



UNCUYO

Universidad

Nacional de Cuyo

Carrera de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROBIOL

“Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema”.

PARA OPTAR AL TÍTULO DE DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Luciana Paola Prendes

Director: Vilma Inés Morata de Ambrosini

Codirector: María Laura Ramirez

Mayo 2016

A mis hijas, Constanza y Ludmila.

A Sergio.

AGRADECIMIENTOS:

- A mi directora y mi co-directora de Tesis, Dra. Vilma Morata de Ambrosini y Dra. M. Laura Ramirez, por brindarme su conocimiento, su guía y apoyo permanente durante el transcurso de esta tesis. Agradezco el acceso a la instrumentación del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria de la Universidad Nacional de Cuyo y del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- A mi compañera del laboratorio, Dra. M. Gabriela Merín, por su aporte experimental y discusiones científicas, que han enriquecido este trabajo.
- A Mario Andreoni y Rubén Osorio, del INTA Rama Caída, por su ayuda incondicional durante los muestreos y trabajo experimental, especialmente a Mario por su entusiasmo y apoyo.
- Al Dr. Ariel Fontana, por brindarme su conocimiento químico analítico y gran ayuda experimental, así como el acceso a la instrumentación del laboratorio de Bioquímica Vegetal, del IBAM, en Mendoza.
- A mis compañeras del laboratorio Dra. M. Carolina Martín e Ing. Marianela Bignert, por su apoyo, comprensión y compañía.
- A la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, por brindarme un espacio académico propicio para el desarrollo de mi tesis.
- A mis padres, Graciela y Héctor, por incentivar me en el esfuerzo y la dedicación, aún cuando las cosas son difíciles.
- A mis hermanos, Javier, Marcia y Melina, por estar presentes siempre.
- A mis suegros, Elvira y Ramón, por brindarme su ayuda incondicional y a mis cuñados, Pablo, Cecilia y Gabriela.

RESUMEN

La presencia de hongos filamentosos productores de micotoxinas en uva para vinificar significa un gran riesgo para la salud de los consumidores de vino. Durante el presente estudio se observó que el género *Alternaria* constituye la microbiota predominante en uvas Malbec de la DOC San Rafael, seguido por *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Los aislados de *Alternaria* fueron identificados como *Alternaria alternata* y el 97 % de las cepas evaluadas produjeron alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y/o ácido tenuazónico (ATe), siendo este último producido con mayor frecuencia y niveles. Asimismo, el 86 % de estas cepas presentó un grado alto de patogenicidad en uva Malbec. A fin de evaluar la incidencia natural de ATe en uvas para vinificación se optimizó una metodología existente basada en QuEChERS HPLC-UV. Un 57 % de las muestras analizadas, mostró contaminación con ATe, constituyendo el primer reporte a nivel mundial de la ocurrencia natural de esta toxina en uvas para vinificar. Mediante un estudio ecofisiológico en un medio simul uva se determinó que la temperatura y a_w óptimos para el crecimiento de *A. alternata* como para la producción de AOH, AME y ATe fueron coincidentes, así también la óptima producción de ATe en uva estuvo en congruencia. En pos de seleccionar un posible agente de control biológico de *Alternaria* en uva para vinificar, se aislaron levaduras del mismo ecosistema. El 82 % de los aislados fue identificado como *Aureobasidium pullulans* y el 6,3 %, 5,4 %, 2,7 %, 2,7 % y 0,9 % como *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina*, *Cryptococcus laurentii* II y *Rhodothorula* spp., respectivamente. Todas las cepas *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina* y la mayoría de *H. uvarum*, protegieron a la uva de la infección con *A. alternata* y 6 de ellas disminuyeron también el nivel de ATe, mostrando resultados prometedores para el control biológico de *Alternaria* en uva para vinificar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El vino	23
I.1.1 Origen e Importancia del vino	23
I.1.2. La uva como protagonista en la vinificación	25
I.1.3 Hongos filamentosos presentes en uvas para vinificación	28
I.2. El género <i>Alternaria</i>	32
I.2.1 Taxonomía, identificación y ecología del género <i>Alternaria</i>	32
I.2.2 Micotoxinas producidas por el género <i>Alternaria</i>	37
I.2.3 Influencia de factores abióticos en la producción de micotoxinas de <i>Alternaria</i>	40
I.3. Micotoxinas de <i>Alternaria</i> en alimentos	43
I.3.1 Determinación de las micotoxinas de <i>Alternaria</i>	43
I.3.2 Incidencia natural de las micotoxinas de <i>Alternaria</i> en alimentos	45
I.4. Levaduras	47
I.4.1. Taxonomía e Identificación de levaduras	47
I.4.2 Levaduras epífitas de uva	49
I.4.3. Levaduras como posibles agentes de control biológico de hongos filamentosos en uvas para vinificar	51
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	56
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Evaluación de la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael	58

III.1.A Medio de cultivo y soluciones	58
III.1.1 Muestreo	59
III.1.2 Recuento y aislamiento de los diferentes géneros fúngicos	60
III.1.3 Análisis estadístico	61
III.2 Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares	62
III.2.A Medio de cultivo y soluciones	62
III.2.1 Identificación utilizando marcadores morfológicos.	63
III.2.2. Identificación utilizando marcadores moleculares	64
III.2.2.1. Cepas fúngicas	64
III.2.2.2. Producción de la biomasa fúngica	64
III.2.2.3. Extracción, purificación y cuantificación del ADN	65
III.2.2.4. Reacciones de PCR	66
III.3 Caracterización del potencial toxicogénico y patogénico de cepas <i>Alternaria alternata</i> aisladas de uva	67
III.3.A Medio de cultivo y soluciones	67
III.3.1. Producción y extracción de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico	68
III.3.2. Detección y cuantificación de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia	69
III.3.3. Ensayos de patogenicidad en uva	70
III.3.4. Análisis estadístico	71
III.4. Optimización y validación de una metodología analítica para la	71

extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazonico en uvas	
III.4.A. Reactivos y soluciones	71
III.4.1. Experimentos de recuperación de ácido tenuazónico en uva Malbec	72
III.4.2. Optimización de las condiciones de extracción	73
III.4.3. Optimización de la limpieza	73
III.4.4. Detección y cuantificación de ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector UV	74
III.4.5. Validación del método	75
III.5. Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael	77
III.5.1 Muestreo	77
III.5.2 Extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas	77
III.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por <i>Alternaria alternata</i>	79
III.6.1 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas de <i>Alternaria alternata</i> en medio de cultivo simi- uva (<i>in vitro</i>)	79
III.6.1.1 Medio de cultivo	79
III.6.1.2 Cepas fúngicas	79

III.6.1.3 Inoculación e incubación	80
III.6.1.4 Evaluación del crecimiento	80
III.6.1.5 Evaluación de la producción de toxinas	80
III.6.2 Evaluación del efecto de factores abióticos (temperatura y tiempo de incubación) sobre la producción de ácido tenuazónico por <i>Alternaria alternata</i> en uva (<i>in situ</i>)	81
III.6.2.1 Cepas fúngicas	81
III.6.2.2 Preparación del inóculo fúngico	81
III.6.2.3 Determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de <i>A. alternata</i> en uva	82
III.6.2.4 Inoculación, incubación y evaluación de la producción de ácido tenuazónico en uva	83
III.6.3 Análisis estadístico	83
III.7 Aislamiento e identificación de levadura y organismos tipo levadura del ecosistema de uvas Malbec de la DOC San Rafael	83
III.7.A Medio de cultivo y soluciones	83
III.7.1 Aislamiento de levadura y organismos tipo levadura	84
III.7.2 Identificación de levaduras y organismos tipo levadura mediante la técnica molecular de PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2	84
III.7.2.1. Reacciones de PCR	85
III.7.2.2. Cortes con enzimas de restricción	86
III.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> en uva, confirmación de su	86

identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico	
III.8.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> en uva	86
III.8.1.1 Preparación del inóculo de levadura y organismos tipo levadura	86
III.8.1.2 Cepas fúngicas e inóculo fúngico	87
III.8.1.3 Evaluación del efecto preventivo de las levaduras y organismos tipo levadura frente a la infección de <i>Alternaria alternata</i> en uva	87
III.8.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S	88
III.8.2.1 Extracción del ADN genómico	88
III.8.2.2 Reacciones de PCR y análisis de las secuencias	89
III.8.3 Evaluación de la capacidad de levaduras seleccionadas de controlar la producción de ácido tenuazónico por <i>Alternaria alternata</i> en uva	90
III.8.4 Análisis estadístico	90

IV. RESULTADOS

IV.1. Evaluación de la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael	92
IV.2. Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares	94
IV.2.1. Identificación utilizando marcadores morfológicos	94
IV.2.2. Identificación utilizando marcadores moleculares	96

IV.3. Caracterización del potencial micotoxicogénico y patogénico de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de uva	97
IV.3.1. Potencial micotoxigénico	97
IV.3.2. Patogenicidad en uva variedad Malbec	100
IV.4. Optimización y validación de una metodología analítica para la extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas	103
IV.4.1. Optimización de las condiciones de extracción	103
IV.4.2. Optimización de la limpieza	105
IV.4.3 Validación del método propuesto	107
IV.5 Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael	108
IV.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por <i>Alternaria alternata</i>	110
IV.6.1 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas de <i>Alternaria alternata</i> en medio de cultivo simul uva (<i>in vitro</i>)	110
IV.6.1.1 Evaluación del efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento	110
IV.6.1.2 Efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de alternariol y alternariol monometil éter	113

IV.6.1.3 Efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de ácido tenuazónico	121
IV.6.2 Evaluación del efecto de factores abióticos (temperatura y tiempo de incubación) sobre la producción de ácido tenuazónico por <i>Alternaria alternata</i> en uva (<i>in situ</i>)	125
IV.7 Aislamiento e identificación de levaduras y organismos tipo levadura de uvas Malbec de la DOC San Rafael	129
IV.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> en uva, confirmación de su identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico	132
IV.8.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> en uva	132
IV.8.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S	135
IV.8.3 Evaluación de la capacidad de levaduras para controlar la producción de ácido tenuazónico por <i>Alternaria alternata</i> en uva	138
V. DISCUSION	
V.1 Evaluación de la micobiota presente en uvas Malbec de la región DOC San Rafael	140
V.2 Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares	143
V.3 Caracterización del potencial micotoxigénico y patogénico de las	146

especies de <i>Alternaria</i> identificadas aisladas de uva	
V.4 Optimización y validación de una metodología analítica para la extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas	151
V.5 Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael	154
V.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por <i>Alternaria alternata</i> en un medio de cultivo simil uva y en uva (estudio <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	158
V.7 Aislamiento e identificación de levaduras y organismos tipo levadura de uvas Malbec de la DOC San Rafael	164
V.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> en uva, confirmación de su identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico	168
VI. CONCLUSIONES	176
VII. BIBLIOGRAFÍA	178
VIII. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS	210

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza y la DOC San Rafael. 24
- Figura 2:** Esquema representativo de la estructura de la baya. 26
- Figura 3:** Evolución de los diferentes componentes de la pulpa durante la maduración de la uva. 27
- Figura 4:** Especies representativas de algunas secciones pertenecientes al género *Alternaria*: a- *Alternaria alternantherae* (sección *Alternantherae*), b- *A. arborescens* (sec. *Alternaria*), c- *A. brassicicola* (sec. *Brassicicola*), d- *A. abundans* (sec. *Chalastospora*), e- *A. cheiranthi* (sec. *Cheiranthus*), f- *A. embellisia* (sec. *Embellisia*), g- *A. proteae* (sec. *Embellisioides*), h- *A. limicola* (sec. *Euphorbiicola*), i- *A. eureka* (sec. *Eureka*), j- *A. infectoria* (sec. *Infectoriae*), k- *A. japonica* (sec. *Japonicae*), l- *A. scirpicola* (sec. *Nimbya*). 33
- Figura 5:** Estructuras químicas de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazónico (ATe) e iso- ácido tenuazónico (iso-ATe), altertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II y ATX-III) y estenfiltoxina III. 38
- Figura 6:** Comparación de los perfiles de crecimiento y producción de diferentes micotoxinas producidas por *Alternaria alternata* en granos de trigo 43
- Figura 7:** Muestreo realizado durante la vendimia 2013 en la región vitivinícola DOC San Rafael, comprendió viñedos de los

- distritos: Cuadro Nacional (A), Las Paredes (B) y (F), Rama Caída (C), Cuadro Benegas (D), Cañada Seca (E). 60
- Figura 8:** Esquema de trabajo método de extracción de ácido tenuazónico de uvas basado en QuEChERS. 78
- Figura 9:** Esquema de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ADNr de levaduras. 85
- Figura 10:** Microscopía óptica de aislados representativos pertenecientes a los principales géneros presentes a tiempo de cosecha en uvas Malbec de la DOC San Rafael, en medio de cultivo CYA: A- *Alternaria* (100X), B- *Cladosporium* (100X), C- *Penicillium* (40x, lactofusina), D- *Aspergillus uniseriado* (100x), E y F- *Aspergillus biseriado* (100x). 92
- Figura 11:** Abundancia o densidad relativa (%) de los 4 géneros fúngicos relevantes encontrados en uvas Malbec a tiempo de cosecha durante las vendimias 2011 y 2012 (en INTA Rama Caída de la DOC San Rafael) y durante la vendimia 2013 en toda la DOC San Rafael. 93
- Figura 12:** Patrones de esporulación característicos de cepas de *Alternaria alternata* cultivadas en medio APZ a 22-25°C y ciclos de luz: oscuridad (8:16). A, B, C y D Microscopía óptica (40x); E, F Microscopía óptica (100x). 95
- Figura 13:** Colonias características de cepa de *Alternaria alternata* en medios (A) APZ y (B) V8 incubadas durante 7 días a 22-25°C en

ciclo de luz: oscuridad (8:16).

96

Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del gen *Alta1*. **A-** Amplificación para los cebadores específicos del género *Alternaria*: Dir5cAlta1 y Inv4Alta1 de 195 pb. Calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 cepas de *Alternaria alternata*; **B-** Amplificación para los cebadores específicos del grupo-especie *A. alternata*: altDAlta1 y AinflAlta1 de 118 pb. Calles 7, 8, 9, 10, 11 y 12 cepas de *A. alternata*. MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb; -: control negativo.

97

Figura 15: Resultados de ensayo de patogenicidad de cepas de *Alternaria alternata* en uvas Malbec, luego de la incubación por 7 días a 25 °C y 100% de HR del control negativo (A); cepa de *A. alternata* grado 1-poco patogénico (B); cepa de *A. alternata* grado 2-moderadamente patogénico (C); cepa de *A. alternata* grado 3-muy patogénico (D).

101

Figura 16: Porcentaje de recuperación (R%) de ácido tenuazónico obtenidos utilizando hexano, acetonitrilo y acetato de etilo como solventes de extracción.

103

Figura 17: Porcentajes de recuperación (%R) de ácido tenuazónico obtenidos con (a) distintos volúmenes de acetato de etilo, (b) distintas relaciones de muestra: agua: solvente manteniendo un volumen constante de 5 mL de acetato de etilo.

104

Figura 18: Porcentajes de recuperación (%R) de ácido tenuazónico

- obtenidos mediante la adición de ácido fórmico. 105
- Figura 19:** Cromatogramas obtenidos para ácido tenuazónico aplicando distintas opciones de limpieza al extracto. Agregado de 250 mg CaCl₂ solo o en combinación con 200 mg de PSA (adicionando 4, 2 o 0% de ácido fórmico). 106
- Figura 20:** Cromatogramas obtenidos para (a) estándar de ácido tenuazonico, 0,5 µg/g (b) muestra de uva enriquecida con 0,5 µg/g de ATe y (c) muestra positiva M14. 108
- Figura 21:** Efecto de la temperatura y la actividad de agua, 0,95 (Δ), 0,96 (●), 0,97 (▲), 0,98 (■) y 0,99 (◆) sobre el crecimiento de *Alternaria alternata*, 5.5 (A), 7.5 (B) y 25.1 (C), sobre un medio de cultivo simil uva. 111
- Figura 22:** Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1. 112
- Figura 23:** Niveles de alternariol (AOH) (µg/g) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, durante 28 días. 116
- Figura 24:** Niveles de alternariol monometil éter (AME) (µg/g) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de

- actividad de agua y temperatura, durante 28 días. 117
- Figura 25:** Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de alternariol ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1. 118
- Figura 26:** Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de alternariol monometil éter ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1. 119
- Figura 27:** Niveles de ácido tenuazónico (ATe) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, durante 28 días. 123
- Figura 28:** Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de ácido tenuazónico ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1. 124
- Figura 29:** Niveles de ácido tenuazónico (ATe) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas (A) 7.5 y (B) 25.1, sobre bayas de uva Malbec a diferentes niveles de temperatura y tiempo de incubación 127
- Figura 30:** Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la temperatura y el tiempo de incubación. Los colores en el

contorno se refieren a las concentraciones medias de ácido tenuazónico ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 7.5, B) cepa 25.1. 128

Figura 31: Productos amplificados por PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. Muestras sembradas correspondientes a los géneros *Candida* (CA), *Hanseniaspora* (HA), *Aureobasidium* (AU), *Metschnikowia* (ME), *Rhodotorula* (RH) y *Cryptococcus* (CR). Control negativo de reacción (-), MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb. 131

Figura 32: Fragmentos de digestión de los productos de PCR de A- *Hanseniaspora uvarum*, B- *Metschnikowia pulcherrima*, C- *Candida zemplinina*, D- *Cryptococcus laurentii* II, E- *Rhodotorula* spp. y F- *Aureobasidium pullulans*, obtenidos con las enzimas *Cfo I*, *Hinf I*, *Hae III* y *Dde I*. MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb. 131

Figura 33: Gráfico Biplot de los primeros 2 componentes principales del efecto antagonista frente a las cepas de *Alternaria alternata* 5.5, 7.5 y 25.1 de las levaduras seleccionadas: **1-** cepas de levadura LP124, LP125.1, LP126, LP128.2, LP131.2, LP6.4.1, LP8.1.1, LP8.2.1, LP8.5.1, LP8.5.2, LP10.2.1; **2-** cepa de levadura LP122.2; **3-** cepa de levadura LP125.2; **4-** cepa de levadura 132.1. **5-** cepa de levadura LP123.2. Los valores estadísticamente similares de acuerdo al test de Hotelling -Bonferroni se encuentran agrupados. 134

Figura 34: Árboles filogenéticos de cepas de levadura seleccionadas por su capacidad de reducir la infección de *Alternaria alternata* en uva, basados en la secuenciación parcial del ADNr. (A) Cepas LP124, LP125.1, LP8.8.8, LP126 y LP8.2.1 pertenecientes a *Hanseniaspora uvarum*, (B) y (C) cepas LP122.2, LP123.2, LP125.2, LP128.2, LP131.2 y LP132.1 pertenecientes a *Metchnikowia* spp. y (D) cepas LP8.5.1, LP8.5.2 y LP6.4.1 pertenecientes a *Starmerella bacillaris*. Los números representan el nivel de confianza obtenidos partir de 1000 repeticiones (se indican las frecuencias mayores al 50 %). Las barras inferiores en A, B, C y D representan la distancia correspondiente a un cambio de 1; 200; 0,2 y 5 pares de bases en 100 nucleótidos, respectivamente. En A, *Candida tropicalis* (GenBank EF120605) se usa como cepa no relacionada o “outgroup”, en B, *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank HE963295) y en D, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank AY048154).

137

Figura 35: Porcentaje de ácido tenuazónico producido por la cepa 7.5 de *Alternaria alternata* a los 24 días de incubación a 25°C, con y sin el efecto preventivo de las cepas de levadura LP8.5.2, LP131.2, LP128.2, LP8.1.1, LP8.5.1 y LP6.4.1. Se incluyen controles de las cepas de levadura solas y agua (A). Letras distintas muestran diferencias significativas en los tratamientos (LSD Fisher, $p < 0,05$).

139

Figura 36: Porcentaje de ATe producido por la cepa 25.1 de *Alternaria*

Alternata con 24 días de incubación a 25°C, con y sin el efecto preventivo de las cepas de levadura LP8.5.2, LP131.2, LP128.2, LP8.1.1, LP8.5.1 y LP6.4.1. Se incluyen controles de las cepas de levadura solas y agua (A). Letras distintas muestras diferencias significativas en los tratamientos (LSD Fisher, $p < 0,05$).

139

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Organismos asociados a podredumbres en uva.	30
Tabla 2: Características morfológicas evaluadas para la identificación de <i>Alternaria</i> .	64
Tabla 3: Secuencia de los cebadores específicos utilizados en la determinación los diferentes grupos especies de <i>Alternaria</i> .	66
Tabla 4: Porcentaje de uvas Malbec de la DOC San Rafael infectadas con géneros fúngicos durante la vendimia 2013 (en medio DRBC).	93
Tabla 5: Potencial micotoxigénico en medio AMLM de cepas de <i>Alternaria Alternata</i> aisladas durante las vendimias 2011 y 2012.	99
Tabla 6: Patogenicidad de cepas de <i>Alternaria alternata</i> en uva.	102
Tabla 7: Rendimiento analítico, recuperaciones absolutas (% , como una estimación de la exactitud) y precisión del método propuesto para uvas enriquecidas a diferentes niveles de concentración de ATe.	107
Tabla 8: Incidencia natural de ácido tenuazónico en muestras de uva Malbec. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/g}$) con sus desviaciones estándar, n=3 replicas.	109
Tabla 9: Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (c) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> en un medio simil uva.	113
Tabla 10: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre	

la producción de alternariol (AOH) por 3 cepas de <i>Alternaria Alternata</i> en un medio de cultivo simil uva.	120
Tabla 11: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre la producción de alternariol monometil éter (AME) por 3 cepas de <i>Alternaria Alternata</i> en un medio de cultivo simil uva.	121
Tabla 12: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre la producción de ácido tenuazónico (ATe) por 3 cepas de <i>Alternaria Alternata</i> en un medio de cultivo simil uva.	125
Tabla 13: Análisis de la varianza del efecto de la cepa (c), temperatura (T), tiempo de incubación (t), y sus interacciones sobre la producción de ácido tenuazónico por <i>A. alternata</i> en uva.	129
Tabla 14: Patrones de restricción obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr de los aislados con características de levadura de las vendimias 2011, 2012 y 2013.	130
Tabla 15: Cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael con capacidad antagonistas frente a <i>A. alternata</i> .	133
Tabla 16: Capacidad antagonista de levaduras seleccionadas de uvas Malbec vendimias 2011, 2012 y 2013 DOC San Rafael frente a cepas de <i>A. alternata</i> .	133

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El vino

I.1.1 Origen e Importancia del vino

La historia del vino es paralela a la de la civilización, los historiadores creen que se remonta al Cáucaso y la Mesopotamia alrededor del año 6000 antes de Cristo. Desde allí se integró en las diversas culturas del viejo mundo. Fue recién en el siglo XVI, que los exploradores europeos lo introdujeron al continente americano. En 1530, los conquistadores españoles plantaron *Vitis vinífera* en México, Argentina, Perú y Chile. Ya en el siglo XX, la oficina internacional de la viña y el vino (OIV) en París, reportaba 8 millones de hectáreas de viñedos distribuidos en el mundo, mayormente concentrados en las zonas templadas, cada uno de ellos reflejo del *terroir*, la historia, cultura y tradición propias de la región a la que pertenecen (Pretorious, 2000).

Hoy en día, el vino se ha convertido en un sinónimo de cultura y convive con nuestro estilo de vida alrededor del mundo, siendo un perfecto complemento de la gastronomía, el entretenimiento y el arte. También juega un papel central en la economía de muchas naciones, en 2015, la producción mundial de vino (excluido zumos y mostos) ha sido considerable y se sitúa en 274,4 millones de hectolitros (MhL), eso significó 5,8 MhL más que en 2014. Por su parte, Argentina, con una producción de 13,4 Mhl durante el 2015, se encuentra en el quinto puesto de los países productores de vino, exportando a grandes mercados como el Reino Unido, Dinamarca, Países Bajos, Rusia, Estados Unidos, Canadá y Brasil (OIV, 2016).

La provincia de Mendoza es un punto de referencia nacional para la industria enológica argentina y es allí donde se localizan las primeras DOC (Denominación de Origen Controlada) argentinas, en las zonas de Luján de Cuyo (al norte) y San Rafael (al sur). Para que un vino sea amparado por una Denominación de Origen (DO, o Denominación de Origen Controlada, DOC), la uva debe proceder de viñedos localizados en la zona determinada por la DO

y debe ser elaborado en la misma región. Los reglamentos de cada DO establecen no solo las variedades de vid, su forma de cultivo, poda, etc., sino también el modo de elaboración y crianza de los vinos. Un vino DOC es ante todo un vino de calidad superior, que responde a una personalidad distintiva del terruño del cual proviene e implica que el vino debe ser además embotellado en la Denominación para garantizar totalmente su origen (Ley 25.163).

La reconocida DOC San Rafael se encuentra situada al sur de la provincia de Mendoza (34,5°-36,0° latitud sur, 70,0°-66,5° longitud oeste) y se extiende al pie de la Cordillera de Los Andes. Es un oasis irrigado por las aguas de los ríos Atuel y Diamante (Fig. 1) que nacen de las altas cumbres andinas para desplazarse hacia el Valle de San Rafael al este, el cual posee una pendiente que desciende desde Las Paredes a 800 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) hasta General Alvear 450 m.s.n.m. La ciudad de San Rafael pertenece al grupo climático IH+2 IF+1 IS+1, caluroso, de noches frías y de sequía moderada, existe riesgo de heladas tardías y también de granizo. De clima seco, las precipitaciones anuales oscilan cerca de los 250 mm y las enfermedades criptogámicas tienen moderada incidencia en la región (Catania y col., 2012).



Catania y col., 2012.

Figura 1: Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza y la DOC San Rafael.

Además, sus terruños con cualidades ecológicas distintivas (*terroir*) favorecen el cultivo de distintos varietales de *Vitis vinifera* L.: entre las uvas tintas podemos mencionar Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Sangiovese, Syrah, Pinot Noir y Bonarda. Entre las uvas blancas se destaca Chenin Blanc, Semillón, Torrontés y Chardonnay. Particularmente, Malbec, una de las variedades de uva para vinificar más importantes y típicas en Argentina, es mayoritaria, constituyendo el 35,1 % del total de uvas para vinificación del país durante el 2015 (INV 2016). La DOC San Rafael, produce 1.014.433 quintales métricos de uvas para vinificar (aproximadamente el 100 % del total de uvas) lo que representa el 4,3 % de la producción Argentina, transformando a la actividad vitivinícola en una de las principales de la región (INV 2016).

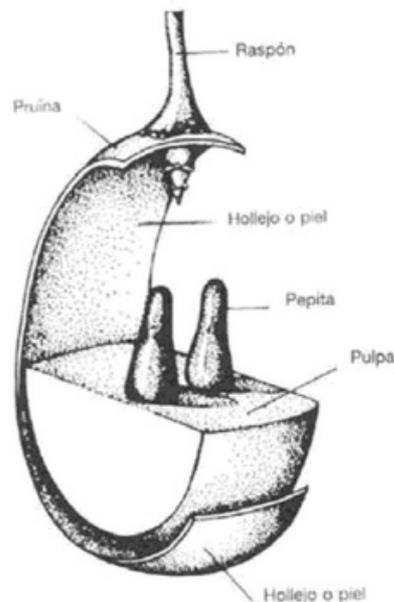
I.1.2 La uva como protagonista en la vinificación

Es importante destacar el protagonismo de la uva en todo el proceso vitivinícola. Este protagonismo es evidente ya que constituye la materia prima de todo el proceso, pero paradójicamente, le hemos prestado muy poca atención a la uva y ha sido el vino el que ha adquirido, generalmente, todo el protagonismo. Existe una máxima o axioma en enología según el cual de una uva buena puede hacerse un vino bueno o un vino malo, según las condiciones de elaboración, pero de una uva mala nunca podrá hacerse un buen vino (Martinez de Toda, 2008).

La uva es un fruto en baya; por eso se habla, indistintamente, de uva o de baya para referirnos al fruto de la vid (Fig. 2). El desarrollo de las bayas se realiza a lo largo de dos fases principales que son el crecimiento herbáceo de la baya y la maduración, separadas por una fase muy corta que se denomina envero.

El crecimiento herbáceo de la baya comienza con el crecimiento del ovario, generado por el polen durante su germinación. Desde la fecundación, el ovario se desarrolla por multiplicación celular, que se detiene a partir de la 3er semana, a partir de allí, la baya va a crecer únicamente por aumento del tamaño celular (Martinez de Toda, 2008).

Al final de la fase de desarrollo herbáceo llega un momento en que la baya, anteriormente dura y de color verde, se ablanda y se vuelve traslúcida en variedades blancas o se colorea en variedades tintas; este proceso se conoce con el nombre de “envero”. Durante la fase de desarrollo herbáceo las bayas presentan un pequeño contenido en azúcares, pero en el envero se produce un incremento brusco de dicho contenido, se lleva a cabo una movilización rápida desde las reservas acumuladas en formas de almidón en diferentes partes de la planta (Martínez de Toda, 2008).



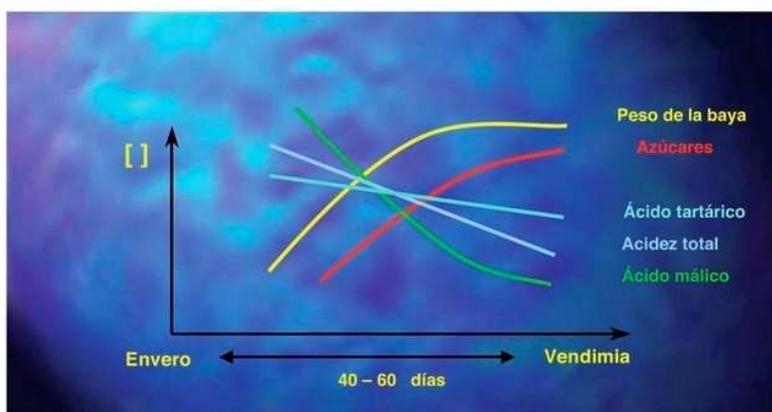
Martínez de Toda, 2008.

Figura 2: Esquema representativo de la estructura de la baya.

Durante el período de maduración de la uva se desarrollan una serie de cambios, ya iniciados en el envero, en lo que respecta a la composición química de la baya. La evolución de la composición química de la uva es objeto del seguimiento rutinario de la evolución de la maduración en el viñedo y se conoce suficientemente bien, por lo menos en lo que respecta a la pulpa (Fig. I.3).

La maduración de la uva es un proceso mucho más complejo que el que refleja la evolución de la pulpa, en ella tiene lugar el proceso complejo de “maduración

fenólica”. Los compuestos fenólicos de la uva se pueden englobar bajo la denominación de compuestos “nobles” en el sentido de que son los responsables de que de la uva se pueda obtener un producto tan peculiar como el vino. Otros compuestos, como los azúcares y los ácidos, son catalogados como “comunes” porque aparecen en cualquier tipo de fruto y no sólo en la uva (Martinez de Toda, 2008).



Martinez de Toda, 2008.

Figura 3: Evolución de los diferentes componentes de la pulpa durante la maduración de la uva.

Se definen como compuestos fenólicos aquellas sustancias cuya estructura tiene uno o más anillos aromáticos (benceno) con, al menos, un sustituyente de hidroxilo. Existen dos grandes grupos de compuestos fenólicos: los ácidos fenólicos y los flavonoides (flavonoles, antocianos y taninos) (Martinez de Toda, 2008).

De manera general, las moléculas fenólicas son muy reactivas y existen, sobre todo, en estado combinado, sea con un ácido orgánico o con un azúcar (ácidos fenólicos, flavonoles, antocianidinas), o con ellas mismas para formar un polímero (taninos). Todos estos compuestos son resultado del metabolismo secundario de la planta y presentan propiedades espectrales, oxidoreductoras, gustativas y saludables. El hollejo y las pepitas son las zonas de concentración máxima en compuestos fenólicos. Los antocianos y flavonoles se localizan en las vacuolas de las células del hollejo y en las de la pulpa para las variedades

tintoreras. Los ácidos fenólicos están, sobre todo, concentrados en la pulpa. Los taninos son abundantes en las pepitas y en, menor medida, en el hollejo. Los antocianos alcanzan su contenido máximo en el momento de madurez de la pulpa o incluso después. Los taninos del hollejo son bastante abundantes desde el envero (50 %) y presentan su contenido máximo antes de la madurez de la pulpa. Los ácidos fenólicos son abundantes antes del envero y disminuyen regularmente hasta la madurez (Martinez de Toda, 2008).

Entre los principales factores vitivinícolas que influyen sobre los diferentes componentes y características de la uva (concentración de azúcares, antocianos, compuestos fenólicos, compuestos aromáticos, acidez total y estado sanitario) encontramos la temperatura media y salto térmico entre día y noche en vendimia, la disponibilidad de agua y nitrógeno en la maduración, la exposición de la vegetación y el nivel de producción de uva (Martinez de Toda, 2008).

I.1.3 Hongos filamentosos presentes en uvas para vinificación

En 1863, Luis Pasteur demuestra que el vino es el producto de la fermentación alcohólica del jugo de uva llevada a cabo por levaduras. En la actualidad, sabemos que la vinificación o elaboración de vino resulta un proceso biotecnológico complejo que involucra interacciones entre uvas, microorganismos y condiciones físico-químicas (Pretorious, 2000).

Las uvas tienen una compleja ecología microbiana incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas y efectos sobre la producción del vino (Barata y *col.*, 2012; Rousseaux y *col.*, 2014).

La contaminación fúngica de las uvas puede ocurrir antes y durante la cosecha, así como también durante el procesamiento. El crecimiento fúngico comienza en uvas si la temperatura y la humedad son apropiadas, produciendo numerosos efectos adversos que impactan de manera negativa en la producción, calidad y “flavour” del vino. Entre los más importantes, se pueden citar: i) pérdida del rendimiento en jugo, ii) prolongación del proceso de prensado debido a la naturaleza resbaladiza de las uvas infectadas, iii)

alteración de la composición química del vino por la producción de ácido glucurónico, altos niveles de glicerol, oxidación de los compuestos fenólicos, iv) secreción de β -glucanos que afectan negativamente la clarificación, v) producción off-flavours (como el ácido acético), y vi) estimulación del crecimiento de levaduras de deterioro y bacterias (Pretorius, 2000). En 1998, Fleet y *col.*, mostraron las primeras evidencias de que los hongos producen metabolitos antilevaduras que pueden afectar a la fermentación alcohólica y maloláctica. Aunque los hongos filamentosos son incapaces de sobrevivir a concentraciones de etanol de 3%, bajo pH, SO₂ y anaerobiosis del vino, son capaces de crecer en las superficies del equipamiento de bodegas y en barricas de madera usadas para el añejamiento de vino otorgándole flavour mohoso.

Entre todos estos efectos negativos es de principal preocupación la producción de micotoxinas en uva para vinificación que pueden perdurar durante el proceso hasta llegar al vino, generando un riesgo para la salud de los consumidores (Rousseaux y *col.*, 2014).

La podredumbre y el deterioro de las uvas antes de la cosecha puede ser causado por una gran variedad de organismos, en su mayoría fúngicos, algunos más comúnmente asociados a los tejidos vegetativos de la vid, como miembros de la familia Botryosphaeriaceae, *Uncinula necator*, *Phomopsis viticola* y *Plasmopara viticola* y otros parte de la microbiota de la superficie de uvas para vinificar (Tabla 1), todos ellos con capacidad de atacar la baya de uva dependiendo de las condiciones de ambiente y clima de la viña (Steel y *col.*, 2013).

Tabla 1: Organismos asociados a podredumbres en uva

Organismo	Nombre trivial y apariencia	Impactos reportados en la calidad del vino
<i>Alternaria spp.</i>	Hongo negro	No conocido
<i>Aspergillus spp.</i>	Hongo negro fumagina	Producción de micotoxinas (ocratoxina A en algunas cepas de <i>A. niger</i> y otras especies)
<i>Botritis cinerea</i>	Hongo gris	Pérdida del color rojo del vino, aromas a moho y tierra
<i>Cladosporium spp.</i>	Hongo verde aterciopelado	No conocido
<i>Colletotrichum spp.</i>	Esporulación naranja- podredumbre de la madurez	Olores desagradables a saco de arpillera y moho, alto contenido de acidez volátil, glicerol y ácido glucurónico
<i>Elsinoe ampelina</i>	Punto negro Punto negro o lesión de las bayas inmaduras que se transforma en una cicatriz negra en la cosecha	No conocido (la enfermedad afecta principalmente variedades de uva de mesa)
<i>Greeneria uvicola</i>	Podredumbre amarga, anillos negros de esporulación alrededor de la circunferencia de la baya.	Olores amargos
<i>Guignardia bidwellii</i>	Pudrición negra	No conocido
<i>Penicillium spp.</i>	Hongo verde azulado	Aromas a moho y tierra, producción de mixotoxinas (patulina) de algunas cepas
<i>Rhizopus spp.</i>	Hongo negro	No conocida
Algunas bacterias, levaduras y hongos filamentosos	Podredumbre ácida, bayas acuosas, olor a vinagre	Formación de acetato de etilo y ácido acético, variable dependiente del complejo particular de organismos involucrados.

Steel y col., 2013

Actualmente, se han identificado 8 géneros de hongos filamentosos, por técnicas convencionales y moleculares, que predominan entre los aislados en uvas para vinificar en distintas regiones vitivinícolas: *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Botritis* (Darriet y col., 2000; Abrunhosa y col., 2001; Da Rocha Rosa y col., 2002; Sage y col., 2002, 2004; Magnoli y col., 2003, 2004; La Guerche y col., 2004; 2005; 2006; 2007; Bau y col., 2005; Medina y col., 2005; Serra y col., 2005, 2006; Tournas y Katsoudas, 2005; Bellí y col., 2006; Doaré-Lebrun y col., 2006; Gomez y col., 2006; Lasram y col., 2007; Melki Ben Fredj y col., 2007; 2009; Ponsone y col., 2007; Steel y col., 2007; 2013; Uyovbisere y col., 2007; Bragulat y col., 2008; Chiotta y col., 2009; Diaz y col., 2009; Kassemeyer y Berkelmann-Löhnertz, 2009; Laforgue y col., 2009; Mundy y col., 2009; Morales-Valle y col., 2010; 2011, Diguta y col., 2011; Dean y col., 2012).

Si bien, se observan cambios importantes en la población fúngica durante el desarrollo de la uva, la cosecha es considerada un período crítico para el desarrollo fúngico. La disminución en la acidez, la acumulación de azúcares y el aumento de la fragilidad de la cutícula de la baya producidos en la cosecha, explicarían el aumento en la abundancia de hongos y los mayores niveles de micotoxinas encontrados (Hocking y col., 2007; Clouvel y col., 2008; Lasram y col., 2012). Bellí y col. (2006) observaron un incremento en el índice de biodiversidad, de 1,41 al comienzo del envero hasta 3,95 en la cosecha.

Otros factores de diversidad resultan las diferentes variedades de uva consideradas, si se trata de uvas tintas o blancas, entre otras. Se encontró una menor diversidad entre hongos filamentosos aislados de uvas Moscatel de España que de variedades tintas como Bobal, Tempranillo, Garnacha y Monastrell (Medina y col., 2005).

El clima es otro factor a considerar. Se ha observado una mayor frecuencia del género *Penicillium* en climas templados y fríos, como los del norte de Europa (Sage y col., 2004), mientras que *Aspergillus* de la sección *Nigri* parecen estar mejor adaptado a las condiciones de los viñedos Mediterráneos, secos y calurosos probablemente gracias a que sus esporas les proveen protección

contra los rayos de luz UV y por lo tanto poseen una ventaja competitiva en climas más cálidos (Pitt y Hocking, 2006; 2009; Serra y col., 2003; Valero y col., 2007). Chiotta y col. (2009) revelaron la existencia de una correlación positiva entre el porcentaje de aislados identificados como *A. carbonarius* que crecen en uva y la temperatura de diferentes regiones de Argentina.

Entre otros factores, se reportaron mayores niveles de contaminación con *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* y ochratoxina A (OTA) en viñedos infectados con *Planococcus ficus* (cochinilla harinosa de la vid) que presenta un rol importante en el daño de la piel de la uva (Chiotta y col., 2010).

Por otro lado, el uso de fungicidas, herbicidas e insecticidas en el campo para prevenir algunas enfermedades y plagas de la vid, podrían afectar la microbiota presente en uvas para vinificar, como se ha informado para bacterias y levaduras presentes en este nicho (Martins y col., 2012; 2014).

