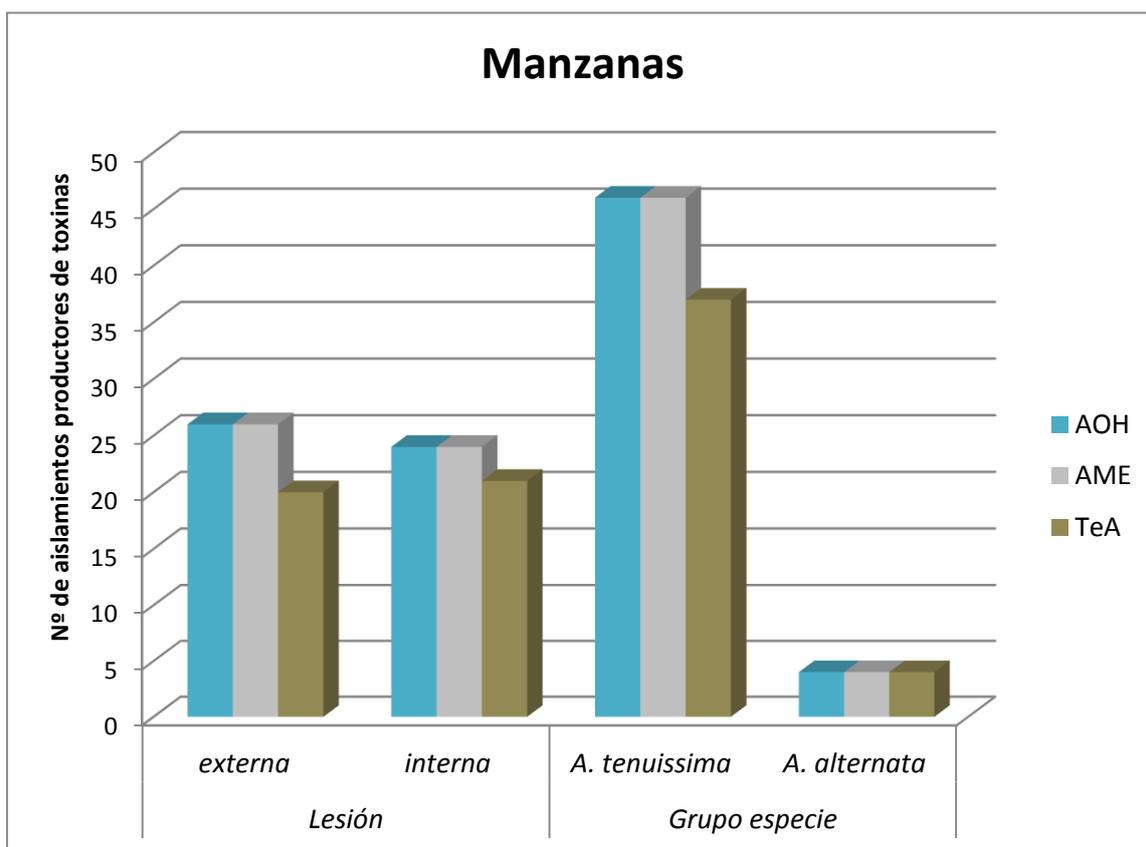


Figura 34: Producción de toxinas de *Alternaria* por aislamientos de manzanas según el tipo de lesión y el grupo-especie.

Las figuras 35, 36 y 37 muestran la distribución de las concentraciones de las toxinas producidas por *Alternaria* spp. de manzana, AOH, AME y TeA, respectivamente. Los resultados de concentración están expresados en μg de toxina por Kg de medio (AM) y están representados gráficamente en histogramas. En la tabla 6 se muestra el rango de las concentraciones y los valores promedios de cada toxina producidos por los aislamientos de manzana.

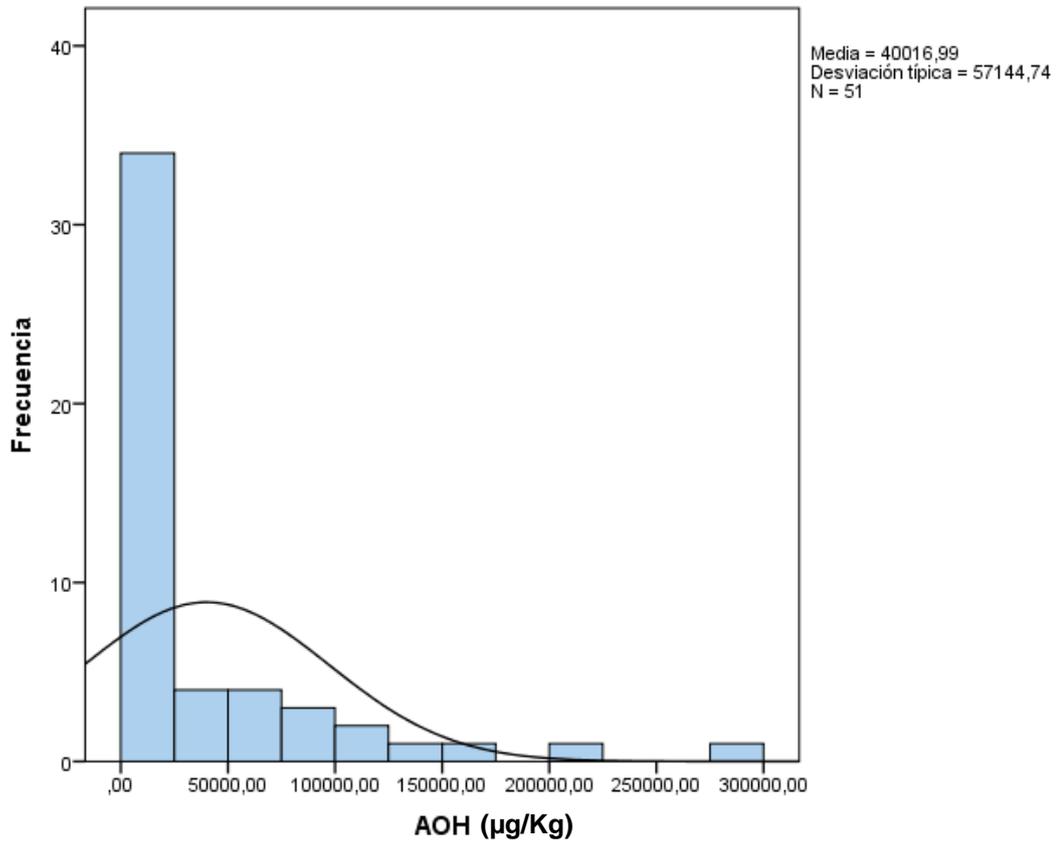


Figura 35: Producción de AOH por *Alternaria* spp. de manzanas.

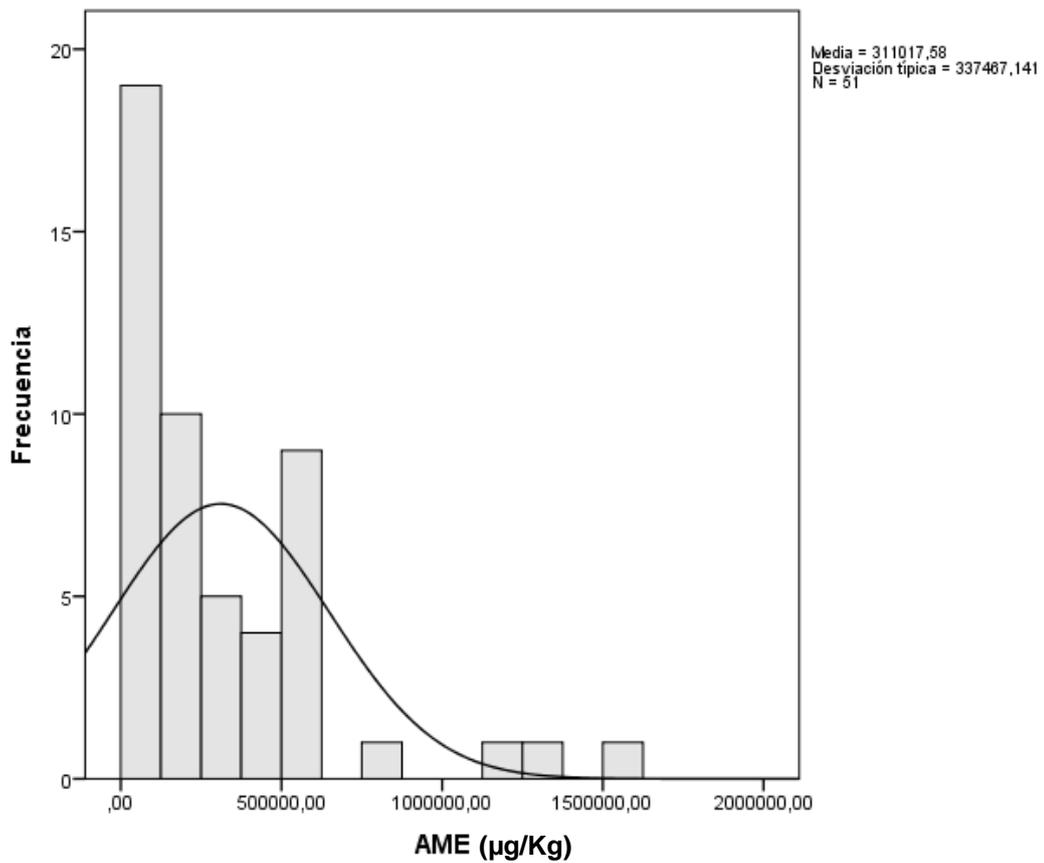


Figura 36: Producción de AME por *Alternaria* spp. de manzanas.

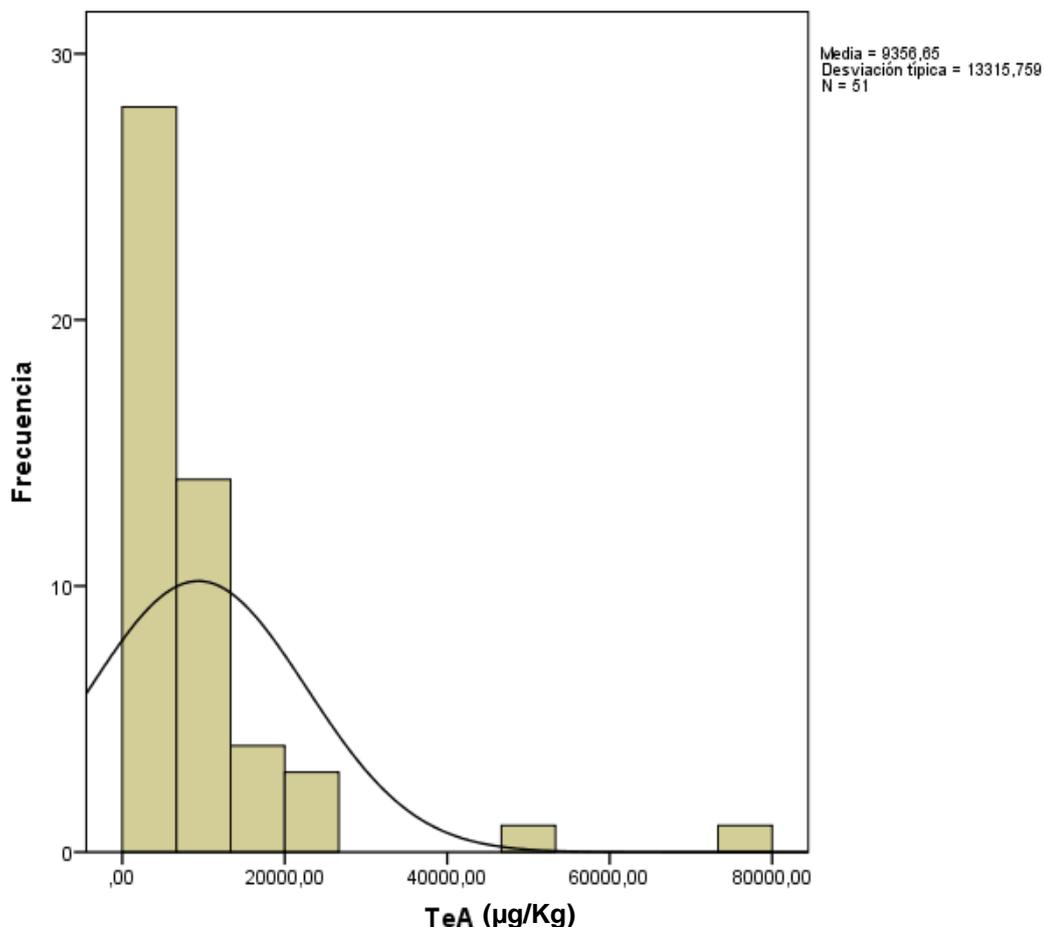


Figura 37: Producción de TeA por *Alternaria* spp. de manzanas.

Tabla 6: Valores máximos, mínimos y promedio de producción de toxinas de *Alternaria* por aislamientos de manzana.

Micotoxina	Mínimo (µg/Kg)	Máximo (µg/Kg)	Promedio (µg/Kg)
AOH	2.114	282.529	40.817
AME	4.385	1.541.219	317.238
TeA	650	79.764	11.639

* Se consideraron únicamente las muestras positivas para el cálculo de promedio, máximo y mínimo

Los resultados de producción de las micotoxinas estudiadas obtenidos para cada aislamiento individual se encuentran detallados en el Anexo 3.

Se analizó la correlación entre las concentraciones de las tres micotoxinas producidas por cada aislamiento para el total de las *Alternaria* spp. aisladas de manzanas. La figura 38 muestra las correlaciones AOH vs AME, AOH vs TeA

y AME vs TeA. Las tres correlaciones fueron positivas, siendo la correlación entre AOH y AME la que presentó el mayor coeficiente (R^2).

