



Efecto de factores ambientales pre y post-cosecha en dos genotipos de lechuga infectadas con *Alternaria alternata*

Ekitaldi-aretoa,
Eusko Jaurlaritza,
2022ko apirilaren 7a

**ELIKAGAIEN
SEGURTASUNAREN
ARLOKO IKERKETA
EMAITZAK
TRANSFERITZEKO**

**IX. JARDUNALDIA
JORNADA DE
TRANSFERENCIA DE
RESULTADOS DE
INVESTIGACIÓN**

Salón de Actos,
Gobierno Vasco, Lakua
7 abril 2022



GRUPOS E INVESTIGADORES PARTICIPANTES

1. **NEIKER:** Amaia Ortiz Barredo y Ana Aragonés



2. **UPV/EHU-1: GENOMIC RESOURCES.** Andone Estonba y Iratxe Zarraonaindía (Co-IP)

3. **UPV/EHU-2: EKOFISKO.** Antonio Hernández (Co-IP), Jose María Becerril.

4. **UPV/EHU-3: FISIOClima CO₂.** Alberto Muñoz Rueda, Maite Lacuesta, Amaia Mena, Jon Miranda y Usue Perez (Co-IP)



2. PARTICIPACIÓN/COOPERACIÓN CON AGENTES DE LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Neiker: Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, a través de **Amaia Ortiz Barredo**, responsable del **Departamento de Producción y Protección Vegetal** y de **Ana Aragonés**



Participan en la planificación del diseño y la toma de muestras, además de como asesoría científica del proyecto.

Por otra parte colaboramos con los **agricultores Larizgoitia-Garcia**.

Participan en el seguimiento de los factores críticos que favorecen el desarrollo de *Alternaria* y la producción de micotoxinas durante las etapas de crecimiento del cultivo, a través de su seguimiento estacional, y de las condiciones de almacenamiento de alimentos vegetales/verduras (lechugas y tomates).



ÍNDICE

1. Objetivos del proyecto
2. Participación/Cooperación con agentes de la cadena agroalimentaria vasca
3. Resultados relevantes para reducir riesgos en la cadena agroalimentaria vasca
4. Actividades de difusión y transferencia realizadas



1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Caracterización de los factores microbianos y ambientales (pre y postcosecha) que influyen en la producción de micotoxinas de *Alternaria* spp
2. Puesta a punto de métodos para evaluar la incidencia de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas derivadas en alimentos de consumo humano y animal.
3. Estudio prospectivo de la incidencia (presencia y abundancia) de especies del género *Alternaria* mediante aproximaciones genómicas en alimentos vegetales en la CAPV
4. Estudio prospectivo de la incidencia de micotoxinas producidas por el género *Alternaria* mediante HPLC/UPLC en alimentos vegetales en la CAPV.
5. Evaluar los factores ambientales (temperatura, humedad, método de almacenamiento etc.) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas, para definir pautas de manipulación/almacenamiento del alimento
6. Establecer pautas para reducir el riesgo de contaminación de *Alternaria* e ingesta de sus micotoxinas.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Revisión del estado actual del conocimiento sobre los factores ambientales y culturales que influyen en la proliferación de *Alternaria* y en la producción de micotoxinas

Análisis bibliográfico desde el año 2010 al 2019.

La búsqueda se ha realizado utilizando distintas palabras clave:

- “*Alternaria alternata* AND toxin” (332 artículos)
- “*Alternaria alternata* AND alternariol” (102 artículos)
- “*Alternaria alternata* AND alternariol monomethyl ether” (9 artículos)
- “*Alternaria alternata* AND tentoxin” (21 artículos)
- “*Alternaria alternata* AND tenuazonic acid” (62 artículos)
- “*Alternaria alternata* AND altenuene” (21 artículos)