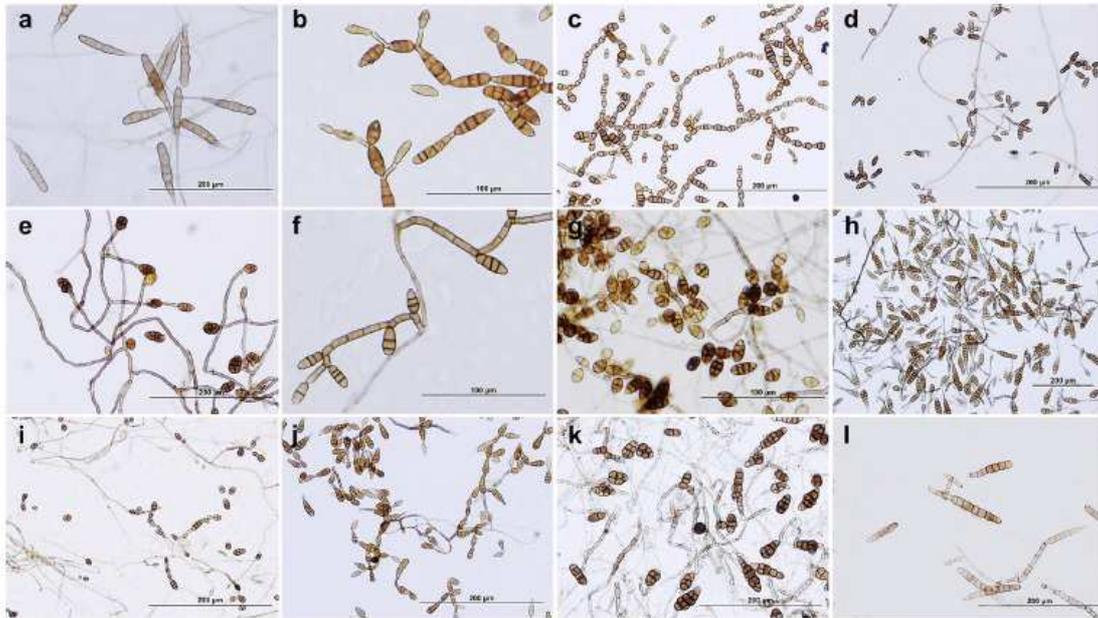
El incremento en la incidencia de micotoxinas y off-flavours en el vino, ha demostrado la necesidad de un estudio cuidadoso de los hongos presentes en uva para vinificar. Existen numerosos reportes en la literatura dedicados al estudio de especies de *Aspergillus*, productores de aflatoxinas y ocratoxina y de especies de *Penicillium*, productores de patulina, ambos géneros fúngicos también son causantes de numerosos off-flavours (Rousseaux y col., 2014). Sólo recientemente, el género *Alternaria*, de un gran potencial micotoxigénico y comúnmente encontrado en uva, ha comenzado a estudiarse (Mikusova y col.; 2014; Vargas Trinidad y col., 2015).

I.2 El género *Alternaria*

I.2.1 Taxonomía, identificación y ecología del género *Alternaria*

El género *Alternaria* comprende un grupo de hongos de la familia Pleosporaceae (Pleosporales, Dothideomycetes, Ascomycota). Los conidios de *Alternaria* poseen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, son de color pardo y poseen un extremo apical en pico (faeodictiosporas). Se originan por brotación apical a partir de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar, en este último caso, a una cadena que suele ramificarse si

una espora produce más de un brote. Es decir que los conidios de este género presentan un desarrollo acrópeto (Simmons, 2007) (Fig. 4).



Lawrence y col., 2016.

Figura 4: Especies representativas de algunas secciones pertenecientes al género *Alternaria*: a- *Alternaria alternantherae* (sec. *Alternantherae*), b- *A. arborescens* (sec. *Alternaria*), c- *A. brassicicola* (sec. *Brassicicola*), d- *A. abundans* (sec. *Chalastospora*), e- *A. cheiranthi* (sec. *Cheiranthus*), f- *A. embellisia* (sec. *Embellisia*), g- *A. proteae* (sec. *Embellisioides*), h- *A. limícola* (sec. *Euphorbiicola*), i- *A. Eureka* (sec. *Eureka*), j- *A. infectoria* (sec. *Infectoriae*), k- *A. japonica* (sec. *Japonicae*), l- *A. scirpicola* (sec. *Nimbya*).

Alternaria fue originalmente descrita por Nees (1816), basado en *Alternaria tenuis* como única especie y desde ese entonces su taxonomía ha sido tema de debate. La diferenciación de *Alternaria* y taxones relacionados se ha basado en un número de rasgos morfológicos exclusivos, particularmente la forma de los conidios, el patrón de esporulación tridimensional, el grosor de los septos, etc (Simmons 1967, 1992, 1993, 1995 y 2007).

En 1992, Simmons describió numerosos “grupo-especies” morfológicos dentro de *Alternaria*, es decir grupos de taxones que producen patrones de

esporulación similares y comparten características morfológicas de sus conidios, y los tipificó con especies representativas. El grupo especie *A. alternata*, por ejemplo, incluye especies con esporas pequeñas en cadenas, como *A. alternata*, y el grupo especie *Alternaria porri* incluye especies con esporas grandes, largas y no encadenadas, como *A. porri*. Otros grupo especie morfológicos son *Alternaria brassicicola*, *Alternaria cheiranthi* y *Alternaria infectoria* (Simmons, 1995).

La clasificación morfológica de *Alternaria* logró su pináculo con el trabajo de Emory G. Simmons (Simmons, 2007), un sistema taxonómico basado en una clave dicotómica para la identificación de *Alternaria* a nivel de especie, logrando reconocer más de 270 especies. El mismo considera la observación de las características morfológicas en cultivo con condiciones estandarizadas, haciendo una primera separación de las especies del género en categorías mayores en base a la morfología del conidio y a los patrones de esporulación. Para las especies con esporas relativamente grandes, la característica principal es la naturaleza del desarrollo apical de los conidios. Para las especies con esporas relativamente pequeñas, se considera la relación conidióforo-conidio en el desarrollo del patrón de esporulación.

No obstante, la superposición de características morfológicas y la plasticidad de algunas especies de *Alternaria*, ha hecho de la morfología un criterio insuficiente para la identificación de *Alternaria*.

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, se han identificado regiones del ADN con diferentes grados de variabilidad que han servido de “marcadores moleculares” para análisis filogenéticos. Los análisis filogenéticos de *Alternaria* y taxones relacionados han utilizado rDNA nuclear (DNA ribosomal), las regiones ITS, mtSSU (subunidad pequeña mitocondrial) y numerosos genes codificantes de proteínas tales como: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa - gpd, endo poligalacturonasa- endoPG, principal alérgeno de *Alternaria* Alt a1, entre otros (Lawrence y col., 2016).

Pavón y col. (2010) aprovecharon la diversidad de las secuencias del gen *Alt a1* y sus homólogos en el género *Alternaria* y taxones relacionados (Hong y col., 2005)

para desarrollar un método sencillo de identificación de *Alternaria* basado en la amplificación por PCR del gen *Alt a1* con cebadores específicos. Esto permitió la detección e identificación de los grupo- especies *A. alternata*, *A. porri*, *Alternaria radicina* y *A. infectoria*, respaldados por estudios filogenéticos previos (Chou y Wu, 2002; Hong y col., 2005). El grupo especie *A. alternata* incluye especies tales como *A. alternata*, *Alternaria arborescens*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria gaisen*, *Alternaria citri* y *Alternaria longipes*, productoras de las micotoxinas como alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y ácido tenuazónico (ATe) (Andersen y col., 2001 y 2002). El grupo especie *A. porri* incluye especies tales como *A. porri*, *Alternaria dauci* y *Alternaria tomatophila*, productoras de micotoxinas tales como AOH, altertoxina (ATX) y altersolanol (Andersen y col., 2008). El grupo especie *A. radicina*, incluye la especie *A. radicina*, patógeno de zanahoria y productor de compuestos fitotóxicos como el radicinin y radicinol (Konstantinova y col., 2002; Solfrizzo y col., 2005). Y por último y el grupo especie *A. infectoria* incluye especies tales como *Alternaria arbusti*, *Alternaria ethzedia*, *A. infectoria*, *Alternaria intercepta*, *Alternaria metachromatica*, *Alternaria oregonensis*, *Alternaria photistica*, *Alternaria triticina*, *Alternaria viburni* y *Alternaria triticimaculans*, capaces de producir infectopironas (Christensen y col., 2005; Andersen y col., 2009).

En años recientes, nuevas investigaciones filogenéticas incluyendo múltiples loci han realizado avances significativos en la filogenia de *Alternaria* (Lawrence y col., 2013; 2014; Woudenberg y col., 2013) corroborando algunos de los principales grupos morfológicos identificados por Simmons. Estos estudios han elevado diversos grupo-especies filogenéticos (grupo de taxones que comparten características morfológicas de sus conidios y forman parte de un grupo monofilético discreto fuertemente sustentado por el análisis filogenético de secuencias de DNA) al estatus taxonómico de sección, dando un total actual de veintisiete secciones dentro del género *Alternaria* (Lawrence y col., 2016).

En este nuevo contexto, el uso conjunto de marcadores moleculares con metodologías convencionales resulta entonces una herramienta valiosa para contrarrestar las antiguas limitaciones en el estudio sistemático de los hongos.

Por otra parte, *Alternaria* representa un género fúngico ecológicamente diverso y cosmopolita, con diferentes especies distribuidas ampliamente en la naturaleza interactuando con sus huéspedes de manera diversa.

En la actualidad, se han descrito 4 grupos ecológicos distintos para *Alternaria*, caracterizados por diferentes asociaciones con los sustratos y patogenicidad, correlacionándose ésta última con su filogenia (Lawrence y col., 2016).

El primer grupo está constituido por las especies patógenas de plantas (fitopatógenas), que en general se encuentran asociadas a una especie de planta hospedadora o a un pequeño grupo de taxones en un mismo género. Estas especies son capaces de producir fitotoxinas, que pueden ser específicas de huésped (HST) o no específicas (non-HST). Considerando su posible participación en la patogénesis (Yoder, 1980), la mayoría de las HST podrían causar la enfermedad, mientras que algunas de las non-HST aumentarían la extensión o severidad de la lesión (Manmagain y col., 2013).

El segundo grupo se encuentra constituido por las especies saprófitas, comúnmente recuperadas de sustratos de origen vegetal sin vida, incluyendo plantas muertas, papel y comida (Rotem, 1994). Aunque también se aíslan de plantas vivas, usualmente de tejidos senescentes o dañados y son causa de importantes pérdidas de rendimiento, antes, durante y después de la cosecha.

El 3er grupo lo constituyen las especies endófitas, en algunos casos aislados de tejidos de plantas asintomáticos. Serdani y col. (2002) investigaron la patogenicidad de cepas de *A. infectoria* aisladas de hojas de manzana y encontraron un estilo de vida verdaderamente endófito de algunos especímenes. No obstante, estudios recientes comienzan a cuestionarse si la fase endófito es sólo un período lento de latencia de una enfermedad inducida por un patógeno débil, y/o la patogénesis se inicia debido al estado de salud del huésped (Lawrence y col., 2016).

Finalmente, el 4to grupo está constituido por aquellas especies capaces de inducir patógenesis en los humanos. Algunas especies de *Alternaria* han sido asociadas con infecciones de la cornea, cavidades orales y sinusoidales, el tracto respiratorio, piel y uñas (Badenoch y col., 2006; Simons 2007).

I.2.2 Micotoxinas producidas por el género *Alternaria*

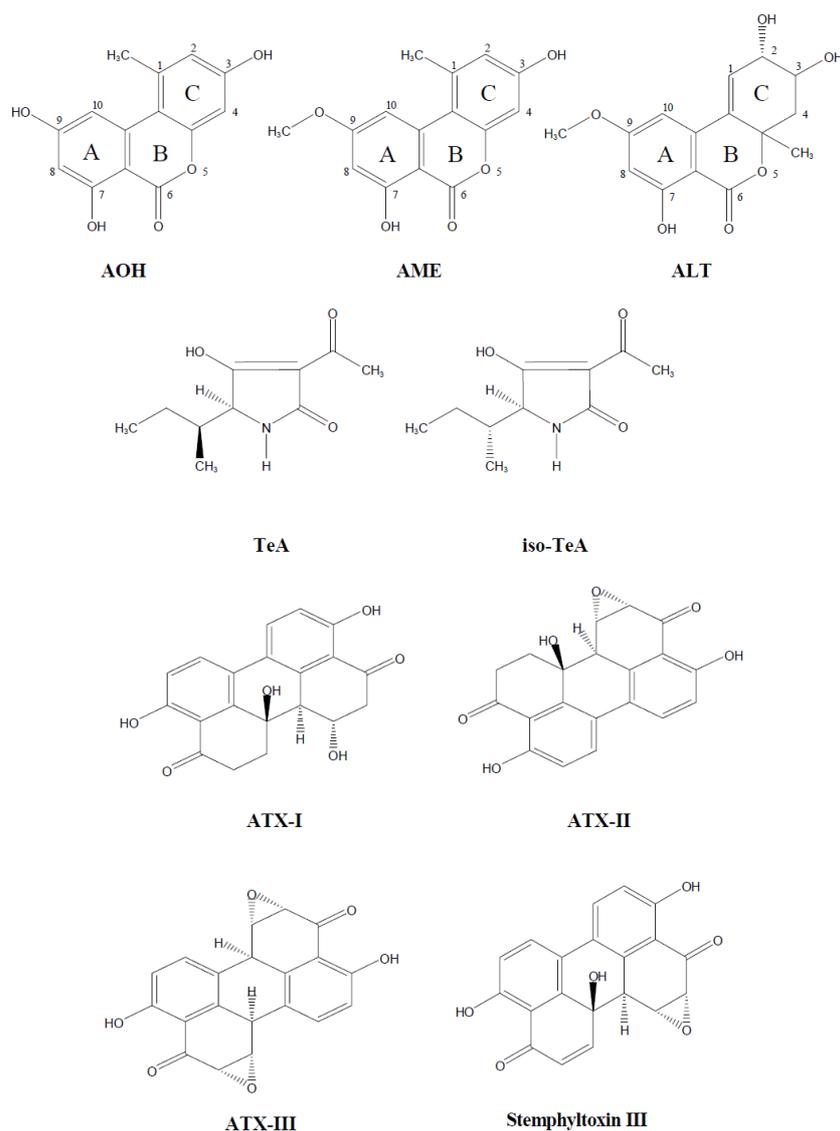
Algunas especies de *Alternaria* son bien conocidas por su habilidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios. Éstos son compuestos que poseen bajo peso molecular producidos durante la fase estacionaria de crecimiento y no son necesarios para el crecimiento o el desarrollo del hongo que las produce. Actualmente todavía se debate sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el rol que dichos metabolitos tienen en la biología de los organismos que los producen. Muchos de estos metabolitos tienen actividad biológica y pueden ser tóxicos para otros microorganismos (antibióticos), las plantas (fitoxinas) o los animales (micotoxinas) (Fox y Howlett, 2008).

Por definición las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos producidos por hongos filamentosos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Richard, 2007). La producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el huésped, el ambiente y la especie toxicogénica; la interacción entre las partes interactuantes puede influir en la mayor o menor producción de las toxinas (Magan y Aldred, 2007).

La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas y unas pocas son patógenas facultativas de plantas (Bennet y Klinch, 2003). Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002). Debido al peligro toxicológico que implican, numerosos estudios se han enfocado en la identificación de hongos potenciales productores y los factores que determinan su ocurrencia en distintos alimentos de consumo humano (Logrieco y col., 2009).

Las especies de *Alternaria* pueden producir más de 120 metabolitos secundarios, un cuarto de ellos, han sido reconocidos como micotoxinas (Panigrahi, 1997). Las primeras micotoxinas de este género fueron aisladas y caracterizadas entre los años 1953-1986. Las micotoxinas de *Alternaria* se clasifican dentro de 5 grupos químicos: a) dibenzo- α -pironas: alternariol (AOH), alternariol

monometil éter (AME), altenueno (ALT); b) ácido tenuazónico (ATe) e iso-ácido tenuazónico (iso-ATe); c) perilenquinonas: alvertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II y ATX-III) y estenfiltoxina III; d) toxinas de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (AAL-toxinas): AAL-TA y AAL-TB; e) estructuras misceláneas como la tentoxina (TEN), un tetrapéptido cíclico. Entre ellas, AOH, AME, ALT, ATe, TEN, y las alvertoxinas I, II y III son consideradas las más importantes (Fig. 5) (Lee y col., 2015).



EFSA, 2011

Figura 5: Estructuras químicas de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazónico (ATe) e iso- ácido tenuazónico (iso-ATe), alvertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II y ATX-III) y estenfiltoxina III.

La exposición a las toxinas de *Alternaria* ha sido vinculada a una gran variedad de efectos adversos para la salud humana y animal. De particular preocupación en la salud, es la asociación encontrada entre la contaminación con *A. alternata* en granos de cereales y los altos niveles de cáncer de esófago en China (Liu y col, 1991; 1992). En 2012, la autoridad europea en inocuidad alimentaria (EFSA) sugirió que las toxinas de *Alternaria* son de gran preocupación para la salud pública (EFSA, 2011).

El ácido tenuazónico (ATe) puede actuar como micotoxina y fitotoxina (no específica de huésped, no-HST), y sería la más tóxica de las toxinas producidas por *Alternaria*, en varias especies de animales, como ratones, gallinas y perros (Woody y Chu, 1992; Visconti y Sibilía, 1994; Bottalico y Logrieco, 1998; Logrieco y col., 2003). Por otra parte, esta micotoxina ha sido asociada con trastornos hematológicos en humanos como la enfermedad de Onyalai, una forma de trombocitopenia, que sólo parece ocurrir en el centro sur de África (Bottalico y Logrieco, 1998). El ácido tenuazónico también ha mostrado capacidad de inhibir la biosíntesis de proteínas en tres líneas celulares de mamíferos (Zhou y Qiang, 2008).

Con respecto a AOH y AME, no serían agudamente tóxicas, pero existen evidencias de sus propiedades mutagénicas, carcinogénicas y tumorogénicas, *in vitro* e *in vivo* (Brugger y col., 2006; Lehmann y col., 2006; Ostry, 2008; Logrieco y col., 2009; EFSA, 2011). En células del carcinoma de colon humanas, AOH presentó mayor genotoxicidad que AME (Ostry, 2008) y ambas fueron capaces de inhibir la topoisomerasa II α , incrementando de esa forma la disrupción de las hebras de ADN (Marko, 2007; Fehr y col., 2009). También se ha documentado el efecto de AOH y AME en la inhibición de la secreción de progesterona, en células de ovario de cerdos (Tiemann y col., 2009). También se ha demostrado la capacidad de AOH de reducir la viabilidad de las células endometriales porcinas al afectar la expresión genética a nivel de la traducción (Wollenhaupt y col., 2008). Asimismo, Lehmann y col. (2006) demostraron que AOH podía inhibir la proliferación de células de adenocarcinoma del endometrio humano (Ishikawa) y líneas celulares de hámster (V79) al interferir

con la vida celular. Por último, AOH y AME han mostrado propiedades cancerígenas en células de la mucosa del esófago de ratones (Yekeler y col., 2001).

Con respecto a los derivados perileno, representada por las ALTX I, II y III, presentan una capacidad mutagénica superior a la de AOH en ratones (Ostry, 2008). Entre ellas, ALTXI produce toxicidad aguda en ratones y es altamente mutagénica en líneas celulares de mamíferos (Schrader y col., 2006) y ALTII, parece ser un disruptor de hebras de DNA y mutágeno mucho más potente que AOH y AME en líneas de cultivo celular de mamíferos (Fleck y col., 2012).

El género *Alternaria* también incluye especies que pueden producir una clase de micotoxinas análogas a la esfinganina, AAL-TA y TB-AAL. Estas toxinas, estructuralmente similares a las fumonisinas (micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*) (Desjardins, 2006), han demostrado afectar la viabilidad de algunas células de mamíferos, en particular, las de riñón de perro, hepatoma de ratas y líneas celulares de fibroblastos de ratón (Abbas y col., 1995).

I.2.3 Influencia de factores abióticos sobre el crecimiento y la producción de las toxinas de *Alternaria*

El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas son el resultado de complejas interacciones entre diversos factores bióticos y abióticos y por lo tanto, entender el efecto de cada factor involucrado es esencial para la predicción, comprensión y prevención de la producción de las micotoxinas en productos agrícolas y alimentos terminados (Sanchis y Magan, 2004; Pardo y col., 2005). Aún si los requerimientos nutricionales son los adecuados, otros parámetros físicos resultan importantes, como la disponibilidad de agua y la temperatura (Sanchis y Magan, 2004).

La actividad acuosa (a_w) se define como la proporción del agua libre presente en un sustrato, no ligada, química o físicamente a la matriz y se encuentra directamente relacionada con el crecimiento de los microorganismos (Aldred y col., 2004).

La temperatura, por su parte, influye en la proliferación y sobrevivencia de los organismos. Se conoce que el metabolismo celular aumenta conforme aumenta la temperatura hasta una temperatura máxima a partir de la cual se produce la desnaturalización irreversible de las proteínas estructurales y enzimáticas. Por debajo de la temperatura mínima los microorganismos detienen su crecimiento, pero mantienen su viabilidad (Lillehoj y Elling, 1983).

Magan y Lacey (1984) estudiaron cepas de *A. alternata* aisladas de trigo y mostraron que el crecimiento ocurrió en un rango más estrecho de condiciones de a_w y temperatura que la germinación en un medio de cultivo en base a trigo. En otro estudio se observó que una cepa de *A. alternata* aislada de trigo, presentaba un crecimiento óptimo a 25 °C en el rango de 0,88-0,89 a 0,995 de a_w (Magan y Aldred, 2007). Patriarca y col. (2014) encontraron que cepas de *A. tenuissima* aisladas de trigo en Argentina, tuvieron un rango de temperatura mayor para el crecimiento, con el óptimo a 25-30 °C a 0,98 de a_w . Oviedo y col. (2009) encontraron que cepas de *A. alternata* de semillas de soja crecieron bien hasta 35 °C en un medio de cultivo a base de soja, inusual para cepas aisladas de cereales templados. Pose y col. (2009) encontraron que cepas de *A. alternata* aisladas de tomate crecían en un rango de temperatura de 6 a 35 °C y 0,982 a 0,922 de a_w en un medio de cultivo sintético en base a tomate, con un óptimo a 21 °C y 0,982 de a_w . Vaquera y col (2014) observaron que la germinación y el crecimiento ocurrían en el rango de 6 a 30 °C y 0,995 a 0,95 de a_w para *A. arborescence* patógena de tomate. En general, los estudios sugirieron que el crecimiento resulta similar para diferentes cepas del mismo nicho, para aislados de cereales, tomates, sorgo, girasol y semillas de soja (Lee y col., 2015).

Por otra parte, las condiciones medioambientales en las que pueden producirse las micotoxinas de *Alternaria* también han sido revisadas (Lee y col., 2015). En estudios sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas de *A. alternata* en trigo, se encontró que el rango de la temperatura y la a_w para la producción de toxinas es mucho más estrecho que aquel para el crecimiento (Sanchis y Magan, 2004) (Fig. 6). En el estudio sobre la producción de AOH y AME en semillas de irradiadas de soja por 2 cepas de *A. alternata*, se encontró que las condiciones

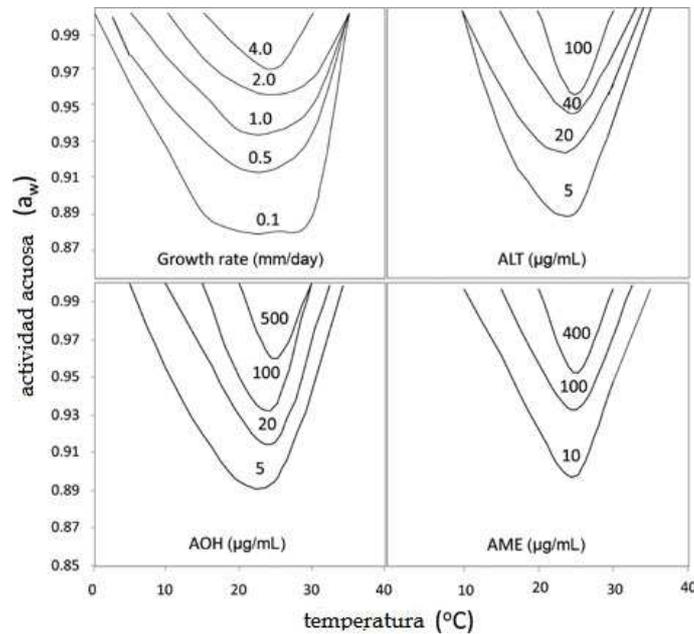
óptimas para la producción de AOH fueron diferentes entre cepas mientras que para la producción de AME fueron más consistente entre las cepas y AME, a diferencia de AOH, no fue producido a una temperatura mayor a 30 °C (Oviedo y col., 2010; 2011). Esto se podría atribuir a diferencias ecológicas o regionales entre las cepas aisladas de Argentina. Por otra parte, cepas de *A. tenuissima* de muestras de trigo argentinas, tuvieron patrones similares de crecimiento y producción de micotoxinas, especialmente a condiciones de temperatura mayores a 30 °C (Patriarca y col., 2014).

El estatus nutricional del alimento también ha demostrado ser importante para la producción de micotoxinas. Magan y Baxter (1994) encontraron que las cepas de *A. alternata* aisladas de sorgo tenían patrones de producción de ATe diferentes a cepas aisladas de otros sustratos. Las condiciones óptimas de producción de AOH, AME y ATe de cepas de *A. alternata* en un medio a base de tomate, fueron 21 °C y 0,954 de a_w , 35 °C y 0,954 de a_w y 21 °C y 0,982 de a_w , respectivamente, luego de 28 días de incubación (Pose y col., 2010). En la producción de ATX-II por cepas de *A. tenuissima* aisladas de cereales argentinos se observó que las mayores concentraciones se obtuvieron a 30 °C y 0,98 de a_w (Patriarca, 2014). Todos estos estudios sugirieron que las condiciones para la producción de micotoxinas resultan más variables que para el crecimiento, para cepas distintas de un mismo nicho (Lee y col., 2015).

Además, las especies toxicogénicas pueden crecer y producir toxinas sobre una amplia gama de sustratos, aunque algunos de los sustratos son más adecuados para la síntesis que otros. El tipo de sustrato puede determinar la producción o no de las toxinas. Se ha demostrado que algunas cepas de hongos productores de toxinas en medios de cultivo sintéticos, no las produjeron cuando crecieron sobre un sustrato natural, o que sólo producían un determinado grupo químico de toxinas (Betina, 1989; Viñas y col., 1992).

Es importante destacar que la presencia de hongos potenciales productores de toxina no necesariamente implica que estos metabolitos estarán presentes, ya que las condiciones que promueven el crecimiento fúngico no necesariamente coinciden con aquellas responsables de la producción de micotoxinas. Las

micotoxinas también pueden estar presentes en sustratos intactos y sus productos derivados (Barkai-Golan, 2008).



Sanchis y Magan, 2004

Figura 6: Comparación de los perfiles de crecimiento y producción de diferentes micotoxinas producidas por *Alternaria alternata* en granos de trigo.

I.3 Micotoxinas de *Alternaria* en alimentos

I.3.1 Determinación de las micotoxinas de *Alternaria*

Existen numerosos procedimientos analíticos para la determinación de micotoxinas en productos alimenticios. Las micotoxinas de *Alternaria* han sido generalmente extraídas de los alimentos sólidos con solventes orgánicos, tales como cloruro de metileno, metanol, acetonitrilo o acetato de etilo, mientras que para ATe se ha preferido realizar extracciones ácidas con solvente (Scott, 2001). Para la limpieza de los extractos se han utilizado técnicas como la partición líquido/líquido con solventes, en general para la determinación de ATe (Kocher, 2006 y 2007), y el uso de columnas de fase sólida (SPE) como por ejemplo, C18, aminopropil, SPE/Oasis®, para la determinación de AOH, AME y ATX-I (Scott, 2001). También se ha aplicado la microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de ATe (Aresta y col., 2003).

Actualmente, en pos de disminuir el tiempo de análisis debido al tratamiento de las muestras y los costos, se ha implementado cada vez más el uso de el método de QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe). Esta metodología, ampliamente utilizada para la preparación de muestras, es conocida por su simplicidad y aplicabilidad en el análisis simultáneo de un gran número de compuestos (pesticidas, drogas farmacéuticas, hormonas y toxinas) en una amplia variedad de matrices (Nuñez y *col.*, 2012). Este método involucra una extracción con acetonitrilo y una limpieza por partición, después de la adición de una mezcla de sales ($MgSO_4$ y NaCl). La limpieza también puede realizarse con una SPE a través de la adición de los sorbentes apropiados. El método de QuEChERS ha sido aplicado exitosamente en la detección de las micotoxinas de *Alternaria* en sustratos tales como hierbas, vino, granada y jugo de granada (Wang y *col.*, 2014; Pizzutti y *col.*, 2014; Myresiotis y *col.*, 2015).

Hay numerosos métodos cromatográficos disponibles para la detección y cuantificación de micotoxinas, los trabajos de Ostry (2008) y Turner y *col.*, (2009) describen en detalle el uso de estas metodologías. En particular para las micotoxinas producidas por *Alternaria* se ha utilizado cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Debido a que GC requiere derivatización, la técnica de HPLC resulta más adecuada para el análisis de compuestos polares como las micotoxinas (Pavón y *col.*, 2012; Vackavik y *col.*, 2010). La detección de los productos separados ha sido lograda mediante detección por fluorescencia (FD), por luz ultravioleta (UV), espectrometría de masa sola (MS) o tándem MS (MS/MS) (Ostry y *col.*, 2008; EFSA, 2011).

Debido a su selectividad y especificidad, la cromatografía líquida acoplada a un detector masa-masa (LC-MS/MS) es actualmente, el método más aplicado para el análisis de micotoxinas. La nueva generación de instrumentos analíticos permite analizar múltiples toxinas en una corrida, sin limpieza previa, reduciendo de esa manera el tiempo de análisis. Alternariol y AME, fueron las primeras toxinas de *Alternaria* incluídas en estos métodos multi-micotoxinas. Más recientemente, otras micotoxinas de *Alternaria* han sido integradas a los

mismos (Varga y col., 2013). Recientemente, se han desarrollado algunos métodos para el análisis de micotoxinas de *Alternaria* en productos a base de tomate (Noser y col., 2011) y cereales (Walravens y col., 2014). Debido a su pobre comportamiento cromatográfico, ATe presenta un límite de detección mayor que el de las otras micotoxinas de *Alternaria*. Para mejorar esto, se ha realizado su derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (Siegel y col., 2009), mostrando un límite de detección 20 a 30 veces menor. El uso de ionización química por presión atmosférica (APCI) también ha sido utilizado, mejorando la señal de ATe al menos un factor comparado con la ionización por electrospray (Prelle y col., 2013). Recientemente, Fan y col. (2016) desarrollaron un método de pre-tratamiento basado en una cromatografía contracorriente modificada con líquido iónico, para el enriquecimiento y limpieza de trazas de AOH, AME y ATe en vino y jugo, previo al análisis por HPLC, logrando excelente eficiencia del mismo.

En general, entre los factores limitantes para el análisis de las micotoxinas de *Alternaria*, se encuentran la eficiencia de la limpieza de la muestra, la disponibilidad de suficientes cantidades de estándares y la falta de materiales de referencia para alimentos para animales y productos alimenticios humanos. En algunos casos inclusive, la estandarización y la validación de la exactitud de los métodos analíticos, no se ha realizado (Lee y col., 2015).

I.3.2 Incidencia natural de las micotoxinas de *Alternaria* en alimentos

Al presente, no existen regulaciones internacionales o exclusivas de la Unión Europea acerca de las toxinas de *Alternaria* en productos alimenticios (López y col., 2016)

Numerosos trabajos han sido publicados sobre la incidencia natural de las micotoxinas producidas por las especies del género *Alternaria* en diversos sustratos (Bottalico y Logrieco, 1998; Scott, 2001; Ostry, 2008; Fernández-Cruz y col., 2010). Estos trabajos muestran que AOH, AME y ATe han sido las micotoxinas más frecuentemente evaluadas en distintos países (Logrieco y col., 2009). Se ha observado incidencia natural de estas micotoxinas en manzanas,

mandarinas, aceitunas, pimientos, tomates, semillas de girasol, sorgo, trigo (Scott, 2001; Ostry, 2008) y aceites comestibles (de oliva, colza, sésamo, girasol) (Kocher, 2007).

En el año 2011, el panel de la autoridad europea en inocuidad alimentaria (EFSA) CONTAM publicó su opinión sobre el riesgo para los animales y la salud pública en relación a la presencia de toxinas de *Alternaria* (AOH, AME, ATe, iso-ATe, ATXs, TEN, ALT, AAL) en piensos y alimentos (EFSA, 2011). De acuerdo a esta revisión, se recolectaron 1.150 datos de ocurrencia en alimentos, sólo de la literatura. Las mayores concentraciones de AOH, AME, ATe y TEN fueron encontradas en el grupo de alimentos “legumbres, nueces y aceites de semilla” y en particular en las semillas de girasol. En función de los datos publicados de incidencia natural de micotoxinas de *Alternaria* en cerca de 300 muestras de piensos y productos agrícolas en Europa, AOH se encontró en 31% de las muestras en concentraciones que variaron entre 6,3 a 1840 µg/kg (con el máximo encontrado en semillas de girasol). Alternariol monometil éter fue encontrado en el 6 % de las muestras con niveles que variaban entre 3 hasta 184 µg/kg (máximo encontrado en cereales). Altenueno fue encontrado en 73 % de las muestras en concentraciones que variaban desde 6,3 hasta 41 µg/kg (máximo encontrado en granos de trigo). Por último, ATe estuvo presente en el 15 % de las muestras con niveles variables entre 500 a 4310 µg/kg (máximo encontrado en nueces). No obstante, EFSA advirtió numerosas limitaciones en la revisión llevada a cabo. La mayoría de los estudios de ocurrencia de las toxinas de *Alternaria* reportaron grandes concentraciones de toxinas en alimentos con contaminación fúngica visible, los cuales no son apropiados para el consumo humano, por lo que esos datos no serían útiles para una evaluación de riesgo. La mayoría de los datos aportados pertenecían a granos y subproductos, muy pocos a frutas y vegetales y ninguno a vinos o piensos. Fue escasa la información aportada acerca de las toxinas de *Alternaria* durante el procesamiento. Como resultado, el estudio de riesgo llevado a cabo por EFSA en el 2011, fue inconcluso.

En respuesta a ello, el comité permanente de la cadena de alimentos y salud animal, identificó las toxinas AOH, AME, ATe, TEN y ALT como relevantes y recomendó que se recolecte información de la incidencia de las mismas en productos alimenticios mediante estudios a nivel nacional. En consecuencia, recientemente en Holanda se llevo a cabo un estudio, donde se detectó AOH, AME, ATe y TEN en uno o más productos alimenticios, mientras que ALT no fue encontrado en ninguna de las muestras. El ácido tenuazónico se encontró en 27 % de las muestras en altas concentraciones en cereales, salsas de tomate, higos, vino y semillas de girasol y en baja incidencia en manzanas, cítricos, tomates y aceitunas (Lopez y *col.*, 2016). Este tipo de estudios aportan información EFSA y permitirán realizar una evaluación del análisis de riesgos, en pos de definir la legislación requerida.

I.4 Levaduras

I.4.1 Taxonomía e Identificación de levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión y pueden o no formar esporas. También pueden constituir sólo una etapa en el ciclo de vida de un hongo filamentoso (Kurtzman y Fell, 1998).

El primer nivel de clasificación de las levaduras se basa en aspectos de la sexualidad de las mismas, las levaduras representan los taxones Ascomycotina y Basidiomycotina (hongos perfectos) y Deuteromycotina u hongos imperfectos, sin fase sexual. Las subdivisiones taxonómicas menores (familias, subfamilias, géneros, especies y cepas) se basan en diversos criterios morfológicos, fisiológicos y genéricos, incluyendo la reproducción sexual (Kurtzman y Fell, 1998).

Los ascomicetes (filo Ascomycota) constituyen una división monofilética del Reino Fungi. Son hongos con micelio tabicado que producen ascosporas endógenas y constituyen la división (filo) más grande del Reino Fungi. Pueden ser unicelulares o talófitos. La reproducción puede ser de dos tipos: asexual, por esporas exógenas (conidios), y sexual, por esporas endógenas (ascosporas). De ellos derivan los Deuteromicetes, que han perdido, o se desconoce, su

reproducción sexual. Dentro de esta división se encuentran las clases Euascomycetes y Hemiascomycetes, siendo esta última la que contiene al Orden Saccharomycetales (Endomycetales) al cual pertenece el género de levadura *Saccharomyces*. Otros géneros de levadura pertenecientes a esta división asociados normalmente con viñedos, mostos, vinos y ambientes de bodega son *Hanseniaspora/ Kloeckera*, *Dekkera/ Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* (Pretorius y col., 1999).

Los basidiomicetes (filo Basidiomycota) son una división del Reino Fungi que incluye a los hongos que producen basidios con basidiosporas. Esta división es la más evolucionada y contiene a numerosos y variados tipos de hongos. La reproducción puede ser asexual (llevada a cabo por conidios) y sexual. Este filo alberga tres Clases: Ustilaginomycetes, Uredinomycetes e Hymenomycetes. Los géneros de levadura pertenecientes a esta división que están asociados a la vinificación son *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (Pretorius y col., 1999).

Tradicionalmente, la identificación clásica de especies de levaduras basada en numerosas pruebas morfológicas y fisiológicas resulta un proceso complejo que requiere demasiado tiempo (Kreger-van Rij, 1984; Barnett y col., 2000). Asimismo, esta metodología convencional puede en algunos casos conducir a resultados imprecisos (Smith, 1998). Diversos estudios moleculares demuestran incongruencias con las pruebas fisiológicas, presentando variaciones en los perfiles de fermentación y asimilación como en las características morfológicas entre cepas de una misma especie (Kurtzman y Phaff, 1987). Nuevas técnicas de identificación, principalmente basadas en las secuencias de ácidos nucleicos, son empleadas actualmente por ser más confiables y discriminantes para la caracterización de especies. Uno de los métodos moleculares más exitosos para la identificación de especies de levaduras es el basado en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen 5,8S del ARNr y las secuencias internas transcritas (ITS). Se ha demostrado que la técnica PCR-RFLP puede ser una herramienta rápida, confiable y precisa para la identificación de levaduras de diversos nichos ecológicos (Guillamon y col., 1998; Esteve-Zarzoso y col., 1999). Otra técnica molecular ampliamente utilizada

por su eficiencia en la asignación de especies de levaduras es la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S del ARNr (Kurtzman y Robnett, 1998). En los últimos años, se desarrollaron nuevas tecnologías de secuenciación consideradas de alto rendimiento como la secuenciación 454 o Illumina que permiten identificar y caracterizar la diversidad de levaduras directamente a partir de muestras de uva o vino sin requerir el cultivo de estos microorganismos (Bokulich y col., 2014). Estas técnicas presentan como principal ventaja que permiten estudiar el metagenoma de una determinada muestra, logrando identificar casi la totalidad de especies presentes en la muestra.

I.4.2. Levaduras epífitas de uva

Los granos de uva son la principal fuente de levaduras, albergando una población de entre 10^2 y 10^4 células por gramo. Estas levaduras juegan un rol importante en la calidad de la uva previa a la cosecha, así como a través del proceso de vinificación (Fleet y col., 2002). Estudios previos han indicado que los géneros *Aureobasidium* (hongo tipo-levadura), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issanchenkia*, *Kluveromyces*, *Metchnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces* son los más frecuentemente aislados de uva (Sabate y col., 2002; Fleet y col., 2002; Prakitchaiwattana y col., 2004; Combina y col., 2005; Raspor y col., 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Chavan y col., 2009). No obstante, la principal responsable de la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*, es raramente aislada de muestras de grano de uva (Mortimer y Polsinelli, 1999). Barata y col. (2012) en pos de explicar la gran variabilidad de levaduras halladas en uva en los diferentes estudios, propusieron ubicarlas junto con algunas bacterias ácido lácticas y ácido acéticas del mismo nicho en lo que denominaron el consorcio microbiano del vino (CMV). El CMV subsecuentemente, fue dividido en 3 grandes grupos con características fisiológicas particulares y comportamiento similar en uva, siendo el balance entre los mismos producto de la disponibilidad de nutrientes en la superficie de la uva. El primer grupo,

denominado oligotrófico, compuesto por levaduras basidiomicetes oxidativas, el hongo tipo-levadura *Aureobasidium pullulans* y bacterias ácido lácticas, está caracterizado por especies favorecidas en un medioambiente pobre en nutrientes, como el de las uvas “verdaderamente sanas”. El segundo grupo, denominado copiotrófico, compuesto por levaduras ascomicetes oxidativas (algunas *Candida* spp.), apiculadas débilmente fermentativas (*Hanseniaspora* spp.), formadoras de films (*Pichia* spp) y fermentativas (*Candida zemplinina*, *Metchnikowia* spp.), se incrementaría durante la madurez de la uva, ya que depende de la liberación de algunos nutrientes inclusive en uvas visualmente intactas. El tercer grupo, denominado también copiotrófico, está compuesto por levaduras fuertemente fermentativas (*Saccharomyces* spp., *Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp. y *Pichia* spp.) y bacterias ácido acéticas aerobias obligadas y su proliferación se explicaría debido a una gran disponibilidad de nutrientes, resultante directo de un daño en la uva.