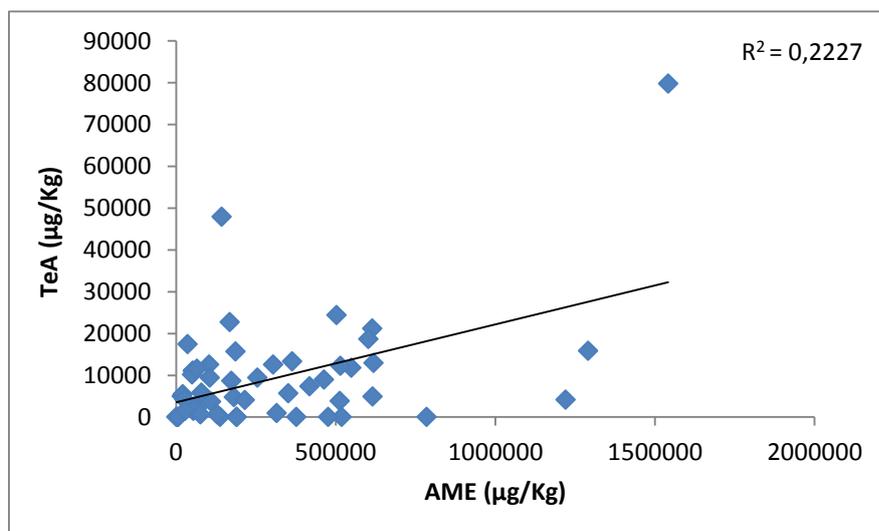
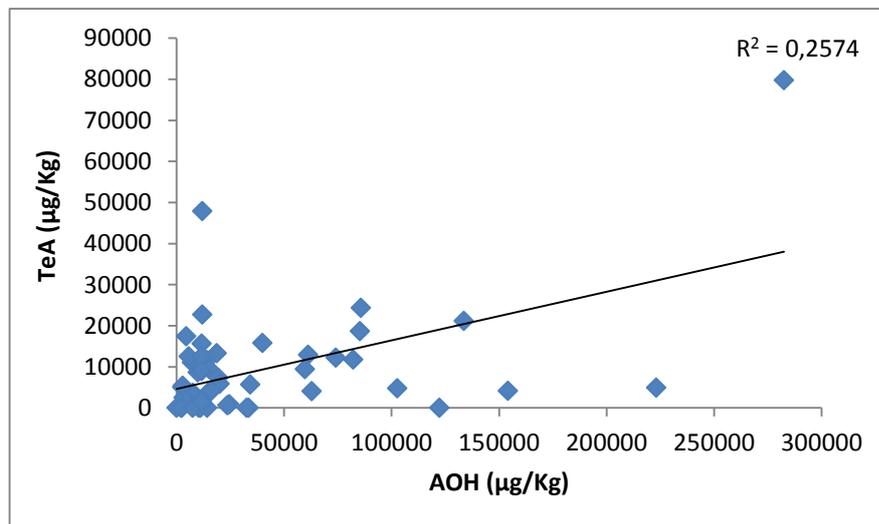
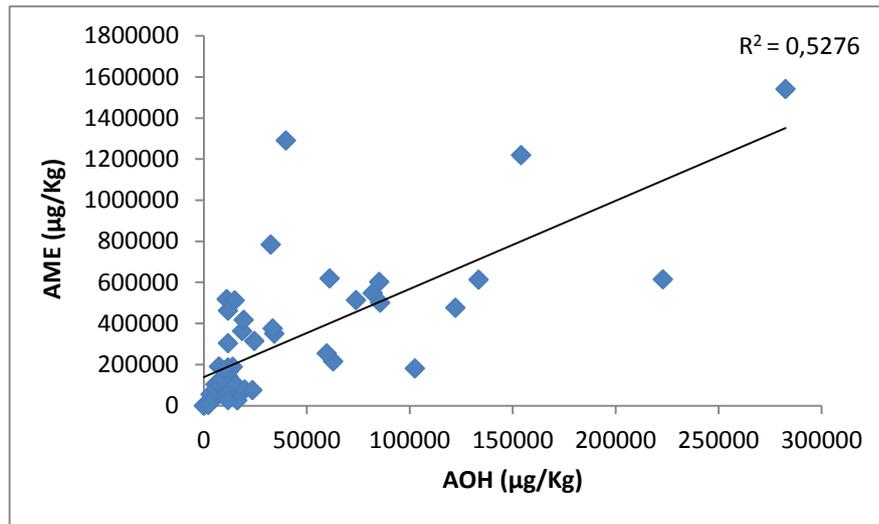


Figura 38: Correlaciones entre micotoxinas producidas por aislamientos de *Alternaria* de manzanas.

Tabla 7: Producción de micotoxinas por especies de *Alternaria* provenientes de manzanas.

Especies	Micotoxinas	N° de aislamientos productores	Promedio (µg/Kg)	Máximo (µg/Kg)	Mínimo (µg/Kg)
<i>A. mali</i>	AOH	13/13	67.628	282.529	2.358
	AME	13/13	450.553	1.541.218	6.041
	TeA	10/13	22.658	79.764	2.073
<i>A. brossonnetiae</i>	AOH	6/7	11.817	34.290	2.114
	AME	6/7	114.248	351.024	4.384
	TeA	4/7	6.499	11.584	3.716
<i>A. longipes</i>	AOH	4/4	29.771	85.710	9.863
	AME	4/4	360.379	501.891	172.890
	TeA	4/4	13.639	24.367	8.677
<i>A. caudata</i>	AOH	1/1	85.266	-	-
	AME	1/1	601.739	-	-
	TeA	1/1	18.680	-	-
<i>A. alternata</i>	AOH	1/1	5.657	-	-
	AME	1/1	103.614	-	-
	TeA	1/1	12.571	-	-
<i>A. dumosa</i>	AOH	1/1	2.760	-	-
	AME	1/1	21.134	-	-
	TeA	1/1	5.426	-	-
Grupo-especie <i>A. tenuissima</i>	AOH	22/22	33.767	223.033	3.331
	AME	22/22	273.547	1.219.656	25.852
	TeA	18/22	6.009	17.425	650
Grupo-especie <i>A. alternata</i>	AOH	2/2	67.570	74.013	61.127
	AME	2/2	566.578	618.666	514.490
	TeA	2/2	12.597	12.962	12.232

AOH: Alternariol; AME: Alternariol monometil éter; TeA: Acido tenuazónico.

* Se consideraron únicamente las muestras positivas para el cálculo de promedio, máximo y mínimo.

La tabla 7 muestra las concentraciones promedio, máximas y mínimas de las micotoxinas producidas por aislamientos de manzana discriminadas por especie o grupo-especie, según corresponda. Las concentraciones más elevadas de las tres toxinas, AOH, AME y TeA, fueron producidas por la especie *A. mali*. La máxima concentración de cada una de las toxinas correspondió a un mismo aislamiento de dicha especie. Los valores más bajos de AOH y AME se registraron para la especie *A. broussonetiae*. Asimismo, la menor producción de ambos alternarios correspondió a un mismo aislamiento de esta especie. Para TeA, en cambio, la menor producción se observó para un aislamiento del grupo-especie *A. tenuissima*. Por otra parte, el único aislamiento que no produjo ninguna de las tres toxinas correspondió a la especie *A. broussonetiae*.

3.5.2 Aislamientos de cítricos

La capacidad de producción de toxinas por los aislamientos de *Alternaria* spp. de frutos cítricos fue investigada también en agar manzana (AM) a fin de evaluar la posible especificidad de sustrato de las cepas toxicogénicas. De un total de 12 aislamientos de cítricos, 4 (33%) produjeron las tres toxinas (AOH, AME y TeA) y 8 (67%) produjeron solo AOH y AME en AM. Todos los aislamientos de cítricos fueron capaces de producir al menos una de las micotoxinas estudiadas en dicho medio de cultivo.

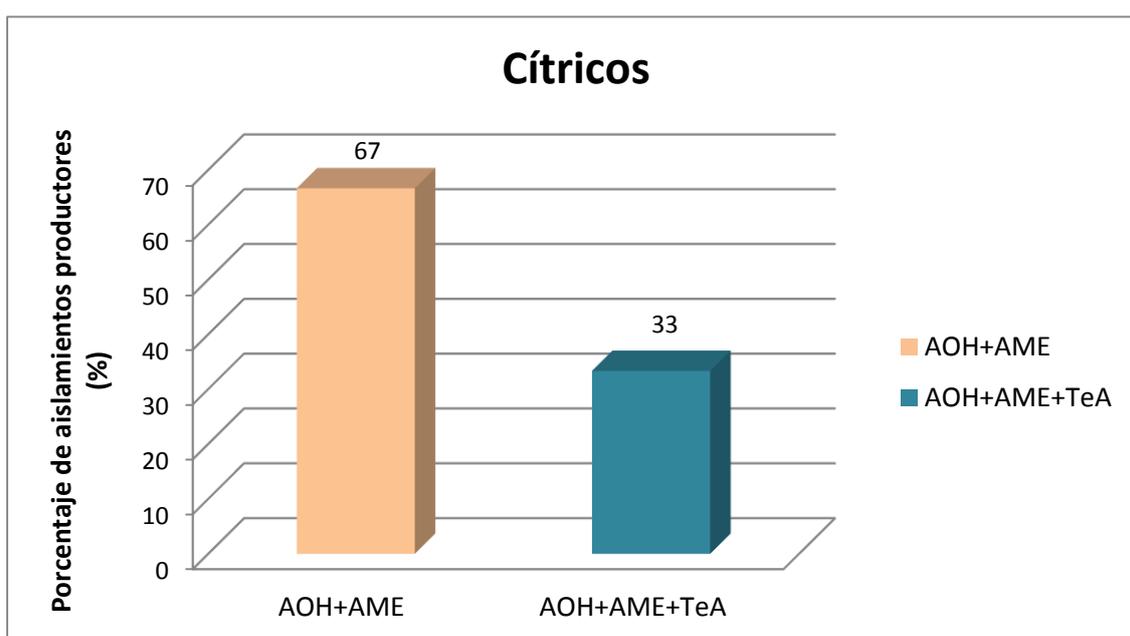


Figura 39: Producción de micotoxinas por *Alternaria* spp. aisladas de cítricos.

Las figuras 40, 41 y 42 muestran la distribución de las concentraciones de toxinas producidas por *Alternaria* spp. de cítricos, AOH, AME y TeA, respectivamente. Los resultados están expresados en μg de toxina por Kg de medio (AM) y representados gráficamente en histogramas.

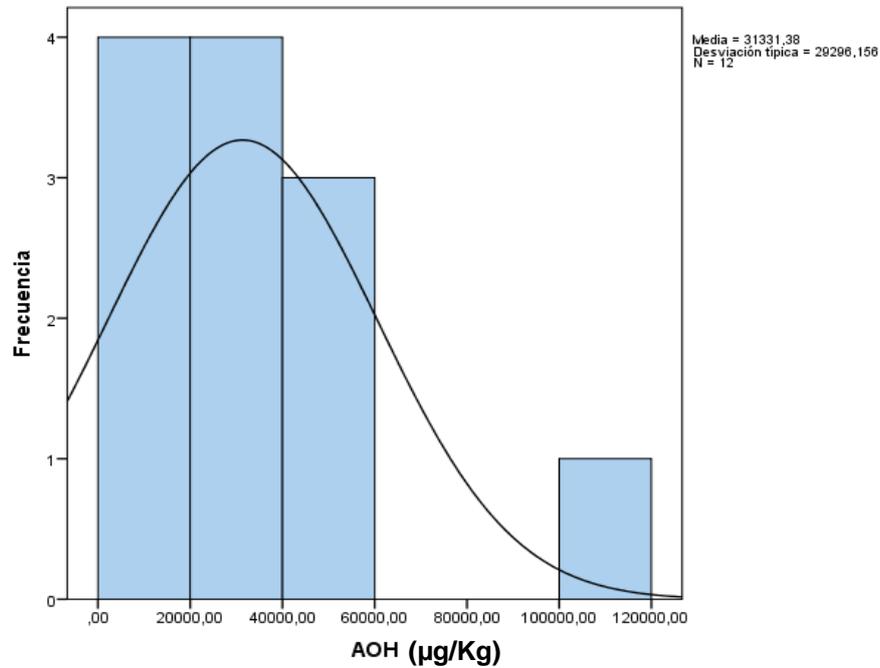


Figura 40: Producción de AOH por *Alternaria* spp. de cítricos.

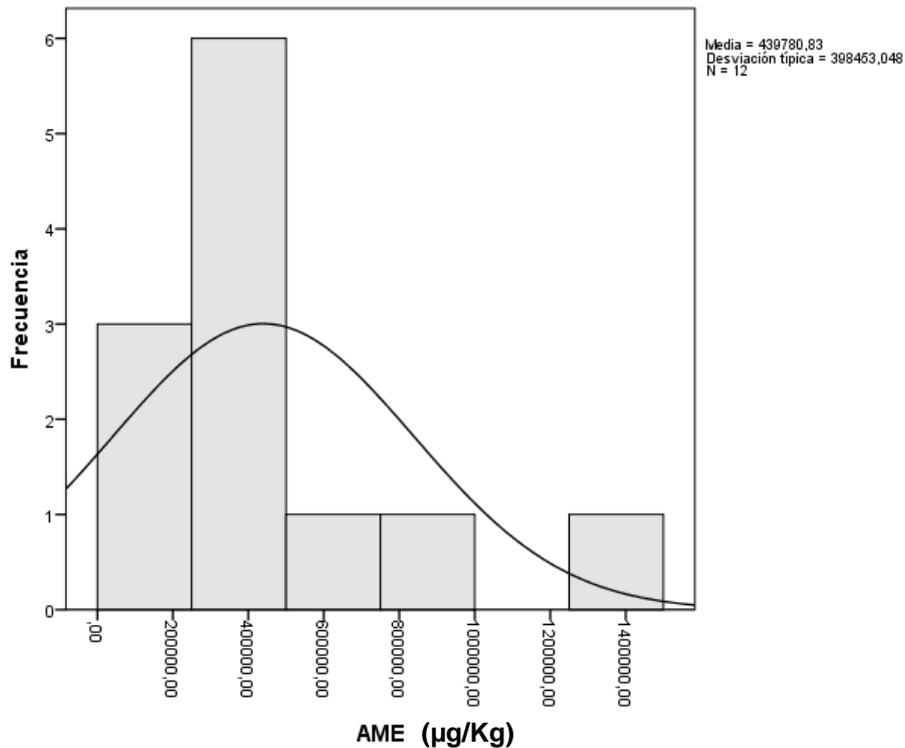


Figura 41: Producción de AME por *Alternaria* spp. de cítricos.