Además se ha combinado la palabra *Alternaria alternata* con palabras clave como

“AND climate change, preharvest, postharvest technology, elevated CO₂, temperature, plant physiology, cultural practices relative humidity”.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Revisión del estado actual del conocimiento sobre los factores ambientales y culturales que influyen en la proliferación de *Alternaria* y en la producción de micotoxinas

FACTORES AMBIENTALES

La **temperatura**, la **actividad del agua** y el **pH** son los factores más determinantes en el desarrollo de la severidad (% de área infectada) de la enfermedad por *Alternaria* (Lee et al., 2015; Prendes et al., 2016), siendo la **especie vegetal** y la **cepa de *Alternaria*** los factores más determinantes en la producción de micotoxinas (Siciliano et al., 2017).

Un mayor desarrollo de la enfermedad no siempre está relacionado con una mayor concentración de micotoxinas (Siciliano et al., 2017).

Las **condiciones de cambio climático** variarán la concentración de las distintas micotoxinas y el grado de severidad de la **infección** (Siciliano et al., 2017).



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Revisión del estado actual del conocimiento sobre los factores ambientales y culturales que influyen en la proliferación de *Alternaria* y en la producción de micotoxinas

FACTORES AMBIENTALES

En consecuencia, será importante analizar de qué manera las condiciones ambientales afectarán a

- la relación que se establezca entre la especie vegetal infectada
- la cepa de *Alternaria*
- el grado de desarrollo de la infección y
- la producción de micotoxinas, tanto en condiciones de pre- como post-cosecha



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Revisión del estado actual del conocimiento sobre los factores ambientales y culturales que influyen en la proliferación de *Alternaria* y en la producción de micotoxinas

FACTORES CULTURALES

Prácticas como mantenimiento de un **campo sano y el vigor de los cultivos, y el saneamiento y la eliminación de infecciones** en la zona afectada ayudan a reducir el riesgo de infección por *Alternaria*. El uso de riego dirigido al suelo y no a las hojas también reduce el riesgo de infección. Sin embargo, estas prácticas agrícolas no son suficientes para controlar la infección por *Alternaria* (Adhikari et al., 2017).

A nivel de prácticas agrícolas también es importante **usar genotipos o variedades más resistentes a la infección por *Alternaria*** (Adhikari et al., 2017).



1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Caracterización de los factores microbianos y ambientales (pre y postcosecha) que influyen en la producción de micotoxinas de *Alternaria* spp
2. Puesta a punto de métodos para evaluar la incidencia de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas derivadas en alimentos de consumo humano y animal.
3. Estudio prospectivo de la incidencia (presencia y abundancia) de especies del género *Alternaria* mediante aproximaciones genómicas en alimentos vegetales en la CAPV
4. Estudio prospectivo de la incidencia de micotoxinas producidas por el género *Alternaria* mediante HPLC/UPLC en alimentos vegetales en la CAPV.
5. Evaluar los factores ambientales (temperatura, humedad, método de almacenamiento etc.) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas, para definir pautas de manipulación/almacenamiento del alimento
6. Establecer pautas para reducir el riesgo de contaminación de *Alternaria* e ingesta de sus micotoxinas.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores ambientales (pre y post-cosecha) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar la influencia de **temperatura y humedad (pre-cosecha)**, se recolectaron lechugas (N=120) crecidas a cielo abierto durante distintas estaciones (Verano de 2020, Otoño de 2020, Primavera de 2021).

El muestreo se realizó en el **momento de venta**. La mita de la lechuga se utilizó para los análisis en momento de venta y la otra mitad se guardó en la nevera a **4°C durante 4 días para simular condiciones de almacenamiento en frío (post-cosecha)**.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