La composición de la comunidad microbiana de la uva se encuentra influenciada por múltiples factores: variedad y grado de madurez de la uva (Rementeria y col., 2003; Renouf y col., 2005; Martins y col., 2012), climatología y estado sanitario (Barata y col., 2012), así como el uso de productos fitosanitarios (Comitini y Ciani, 2008; Martins y col., 2012) e interacciones levadura-levadura, levadura-bacteria y levadura-hongo (Fleet, 2003). Así también cada región presenta una microbiota característica de acuerdo al área en la que se encuentran localizados los viñedos (Riberau-Gayon y col., 2000).

La fruta inmadura tiene un conteo microbiano extremadamente bajo. A medida que la uva madura, la población de levaduras aumenta. Estudios mediante microscopía electrónica han revelado que las levaduras se encuentran localizadas en aquellas áreas de la superficie de uva donde puede escaparse algo de jugo y están embebidas en una secreción pegajosa de la misma (Fleet y col., 1999). Un estudio reciente llevado a cabo por Martins y col (2014), confirmó estos hallazgos encontrando un incremento en la población de levaduras y poblaciones tipo-levadura durante el proceso de maduración de la uva, en paralelo al aumento de contenido de azúcar en la baya.

El estado fitosanitario de la uva también es un factor muy importante en la ecología microbiana, pudiendo incrementar los conteos microbianos y la diversidad de especies (Barata y *col.*, 2012). Las uvas dañadas, rápidamente desarrollan poblaciones de 10^6 - 10^8 UFC/g y contienen altas poblaciones de hongos filamentosos y bacterias acéticas.

Con respecto a los tratamientos fitosanitarios, numerosos estudios revelaron una disminución en la comunidad de levaduras epífita de uva (Comitini y Ciani, 2008; Cadez y *col.*, 2010; Cordero-Bueso y *col.*, 2011; Grube y *col.*, 2011; Schmid y *col.*, 2011). Recientemente, en un estudio realizado por Martin y *col.* (2014), se encontró que el conteo de levadura fue significativamente mayor para uvas cultivadas bajo tratamiento orgánico que para aquellas sometidas a tratamiento convencional (con diversos herbicidas, insecticidas, miticidas y fungicidas), mientras que el contenido de cobre fue mayor en estas últimas. Por lo que las diferencias en la densidad de la población microbiana se atribuyeron a los tratamientos con fungicidas a base de cobre, que inhibirían esta comunidad de microorganismos.

La microbiota natural de uva y mosto puede servir como fuente de inóculo de levaduras deseables y/o microorganismos de deterioro. Los efectos potenciales de esta microbiota en la naturaleza de la fermentación y sobre todo en la calidad e inocuidad del producto final hacen importante contar con un conocimiento profundo acerca de los microorganismos presentes en superficie de uva para vinificar.

I.4.3 Levaduras como posibles agentes de control biológico de hongos filamentosos en uvas para vinificar

El control del crecimiento fúngico en uvas para vinificar es un tema clave en la elaboración de vino. La producción de micotoxinas fúngicas en uva y su posible traspaso al vino, es un asunto que no ha sido adecuadamente tratado hasta el momento. Actualmente, la adición de fungicidas orgánicos y/o químicos es utilizada como una herramienta de rutina para el control de organismos que atacan a la vid pudiendo también bajo ciertas condiciones propicias atacar su

fruto como *U. necator*, *P. viticola*, *Botrytis cinerea* y *Stereum necátor*. Sin embargo, la acción de estos tratamientos sobre otras poblaciones fúngicas no está del todo clara. No obstante, el desarrollo de resistencia fúngica a estos compuestos y hasta la posibilidad de efectos estimulantes sobre la producción de micotoxinas por cepas toxigénicas, han sido reportados (Moss y col., 1991; Dalcero y col., 1995, Ramirez y col., 2004). Los residuos de estos fungicidas también influyen en la ecología de las levaduras responsables de la fermentación alcohólica (Cabras y col., 1999; Cabras y Angioni, 2000). Asimismo, la preocupación pública sobre los residuos químicos en la comida y el ambiente han llevado a la aplicación de estrictas políticas regulatorias en su uso, incrementado el interés por métodos alternativos, como el control biológico (Heydari y Pessarakli, 2010). El control biológico está definido como la inhibición del crecimiento, infección y reproducción de un organismo usando otro organismo (Baker, 1987; Cook, 1983). El control biológico de hongos filamentosos contaminantes con especies de levaduras antagonistas seleccionadas ha sido una iniciativa interesante desde sus comienzos (Chaluzt y Droby, 1998; Suzzi y col., 1995; Guinebretiere y col., 2000; Fleet, 2003).

Las levaduras presentan la ventaja de colonizar las superficies de planta o heridas durante largos períodos y condiciones secas. En particular, las levaduras epífitas de uva para vinificar, como componentes mayoritarios adaptados fenotípicamente a este nicho, serían capaces de colonizar más efectivamente y competir por los nutrientes y el espacio, logrando de esta manera una mayor capacidad para de control biológico de hongos filamentosos en el mismo ecosistema (Suzzi y col., 1995).

Schena y col. (1999) demostraron la actividad antagonista de aislados de *A. pullulans* contra *Aspergillus niger* en uvas, así como su actividad inhibitoria contra *B. cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Zahavi y col. (2000), reportaron que *Candida guilliermondii* fue efectiva en reducir la incidencia de podredumbre causada por *B. cinerea*, *R. stolonifer* y *Aspergillus* del agregado *A. niger*. Sipiczky y col. (2006) encontraron cepas de *Metchnikowia pulcherrima* aisladas de uvas contaminadas con *B. cinerea* mostraban una buena capacidad antagonista contra

este patógeno. De igual modo, Guzzon y col. (2014) reportaron cepas de levadura de las especies *Issatchenkia terricola*, *Metchnikowia sinensis* y *Hanseniaspora opuntiae*, aisladas de uvas utilizadas en la producción del tradicional “Vino Santo” italiano mostraban capacidad para biocontrolar *B. cinérea*.

El control biológico también ha sido propuesto como una herramienta útil para reducir el impacto de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina en los viñedos. Cepas de *Issatchenkia orientalis*, *M. pulcherrima*, *I. terricola* y *Candida incommunis*, aisladas de la flora epífita de bayas de uva de la variedad Negroamaro, fueron capaces de disminuir la colonización de las uvas por *A. carbonarius* y *A. niger* (Bleve y col., 2006). Así también, dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* mostraron capacidad de controlar el crecimiento de *A. carbonarius* y de especies de *Aspergillus* del agregado *A. niger* y la acumulación de OTA. Los efectos inhibitorios observados dependieron de la especie productora de OTA involucrada, las cepas de levadura utilizadas, la a_w y la temperatura y todas sus interacciones (Ponsone y col., 2011). Por otro lado, se ha reportado una cepa de *S. cerevisiae* capaz de reducir la biosíntesis de OTA en un medio sintético en base a mosto y de inhibir el crecimiento del agente productor, *A. carbonarius* (Cubaiu y col., 2012). Además, Kapetanakou y col. (2012) observaron la inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* y la consecuente inhibición de la producción de OTA, mediada por bacterias y compuestos de levadura en medio de cultivo. Ninguno de los compuestos bacterianos inhibió el crecimiento de *A. carbonarius*, pero si disminuyeron la producción de OTA (de 2 a 25 %). Los compuestos de levadura, a una concentración de 10^5 UFC/mL, inhibieron eficientemente el crecimiento fúngico y produjeron la mayor disminución del contenido de OTA (más del 65 %).

También se han realizado estudios con levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas, para el control de diversos patógenos de planta o uva de mesa. Suzzi y col. (1995) observaron que levaduras naturales del vino aisladas de baya de uva poseían actividad biocontroladora contra hongos patógenos de planta (*A. niger*, *A. alternata*, *Botrytis squamosa*, *Cladosporium variable*, *Colleotrichum*

acutatum, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *P. digitatum*, *P. longicola*, *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotium* y *Trichoderma viride*). Dos cepas de *S. cerevisiae* y una de *Zygosaccharomyces* resultaron los antagonistas más prometedores. Asimismo, entre levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas en Argentina, se encontraron 16 levaduras antagonistas de *B. cinerea* (15 *S. cerevisiae* y 1 *Sch. Pombe*) en uvas de mesa (Nally y col., 2012) y 43 levaduras antagonistas (14 *S. cerevisiae*, 1 *Saccharomyces chevalieri*, 1 *Saccharomyces kluyveri*, 4 *Candida sake*, 2 *Candida catenulata*, 1 *Candida famata*, 1 *Candida rugosa*, 1 *Candida versatilis*, 2 *Dekkera vanriijiae*, 2 *Dekkera anomala*, 1 *I. orientalis*, 2 *Kluveromyces marxianus*, 2 *Pichia membranifaciens*, 1 *Sporobolomyces roseus*, 8 *Torulasporea delbrueckii*) de alguno de los hongos componentes del complejo de podredumbre ácida en uvas de mesa (*Aspergillus caelatus*, *A. carbonarius*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *F. oxysporum*, *Penicillium comune*, *R. stolonifer* y *Ulocladium* sp.) (Nally y col., 2013).

En cuanto al uso del control biológico en condiciones de campo, resulta interesante el trabajo desarrollado por Dimakopoulou y col. (2008) quienes aislaron levaduras de la filosfera de hojas de vid y seleccionaron *in situ* (bayas de uva separadas) levaduras con habilidad de disminuir el crecimiento de *A. carbonarius* (causante de la pudrición ácida), resultando la levadura antagonista más efectiva una cepa de *A. pullulans*. La misma fue ensayada acampo en 2 variedades de uvas tintas, uvas Grenache, Rouge y Agiorgitiko localizadas en distintos viñedos de Grecia. El uso de la levadura resultó igualmente efectiva que el fungicida fludioxonil + cyprodinil para reducir la infección por podredumbre ácida, la presencia de *A. carbonarius* en uvas al tiempo de cosecha y la contaminación de OTA en mosto.

Se ha demostrado que la eficacia del agente de biocontrol puede variar dependiendo del nivel de inoculo del patógeno y las condiciones ambientales locales (O'Neill y col., 1996). Si la concentración del propágulo del patógeno se incrementa, la concentración de la levadura antagonista también debe incrementarse para mantener el nivel original del control de la enfermedad (Janisiewicz, 1987). Esto subraya la importancia de mantener buenas prácticas

sanitarias en el campo para reducir el nivel de inoculo en la suspensión de tratamiento.

Es importante destacar que en el mercado, ya se han desarrollado varios productos basados en levaduras antagonistas para el control de enfermedades post-cosecha de uvas, frutos de pepito y cítricos como Aspire (Ecogen, Inc., Langhore, PA) con la levadura antagonista *Candida oleophila* (Droby y col., 1993,1998), Yieldplus (Anchor yeast, Cape town) basado en *Cryptococcus albidus* (De Koch, 1998) hecho y registrado en el sur de África y Shemer (Agrogreen, Asgdod) basado en *M. fructicola* (Kurtzman y Droby 2001; Karabulut y col., 2002 y 2003) hecho y registrado en Israel.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II. 1. HIPÓTESIS

Existe una población de hongos filamentosos con potencial toxicogénico en uvas Malbec de la DOC San Rafael y cepas de levaduras características del mismo ecosistema capaces de biocontrolarlos. Las uvas Malbec usadas para vinificación en Argentina presentan contaminación con toxinas de *Alternaria*.

II.2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la población de hongos filamentosos en uvas Malbec de la DOC San Rafael con especial interés en aquellos con potencial toxicogénico y estudiar su interacción con levaduras del mismo ecosistema, con el objeto de identificar cepas con capacidad de biocontrolarlos. Evaluar la incidencia natural de toxinas de *Alternaria* en uvas Malbec de la DOC San Rafael.

II.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael
- 2) Identificar a nivel de especie aislados pertenecientes al género *Alternaria* a través del uso de marcadores morfológicos y moleculares
- 3) Caracterizar el potencial micotoxicogénico y patogénico de las especies de *Alternaria* identificadas
- 4) Optimizar la metodología analítica para la detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas
- 5) Determinar la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec cosechadas en la región vitivinícola DOC San Rafael
- 6) Evaluar el efecto de factores abióticos sobre el crecimiento y la producción de toxinas por *Alternaria alternata*
- 7) Aislar e identificar levaduras y organismos tipo levadura del ecosistema de uvas Malbec de la DOC San Rafael

- 8) Seleccionar levaduras y organismos tipo levadura del mismo ecosistema con capacidad de biocontrol de *Alternaria* en uva

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Evaluación de la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

III.1.A Medio de cultivo y soluciones

Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC): glucosa 10 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g; cloranfenicol 0,001 g; dicloran 0,002 g; rosa de bengala 0,0025 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Agar Czapek extracto de levadura (CYA): sacarosa 30 g; K_2HPO_4 1 g; extracto de levadura 5 g; Czapek concentrado 10 mL; solución de elementos trazas 1 mL; agar 15 g; agua destilada 1000 mL; pH final del medio: 6,7. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Czapek concentrado: NaNO_3 30 g; KCl 5 g; MgSO_4 (7 H_2O) 5 g; FeSO_4 (7 H_2O) 0,1 g; agua destilada 100 mL.

Solución de elementos trazas: CuSO_4 (5 H_2O) 0,5 g; ZnSO_4 (7 H_2O) 1 g; agua destilada 100 mL. No necesita esterilización.

Solución stock de rosa de bengala: se disolvieron 25 mg de rosa de bengala en 30 mL de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.

Solución stock de dicloran: 200 mg de dicloran se disolvieron en 100 mL de etanol 95%.

Solución stock de cloranfenicol: se disolvieron 250 mg de cloranfenicol en 100 mL de etanol 95%.

III.1.1 Muestreo

Para evaluar la microbiota presente y la influencia de distintas prácticas de control de rutina vitivinícolas en los viñedos, se realizaron 2 experimentos en un viñedo Malbec de la estación experimental INTA- Rama Caída (lat. 34.7° S, long. 68.4° O, altitud 750 m), perteneciente a la DOC San Rafael (Mendoza, Argentina) uno durante la vendimia 2010/2011 (2011) y el otro 2011/2012 (2012). El diseño experimental consistió en seis bloques distribuidos al azar en 3 filas de vides, cada bloque estuvo constituido por 4 plantas. En 3 de ellos se aplicó un tratamiento orgánico que consistió en 3 pulverizaciones (Enero, Febrero y Marzo) con 3 g/L de oxiclورو de cobre y 3 g/L de azufre (tratamiento orgánico) y los 3 restantes se mantuvieron sin tratar. Se tomó una muestra independiente a tiempo de cosecha de cada bloque (3 muestras independientes por tratamiento) compuesta por 3 racimos recolectados a aproximadamente 1.5 m del suelo de 3 de las 4 plantas presentes en cada bloque (un racimo por planta).

Durante la vendimia 2012/2013 (2013), se tomaron muestras de 6 viñedos Malbec sometidos a tratamientos orgánico y no-orgánico, localizados en los distritos: Cuadro Nacional (A), Las Paredes (B) y (F), Rama Caída (C), Cuadro Benegas (D) y Cañada Seca (E), representando la DOC San Rafael (Fig. 7). El área geográfica total elegida para muestrear estuvo comprendida entre las latitudes 34.3° y 34.8° S, longitudes 67.4° y 68.5° O y entre los 500 y 800 m de altitud. Los 6 viñedos fueron tratados con oxiclورو de cobre y azufre como se describió previamente, pero en 2 de ellos (B y E) la primera pulverización (Enero) fue realizada con una suspensión de 2,1 g/L de un polímero de ditiocarbamato manganeso con sal de zinc (Mancozeb 80 % p/p), un fungicida (tratamiento no-orgánico). Se tomó una muestra independiente a tiempo de cosecha de cada viñedo (4 muestras para el tratamiento orgánico y 2 para el no-orgánico) compuesta por 9 racimos recolectados a aproximadamente 1,5 m del suelo de 9 plantas distribuidas homogéneamente en el viñedo (un racimo por planta).

Durante las vendimias 2011, 2012 y 2013, se recolectaron un total de 18 muestras

(6 muestras por vendimia) las cuales se colocaron en bolsas plásticas y fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio para ser procesadas.

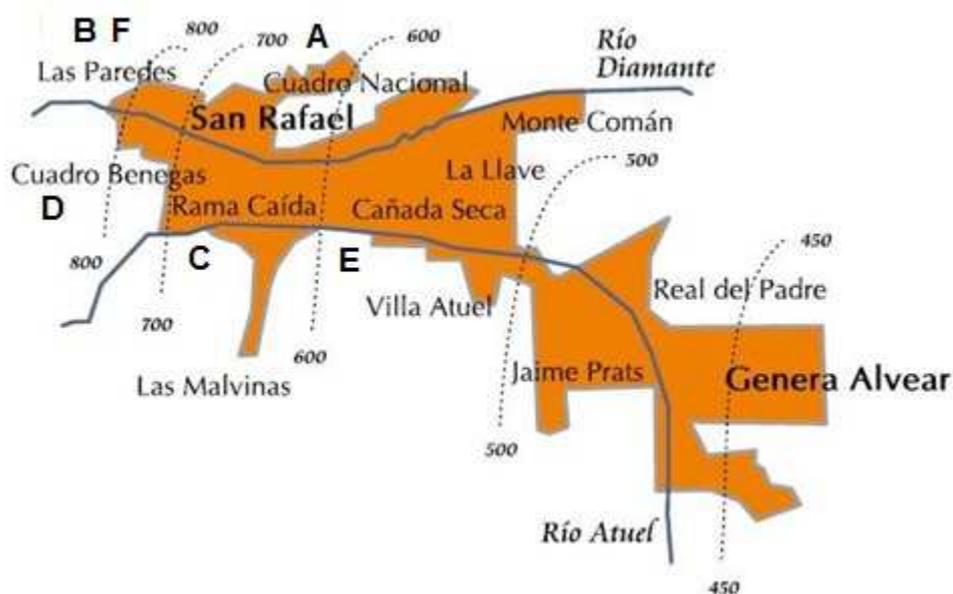


Figura 7: Muestreo realizado durante la vendimia 2013 en la región vitivinícola DOC San Rafael, comprendió viñedos de los distritos: Cuadro Nacional (A), Las Paredes (B) y (F), Rama Caída (C), Cuadro Benegas (D), Cañada Seca (E).

III.1.2 Recuento y aislamiento de los diferentes géneros fúngicos

El aislamiento de los distintos géneros fúngicos componentes de la microbiota de uvas Malbec se realizó por el método de siembra directa. Se seleccionaron al azar, de cada muestra, uvas Malbec que no presentaban síntomas visibles de infección fúngica. Las mismas fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) por 1 min y posteriormente fueron lavadas con agua estéril (3 veces). Se utilizaron un total de 15, 30 y 90 uvas por muestra en las vendimias 2011, 2012 y 2013 respectivamente. Las uvas, fueron colocadas sobre la superficie de placas de Petri conteniendo el medio DRBC, a razón de 5 por placa, dando un total de 3, 6 y 18 placas por muestra en las vendimias 2011, 2012 y 2013 respectivamente. Posteriormente fueron incubadas a 25 °C por 7 días.

Las colonias desarrolladas se observaron macroscópica y microscópicamente. La identificación a nivel de género se realizó de acuerdo a las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1990), Pitt y Hocking (2009) y Samson y col. (2004).

Las colonias fúngicas resultantes de cada muestra fueron enumeradas y agrupadas de acuerdo a su morfología para obtener la abundancia relativa (%) de cada género distinguible o densidad relativa (DR%), calculada de la siguiente manera (González y col., 1996):

$$\frac{N^{\circ} \text{ de aislados de un género} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de aislados}}$$

N° total de aislados

En la vendimia 2013 el nivel de contaminación de las muestras con los distintos géneros se expresó como porcentaje de uvas infectadas (%).

Un número representativo de colonias pertenecientes al género *Alternaria* (que resultó ser el más abundante y con mayor porcentaje de infección de acuerdo a la vendimia analizada) fueron seleccionadas al azar. Las mismas fueron transferidas al medio CYA e incubadas a 25 °C y cuando se observó un buen crecimiento de los cultivos se almacenaron a 4 °C hasta su posterior identificación a nivel de especie.

III.1.3 Análisis estadístico

Los datos de abundancia relativa de los distintos géneros fúngicos y el porcentaje de uvas infectadas se analizaron con ANOVA seguido por el test de LSD Fisher ($p < 0.05$ o $p < 0.01$), en algunos casos se utilizó la tabla de contingencias. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y STATGRAPHICS Plus 5.1.

III.2 Identificación de las especies de *Alternaria* aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares

III.2.A Medio de cultivo y soluciones

Agar agua (AA): agar 15 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Agar papa dextrosa (PDA): papa 250 g; glucosa 20 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL. Las papas con cáscara se lavaron, se cortaron en trozos, y se hidrataron con 500 mL de agua, se hirvieron en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Se filtró el caldo con las papas a través de una gasa y se adicionó el agar. La pulpa de la papa se homogeneizó para obtener un puré y posteriormente se adicionó al caldo y el agar, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 mL). Se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Agar papa zanahoria (APZ): papa 20 g; zanahoria 20 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL. Las papas y las zanahorias con cáscara se lavaron, se cortaron en trozos, y se hidrataron con 500 mL de agua, se hirvieron en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Se filtró el caldo con las papas y las zanahorias a través de una gasa y se adicionó el agar. La pulpa de la papa y la zanahoria se homogeneizó para obtener un puré y posteriormente se adicionó al caldo y el agar, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 mL). Se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Medio de cultivo V8: Jugo vegetal con tomate, zanahorias, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro y espinaca (jugo V8 -Campbells) 175 mL; CaCO₃ 3 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Medio Wikerman: glucosa 40 g; peptona 5 g; extracto de levadura 3 g; extracto de malta 3 g; agua destilada 1000 mL. Se fraccionó el volumen (50 mL) en

frascos Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C.

Buffer de extracción: 2 % CTAB, 100 mM Tris-ClH (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl. Se mezclaron todos los componentes y se le adicionó aproximadamente 350 mL de agua bidestilada mientras se agitó hasta que la solución se tornó transparente. Se ajustó el volumen a 500 mL con agua bidestilada y se conservó a 65 °C (no fue necesario esterilizar).

III.2.1 Identificación utilizando marcadores morfológicos

Se clasificaron a nivel de especie un total de 38 aislados con características morfológicas del genero *Alternaria* (vendimias 2011 y 2012). De cada aislado se procedió a realizar un cultivo monosporico. A tal fin se tomó una pequeña cantidad superficial de micelio y se preparó una suspensión en 10 mL de agua destilada estéril. Se vertieron los 10 ml de la suspensión sobre una placa de Petri con medio AA y se diseminó la suspensión por rotación para que las esporas se fijaran al agar, descartándose el resto de agua. Las placas de Petri se incubaron inclinadas (aprox. 45°) durante 16 hs a 25 °C. A partir de dichas placas se aislaron esporas (usando una lupa estereoscópica) y se realizaron siembras monospóricas en el medio CYA. Los cultivos se incubaron a 25 °C bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (8/16 hs) por 7 días. Finalizado el período de incubación los cultivos se transfirieron a los medios de cultivo recomendados para la identificación de las especies de *Alternaria*: APZ y V8 (Simmons, 2007). Los cultivos se incubaron bajo ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad (8/16 horas) a 22 °C para inducir la formación de los patrones de esporulación característicos. La identificación a nivel de especie se realizó según la metodología propuesta por Simmons (2007) en base a los patrones de esporulación y la morfología de sus conidios (Tabla 2).

Tabla 2: Características morfológicas evaluadas para la identificación de *Alternaria*.

Macroscópicas	Microscópicas	
	conidióforos	Conidios
-diámetro de la colonia	-elongación	-tamaño, color, textura y forma
-color	-morfología	-número de conidios por cadena
-reverso de la colonia	-conidiogénesis	-Número y tipo de septo
-textura		-posición del conidio en los conidióforos o en las cadenas
		-ornamentación
		-presencia o ausencia de cadenas
		-ramificación

Una vez identificadas a nivel de especie las cepas fueron conservadas en una solución de glicerol al 15 % a -20 °C.

III.2.2 Identificación utilizando marcadores moleculares

III.2.2.1 Cepas fúngicas

Para la identificación molecular se evaluaron las 38 cepas previamente aisladas e identificadas como *A. alternata* utilizando marcadores morfológicos. Todas las cepas utilizadas en este estudio se conservaron en una suspensión de glicerol al 15 % a -20 °C, a partir de la cual los cultivos se recuperaron en el medio CYA y fueron incubados bajo ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad (8/16 hs) a 25 °C durante 7 días.

III.2.2.2. Producción de la biomasa fúngica

A partir de las cepas desarrolladas en el medio CYA se realizó una suspensión de esporas en una solución de 0,1 % de Tween 20 de cada una y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 50 mL de medio Wikerman. Los cultivos se incubaron a 25 °C durante 4 a 5 días en un agitador orbital (120 rpm). El micelio fue cosechado por filtración (filtros Ken AG Ashland, Ohio), se lavó

con agua destilada estéril y se secó entre papeles absorbentes. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

III.2.2.3. Extracción, purificación y cuantificación del ADN

El micelio congelado de cada una de las cepas se pulverizó en morteros con nitrógeno líquido y se distribuyó en microtubos plásticos de 1,5 mL de capacidad. El ADN fue extraído con buffer de extracción siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). A los micelios congelados de cada una de las cepas en estudio (aprox. 1,5 a 2 g) se le adicionó 700 µl de buffer de extracción (a 65 °C) y 7 µl de 2-mercaptoetanol y se incubaron a 65 °C durante 30 min. Luego del periodo de incubación, se agregó 300 µl de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1, v/v), se agitó la mezcla durante 2 a 3 min. en vórtex y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se tomó 600 µl de la fase acuosa y los ácidos nucleicos crudos se precipitaron con un volumen igual de isopropanol y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se disolvió en 500 µl de buffer TE 1X (pH 8,0). Una vez que los pellets estuvieron completamente disueltos se adicionó 200- 300 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1, v/v/v) y se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm durante 5 min. La fase acuosa (aproximadamente 500 µl) fue tratada con 1 µl de ARNsa A (2 mg/mL) e incubada a 37 °C durante 30 min. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 500 µl de isopropanol y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. Una vez que los pellets estuvieron completamente secos, se lavaron 2 ó 3 veces con 1 mL de etanol frío al 70 % y se secaron a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min. Finalmente, se resuspendieron en 50 µl de buffer TE 1X y se conservaron las muestras a -20 °C hasta el momento de usarse en los siguientes análisis.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind* III (New England, BioLabs, Inc.) como ADN testigo. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % para corroborar su integridad. Se realizaron las diluciones correspondientes

en agua bidestilada hasta obtener una concentración de 100 ng en un volumen final de 10 µl para realizar las reacciones de PCR.

III.2.2.4. Reacciones de PCR

Para la identificación de los grupos especies de *Alternaria* se utilizó la metodología propuesta por Pavón y col. (2010). Las amplificaciones se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una mezcla de 25 µl que contenía 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (2mM); 1X buffer PCR (50 Mm KCl, 10 mM Tris-ClH a pH 8,3); 10 pmol de cada uno de los cebadores que integran el par seleccionado (Tabla 3); 10-25 ng de ADN genómico, 1U de Taq ADN polimerasa (Taq polymerase, Invitrogen, Brazil).

Tabla 3: Secuencia de los cebadores específicos utilizados en la determinación los diferentes grupos especies de *Alternaria*.

	Secuencia del cebador (5'-3')	T° de annealing (°C)	Tamaño del producto	Identificación
Dir5cAlta1 Inv4Alta1	GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT CGCGGCAGTAGTTGGGAA	55	195	Género <i>Alternaria</i>
AaltDAlta1 AinfIAlta1	CGCATCCTGCCCTGTCA GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC	65	118	<i>A. alternata</i> *
AinfDAlta1 AinfIAlta1	CGCATCCTGCCCAGTTG GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC	63	118	<i>A. infectoria</i> *
AraDAlta1 AsolIAlta1	CCCGCCAGGACAACGCT GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG	63	131	<i>A. radicina</i> *
AsolDAlta1 AsolIAlta1	CGCATCCTGCCCGTCT GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG	65	118	<i>A. porri</i> *

*Grupo especie

Se usó un control negativo en cada reacción conteniendo todos los reactivos, excepto el ADN. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador TC-312 (TECHNE) usando el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C 1 min., seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., temperatura de annealing por 30 seg y 72 °C por 45 seg. Se realizó una extensión final de 10 min. a 72 °C después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y fueron visualizados con un transiluminador bajo luz UV (302 nm). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (Byodinamics, cienmarker) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb.

III.3 Caracterización del potencial micotoxicogénico y patogénico de cepas *Alternaria alternata* aisladas de uva

III.3.A Medio de cultivo y soluciones

Agar arroz molido licor de maíz (AMLM): arroz molido lavado 50 g; licor de maíz 5 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Preparación de la solución madre de ATe: se disolvieron 2 mg de tenuazonato de cobre en 500 µl de cloruro de metileno y se pasó la solución a través de una columna empaquetada con Dowex 50 w (intercambio iónico) de 1,5 cm de altura. El acondicionamiento de la resina se realizó por lavado de la columna con 4 mL de cloruro de metileno, se agregó sobre la columna el tenuazonato de cobre diluido y se eluyó con 8 mL de cloruro de metileno. El solvente se evaporó a sequedad y el ácido tenuazónico se resuspendió en 1 mL de metanol. Para calcular la concentración de ATe se tuvo en cuenta su absortividad molar $\Sigma_{277} = 12,980 \text{ L/mol*cm}$.

Solución de trabajo de ATe: se partió de una solución madre con una concentración de 3,42 mg/mL en metanol. A partir de la misma, se tomaron 292,40 µl y se resuspendieron en 1000 µl de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron 5, 10, 20 y 30 µl, se secaron con corriente de N₂ y se resuspendieron en 100 µl de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 µg/mL.

Solución de trabajo de AME: se partió de una solución madre con una concentración de 0,5 mg/mL en metanol. A partir de la misma, se tomaron 2 mL y se resuspendieron en 1000 µl de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron 5, 10, 20 y 30 µl, se secaron con corriente de N₂ y se resuspendieron en 100 µl de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 µg/mL.

Solución de trabajo de AOH: se partió de una solución madre con una concentración de 1 mg/mL en metanol. A partir de la misma, se tomó 1 mL y se resuspendió en 1000 µl de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron 5, 10, 20 y 30 µl, se secaron con corriente de N₂ y se resuspendieron en 100 µl de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 µg/mL.

III.3.1 Producción y extracción de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico

Se evaluó el perfil toxicogénico de un total de 34 cepas de *A. alternata* clasificadas en base a las características morfológicas y moleculares. Las cepas se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio AMLM y se incubaron por 14 días a 25 °C en oscuridad (Chulze y col., 1994).

El método de extracción de las toxinas se basó en la técnica de extracción a microescala propuesta por Smedsgaard (1997) modificada en tres pasos de extracción apropiados para los metabolitos producidos por las especies del género *Alternaria* (Andersen y col., 2001). A partir de las colonias desarrolladas durante 14 días se tomaron con sacabocados de la porción central 3 discos del cultivo de 6 mm de diámetro y se colocaron en viales color ámbar. Los viales fueron pesados antes y después de colocar los discos, y se determinó, por diferencia, el peso real de los discos de medio de cultivo + micelio.

Las toxinas se extrajeron a partir de los discos con 1,5 mL de cloroformo: metanol (2:1 v/v) por 60 min. en un baño ultrasónico. El extracto se transfirió a un vial de 1,5 mL limpio y se evaporó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Una segunda extracción de las toxinas se realizó sobre los mismos discos

ultrasónicamente por 60 min. con 1,3 mL de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico. El segundo extracto se transfirió al vial que contenía el primer extracto seco y se evaporó. Una tercera extracción de las toxinas se realizó ultrasónicamente por 60 min. con 1,5 mL de 2-propanol, el extracto fue transferido al vial que contenía los dos extractos previos y se evaporó a sequedad. La mezcla de los 3 extractos secos se redisolvió por ultrasonido en 1000 µl de metanol y 1000 µl de una mezcla acetonitrilo: buffer 0,027M de KH_2PO_4 .

III.3.2 Detección y cuantificación de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia

El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector UV Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStationRev A.06.01). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Symmetry Shield), conectada a una precolumna Security Guard™ (4 x 3,0 mm) con el mismo empaquetamiento de la columna.

Para las toxinas AOH y AME, la fase móvil consistió en dos mezclas isocráticas consecutivas de acetonitrilo: agua 25: 75 v/v (solución A) y acetonitrilo: agua 50: 50 v/v (solución B). La solución A a un flujo de 1,0 mL/min por 3,5 min. seguido de la solución B a un flujo de 1,0 mL/min por 16,5 min. La detección se realizó a 256 nm y el tiempo de retención promedio para AOH y AME fue de 12,5 y 16,8 min., respectivamente.

Para ATe, la fase móvil consistió en dos mezclas isocráticas consecutivas de acetonitrilo: buffer 0,027M de KH_2PO_4 25: 75 v/v (solución C) y acetonitrilo: buffer 0,027M de KH_2PO_4 50: 50 v/v (solución D). La solución C a un flujo de 1,0 mL/min por 3,5 min seguido de la solución D a un flujo de 1,0 mL/min por 16,5 min. La detección se realizó a 279 nm y el tiempo de retención promedio fue de 6,3 min. El volumen de inyección en todos los casos fue de 50 µl, trabajando en condiciones de "loop" lleno.

Se construyeron curvas de calibración con diferentes concentraciones de AOH, AME y ATe. Las toxinas fueron cuantificadas por correlación de la altura de los picos cromatográficos de los extractos de las muestras y de las curvas estándares.

Paralelamente se llevó a cabo un experimento de recuperación de las toxinas de *Alternaria* en el medio AMLM. Se enriquecieron al momento del plaqueo alícuotas del medio de cultivo con diferentes concentraciones de las toxinas (AOH, AME y ATe) en el rango de 0,1 a 10 ppm (cada nivel por triplicado). Una vez solidificados los medios se extrajeron, detectaron y cuantificaron las toxinas como lo descrito previamente. Posteriormente se calcularon los recuperos de cada toxina y se establecieron los límites de detección cuantificación para cada una de ellas.

III.3.3 Ensayos de patogenicidad en uva

Se evaluó la patogenicidad de 29 cepas de *A. alternata* en uvas Malbec, siguiendo la técnica de inoculación con palillos adaptada para bayas (Greco y col., 2012) con algunas modificaciones. Brevemente, se cortaron por la mitad palillos de madera y se colocaron en frascos de tapa rosca de 50 mL de capacidad con agua destilada donde fueron autoclavados 3 veces (121 °C durante 15 min). Posteriormente, los palillos esterilizados fueron colocados asépticamente y de forma radial en la superficie de placas de Petri conteniendo el medio de cultivo PDA (8 por placa). Para proceder a la colonización de los palillos, las placas de PDA fueron inoculadas centralmente con las cepas de *Alternaria* e incubados bajo ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad (8/16 hs) a 25 °C durante 2 semanas.

Una vez finalizada la colonización de los palillos, se tomaron bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes, y se las desinfectó superficialmente colocándolas en Erlenmeyers de 1 L de capacidad con una solución de hipoclorito de sodio (1 %, v/v) y agitándolas durante 1 min a 120 rpm. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril (3 veces). La patogenicidad de cada cepa fúngica fue evaluada

colocando por punción un total de 7 palillos contaminados en 7 bayas de uva (uno por baya) y dejándolos en las mismas. Las bayas con palillos se colocaron en la superficie de una placa de Petri de vidrio (90 mm de diámetro) y fueron incubadas por 7 días a 25 °C. Para alcanzar una humedad relativa (RH) de 100 %, se colocó un vaso de agua en la incubadora. Como control negativo se utilizaron palillos estériles sin contaminación fúngica para colocar en las bayas de uva. Luego del período de incubación, se evaluaron las lesiones internas y externas. Según el tamaño de la lesión ocasionada, se definieron 3 grados de patogenicidad: poco patogénico (1, lesión que abarcaba menos de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la uva), moderadamente patogénico (2, lesión que abarcaba más de $\frac{1}{4}$ hasta $\frac{1}{2}$ de la superficie de la uva), y muy patogénicos (3, lesión que abarcaba más de $\frac{1}{2}$ hasta toda la superficie de la uva). Por cada cepa evaluada se realizaron 3 experimentos independientes.

III.3.4 Análisis estadístico

Los datos de la producción de micotoxinas se analizaron con ANOVA seguido por el test de LSD Fisher ($p < 0.05$ o $p < 0.01$). Los coeficientes de correlación de Pearson fueron usados para evaluar la relación entre las diferentes micotoxinas. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para analizar el grado de patogenicidad ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y Statgraphics Plus 5.1.

III.4 Optimización y validación de una metodología analítica para la extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazonico en uvas

III.4.A Reactivos y soluciones

Preparación de la solución madre de ATe: se disolvieron 2 mg de tenuazonato de cobre (≥ 98 %, Sigma-Aldrich) en 0,5 mL de metanol y se pasó la solución a través de una columna empaquetada con la resina Dowex 50 w (intercambio iónico) de 4 cm de altura por 1 cm de diámetro, acoplada a un sistema de vacío. El acondicionamiento de la resina se realizó mediante 3 lavados consecutivos de

la columna con 4 mL de metanol, se agregó a la columna la solución de tenuazonato de cobre diluido, luego el ATe se eluyó con 15 mL de metanol y se llevó a un volumen final de 25 mL. Para calcular la concentración de ATe se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = \frac{A}{\Sigma_{277} \times l}$$

donde A, es la absorbancia medida para la solución de ATe obtenida, Σ_{277} es la absorptividad molar y l el ancho efectivo de paso del haz de luz. El Σ_{277} para ATe 12,980 L/mol* cm. La concentración de la solución madre obtenida fue 47 µg/mL de ATe. A partir de la solución madre se construyeron las curvas de calibrado mediante diluciones secuenciales. Asimismo, a partir de esta madre se realizaron las adiciones en la matriz de uva para evaluar las figuras de mérito analítico de la metodología.

Preparación de sales anhidras: Tanto el sulfato de magnesio (MgSO₄) como el cloruro de calcio (CaCl₂) fueron colocadas en recipientes de vidrio y secadas en estufa a temperatura de 100 °C durante 1-2 días para lograr las sales anhidras. Posteriormente, se molieron utilizando un molinillo y se pesaron las cantidades necesarias para el procedimiento.

III.4.1 Experimentos de recuperación de ácido tenuazónico en uva Malbec

Se realizaron experimentos de recuperación utilizando muestras blanco de uva (libres de contaminación con la micotoxina), seleccionadas de uvas Malbec previamente preparadas, extraídas y analizadas que dieron resultados negativos para la presencia de ATe. Las muestras blanco homogeneizadas con minipimer (2,5 g) fueron enriquecidas con soluciones estándar de ATe a 3 niveles de concentración diferentes, con triplicado por cada nivel (n=3). Los niveles de adición fueron 0,05 µg/g, 0,50 µg/g y 5,00 µg/g.

Para la extracción de ácido tenuazónico desde la matriz uva se optimizó una metodología basada en QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) (Anastassiades y col., 2003). El procedimiento de enriquecimiento fue realizado al comienzo del método de extracción, agregando una alícuota de la solución estándar de ATe a una mezcla de 2,5 g de uva homogeneizada y 2,5

mL de agua acidificada al 1% con ácido fórmico. Las muestras fueron mezcladas durante 30 s con vórtex, mantenidas por 5 min para su estabilización y se prosiguió con las diferentes alternativas de extracción y limpieza descritas en puntos subsiguientes.

Las recuperaciones absolutas (R%) del método propuesto fueron calculadas como la diferencia entre las concentraciones medidas de los extractos de uva enriquecidos (C_s) y los no enriquecidos (C_b), dividida por la concentración teórica (C_t) añadida a la muestra y multiplicado por 100,

$$R \% = \left[\frac{C_s - C_b}{C_t} \right] \times 100$$

Donde C_s y C_b fueron establecidos utilizando la curva de calibración en matriz.

III.4.2 Optimización de las condiciones de extracción

Para determinar el solvente de extracción óptimo, se agregaron 5 mL de acetonitrilo, hexano o acetato de etilo a la mezcla de 2,5 g de uva homogeneizada y 2,5 mL de agua acidificada al 1% con ácido fórmico, y se realizó una agitación manual durante 1 minuto.

Para determinar el volumen óptimo del solvente de extracción, se realizaron series de extracciones separadas utilizando 2,5 g de muestra diluida con 2,5 mL de agua (acidificada con ácido fórmico) + 2,5, 5,0 y 7.5 mL de acetato de etilo. A su vez se estudió la relación muestra: agua: solvente, manteniendo los mismos niveles de enriquecimiento para cada ensayo y un volumen constante de 5 mL de acetato de etilo, como solvente de extracción.