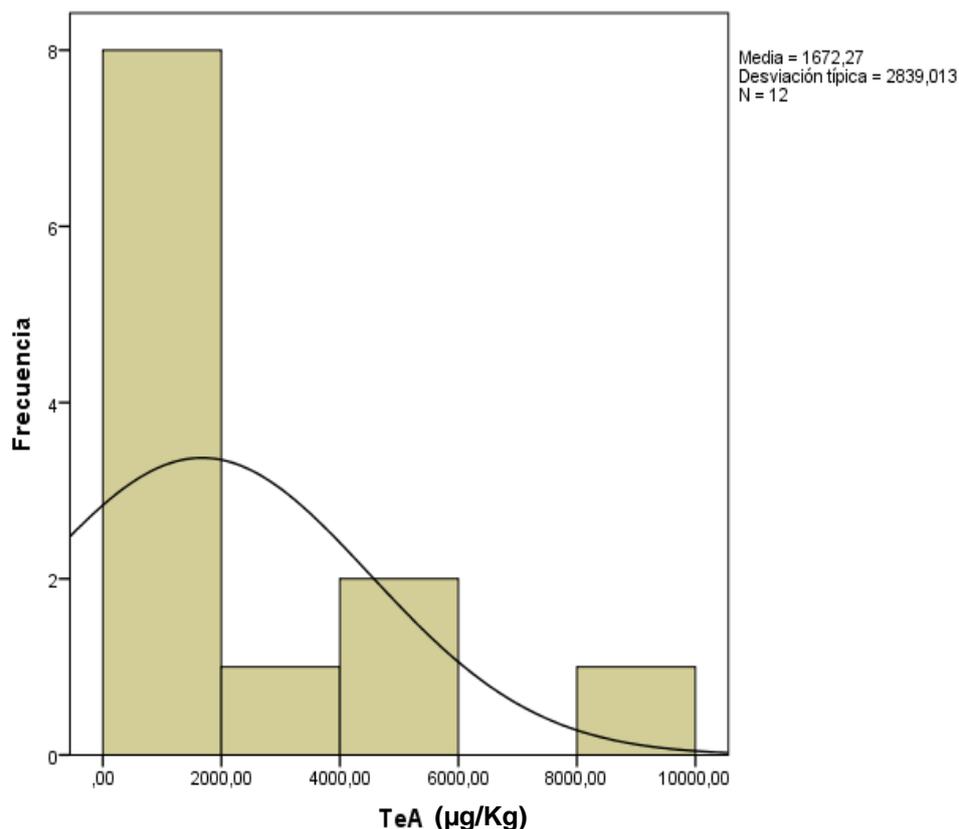


Figura 42: Producción de TeA por *Alternaria* spp. de cítricos.

En la tabla 8 se muestra el rango de las concentraciones de cada toxina y los valores promedios producidos por aislamientos de cítricos en AM.

Tabla 8: Valores máximos, mínimos y promedio de producción de toxinas de *Alternaria* por aislamientos de cítricos.

Micotoxina	Mínimo (µg/Kg)	Máximo (µg/Kg)	Promedio (µg/Kg)
AOH	2.295	111.295	31.331
AME	2.769	1.477.352	439.781
TeA	2.789	8.913	5.017

* Se consideraron únicamente las muestras positivas para el cálculo de promedio, máximo y mínimo

Los resultados de producción de las micotoxinas estudiadas obtenidos para cada aislamiento individual se encuentran detallados en el Anexo 3.

La tabla 9 muestra las concentraciones promedio, máximas y mínimas de las micotoxinas producidas por aislamientos de cítricos discriminadas por especie.

Tabla 9: Producción de micotoxinas por especies de *Alternaria* provenientes de cítricos.

Especies	Micotoxinas	Positivos	Promedio (ug/Kg)	Máximo (ug/Kg)	Mínimo (ug/Kg)
<i>A. limoniasperae</i>	AOH	6/6	27.735	44.780	3.605
	AME	6/6	544.937	1.477.352	60.655
	TeA	2/6	3.455	4.121	2.788
<i>A. citrimacularis</i>	AOH	3/3	51.398	111.294	2.295
	AME	3/3	321.530	519.289	2.768
	TeA	2/3	6.578	8.913	4.243
<i>A. longipes</i>	AOH	2/2	9.718	10.803	8.633
	AME	2/2	355.403	417.623	293.183
	TeA	0/2	N.D.	-	-
<i>A. broussonetiae</i>	AOH	1/1	35.932	-	-
	AME	1/1	332.349	-	-
	TeA	0/1	N.D.	-	-

AOH: Alternariol; AME: Alternariol monometil éter; TeA: Acido tenuazónico; ND: no detectada.

* Se consideraron únicamente las muestras positivas para el cálculo de promedio, máximo y mínimo

Las mayores concentraciones de las toxinas AOH y TeA fueron producidas por la especie *A. citrimacularis* y la de AME por *A. limoniasperae*. Los valores más bajos de AOH y AME fueron producidos por *A. citrimacularis*, y para TeA por *A. limoniasperae*.

Los aislamientos de cítricos produjeron las tres toxinas en concentraciones más bajas que los de manzanas en AM. A fines comparativos, debe tenerse en cuenta que las únicas especies que se aislaron de ambos sustratos fueron *A. broussonetiae* y *A. longipes*. Las concentraciones de AME y AOH producidas por *A. broussonetiae* aislada de cítricos fueron cuantitativamente similares a los valores máximos de aislamientos de manzanas; sin embargo, TeA no fue producido por los aislamientos de cítricos correspondientes a esta especie. Por otro lado, los aislamientos de *A. longipes* de manzanas produjeron cantidades de AME similares a las de cítricos, pero mayores concentraciones de AOH. Asimismo, los aislamientos de cítricos de esta especie fueron incapaces de sintetizar TeA.

3.6 Ocurrencia de micotoxinas en manzanas infectadas naturalmente

Un total de 30 manzanas fueron analizadas, 25 de las cuales presentaron lesión interna (corazón mohoso), 3 mostraban lesión externa, y 2 no presentaban lesión. Los resultados indicaron que 28/30 muestras presentaron contaminación con al menos una de las toxinas analizadas. La distribución de las toxinas en las muestras resultó en 2 (7%) de las muestras naturalmente contaminadas con las tres toxinas (AOH, AME y TeA), 14 (46%) con AOH y AME, 3 (10%) con AME y TeA, 2 (7%) únicamente con AOH, 7 (23%) únicamente con AME y solo 2 (7%) no mostraron contaminación con ninguna de las tres toxinas evaluadas. Estos resultados se muestran en la Figura 43.

Las únicas dos muestras que no estaban contaminadas con ninguna de las tres toxinas fueron aquellas que no presentaban lesión por deterioro fúngico.

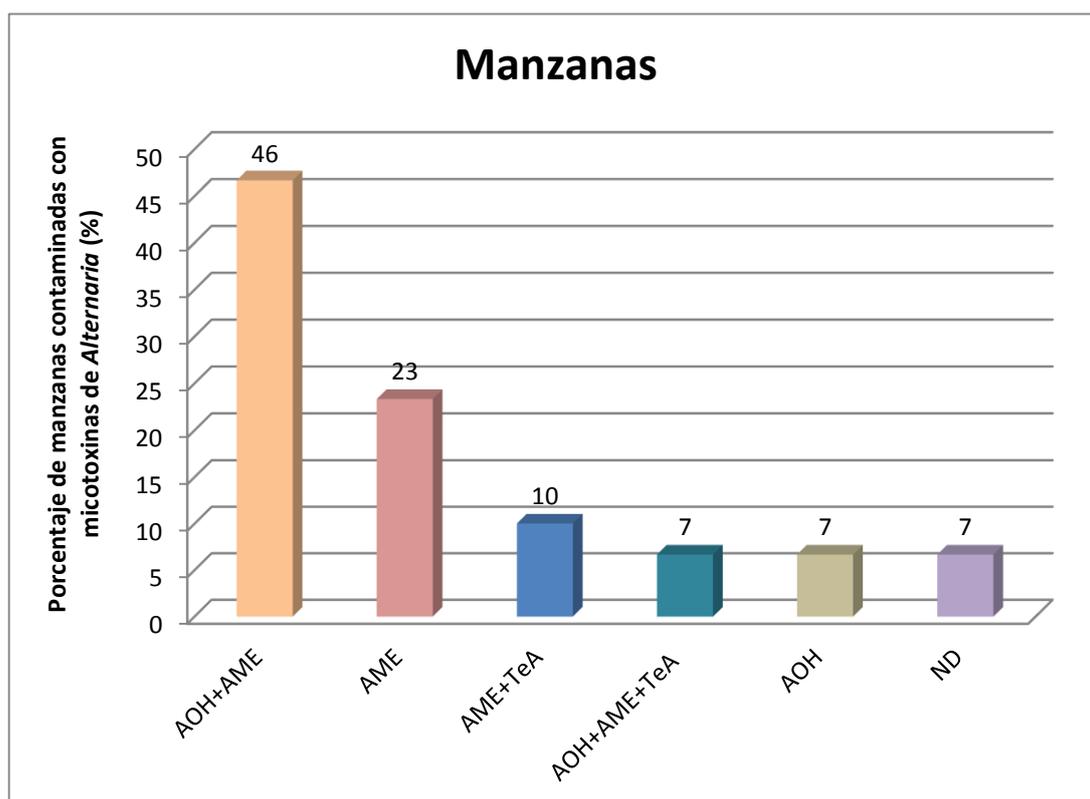


Figura 43: Ocurrencia natural de micotoxinas de *Alternaria* spp. en manzanas.

La tabla 10 muestra la concentración de AOH, AME y TeA hallada en manzanas naturalmente contaminadas.

Tabla 10: Concentración de toxinas de *Alternaria* spp. en manzanas naturalmente contaminadas.

Muestra #	Tipo de lesión	Micotoxinas (µg/Kg)		
		AOH	AME	TeA
1	Lesión interna	28	554	N.D.
2	Lesión interna	N.D.	688	N.D.
3	Lesión interna	N.D.	350	N.D.
4	Lesión interna	N.D.	1.266	12
5	Lesión interna	186	3.793	55
6	Lesión interna	397	2.255	10
7	Lesión interna	68	783	N.D.
8	Lesión interna	N.D.	233	N.D.
9	Lesión interna	135	113	N.D.
10	Lesión interna	N.D.	170	13
11	Lesión interna	191	636	N.D.
12	Lesión interna	765	900	N.D.
13	Lesión interna	N.D.	1.410	25
14	Lesión interna	807	1.682	N.D.
15	Lesión interna	506	6.176	N.D.
16	Lesión externa	99	5.727	N.D.
17	Lesión externa	229	1.607	N.D.
18	Lesión externa	N.D.	507	N.D.
19	Lesión interna	286	699	N.D.
20	Lesión interna	248	1.759	N.D.
21	Lesión interna	135	940	N.D.
22	Lesión interna	N.D.	734	N.D.
23	Lesión interna	327	N.D.	N.D.
24	Lesión interna	N.D.	2.911	N.D.
25	Lesión interna	494	2.332	N.D.
26	Lesión interna	N.D.	1.370	N.D.
27	Lesión interna	1.809	21.764	N.D.
28	Lesión interna	116	N.D.	N.D.
29	Sin lesión	N.D.	N.D.	N.D.
30	Sin lesión	N.D.	N.D.	N.D.

Las figuras 44, 45 y 46 muestran la distribución de las concentraciones de las respectivas toxinas de *Alternaria* spp. en manzanas naturalmente contaminadas. Los resultados están expresados en µg de toxina por Kg de fruta y representados gráficamente en histogramas.

La tabla 11 muestra los rangos de concentraciones de cada toxina y los valores promedios hallados en manzanas naturalmente contaminadas.

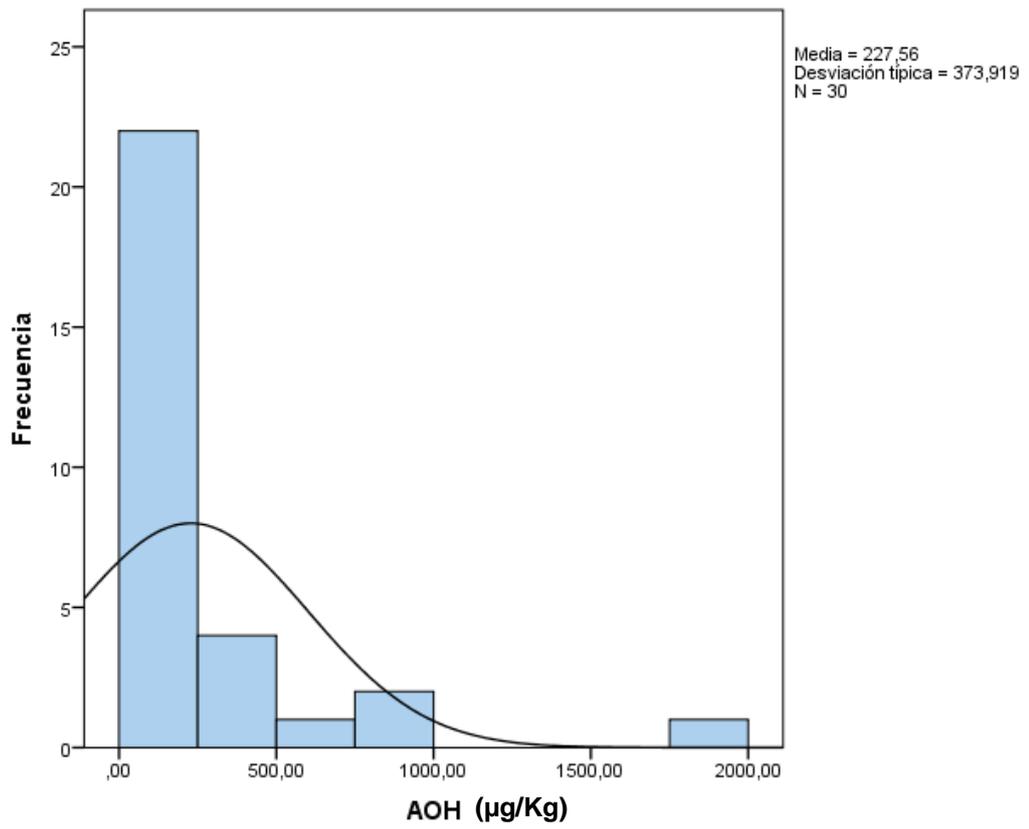


Figura 44: Ocurrencia natural de AOH en manzanas.