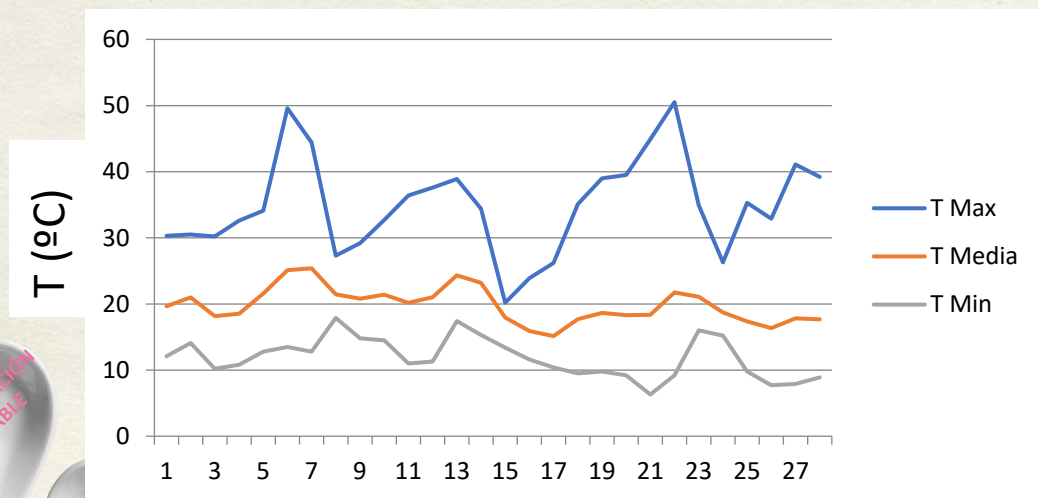
Evaluar los factores ambientales (pre y post-cosecha) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Muestreo de verano 2020

Tº media max (34,9 °C)

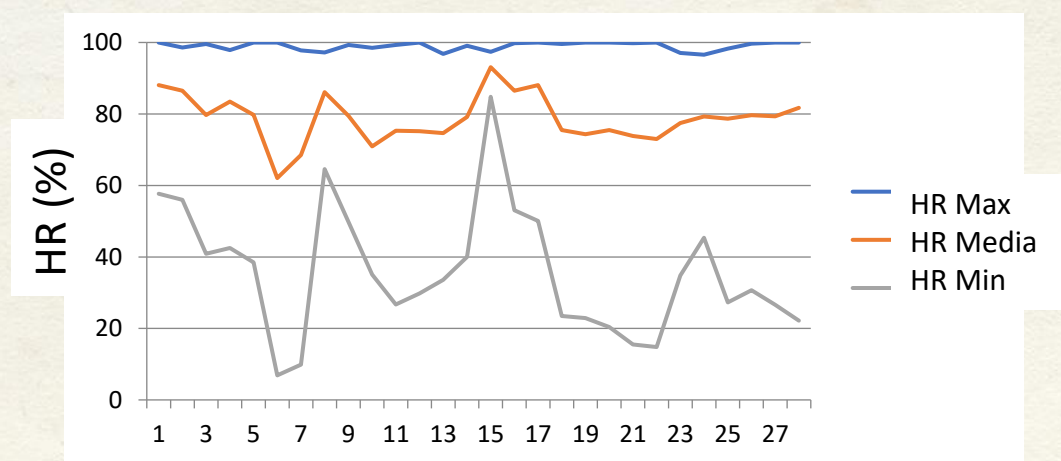
Tº med min (11,9 °C)



Muestreo de verano 2020

HR media max (99 %)

HR med min (35,9 %)



SEGURIDAD
ALIMENTARIA

ALIMENTACIÓN
SALUDABLE

ALIMENTACIÓN
SOSTENIBLE

3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores ambientales (pre y post-cosecha) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Muestreo de verano 2020

Tº media max (34,9 °C)

Tº med min (11,9 °C)

Muestreo de verano 2020

HR media max (99 %)

HR med min (35,9 %)

Muestreo de otoño 2020

Tº media max (24,5 °C)

Tº med min (9,3 °C)

Muestreo de otoño 2020

HR media max (99,9 %)

HR med min (61,2 %)

Muestreo de primavera 2021

Tº media max (28,4 °C)

Tº med min (6,7 °C)

Muestreo de primavera 2021

HR media max (97,0 %)