El efecto del pH en la extracción de ATe fue también evaluado, agregando distintas concentraciones de ácido fórmico (0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 % v/v) y comparándolo con la muestra sin modificación del pH.

III.4.3 Optimización de la limpieza

A posteriori de la fase de extracción, se adicionaron 4 g de $MgSO_4$ anhidro y 1 g de NaCl, se agitó manualmente 1 min y se procedió a la centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos, para separar la fase acuosa de la fase de solvente orgánico (fase de partición del método de QuEChERS) y se recolectó la capa superior

orgánica (contiendo al analito) en un tubo cónico de 15 mL de capacidad. Se evaluó entonces la aplicación de una limpieza en fase sólida dispersiva (dSPE) utilizando diferentes sorbentes de grado analítico (50 μm de tamaño de partícula) incluyendo PSA (amina primaria y secundaria), C_{18} (octadecil-silano) y GCB (negro de carbón grafitado) (Waters, Milford, MA, USA), y sales para el secado: MgSO_4 y CaCl_2 . Para ello se agregó 0,2 g de sorbente y 0,25 g de sales para el secado, solos o en diferentes combinaciones a la fase orgánica, se homogeneizó la mezcla en vortex durante 30 segundos y se procedió a centrifugar a 8000 rpm durante 5 min. También se evaluó la posibilidad de un paso adicional de corrección de pH con diversos % de ácido fórmico (0, 2 y 4 %) durante esta etapa.

Estos últimos sobrenadantes fueron entonces recolectados en tubos Kahn de vidrio y evaporados a sequedad (concentrador SpeedVac). Por último, los residuos se resuspendieron en 0,5 mL de fase móvil metanol: 0,1 M NaH_2PO_4 (2:1 v/v), ajustado a un pH 3.2 y se inyectaron 20 μL de la muestra en el HPLC con detector UV (HPLC-UV).

III.4.4 Detección y cuantificación de ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV

El ácido tenuazónico fue determinado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de longitud de onda múltiple (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Alemania). El instrumento de HPLC modelo "DionexUltimate 3000" consistió en una unidad desgasificadora al vacío, un inyector automático, una bomba cuaternaria, un horno cromatográfico y un detector modelo Dionex MWD-3000 (RS). Este último posee una celda de flujo analítico que opera a una velocidad de recolección de datos de 5 Hz, un ancho de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 1.000 s. La longitud de onda de trabajo para ATe fue de 279 nm y se utilizó el software Chromeleon 7.1 para controlar los parámetros del sistema de HPLC-MWD, la adquisición y el procesamiento de los datos.

Las separaciones en cromatográficas fueron llevadas a cabo con una columna Kinetex XB-C₁₈ (4.6 mm x 150 mm, 5 μm) Phenomenex (Torrance, CA, USA) utilizando el método previamente reportado por Shephard y col. (1991) con algunas modificaciones. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: 0,1 M NaH₂PO₄ (2:1 v/v) esta mezcla se ajustó a pH 3,2 mediante la adición de ácido fosfórico. Las muestras fueron analizadas usando un método isocrático a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min durante un tiempo de corrida total de 4 min. La temperatura de la columna fue de 30 °C y el volumen de la inyección de 20 μL.

La identificación y cuantificación de ATe en muestras de uva se basó en la comparación de los tiempos de retención (t_R) y los valores de absorbancia de los picos detectados en las muestras con aquellos obtenidos por la inyección de estándares puros del analito. Además, las muestras fueron adicionadas con concentraciones conocidas de Ate, en pos de verificar la identificación selectiva del analito y la ausencia de interferencias al tiempo de retención del mismo. Las muestras fueron cuantificadas usando calibración en matriz.

III.4.5 Validación del método

El método analítico optimizado fue validado en base a la repetividad (precisión intra-día) y reproducibilidad (precisión inter-día) de los tiempos de retención del analito, linealidad, exactitud (como recuperación), precisión (como repetividad de los valores recuperados), selectividad y límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Para evaluar la linealidad de las curvas de calibración, las soluciones estándar se prepararon a 6 niveles de concentración (0,25, 0,50, 1,25, 2,5, 5,0 y 12,5 μg/mL) en fase móvil del HPLC y en la matriz de uva. Para esta última, se siguió la metodología descrita en punto III.4.1 y finalmente fue resuspendida en la fase móvil del HPLC. Estas fueron inyectadas por triplicado en el sistema de HPLC-UV y los cálculos fueron realizados basados en las áreas promedio de los picos. Las ecuaciones de regresión de la curva de calibrado y la determinación de sus coeficientes (r^2) fueron calculados y el rango lineal para ATe determinado.

El límite de detección de ATe (LD) fue establecido mediante una relación 3:1 de señal/ruido (S/R). El límite de cuantificación del método (LC) fue determinado como la menor concentración del analito validada con una exactitud aceptable (recuperación en el rango de 70 a 120 % y desviación estándar relativa RSDs ≤ 20 %) (SANCO, 2013).

La precisión fue determinada a 0,05, 0,50 and 5,00 µg/g. La relación de Horwitz (HorRat), es un parámetro normalizado que indica la aceptabilidad de un método relativa a la precisión del laboratorio (reproducibilidad) (Horwitz y col., 2006), fue calculado de la siguiente manera:

$$HorRat = \frac{RSD_R(\%)}{PRSD_R(\%)}$$

Donde RSD_R (%) simboliza la desviación estándar relativa observable calculada a partir de los datos de rendimiento, y PRSD_R (%) la desviación estándar predicha calculada a partir de la ecuación de Horwitz PRSD_R (%) = 2C^{-0.15}, donde C es la concentración encontrada o adicionada, expresada como una fracción de masa (0,05 µg/g = 5 x 10⁻¹³). La existencia de desviaciones consistentes en el menor rango de valores (<2), son aceptables.

También se determinó el efecto matriz del método, definido como la/s respuesta/s positivas o negativas producidas por otro/s compuesto/s distintos al analito buscado (interferencias) que influyen en la medida de su concentración o masa (SANCO, 2013). Si la interferencia no puede ser eliminada o compensada, sus efectos pueden ser aceptables si el impacto en la exactitud no es significativo (SANCO, 2013). El efecto matriz potencial (%) para ATe causado por interferencias ocurridas durante el análisis por HPLC-UV fue evaluado comparando las respuestas analíticas de estándares preparados en solvente y los estándares en matriz; y fue calculado de la siguiente manera:

$$ME = \left[\frac{A_{ss} - A_s}{A_s} \right] \times 100$$

Donde A_{ss} es la respuesta (área del pico) medida en la matriz enriquecida (la adición fue llevada a cabo sobre las muestras de uva, antes de la extracción), y A_s es la respuesta obtenida para el estándar en solvente a la misma concentración.

III.5 Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

III.5.1 Muestreo

Durante la vendimia 2015, a tiempo de cosecha, se tomaron muestras de uva de 13 viñedos de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec representativos de zona DOC San Rafael. El área total seleccionada para el muestreo estuvo ubicada entre 34.3° y 34.8° S de latitud, 67.4° y 68.5° W de longitud, y con una altitud en el rango de 500 a 800 m sobre el nivel del mar. El muestreo se realizó en base a un protocolo previamente descrito para el análisis de niveles de micotoxinas en productos alimenticios (EC., 2006). Brevemente, cada muestra independiente se tomó recolectando racimos de uva presentes a 1,5 m del suelo de 12 plantas (un racimo por planta) distribuidas de manera homogénea en el viñedo, resultando en aproximadamente 1 kg por muestra. Además, la última muestra tomada consistió en un racimo con signos visibles de infección que fue encontrado en uno de los 13 viñedos muestreados. Todas las muestras se mantuvieron en bolsas plásticas y refrigeradas durante su transporte al laboratorio. Luego, cada muestra fue molida completamente en licuadora y se recolectaron 3 alícuotas de 2,5 g cada una (réplicas) en tubos de centrifuga de fondo cónico de 50 mL que fueron almacenados a -20 °C hasta el comienzo de la extracción.

III.5.2 Extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazonico en uvas

En la figura 8 se puede observar el esquema final de extracción optimizado en el punto anterior.

A cada una de las muestras de uva homogeneizada en licuadora de 2,5 g (en tubo de centrifuga con fondo cónico de 50 mL) se le adicionaron 2,5 mL de agua ultrapura (acidificada con 1% ácido fórmico) y 5 mL de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente por 1 min para asegurar una homogenización adecuada de la muestra y el solvente de extracción. Para la separación de fases, se agregaron 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl, los tubos fueron nuevamente agitados por 1 min y centrifugados a 8000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue

transferido a tubo de centrifuga fondo cónico de 15 mL de capacidad que contenían 0,25 g de CaCl₂ anhidro, y fue agitando con vórtex por 30 s y finalmente centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos. Estos últimos sobrenadantes fueron entonces recolectados en tubos Kahn de vidrio y evaporados a sequedad (concentrador SpeedVac). Por último, los residuos se resuspendieron en 0,5 mL de fase móvil metanol: 0,1 M NaH₂PO₄ (2:1 v/v), ajustado a un pH 3,2. Se inyectaron 20 µL de la muestra en el HPLC con detector UV (HPLC-UV) y se procedió según punto III.4.4.

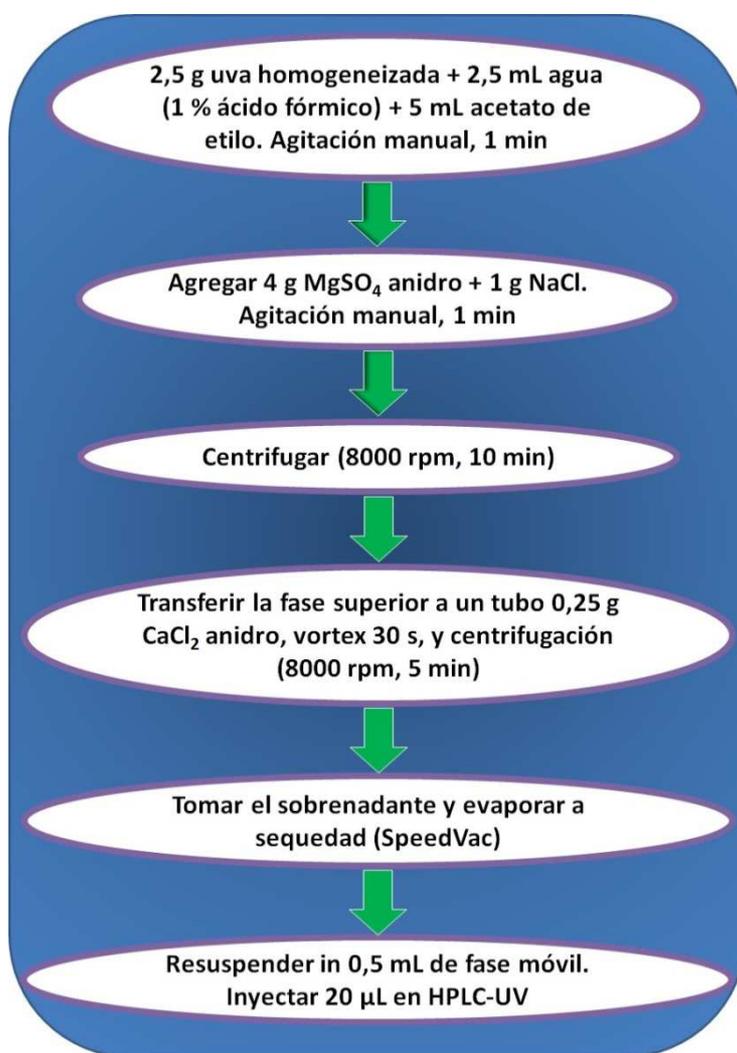


Figura 8: Esquema de trabajo método de extracción de ácido tenuazónico de uvas basado en QuEChERS

III.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por *Alternaria alternata*

III.6.1 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas de *Alternaria alternata* en medio de cultivo simil-uva (*in vitro*)

III.6.1.1 Medio de cultivo

Medio simil uva -entre envero y madurez- (MSU) 2% (Tassou y col., 2009): D(+) glucosa 70 g; D(-) fructosa 30 g; L(-) ácido tartárico 7g; L(-) ácido málico 10g; (NH₄)₂SO₄ 0,67 g; MgSO₄ (7 H₂O) 1,5 g; NaCl 0,15 g; CuCl₂ 0,0015 g; FeSO₄ (7 H₂O) 0,021 g; ZnSO₄ (7H₂O) 0,0075 g; (+) catequina 0,05g; agar 25 g; agua destilada 1000 mL. El pH del medio fue ajustado a 4,2 mediante el agregado de KOH (6N). La a_w basal del medio fue de 0,99. Se ajustó la actividad acuosa (a_w) a 0,99 (sin agregado de glicerol); 0,98, 0,97, 0,96 y 0,95 mediante el agregado de diferentes cantidades de glicerol (Dallyn y Fox, 1980). El medio se esterilizó en autoclave a vapor efluente por 30 min. y posteriormente fue fraccionado en placas de Petri de 9 cm. La a_w final de las placas con el medio de cultivo fue verificada usando un medidor de a_w (Aqualab Series 3 DecágonDevices, Inc, WA, EE.UU.).

Agar nutritivo sintético (ANS): sacarosa 0,2 g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄ (7 H₂O) 0,5g, KNO₃ 1 g; KCl 0,5 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 6 cm.

III.6.1.2 Cepas fúngicas

Se utilizaron 3 cepas de *A. alternata* (5.5, 7.5 y 25.1) seleccionadas por su capacidad toxicogénica en medio AMLM (*in vitro*) y actividad patogénica demostrada en uva (punto III.3).

III.6.1.3 Inoculación e incubación

Las placas con el medio de cultivo MSU ajustados a las diferentes a_w , se inocularon en el centro con un taco de micelio de 3 mm de diámetro, tomado con un sacabocado estéril, de la zona de activo crecimiento de un cultivo de *A. alternata* de 7 días en el medio ANS a 25 °C. Una vez inoculadas, las placas con igual a_w se colocaron en bolsas de polietileno y fueron incubadas a 15, 25 y 30 °C durante un período de 28 días. El ensayo se realizó por triplicado.

Se aplicó un diseño factorial completo con 3 réplicas. Los factores estudiados fueron cepas (3) x niveles de a_w (5) x temperatura (3), y como respuesta se utilizó la velocidad de crecimiento.

III.6.1.4 Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento se realizó diariamente, midiendo el diámetro de las colonias en dos direcciones durante el período de incubación o hasta que las colonias alcancen los bordes de la placa de Petri utilizando una lupa binocular (10X). Se representó el incremento del radio de la colonia en función del tiempo para cada una de las cepas de *A. alternata* utilizadas y en cada una de las condiciones de a_w y temperatura ensayadas. Los datos se ajustaron a una recta correspondiente a la fase de crecimiento lineal, calculándose a partir de allí, la velocidad de crecimiento en mm/día (como la pendiente de la recta).

III.6.1.5 Evaluación de la producción de toxinas

A diferentes períodos de incubación (7, 14, 21 y 28 días) se tomaron discos del margen de la colonia, con sacabocado estéril (5 mm de diámetro) de cada cepa cultivada a diferentes a_w y temperaturas por triplicado, y se los colocó en viales previamente pesados. Posteriormente, agregados los discos de micelio, los viales fueron pesados nuevamente y se determinó, por diferencia, el peso real de los discos de medio de cultivo + micelio.

El método de extracción utilizado para las 3 toxinas se basó en la técnica de extracción a microescala propuesta por Smedsgaard (1997) modificada en tres pasos de extracción apropiados para los metabolitos producidos por las

especies del género *Alternaria* (Andersen y col., 2001), descrita en el punto III.3.1

La detección y cuantificación para las tres toxinas se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto III.3.2.

Paralelamente se llevó a cabo un experimento de recuperación de las toxinas de *Alternaria* en el medio MSU. Se enriquecieron al momento del plaqueo alícuotas del medio de cultivo con diferentes concentraciones de las toxinas (AOH, AME y ATe) en el rango de 0,1 a 10 ppm (cada nivel por triplicado). Una vez solidificados los medios se extrajeron, detectaron y cuantificaron las toxinas como lo descrito previamente. Posteriormente se calcularon los recuperos de cada toxina y se establecieron los límites de detección cuantificación para cada una de las toxinas.

El número de ensayos fue: 5 a_w x 3 temperaturas x 3 cepas x 3 réplicas x 4 de incubación. Las respuestas medidas fueron las concentraciones de tres micotoxinas, AOH, AME y ATe.

III.6.2 Evaluación del efecto de factores abióticos (temperatura y tiempo de incubación) sobre la producción de ácido tenuazónico por *Alternaria alternata* en uva (*in situ*)

III.6.2.1 Cepas fúngicas

Se utilizaron 3 cepas de *A. alternata* (5.5, 7.5 y 25.1) seleccionadas por su capacidad toxicogénica en medio AMLM (*in vitro*) y actividad patogénica demostrada en uva (punto III.3).

III.6.2.2 Preparación del inóculo fúngico

Se sembraron cada una de las cepas de *A. alternata* en medio APZ y se incubaron a 20-25 °C durante 7-10 días bajo ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad (8/16 hs). Finalizado el período de incubación, se adicionaron 4 ml de agua destilada- 0.05 % Tween 20 (v/v) estéril a cada una de las placas, para remover las esporas del micelio. Cada suspensión fue

recolectada en microtubos de 1,5 ml estériles que se centrifugaron a 13.000 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de esporas fue resuspendido en 1 ml de una solución 0,01 % de Tween 20 (v/v) estéril. La concentración de esporas fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y las concentraciones a utilizar fueron ajustadas por dilución en solución 0.01 % Tween 20 (v/v).

III.6.2.3 Determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *A. alternata* en uva

La metodología se basó en el ensayo de fitopatogenicidad descrito por Nally y col. (2013). Brevemente se tomaron bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se las desinfectó superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (1 %, v/v) seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Las uvas fueron inoculadas mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 µl de una suspensión de esporas en solución 0.01 % Tween 20 (v/v) a una concentración dentro del rango de $1,75 \cdot 10^2$ a $1,9 \cdot 10^5$ esporas/mL, generando una herida ecuatorial con el mismo tipo estéril que contenía la suspensión. El control negativo consistió en uvas inoculadas sólo con 20 µl de la solución 0.01 % Tween 20 (v/v). Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm) a 25 °C en estufa, a oscuridad y humedad relativa de 100 % por 5 días. Se utilizaron 3 placas con 8 uvas por placa por cada cepa y condición a evaluar. El experimento se repitió 2 veces.

Al final del experimento, se determinó para cada cepa y concentración de esporas evaluadas, el porcentaje de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada por *Alternaria* en uvas (%), calculada como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales $\times 100$. La mínima concentración de esporas capaz de producir un porcentaje de infección del 100 % para cada cepa de *Alternaria*, fue definida como la CMI.

III.6.2.4 Inoculación, incubación y evaluación de la producción de ácido tenuazónico en uva

Para evaluar el efecto de factores abióticos (temperatura y tiempo de incubación) en la producción de ATe en uva por las cepas de *A. Alternata* seleccionadas, se utilizó la metodología descrita en punto III.6.2.3 con algunas modificaciones. Las uvas fueron inoculadas con la CMI de cada cepa de *A. Alternata*, y se incubaron en placas de Petri (90 mm) a 3 temperaturas diferentes (15, 25 y 35 °C) en cámara fría y estufas, respectivamente, durante 10, 17 y 24 días. Se utilizaron 3 placas con 8 uvas por placa por cada condición a evaluar, dando un total de muestras de 3 temperaturas x 3 cepas x 3 réplicas x 3 tiempos de incubación. El experimento se repitió 2 veces.

Para determinar la producción de ATe en cada una de las condiciones evaluadas, las uvas de cada placa (muestra) fueron procesadas según la metodología de extracción optimizada (punto III.5.2) y se procedió a la detección y cuantificación de ATe por HPLC-UV (punto III.4.4).

III.6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de velocidad de crecimiento y de producción de toxinas fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y análisis multivariado de varianza (MANOVA), según se requirió. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013), STATGRAPHICS Plus 5.1, Statistica 7.0 y Sigmaplot, así como Sigmaplot.

III.7 Aislamiento e identificación de levaduras y organismos tipo levadura de uvas Malbec de la DOC San Rafael

III.7.A Medio de cultivo y soluciones

Agar malta, levadura, glucosa y peptona (MYGP): Extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona de carne 5 g, glucosa 2 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

Caldo dextrosa, peptona y extracto de levadura (YPD): extracto de levadura 10 g, peptona 20 g, glucosa 20 g, 1000 mL de agua. Para la preparación del medio sólido se adicionaron 20 g de agar por cada 1000 mL de caldo YPD, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

III.7.1 Aislamiento de levadura y organismos tipo levadura

El aislamiento de levaduras y organismos tipo levadura se realizó por el método de siembra directa en medio DRBC, en paralelo al aislamiento fúngico descrito en el punto III.1.2. A fin de generar una presión de selección para encontrar mayor cantidad de antagonistas entre los aislados, se aislaron sólo colonias con características de levadura que prevalecieron en su convivencia con los hongos filamentosos al cabo de 7 días de incubación en DRBC. Se aislaron de esta manera 110 colonias, que se transfirieron al medio YPD agar, se dejaron crecer a 28 °C por 48 a 72 hs y se obtuvieron cultivos puros. Cada uno de los aislados fue crecido en caldo YPD los cuales fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior identificación.

III.7.2 Identificación de levaduras y organismos tipo levadura mediante la técnica molecular de PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2

Se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Esteve-Zarzoso *y col.* (1999) y Fernández-Espinar *y col.* (2006) con algunas modificaciones. Se sembraron cada uno de los aislados a identificar en medio YPD-agar y se incubaron a 28 °C por 48 h. Las células de cada aislamiento de levadura se recogieron directamente desde una colonia fresca y se resuspendieron en 50 µL de agua estéril. Las suspensiones celulares se llevaron a un baño de agua a ebullición durante 5 min y seguidamente se enfriaron por inmersión en hielo durante 5 min. Luego, las células de levadura se separaron por centrifugación (10.000×g, 10 min a 4 °C) y los sobrenadantes resultantes se utilizaron para el ensayo de amplificación.

III.7.2.1 Reacciones de PCR

La región ITS1-5,8S-ITS2 (Fig. 9) se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR) en un termociclador TC-312 (TECHNE) usando los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') previamente descritos por White y col. (1990).

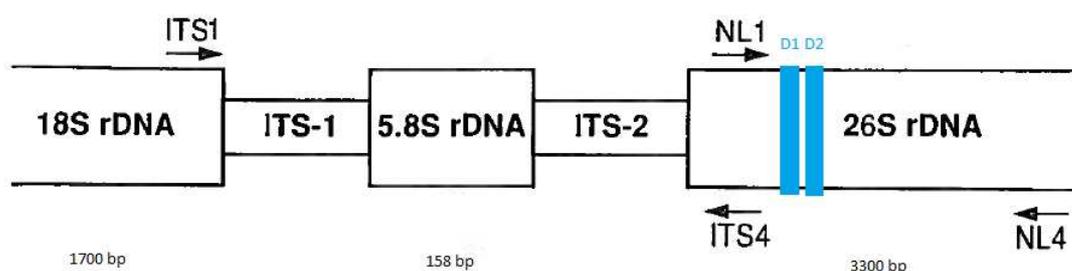


Figura 9: Esquema de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ADNr de levaduras.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ L. La mezcla de PCR contuvo 15 μ L de sobrenadante conteniendo el ADN molde, 10 μ L de tampón de PCR 10X, 8 μ L de dNTPs (1 mM), 2 μ L de cebador ITS1 (50 mM), 2 μ L de cebador ITS4 (50 mM), 5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 57,5 μ L de agua miliQ, 0,5 μ L de enzima Taq polimerasa (5 U/ μ L). La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 $^{\circ}$ C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 $^{\circ}$ C, 2 min a 55,5 $^{\circ}$ C y 2 min 72 $^{\circ}$ C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 $^{\circ}$ C.

Para verificar la obtención de los productos amplificados y su tamaño, se sembraron 5 μ L de cada uno de ellos en geles de agarosa al 1,4 % con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) en solución reguladora TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X. La separación se realizó por electroforesis a voltaje constante (100 V) y el ADN fue visualizado con un transiluminador bajo luz UV (302 nm). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (Byodinamics, cienmarker) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb.

III.7.2.2 Cortes con enzimas de restricción

Los productos amplificados de PCR se digirieron sin previa purificación con las endonucleasas de restricción *Cfo* I, *Hinf* I y *Hae* III, también se utilizó *Dde* I, de ser necesario, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa al 2,2 % con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en solución reguladora TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X. La separación se realizó por electroforesis a voltaje constante (100 V) y el ADN fue visualizado con un transiluminador bajo luz UV (302 nm). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (Byodinamics, cienmarker) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb. Finalmente, los tamaños de los fragmentos obtenidos con cada una de las enzimas de restricción junto con el tamaño del amplificado para cada cepa, fueron cargados en la base de datos de levaduras YEAST-ID (www.yeast-od.org) para asignar especie. Se tomó como criterio, en un rango de ± 30 pb, un acierto de al menos 80 % con los fragmentos esperados.

III.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva, confirmación de su identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico

III.8.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

III.8.1.1 Preparación del inóculo de levadura y organismos tipo levadura

Se realizaron siembras de cada una de las cepas de levadura a evaluar en medio MYGP y se incubaron a 28 °C durante 48-72 hs. Se tomaron varias colonias aisladas por cepa y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril contenida en un microtubos de 1,5 mL. Estas suspensiones fueron centrifugadas a 6200 g por 5 minutos a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos nuevamente en agua destilada estéril para repetir el

procedimiento, para eliminar cualquier nutriente remanente del medio inicial. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos en agua destilada estéril y se ajustó la concentración de levadura a 10^6 UFC/mL mediante recuento en cámara de Neubauer.

III.8.1.2 Cepas fúngicas e inóculo fúngico

Se utilizaron 3 cepas de *A. alternata* (5.5, 7.5 y 25.1) seleccionadas anteriormente (punto III.3) y para la preparación del inóculo fúngico se procedió según punto III.6.2.2.

III.8.1.3 Evaluación del efecto preventivo de las levaduras y organismos tipo levadura frente a la infección de *Alternaria alternata* en uva

Se evaluó el posible efecto preventivo de 67 cepas de levadura y organismos tipo levadura previamente aisladas e identificadas (punto III.7) frente a la infección ocasionada en uva por cepas de *A. alternata*, según metodología descrita previamente (punto III.6.2.3) con algunas modificaciones. Se desinfectaron superficialmente uvas Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se inocularon mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 μ l de una suspensión de 10^6 UFC/mL de la cepa de levadura u organismos tipo levadura a evaluar, generando una herida ecuatorial con el mismo tipo que contenía la suspensión. Una vez cumplido el período de 2 horas se inoculó, en la misma herida y mediante micropipeta, 20 μ l de la cepa de *Alternaria* a enfrentar a su CMI. Los controles negativos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 μ l de agua destilada estéril y uvas inoculadas con 20 μ l de la suspensión de cada levadura y organismo tipo levadura a evaluar sin post-inoculación del patógeno. Los controles positivos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 μ l del patógeno (*A. alternata*) a su CMI. Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm), a razón de 8 uvas por placa, a 25 °C en estufa y humedad relativa de 100 % durante 5 días. Se utilizaron 8 uvas por replica (placa) y 3 réplicas por tratamiento en un diseño de bloques completos al azar. Al final del experimento se determinó el porcentaje

de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada en uva (%) por tratamiento, como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales x 100.

Con los datos de este experimento se realizó la preselección de levaduras y organismos tipo levadura con capacidad preventiva, utilizando como criterio una reducción mayor o igual a 60 % del porcentaje de infección provocado por cada una de las 3 cepas de *A. alternata* a su CMI.

III.8.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S

III.8.2.1 Extracción del ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico total de 15 levaduras que resultaron seleccionadas por su capacidad preventiva frente a la infección de las 3 cepas de *A. alternata* en uva (punto III.8.1), siguiendo la técnica descrita por Querol y col (1992). Los aislamientos de las levaduras se inocularon en caldo YPD y se incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min. El sedimento celular se lavó con 1 mL de agua estéril y se resuspendió en 500 µl de solución 1 (sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1M). Se agregó 30 µl de una solución de zimoliasa (25 mg/ml) y 30 µl de glucanasa (25 mg/ml), se homogeneizó e incubó a 37 °C durante 1 h. A posteriori se centrifugó a 7.000 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 500 µl de solución 2 (Tris-HCl 50 Mm, EDTA 20Mm), se añadió 13 µl de SDS 10% y se incubó a 65 °C durante 5 min. Se agregó 200 µl de acetato de potasio (5M/3M), se agitó por inversión y se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min y se pasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Para precipitar el ADN de los sobrenadantes se agregó isopropanol en una relación 1:1, se agitó por inversión, se incubó a -20 °C durante 30-60 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El ADN precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en

agua miliQ estéril. Para eliminar el RNA, se agregó a cada tubo 1 ul de RNasa 2mg/mL y se incubó a 37 °C durante 1 h.

III.8.2.2 Reacciones de PCR y análisis de las secuencias

Se amplificó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de de aproximadamente 500-600 nucleótidos que corresponde al extremo 5' del gen que codifica el ARNr 26S (subunidad grande), conteniendo los dominios D1 y D2. Para ello, se utilizaron los cebadores descritos previamente por Kurtzman y Robnett (1998): NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Fig. 10). Para la amplificación exitosa en una de las cepas se requirió la dupla ITS1-NL4. La amplificación se realizó en un termociclador TC-312 (TECHNE). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL y contuvo 1 µL de ADN templado (12-60 ng/µL), 5 µL de tampón de PCR 10×, 3 µL de MgCl₂ (50mM), 4 µL de dNTPs 1 mM, 1 µL de cada cebador 10 µM, 0,25 µL de enzima Taq polimerasa (5 U/ µL) y 34,75 µL de agua miliQ. La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 2 min 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. Seguidamente, los productos amplificados del gen 26S del ADNr se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

La secuenciación de los fragmentos amplificados de ADNr se realizó por electroforesis capilar usando los cebadores NL1 y NL4, en uno de los casos se requirió ITS1, haciendo uso de la prestación de servicios externos de la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Hurlingham, Buenos Aires, Argentina). Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA6 versión 2013 y las comparaciones se realizaron con las secuencias presentes en las bases de datos de acceso público con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica (Basic Local Alignment SearchTool, BLAST) provista por GenBank, disponible en el servidor del NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de las secuencias

parciales de ADN_r se construyó el árbol filogenético de las cepas aplicando el método de “Neighbor-joining” (Tamura y col., 2004) mediante el software MEGA6.

III.8.3 Evaluación de la capacidad de levaduras seleccionadas de controlar la producción de ácido tenuazónico por *Alternaria alternata* en uva

Se evaluó la capacidad de 6 levaduras (de un total de 15 que mostraron capacidad preventiva frente a la infección ocasionada en uva por las 3 cepas de *A. alternata*) de controlar la producción de ácido tenuazónico en uva por las cepas 7.5 y 25.1 de *A. alternata*. Para ello, se procedió según metodología descrita en punto III.8.1, con algunas modificaciones. Las uvas inoculadas se incubaron a 25 °C en estufa y a humedad relativa de 100 % durante 24 días (condición optimizada para la producción de ATe por las cepas 7.5 y 25.1 de *A. alternata* punto III.6.2). El experimento se repitió 2 veces.

Al final del período de incubación, cada una de las muestras fue homogeneizada, se recolectaron 2,5 g en tubos de centrifuga con fondo cónico de 50 ml de capacidad y se procedió según la metodología de extracción y cuantificación por HPLC-UV optimizada descrita en el punto III.5.2.

III.8.4 Análisis estadístico

Para la selección de cepas de levadura y organismos tipo levadura con capacidad preventiva frente a la infección de *A. alternata* en uva, se utilizaron los datos de porcentaje de infección correspondientes a los 2 experimentos, se obtuvo promedio y desviación estándar para cada una de las cepas y se seleccionaron aquellas que lograron una reducción del porcentaje de infección igual o mayor al 60 % (p de 0,05) para cada una de las 3 cepas fúngicas en su CMI.

Para el análisis de las levaduras seleccionadas se aplicó el análisis multivariado de varianza (MANOVA), seguido de test de Hotelling –Bonferroni para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas. También se realizó el

análisis de componentes principales (CPA) para simplificar las interpretaciones de los resultados y fue presentado en un gráfico de tipo biplot.

Los datos de producción de ácido tenuazónico en uva con los distintos tratamientos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de LSD-Fisher para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los mismos.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y STATGRAPHICS Plus 5.1.

IV. RESULTADOS

IV.1 Evaluación de la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

El relevamiento de la flora fúngica durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en la región vitivinícola DOC San Rafael, reveló la presencia de 4 géneros fúngicos relevantes a tiempo de cosecha en uvas Malbec (Fig. 10). Entre ellos, *Alternaria* fue predominante en términos de abundancia o densidad relativa (58 % en 2011, 81 % en 2012 y 2013) seguido por *Cladosporium* (22 % 2011, 19 % 2012 y 7% 2013) y alternativamente por *Aspergillus* (11% 2011 y 3% 2013) o *Penicillium* (3 % 2011 y 4 % 2013) (Fig. 11). Además, durante las diferentes vendimias analizadas se encontró un porcentaje menor (<5%) de *Drechslera* y géneros pertenecientes a los Zygomycetes.

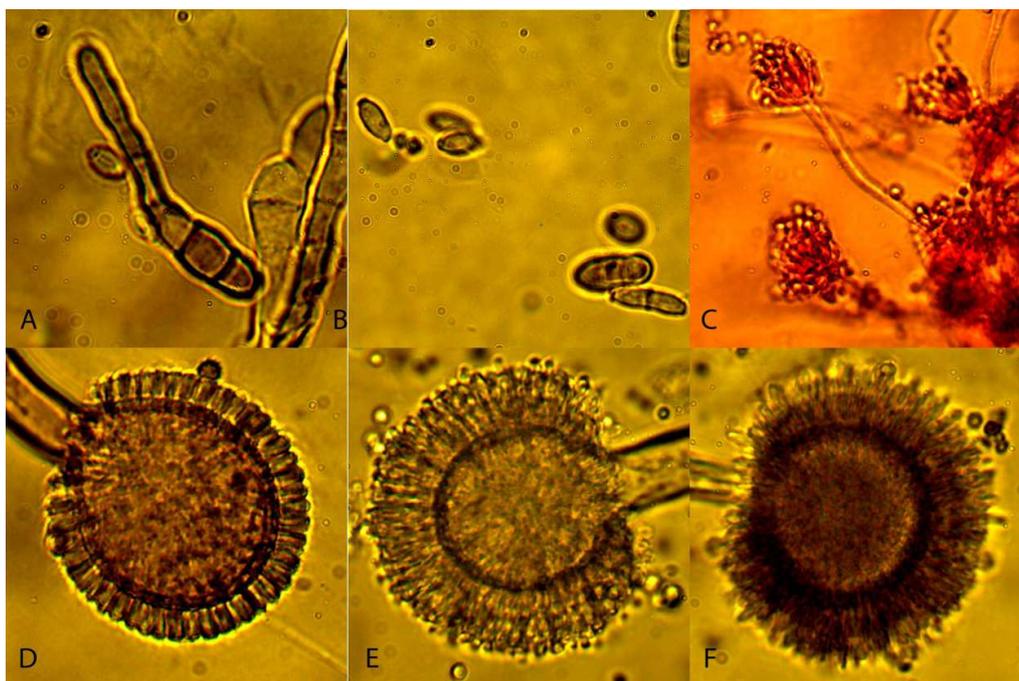


Figura 10: Microscopía óptica de aislados representativos pertenecientes a los principales géneros presentes a tiempo de cosecha en uvas Malbec de la DOC San Rafael, en medio de cultivo CYA: A- *Alternaria* (100x), B-*Cladosporium* (100x), C-*Penicillium* (40x, lactofusina), D- *Aspergillus uniseriatus* (100x), E y F- *Aspergillus biseriatus* (100x)

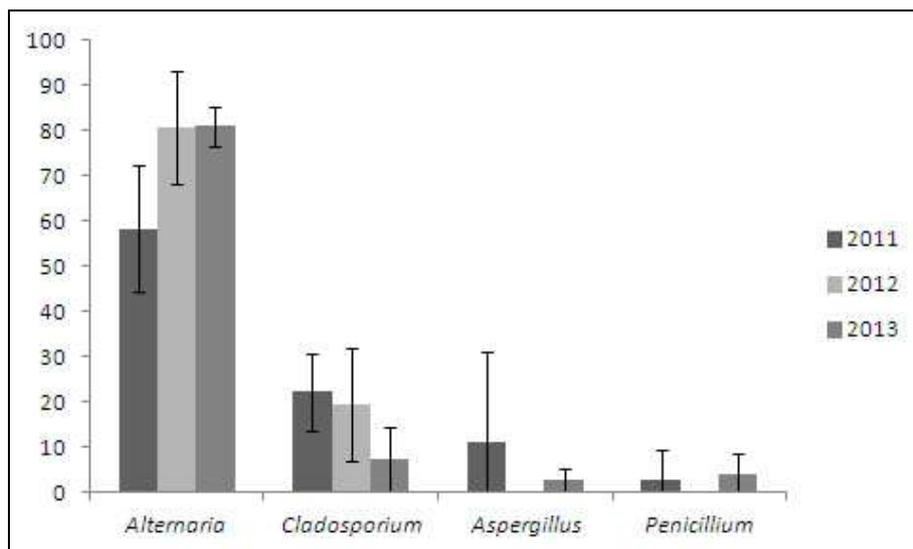


Figura 11: Abundancia o densidad relativa (%) de los 4 géneros fúngicos relevantes encontrados en uvas Malbec a tiempo de cosecha durante las vendimias 2011 y 2012 (en INTA Rama Caída de la DOC San Rafael) y durante la vendimia 2013 en toda la DOC San Rafael.

Además, durante la vendimia 2013, se evaluó el porcentaje de uvas infectadas resultando *Alternaria* el género aislado con mayor frecuencia ($p < 0.01$), seguido indistintamente por *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Tabla 4).

TABLA 4: Porcentaje de uvas Malbec de la DOC San Rafael infectadas con géneros fúngicos durante la vendimia 2013 (en medio DRBC).

Género fúngico	N° de bayas infectadas ($n = 90$)	
	Rango (%) [*]	Promedio (%) [†]
<i>Alternaria</i>	94,4-100,0	96,4 ^a
<i>Cladosporium</i>	0,0-26,4	12,2 ^b
<i>Penicillium</i>	0,0-16,0	4,6 ^b
<i>Aspergillus</i>	0,0-10,1	2,7 ^b

^{*} Porcentaje mayor y menor de uvas para vinificación infectadas.

[†] Promedio de porcentaje de uvas infectadas.

^{a,b} Los valores con superíndices diferentes difieren significativamente ($p < 0.01$) de acuerdo al test de LSD-Fisher.

En simultáneo, se evaluó el efecto de los distintos tratamientos aplicados en campo. Con respecto a la aplicación o no del tratamiento orgánico (oxicloruro de cobre y azufre) durante las vendimias 2011 y 2012, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la abundancia relativa de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* o *Penicillium*. Asimismo, cuando se evaluó la aplicación del tratamiento orgánico o del tratamiento no orgánico durante la vendimia 2013, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la abundancia relativa ni en el porcentaje de uvas infectadas de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* o *Penicillium*.

IV.2. Identificación de las especies de *Alternaria* aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares

IV.2.1 Identificación utilizando marcadores morfológicos

Se identificaron un total de 38 cepas con características morfológicas del género *Alternaria*, aislados de uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael durante las vendimias 2011 y 2012. Las cepas fueron identificadas por examen microscópico (40x y 100x) en base a los caracteres morfológicos desarrollados en los medios de cultivo APZ y V-8. De acuerdo a sus patrones de esporulación, todos los aislados de *Alternaria* fueron identificados como *A. alternata*.

Las cepas de *A. alternata* desarrolladas en medio de cultivo APZ, incubadas durante 7 días, mostraron una colonia de aproximadamente 4-5 cm de radio con 5 pares de anillos concéntricos de esporulación. La esporulación en la superficie de las zonas expuestas a la luz fue densa y presentó múltiples cadenas de conidios ramificadas. La esporulación sobre la superficie del medio de cultivo fue abundante pero no densa, presentando cadenas simples de 4-7 conidios y ramificadas en conidióforos cortos, mientras que en el medio V-8 se observó una densa esporulación. Los patrones de esporulación característicos de *A. alternata* en los medios de cultivo APZ y V-8 se observan en las figuras 12 y 13.