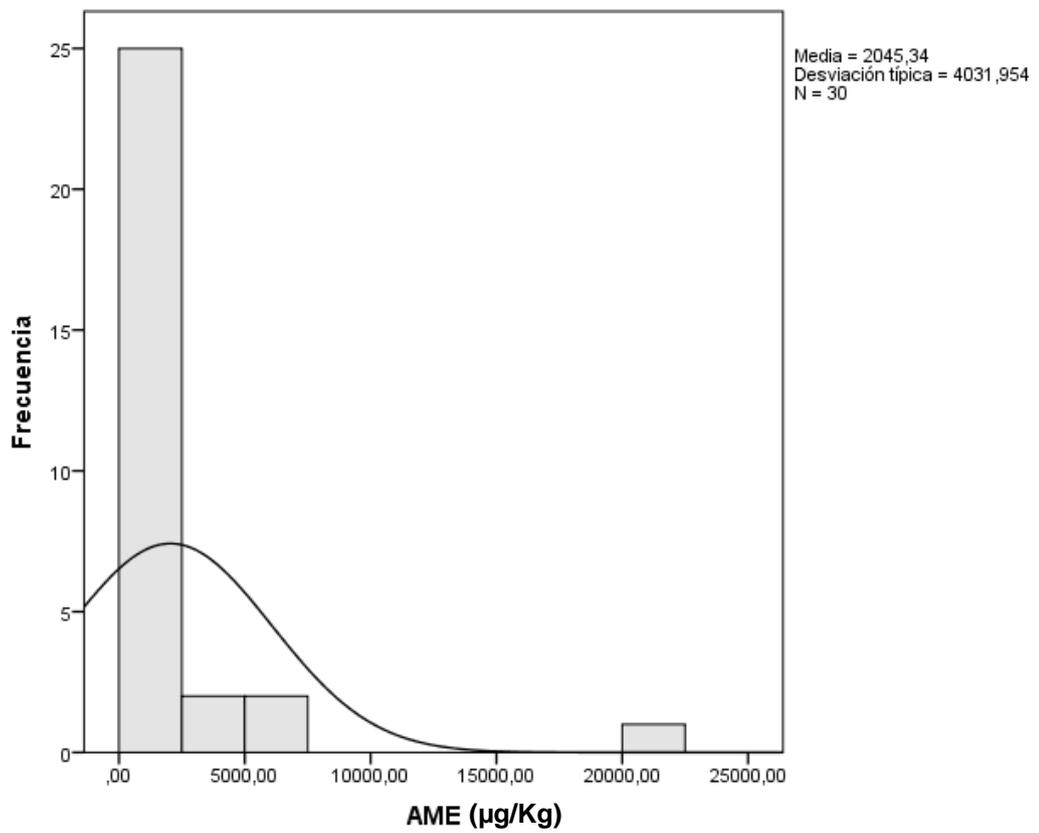


Figura 45: Ocurrencia natural de AME en manzanas.

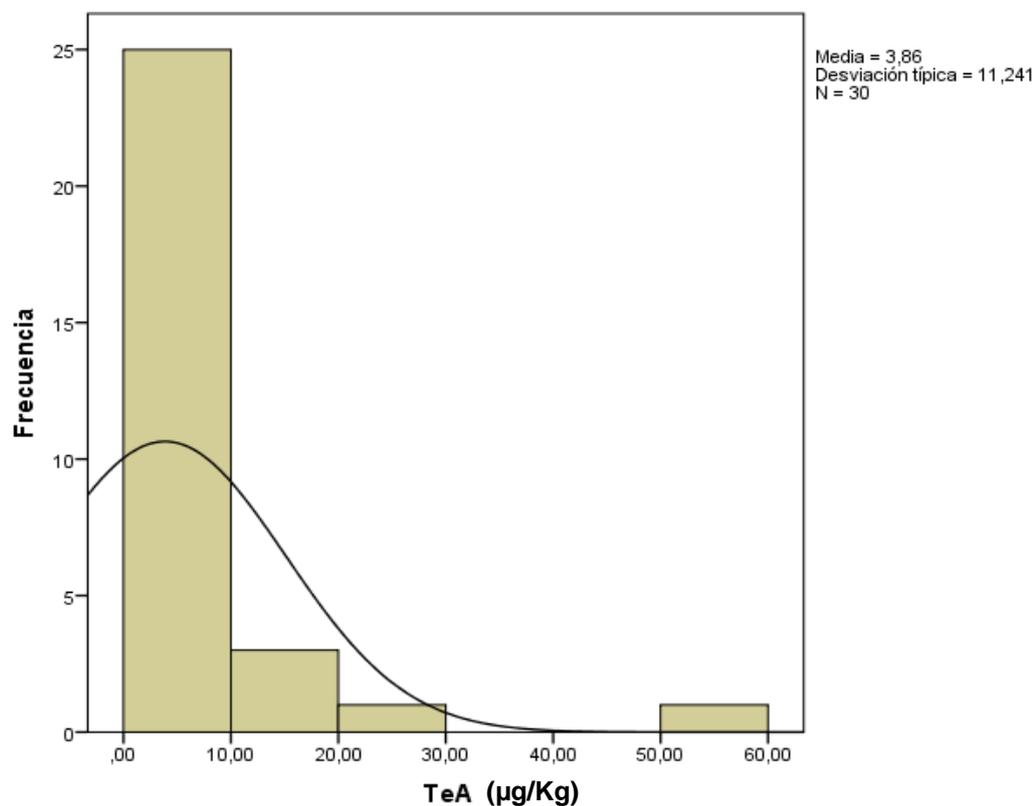


Figura 46: Ocurrencia natural de TeA en manzanas.

Tabla 11: Valores máximos, mínimos y promedio de toxinas de *Alternaria* en manzanas infectadas naturalmente.

Micotoxina	Mínimo (µg/Kg)	Máximo (µg/Kg)	Promedio (µg/Kg)
AOH	28	1809	379
AME	113	21.764	2.360
TeA	10	55	23

* Se consideraron únicamente las muestras positivas para el cálculo de promedio, máximo y mínimo

AME fue la toxina hallada en concentraciones más elevadas, seguida por AOH. TeA fue detectado en concentraciones mucho menores que ambos alternarioles.

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN

4. Discusión

4.1 Estudio de la micota de manzanas y cítricos

Numerosos estudios en diferentes partes del mundo, determinan al género *Penicillium* como el principal agente causal del deterioro de frutas (Exadaktylou y Thomidis, 2010; Franck y col., 2005; Janisiewicz y Korsten, 2002; Logrieco y col., 2003; Palou y col., 2010; Rathod, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el género fúngico con mayor incidencia en ambos sustratos, manzanas y cítricos, cultivados en Argentina, fue *Penicillium*, coincidiendo con los datos de bibliografía.

Los géneros de mayor incidencia en manzanas fueron *Penicillium*, *Alternaria* y *Geotrichum*, en orden de frecuencia decreciente. Estudios realizados en Grecia por Konstantinou y col. (2011), en diferentes variedades de manzanas, incluyendo Red Delicious, la variedad analizada en este trabajo, mostraron que los géneros con mayor incidencia fueron *Penicillium*, *Botrytis* y *Alternaria*. Un amplio estudio llevado a cabo en los EE.UU. sobre 424 muestras de 6 variedades de manzanas, mostró como principales contaminantes a *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Tournas y Uppal Memon, 2009). Por otra parte, Sholberg y Haag (1996) estudiaron la incidencia de patógenos postcosecha en manzanas almacenadas en Canadá y encontraron como principales contaminantes a los géneros *Penicillium* y *Botrytis*. Aunque se detectó también la presencia de *Alternaria*, este género mostró una menor incidencia que la observada en el presente trabajo y el de Grecia.

Si bien es evidente la existencia de una cierta variabilidad geográfica, muy probablemente asociada a las condiciones climáticas dominantes en las zonas de cultivo, los géneros *Penicillium* y *Alternaria*, son considerados los principales agentes de deterioro de esta fruta en diversas regiones del mundo, coincidiendo con nuestros resultados. Existen además varios estudios realizados en lesiones del corazón de manzanas donde se encontró al género *Alternaria* como el principal agente asociado a este tipo de lesión (Gao y col., 2013; Serdani y col., 2002; Soliman y col., 2015).

Los principales géneros aislados a partir de cítricos en el presente trabajo fueron *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Geotrichum*. Estos resultados presentan

similitud con los reportados por Guédez y col. (2010) en Venezuela, donde los géneros predominantes, aislados a partir de naranjas, fueron *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Cladosporium*. Numerosos datos de bibliografía señalan a *Penicillium* como el principal género contaminante de cítricos (Logrieco y col., 2003; Pitt y Hocking, 2009). Sin embargo, otros géneros como *Alternaria*, *Geotrichum*, *Cladosporium* y *Colletotrichum* han sido hallados en altas frecuencias en estudios sobre frutos cítricos, en algunos casos superando en incidencia a *Penicillium* (Kanetis y col., 2015).

La incidencia del género *Alternaria* en cítricos ocupó el quinto lugar en el presente trabajo, aislándose solamente de limones y naranjas; en mandarinas no hubo incidencia de este género. Los datos de bibliografía en cuanto a la preponderancia de este género en cítricos presentan mayor variabilidad que en el caso de manzanas. Estudios realizados en Estados Unidos por Tournas y Katsoudas (2005), determinaron al género *Alternaria* como el principal agente de deterioro en cítricos (naranjas, mandarinas, limones y limas), mientras que otros estudios realizados en Nigeria, a partir de naranjas, mencionan a *Alternaria* como uno de los géneros de menor incidencia (Oviasogie y col., 2015). Esta variabilidad en los resultados podría estar relacionada con las condiciones climáticas durante las distintas etapas de cultivo en los diferentes países en donde se realizaron los estudios.

La micota de frutas se ve influenciada por diferentes aspectos, entre ellos la ubicación geográfica, condiciones ambientales, agronómicas, técnicas de manejo de cultivo, riego, fumigación, entre otros factores, que son determinantes en la variabilidad de la incidencia de los diferentes géneros fúngicos aislados y reportados en diversos sustratos a nivel mundial. Es por ello que el conocimiento de la misma a nivel regional es importante para establecer los principales riesgos a los que están sometidos los cultivos, prevenir las enfermedades causadas por estos patógenos, las cuales derivan en importantes pérdidas económicas para el sector productivo, y enfocar los estudios en los géneros micotoxigénicos, que, en caso de desarrollarse en los frutos, pueden acumular sustancias tóxicas en los mismos, que no son eliminadas luego durante el procesado.

4.2 Incidencia de *Alternaria spp.* en cítricos y manzanas e Identificación morfológica de *Alternaria spp.* a nivel de grupo-especie y especie

El género *Alternaria* estuvo presente en un 55% de los aislamientos provenientes de manzanas, mientras que en cítricos solamente se aisló en un 14%. Probablemente la composición química de las manzanas, así como su mayor pH, propicien un ambiente más favorable para el crecimiento y esporulación de este género. Además la gruesa piel de los cítricos representa una barrera más difícil de penetrar para el patógeno, que frecuentemente ingresa al fruto en etapa post-cosecha a través de heridas e incisiones en la piel o cáscara del fruto.

Los aislamientos de *Alternaria* presentes en los dos tipos de frutos pertenecieron solamente a dos grupos-especie dentro de la sección de *Alternaria* de esporas pequeñas. En manzanas se aislaron cepas pertenecientes a los grupos-especie *A. tenuissima* y *A. alternata*, correspondientes al grupo H y J respectivamente, según los modelos de esporulación establecidos por Simmons (2007). Mientras que en cítricos solamente se halló el grupo-especie *A. tenuissima*.

La identificación morfológica a nivel de especie dentro de la sección de *Alternaria* de esporas pequeñas es muy compleja debido a las estrechas similitudes que presentan dichas especies entre sí y a la existencia de características comunes a varias de ellas. Por esto, muchos estudios han intentado el empleo de análisis moleculares para realizar la identificación a este nivel (Peever y col, 1999; Pryor y Gilbertson, 2000; Roberts y col, 2000); sin embargo los resultados obtenidos aún son muy variables como para poder incorporar estas técnicas como herramientas taxonómicas. La secuenciación de regiones conservadas, comúnmente utilizadas en la identificación a nivel de especie para otros géneros fúngicos, como *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, etc., no proporcionó resolución entre el grupo de *Alternaria* de esporas pequeñas, y no mostró correlación con la división a nivel de especie basada en los patrones tridimensionales de esporulación desarrollada por Simmons (2007). Por ejemplo, los análisis filogenéticos utilizando regiones ITS, universalmente empleados para identificación de especies dentro de diversos géneros fúngicos, no resultan aplicables para *Alternaria spp.* de esporas

pequeñas, ya que entre *A. alternata* y *A. tenuissima* estas regiones resultan casi en un 100% idénticas. Los estudios más recientes, basados en la secuenciación de diversas regiones conservadas y genes codificantes de proteínas concluyen que todas las *Alternarias* de esporas pequeñas descritas por Simmons (2007) deberían agruparse en una única sección, *Alternaria* sección *Alternaria*, de la cual *A. alternata* sería la especie tipo (Lawrence y col., 2013, 2016). La incorporación de esta nomenclatura simplificaría la identificación a nivel especie para este género, pero resultaría, en cambio, en la pérdida de información útil desde el punto de vista toxicológico y epidemiológico, ya que la producción de metabolitos secundarios tóxicos puede variar de una especie a otra, así como la especificidad de sustrato o sus características de agresividad y fitopatogenicidad.

En el presente trabajo se realizó la identificación morfológica a nivel de especie cuando las características del aislamiento resultaron lo suficientemente diferenciables. En el resto de los casos se clasificó a nivel grupo-especie según los patrones de esporulación de Simmons (2007).

En manzanas se identificaron seis especies: *A. mali*, *A. broussonetiae*, *A. longipes*, *A. caudata*, *A. alternata* y *A. dumosa*. El resto de los aislamientos correspondió en su mayoría al grupo-especie *A. tenuissima* y en baja proporción a *A. alternata*. En un estudio realizado en China (Gao y col., 2013) se identificaron en manzanas las especies *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. tenuissima*, mientras que en estudios realizados en hojas y frutos de manzanas en Australia fueron identificadas las especies *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. mali* y *A. longipes* (Harteveld y col., 2013). *A. broussonetiae*, *A. caudata* y *A. dumosa*, especies aisladas en este trabajo, no han sido reportadas en estudios previos realizados en manzanas.

En cítricos se identificaron solamente cuatro especies, *A. limoniasperae*, *A. citrimacularis*, *A. longipes* y *A. broussonetiae*, todas ellas incluidas en el grupo-especie *A. tenuissima*. Kang y col. (2002), en su estudio sobre cítricos llevado a cabo en Sudáfrica, mencionan que las especies comúnmente aisladas son *A. alternata* y *A. citri*, ambas correspondientes al grupo-especie *A. alternata*, el cual no fue hallado entre nuestros aislamientos. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en Irán determinó a *A. tenuissima* como el principal agente causal de la podredumbre negra de cítricos (Mojerlou y Safaie, 2012).