HR med min (34,9 %)

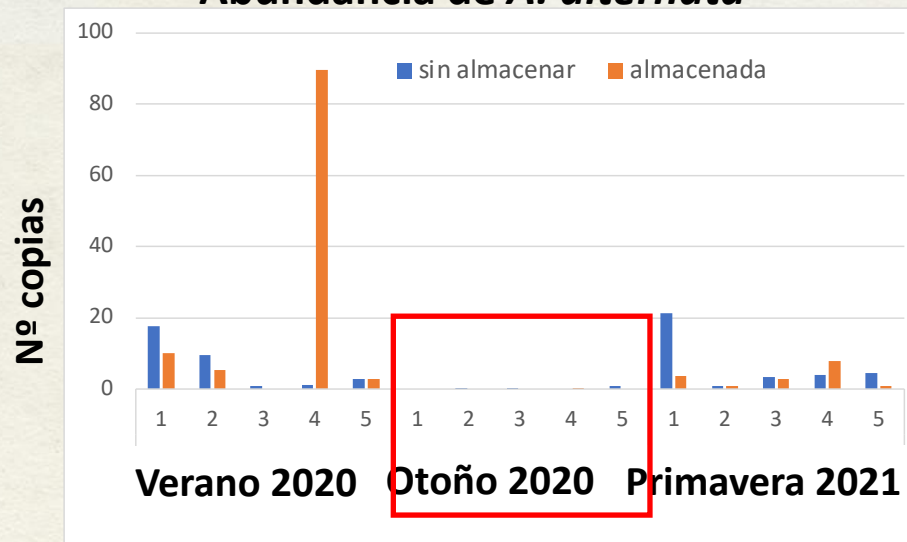


3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores ambientales (pre y post-cosecha) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

RESULTADOS

Abundancia de *A. alternata*



Hay una diferencia entre las lechugas recogidas en otoño y las recogidas en primavera y en verano.

En otoño no se ve incidencia del hongo

	Sin almacenar				Almacenada			
	MIN	MAX	PROMEDIO	DESVEST	MIN	MAX	PROMEDIO	DESVEST
Verano 2020	0.83	17.66	6.34	7.23	0.00	89.56	21.58	38.18
Otoño 2020	0.00	0.73	0.26	0.31	0.00	0.15	0.03	0.07
Primavera 2021	0.88	21.30	6.77	8.24	0.78	7.84	3.16	2.91



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL (en cámara climática con condiciones controladas)

Para evaluar el impacto de las condiciones pre y post-cosecha se ha puesto a punto un ensayo experimental bajo condiciones de cambio climático

Condiciones climáticas actuales, CATA		Condiciones climáticas futuras, CETE	
22 °C día	+400 ppm CO ₂	26 °C día	+700 ppm CO ₂
18 °C noche		22 °C noche	





3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

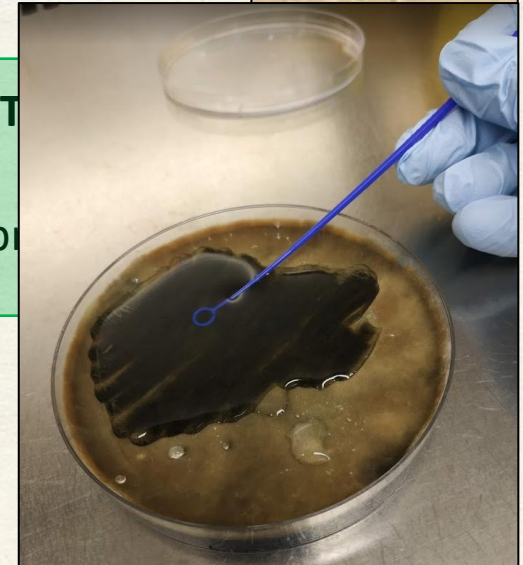
DISEÑO EXPERIMENTAL (en cámara climática con condiciones controladas)