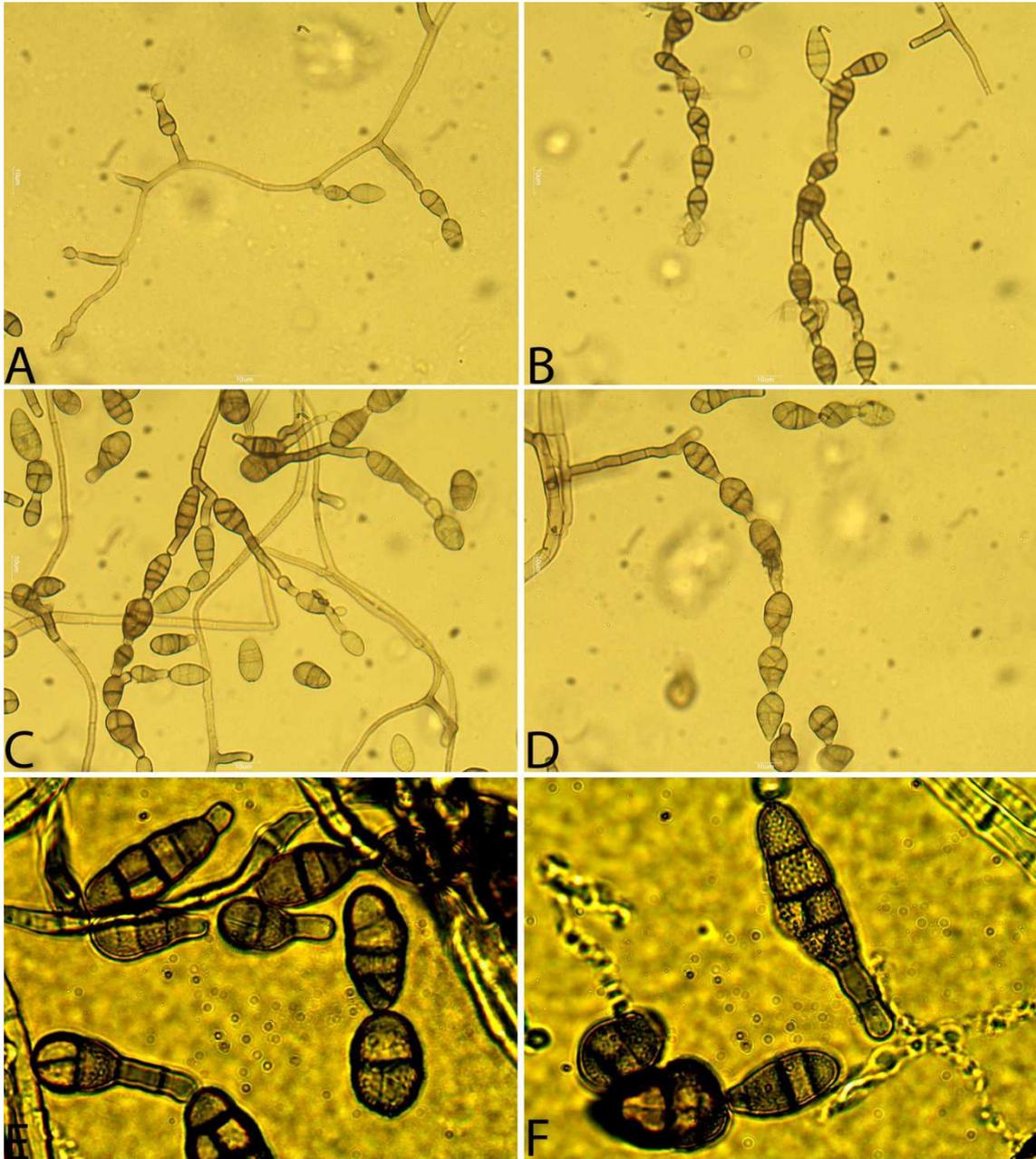


Figura 12: Patrones de esporulación característicos de cepas de *Alternaria alternata* cultivadas en medio APZ a 22-25 °C y ciclos de luz: oscuridad (8: 16). A, B, C y D Microscopía óptica (40x); E, F Microscopía óptica (100x).

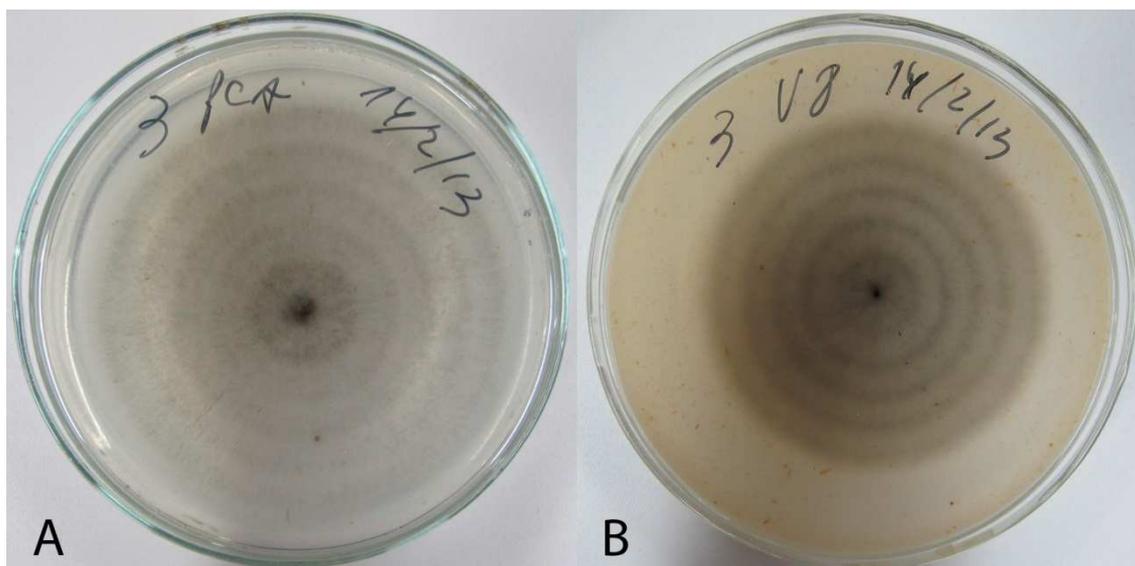


Figura 13: Colonias características de cepa de *Alternaria alternata* en medios (A) APZ y (B) V8 incubadas durante 7 días a 22-25 °C en ciclo de luz: oscuridad (8:16).

IV.2.2 Identificación utilizando marcadores moleculares

Se utilizó la metodología propuesta por Pavón y col. (2010) para corroborar la identificación morfológica de las cepas de *Alternaria* aisladas de uva. La identificación molecular de las cepas de *Alternaria* aisladas de uva basada en el marcador *Alt a1* mostró una amplificación positiva de 195 pb, correspondiente al par de cebadores Dir5cAlta1-Inv4Alta1, confirmando su pertenencia al género *Alternaria* (Fig. 14 A). Posteriormente, utilizando los cebadores derivados del gen *Alt a1*, AaltDAlta1-AinfIAlta1, correspondientes al grupo-especie *A. alternata*, se observó que en todas las cepas identificadas morfológicamente como *A. alternata* (especie incluida en el grupo especie *A. alternata*) se amplificó un fragmento de 118 pb., específico para este grupo (Fig. 14 B).

Ninguna de las 38 cepas de *Alternaria* aisladas de uva, mostraron amplificación específica con los cebadores derivados del gen *Alt a1* específicos para los grupos-especie *A. infectoria*, *A. radicina* o *A. porri*. Asimismo, no se observó amplificación alguna en los controles negativos.

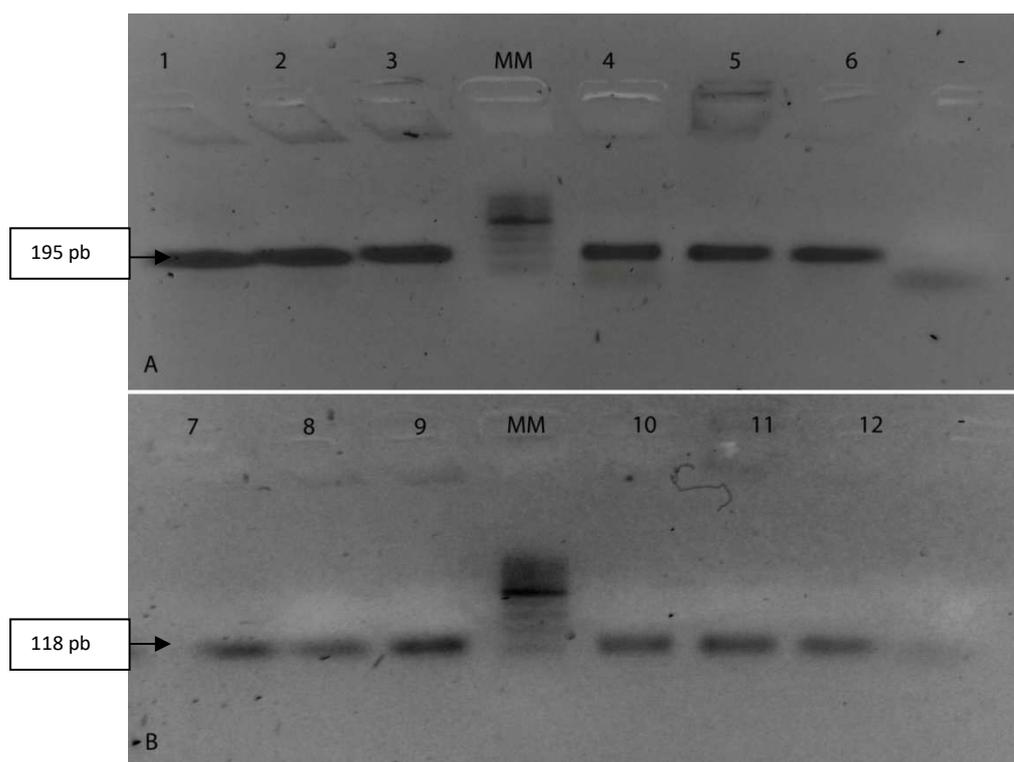


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del gen *Alt a1*. **A-** Amplificación para los cebadores específicos del género *Alternaria*: Dir5cAlta1 y Inv4Alta1 de 195 pb. Calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 cepas de *Alternaria alternata*; **B-** Amplificación para los cebadores específicos del grupo-especie *A. alternata*: altDAlta1 y AinflAlta1 de 118 pb. Calles 7, 8, 9, 10, 11 y 12 cepas de *A. alternata*. MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb; -: control negativo.

IV.3 Caracterización del potencial micotoxigénico y patogénico de cepas de *Alternaria alternata* aisladas de uva

IV.3.1 Potencial micotoxigénico

El potencial micotoxigénico, evaluado como la producción de micotoxinas en medio AMLM, de las cepas de *A. alternata* aisladas de uvas Malbec de la DOC San Rafael, vendimias 2011 y 2012 se muestra en la tabla 5. Como puede observarse, el 97 % de las 34 cepas de *A. alternata* evaluadas, fueron capaces de producir al menos 1 de las 3 micotoxinas evaluadas (AOH, AME y ATe).

Entre las cepas evaluadas ($n = 34$), se encontraron diferentes perfiles: el 53 % de las cepas co-produjo ATe, AOH y AME, el 18 % co-produjo ATe y AOH y el 3 % co-produjo ATe y AME. Además, el 21 % de las cepas fue capaz de producir exclusivamente ATe.

El ATe fue producido por la mayoría de las cepas (97 %) y a los mayores niveles (máximo de 1941 ppm y mínimo de 11,2 ppm), seguido por AOH producido por el 71 % de las cepas, con un máximo de 437 ppm y un mínimo de 1,8 ppm y AME producido por el 56 % de las cepas, con un máximo de 663,4 ppm y un mínimo de 0,6 ppm.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la producción de cada micotoxina (ATE, AOH y AME) entre cepas aisladas de bloques con tratamiento orgánico o sin tratamiento, ni tampoco entre cepas de las distintas vendimias (2011 y 2012).

Se encontró una correlación positiva entre la producción de AOH y AME ($r = 0,46$, $p = 0,006$), no siendo así entre AOH y ATe o AME y ATe.

TABLA 5: Potencial micotoxigénico en medio AMLM de cepas de *Alternaria alternata* aisladas durante las vendimias 2011 y 2012.

Vendimia	Tratamiento en viñedo	Aislado evaluado	Producción de toxinas (ppm)		
			ATe	AME	AOH
2011	orgánico	20	162,1	153,4	nd
		25.1	1070,8	nd	12,2
		27	44,2	nd	nd
	sin tratamiento	2	265,3	149,5	29,6
		3	1056,8	63,7	27,2
		4	583,8	16,0	35,1
		7	1176,8	0,6	8,6
		8	225,1	nd	nd
		15	1080,0	236,5	146,8
		18	136,0	nd	18,2
2012	orgánico	5.1	73,5	nd	nd
		5.2	55,5	123,9	1,8
		5.3	798,4	nd	nd
		5.4	459,4	nd	nd
		5.5	73,6	663,4	142,8
		7.1	148,2	5,7	19,3
		7.2	282,1	9,9	107,5
		7.3	441,3	22,6	2,2
		7.4	46,0	nd	nd
		7.5	1941,1	10,8	60,4
		8.1	11,2	nd	nd
		8.3	119,9	289,5	180,6
		8.4	726,5	6,7	17,1
		Sin tratamiento	1.1	655,3	139,5
	1.2		387,1	117,7	19,9
	1.4		45,1	nd	12,3
	2.1		152,9	nd	nd
2.2	594,1		nd	101,7	
2.3	101,9		34,5	71,3	
2.4	433,7		0,9	7,4	
2.5	1412,0	nd	26,9		
3.1	nd	nd	nd		
3.3	594,4	nd	21,2		
3.5	539,1	24,9	2,9		
Promedio* 2011-2012			481,6	108,9	62,9

ATe: Ácido tenuazónico; AOH: Alternariol; AME: Alternariol monometil éter.
nd: no detectado nivel inferior al LC
* Promedio de las cepas productoras.

IV.3.2 Patogenicidad en uva variedad Malbec

Se realizó una evaluación de la capacidad patogénica en uva Malbec de 29 cepas de *A. alternata*, previamente identificadas y caracterizado su potencial micotoxigénico. Los grados de patogenicidad posibles fueron clasificados como: 1- poco patogénico: lesión que abarca menos de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la uva; 2- moderadamente patogénico: lesión que abarca más de $\frac{1}{4}$ hasta $\frac{1}{2}$ de la superficie de la uva; 3- muy patogénicos lesión que abarca más de $\frac{1}{2}$ hasta toda la superficie de la uva (Fig. 15).

El grado de patogenicidad en uva de las 29 cepas de *A. alternata* evaluadas se resume en la tabla 6. El 55 % de las cepas resultaron muy patogénicas, el 31% moderadamente patogénicas y sólo una porción menor (14 %) poco patogénicas.

No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre la capacidad patogénica de las cepas aisladas de bloques con tratamiento orgánico o sin tratamiento, ni tampoco de las distintas vendimias (2011 y 2012).

Tampoco se encontró tendencia o correlación entre el grado de patogenicidad obtenido y la capacidad de producir AOH, AME y ATe de las cepas de *A. alternata* evaluadas.



Figura 15: Resultados de ensayo de patogenicidad de cepas de *Alternaria alternata* en uvas Malbec, luego de la incubación por 7 días a 25 °C y 100 % de HR del control negativo (A); cepa de *A. alternata* grado 1-poco patogénico (B); cepa de *A. alternata* grado 2-moderadamente patogénico (C); cepa de *A. alternata* grado 3- muy patogénico (D).

TABLA 6: Patogenicidad de cepas de *Alternaria alternata* en uva

Vendimia	Tratamiento en viñedo	Aislado evaluado	Grado de patogenicidad*	
2011	orgánico	20	1	
		25.1	2	
		27	3	
	Sin tratamiento	2	3	
		4	1	
		8	3	
		15	1	
		18	2	
	2012	orgánico	5.1	3
5.2			2	
5.3			2	
5.4			3	
5.5			2	
7.1			3	
7.2			3	
7.3			3	
7.4			1	
7.5			3	
8.1			3	
8.3			2	
Sin tratamiento			1.2	3
1.4			3	
2.1			3	
2.2		3		
2.3	3			
2.4	2			
2.5	2			
3.3	3			
3.5	2			

* 1: poco patogénico; 2: moderadamente patogénico; 3: muy patogénico.

IV.4 Optimización y validación de una metodología analítica para la extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas

IV.4.1 Optimización de las condiciones de extracción

Como criterio de elección para elegir el solvente de extracción óptimo se buscó una alta solubilidad de ATe, una alta selectividad (baja co-extracción de los componentes de la matriz) y un gran porcentaje de recuperación del analito (R%).

Como resultado, usando acetato de etilo y hexano, los cromatogramas obtenidos exhibieron picos definidos y buena sensibilidad para ATe. En contraste, cuando se utilizó acetonitrilo los cromatogramas no tuvieron la resolución adecuada, apareciendo parcialmente superpuestos con interferencias de la matriz. El acetato de etilo fue elegido como solvente de extracción, ya que demostró la máxima R % para ATe (Fig. 16).

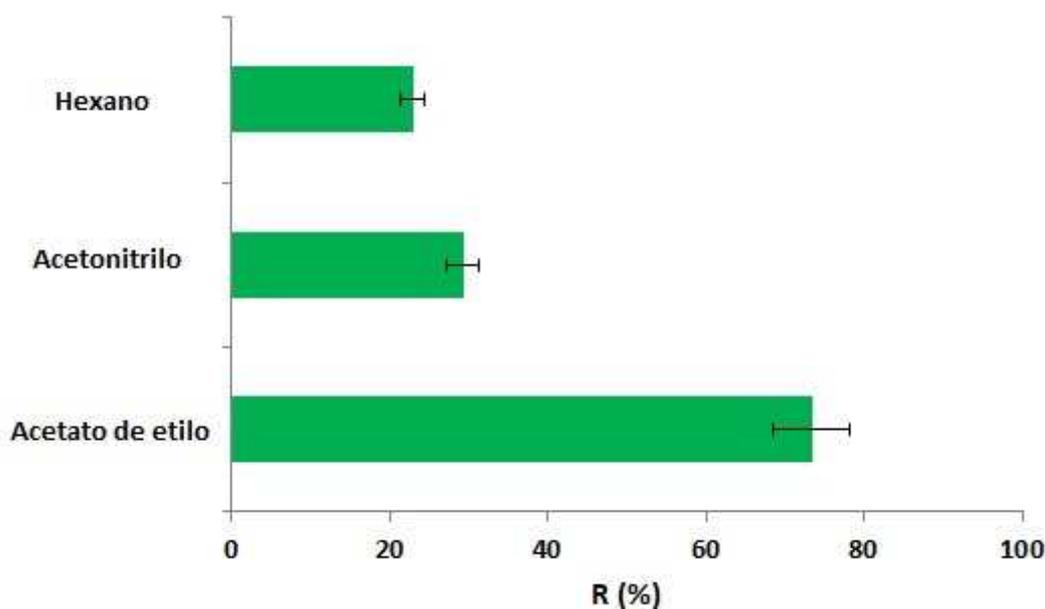


Figura 16: Porcentaje de recuperación (R %) de ácido tenuazónico obtenidos utilizando hexano, acetonitrilo y acetato de etilo como solventes de extracción.

El volumen óptimo de acetato de etilo resultó de 5 mL, debido a la mayor recuperación de ATe lograda, como se muestra en la figura 17 a. También, se evaluó la relación muestra: agua: solvente óptima manteniendo los mismos niveles de adición de ATe en cada ensayo y un volumen constante de 5 mL del solvente de extracción (acetato de etilo). El mayor porcentaje de recuperación (R %) se obtuvo utilizando la combinación de 2,5 g muestra de uva+ 2,5 mL agua acidificada+ 5 mL acetato de etilo, como se muestra en la figura 17 b. Un incremento en la cantidad de muestra a 5 g con el resto de los factores constantes, disminuyó el porcentaje de recuperación obtenido. Asimismo, no agregar agua en la muestra de uva, manteniendo la acidificación de 1 % (ácido fórmico adicionado directamente a la muestra), presentó un porcentaje de recuperación 15 % menor a la combinación de 2,5 g muestra de uva+ 2,5 mL agua acidificada+ 5 mL acetato de etilo.

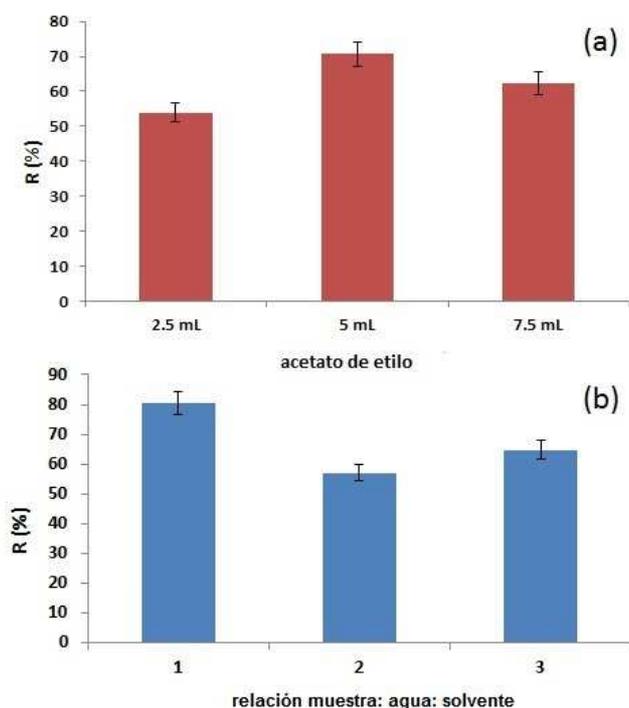


Figura 17: Porcentajes de recuperación (% R) de ácido tenuazónico obtenidos con (a) distintos volúmenes de acetato de etilo, (b) distintas relaciones muestra: agua: solvente manteniendo un volumen constante de 5 mL de acetato de etilo.

La acidificación durante la extracción mediante la adición de ácido fórmico mejoró el valor de recuperación de ATe entre 13 y 23 % (Fig. 18), obteniéndose los mejores valores con la adición de 1 % de ácido fórmico.

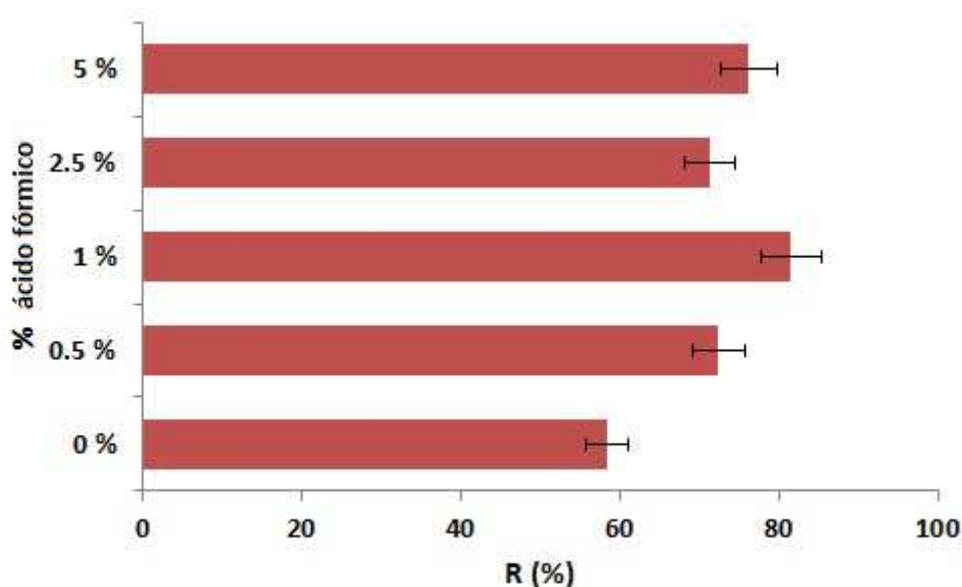


Figura 18: Porcentajes de recuperación (% R) de ácido tenuazónico obtenidos mediante la adición de ácido fórmico.

IV.4.2 Optimización de la limpieza

El criterio utilizado para seleccionar un sorbente o sal anhidra para la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) fue la obtención de un alto porcentaje de recuperación de ATe y la minimización de las interferencias en matriz.

Como resultado, el agregado de CaCl_2 logró la mayor recuperación (83 %), teniendo una adecuada reducción en los componentes de matriz, comparado con las otras opciones evaluadas. El uso de MgSO_4 y la combinación $\text{MgSO}_4 + \text{CaCl}_2$, arrojó porcentajes de recuperación del 72 y 74 %, respectivamente, con una señal de fondo similar a la obtenida con CaCl_2 .

En general, el uso de diferentes sorbentes y sus combinaciones mostró una reducción en los porcentajes de recuperación obtenidos. En el caso de PSA (amina primaria y secundaria), se observó una reducción considerable en la señal de fondo, obteniendo una respuesta señal: ruido similar a la lograda con

CaCl₂, pero el valor de recuperación del analito también disminuyó cerca de 24 %. Para mejorar entonces el porcentaje de recuperación de ATe manteniendo las facetas beneficiosas de limpieza del PSA, se evaluó la aplicación de un paso adicional de corrección de pH, utilizando ácido fórmico adistintos niveles (0,2 y 4 %). Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron un incremento de la recuperación de 52 % y 66 % para los niveles de 2 y 4 % de ácido fórmico, respectivamente, pero la señal de fondo de los cromatogramas también aumentó (Fig. 19). En el caso de los sorbentes C₁₈ (octadecil-silano) y GCB (negro de carbón grafitado), los porcentajes de recuperación de ATe obtenidos fueron de 65 y 75 %, respectivamente. Combinando C₁₈ y GCB con CaCl₂ y PSA (con el agregado de 4 % de ácido fórmico), los porcentajes de recuperación fueron de 65 a 68 %. El GCB, redujo la cantidad de picos interferentes en el primer segmento del cromatograma, pero cuando se combinó con PSA, se observó un aumento de los picos interferentes.

Tampoco se obtuvieron mejoras en el porcentaje de recuperación de ATe aplicando el paso adicional de corrección de pH (adicionando ácido fórmico a niveles de 0, 2 y 4 %) a las sales de secado.

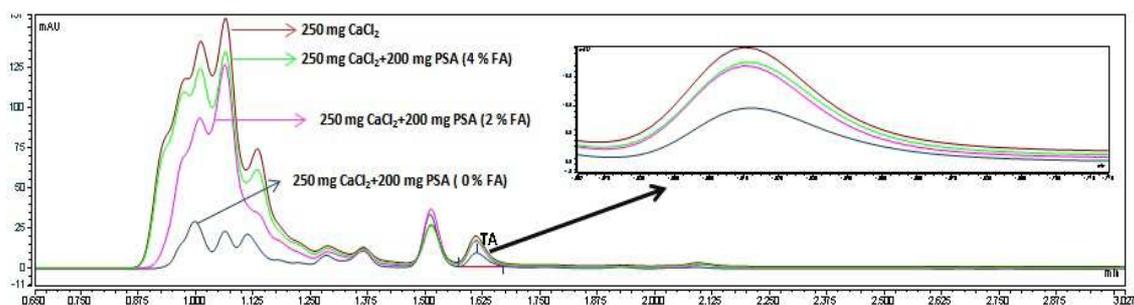


Figura 19: Cromatogramas obtenidos para ácido tenuazónico aplicando distintas opciones de limpieza al extracto. Agregado de 250 mg CaCl₂ solo o en combinación con 200 mg de PSA (adicionando 4, 2 o 0 % de ácido fórmico).

IV.4.3 Validación del método propuesto

Las características analíticas (figuras de mérito) del método optimizado se encuentran compiladas en la tabla 7. Como puede observarse, las recuperaciones de ATe obtenidas para 2,5 g de muestra de uva estuvieron en el rango de 81,9 - 97,1 %, y las desviaciones estándar asociadas variaron entre 2,0 y 7,5 %, para todos los niveles de adición estudiados. El HorRat de ATe, calculado a los 3 niveles de adición estudiados, fue de 0,02, 0,02 y 0,11, respectivamente. La exactitud y precisión inter-día, fue evaluada con 2,5 g de uva enriquecida con ATe al nivel de 0,05 µg/g (LC) y procesada por triplicado durante 3 días consecutivos. En este caso, la recuperación del método fue de 112,5 %, con un RSD de 13,4 %.

La comparación de las respuestas de los estándares en solvente y en matriz, mostraron un efecto matriz de -34 % para ATe, causada por interferencias ocurridas durante el análisis por HPLC-UV. Se usaron entonces, para compensar los errores asociados a las interferencias observadas, los estándares en matriz para la técnica de calibración, a modo de lograr cuantificaciones exactas del analito target.

Tabla 7: Rendimiento analítico, recuperaciones absolutas (% , como una estimación de la exactitud) y precisión del método propuesto para uvas enriquecidas a diferentes niveles de concentración de ATe.

Rango lineal (µg/g)	r ²	LD (µg/g)	LC (µg/g)	Recuperación (%)=DS, n=3 réplicas			Precisión (RSDs, %)	
				0,05 µg/g	0,5 µg/g	5 µg/g	Intra-día ^a	Inter-día ^b
ATe LC-5	0,9921	0,01	0,05	96,3±5,5	81,9±2,0	97,1±7,5	4,6	11,4

^an=3 réplicas de la muestra de uva enriquecidas a nivel 0,05 µg/g procesadas en el mismo día

^bn=9 réplicas de la muestra de uva enriquecidas a nivel 0,05 µg/g procesadas en 3 días consecutivos

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación.

La figura 20 muestra los cromatogramas obtenidos para el estándar de ATe, una muestra de uva enriquecida con ATe y una muestra de uva positiva (naturalmente contaminada, muestra M14). El tiempo de retención de ATe obtenido al analizar la muestra M14, no mostró diferencias con los obtenidos con el estándar o con la muestra de uva enriquecida con ATe, así como no se detectaron interferencias al tiempo de retención del analito.

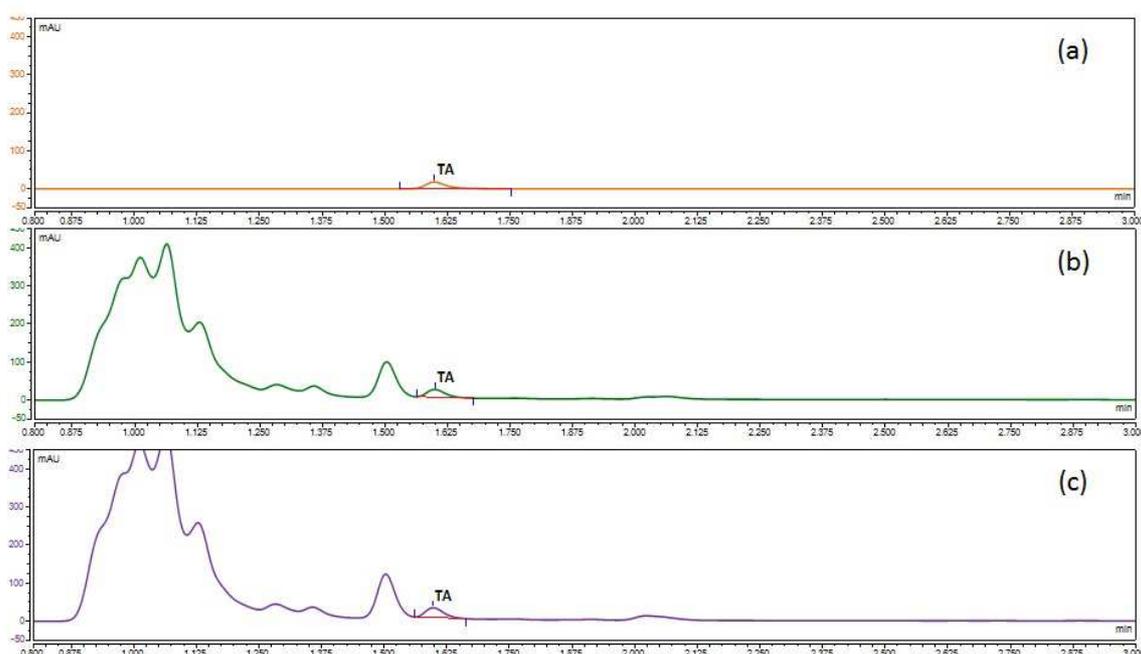


Figura 20: Cromatogramas obtenidos para (a) estándar de ácido tenuazonico, 0,5 $\mu\text{g/g}$ (b) muestra de uva enriquecida con 0,5 $\mu\text{g/g}$ de ATe y (c) muestra positiva M14.

IV.5 Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

Para el estudio de la incidencia natural de ATe en uvas Malbec pertenecientes a la DOC San Rafael, se aplicó el método optimizado de QuEChERS-HPLC-UV a un total de 14 muestras representativas recolectadas a tiempo de cosecha durante la vendimia 2014-2015 (2015). Los niveles de la toxina en las muestras analizadas se resumen en la tabla 8. El ATe estuvo presente en más del 57 % de

las muestras analizadas, con un 50 % de incidencia en muestras asintomáticas (M1 a M13) y una concentración máxima de 0,096 $\mu\text{g/g}$, mientras que la muestra con contaminación fúngica visible presentó una concentración máxima de 0,595 $\mu\text{g/g}$ (muestra M14, Fig. 21c).

Tabla 8: Incidencia natural de ácido tenuazónico en muestras de uva Malbec. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/g}$) con sus desviaciones estándar, n=3 replicas.

Muestra	Nivel encontrado
M1	n.d.
M2	n.d.
M3	n.d.
M4	n.d.
M5	n.d.
M6	n.d.
M7	<LC
M8	<LC
M9	0,096 \pm 0,003
M10	0,057 \pm 0,001
M11	0,093 \pm 0,005
M12	<LC
M13	<LC
M14	0,595 \pm 0,05
Frecuencia de la ocurrencia	57%

n.d., no detectado por ser menor al Límite de Detección (0,01 $\mu\text{g/g}$)
 <LC, menor al Límite de Cuantificación (0,05 $\mu\text{g/g}$)

IV.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por *Alternaria alternata*

IV.6.1 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas de *Alternaria alternata* en medio de cultivo simil uva (*in vitro*)

IV.6.1.1 Evaluación del efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento

Durante la evaluación de los factores abióticos (a_w y temperatura) sobre el crecimiento de las 3 cepas de *A. alternata* en un medio de cultivo simil uva, en general se observó que para las 3 cepas evaluadas los niveles óptimos de a_w , variaron en un rango de 0,95 a 0,99 a una temperatura óptima de 25 °C. Las máximas velocidades de crecimiento se observaron al mayor nivel de a_w (0,99) y a 25 °C, con disminución de las velocidades de crecimiento a medida que la a_w del medio era reducida. Las tres cepas fueron capaces de crecer a la menor a_w ensayada (0,95) a 15, 25 y 30 °C (Fig. 21).

Para la cepa 5.5 también se observó un muy buen crecimiento a 30 °C, no observándose diferencia con la velocidad de crecimiento a 25 °C para 0,95, 0,96, 0,97 y 0,98 a_w . De hecho, para esta cepa, la velocidad de crecimiento a 30 °C a 0,97 y 0,98 a_w fue mayor que a 0,99.

Para la cepa 7.5, la velocidad de crecimiento a 30 °C fue mayor a 0,98 a_w , seguida por las velocidades a 0,99, 0,97, 0,95 y 0,96 de a_w .

Para la cepa 25.1, la velocidad de crecimiento a 25 °C fue superior a 0,99 a_w , seguida por 0,98 a_w y el resto de las actividades acuosas evaluadas (con igual velocidad de crecimiento).

Con los datos obtenidos de las 3 cepas evaluadas, se graficaron mapas de contorno a fin de identificar las velocidades de crecimiento óptimas y marginales para las cepas de *A. alternata* (Fig. 22).

El análisis de la varianza del efecto de un único factor (cepa, a_w y temperatura), dos y tres vías de interacción mostró que todos los factores por si solos y todas las interacciones fueron estadísticamente significativas sobre la velocidad de crecimiento, siendo el factor temperatura el más importante (Tabla 9).

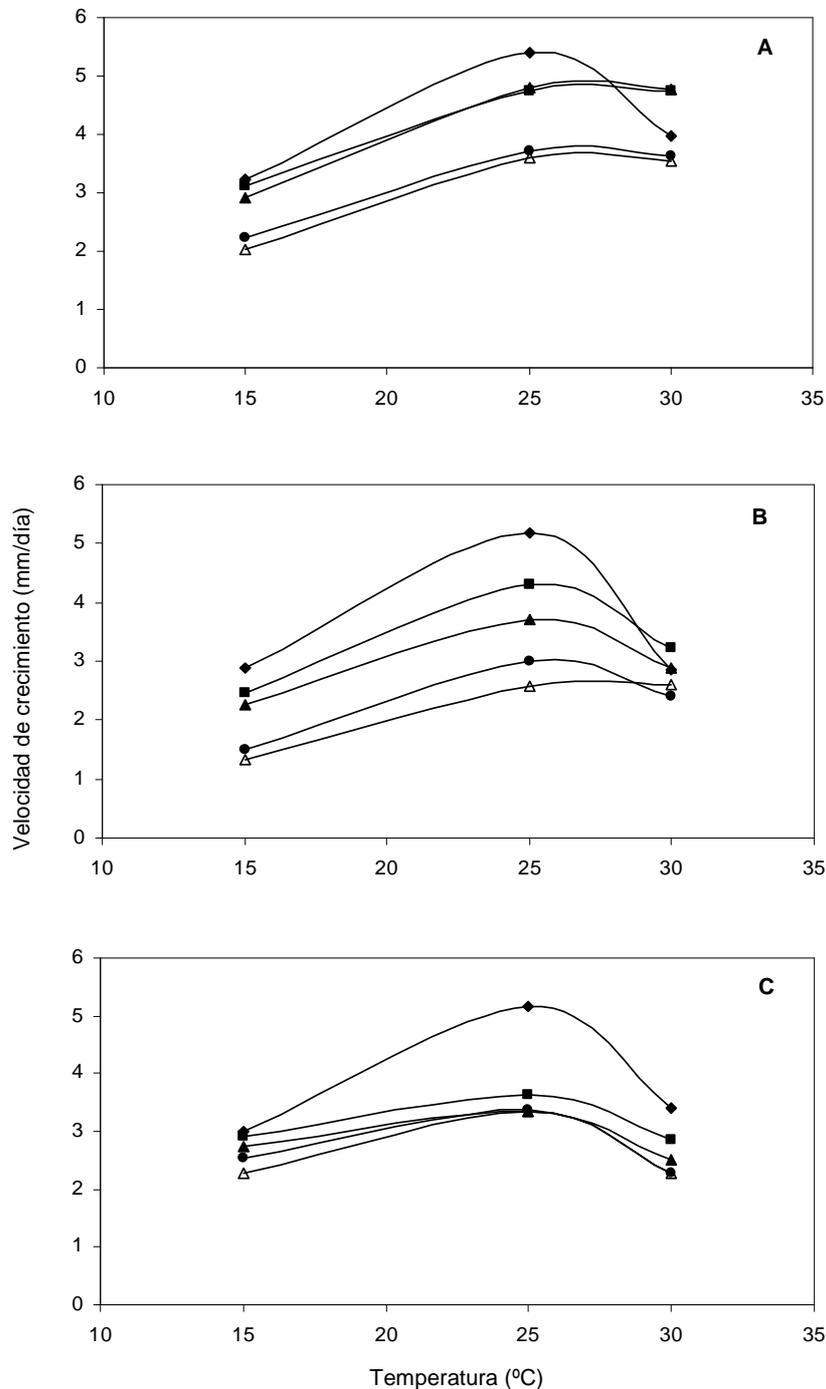


Figura 21: Efecto de la temperatura y la actividad de agua, 0,95 (Δ), 0,96 (\bullet), 0,97 (\blacktriangle), 0,98 (\blacksquare) y 0,99 (\blacklozenge) sobre el crecimiento de *Alternaria alternata*, 5.5 (A), 7.5 (B) y 25.1 (C), sobre un medio de cultivo simil uva.