Las especies de *Alternaria* causantes de deterioro tanto de cítricos como de manzanas en el presente trabajo difieren de los datos de bibliografía. Las condiciones climáticas son un fuerte factor de selección sobre la micota predominante en los cultivos de las distintas regiones geográficas. En un trabajo anterior realizado en Argentina, Andersen y col. (2015) determinaron que las características morfológicas de los aislamientos de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas provenientes de este país son diferentes a las especies descritas por Simmons (2007) y prevalentes en países del hemisferio norte.

Con el fin de identificar si el agente causal de las distintas enfermedades del fruto corresponde a especies diferentes o si el mismo patógeno es capaz de producir ambos tipos de deterioro, se analizó la prevalencia de los distintos grupos-especie y especies de *Alternaria* en función del tipo de lesión. En manzanas el grupo-especie predominante, tanto en lesiones externas como en corazón mohoso, fue *A. tenuissima* y en ambos casos la especie más frecuente fue *A. mali*. La distribución y frecuencia de las diferentes especies aisladas de exterior e interior del fruto fueron muy similares. Las principales diferencias residen en que algunas especies minoritarias, como *A. caudata*, *A. alternata* y *A. dumosa*, fueron aisladas únicamente de lesiones externas, mientras que *A. longipes* sólo se encontró en corazón mohoso. Estos resultados sugieren que las especies de *Alternaria* capaces de producir lesiones en manzana pueden ser causantes tanto de lesiones externas como de corazón mohoso.

Existen pocos datos en la bibliografía respecto de especies de *Alternaria* asociadas a corazón mohoso y/o lesiones externas de manzana. Gao y col. (2013) llevaron a cabo un estudio en China, donde hallaron a *A. alternata* y *A. tenuissima* como especies causales del corazón mohoso, mientras que *A. arborescens*, especie que no fue hallada en nuestro trabajo, fue aislada de lesiones externas. Otro estudio realizado en Sudáfrica hallaron estas mismas tres especies, además de *A. infectoria*, en manzanas con corazón mohoso (Kang y col., 2002). En Grecia, 67/75 aislamientos de corazón mohoso correspondieron a la especie *A. tenuissima* y solo 8 fueron identificados como *A. arborescens* (Ntasiou y col., 2015). En Australia, a partir de lesiones externas de manzanas se aislaron *A. arborescens* mayoritariamente, seguida de *A. mali*, *A. longipes*, *A. tenuissima* y *A. alternata*.

La diversidad entre los distintos estudios y respecto de los resultados hallados en el presente trabajo sugiere que las especies de *Alternaria* capaces de colonizar los frutos de manzana pueden causar lesiones externas así como el corazón mohoso si se dan las condiciones adecuadas en la correspondiente etapa de cosecha. El corazón mohoso implica el ingreso de las esporas fúngicas en los capullos senescentes después de la floración, aunque algunas teorías sugieren que las esporas pueden ingresar a la semilla a través de los senos del cáliz en cualquier momento del desarrollo del fruto. Las condiciones de alta humedad y temperatura elevadas favorecen la infección (Reuveni y col., 2002). Por otra parte, las lesiones externas pueden ocurrir en etapas finales de maduración del fruto o en postcosecha, principalmente por una invasión oportunista del hongo cuando la piel del fruto sufre heridas por golpes, ataques de insectos, picaduras de pájaros, etc.

En cítricos, la mayoría de los aislamientos correspondieron a lesiones externas. *A. limoniasperae*, la especie predominante, fue hallada también en lesiones internas de limón, al igual que el único aislamiento de *A. broussonetiae* obtenido. Sin embargo, por el bajo número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de cítricos no es posible establecer una clara asociación entre la lesión producida y las especies responsables del deterioro.

4.3 Capacidad toxicogénica de las cepas de *Alternaria*

De los 51 aislamientos provenientes de manzanas, 50 (98%) fueron capaces de producir al menos una micotoxina.

Al evaluar la producción de toxinas por dichos aislamientos en AM, se determinó que AOH fue producido por 50 aislamientos en valores en el rango 2.114-282.529 $\mu\text{g/Kg}$. Estos mismos aislamientos fueron además capaces de producir AME en un rango entre 4.385 y 1.541.219 $\mu\text{g/Kg}$. TeA, en cambio, fue producido por un número menor de aislamientos (41) y en menores concentraciones que las otras dos toxinas (650-79.764 $\mu\text{g/Kg}$).

Los datos de bibliografía sobre la capacidad toxicogénica de *Alternaria* spp. de manzana son escasos y en general referidos a un bajo número de aislamientos. En Argentina, Robiglio y López (1995) evaluaron la capacidad de producir AOH y AME por 5 cepas de *A. alternata* aisladas de manzanas Red

Delicious con corazón mohoso. La biosíntesis de ambas toxinas se evaluó *in vitro* en agar arroz e *in vivo* en manzanas inoculadas. Cuatro de ellas fueron capaces de producir ambas toxinas en los dos sustratos y una sólo lo hizo en agar arroz en cantidades apreciables, si bien los resultados obtenidos fueron semicuantitativos. En Dinamarca, Andersen y col. (2006), analizaron la capacidad de producción de AOH, AME y TeA de 8 aislamientos de manzana pertenecientes al grupo-especie *A. tenuissima*. A diferencia de los resultados obtenidos con los aislamientos del presente trabajo, 5/8 produjeron AOH y AME mientras que TeA fue producido por los 8 aislamientos. Ntasiou y col. (2015) determinaron la capacidad de biosíntesis de AOH y AME *in vivo* e *in vitro* por 30 cepas de *Alternaria* aisladas de corazón mohoso de manzanas en Grecia. La mayoría de los aislamientos fueron capaces de producir ambas toxinas en las dos condiciones. Las rangos de concentraciones en agar DRYES fueron de 2.260-463.110 µg/Kg y 430-260.250 µg/Kg, para AOH y AME respectivamente. La producción de TeA no fue evaluada en este estudio. Los valores obtenidos por estos autores son similares a los del presente trabajo, si bien los aislamientos de Grecia produjeron mayores cantidades de AOH que de AME, mientras que, en nuestros ensayos *in vitro*, AME fue la toxina producida en mayor concentración. En cuanto a la producción *in vivo* de ambas toxinas, los valores de concentración hallados por Ntasiou y col. (2015) fueron mucho menores, 0,05-8,35 µg/Kg para AOH y 0,02-2,76 para AME en manzanas inoculadas artificialmente. Estos valores son aún más bajos que los que se detectaron en manzanas naturalmente contaminadas en el presente trabajo.

Con respecto a la co-producción de las toxinas, el 80% de los aislamientos mostró la capacidad de biosintetizar las 3 toxinas investigadas, AOH, AME y TeA; el 18% produjo solo dos, AOH y AME, y solo un aislamiento, correspondiente a la especie *A. broussonetiae*, no produjo ninguna de las tres toxinas.

Se observó que las cepas aisladas de lesión interna mostraron una capacidad toxicogénica similar a las que fueron aisladas de lesiones externas. En cuanto al grupo-especie, las cepas correspondiente a *A. tenuissima* tuvieron una alta capacidad de producción de las tres toxinas, con un 82% co-productoras de las tres simultáneamente, mientras que el 100% de los aislamientos del grupo especie *A. alternata* fueron capaces de producir las tres

toxinas, aunque cabe destacar que fueron muy pocos los aislamientos obtenidos de este último grupo-especie.

En cuanto a la capacidad toxicogénica de los 12 aislamientos provenientes de cítricos, todos fueron capaces de producir al menos una micotoxina. AOH fue producido por todos los aislamientos en valores que van desde 2.295 hasta 111.295 $\mu\text{g/Kg}$. Asimismo, AME fue producido también por los 12 aislamientos en el rango 2.769-1.477.352 $\mu\text{g/Kg}$. Al igual que para las *Alternarias* de manzana, TeA fue producido por un menor número de aislamientos (4) y en menores concentraciones que ambos alternarioles (2.789-8.913 $\mu\text{g/Kg}$). En el caso de los cítricos, AME fue también la toxina producida en mayores concentraciones seguida por AOH, y los valores más bajos fueron los de TeA.

La mayoría de los estudios sobre *Alternaria* spp. en cítricos están enfocados en las relaciones filogenéticas de dichas especies, pero existen muy pocos datos sobre la capacidad toxicogénica de los aislamientos. Logrieco y col. (1990), evaluaron la capacidad toxicogénica de *Alternaria* spp. aisladas de mandarinas del sur de Italia. Las cepas fueron capaces de sintetizar las tres toxinas, AOH, AME y TeA en niveles de 12.000-20.000 $\mu\text{g/Kg}$, 7.500-20.000 $\mu\text{g/Kg}$ y 170.000-6.800.000 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente, en arroz autoclavado. Cuando se evaluó la producción *in vivo* por las mismas cepas en frutos de mandarina, las concentraciones de las tres toxinas fueron mucho menores, con valores de 920-8.700 $\mu\text{g/Kg}$ para AOH, 170-6.300 $\mu\text{g/Kg}$ para AME y 85.000-93.000 $\mu\text{g/Kg}$ para TeA.

Los niveles de toxinas producidas por *Alternaria* spp. de cítricos de Argentina difieren de los resultados de Logrieco y col. (1990), principalmente para TeA, que fue producido en concentraciones mucho menores que AOH y AME por nuestros aislamientos. Es importante resaltar que ambos estudios *in vitro* fueron realizados en diferentes matrices, lo cual puede explicar las diferencias observadas.

Con respecto a la coproducción de las toxinas, 4 aislamientos de cítricos produjeron las 3 toxinas AOH, AME y TeA y 8 produjeron solo los alternarioles.

La proporción de aislamientos productores y la concentración de micotoxinas fueron similares para las especies de *Alternaria* de manzanas y cítricos. Es relevante destacar que las especies de cítricos fueron capaces de sintetizar las toxinas en cantidades elevadas, aún cuando se evaluó la producción *in vitro* en

agar manzana, lo cual indica que no existe especificidad de sustrato para dichos patógenos y que las cepas de cítricos resultarían igualmente toxicogénicas en el caso de colonizar frutos de manzana.

La capacidad toxicogénica de los aislamientos evaluada en ensayos *in vitro* brinda información sobre la posibilidad de dichos microorganismos de sintetizar los metabolitos tóxicos en condiciones óptimas para su desarrollo y metabolismo. El sustrato agarizado presenta una composición química similar al del fruto pero no idéntica, ya que el autoclavado puede modificarla y destruir componentes del fruto que actúan como barreras químicas para el desarrollo del microorganismo. Asimismo la barrera física que constituye la piel o cáscara del fruto se elimina, lo que facilita la colonización fúngica y reduce los tiempos de desarrollo y biosíntesis. Estos ensayos resultan una herramienta útil para caracterizar las poblaciones fúngicas fitopatógenas en cuanto a su patogenicidad y permite establecer relaciones y comparaciones entre ellas, en cuanto a su sustrato de origen, procedencia geográfica, climática, etc.

Sin embargo, para conocer con precisión el grado de contaminación al que están expuestos los cultivos es necesario analizar muestras naturalmente contaminadas, que han sido cosechadas y manipuladas en post-cosecha en las condiciones normales de distribución y comercialización. Es por ello que en la última etapa del presente trabajo se procedió a evaluar la ocurrencia natural de toxinas de *Alternaria* en manzanas naturalmente infectadas muestreadas en el punto de comercialización.

4.4 Ocurrencia de micotoxinas en manzanas infectadas naturalmente

De las 30 manzanas analizadas, 18 presentaron contaminación natural con AOH en valores que van desde 28 hasta 1.809 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Con respecto a AME, 26 resultaron contaminadas en el rango 113-21.764 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La incidencia de TeA, al igual que lo que mostraron los resultados *in vitro*, fue menor que la de los alternarioles, con solo 5 muestras positivas en un rango de concentraciones entre 10 y 55 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Stinson y col. (1981), en un estudio en EEUU realizado en diversas frutas, incluyendo manzanas, determinó la presencia de cinco toxinas, entre ellas AOH, AME y TeA. Al igual que en el presente trabajo, TeA fue una de las

toxinas detectadas en menores concentraciones, la cual presentó un valor máximo de 500 µg/Kg. Las concentraciones más elevadas fueron de 58.800 µg/Kg y 2.300 µg/Kg correspondientes a AOH y AME respectivamente, valores similares a los obtenidos en el presente trabajo, a diferencia de que las manzanas argentinas presentaron concentraciones más elevadas de AME que de AOH.

Con respecto a la co-ocurrencia de las micotoxinas, 2 muestras mostraron contaminación natural con las tres toxinas AOH, AME y TeA, 14 con ambos alternarioles y 3 con AME y TeA. La presencia simultánea de más de una micotoxina en un mismo fruto aumenta el riesgo toxicológico por la posibilidad de efectos sinérgicos entre las mismas.

Es relevante destacar que, de las 30 muestras analizadas, solo 2 no presentaron contaminación natural con toxinas de *Alternaria* y fueron únicamente aquellas que no mostraron ningún signo de deterioro, externo ni interno. El principal riesgo toxicológico no reside en el consumo de frutos contaminados, que suele ser poco frecuente, sino en el destino de esos frutos a la elaboración de productos derivados, como jugos, concentrados, y particularmente, alimentos para infantes.

Un estudio realizado en España por Delgado y Gómez-Cordovés (1998), demostró la presencia de los alternarioles en jugo de manzanas, con una contaminación natural del 50% de las muestras analizadas. AOH fue hallado en mayores concentraciones, en un rango de 1,32-5,42 µg/L, mientras que AME estuvo presente a nivel de trazas en la mayoría de las muestras, con una concentración máxima de 1,71 µg/L en una muestra. Otro trabajo realizado en Italia (Prelle y col., 2013) analizó la presencia de diversas toxinas de *Alternaria* en jugos de manzana. De 10 muestras analizadas, 2 mostraron contaminación con TeA (24,3-45,3 µg/Kg), aunque no se hallaron los alternarioles en ninguna de las muestras. Ackerman y col. (2011) hallaron AOH en alta frecuencia en productos de manzanas, jugos (59%) y purés (100%) comercializados en Alemania, en el rango 1,1-4.2 µg/L y 1,8-8,7 µg/Kg respectivamente. En otro estudio sobre jugos de manzana del mercado alemán, Gross y col. (2011) hallaron TeA en una concentración de 58 µg/L en una de las 7 muestras analizadas. También en Alemania, Asam y Rychlik (2013) hallaron TeA en

fórmulas infantiles a base de frutas, entre ellas manzana, en un rango desde 2,5 hasta 22 µg/Kg.