Para evaluar el impacto de las condiciones pre y post-cosecha se ha puesto a punto un ensayo experimental bajo condiciones de cambio climático

Condiciones climáticas actuales, CATA		Condiciones climáticas futuras, CET	
22 °C día	+400 ppm CO ₂	26 °C día	+700 ppm CO ₂
18 °C noche		22 °C noche	

en donde se han inoculado con *A. alternata* (densidad de conidios de 3.2×10^7 c/ml)

Se sembró *Alternaria* 2 en 25 placas de agar patata, y se crecieron a 28°C durante 7 días. El inóculo para infectar las lechugas se obtiene fresco el día que se requiere (no se preservan a 4°C para utilizar más adelante)





3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL (en cámara climática con condiciones controladas)

Para evaluar el impacto de las condiciones pre y post-cosecha se ha puesto a punto un ensayo experimental bajo condiciones de cambio climático

Condiciones climáticas actuales, CATA

22 °C día
18 °C noche +400 ppm CO₂

en donde se han inoculado con *A. alternata* (densidad 3.000 spores/cm²)

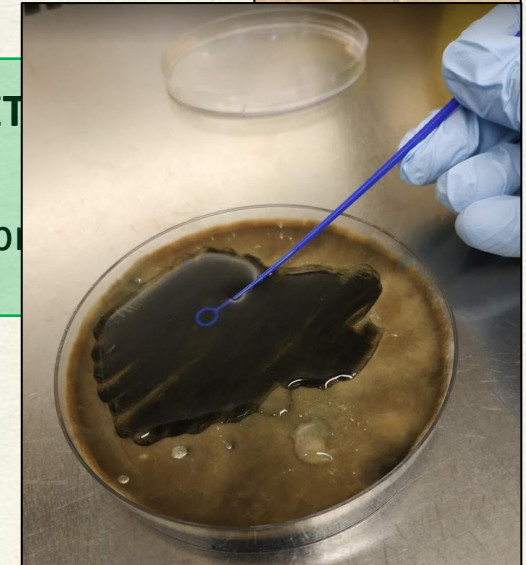
En una variedad de lechuga verde y en otra variedad roja



Batavia



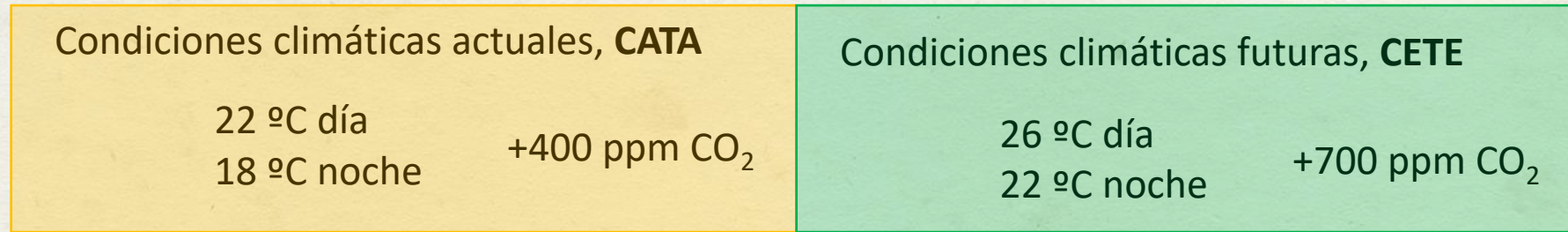
Hoja de Roble



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL (en cámara climática con condiciones controladas)



↓ 19/10/2020

Siembra de **lechuga**
Batavia
Hoja de Roble

↓ 26/11/2020

Inoculación con
A. alternata

densidad de conidios
de 6.4x10⁷ c/planta

↓ 10/12/2020

Muestreo en compra
Almacenamiento a
4 °C durante 4 días

↓ 14/12/2020

Muestreo de
almacenadas



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

RESULTADOS

En el análisis por qPCR se ve que las lechugas de color verde a una temperatura más elevada están más afectadas por *Alternaria*.