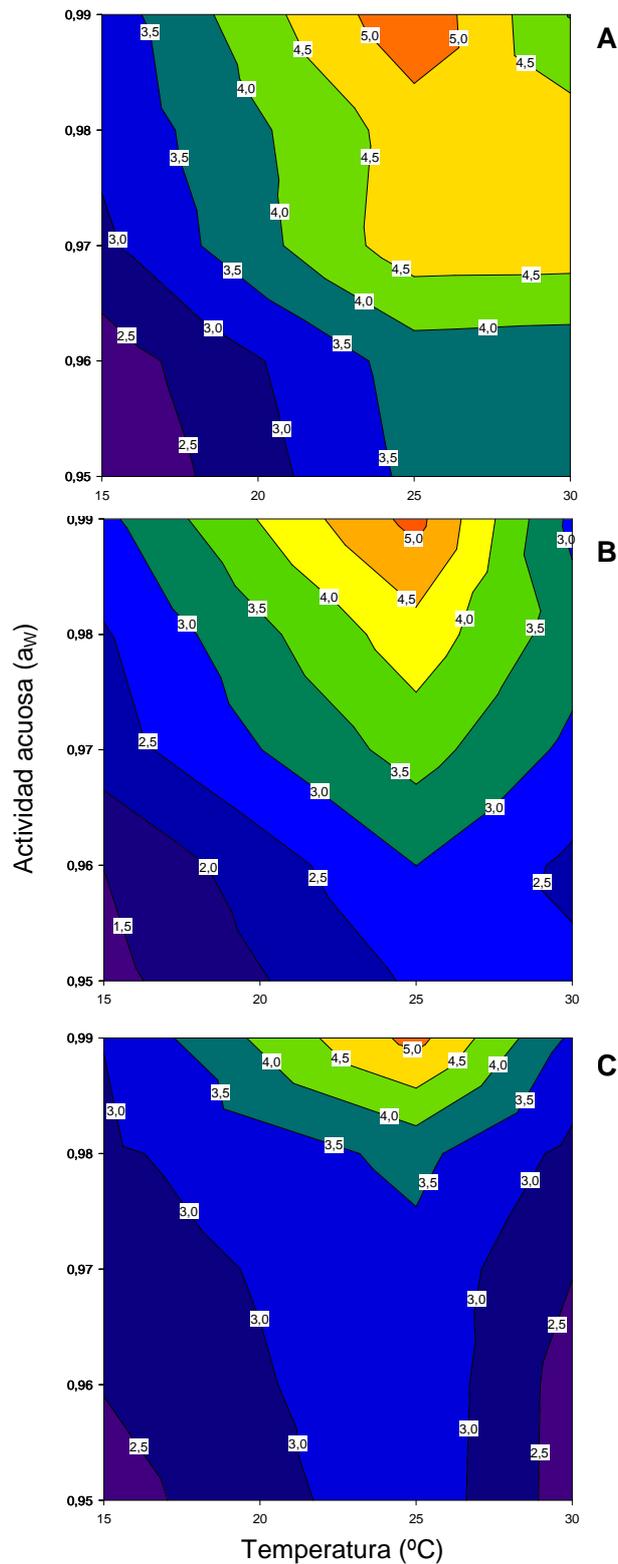


Figura 22: Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1.

Tabla 9: Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (c) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de *Alternaria alternata* en un medio simil uva.

Fuente de variación	DF ^a	MS ^b	F ^c
c	2	9,831	813,197*
a_w	4	7,017	580,458*
T	2	23,692	1959,753*
c x a_w	8	0,510	42,154*
c x T	4	2,031	168,006*
a_w x T	8	0,884	73,109*
c x a_w x T	16	0,156	12,944*

*Significancia $P < 0,001$.

^a Grados de libertad.

^b Cuadrado medio.

^c F-Snedecor.

IV.6.1.2 Efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de alternariol y alternariol monometil éter

En una instancia previa a comenzar el estudio se realizó un ensayo de recuperación de AOH y AME en el medio simil uva 2 %. Dentro del rango de enriquecimiento utilizado (10-1000 ng/g), se observó una recuperación de 87-94 % y 89-92 % para AOH y AME, respectivamente. El límite de detección para ambas toxinas analizadas, basado en la relación señal-ruido (3:1) fue de 0,001 $\mu\text{g/g}$, y los límites de cuantificación fueron establecidos como tres veces el límite de detección. Debido a los buenos niveles de recuperación obtenidos se prosiguió con el estudio *in vitro*.

En el estudio sobre la influencia de la a_w , la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de AOH y AME por 3 cepas de *A. alternata*, en un medio de cultivo simil uva, se observó que para 1 de las cepas (25.1) no hubo producción significativa de AOH y AME a 0,95 y 0,96 a_w en todas las temperaturas evaluadas. La producción máxima de AOH se observó a 25 °C y 0,99 de a_w para las 3 cepas, pero a los 14 días de incubación para las cepas 25.1 y

a los 21 días para las cepas 5.5 y 7.5. De igual manera, las mismas condiciones generaron la máxima producción de AME, siendo los tiempos de incubación de 14 o 21 días indistintos para la cepa 7.5. En general, se observó que los niveles máximos de AOH y AME producidos por la cepa 25.1 fueron mayores, siguiéndole en orden decreciente los producidos por las cepas 7.5 y 5.5 a 25 °C. Por el contrario, a 30 °C, los niveles de producción de AOH y AME fueron mayores para la cepa 7.5 siguiéndole el producido por la cepa 25.1 y 5.5, en el caso de AOH y el producido por la cepa 5.5 y 25.1, en el caso de AME. A 15 °C, la producción de AOH estuvo en el mismo orden para las 3 cepas, pero para AME la producción de la cepa 5.5 fue mucho mayor que el resto.

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, la producción de AOH fue mayor a 25 °C, siguiéndole en orden decreciente las temperaturas de 30 °C y 15 °C para las 3 cepas evaluadas. La producción de AME siguió el mismo orden de temperatura para las cepas 7.5 y 25.1, aunque en esta última la producción a 15 °C como a 30 °C fue similar. Por el contrario, para la cepa 5.5, la mayor producción observada a 25 °C, fue seguida por la producción a 15 °C y luego a 30 °C.

A 25 °C, la producción máxima de AOH se observó a 0,99 a_w a los 14 días para la cepa 25.1 y a los 21 días para las cepas 5.5 y 7.5. La cepa 5.5 fue capaz de producir AOH a 0,99, 0,98, 0,97 y 0,96 a_w a partir de los 7 días de incubación. La cepa 7.5 fue capaz de producir AOH tanto a 0,99 como a 0,98 a_w a partir de los 14 días de incubación. La cepa 25.1 sólo produjo AOH a 0,99 de a_w a los 14 días de incubación, experimentándose una caída abrupta del contenido en el tiempo de incubación siguiente. Con respecto a la máxima producción de AME a 25 °C, se obtuvo a 0,99 de a_w a los 14 días de incubación para la cepa 25.1, a los 14 como a los 21 días de incubación para la cepa 7.5 y a los 21 días de incubación para la cepa 5.5. La cepa 5.5 fue capaz de producir AME a todas las a_w evaluadas a partir de los 14 días de incubación. La cepa 7.5 fue capaz de producir AME a 0,99, 0,98 y 0,97 a_w de manera decreciente, a partir de los 14 días de incubación. La cepa 25.1 sólo produjo AME a 0,99 a_w a los 14 días de incubación.

A 30 °C, la máxima producción de AOH fue obtenida nuevamente a 0,99 aw pero a los 28 días de incubación para las 3 cepas. La cepa 5.5 sólo produjo AOH a 0,99 aw, a partir de los 14 días de incubación. Tanto la cepa 7.5 como la cepa 25.1 fueron capaces de producir AOH en orden decreciente a 0,99, 0,98 y 0,97 aw a partir de los 7- 14 días de incubación. Con respecto a AME, la máxima producción a 30 °C fue obtenida a 0,99 aw, a 14, 21 y 28 días de incubación para las cepas 25.1, 5.5 y 7.5, respectivamente. La cepa 7.5 fue capaz de producir AME a todas las aw evaluadas de manera decreciente de la mayor a la menor aw. Las cepas 25.1 y 5.5 fueron capaces de producir AME a 0,99 y 0,98 aw, con un pico a los 14 y 21 días de incubación, respectivamente.

A los 15 °C, se observó la mayor producción de AOH a 0,99 aw para las 3 cepas, pero a 14 días de incubación para la cepa 7.5 y 28 días para las cepas 5.5 y 25.1. Tanto la cepa 5.5 como la cepa 7.5 fueron capaces de producir AOH a todas las aw evaluadas, con un máximo a 0,99 aw a los 14 y 28 días de incubación, respectivamente y otro pico menor a 0,96 aw a 28 días de incubación para ambas cepas. La cepa 25.1 produjo AOH a 0,99, 0,98 y 0,97 de aw, a partir de los 14 días de incubación. A esta temperatura evaluada, AME tuvo su máxima concentración a 0,99 de aw a 21 días de incubación para la cepa 7.5 y a 28 días de incubación para las cepas 5.5 y 25.1. La cepa 5.5 fue capaz de producir AME a todas las aw ensayadas a partir de los 14 días de incubación, con un máximo de producción a 0,99 y otro menor a 0,96 a los 28 días de incubación. La cepa 7.5 fue capaz de producir AME a todas las aw ensayadas, con un máximo de producción a 0,99 aw y otro menor a 0,96 aw a los 21 días de incubación. La cepa 25.1 produjo AME tanto a 0,99, 0,98 y 0,97 aw a partir de los 14 y 21 días de incubación.

La producción de AOH y AME a 15, 25 y 30 °C durante los 28 días del período de incubación se observan en las figuras 23 y 24.

Con los datos obtenidos de las tres cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas y marginales de aw y temperatura, y el rango de las condiciones para la producción de AOH y AME (Fig. 25 y 26).

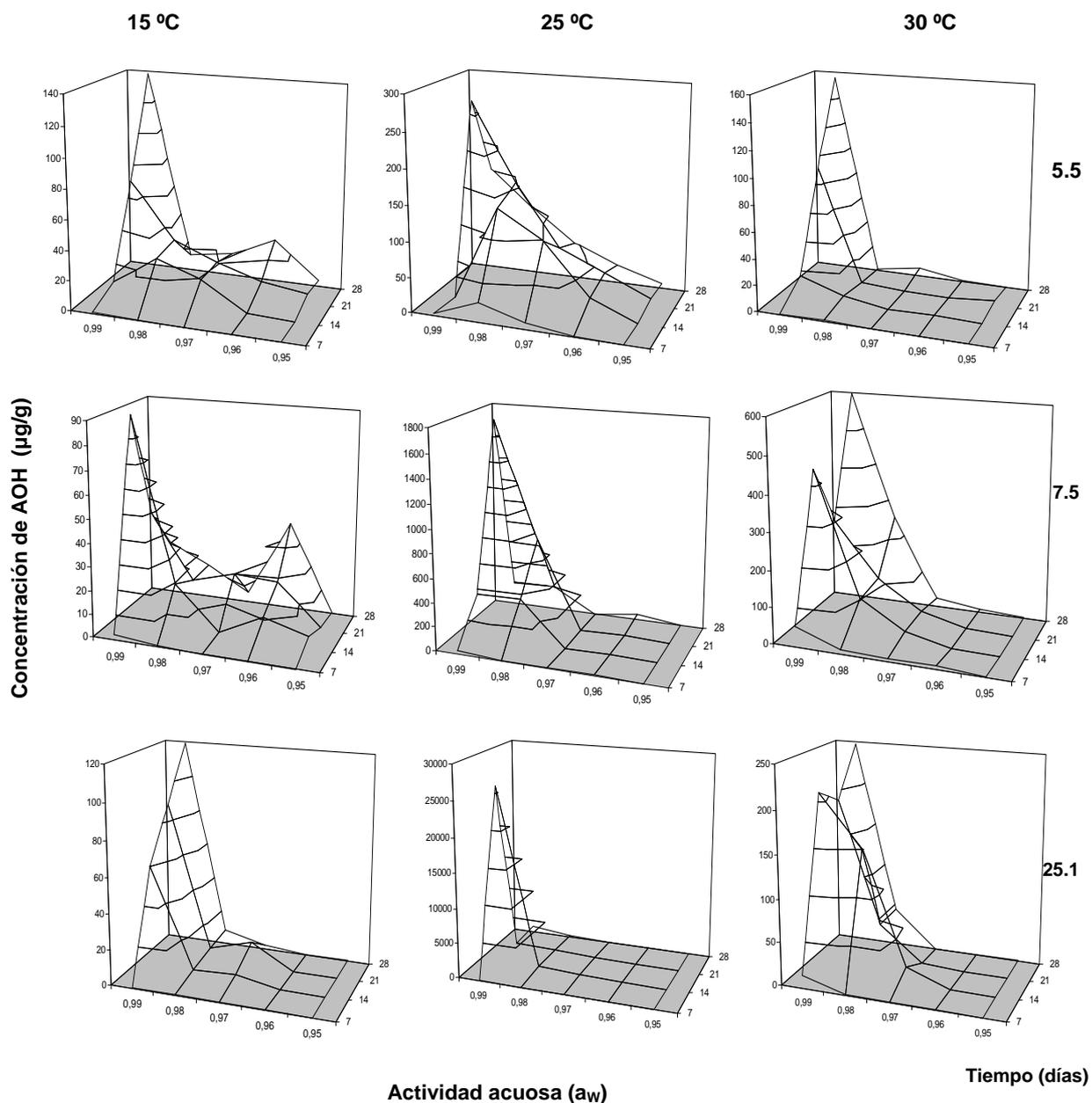


Figura 23: Niveles de alternariol (AOH) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, durante 28 días.

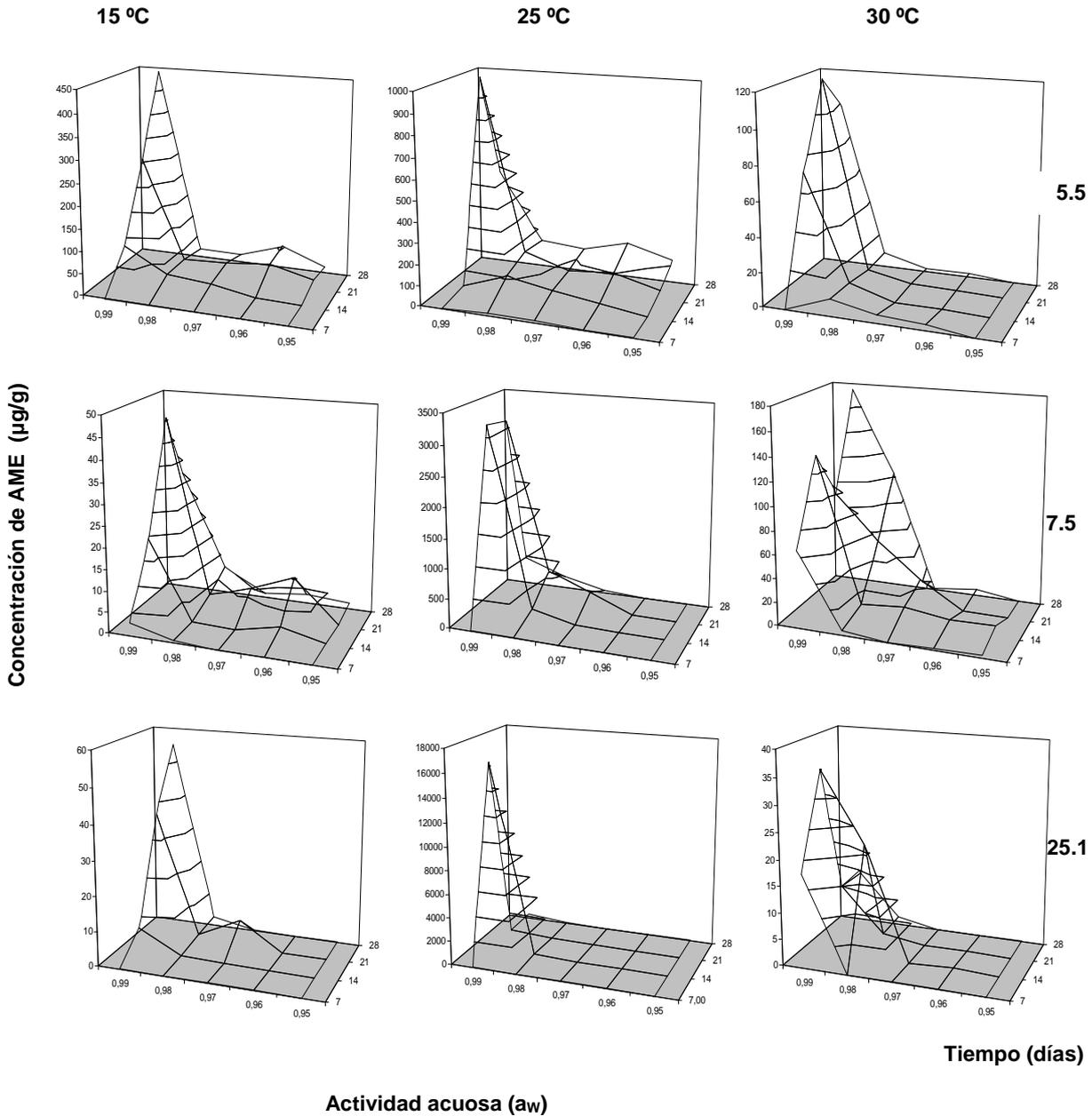


Figura 24: Niveles de alternariol monometil éter (AME) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, durante 28 días.

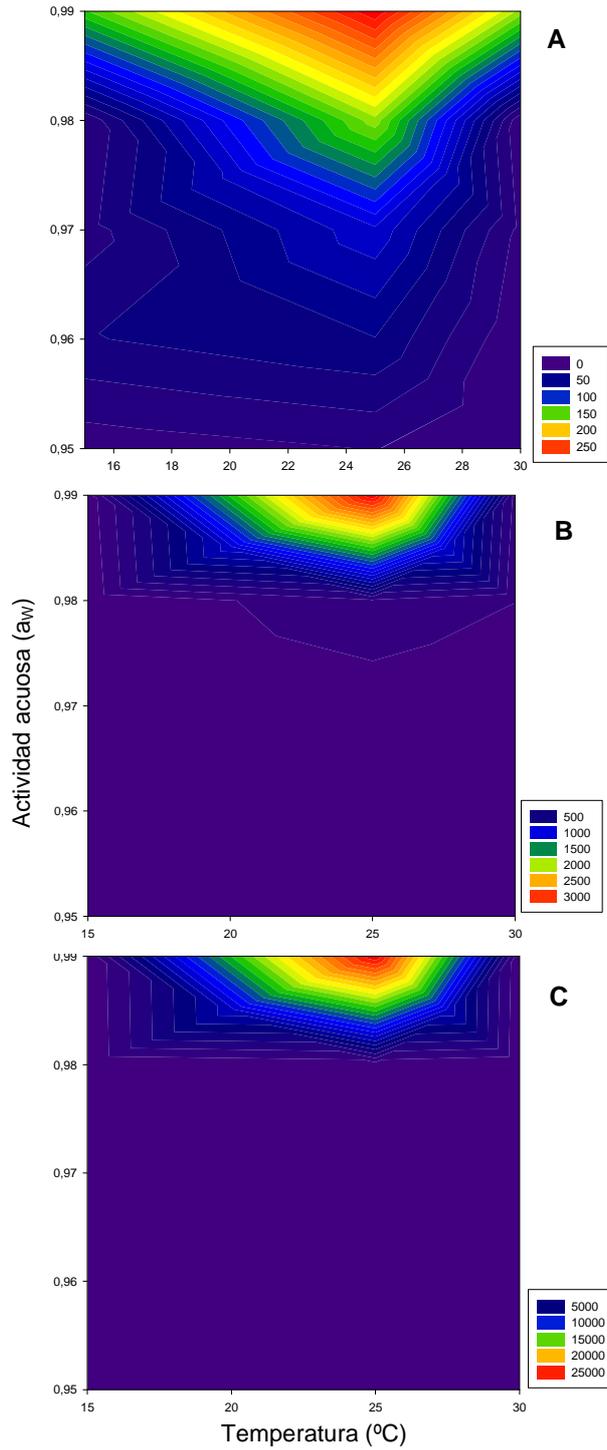


Figura 25: Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de alternariol ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1.

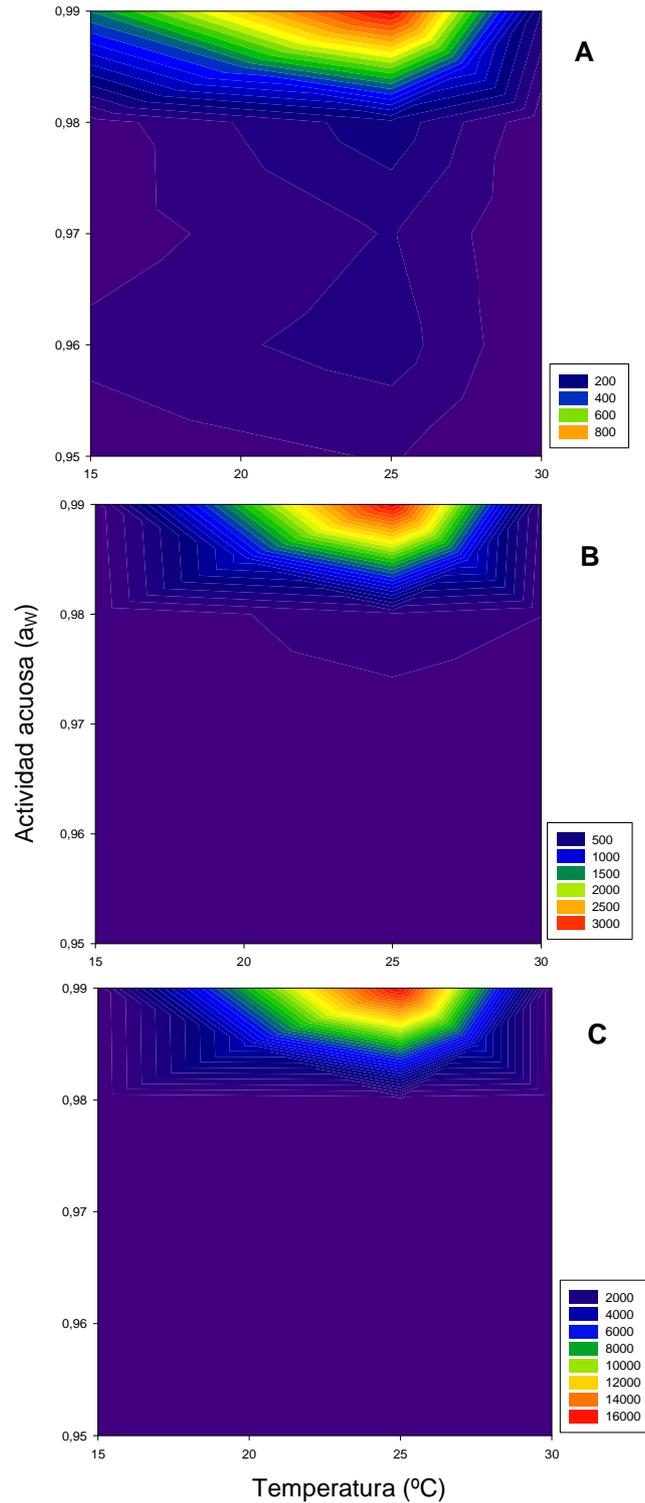


Figura 26: Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de alternariol monometil éter ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1.

Se realizó un análisis de la varianza del efecto de un único factor (temperatura, a_w y tiempo), dos y tres vías de interacción sobre la producción de AOH de las 3 cepas de *A. alternata* evaluadas (Tabla 10). Este análisis mostró que el factor a_w fue estadísticamente significativo para la producción de AOH en las 3 cepas, mientras que el efecto de los otros factores varió según la cepa considerada.

El análisis de la varianza del efecto de un único factor (temperatura, a_w y tiempo), dos y tres vías de interacción sobre la producción de AME de las 3 cepas de *A. alternata* evaluadas (Tabla 11), mostró que el efecto de estos factores varió según la cepa considerada.

Tabla 10: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre la producción de alternariol (AOH) por 3 cepas de *Alternaria alternata* en un medio de cultivo simil uva.

Fuente de variación	DF ^a	Cepa 5.5		Cepa 7.5		Cepa 25.1	
		MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c
T	2	33210,638	19,636*	2705749,554	5,820	40051380,246	5,009
i	3	23191,552	13,712*	711537,178	1,530	33198664,594	4,15
a_w	4	30831,884	18,229*	2532521,135	5,447*	39742293,860	4,971*
T x i	6	5098,976	3,015	685967,980	1,475	32457949,017	4,060*
T x a_w	8	5078,383	3,003	2026650,001	4,359*	36182047,872	4,525*
I x a_w	12	11142,123	6,588*	566780,098	1,219	32191126,571	4,026*
T x i x a_w	4	1909,279	1,129	55022,216	1,194	32077646,736	4,012*

*Significancia $P < 0,001$

^a Grados de libertad

^b Cuadrado medi.

^c F-Snedecor

Tabla 11: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre la producción de alternariol monometil éter (AME) por 3 cepas de *Alternaria alternata* en un medio de cultivo simil uva.

Fuente de variación	DF ^a	Cepa 5.5		Cepa 7.5		Cepa 25.1	
		MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c
T	2	200276,270	9,367*	24130,360	1,010	15125947,617	4,778
i	3	156630,289	7,326*	179298,142	7,502*	13040188,593	4,119
a_w	4	248504,137	11,623*	486462,504	20,353*	14691251,076	4,641
T x i	6	56753,952	2,654	259976,259	10,877*	12999595,904	4,107*
T x a_w	8	35662,930	1,668	131607,752	5,506*	14275763,990	4,510*
I x a_w	12	73362,160	3,431*	41933,753	1,754	12835179,237	4,055*
T x i x a_w	4	32141,577	1,503	105161,640	4,400*	12845952,108	4,058*

*Significancia $P < 0,001$

^a Grados de libertad

^b Cuadrado medio

^c F-Snedecor

IV.6.1.3 Efecto de la actividad acuosa, temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de ácido tenuazónico

En una instancia previa a comenzar el estudio se realizó un ensayo de recuperación de ATe en el medio simil uva 2%. Dentro del rango de enriquecimiento utilizado (10-1000 ng/g), se observó una recuperación de 85-98 %. El límite de detección, basado en la relación señal-ruido (3:1) fue de 0,01 $\mu\text{g/g}$, y el límite de cuantificación fue establecido como tres veces el límite de detección. Debido a los buenos niveles de recuperación obtenidos se prosiguió con el estudio *in vitro*.

En el estudio sobre la influencia de la a_w , temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de ATe por las 3 cepas de *A. alternata*, en un medio de cultivo simil uva, se observó, que todas las cepas fueron capaces de producir ATe en las 3 temperaturas evaluadas (15, 25 y 30 °C). Las cepas 5.5 y 7.5 fueron capaces de producir ATe en todas las a_w evaluadas, mientras que la cepa 25.1 no fue capaz de producir ATe a 0,95 a_w en ninguna de las

temperaturas evaluadas. La concentración máxima de ATe fue obtenida a 25°C y 0,99 a_w para las 3 cepas, pero a diferentes tiempos de incubación: 14 días para la cepa 25.1 y 21 días para las cepas 5.5 y 7.5. A 25 °C los niveles de toxina producidos por la cepa 25.1 fueron mayores a los de la cepa 7.5, seguido por los de la cepa 5.5, mientras que a 30 °C la máxima producción fue obtenida por la cepa 7.5, seguida por las cepas 25.1 y 5.5. A 15 °C las cepas 7.5 y 25.1 produjeron niveles similares de toxina, seguidas por la cepa 5.5.

Considerando la temperatura de incubación, la máxima producción de ATe se observó a 25 °C para las 3 cepas, seguida por 30 y 15 °C para la cepa 7.5 y a la inversa para la cepa 25.1. Mientras que para la cepa 5.5 los niveles obtenidos a 30 y 15 °C fueron similares. A la máxima temperatura ensayada (30 °C), la producción máxima de ATe fue obtenida a 0,99 a_w a los 7 días de incubación para la cepa 25.1 y a los 14 días para las cepas 5.5 y 7.5. A 30 °C, tanto la cepa 5.5 como la cepa 7.5 fueron capaces de producir ATe a todas las a_w ensayadas, mientras que la cepa 25.1 fue capaz de producirla toxina a 0,99, 0,98 y 0,96 a_w , todas a partir de los 7 días de incubación.

A 25 °C, la producción máxima de ATe fue obtenida a 0,99 de a_w a los 14 días de incubación para la cepa 25.1 y a los 21 días de incubación para las cepas 5.5 y 7.5. Nuevamente, las cepas 5.5 y 7.5 fueron capaces de producir ATe a todas las a_w ensayadas a partir de los 7 días de incubación, mientras que la cepa 25.1 no fue capaz de producir ATe a 0,95 de a_w .

A 15 °C, la concentración máxima de ATe fue observada a 0,99 a_w para las cepas 25.1 y 5.5 pero a 14 y 21 días de incubación, respectivamente. Mientras que para la cepa 7.5 la máxima concentración de ATe fue obtenida a 0,96 a_w a los 14 días de incubación. Las cepas 5.5 y 7.5 fueron capaces de producir ATe a todas las a_w ensayadas a partir de los 7, 14 y 21 días de incubación en función de la a_w considerada. La cepa 25.1 sólo produjo ATe a las a_w 0,99, 0,98 y 0,97.

La producción de ATe a 15, 25 y 30 °C durante los 28 días del período de incubación se observa en la figura 27.

Con los datos obtenidos de las tres cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas de a_w y temperatura, y el rango de las condiciones para la producción de ATe (Fig. 28).

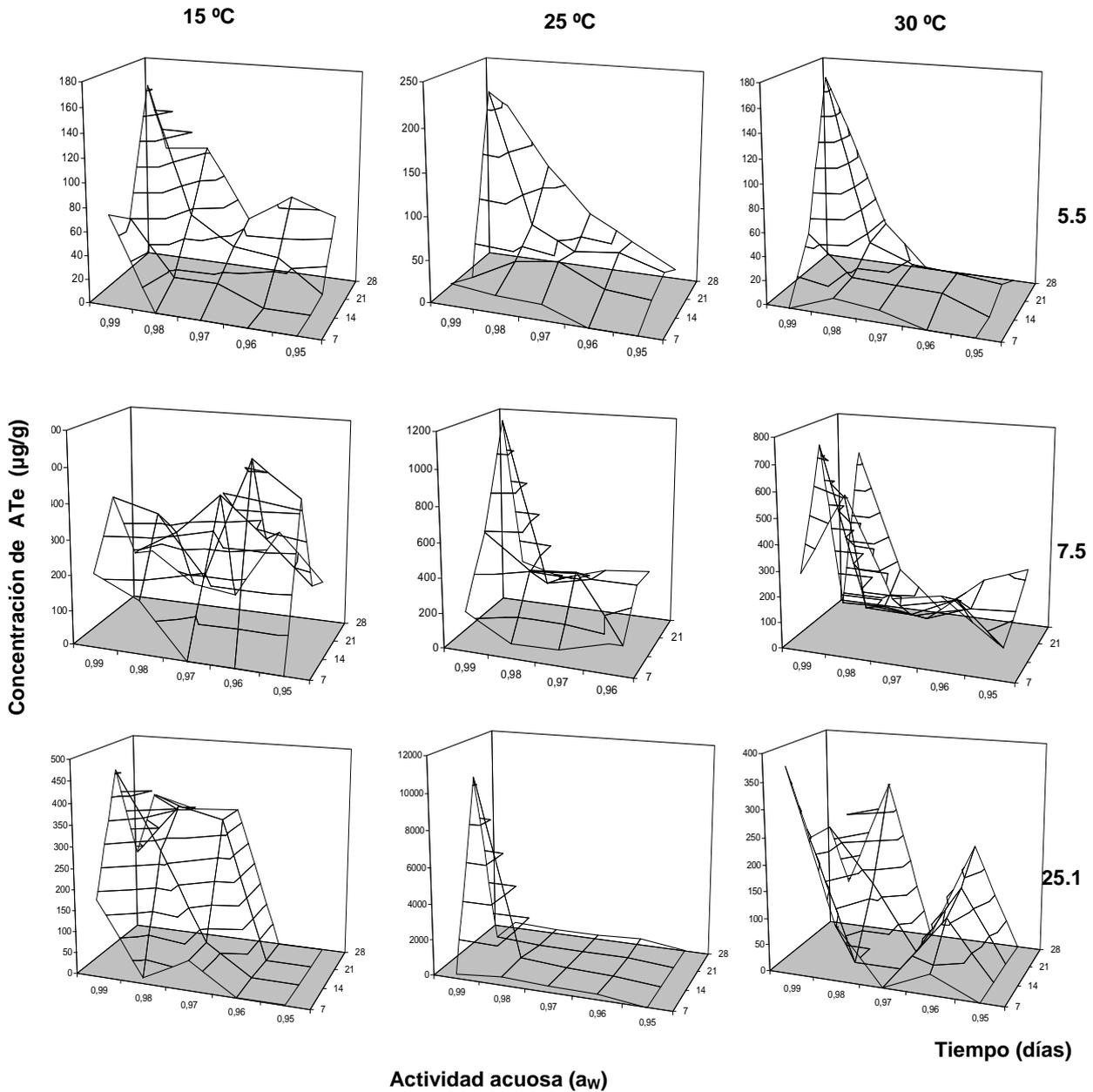


Figura 27: Niveles de ácido tenuazónico (ATE) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas 5.5, 7.5 y 25.1, en un medio de cultivo simil uva ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, durante 28 días.

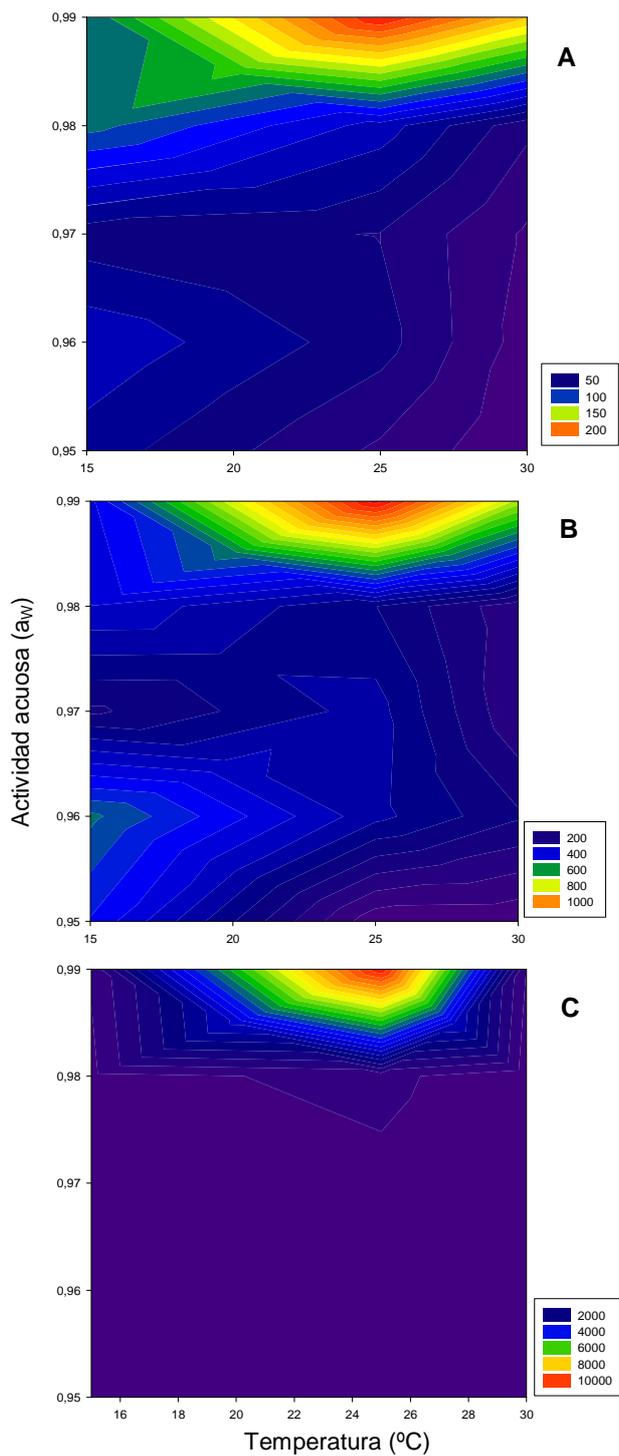


Figura 28: Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la actividad de agua y la temperatura. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de ácido tenuazónico ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 5.5, B) cepa 7.5, C) cepa 25.1.

El análisis de la varianza del efecto de un único factor (temperatura, a_w y tiempo), dos y tres vías de interacción sobre la producción de ATe de las 3 cepas de *A. alternata* evaluadas (Tabla 12), mostró que el efecto de estos factores varió según la cepa considerada.

Tabla 12: Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T) y tiempo de incubación (i) y sus interacciones sobre la producción de ácido tenuazónico (ATE) por 3 cepas de *Alternaria alternata* en un medio de cultivo simil uva.

Fuente de variación	DF ^a	Cepa 5.5		Cepa 7.5		Cepa 25.1	
		MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c	MS ^b	F ^c
T	2	1672,299	0,199	418959,984	9,266*	7309418,936	4,551
i	3	54471,158	6,483*	271013,529	5,994*	5046266,575	3,142
a_w	4	82781,853	9,852*	669830,144	14,815*	7491387,017	4,665
T x i	6	8237,097	0,980	241260,390	5,336*	5332375,728	3,320
T x a_w	8	5961,227	0,709	178767,203	3,954*	4939698,218	3,076
I x a_w	12	23834,374	2,837	121388,287	2,685	5402994,817	3,364*
T x i x a_w	4	6967,039	0,829	129730,055	2,869*	4942599,593	3,078*

*Significancia $P < 0,001$

^a Grados de libertad

^b Cuadrado medio

^c F-Snedecor.

IV.6.2 Evaluación del efecto de factores abióticos (temperatura y tiempo de incubación) sobre la producción de ácido tenuazónico por *Alternaria alternata* en uva (*in situ*)

La determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *A. alternata* en uvas incubadas en oscuridad a 25 °C durante 5 días, mostró diferencias entre las distintas cepas evaluadas. Para las cepas de *A. alternata* 5.5 y 25.1 la CMI resultó de $1,75 \times 10^4$ esporas/mL y para la cepa 7.5 fue de 5×10^4 esporas/mL, ocasionando porcentajes de infección de 97 ± 21 %, 97 ± 17 % y 98 ± 18 %, respectivamente.

Durante el estudio de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre la producción de ATe en uva, se observó que para una de las cepas (5.5) no hubo producción significativa de ATe en ninguna de las condiciones de temperatura y tiempo evaluadas. La cepa 25.1 produjo mayores niveles de ATe que la cepa 7.5 en todas las condiciones ensayadas. La máxima producción de ATe se observó a las temperaturas tanto de 15 como 25 °C para ambas cepas, en el caso de la cepa 25.1 con una incubación de 24 días y para la cepa 7.5 tanto a 17 como a 24 días de incubación. A la máxima temperatura evaluada (35 °C) la mayor producción de ATe se observó a los 17 días para ambas cepas. Los niveles de ATe producidos a esta temperatura fueron los más bajos en relación a las otras 2 temperaturas evaluadas (15 y 25 °C). A 25 °C, la producción máxima de ATe se observó a 24 días de incubación para la cepa 25.1 y tanto a 17 como a 24 días para la cepa 7.5. Las dos cepas produjeron ATe a los 3 tiempos ensayados y con buenos niveles. A 15 °C, la temperatura más baja evaluada, se volvió a repetir el comportamiento advertido a 25 °C, la producción máxima de ATe se observó a 24 días de incubación para la cepa 25.1 y tanto a 17 como a 24 días de incubación para la cepa 7.5.

La producción de ATe a 15, 25 y 35 °C a los diferentes tiempos de incubación ensayados (10, 17 y 24 días) para cada una de las cepas evaluadas se observan en la figura 29.

Con los datos obtenidos se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación, y el rango de las condiciones para la producción de ATe (Fig. 30).

El análisis de la varianza del efecto de los factores individuales sobre la producción de ATe demostró que todos los factores individuales y sus interacciones, exceptuando la interacción entre cepa x tiempo y cepa x temperatura, influenciaron significativamente la producción de ATe por ambas cepas. Siendo el factor cepa el más importante (Tabla 13).