Por el contrario, el único estudio realizado en Argentina sobre la incidencia de los alternarioses en jugos de manzana no halló la presencia de estas micotoxinas en ninguna de las 37 muestras analizadas (Broggi y col., 2014).

Si bien hay variabilidad entre los resultados de los distintos trabajos, existe evidencia de que las micotoxinas acumuladas en las frutas no se destruyen en el proceso de industrialización y se encuentran en cantidades variables en los productos procesados. Resulta de especial preocupación la presencia de micotoxinas en las fórmulas infantiles. Al no existir hasta el momento regulación para micotoxinas de *Alternaria* en ninguna de las principales comunidades económicas a nivel mundial, estos productos no son sometidos a controles sanitarios y representan un peligro para una población de riesgo como son los infantes. Además, teniendo en cuenta los datos sobre toxicidad y la creciente presencia de estas toxinas en alimentos, determinados organismos, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), consideran necesario realizar nuevos estudios sobre su toxicidad y presencia en alimentos, con el fin de disponer de datos objetivos que permitan evaluar la situación actual con vistas a establecer límites máximos permitidos que los productos de exportación argentinos, como concentrados y jugos de fruta, tendrían que cumplir en un futuro cercano.

CAPÍTULO V – CONCLUSIONES

5. Conclusiones

- *Penicillium* fue el género fúngico con mayor incidencia tanto en manzanas como en cítricos.
- *Alternaria* fue el segundo contaminante fúngico de mayor incidencia en manzanas y el quinto en cítricos.
- Las especies de *Alternaria* contaminantes de manzana correspondieron a los grupos-especie *A. tenuissima* y *A. alternata*, mientras que de cítricos solo se aislaron miembros del grupo-especie *A. tenuissima*.
- *A. mali* fue la especie con mayor incidencia en manzanas, mientras que en cítricos lo fue *A. limoniasperae*.
- La distribución y frecuencia de las diferentes especies de *Alternaria* aisladas de exterior e interior del fruto en manzanas fueron muy similares.
- La mayoría de los aislamientos de *Alternaria* spp. de cítricos fueron obtenidos de lesiones externas. *A. limoniasperae* y *A. broussonetiae* fueron halladas también en lesiones internas de limón.
- El 98% de los aislamientos de *Alternaria* de manzana mostraron la capacidad de sintetizar al menos una de las tres micotoxinas investigadas (AOH, AME y TeA).
- AME fue la toxina producida en mayores concentraciones por aislamientos de manzana *in vitro*, seguida por AOH. TeA fue producida por un menor número de aislamientos y en menores concentraciones.
- El 80% de los aislamientos de manzana fueron capaces de co-producir las tres micotoxinas simultáneamente *in vitro* en agar manzana.

- Los 12 aislamientos de cítricos fueron capaces de biosintetizar al menos una de las tres micotoxinas investigadas *in vitro* en agar manzana.
- Las concentraciones de micotoxinas producidas por aislamientos de cítricos mostraron una tendencia similar a las de manzana, siendo AME la que se produjo en mayor concentración, seguida por AOH y TeA.
- Las especies de *A. mali* en manzanas y *A. citrimacularis* junto con *A. limoniasperae* en cítricos fueron las que produjeron las concentraciones más elevadas de las tres toxinas.
- Las especies de cítricos fueron capaces de sintetizar las toxinas en cantidades elevadas *in vitro* en agar manzana, no mostrando especificidad de sustrato.
- Las concentraciones de toxinas producidas por *Alternaria* spp. de manzanas y cítricos *in vitro*, fueron mayores a las concentraciones detectadas en manzanas contaminadas naturalmente.
- De 30 manzanas analizadas, 28 presentaron contaminación natural con toxinas de *Alternaria*.
- Las únicas muestras no contaminadas fueron aquellas que no mostraron deterioro visible causado por el patógeno, tanto externo como interno.
- AME fue la toxina de mayor ocurrencia natural en manzanas, tanto en cuanto a cantidad de muestras contaminadas, como a niveles de concentración hallados.
- La incidencia de TeA en manzanas fue menor que la de las otras dos toxinas, con solo 5/30 muestras positivas y en bajos niveles de concentración.

- Se demostró la co-ocurrencia de AOH, AME y TeA en 2 muestras de manzana, de ambos alternarios en 14 muestras, y de AME y TeA en 3 manzanas.

5.1 Conclusión general

Los resultados del presente trabajo advierten sobre el riesgo asociado a la posible presencia de toxinas de *Alternaria* en productos derivados de manzana (jugos, sidras, purés, papillas, etc.) cuando se incorporan a la producción frutos contaminados con el patógeno.

CAPÍTULO VI – PERSPECTIVAS FUTURAS

6. Perspectivas futuras

- Analizar la incidencia de toxinas de *Alternaria* en alimentos procesados a base de manzana elaborados en Argentina.
- Implementar estrategias de bajo impacto ambiental para la reducción de la contaminación de los frutos con *Alternaria* tanto en etapas pre- como post-cosecha.
- Evaluar nuevas tecnologías para la reducción de las toxinas de *Alternaria* en línea de producción a fin de obtener productos seguros para la salud de los consumidores.

CAPÍTULO VII - BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

Abd El-Aal, S.S. (1997). Effects 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.

An, Y., Zhao, T., Miao, J., Liu, G., Zheng, Y., Xu, Y., Van Etten, R.L. (1989). Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1341-1343.

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., Kroger, E., y Roberts, R.G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Microbiological Research*, 105: 291-299.

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., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., Hagsholm Pedersen, L. (2006). Realtime PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 105–111.

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.

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.

Asam, S., Konitzer, K., Rychlik, M. (2010). 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.

Azcarate, 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.

Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., Cahagnier, B. (2002). Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4): 728-731.

Baraona, M., Barrantes, E. (2000). *Fruticultura Especial, Morfología, taxonomía, usos e importancia nutritiva*, Editorial Universidad Estatal a distancia, Guatemala, pp. 44.

Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control*. Amsterdam: Elsevier, 418 pp.

Barkai-Golan, R. (2008). *Alternaria* mycotoxins. En: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.) *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Elsevier, San Diego, CA. USA. pp. 185-203.

Barkai-Golan, R., Paster, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of micotoxins: 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. En: Tzi-Bun N (Ed). *Soybean: Biochemistry, Chemistry and Physiology*. InTech, Croacia, pp. 7-20.

Bennett, J., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Review*, 16: 497-516.

Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J., Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feed and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137 (3): 265-282.

Binder, E.M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1-2): 149-166.

Bonifaz, A. (2012), *Micología médica básica, Propiedades generales de los hongos*, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A., México, 600 pp.

Bottalico, A., Logrieco A. (1992). *Alternaria* plant diseases in mediterranean countries and associated mycotoxins. En: Chelkowski J., Visconti A. (Eds.). *Alternaria, Biology, Plant Disease and Metabolites*. Amsterdam. Elsevier.

Bottalico, A., Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds). Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker Inc, NuevaYork, Estados Unidos, pp. 65-108.

Bozoglu, F. (2009) Different mycotoxin inactivation application and their inactivation mechanisms. Proceeding for Natural Science Matica Srpska Novi Sad, 117: 27-35.

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.E., González, H.H.L., Resnik, S.L., Pacin, A. (2007) *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. Revista Iberoamericana de Micología, 24: 47-51.

Broggi, L.E., Reinoso, C.M., Resnik, S.L., Martínez, F., Drunday, V. (2014). Ocurrencia de alternariol y alternariol monometil éter en jugos de manzana de consumo masivo en la Provincia de Entre Ríos, Argentina. Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento. Universidad Nacional de Entre Ríos. Vol.4 #4.

Bryden, W.L. (2007). Mycotoxins in food chain: Human health implication. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16 (1): 95-101.

Cafi (2013). Cámara Argentina de Fruticultores Integrados (<http://www.cafi.org.ar/produccion-de-peras-y-manzanas-en-argentina/>). Último acceso: marzo de 2016.

CAST (2003). Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report N° 139, Ames, Iowa, USA.

Chelkowski, J., Visconti, A, (1992). *Alternaria*: Biology, Plant diseases and metabolites. Elsevier (Ed.), Amsterdam, Holanda, pp. 1-36.

Da Motta, S., Soares, L.M.V. (2001). Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid, Food Additives and Contaminants, 18(7): 630-4.

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Olivera Rekson, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food Additives and Contaminants, 19: 408–414.

Davis, V.M., Stack, M.E. (1994). Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology, 60: 3901-3902.

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

Dobra, C., Sosa, M.C., Lutz, M.C., Rodriguez, G. (2012). Fruit Rot Caused by *Phytophthora* sp. in cold-stored pears in the valley of Rio Negro and Neuquén, Argentina. *Acta Horticulturae*, 909: 505-510.

Droby, S. (2006). Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae*, 709: 45–51.

EFSA (2011). *EFSA Journal* 9, 2407. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407> (97 pp., www.efsa.europa.eu/efsajournal).

Exadaktylou, E., Thomidis, T. (2010). Use of compost extract to control postharvest fruit rots of peach. – *Analele Universității din Oradea, fascicula Protecția Mediului*, 15: 249-251.

FAOSTAT (2013). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Dirección de estadística. (http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/S). Último acceso: marzo de 2016.

Federcitrus (2014). Federación Argentina del Citrus (www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2014.pdf).

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.

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 cultures mammalian cells. *Toxicology Letters*, 214: 27-32.

Franck, J., Latorre, B.A., Torres, R., Zoffoli, J.P. (2005). The effect of preharvest fungicide and postharvest sulfur dioxide use on postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 37: 20-30.

Frisvad, J.C. (1983). A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins on cereals. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 409–416.

FUNBAPA (2013). Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica. Disponible digital en: http://www.mecon.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf. Último acceso: febrero de 2016.

Gao, L.L., Zhang, Q., Sun, X.Y., Jiang, L., Zhang, R., Sun, G.Y., Zha, Y.L., Biggs, A.R. (2013). Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China. *Plant Disease*, 97: 510-516.

Giry, H., Szeke, B. (1995). Determination of *Alternaria* mycotoxins in selected raw and processed fruit and vegetable products. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 46: 129-133.

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.

Gross, M., Curtui, V., Ackermann, Y., Latif, H., Usleber, E. (2011). Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23): 12317-12322.

Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., Olivar, R., Maffei, M. (2010). Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30: 43-47.

Gutiérrez, S.A., Reis, E.M., Carmona, M.A. (2010). Methods for detection of *Alternaria padwickii* in rice seeds. *Journal of Phytopathology*, 158: 523-526.

Harteveld, D.O.C., Akinsanmi, 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.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12): 1422-1432.

Hayat, K. (2014). *Citrus, Molecular Phylogeny, Antioxidant properties and Medicinal Uses, History, ecology and challenges of citrus production in tropical and subtropical areas*, Nova Science Publisher, New York, 213 pp.

Hladki, A.I. (2009). Un acercamiento al mundo de la micología. En: M. Dankert (Ed.), *XLIII Conferencia llevada a cabo en la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires*, Buenos Aires, Argentina, pp. 481-497.

Huffman, J., Gerber, R., Du, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93: 764-776.

Infoagro (2011a). ([http://www.infoagro.com/citricos/informes/postrecoleccion_citricos .htm](http://www.infoagro.com/citricos/informes/postrecoleccion_citricos.htm)).

Infoagro (2011b). (http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm).

INTA (2012). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Programa Nacional Frutales (http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_programa_nacional_frutales_cadena_frutales_de_pe.pdf).

Jacquot, J.P., Gadal, P. (2014). Advances in botanical research, Fungi, Fungal-plant interactions: A never ending story of friends and foes. Amsterdam: Elsevier, 472 pp.

Janisiewicz, W.J., Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruit. Annual Review of Phytopathology, 40: 411-441.

Jones, A., Aldwinckle, H.S. (2002). Plagas y enfermedades del manzano y del peral. The American Pytopathological Society (Ed.), Estados Unidos, 121 pp.

Kada, T., Sadaie, Y., Sakamoto, Y. (1984). *Bacillus subtilis* repair test. En: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). Handbook of mutagenicity test procedures, 2^a ed. Amsterdam, Holanda, pp. 13-31.

Kanetis, L., Testempasis, S., Goulas, V., Samuel, S., Myresiotis, C., Karaoglanidis, G. (2015). Identification and mycotoxigenic capacity of fungi associated with pre- and postharvest fruit rots of pomegranates in Greece and Cyprus. International Journal of Food Microbiology, 208: 84-92

Kang, J.C., Crous, P.W., Michau, G.R.A., Serdani, M., Song, S.M. (2002). Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. Mycological Research, 106: 1151-1162.

Konstantinou, S., Karaoglanidis, G.S., Bardas, G.A., Minas, I.S., Doukas, E., Markoglou, A.N. (2011). Postharvest fruit rots of apple in Greece: Pathogen incidence and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. Plant Disease, 95: 666-672.

Kralova, J., Hajšlová, J., Poustka, J., Hochman, M., Bjelková, M., Odstrilová, 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 Science, 24: 288-296.

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: 119-31.

Lawrence, D., Gannibal, P., Peever, T., Pryor, B. (2013). The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. Mycologia, 105(3): 530-46.

Lawrence, D., Rotondo, F., Gannibal, P. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. Mycological Progress, 15: 1-22

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.

- Liu, G.T., Qian, Y.Z., Zhang, P., Dong, W.H., Qi, Y.M., Guo, H.T. (1992). Etiologic role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. Chinese Medical Journal, 105(5): 394-400.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology, 109: 645-667.
- 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.
- Logrieco, A., Visconti, A., Bottalico, A. (1990). Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins. Plant Disease, 74: 415-417.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology, 119: 131-139.
- Magan, N., Baxter, E.S. (1994). Environmental factors and tenuazonic acid production by *Alternaria* spp., isolated from sorghum. En: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J., Champ, B.R. (Eds.). Stored Product Protection. Wallingford, Estados Unidos.
- Magan, N., Lacey, J. (1984). Effects of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and wheat grain. Applied and Environmental Microbiology, 47: 1113-1117.
- Magan, N., Olsen, M. (2004) Mycotoxins in food. Detection and control. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 488 pp.
- 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.
- Marko, D. (2007). Mechanisms of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins. En: Gesellschaft für Mykotoxin Forschung. Proceedings of the 29th mycotoxin workshop. Stuttgart-Fellbach, Germany, 48.
- Milicevic, D. R., Škrinjar, M., Baltic, T. (2010). Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. Toxins, 2: 572-592.