La infección en las lechugas verdes es más abundante que en las lechugas rojas.

Tratamiento	Sin almacenar						Almacenada					
	total	Posit.	min	max	media	DESVEST	total	Posit.	min	max	media	DESVEST
Batavia CATA +AA	4	3	1	108	45	53	4	4	29	2452	536	1193
Batavia CATA -AA	4			1		1	4			3	1	1
Batavia CETE +AA	4	3	12	2452	540	1188	4	1	4	37	15	14
Batavia CETE -AA	4						4			1		
Roble CATA + AA	4	1	6	35	14	14	4		2	148	36	69
Roble CATA -AA	4			2		1	4			2		1
Roble CETE +AA	4			2	1	1	4	1		79	17	39
Roble CETE -AA	4						4					

El efecto del almacenamiento post-cosecha fue dependiente de las condiciones ambientales.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

RESULTADOS

	Almacenaje postcosecha	TeA (µg·kg ⁻¹ lechuga)	TEN (µg·kg ⁻¹ lechuga)	Crecimiento	Sin almacenar						Almacenada					
					total	Posit.	min	max	media	DESVEST	total	Posit.	min	max	media	DESVEST
Batavia, CATA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,06	0,12	+	4	3	1	108	45	53	4	4	29	2452	536	1193
Batavia, CATA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,08	-	-	4			1		1	4			3	1	1
Batavia, CETA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,32	0,27	+	4	3	12	2452	540	1188	4	1	4	37	15	14
Batavia, CETA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,40	0,54	-	4						4			1		
				+	4	1	6	35	14	14	4		2	148	36	69
				-	4			2		1	4			2		1
				+	4			2	1	1	4	1		79	17	39
				-	4						4					



Concentración de micotoxinas de *Alternaria* en lechuga en función del almacenaje y las condiciones de crecimiento. Tentoxina (TEN) y ácido tenuazoico (TeA)

→ Hay evidencias de que el almacenamiento post-cosecha fomenta la producción de micotoxinas, ya que se detectaron en el 6% de las almacenadas, y en ninguna de las muestras frescas.

3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

RESULTADOS

	Almacenaje postcosecha	TeA (µg·kg ⁻¹ lechuga)	TEN (µg·kg ⁻¹ lechuga)
Batavia, CATA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,06	0,12
Batavia, CATA, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,08	-
Batavia, CETE, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,32	0,27
Batavia, CETE, con inóculo	En venta + 4ºdías a 4ºC	0,40	0,54

→ El aumento en la temperatura y la concentración de CO₂ durante el crecimiento (simulación de cambio climático) puede incrementar el contenido en micotoxinas

→ La concentración de micotoxinas está situada en el **rango bajo/muy bajo** de las descritas en la bibliografía y los informes de la EFSA, lo que hace que **el riesgo asociado a su consumo sea ínfimo**

→ Hay evidencias de que **el almacenamiento post-cosecha fomenta la producción de micotoxinas**, ya que se detectaron en el 6% de las almacenadas, y en ninguna de las muestras frescas.

Concentración de micotoxinas de *Alternaria* en lechuga en función del almacenaje y las condiciones de crecimiento. Tentoxina (TEN) y ácido tenuazoico (TeA)