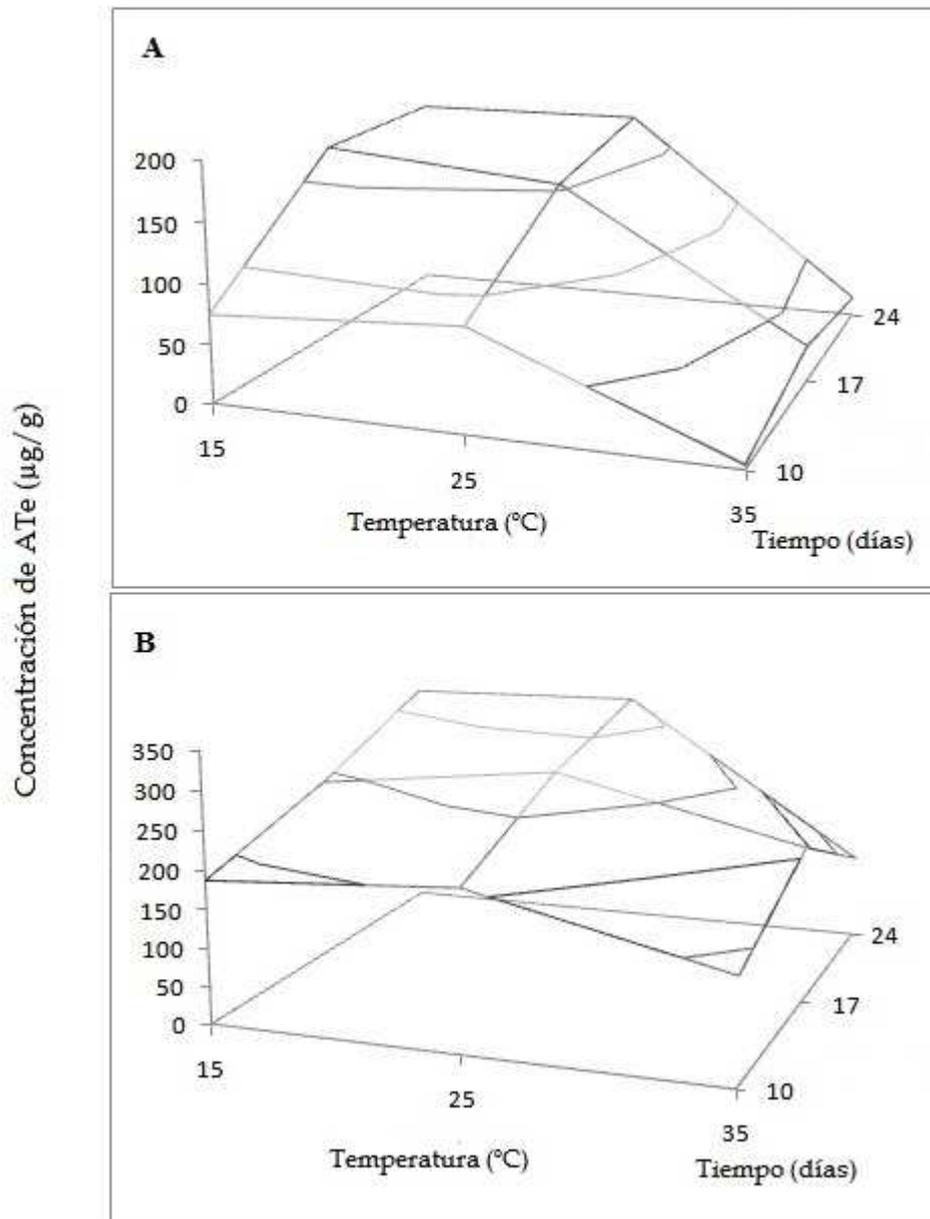


Figura 29: Niveles de ácido tenuazónico (ATE) ($\mu\text{g/g}$) producidos por *Alternaria alternata*, cepas (A) 7.5 y (B) 25.1, sobre bayas de uva Malbec a diferentes niveles de temperatura y tiempo de incubación.

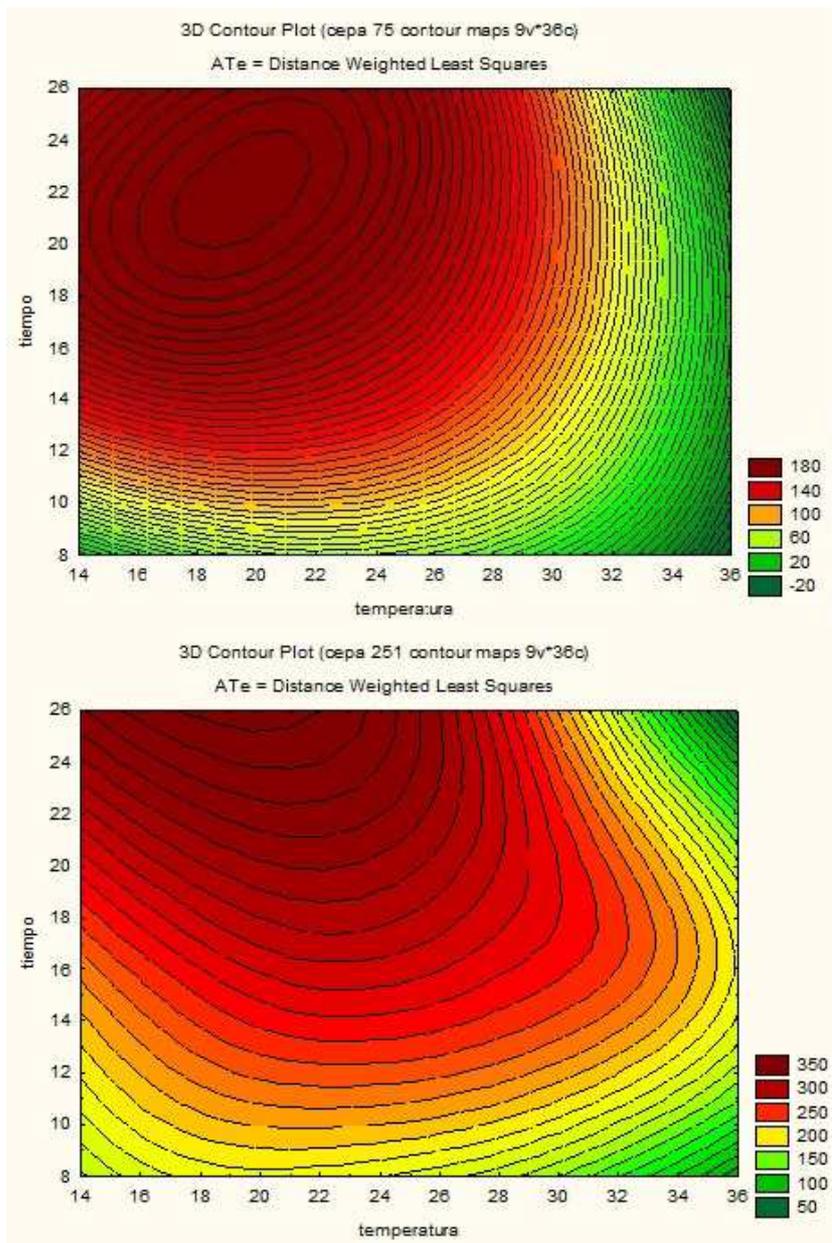


Figura 30: Mapas de contorno de *Alternaria alternata* en relación a la temperatura y el tiempo de incubación. Los colores en el contorno se refieren a las concentraciones medias de ácido tenuazónico ($\mu\text{g/g}$) A) cepa 7.5, B) cepa 25.1.

Tabla 13: Análisis de la varianza del efecto de la cepa (c), temperatura (T), tiempo de incubación (t), y sus interacciones sobre la producción de ácido tenuazónico por *Alternaria alternata* en uva.

Fuentes de variación	df ¹	MS ²	F ³
c	1	140700,6	1471,574*
T	2	53391,7	558,419*
t	2	18828,4	196,925*
c x T	2	624,6	6,533
c x t	2	41,0	0,429
T x t	4	4898,8	51,236*
c x T x t	4	1484,3	15,524*

¹Grados de libertad

²Cuadrado medio

³F-Snedecor.* Significativo P<0,001

IV.7 Aislamiento e identificación de levaduras y organismos tipo levadura de uvas Malbec de la DOC San Rafael

Se obtuvieron un total de 111 colonias con características de levadura de uva Malbec durante las vendimias 2011 (18), 2012 (27) y 2013 (66) que prevalecieron en su convivencia con los hongos filamentosos al cabo de 7 días de incubación en medio DRBC aplicando el método de siembra directa.

A fin de realizar la identificación de las colonias aisladas, se aplicó la técnica de PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2. El tamaño de los productos de PCR y el análisis de restricción con las endonucleasas proporcionaron 6 patrones de restricción diferentes entre los aislados (Tabla 14, Fig. 31 y 32).

El 82 % (91) del total de aislados durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 fue identificado como el organismo tipo levadura *A. pullulans*, el 6,3 % (7) como la levadura *H. uvarum*, el 5,4 % (6) como la levadura *M. pulcherrima*, el 2,7 % (3) como la levadura *Cryptococcus laurentii* II (*Cr. laurentii* II) y el 2,7 % (3) como la levadura *C. zemplinina*. El 0,9 % (1) restante, presentó características morfológicas típicas del género *Rhodotorula* y un patrón de PCR-RFLP que coincidió parcialmente con especies del género (*Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula acuta*, *Rhodotorula glutinis*) por lo que sólo se la identificó hasta nivel

de género como *Rhodotorula*. Los diferentes patrones de restricción de las cepas identificadas y el número de aislamientos según la vendimia considerada, se presentan en la tabla 14.

Como se puede observar en la tabla 14, hubo variaciones en las levaduras y organismos tipo levaduras presentes en los diferentes años evaluados. Durante el año 2011 en el viñedo de INTA Rama Caída se encontraron las especies *A. pullulans*, *M. pulcherrima* y *H. uvarum*, siendo estas dos últimas halladas sólo en el tratamiento orgánico. Durante 2012, también en el viñedo de INTA Rama Caída con tratamiento orgánico y no orgánico, fueron aisladas sólo cepas de la especie *A. pullulans*. En 2013, donde se muestrearon 6 viñedos pertenecientes a la DOC San Rafael, incluyendo el viñedo del INTA Rama Caída, se aislaron mayoritariamente *A. pullulans* seguida en menor medida por *Cr. laurentti II* (tratamiento orgánico) y *H. uvarum*, *C. zemplinina* y *Rhodotorula* spp. (tratamiento no orgánico).

Tabla 14: Patrones de restricción obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr de los aislados con características de levadura de las vendimias 2011, 2012 y 2013.

Especie	N° de aislamientos 2011/2012/2013	Producto amplificado (bp)	Fragmentos de restricción (pb)			
			<i>Cfo I</i>	<i>Dde I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8/27/56	600	100+180 +190	ND	150+450	130+180+ 290
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4/0/3	775	100+320 +340	80+100+ 170 +300	775	160+200+370
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	6/0/0	400	95+100+205	ND	100+280	190 + 200
<i>Cryptococcus laurentii II</i>	0/0/3	550	260+290	ND	100+375	270+270
<i>Candida zemplinina</i>	0/0/3	460	56+103+105 +196	ND	460	225+235
<i>Rhodothorula</i> spp.*	0/0/1	660	240+320	ND	660	150+230

ND, no determinado

*Identificada a nivel de género

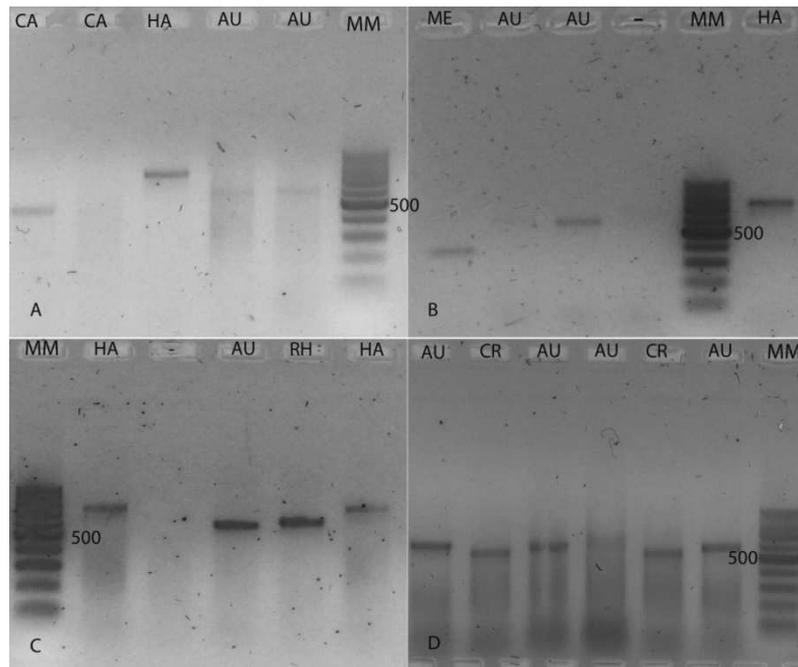


Figura 31: Productos amplificados por PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. Muestras sembradas correspondientes a los géneros *Candida* (CA), *Hanseniaspora* (HA), *Aureobasidium* (AU), *Metschnikowia* (ME), *Rhodotorula* (RH) y *Cryptococcus* (CR). Control negativo de reacción (-), MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb.

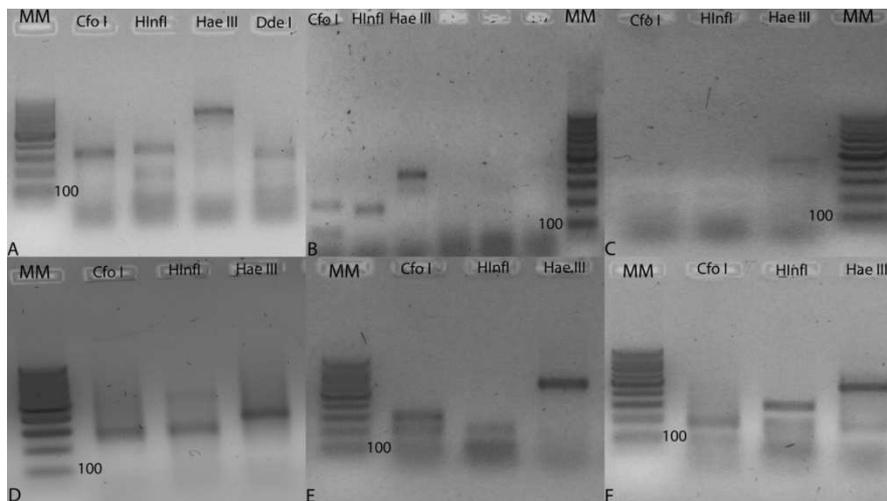


Figura 32: Fragmentos de digestión de los productos de PCR de A- *Hanseniaspora uvarum*, B- *M. pulcherrima*, C- *Candida zemplinina*, D- *Cryptococcus laurentii* II, E- *Rhodotorula* spp. y F- *Aureobasidium pullulans*, obtenidos con las enzimas *Cfo I*, *Hinf I*, *Hae III* y *Dde I*. MM: marcador de peso molecular de escala de 100 pb.

IV.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva, confirmación de su identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico

IV.8.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

Para seleccionar cepas de levadura u organismos tipo levadura de los previamente aislados con capacidad de prevenir la infección de *A. alternata* en uva, se utilizaron 67 cepas de levadura y organismos tipo levadura del total aislado (111) y las cepas de *A. alternata* 5.5, 7.5 y 25.1 en sus respectivas concentraciones mínimas infectivas (punto IV.6.2).

En un primer experimento, el 48 % (32/67) de las cepas de levadura y organismos tipo levadura evaluados disminuyeron el porcentaje de uvas infectadas en un 60 % para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas, resultando preseleccionadas para un segundo experimento. Finalmente, el 22,4 % (15/67) del total de levaduras y organismos tipo levadura evaluados lograron controlar a las 3 cepas de *A. alternata* en los 2 experimentos independientes llevados a cabo ($p < 0,05$) (Tabla 15).

Todas las cepas de levadura identificadas como *M. pulcherrima* (6), *C. zemplinina* (3) y la mayoría (6 de 7) de *H. uvarum* evaluadas mostraron capacidad de disminuir la infección en uva provocada por las tres cepas de *A. alternata* empleadas. Por otro lado, ninguna de las cepas del organismo tipo levadura *A. pullulans* (47) y las cepas de levadura identificadas como *Cr. laurentii* II (3) y *Rhodothorula* spp. (1) mostraron esa capacidad (Tabla 15).

Las levaduras con capacidad antagonista fueron agrupadas en dos categorías según el test de Hotelling -Bonferroni (MANAVA; $p < 0,05$). El grupo integrado por la mayoría de las levaduras (14) logró reducir el porcentaje de infección a 0.0 % de cada una de las 3 cepas fúngicas a su CMI, mientras que sólo una cepa (LP123.2) mostró una menor eficiencia (Tabla 16).

Tabla 15: Cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael con capacidad antagonistas frente a *Alternaria alternata*.

Especie	Aislados vendimia			TOTAL	EVALUADAS ^A	ANTAGONISTAS ^B
	2011	2012	2013			
<i>A. pullulans</i>	8	27	56	91	47	0
<i>H. uvarum</i>	4	0	3	7	7	6
<i>M. pulcherrima</i>	6	0	0	6	6	6
<i>C. laurentii II</i>	0	0	3	3	3	0
<i>C. zemplinina</i>	0	0	3	3	3	3
<i>Rhodotorula spp.</i>	0	0	1	1	1	0
total	18	27	66	111	67	15

^A Evaluadas mediante los experimentos de selección

^B Capaces de reducir el porcentaje de uvas infectadas en un 60% para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas (5.5, 7.5 y 25.1) en su CMI, en 2 experimentos independientes ($p < 0,05$).

Tabla 16: Capacidad antagonista de levaduras seleccionadas de uvas Malbec vendimias 2011, 2012 y 2013 DOC San Rafael frente a cepas de *Alternaria alternata*.

Cepa	Especie	Origen	% de infección ¹			*
			cepa 5.5	cepa 7.5	cepa 25.1	
LP123.2	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	4,4 ± 0,7	2,0 ± 2,8	0,0 ± 0,0	A
LP122.2	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	0,0 ± 0,0	2,2 ± 3,1	0,0 ± 0,0	B
LP125.2	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	1,9 ± 2,7	0,0 ± 0,0	2,0 ± 2,8	B
LP128.2	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP131.2	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP132.1	<i>M. pulcherrima.</i>	2011	1,9 ± 2,6	0,0 ± 0,0	2,1 ± 2,9	B
LP124	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP125.1	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP126	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.1.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP10.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP6.4.1	<i>C. zemplinina.</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.1	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.2	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B

¹ Promedio y desviación estándar correspondiente al porcentaje de uvas infectadas para cada una de las cepas de *A. alternata* evaluadas, en su concentración mínima infectiva (CMI) con el efecto antagonista de cada levadura seleccionada en 2 experimentos independientes.

* Letras distintas representan una diferencia significativa ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Hotelling -Bonferroni.

El análisis de los componentes principales (Fig. 33) fue utilizado para representar de manera simplificada la capacidad antagonista de las diferentes cepas de levadura seleccionadas. Los 2 primeros componentes principales son capaces de explicar el 91,5 % de la variación total (PC1: 53,5 % y PC2: 38,0 %).

La variable dependiente porcentaje de infección con *A. alternata* 5.5 se relaciona exclusiva y positivamente con el componente CP 1, mientras que las otras 2 variables si bien se relacionan mayormente y de manera positiva con este componente, también se relacionan con el componente CP 2 positiva (porcentaje de infección con *A. alternata* 7.5) y negativamente (porcentaje de infección con *A. alternata* 25.1).

Aquellos grupos de levaduras más alejadas de las variables porcentaje de infección con *A. alternata* 5.5, 7.5 y 25.1 (ejemplo: grupo 1, Fig. 33) serían las mejores antagonistas, mientras que aquellos grupos más cercanos a alguna de las variables (ejemplo: grupo 5, Fig. 33) mostrarían menores capacidades de control.

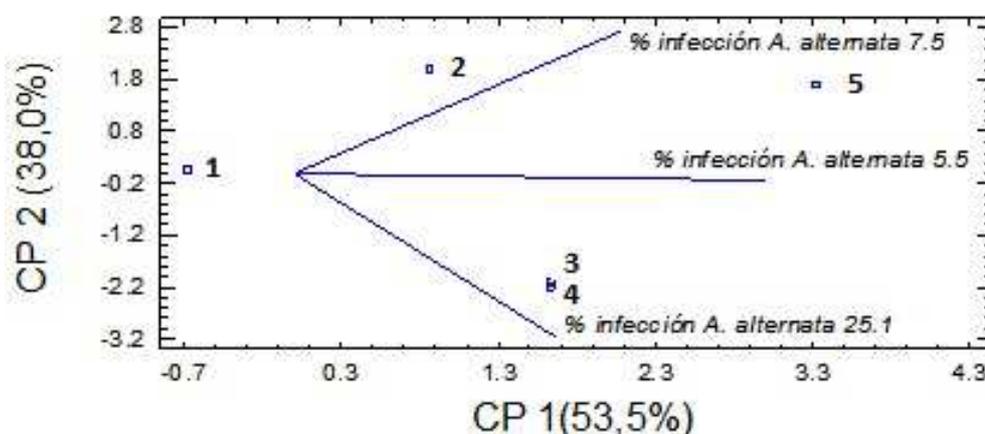


Figura 33: Gráfico Biplot de los primeros 2 componentes principales del efecto antagonista frente a la infección por las cepas de *Alternaria alternata* 5.5, 7.5 y 25.1 de las levaduras seleccionadas: **1-** cepas de levadura LP 124, LP 125.1, LP 126, LP 128.2, LP 131.2, LP 6.4.1, LP 8.1.1, LP 8.2.1, LP 8.5.1, LP 8.5.2, LP 10.2.1; **2-** cepa de levadura LP 122.2; **3-** cepa de levadura LP 125.2; **4-** cepa de levadura LP 132.1. **5-** cepa de levadura LP123.2. Los valores estadísticamente similares de acuerdo al test de Hotelling -Bonferroni se encuentran agrupados.

IV.8.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S

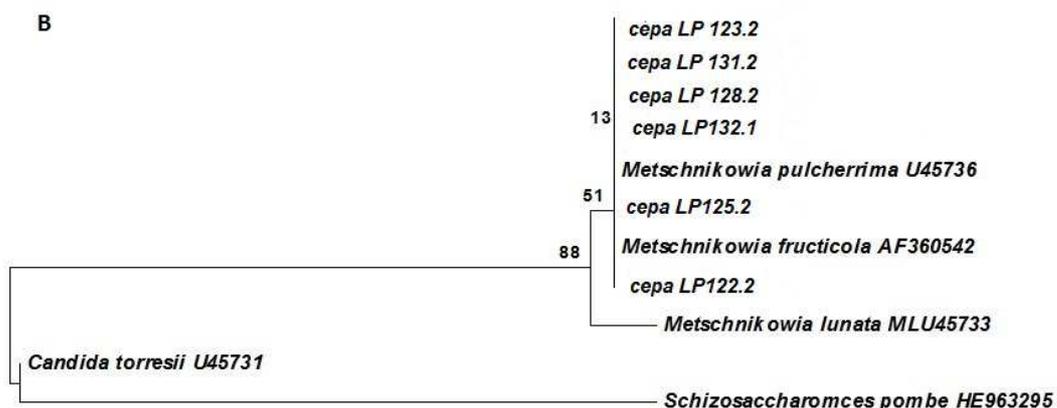
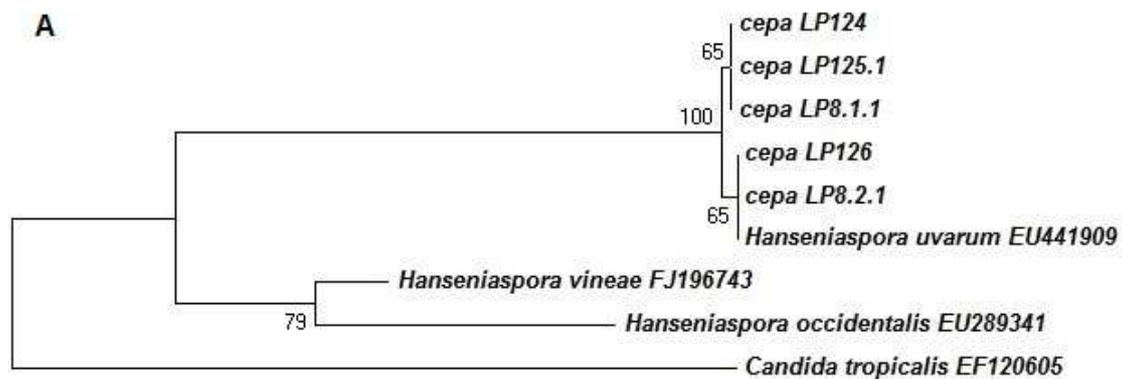
Con el fin de confirmar de forma efectiva la identidad de las cepas de levadura seleccionadas por su potencial biocontrol de *A. alternata* en uva, se realizó la secuenciación de regiones conservadas del ARNr de las mismas.

El análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del gen 26S del ARNr (aproximadamente 600 pb) de las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126, LP8.2.1 y LP 10.2.1 reveló que poseen una estrecha relación filogenética con cepas pertenecientes al género *Hanseniaspora*. Las secuencias de los fragmentos amplificados de las cepas estudiadas mostraron una similitud entre 98-100% con secuencias disponibles en la base de datos GenBank de la misma región de cepas de referencia de *H. uvarum*. El análisis filogenético, basado en el alineamiento de las secuencias parciales del ADNr de las levaduras seleccionadas con las secuencias de cepas de referencia (Fig. 34 A), indicó que las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126 y LP 8.2.1 son conespecíficas con *H. uvarum* A2 26S (GenBank EU441909).

Para las cepas LP 131.2, LP 132.1, LP 128.2, LP 125.2, LP 122.2 y LP 123.2, el análisis mostró una estrecha relación filogenética de las mismas con cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*. Las secuencias obtenidas para las cepas LP 128.2 (437 pb), 131.2 (443 pb) y LP 132.1 (517 pb) mostraron un 98 % (LP 128.2) y 99 % de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. pulcherrima* disponibles en la base de datos GenBank, mientras que las secuencias obtenidas para las cepas LP 122.2 (539 pb) y LP 125.2 (427 pb) mostraron un 98 % y 99 %, respectivamente, de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. fructicola*. La secuencia obtenida para la cepa LP 123.2 (417 pb) mostró una similitud de 97 % con secuencias de cepas de referencia tanto de *M. pulcherrima* como de *M. fructicola*. No obstante, el análisis filogenético realizado (Fig. 34 B) indicó que todas las cepas pertenecerían al grupo que incluye tanto a *M. pulcherrima* (GenBank U45736) como a *M. fructicola* (GenBank AF360542). La ampliación de ese grupo (Fig. 34 C), permite ver que sólo la cepa LP 132.1 sería conespecífica con *M. pulcherrima*, mientras que el

resto de las cepas, si bien serían cercanas filogenéticamente a las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, no sería posible asignarles una especie dentro del género *Metschnikowia*.

Finalmente, el análisis de las secuencias de las cepas LP 6.4.1, LP 8.5.1 y LP 8.5.2 (de aproximadamente 500 pb) reveló una estrecha relación filogenética (100 % de similitud) de estas levaduras con cepas de referencia de *C. zemplinina* o su sinónimo obligado *Starmerella bacillaris*. Asimismo, el análisis filogenético (Fig. 34 D) indicó que estas cepas son conespecíficas tanto con *C. zemplinina* (GenBank AY048154) como con *S. bacillaris* (GenBank AY394855).



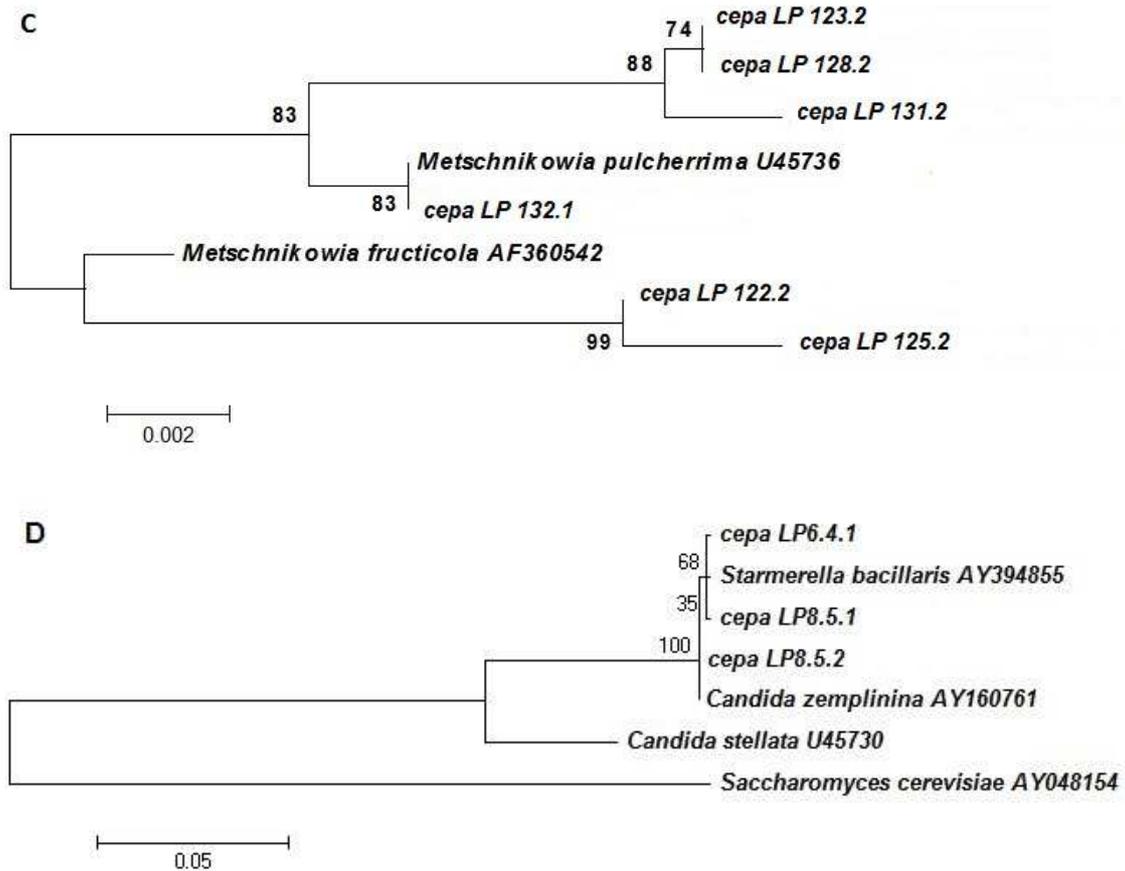


Figura 34: Árboles filogenéticos de cepas de levadura seleccionadas por su capacidad de reducir la infección de *Alternaria alternata* en uva, basados en la secuenciación parcial del ADNr. (A) Cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.8.8, LP 126 y LP 8.2.1 pertenecientes a *Hanseniaspora uvarum*, (B) y (C) cepas LP 122.2, LP 123.2, LP 125.2, LP 128.2, LP 131.2 y LP 132.1 pertenecientes a *Metschnikowia* spp. y (D) cepas LP 8.5.1, LP 8.5.2 y LP 6.4.1 pertenecientes a *Starmerella bacillaris*. Los números representan el nivel de confianza obtenidos a partir de 1000 repeticiones (se indican las frecuencias mayores al 50 %). Las barras inferiores en A, B, C y D representan la distancia correspondiente a un cambio de 1; 200; 0,2 y 5 pares de bases en 100 nucleótidos, respectivamente. En A, *Candida tropicalis* (GenBank EF120605) se usa como cepa no relacionada o “out group”, en B, *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank HE963295) y en D, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank AY048154).

IV.8.3 Evaluación de la capacidad de levaduras para controlar la producción de ácido tenuazónico por *Alternaria alternata* en uva

Se evaluó la capacidad de 6 levaduras para controlar la producción de ATe por dos cepas de *A. alternata* (7.5 y 25.1) en uva, en las condiciones de temperatura y tiempo óptimas para la producción de ATe (25 °C y 24 días de incubación). Estas levaduras fueron azarosamente elegidas entre 15 levaduras previamente seleccionadas por proteger a la uva de la infección con *A. alternata*.

Los controles positivos, que consistieron en cada una de las cepas de *A. alternata* a su CMI, lograron un 100 % de infección a partir de los 5 días de incubación a 25 °C. Además, durante y al finalizar el experimento, se evidenció la ausencia de crecimiento fúngico en todos los tratamientos donde se aplicaron las levaduras.

Como se puede observar, todas las levaduras evaluadas fueron capaces de disminuir la concentración de ATe en uva tanto por la cepa de *A. alternata* 7.5 (Fig. 35) como por la cepa 25.1 (Fig. 36).

Todas las levaduras evaluadas fueron capaces de disminuir de manera similar la producción de ATe por la cepa 7.5 y el contenido de toxina observado en estos tratamientos no tuvo diferencias significativas con el control con agua o levadura sola (Fig. 35).

Por otro lado, las cepas de levadura LP 8.5.2, LP 131.2, LP 128.2, LP 8.1.1 y LP 6.4.1 produjeron una disminución similar de los niveles de ATe producidos por la cepa 25.1 y el contenido de esta toxina observado en estos tratamientos no tuvo diferencias significativas con el control con agua o levadura sola. Mientras que la cepa LP 8.5.1 ocasionó una disminución de los niveles de ATe producidos por la cepa 25.1 menor a la lograda por las otras levaduras y el contenido de ATe fue significativamente mayor a los controles (Fig. 36).

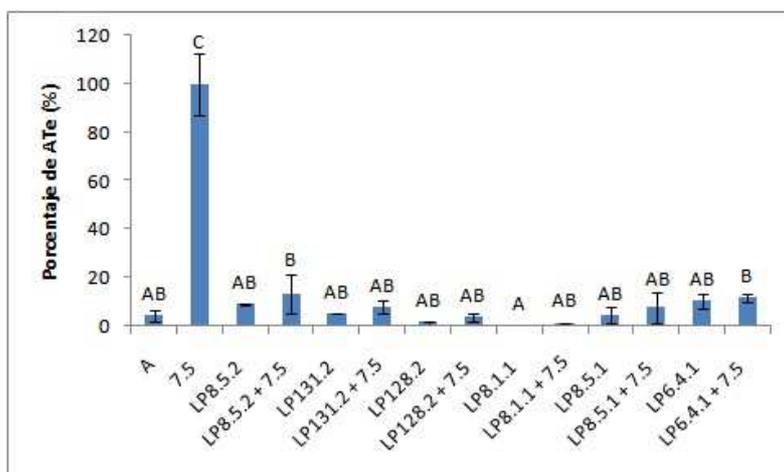


Figura 35: Porcentaje de ácido tenuazónico producido por la cepa 7.5 de *Alternaria alternata* a los 24 días de incubación a 25°C, con y sin el efecto preventivo de las cepas de levadura LP 8.5.2, LP 131.2, LP 128.2, LP 8.1.1, LP 8.5.1 y LP 6.4.1. Se incluyen controles de las cepas de levadura solas y agua (A). Letras distintas muestran diferencias significativas en los tratamientos (LSD Fisher, $p < 0,05$).

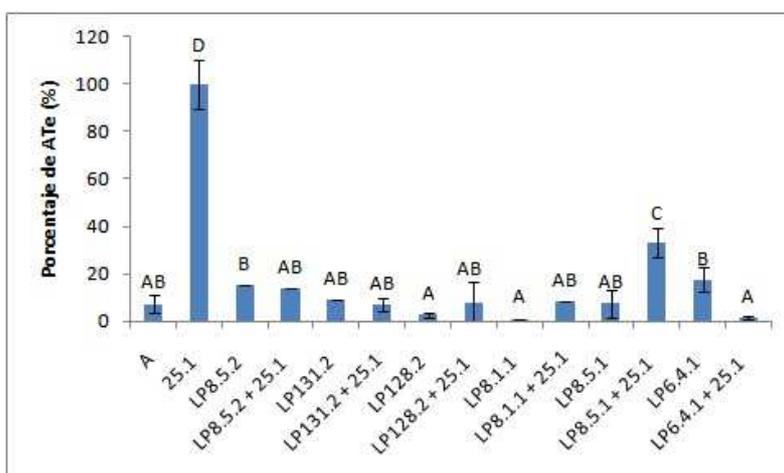


Figura 36: Porcentaje de ATe producido por la cepa 25.1 de *Alternaria alternata* con 24 días de incubación a 25°C, con y sin el efecto preventivo de las cepas de levadura LP 8.5.2, LP 131.2, LP 128.2, LP 8.1.1, LP 8.5.1 y LP 6.4.1. Se incluyen controles de las cepas de levadura solas y agua (A). Letras distintas muestran diferencias significativas en los tratamientos (LSD Fisher, $p < 0,05$).

V. DISCUSION

V.1 Evaluación de la micobiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

En el estudio sobre la micobiota presente en uva Malbec a tiempo de cosecha proveniente de la región DOC San Rafael durante 3 vendimias consecutivas (2011, 2012 y 2013), el género *Alternaria*, resultó el componente mayoritario (Prendes y col., 2015). Este resultado coincide con estudios previos llevados a cabo en otras regiones vitivinícolas del mundo (Sage y col., 2002; Magnoli y col., 2003; Bau y col., 2005; Medina y col., 2005; Belli y col., 2006; Chulze y col., 2006; Serra y col., 2006; Ostry y col., 2007; Tancinova y col., 2015). Le siguieron en orden decreciente, *Cladosporium* y en menor porcentaje *Penicillium* y *Aspergillus*, los cuales estuvieron o no presentes en los diferentes años estudiados.

En el estudio llevado a cabo por Bellí y col. (2006) en uvas Garnacha, Tempranillo, Bobal, Graciano, Cabernet Sauvignon, Merlot, Macabeo, Moscatel, Chardonnay y Sauvignon blanc de 3 regiones vitivinícolas españolas durante las cosechas 2001, 2002 y 2003, *Alternaria* fue seguida por *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus* y *Penicillium*. En otro estudio, Medina y col. (2004) reportaron que en uvas Bobal, Tempranillo, Garnacha, Monastrell y Moscatel de 12 provincias españolas distintas, *Alternaria* fue seguida por *Cladosporium* y *Aspergillus*. Mientras que Bau y col. (2005) encontraron que en uvas Cabernet Sauvignon, Garnatxa blanca, Macabeu, Moscatel y Palomino fino de 7 viñedos localizados a lo largo de la costa Mediterránea de España durante la cosecha 2001, *Alternaria* fue seguida por *Aspergillus* y *Penicillium*. Por otro lado, en Portugal, Serra y col. (2006) reportaron que los géneros más frecuentemente aislados resultaron *Alternaria*, *Botrytis* y *Cladosporium* en 2 variedades típicas de uvas blancas y 10 de uvas tintas distribuidas en 4 regiones vitivinícolas durante 3 años consecutivos: 2001, 2002 y 2003, a diferencia del realizado por Abrunhosa y col. (2001) donde los géneros prevalentes fueron *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium*. En Francia, Sage y col (2002) encontraron que las uvas Chardonnay, Chasselas, Sauvignon, Cabernet, Gamay, Grenache, Merlot, y Syrah de 5

regiones vitivinícolas de Francia durante la cosecha 2000, estaban colonizadas por 5 especies fúngicas dominantes: *A. alternata*, *A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium brevicompactum*, y *Penicillium expansum*, aunque otros estudios realizados en viñedos del norte, la micobiota más prevalente resultó ser *Penicillium* y *Aspergillus* negro, en viñedos del sur (Guérin y col., 2007; Diguta y col., 2011).

En 13 variedades de uva de la región vitivinícola Znojmo ubicada en el sur de la República Checa durante la cosecha del año 2004, se aislaron *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Ostry y col., 2007). Mientras que, en la región vecina de Eslovaquia, el género presente en la mayor cantidad de muestras de uva a tiempo de cosecha en 3 regiones vitivinícolas resultó *Penicillium* seguido de *Botrytis*, *Aspergillus* y *Alternaria* en el 2008 y de *Alternaria* y *Aspergillus* en el 2009 (Mikušová y col., 2012). Es importante destacar que, en Eslovaquia, la presencia de *Alternaria* causó pérdidas significativas durante la cosecha 2007 y 2008, donde se reportaron veranos con temperaturas inusualmente cálidas para la zona (Kakalikova y col., 2009). En estudios posteriores realizados durante la cosecha 2012, se encontró que *Alternaria* era el género aislado con mayor frecuencia, seguido de *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Epicoccum* y *Trichoderma* en 14 variedades de uva cosechadas de varias regiones vitivinícolas eslovacas (Tancinová y col., 2015). Mientras que en 3 variedades de uva en la región de vitivinícola de Tokaj, *Aspergillus* fue seguido de *Botrytis* y *Penicillium* (Felsöciová y col., 2014).

En China, los géneros más frecuentes, en orden decreciente, fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium* en uvas con y sin síntomas de infección fúngica de viñedos pertenecientes al noroeste centro de China. El género *Alternaria* fue principalmente aislado de bayas de uva intactas, pero rara vez de las bayas podridas (Chunmei y col, 2013).

En un estudio realizado en el valle de Hunter, en California, EEUU, se encontró que las especies *B. cinerea*, *A. alternata*, *Rhizopus* sp., *Gonatobotrytis simplex*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporoides*, *Fusarium sporotrichioides*, *Epicoccum nigrum* y

Bipolaris bicolor eran aislados frecuentemente tanto de flores como de uvas maduras durante 5 temporadas (1978-1983) (Nair 1985).

En lo que respecta a Sudamérica, Magnoli y col. (2003), observaron a *Alternaria* spp. como el género fúngico más frecuente (80 % de las muestras) en la micobiota de uvas Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet y Bonarda durante la cosecha 2001 en Mendoza, Argentina, seguido por *Aspergillus* spp. (70 %). En términos de uvas infectadas, *Alternaria* (9,2 %) fue seguido por *Aspergillus* (7,6 %), *Fusarium* (5,5 %), *Ulocadium* (3,3 %), *Eurotium* (3,0 %), *Penicillium* (2,4 %) y *Cladosporium* (2,0 %). Mientras que en otro estudio realizado en uvas de Brasil y Argentina se determinaron como principales géneros fúngicos contaminantes *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*, seguidos de *Phytophthora*, *Moniliella*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Da Rocha Rosa y col., 2002). También en Uruguay, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *A. alternata*, *C. cladosporioides* y *Eurotium purpurascens* durante la cosecha 2003-2004 de las variedades Tanat y Cabernet-Sauvignon (Chulze y col., 2006).