Mojerlou, S., Safaie, N. (2012). Phylogenetic analysis of *Alternaria* species associated with citrus black rot in Iran. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(7): 144-147.

Nelson, P., Toussoun, T., Marasas, W. (1983). *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. University Park, PA, USA. Pennsylvania State University Press, 206 pp.

Niem, J. Miyara, I., Ettetdgui, Y., Reuveni, M., Flaishman, M., Prusky, D. (2007). Core rot development in red delicious apples is affected by susceptibility on the seed locule to *Alternaria alternata* colonization. *Phytopathology*, 97: 1415-1421.

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.

Ntasiou, P., Myresiotis, C.K., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E., Karaoglanidis, G.S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 197: 22–29.

Osborne, L.C., Jones, V.I., Peeler, J.T., Larkin, E.P. (1988). Transformation of C3H/10T1/2 cells and induction of EBV-early antigen in Raji cells by altertoxins I and III. *Toxicology in Vitro*, 2: 97-102.

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. En: lentils and human health. 26. Abstract of the Mycotoxin-Workshop.

Oviasogie, F.E., Ogofure, A.G., Beshiru, A., Ode, J.N., Omeje, F.I. (2015). Assessment of fungal pathogens associated with orange spoilage. *African Journal of Microbiology Research*, 9(29): 1758-1763.

Palou, L., Guardado, A., Montesinos-Herero, C. (2010). First report of *Penicillium* spp. and *Pilidiella granati* causing postharvest fruit rot of pomegranate in Spain. *New Disease Reports* 22, 21.

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.

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.

- Paterson, R.R.M., Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International*, 43: 1902–1914.
- Patriarca, A., Azcarate, M.P., Terminiello, L., y Fernández Pinto, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 219-222.
- Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibanez, A., Liu, Y.C. (1999). Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola* tangelo and rough lemon in Florida. *Phytopathology*, 89: 851-860.
- Peever, T.L., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L.W., Carris, L. M., Bhatia, A. (2005). Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 95: 512-518.
- Perelló, A., Sisterna, M. (2006). Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathology*, 55: 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.
- Pfeiffer, E., Eschbach, S., Metzler, M. (2007). *Alternaria* toxins: DNA strand breaking activity in mammalian cells in vitro. *Mycotoxin Research*, 23: 152-157.
- Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56: 184-192.
- Pitt, J.I., Hocking A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition, Springer New York, USA, 540 pp.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional (Ed.), Londres, Reino Unido, 593 pp.
- Pose, G., Ludemann, V., Fernández, D., Segura, J., Fernández Pinto, V. (2010). *Alternaria* species associated with “moldy heart” on peaches in Argentina. *Tropical Plant Pathology*, 35(3): 174-177.
- Pose, G., Ludemann, V., Segura, J., Fernández Pinto, V. (2004). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by blackmould in Argentina. *Mycotoxin Research*, 20: 80-86.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 348-353.
- Poverene, M., Cantamutto, M., Seiler, G.J. (2008). Ecological characterization of wild *Helianthus Annuus* and *Helianthus Petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources. Characterization and Utilization* 7: 42-49.

Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2013). A new method for detection of five *Alternaria* toxins in food matrices based on LC-APCI-MS. *Food Chemistry*, 140: 161-167.

Pryor, B., Gilbertson, L. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultea* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia*, 94(1): 49-61.

Rathod, G.M. (2010). Survey of post-harvest fungal diseases of some fruits from Marathwada regions of Maharashtra, India. *Journay of Ecobiotechnology*, 2(6): 07-10.

Reddy, K.R.N., Nurdijati, S.B., Salleh, B. (2010). An overview of plant-derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Asian Journal of Plant Science*, 9: 126-133.

Reuveni, M., Sheglov, D., Sheglov, N., Ben-Arie, R., Prusky, D., (2002). Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 421-427.

Roberts, R.G., Reymond, S.T., Andersen, B. (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, 104: 151-160.

Roberts, S.R., Shattuck, V.I., Buchwaldt, L. (2007). *Compendium of brassica diseases*. APS press (ed.), St. Paul, Estados Unidos, 117 pp.

Robiglio, A.L., López, S.E. (1995). Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Red Delicious apples in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 413-417.

Rolleberg, C.L., Fayad, F., Hamada, N.A., May de Mio, L.L. (2011). First report of *Alternaria mali* on apples in Brazil. *Phytopathology*, 101: 155-156.

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.

Sacchi, C., Gonzalez, H.H.L., Broggi, L.E., Pacin, A., Resnik, S.L., 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.

Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., Filtenborg, O. (2001). *Introduction to Food- And Airborne Fungi*. (6th ed.). USA: American Society Microbiology, 389 pp.

- Schrader, T.J., 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.J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., Vijay, H.M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 21: 261-274.
- Scott, P.M. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International*, 84: 1809-1817.
- Scott, P.M. Lawrence, G.A., Lau, B.P.Y. (2006). Analysis of wines, grapes juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22: 33-40.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R. (1980). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid in tomato paste. *Journal of AOAC*, 63: 612–621.
- Scott, P.M., Stoltz, D.R. (1980). Mutagens produced by *Alternaria alternata*, *Mutation Research*, 78: 33-40.
- Scott, P.M., Weber, D., Kanhere, S.R. (1997). Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 765: 255-263.
- Serdani, M., Kang, J.C., Andersen, B., Crous, P.W. (2002). Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106(5): 561-569.
- Sholberg, P.L., Haag, P.D. (1996). Incidence of postharvest pathogens of stored apples in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18 (1): 81–85.
- 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. (1986). *Alternaria* themes and variations (22-26). *Mycotaxon*, 25: 287-308.
- Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* Taxonomy: Current status view-point, challenge. En: Chelkowski, J. and Visconti, A, (Eds.), *Alternaria: Biology, Plant Disease and Metabolites*. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1-36.
- Simmons, E.G. (1999). *Alternaria* themes and variations (236-243). Host-specific toxin producers. *Mycotaxon*, 70: 325-369
- Simmons, E.G. (2007). *Alternaria*. An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre (Ed.), Utrecht, Holanda. 775 pp.

Simmons, E.G., Roberts, R.G. (1993). *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon*, 48: 109-140.

Singh, D., Sharma R.R. (2007). Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. En: Prasad, D. (Ed.), *Sustainable Pest Management*. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Skarkova, J., Ostry, V., Prochazkova, I. (2005). Planar chromatographic determination of *Alternaria* toxins in selected foodstuffs. Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography, Milestones in Instrumental TLC, Siófok, Hungría.

Solfrizzo, M., de Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., van den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrot. *Journal of AOAC International*, 87: 101-106.

Solhaug, A., Vines, L.L., Ivanova, L., Spilsberg, B., Holme, J. A., Pestka, J., Collins, A., Eriksen, G.S. (2012). Mechanism involved in alternariol induced cell cycle arrest. *Mutation Reserch/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 738: 1-11.

Soliman, S.S.M., Li, X.Z., Shao, S., Behar, M., Svircev, A.M., Tsao, R., Tsao, R., Zhou, T. (2015). Potential mycotoxin contamination risks of apple products associated with fungal flora of apple core, *Food Control*, 47: 585-591.

Solomon, P.S. (2011). Assessing the mycotoxigenic threat of necrotrophic pathogens of wheat. *Mycotoxin Research*, 27: 231-237.

Sommer, N.F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7: 331-339.

Soriano, J., Abarca M.L., Berrada, H., Bragulat M.R., Burdaspal, P.A., Cabañes, F.J., Carvajal, M., Castellá, G., Catalá, A.I., Dragacci S., Fernández, M., Ferrer, E., Font, G., García, C.J., López, A., Lori, G.A., Mañes, J., Marín, S., Moltó, J.C., Pacin, A., Peralta, C.E., Ramos, A.J., Renik, S., Rizzo, I., Ruiz, M.J., Sanchis, V., Zakhia, N., Zinedine, A. (2007). *Micotoxinas en alimentos. Toxicidad y evaluación de riesgos*, Ediciones Díaz de Santos, España, 393 pp.

Stack, M.E., Mazzola, E.P., Page, S.W., Pohland, A.E., Highet, R.J., Tempesta, M.S., Corley, D.G. (1986). Mutagenic perylenequinones 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.G., Pohland, A.E. (1985). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *Journal of AOAC*, 68: 640-642.

Stack, M.E., Prival, M.J. (1986). Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. *Applied and Environmental Microbiology*, 4: 718-722.

Stinson, E., Osman, S., Heisler, E., Siciliano, J., Bills, D. (1981). Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 790-792.

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: 236-240.

Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-236.

Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (2000). Compendium of citrus diseases, 2^a ed. APS press (ed.), St. Paul, Estados Unidos, pp. 43-44.

Timmer, L.W., Peever, T.L., Solel, Z., Kazuya, A. (2003). *Alternaria* diseases of citrus: Novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 99-112.

Torres, A., Gonzalez, H.H.L., Etcheverry, M., Resnik, S.L., Chulze, S. (1998). Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants*, 15(1): 56-60.

Tournas, V.H., Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 11-17.

Tournas, V.H., Uppal Memon, S. (2009). Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 133: 206–209.

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., Quevedo Ganoza, F., Fernández Pinto, V., Patriarca, A. (2015). Determination of mycotoxin profiles characteristic of *Alternaria* strains isolated from Malbec grapes. *BIO Web of Conferences* 5, 02004, DOI: 10.1051/bioconf/20150502004.

Visconti, A., Sibilia, A., Sabia, A. (1992). *Alternaria alternata* from oilseed rape: Mycotoxin production and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Research*, 8: 9-16.

Wehmeyer, L.E. (1961). A world monograph of the genus *Pleospora* and its segregates, University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, 451 pp.

Wu, F. (2006). Mycotoxin reduction in Bt corn: Potencial economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*, 15(3): 277-289.

Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M.Z., Calt, M. (2001). Analyses of toxic effects of *Alternaria* toxins on oesophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology*, 29: 492-497.

Zhen, Y.Z., Xu, Y.M., Liu, G.T., Miao, J., Xing, Y.D., Zheng, Q.L., Ma, Y.F., Su, T., Wang, X.L., Ruan, L.R., Tian, J.F., Zhou, G., Yang, S.L. (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer Linxian China. En: O'Neill, I.K., Chen, J., Bartsch, H. (Eds.). *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer, Léon, Francia, pp. 253-257.

Zhu, S.J. (2006). Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruit. En: Nouredine, B., Norio, S. (Eds.), *Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 297–313.

ANEXOS

ANEXO 1

Medios de Cultivo

Diclorán Cloranfenicol Malta Agar (DCMA)

Extracto de malta	10 g
Diclorán (0,2% p/v en etanol, 1ml)	2 mg
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Papa blanca	250 g
D-glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Agar Papa Zanahoria (PCA)

Papa blanca	20 g
Zanahoria	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Agar jugo V8 (V8)

Jugo V8, clarificado	175 ml
----------------------	--------

CaCO ₃	30 g
Zn SO ₄ .7H ₂ O	0,015
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Agua destilada	825 ml

Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES)

Extracto de Levadura	20 g
Sacarosa	150 g
Diclorán (0.2% en etanol)	1,0 ml
Rosa de Bengala (5% p/v)	0,5 ml
Cloranfenicol	0,1g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Agar Manzana

Pulpa de manzana	600 ml
Agar	15 g
Agua destilada	400 ml

ANEXO 2

Características morfológicas de las cepas de *Alternaria* (*H: Grupo especie *A. tenuissima* J: Grupo-especie *A. alternata*)

Muestra	Fruta	Lesión	Colonia		Conidios			Pico	Septos		Cadenas	Ramas laterales	Grupo-especie*	Especie
			Cantidad de anillos	Diámetro (cm)	Forma	Tamaño (µm)	Color	Forma	T	L	Nº de conidios			
1	manzana	externa	5	5.5	elipsoides	38 x 7,5 38 x 7,5 34 x 7,5	dorado	corto, angosto	5 a 7	pocos	8 a 12	ausencia	H	<i>mali</i>
2	manzana	interna	5	6	elipsoides	30 x 7,5 30 x 7,5 26 x 7,5	café	corto, angosto	5 a 7	pocos	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>
3	manzana	externa	5	5	elipsoides	23 x 7,5 26 x 7,5 30 x 7,5	café	corto, angosto	5 a 7	pocos	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>
4	manzana	interna	5	5.5	ovoides	34 x 7,5 26 x 7,5 30 x 7,5	café	cortos y largos	5 a 7	pocos	8 a 10	ausencia	H	<i>broussonetiae</i>
5	manzana	interna	5	5.5	elipsoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	café	cortos y largos	5 a 7	pocos	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>
6	manzana	interna	5	5.5	ovoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	café	cortos	5 a 7	variable	8	ausencia	H	<i>mali</i>
7	manzana	externa	5	6	ovoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	café	cortos	5 a 7	variable	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>
8	manzana	interna	5	5.5	ovoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	marrón	cortos	5 a 7	variable	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>

9	manzana	externa	5	5.5	ovoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	marrón	cortos	5 a 7	variable	8	ausencia	H	<i>mali</i>
10	manzana	externa	5	6	ovoides	34 x 7,5 38 x 7,5 38 x 7,5	café	cortos	5 a 7	variable	9	ausencia	H	<i>mali</i>
11	manzana	externa	6	6	elipsoides	30 x 11,25 30 x 11,25 26 x 7,5	café	cortos	4 a 7	pocos	8 a 10	ausencia	H	<i>mali</i>
12	manzana	externa	5	5.5	elipsoides	43 x 7,5 37,5 x 7,5 37,5 x 7,5	café	cortos	3 a 7	pocos	8	ausencia	H	<i>mali</i>
13	manzana	externa	5	6	ovoides	30 x 11,25 37,5 x 7,5 37,5 x 7,5	café	cortos	4 a 7	1 a 2	8	ausencia	H	<i>broussonetiae</i>
14	manzana	externa	6	5.5	ovoides	30 x 11,25 37,5 x 11,25 30 x 7,5	café oscuro	cortos	4 a 6	1 a 2	5 a 10	Si	H	
15	manzana	interna	6	5.5	elipsoides	37,5 x 7,5 37,5 x 7,5 30 x 11,25	café	cortos	2 a 6	1 a 2	10 y mas	ausencia	H	<i>longipes</i>
16	manzana	externa	6	5.5	ovoides, elipsoides	26 x 11,25 22,5 x 11,25 26 x 7,5	café oscuro	cortos	4 a 5	1 a 2	8 a 10	presencia	H	<i>broussonetiae</i>
17	manzana	externa	5	6	ovoides, elipsoides	22,5 x 11,25 30 x 11,25 26 x 11,25	café	cortos	2 a 7	1 a 2	10 a 13	presencia	H	<i>broussonetiae</i>