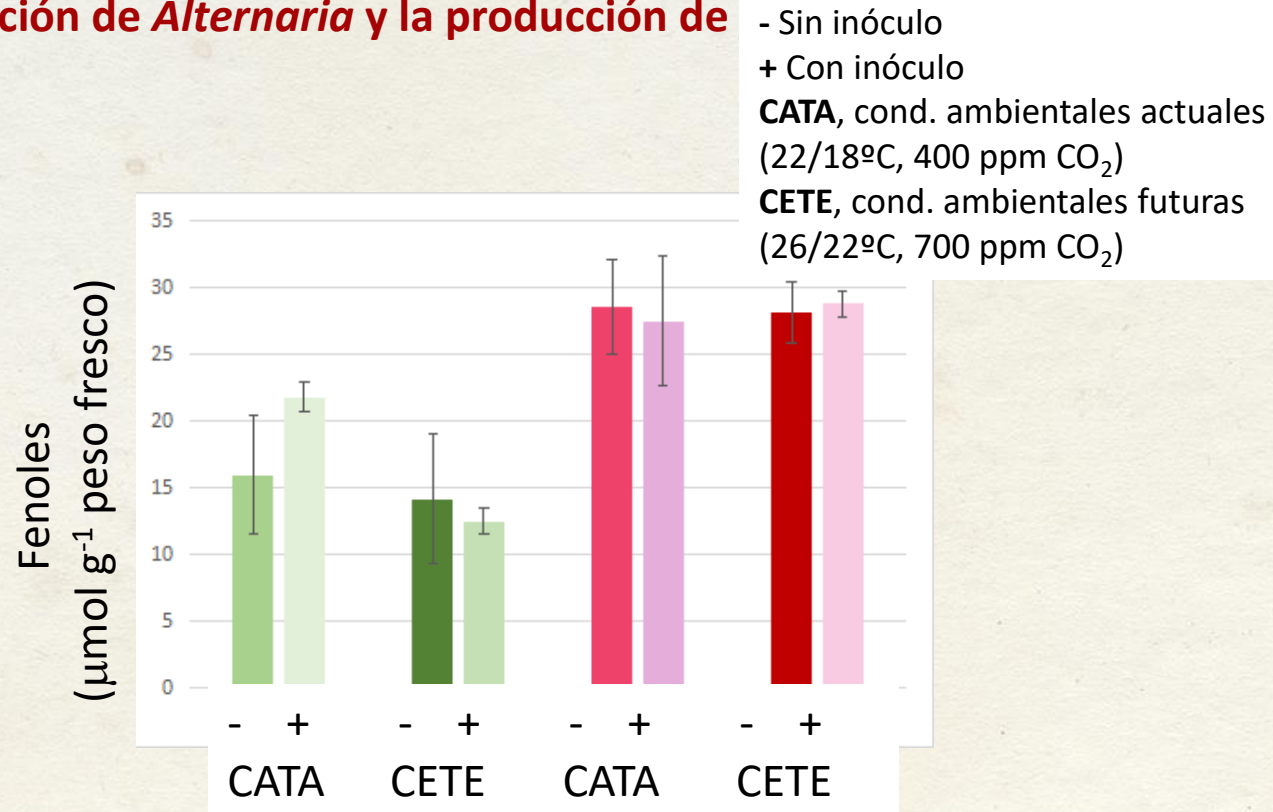
3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de

RESULTADOS

En el cultivar verde, la aparición de tanto del hongo como de las micotoxinas es más alta que en la lechuga roja.

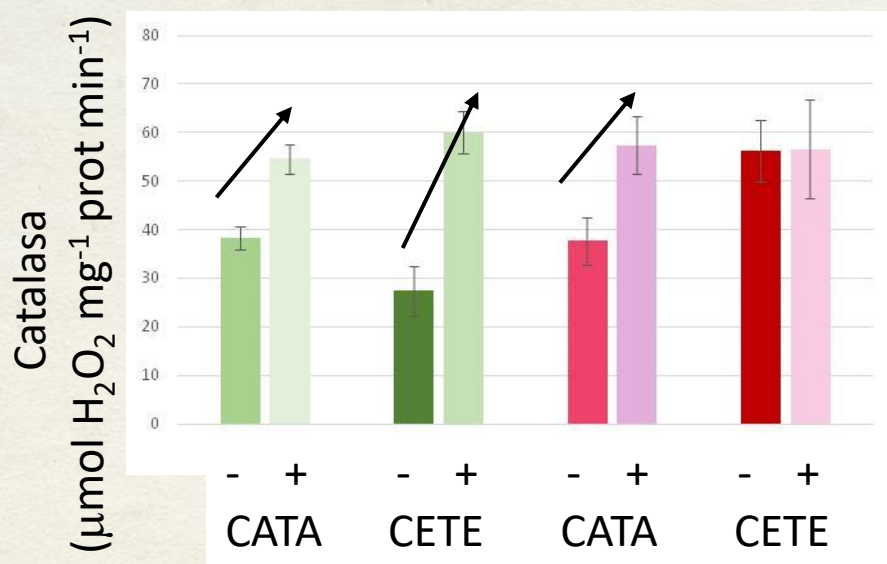
Esto podría deberse al hecho que el cultivar rojo tiene mayor capacidad de hacer frente al hongo debido a su mayor contenido en fenoles.



3. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS EN LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA

Evaluar los factores de cambio climático (alta T y elevado CO₂) y el método de almacenamiento que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas.

RESULTADOS



- Sin inóculo
+ Con inóculo
CATA, cond. ambientales actuales
(22/18°C, 400 ppm CO₂)
CETE, cond. ambientales futuras
(26/22°C, 700 ppm CO₂)

A pesar de ello, es relevante mencionar la baja capacidad de invasión de este hongo.

Esta baja capacidad de infección podría deberse a que ambos cultivares son capaces de **incrementar su sistema antioxidante lo que les haría capaces de eliminar al hongo.**



4. ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA REALIZADAS

Título: *Effect of climate change on two lettuce genotypes infected with *Alternaria alternata*: analysis of fungus invasion, production of toxins and defense response*

Autores: Jon Miranda-Apodaca, Iratxe Aguado, Unai Artetxe, Leire Martín-Souto, Andoni Ramírez-García, Abel Torre, Maite Lacuesta, José M^a Becerril, Andone Estonba, Amaia Ortíz-Barredo, Antonio Hernández, Iratxe Zarraonaindia & Usue Pérez-López

Journal of Agricultural and Food Chemistry
Toxins
World Mycotoxin Journal



1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Caracterización de los factores microbianos y ambientales (pre y postcosecha) que influyen en la producción de micotoxinas de *Alternaria* spp
2. Puesta a punto de métodos para evaluar la incidencia de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas derivadas en alimentos de consumo humano y animal.
3. Estudio prospectivo de la incidencia (presencia y abundancia) de especies del género *Alternaria* mediante aproximaciones genómicas en alimentos vegetales en la CAPV
4. Estudio prospectivo de la incidencia de micotoxinas producidas por el género *Alternaria* mediante HPLC/UPLC en alimentos vegetales en la CAPV.
5. Evaluar los factores ambientales (temperatura, humedad, método de almacenamiento etc.) que influyen en la proliferación de *Alternaria* y la producción de micotoxinas, para definir pautas de manipulación/almacenamiento del alimento
6. Establecer pautas para reducir el riesgo de contaminación de *Alternaria* e ingesta de sus micotoxinas.



5. CONTINUACIÓN DEL PROYECTO EN 2022 (EN PROGRESO)

Establecer pautas para reducir el riesgo de contaminación de *Alternaria* e ingesta de sus micotoxinas.

Estamos realizando una **nueva revisión bibliográfica** enfocándonos en los siguientes aspectos.

- Continuar con el estudio del efecto de las **distintas condiciones ambientales** (entendidas como estrés para el hongo) sobre la producción de micotoxinas.
- Caracterizar el efecto de los **distintos tratamientos post-cosecha** (entendidos como estrés para el hongo) sobre la producción de micotoxinas.
- Conocer la variabilidad en las **distintas cepas de *Alternaria alternata*** para conocer su grado de invasibilidad y su capacidad para generar micotoxinas.
- Analizar la **diferencia en producción de micotoxinas en *A. alternata* crecida *in vivo* o *in vitro*** (en placa) y la **termosensibilidad** de las micotoxinas.