18	manzana	externa	6	5.5	ovoides, elipsoides	26 x 11,25 30 x 11,25 22,5 x 11,25	café	cortos	2 a 6		6 a 8	ausencia	H	<i>broussonetiae</i>
19	manzana	externa	6	5.5	ovoides	26 x 11,25 34 x 11,25 30 x 7,5	café oscuro	cortos	2 a 6	1 a 2	10	presencia	J	<i>alternata</i>
20	manzana	interna	5	6	ovoides, elipsoides	34 x 11,25 30 x 11,25 26 x 11,25	café oscuro	cortos	5 a 6	1 a 2	9 a 11	presencia	H	<i>broussonetiae</i>
21	limón	interna	5	6	ovoides, elipsoides	26 x 7,5 22,5 x 7,5 22,5 x 11,25	café	cortos	1 a 4	1	7	presencia	H	<i>limoniasperae</i>
22	limón	interna	5	6	ovoides, elipsoides	22,5 x 7,5 22,5 x 11,25 26 x 11,25	café oscuro	cortos	1 a 4	1	6	presencia	H	<i>limoniasperae</i>
23	manzana	externa	5	5.5	ovoides, elipsoides	26 x 11,25 26 x 11,25 26 x 11,25	café	cortos	2 a 5	1 a 2	9	presencia	H	
24	manzana	interna	6	6	ovoides	26 x 7,5 34 x 7,5 30 x 7,5 22,5 x 11,25	café	cortos	2 a 6	1 a 2	10 a 12	ausencia	H	<i>broussonetiae</i>
25	limón	interna	5	6	ovoides	30 x 7,5 22,5 x 7,5 30 x 7,5 30 x 7,5	marrón	cortos	1 a 4	1	8	presencia	H	<i>broussonetiae</i>
26	naranja	externa	6	6,5	ovoides	30 x 15 26 x 15 37,5 x 11,25 34 x 7,5	café dorado	cortos	1 a 5	1 a 2	10	presencia	H	<i>longipes</i>

27	naranja	externa	6	6	ovoides	34 x 7,5 37,5 x 15 26 x 15 30 x 11,25	café dorado	cortos	2 a 5	1 a 2	7 a 10	presencia	H	<i>longipes</i>
28	manzana	interna	6	6	ovoides	30 x 11,25 30 x 7,5 34 x 7,5	café	cortos	2 a 6	1 a 2	8 a 10	ausencia	H	
29	limón	externa	6	6	ovoides	34 x 15 30 x 11,25 37,5 x 11,25	café oscuro	cortos	1 a 5	1 a 2	6 a 8	ausencia	H	<i>limoniasperae</i>
30	naranja	externa	6	5.5	ovoides	30 x 11,25 34 x 7,5 30 x 7,5	café oscuro	cortos	3 a 5	1 a 2	8 a 10	presencia	H	<i>limoniasperae</i>
31	manzana	interna	6	6	ovoides	26 x 7,5 30 x 11,25 30 x 7,5	café	corto	4	1 a 2	8 a 12	presencia	H	
32	manzana	externa	5	6	ovoides, elipsoides	37,5 x 11,25 34 x 11,25 41,3 x 11,25	café oscuro	corto	1 a 5	1 a 2	10 a 15	presencia	H	
33	manzana	interna	6	6	ovoides, elipsoides	26 x 11,25 26 x 11,25 30 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 4	1 a 2	13	presencia	H	
34	manzana	interna	6	5,5	ovoides, elipsoides	34 x 15 22,5 x 11,25 30 x 15	café oscuro	corto	1 a 5	1 a 2	10	presencia	H	
35	manzana	externa	5	6	ovoides	22,5 x 11,25 22,5 x 7,5 22,5 x 7,5	dorado	corto	2 a 7	1	11	presencia	H	<i>mali</i>
36	manzana	interna	5	6	ovoides, elipsoides	22,5 x 7,5 26 x 7,5 22,5 x 11,25	café claro	corto	2 a 5	1 a 2	11	presencia	H	

37	manzana	externa	5	6,5	elipsoides	26 x 11,25 22,5 x 7,5 26 x 11,25	café	corto	3 a 4	1 a 2	8 a 10	presencia	H	
38	manzana	interna	5	6	elipsoides	30 x 15 30 x 15 18,75 x 15	café oscuro	corto	1 a 4	1 a 2	8	presencia	J	
39	manzana	externa	4	6	ovoides, elipsoides	18,75 x 11,25 18,75 x 15 22,5 x 11,25	marrón oscuro	corto	3 a 5	1	8 a 10	presencia	J	<i>dumosa</i>
40	limón	externa	6	5,5	ovoides, elipsoides	37,5 x 11,25 41,3 x 15 37,5 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 5	1 a 3	8	presencia	H	<i>limoniasperae</i>
41	manzana	externa	4	6	ovoides	26 x 7,5 26,3 x 11,25 34 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 6	1 a 2	8	presencia	H	
42	manzana	externa	5	5,5	ovoides	60 x 7,5 48,75 x 7,5 41,3 x 7,5	dorado	cortos y muy largos	1 a 7	1 a 2	8 a 10	presencia	H	<i>caudata</i>
43	manzana	interna	5	6	ovoides, elipsoides	41,3 x 11,25 34 x 11,25 34 x 11,25 30 x 7,5	café oscuro	cortos	1 a 6	1 a 2	10 a 14	presencia	H	
44	manzana	interna	6	6	ovoides, elipsoides	30 x 7,5 26 x 7,5 34 x 7,5 30 x 7,5	café oscuro	cortos	1 a 6	1 a 2	8 a 11	presencia	H	
45	manzana	interna	6	6	ovoides	37,5 x 7,5 30 x 7,5 34 x 7,5 26 x 7,5	dorado	cortos	1 a 5	1 a 2	7 a 11	presencia	H	

46	manzana	interna	5	6	ovoides	30 x 7,5 26 x 7,5 26 x 7,5 26 x 11,25	dorado	cortos	1 a 5	1 a 2	5, poco crecimie nto en la placa	presencia	H	<i>mali</i>
47	manzana	externa	5	6	ovoides, elipsoides	30 x 11,25 34 x 11,25 41,3 x 11,25	café claro	cortos	6	1 a 2	10 a 12	presencia	H	
48	manzana	externa	6	5,5	ovoides, elipsoides	36 x 7,5 30 x 7,5 34 x 11,25	café oscuro y dorado	cortos	5 a 6	1 a 2	10	presencia	J	
49	manzana	interna	6	6	ovoides	30 x 7,5 30 x 11,25 34 x 11,25	café oscuro	corto	1 a 7	1 a 2	8 a 12	presencia	H	
50	manzana	interna	5	6	ovoides, elipsoides	30 x 11,25 30 x 7,5 34 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 5	1 a 2	10	presencia	H	
51	manzana	interna	6	6,5	ovoides, elipsoides	37,5 x 11,25 34 x 11,25 26 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 7	1 a 2	10 a 12	presencia	H	
52	manzana	interna	5	5,5	ovoides	41,3 x 11,25 37,5 x 11,25 30 x 7,5	café dorado	corto	1 a 7	1 a 2	15a 17	presencia	H	<i>longipes</i>
53	manzana	interna	5	6	ovoides, elipsoides	34 x 7,5 26 x 11,25 37,5 x 11,25	café claro	corto	1 a 6	1 a 2	12 a 15	presencia	H	<i>longipes</i>
54	limón	externa	6	6,5	ovoides, elipsoides	30 x 7,5 34 x 7,5 37,5 x 7,5	café dorado	corto	1 a 7	1 a 2	6	presencia	H	<i>citrimacularis</i>
55	limón	interna	5	6	ovoides	34 x 11,25 22,5 x 11,25 41,3 x 11,25	café oscuro	corto	1 a 5	1 a 2	13	presencia	H	<i>limoniasperae</i>

56	manzana	interna	5	6	ovoides, obovoide, elipsoides	34 x 7,5 26 x 11,25 30 x 15	café claro	corto	1 a 6	1 a 2	15	presencia	H	<i>longipes</i>
57	limón	externa	6	6,5	ovoides, elipsoides	34 x 11,25 30 x 11,25 41,3 x 7,5	café dorado	corto	1 a 7	1 a 2	10	presencia	H	<i>citrimacularis</i>
58	manzana	externa	6	5,5	ovoides, elipsoides, rugosos	30 x 7,5 26 x 7,5 37,5 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 7	1 a 2	6	presencia	H	
59	limón	externa	6	6,5	ovoides, elipsoides, rugosos	34 x 11,25 30 x 11,25 22,5 x 7,5	café oscuro	corto	1 a 7	1 a 2	8 a 13	presencia	H	<i>citrimacularis</i>
60	manzana	externa	5	6.5	ovoides, elipsoides	34 x 7,5 30 x 7,5 37,5 x 7,5	café dorado	corto	6 a 7	1 a 2	8 a 10	ausencia	H	
61	manzana	externa	5	6	ovoides, elipsoides	34 x 11,25 34 x 7,5 30 x 11,25	café oscuro	corto	6	1 a 2	12	presencia	H	
62	manzana	externa	6	6.5	elipsoides	41,3 x 11,25 45 x 7,5 48,75 x 11,25	café claro	corto			8 a 10	ausencia	H	
63	manzana	externa	6	6	cilíndricos, elipsoides, ovoides	41,3 x 11,25 45 x 7,5 48,75 x 11,25	gris verdoso	corto	6	1 a 2	10	ausencia	H	

ANEXO 3

Producción de micotoxinas por *Alternaria* spp. *in vitro*

(*H: Grupo especie *A. tenuissima* J: Grupo-especie *A. alternata*)

a) Aisladas de manzanas

Muestra	Lesión	Grupo - especie	Especie	Micotoxinas (µg/Kg)		
				AOH	AME	TA
1	externa	H	<i>mali</i>	282.529	1.541.219	79.764
2	interna	H	<i>mali</i>	11.960	142.793	47.928
3	externa	H	<i>mali</i>	12.018	167.593	22.728
4	interna	H	<i>broussonetiae</i>	10.229	137.462	N.D.
5	interna	H	<i>mali</i>	11.100	518.470	N.D.
6	interna	H	<i>mali</i>	133.538	613.722	21.202
7	externa	H	<i>mali</i>	122.219	476.331	N.D.
8	interna	H	<i>mali</i>	39.933	1.290.489	15.816
9	externa	H	<i>mali</i>	102.575	181.322	4.770
10	externa	H	<i>mali</i>	82.116	548.679	11.788
11	externa	H	<i>mali</i>	7.147	51.706	11.073
12	externa	H	<i>mali</i>	12.017	64.764	2.074
13	externa	H	<i>broussonetiae</i>	2.671	17.764	4.999
14	externa	H		10.940	49.369	10.189
15	interna	H	<i>longipes</i>	85.711	501.892	24.368
16	externa	H	<i>broussonetiae</i>	2.114	4.385	N.D.
17	externa	H	<i>broussonetiae</i>	7.456	109.560	3.717
18	externa	H	<i>broussonetiae</i>	N.D.	N.D.	N.D.
19	externa	J	<i>alternata</i>	5.658	103.615	12.572
20	interna	H	<i>broussonetiae</i>	14.146	65.293	11.584
21	externa	H		4.418	35.923	17.426
22	interna	H	<i>broussonetiae</i>	34.290	351.025	5.700
23	interna	H		15.238	105.561	9.408
24	interna	H		18.612	362.785	13.313
25	externa	H		154.127	1.219.656	4.132
26	interna	H		62.825	214.858	4.091
27	interna	H		3.331	55.011	2.506
28	externa	H	<i>mali</i>	59.658	254.064	9.445
29	interna	H		11.501	53.784	1.522
30	externa	H		33.558	376.030	N.D.
31	interna	J		61.128	618.667	12.962
32	externa	J	<i>dumosa</i>	2.760	21.134	5.426
33	externa	H		14.133	188.990	N.D.

34	externa	H	<i>caudata</i>	85.266	601.739	18.680
35	interna	H		19.453	417.382	7.352
36	interna	H		14.992	512.649	3.828
37	interna	H		8.911	128.106	650
38	interna	H	<i>mali</i>	2.359	6.042	N.D.
39	externa	H		7.406	189.999	N.D.
40	externa	J		74.013	514.490	12.232
41	interna	H		24.544	314.545	922
42	interna	H		223.033	614.947	4.904
43	interna	H		11.709	185.788	15.676
44	interna	H	<i>longipes</i>	9.864	172.890	8.678
45	interna	H	<i>longipes</i>	11.797	303.959	12.552
46	interna	H	<i>longipes</i>	11.713	462.776	8.961
47	externa	H		32.569	784.210	N.D.
48	externa	H		19.953	79.184	5.846
49	externa	H		16.225	25.852	4.258
50	externa	H		23.675	75.847	681
51	externa	H		11.730	27.573	1.465

b) Aisladas de cítricos

Muestra	Producto	Lesión	Grupo - especie	Especie	Micotoxinas µg/Kg		
					AOH	AME	TA
1	Limón	interna	H	<i>limoniasperae</i>	22.459	218.230	N.D.
2	Limón	interna	H	<i>limoniasperae</i>	27.612	296.331	N.D.
3	Limón	interna	H	<i>broussonetiae</i>	35.932	332.350	N.D.
4	Naranja	externa	H	<i>longipes</i>	10.803	293.183	N.D.
5	Naranja	externa	H	<i>longipes</i>	8.633	417.623	N.D.
6	Limón	externa	H	<i>limoniasperae</i>	41.180	1.477.352	4.122
7	Naranja	externa	H	<i>limoniasperae</i>	26.777	318.116	N.D.
8	Limón	externa	H	<i>limoniasperae</i>	3.605	60.655	N.D.
9	Limón	externa	H	<i>citrimacularis</i>	40.604	442.532	4.244
10	Limón	interna	H	<i>limoniasperae</i>	44.780	898.938	2.789
11	Limón	externa	H	<i>citrimacularis</i>	111.295	519.289	8.913
12	Limón	externa	H	<i>citrimacularis</i>	2.295	2.769	N.D.