La diversidad de la micobiota fúngica encontrada en uvas para vinificar depende principalmente de las condiciones climáticas y geográficas pero también de la variedad de uva considerada, la madurez y las prácticas de cultivo (Rosseaux y col., 2014).

Por otra parte, existen diferentes prácticas de cultivo empleadas rutinariamente como herramientas de control vitivinícola durante el desarrollo del viñedo en el campo. Entre ellas es común la aplicación de cobre y azufre (cultivo orgánico) y en algunos casos además la utilización de fungicidas, herbicidas e insecticidas sintéticos, incluidos dentro de la categoría general de cultivos no-orgánicos o convencionales. La finalidad del cultivo orgánico, así como la aplicación de los fungicidas sintéticos es lograr una prevención efectiva contra organismos, en su mayoría fúngicos, como *U. necator*, *P. viticola*, *B. cinerea* y *S. necator*, que atacan a la vid pudiendo también bajo ciertas condiciones propicias atacar su fruto, aunque se conoce que el modo de acción de estos tratamientos no es específico (Calhella y col., 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que las prácticas evaluadas (tratamiento orgánico y no orgánico con

ditiocarbamato) no tendrían efecto alguno sobre la microbiota presente en uvas para vinificar a tiempo de cosecha.

No existen otros estudios en la literatura acerca de la influencia de las distintas prácticas de cultivo en campo sobre la microbiota total presente uva para vinificar, aunque algunos trabajos han estudiado la influencia en algunas poblaciones particulares. Nair (1985) demostró que la aplicación del fungicida benomyl durante la apertura de las yemas y al 75 % de la floración en vides, disminuía la incidencia de infecciones latentes de *B. cinerea* en las flores. Remarcando que éstas infecciones latentes en flores podían, bajo condiciones favorables, permitir el desarrollo de un alto nivel de inóculo y consecuentemente un alto riesgo de podredumbre de la baya. Ponsone y col. (2007) encontraron que el porcentaje de uva colonizada por *Aspergillus* de la sección *Nigri* estuvo influenciado significativamente por el sistema de cultivo implementado. El sistema orgánico analizado en este caso consistió, en el agregado de SO_4Cu , mientras que el sistema no-orgánico consistió en el agregado de glifosato (herbicida). El efecto de la aplicación de pre-cosecha de diferentes fungicidas y de dióxido de azufre pos-cosecha en la podredumbre en uvas de mesa fue investigado por Franck y col. (2005). Sus resultados demostraron que ambos tratamientos redujeron efectivamente la podredumbre de uvas de mesa causada por *P. expansum* y *B. cinerea* durante el almacenamiento en frío a largo plazo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis, sobre las prácticas de cultivo evaluadas, podrían ser particularmente importantes a la hora de considerar el control de géneros micotoxigénicos presentes en alta frecuencia, como en el caso de *Alternaria*.

V.2. Identificación de las especies de *Alternaria* aisladas de uvas Malbec mediante marcadores morfológicos y moleculares

En el trabajo realizado durante la presente tesis, se logró identificar la población de *Alternaria* presente en uvas para vinificar mediante métodos morfológico y molecular (Prendes y col., 2015). El método de identificación molecular

desarrollado por Pavón y col. (2010) logró aplicarse con éxito y su resultado fue acorde a la identificación morfológica llevada a cabo mediante la metodología descrita por Simmons (2007). La especie *A. alternata* descrita por Simmons (2007) se encuentra incluida, entre otras, en el grupo-especie *A. alternata*, definido por Pavón y col. (2010).

De manera similar a lo obtenido en el presente trabajo, *A. alternata* también fue la única especie de *Alternaria* identificada en uvas sanas de las variedades Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet y Bonarda durante la cosecha 2001 en Mendoza, Argentina (Magnoli y col., 2003). Ostry y col. (2007), también encontraron que *A. alternata* fue la única especie de *Alternaria* presente en 13 variedades de uva cultivadas en la región sur de la República Checa durante la cosecha 2004.

En Eslovaquia, se identificó morfológicamente a la especie *A. alternata* como la causante de la podredumbre que ocasionó grandes pérdidas durante las cosechas 2007 y 2008 (Kakalikova y col., 2009). Esto significó un llamado de atención sobre la presencia de *Alternaria* en uva para vinificar de la zona y consecuentemente, se realizaron otros estudios a posteriori. Mikušová y col. (2014) identificaron 2 especies, *A. alternata* y *A. tenuissima*, aisladas de uvas sanas de 3 regiones vitivinícolas eslovacas durante el estadio previo a la maduración y durante la cosecha de los años 2008 y 2009. La identificación se basó exclusivamente en características microscópicas y macroscópicas, resultando *A. alternata* más común y de mayor frecuencia de aparición, en comparación con *A. tenuissima* en ambos años, sobre todo a tiempo de cosecha. Durante los años 2011, 2012 y 2013, aislados de *Alternaria* presentes en uvas tintas y blancas sanas provenientes de varias regiones vitivinícolas eslovacas a tiempo de cosecha fueron identificados a nivel grupo-especie. El grupo *A. tenuissima* resultó dominante, seguido por *A. alternata*, *Alternaria arborescences* y *A. infectoria* (Tancinová y col., 2016; 2015; Felsöciová, 2015, Masková 2013).

Recientemente, Vargas Trinidad y col. (2015) analizó uvas Malbec con y sin contaminación fúngica de viñedos pertenecientes a las localidades de Villa Azul y Maiqué en la Provincia de Río Negro (región patagónica Argentina) durante

la cosecha 2013. La autora determinó la presencia de *Alternaria* en el 70 % de las muestras y obtuvieron 85 aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* que fueron identificados morfológicamente a nivel grupo-especie. Del total de éstos aislados, 5 pertenecieron al grupo-especie *A. alternata*, 5 al grupo-especie *A. arborescens* y 75 al grupo-especie *A. tenuissima*.

La falta de unificación de criterios morfológicos para la identificación de aislados de *Alternaria*, sumado a la gran variación intra específica y la influencia de las condiciones medioambientales en los patrones de esporulación, hace necesario contar con otras herramientas, además de los métodos morfológicos tradicionales, para su identificación (Lawrence y col., 2016). Por estos motivos mencionados, numerosos trabajos, al igual que la presente tesis, han empleado análisis morfológicos y moleculares para identificar aislados de *Alternaria* de ambientes vitivinícolas. Polizzotto y col. (2012) encontraron 2 patrones de esporulación, correspondientes al grupo-especie *A. arborescences* y grupo-especie *A. tenuissima* en 20 cepas endofíticas de *Alternaria* aisladas de brotes de vid, mientras que los patrones obtenidos con la RAPD-PCR demostraron un alto grado de variabilidad intra-grupo-especie. Por otro lado, Lorenzini y col. (2014) encontraron que los 6 de 7 aislados de *Alternaria* spp. asociados a la podredumbre de uvas ocurrida durante el proceso de secado post-cosecha para producir los vinos italianos “passito”, mostraron patrones de esporulación pertenecientes al grupo-especie *A. alternata* y fueron ubicados en un clado monofilético junto a especies como *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescence*, mediante análisis filogenético con las secuencias ITS, resultando ambas metodologías compatibles.

Recientemente, Lawrence y col. (2016) sugirieron que las regiones que codifican para ATPasa, calmodulina y Alt a1, resultaron las más informativas para el análisis filogenético del género *Alternaria* y su división en secciones. En el futuro, se deberían desarrollar métodos sencillos, como el desarrollado por Pavón y col. (2010) para *Alt a1*, pero en base a las divergencias de estos 3 marcadores genéticos entre las distintas secciones de *Alternaria*, para lograr una rápida identificación.

V.3 Caracterización del potencial micotoxigénico y patogénico de las especies de *Alternaria* identificadas aisladas de uva

La caracterización del potencial micotoxigénico y patogénico de aislados del género *Alternaria* presentes en uvas destinadas a la vinificación reviste principal importancia, ya que podría correlacionarse con la presencia de sus micotoxinas en el vino. El trabajo realizado en la presente tesis constituye el primero en caracterizar el potencial micotoxigénico y patogénico de cepas de *Alternaria* aisladas de uva Malbec (Prendes y col., 2015). Las mismas fueron aisladas de la región vitivinícola DOC San Rafael en Argentina. Recientemente, Vargas Trinidad y col. (2015) también analizaron cepas de *Alternaria* aisladas de uvas Malbec, pero sólo caracterizaron el potencial micotoxigénico y a diferencia de nuestro trabajo, fueron aisladas de la región patagónica de Argentina.

En un trabajo previo, Mikušová y col. (2014) evaluaron la habilidad toxicogénica de 11 cepas de *Alternaria* aisladas de uvas de 3 regiones vitivinícolas eslovacas, encontrando concentraciones muy bajas de alternariol (AOH) (0,0058-0,0337 ppm) y alternariol monometil éter (AME) (0,0044-0,0494 ppm) y concentraciones de altenueno (ALT) y ácido tenuazonico (ATe) no cuantificables. Aunque resulta importante resaltar que los medios utilizados en este trabajo, CYA y YES (Extracto de levadura, Sacarosa), no serían apropiados para la evaluación del potencial micotoxigénico de cepas de *Alternaria*.

Por el contrario, los medios que contienen arroz molido autoclavado han sido utilizados reiteradamente para evaluar el potencial micotoxigénico de cepas de *Alternaria*, permitiendo la comparación entre cepas aisladas de diferentes sustratos y regiones geográficas. En este sustrato, no hay barreras mecánicas y muchas de las defensas del grano que son termolábiles, han sido suprimidas. Por esta razón provee una condición en la que los aislados son capaces de expresar todo su potencial micotoxigénico, que puede o no ser expresado en el sustrato de origen. En particular, el medio agar arroz licor de maíz (AALM) utilizado en la presente tesis, ha sido descrito como el más apropiado para la evaluación de la producción de micotoxinas de *Alternaria* debido a que estimula la producción y permite una fácil extracción de las mismas (Chulze y col., 1994).

Durante el presente trabajo el porcentaje de cepas de *A. alternata* aisladas de uva Malbec capaces de producir al menos 1 de las 3 micotoxinas evaluadas (AOH, AME y ATe) fue alto (97 %) comparable a lo obtenido por Vargas Trinidad y col. (2015). Esto también fue coincidente con lo encontrado en numerosos estudios de cepas de *Alternaria* aisladas de diferentes sustratos también evaluadas en medios con arroz molido autoclavado (Li y col., 2001; Patriarca y col., 2007; Oviedo y col., 2013; Somma y col., 2011). Además, durante el presente estudio la mayoría de las cepas analizadas (53 %) fueron capaces de coproducir las 3 toxinas, en comparación con el 36 % obtenido por Vargas Trinidad y col. (2015) mostrando un mayor riesgo potencial de efectos sinérgicos como en otros estudios (Greco y col., 2012; Patriarca y col., 2007; Somma y col., 2011).

Por otro lado, la aplicación del tratamiento orgánico a campo evaluado en la presente tesis, no produjo diferencia en el potencial toxicogénico de las cepas de *Alternaria* aisladas de uva. Si bien no existen trabajos previos que analicen este efecto, la evaluación de este potencial en medio de cultivo e inclusive en baya de uva, con la adición de diferentes pesticidas utilizados comúnmente en campo ha demostrado diferentes resultados, inclusive la estimulación de la producción de toxinas de *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium*, probablemente debido al estrés ocasionado por el pesticida (Moss y col, 1991, Dalcero y col., 1995; Ramirez y col., 2004; Belli y col., 2006 b). El trabajo realizado durante la presente tesis muestra una ineficiencia del tratamiento orgánico para prevenir la presencia de cepas de *Alternaria* toxicogénicas. Así también se pudo observar que el potencial toxicogénico no varió significativamente de un año a otro.

La frecuencia de cepas de *Alternaria* productoras de ATe (97 %) fue similar al 100 % obtenido por Vargas Trinidad y col. (2015) y mayor a la de cepas aisladas de otros sustratos, 65 % en arándanos (Greco y col., 2012) 32 % en arroz (Li y col., 2001) 10 % en soja (Oviedo y col., 2013) y 72 % y 70 % en tomates (Patriarca y col., 2007; Somma y col., 2011), aunque en algunos de estos estudios se encontró una producción más frecuente de AOH y AME. Esto podría indicar que el perfil toxicogénico de las cepas de *Alternaria* aisladas de uva sería distinto al de cepas aisladas de otros sustratos.

Asimismo, ATe fue la micotoxina producida en mayores cantidades que AOH y AME, al igual que en los trabajos de Vargas y col. (2015), Greco y col. (2012) y Somma y col. (2011) entre otros. Aunque la concentración máxima obtenida para esta toxina en el presente estudio (1.941 ppm) fue más bajo que lo observado por Vargas Trinidad y col. (2015) (21.031 ppm). Asimismo, estuvo en el mismo orden que los obtenidos en cepas de *Alternaria* aisladas de arándanos (2.778 ppm), (Greco y col., 2012), tomates (4.200 ppm) (Bottalico y Logrieco, 1998), trigo (3.563 ppm) (Li y col., 2001) y mandarinas (6.800 ppm) (Logrieco y col., 2003).

Existen en la literatura trabajos previos donde se han encontrado niveles máximos de producción de AOH (437 ppm) y AME (663 ppm), similares a lo encontrado durante el presente trabajo. Por ejemplo, 119 y 902 ppm para AOH y AME respectivamente en cepas de *A. alternata* aisladas de arándanos (Greco y col., 2012), 600 y 100 ppm de AOH y AME en cepas de *A. alternata* provenientes de tomates (Bottalico y Logrieco, 1998); 178 y 98 ppm de AOH y AME producido por cepas de *A. alternata* aisladas de trigo (Li y col., 2001), y 20 y 20 ppm de AOH y AME por cepas de *A. alternata* provenientes de mandarinas (Logrieco y col., 2003). Por el contrario, los niveles máximos de AOH y AME producidos por las cepas de *Alternaria* aisladas por Vargas Trinidad y col. (2015) fueron extremadamente bajos, de 0,057 ppm de AOH y 0,133 ppm de AME.

Asimismo, en el presente estudio se encontró una correlación positiva entre la producción de AOH y AME. Esto ha sido observado previamente en cepas aisladas de otros sustratos (Li y col., 2001; Patriarca y col., 2007; Oviedo y col., 2013) y se explicaría con el hecho de que comparten los mismos precursores para su biosíntesis (Hiltunen y Söderhäll, 1992).

Si bien, los ensayos de patogenicidad realizados en el presente estudio no reflejan la realidad de una podredumbre de uvas para vinificar en campo, permitieron segregar los diferentes aislados de *A. alternata* según la extensión de la lesión generada en uva, artificialmente inducida. La patogenicidad puede ser definida como la habilidad de causar enfermedad y es un término cualitativo, mientras que la virulencia se refiere a la extensión o severidad de la

lesión de la enfermedad ocasionada, siendo entonces un término cuantitativo (Mamgain y col., 2013). Es por ello que se considera que los ensayos de patogenicidad realizados, reflejarían de manera más precisa la virulencia de las cepas evaluadas, aunque se mantenga el término “patogenicidad” debido a su uso en la bibliografía.

En nuestro estudio, el porcentaje de cepas de *A. alternata* con capacidad patogénica fue alto (55 % muy patogénicos y 31 % moderadamente patogénicos) teniendo en cuenta que se aislaron de uvas sin daño ni síntomas visibles de enfermedad. Además, resultó similar al lo obtenido para cepas de *Alternaria* aisladas de sustratos como arándanos y tomates, con síntomas de enfermedad post-cosecha (Somma et al., 2011; Greco et al., 2012). Pryor y Michaliades (2002), en su test de patogenicidad sobre hojas de pistacho, no detectaron diferencias significativas entre aislados de *Alternaria* recuperados de tejidos de pistacho con y sin síntomas de podredumbre. Por otra parte, Serdani y col. (2002) encontraron diferentes tipos de lesión al evaluar la patogenicidad de cepas de *Alternaria* denominadas endófitas (por haber sido aisladas de manzanas sin síntomas visibles de podredumbre), sólo el grupo-especie *A. infectoria* no causó lesión, ajustándose de esta manera a la definición de un verdadero endófito.

Recientemente, Lorenzini y col., (2014) encontraron diferentes grados de patogenicidad generados por 7 cepas de *Alternaria spp.* asociadas a la podredumbre de uva durante el proceso de secado post-cosecha para producir los vinos passito. La capacidad patogénica de las diferentes cepas se correlacionó con el tipo de tejido de donde fueron aisladas y el tratamiento, en coincidencia con lo encontrado previamente en otros sustratos (Pryor y Michaliades, 2002; Rotondo y col., 2012). Debido a que la mayoría de estas cepas pertenecían a *A. alternata* y fueron patogénicas, ellos sugirieron que la presencia de esta especie en los cuartos de secado estaría relacionada con su estilo de vida “patogénico”. Esta observación sería consistente con el trabajo reportado por Polizzoto y col. (2012) donde se aislaron cepas endófitas de brotes y hojas de vid pertenecientes a las especies *A. arborescence* y *A. tenuissima*, pero ninguna a *A.*

alternata. Aunque no se realizaron ensayos de patogenicidad a las cepas evaluadas en este estudio para corroborar la naturaleza endófito de las mismas, como fue realizado en el estudio de Pryor y Michailides (2002).

Por otra parte, la inoculación artificial de uvas maduras con *A. alternata* aislada de uvas y flores aparentemente sanas y superficialmente desinfectadas, resultó en algún grado de podredumbre (Nair, 1985; Dugan y col., 2002).

En la literatura, *Alternaria* se encuentra descrita como parte del conjunto de organismos que ocasionan la podredumbre de racimos en uvas para vinificar (Pearson y col., 1996; Cuchi y col., 2009; Steel y col., 2013). En un trabajo realizado por Nair (1985) en el valle de Hunter, en California, EEUU, se demostró que la causa primaria de la enfermedad era *B. cinerea*, pero que la presencia de otros hongos como *A. alternata*, *Rhizopus* sp. y *A. niger* podían agravar la enfermedad. Si las uvas eran separadas o agrietadas en la cosecha, estos hongos podían incrementar la enfermedad de podredumbre de racimo. En Eslovaquia, la especie *A. alternata* fue identificada como causal de una podredumbre de uva ocurrida en viñedos durante la cosecha 2008 y 2009, precedidas por veranos inusualmente cálidos (Kakalíkova y col., 2009). Así también, se ha demostrado que *Alternaria* es capaz de colonizar uvas de mesa a partir de su desarrollo en el campo y generar podredumbre post-cosecha bajo condiciones favorables (Swart y Holz, 1994; Tournas y Katsoudas, 2005). En general, los tejidos debilitados, ya sea por la acción de los insectos, el estrés por frío, la sobremaduración de los frutos, las tensiones y la senescencia, entre otros, serían más susceptibles a la infección por *Alternaria* que los tejidos sanos (Thomma, 2003).

Todas estas evidencias estarían a favor de considerar al género *Alternaria* como un patógeno débil (o en período de latencia) oportunista en uvas para vinificar, más que un endófito, en respuesta a este dilema planteado por Lawrence y col. (2016).

Por otro lado, el ATe es una fitotoxina no específica de huésped que estaría relacionada con la virulencia, debido a su actividad fuertemente inhibitoria del crecimiento y capacidad de alterar las estructuras citoplasmáticas de plantas

huéspedes (Bottalico y Logrieco, 1992). No obstante, no se encontró relación entre el grado de patogenicidad obtenido y la capacidad de producir ATe, AOH o AME en las cepas de *A. alternata* evaluadas en la presente tesis.

Teniendo en cuenta la capacidad micotoxigénica y patogénica de la mayoría de las cepas aisladas, si *A. alternata* fuera capaz de desarrollarse en uvas para vinificar en cualquiera de sus estadios de desarrollo en el campo, sería posible también encontrar naturalmente sus micotoxinas. Estas toxinas entonces podrían encontrarse en uva, aún sin síntomas visible de enfermedad (Barkai-Golan y Paster, 2008). En pos de corroborar esta hipótesis se procedió a determinar la incidencia natural de ATe en uva para vinificar, optimizando previamente una metodología analítica para su extracción, detección y cuantificación.

V.4 Optimización y validación de una metodología analítica para la extracción, detección y cuantificación de ácido tenuazónico en uvas

En la presente tesis se optimizó una metodología existente basada en QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) para la extracción de ácido tenuazónico (ATe) desde uva, seguida por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la detección UV (HPLC-UV) para la detección y cuantificación del mismo. Numerosos estudios han utilizado HPLC-UV para la determinación de ATe en alimentos (Shepard y *col.*, 1991; Da Motta y Valente Soares, 2000; Solfrizzo y *col.*, 2004; Oviedo y *col.*, 2012; Terminello y *col.*, 2016). Por otra parte, la preparación de la muestra resulta un etapa crítica para una determinación altamente sensible y selectiva de ATe, debido a la complejidad de la matriz uva, que incluye varios compuestos de diferente naturaleza química y la baja concentración de ATe esperada. En este sentido, la metodología de QuEChERS ha sido ampliamente utilizada como técnica de preparación de muestra, debido a su simplicidad y aplicabilidad en matrices complejas (Anastassiades y *col.*, 2003). Además, recientemente, ha sido exitosamente aplicada para la determinación de diferentes micotoxinas en una

gran variedad de muestras (Siegel y *col.*, 2009; 2010; Pizzutti y *col.*, 2014; Myresiotis y *col.*, 2015).

Para la optimización del método de QuEChERS para la extracción de ATe de la matriz uva, se realizó primero una optimización de las condiciones de extracción, seguida de las de limpieza, y finalmente se procedió a validar la metodología QuEChERS HPLC-UV propuesta.

El acetato de etilo resultó ser el solvente más apropiado para la extracción de ATe, debido a su índice de polaridad. El acetonitrilo a pH ácido, de mayor índice de polaridad, extrajo compuestos fenólicos presentes en la muestra (considerados interferencias) conjuntamente con ATe y el hexano, de menor índice de polaridad, presentó una afinidad considerablemente menor por ATe.

La relación 2,5 g uva: 2,5 mL de agua acidificada: 5 mL de acetato de etilo fue la óptima para extraer ATe en muestras de uva, con un mínimo consumo de solvente y muestra. Cuando la cantidad de muestra y/o dilución fue mayor no permitió la partición completa del compuesto polar ATe en la fase superior de acetato de etilo, generando una menor recuperación, como ha sido reportado por Anastassiades y *col.*, (2003). Por otro lado, si la cantidad de muestra y/o dilución es menor, hay un volumen recuperado menor que genera igualmente una menor recuperación de ATe. Por lo que la dilución de las muestras resulta ser un punto crítico a fin de lograr las mejores recuperaciones de ATe.

El ajuste del pH de la muestra, previo a la extracción, es una estrategia que se utiliza comúnmente para incrementar la recuperación de los compuestos básicos o ácidos, como ATe ($pK_a = 3,5$). La adición de una solución ácida para disminuir el pH de la muestra logró incrementar la recuperación de ATe, ya que el pH ácido impulsó el equilibrio del analito hacia su forma menos polar convirtiéndolo en una molécula neutra, facilitando así su extracción del medio mediante solventes polares orgánicos como el acetato de etilo. El pH demostró una gran influencia no sólo en las recuperaciones de ATe, sino también en la co-extracción de los componentes de matriz y en consecuencia en la estrategia de limpieza elegida.

Según los resultados obtenidos, sólo se logró una limpieza efectiva mediante fase sólida dispersiva (dSPE) con CaCl_2 anhidro. El CaCl_2 produce la eliminación de agua y en consecuencia una menor polaridad en el extracto final. Además, es capaz de precipitar ciertos compuestos polares co-extraíbles, observados como pigmentos de uva tinta (presumiblemente antocianinas) durante y después de la limpieza (Anastassiades y *col.*, 2003). El CaCl_2 anhidro también incrementa la fuerza iónica del medio, lo que conjuntamente con sus otros efectos, favorecería la partición de los analitos neutros (como ATe en este medio) a la fase de acetato de etilo.

Con respecto a los resultados obtenidos con la dSPE empleando el sorbente PSA, parecería que ATe fue capaz de interactuar con él, siendo fuertemente retenido por el mismo, reduciendo de esta manera su recuperación. Este fenómeno ha sido informado previamente en pesticidas con grupos nitrógeno básico (-NH-, =N-) y compuestos hidroxilo (-OH) (Anastassiades y *col.*, 2003) también presentes en la estructura de ATe, debido a su capacidad de formar puentes hidrogeno con PSA. De igual manera, las antocianinas y los compuestos fenólicos interferentes resultarían también retenidos en PSA, explicando la disminución en la señal de ruido de los cromatogramas. Por otro lado, la dSPE con el sorbente GCB, reduciría la cantidad de picos interferentes en el primer segmento del cromatograma debido a su gran afinidad por moléculas planas, como pigmentos y esteroides, mientras que combinado con PSA, produciría un aumento de los picos interferentes debido al incremento del pH del medio, ocasionado por este último.

Finalmente, se llevó a cabo la validación del método de QuEChERS HPLC-UV optimizado para la extracción y detección de ATe en uvas. Las recuperaciones obtenidas, dentro del rango de 81,9 % a 97,1 %, mostraron una gran exactitud del método, mientras que las desviaciones estándar asociadas obtenidas, de 2 y 7,5 %, mostraron una muy buena repetitibilidad (RSD %). Estos parámetros se encuentran dentro del rango normal, comparados con los estándares exigidos para el análisis de pesticidas (SANCO, 2013)

Los valores de HorRat obtenidos, mostraron que la repetitividad observada, basadas en duplicados ciegos, fue mejor a los límites generalmente establecidos (SANCO, 2013), indicando una precisión intra-laboratorio satisfactoria.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) alcanzados en la extracción de ATea partir 2,5 g de muestra de uva, mostraron que el método de QuEChERS HPLC-UV propuesto presenta una sensibilidad adecuada a los niveles de ATe esperados en uva.

Además, la selectividad del método optimizado para la determinación de ATe resultó muy buena, ya que el t_R y el comportamiento del espectro obtenido analizando la solución de ATe y un extracto de uva luego de aplicar el método optimizado fue similar.

En general, se puede resumir que los criterios de validación a todos los niveles de enriquecimiento fueron satisfechos, demostrando la idoneidad del método de QuEChERS HPLC-UV propuesto para la cuantificación adecuada de ATe en uvas. Se debe además destacar la simplicidad de la aplicación del método optimizado de QuEChERS ya que un único operador es capaz de preparar alrededor de 35 muestras en un período de trabajo de 8 horas. Asimismo, el método isocrático propuesto para el HPLC-UV (duración de 4 min) permite el análisis de 100 a 120 muestras en el mismo período de tiempo. Los costos de la aplicación de QuEChERS son significativamente menores a otros métodos como SPE o la extracción líquido-líquido y la exposición del analista al solvente así como el consumo de éste último resultan mínimos.

V.5 Determinación de la incidencia natural de ácido tenuazónico en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael

Los resultados obtenidos constituyen el primer informe a nivel mundial de la incidencia natural de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar. Asimismo, representan una evidencia importante de la producción de ATe en condiciones naturales donde la uva es cultivada, siendo también relevante desde el punto de vista de la industria vitivinícola. Aunque se analizaron un número limitado de muestras, el presente reporte contribuye a evaluar el nivel

de contaminación de uvas para vinificar con la micotoxina ATe así como a establecer los límites de concentración de esta toxina, según lo sugerido por EFSA (2011).

Desde el punto de vista de la salud pública, la presencia de ATe es relevante considerando que es el compuesto más tóxico producido por *Alternaria* (Viñas y col., 1992; Scott y col., 2004). Además, se han observado cambios precancerígenos generados en la mucosa del esófago de ratones alimentados con ATe a 25 mg/kg de peso corporal, por día durante 10 meses (Yekeler y col., 2001). También se ha sugerido la posible participación de ATe en la etiología de Onyalay, un desorden hematológico humano de incidencia en África, (Logrieco y col., 2003).

El 57 % de las 14 muestras de uvas para vinificación analizadas presentaron contaminación con ATe. Las muestras de uvas sanas (13) mostraron niveles que variaron desde el límite de detección del método (0,01 µg/g) hasta 0,096±0,003 µg/g, mientras que la única muestra de uvas visiblemente infectada (M14) mostró una concentración máxima de 0,595±0,050 µg/g. Estos resultados sugieren una correlación positiva entre el desarrollo fúngico y la presencia de ATe, aunque la microbiota presente en la muestra no fue determinada.

Existe información sobre la incidencia de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y ácido tenuazónico (ATe), y en algunos casos, de alternariol (ALT) y altertoxina I (ATX-I), en varias verduras y frutas incluyendo tomates, mandarinas, melones, pimientos, manzanas, frambuesas, cítricos, zanahorias, lentejas (Scott y col., 2001; Ostry y col., 2008; Fernández-Cruz y col., 2010). Los mayores niveles han sido encontrados en frutos visiblemente infectados: manzanas más de 58,8 µg/g para AOH y más de 0,500 µg/g para ATe (Stinson y col., 1981); tomates, más de 53,0 µg/g de AOH y 139,0 µg/g de ATe (Stinson y col., 1981); mandarinas, más de 5,2 µg/g de AOH y 173,9 µg/g de ATe (Logrieco y col., 1988; 1990; Magnani y col., 2007); pimientos, más de 440,0 µg/g de AOH, 249,0 µg/g de AME, 103,0 µg/g de ALT y 342,0 µg/g de ATe (Chung y col., 1998); aceitunas, más de 2,3 µg/g de AOH, 2,9 µg/g de AME y 1,4 µg/g de ALT (Viconti y col., 1986). Asimismo, Tournas y Stack (2001) y

Stinson y *col.* (1980, 1981) fueron capaces de demostrar la producción de AOH, ATe, AME y ALT en manzanas, tomates, bayas, uvas, naranjas y limones, en experimentos de inoculación, representando una evidencia importante del potencial de estas frutas de sufrir la contaminación con las toxinas de *Alternaria*, cuando están dadas las condiciones apropiadas para el crecimiento fúngico (Barkai-Golan y Paster, 2008). Recientemente, López y *col.* (2016) analizaron la incidencia natural de micotoxinas de *Alternaria* (AOH, AME, ATe, ALT y tentoxina) enfocándose en frutos frescos sanos, aptos para el consumo humano, como manzanas, aceitunas, cítricos y tomates, aunque los niveles de ATe encontrados fueron significativamente menores a los niveles de ATe de uvas para vinificar sanas encontrados en nuestro trabajo.

Es probable que las frutas frescas enteras no contribuyan significativamente en la exposición humana de las toxinas de *Alternaria*, ya que los consumidores rechazan las frutas visiblemente infectadas o podridas. EFSA (2011) ha señalado que los datos aportados por estudios de incidencia natural de las toxinas de *Alternaria* en alimentos con contaminación fúngica, no apropiados para el consumo humano, no serían adecuados para una evaluación de riesgo. No obstante, en este sentido, los productos procesados de fruta si podrían aportar cantidades significativas de estas toxinas a la dieta humana, si las frutas visiblemente infectadas no son removidas antes del embalaje o el procesamiento (Barkai-Golan y Paster, 2008).

Existe una información limitada sobre los niveles de las toxinas de *Alternaria* en productos procesados de frutas. El ATe ha sido detectado como contaminante natural en jugo de tomate enlatado, pulpa, puré, pasta y en tomates cocidos enteros en niveles mayores a 178 µg/g (Da Mota y Valente Soares, 2000). Terminello y *col.* (2006) informaron la incidencia natural de toxinas de *Alternaria* en 80 muestras de purés de tomates de la Argentina. Estos autores encontraron ATe en 23 muestras (más de 4,021 µg/g), AOH en 5 muestras (más de 8,756 µg/g) y AME en 21 muestras (más de 1,734 µg/g). Lau y *col.* (2003) junto con Delgado y Gomez-Cordoves (1998) y Scott y *col.*, (2006), confirmaron la presencia de AOH en jugo de manzana, jugo de uva, néctar de arándano, jugo

de frambuesa, vino tinto y néctar de ciruela pasa a niveles mayores a 0,06 µg/g. Lopez y col. (2016) encontraron AOH (de 0,002 a 0,025 µg/g), AME (0,001 a 0,008 µg/g) y ATe en (0,066 a 0,462 µg/g) en salsas de tomate y 0,005 a 0,046 µg/g de ATe en vinos, en un estudio realizado en los Países bajos. Recientemente, también Mikusova y col. (2014) lograron detectar toxinas de *Alternaria* en bayas secas de vino de 3 regiones vitivinícolas eslovacas, aplicando el método de HPLC con detección por doble espectrometría de masa (MS/MS). En este caso, la incidencia natural de ATe presentó concentraciones en el rango de 0,7 a 31,0 µg/g, siendo el mínimo valor encontrado similar al obtenido en nuestra muestra de uva visiblemente infectada.

En general, los análisis acerca de la presencia de micotoxinas en uvas para vinificar y productos derivados, tanto en Argentina como a nivel mundial, se han centrado principalmente en algunas micotoxinas (ocratoxina A, aflatoxina, citrinina, patulina) producidas por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que cuentan con regulación vigente (Rousseaux y col., 2014). La presencia de ocratoxina A (OTA) en uvas para vinificar, bayas secas de uva y vino ha sido informada tanto en Europa como Sudamerica (Belli y col., 2005; Battilani y col., 2006, Chulze y col., 2006, Leong y col., 2006). En particular, en Argentina, se han detectado especies con capacidad de producir OTA (*A. carbonarius*, *A. niger*) e incidencia natural de OTA sólo en las regiones más cálidas del país (La Rioja, San Juan), sugiriendo que serían las zonas más expuestas al peligro de esta toxina (Chiotta y col., 2013).

Teniendo en cuenta que *Alternaria* es el componente principal de la micobiota en uvas para vinificar en diversas regiones vitivinícolas de Argentina y del mundo (Sage y col., 2002; Magnoli y col., 2003; Bau y col., 2005; Medina y col., 2005; Belli y col., 2006; Chulze y col., 2006; Serra y col., 2006; Ostry y col., 2007; Tancinova y col., 2015; Prendes y col., 2015) y que se han encontrado cepas con habilidad de producir ATe, AOH y AME (Prendes y col., 2015; Vargas Trinidad y col., 2015), el riesgo de encontrar las micotoxinas de *Alternaria* en este sustrato podría resultar inclusive mayor al de otras micotoxinas.

Por otra parte, las uvas para vinificar, podrían significar una fuente importante de contaminación con micotoxinas de *Alternaria*, debido a que muchas veces son empleadas para la elaboración de vino independientemente de su condición sanitaria. Si bien no existen reportes acerca de la estabilidad de estas toxinas durante el proceso de vinificación, se ha informado la estabilidad de AOH y AME en jugo de manzana y vino blanco por más de 5 semanas a temperatura ambiente y por 20 minutos a 80 °C (Scott y Kanhere, 2001). En congruencia, la incidencia natural tanto de AOH, AME y ATe ha sido reportada en jugo de uva y vino (Lau y col., 2003; Scott y col., 2006; Broggi y col., 2013; Pizzutti y col., 2014; Fan y col., 2016; Lopez y col., 2016). El vino entonces, podría contribuir significativamente a un aumento en la ingestión de estas micotoxinas en la dieta de quienes lo consumen (Logrieco y col., 2009).

En un futuro, se debería analizar la presencia de las micotoxinas AOH, AME y ATe en un mayor número de muestras de uva para vinificar, así como estudiar la incidencia de las mismas durante el proceso de vinificación hasta el vino, para poder evaluar el alcance de la contaminación y la verdadera exposición de los consumidores a éstas micotoxinas de *Alternaria*.

V.6 Evaluación del efecto de factores abióticos (actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por *Alternaria alternata* en medio de cultivo simil uva y en uva (estudio *in vitro* e *in situ*)

Entender el efecto de cada factor involucrado en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, es esencial para la predicción, comprensión y prevención de la producción de estos metabolitos en productos alimenticios (Sanchis y Magan, 2004; Pardo y col., 2005). Entre los factores ambientales más determinantes, pre y pos cosecha, se encuentra la disponibilidad de agua (a_w) y la temperatura, por lo que se necesita información precisa acerca del impacto y la relación entre estos factores, cuales son las condiciones marginales y las óptimas para el crecimiento y la producción de toxinas (Magan y col., 2003).

Las frutas resultan especialmente susceptibles al ataque fúngico, debido a su alta actividad acuosa (a_w), contenido de azúcar y la presencia de ácidos orgánicos que le otorgan a la pulpa un pH bajo (Tournas y Katsoudas, 2005).

Algunos estudios han observado que la a_w de la uva para vinificar desde el envero hasta la madurez cambia desde 0,98 a 0,95, como consecuencia de la acumulación de azúcar (Leong y *col.*, 2006; Tassou y *col.*, 2009). Por otro lado, se ha determinado que el proceso mediante el cual pequeñas moléculas son excretadas a la superficie externa de un tejido vegetal debido al agua presente en las mismas, conocido como exosmosis (Brown, 1915), se incrementa durante la madurez de la uva (Padgett y Morrison, 1990). Como consecuencia de este proceso, también se modifica la disponibilidad de agua en la piel de las bayas, así como la disponibilidad de nutrientes para la biota epífita (Rousseaux y Donéche, 2001).

Por otra parte, el clima de la región vitivinícola considerada resulta de gran influencia en la presencia, proliferación y producción de micotoxinas de las diferentes especies de hongos micotoxigénicos. Esta describe que las precipitaciones incrementan la a_w de la superficie de uva (Rousseaux y Donéche, 2001). La región vitivinícola de la DOC San Rafael presenta un clima caluroso y seco, de noches frías y sequía moderada, con riesgo de heladas tardías y granizo, con precipitaciones anuales que oscilan cerca de los 250 mm y moderada incidencia de enfermedades criptogámicas (Catania y *col.*, 2012). No obstante, es importante considerar el actual cambio climático (clima más cálido, olas de calor, mayores niveles de precipitación y sequías) que también podría estar afectando la distribución de las poblaciones fúngicas en uvas, afectando también la producción de las micotoxinas (Paterson y Lima, 2011).

Dado que el género *Alternaria* ha sido encontrado en todos los estadios madurativos de la uva, así como en diferentes regiones vitivinícolas del mundo (Rousseaux y *col.*, 2014), resulta importante conocer el rango de a_w y temperatura óptima y sub-óptima que permiten el crecimiento y la producción de micotoxinas por dichas especies.

El estudio realizado en la presente tesis, resulta de gran valor para predecir tanto el crecimiento como la producción de toxinas de *Alternaria* en uva para vinificar, ya que tanto las a_w (0,95, 0,96, 0,97, 0,98 y 0,99) como las temperaturas (15, 25 y 30 °C) evaluadas, simulaban las condiciones en las que se encuentran las uvas desde envero a cosecha en el campo. Además, el medio simul uva es un medio que posee la composición de la uva y ha sido ampliamente utilizado en la evaluación del efecto de factores abióticos sobre el crecimiento y producción de toxinas por otros organismos fúngicos, como *A. carbonarius* (Tassou y col., 2009), permitiendo comparaciones.

A su vez, el presente estudio resulta el primero en evaluar el efecto de la temperatura, la a_w en el crecimiento y la producción de AOH, AME y ATe en un medio de cultivo simul uva de 3 cepas de *A. alternata* aisladas de uva para vinificar.

Se observó que todos los factores ensayados afectaron tanto el crecimiento como la producción de toxinas de las cepas evaluadas.

Los niveles óptimos de a_w para el crecimiento variaron entre 0,95 y 0,99 la temperatura óptima resultó de 25 °C. Las 3 cepas evaluadas fueron capaces de crecer a la menor a_w evaluada (0,95) a 15, 25 y 30 °C. Por otro lado, las cepas presentaron diferencias en el crecimiento observado a la mayor temperatura evaluada (30 °C), en el caso de una de ellas (cepa 5.5) el crecimiento en esa temperatura a las a_w de 0,98, 0,97, 0,96 y 0,95 resultó igual que a 25 °C.

En la literatura, algunos estudios han reportado condiciones óptimas de temperatura y a_w para el crecimiento de cepas *A. alternata*, similares a las obtenidas en la presente tesis. Magan y Lacey, (1984) encontraron que las cepas de *A. alternata* aisladas de granos de trigo presentaban el mayor crecimiento a 0,98 y 1,00 a_w y 25 °C, Oviedo y col., (2009) informaron una a_w de 0,92 y 0,995 y 25 °C para cepas de *A. alternata* aisladas de soja. Mientras que Pose y col., (2009) reportaron 0,982 a_w y 21 °C, para el crecimiento de cepas de *A. alternata* aisladas de tomate.

Con respecto a la producción de toxinas, se evaluaron también distintos tiempos de incubación (7, 14, 21 y 28 días). Las concentraciones máximas tanto

de AOH, AME y ATe fueron producidas a 25 °C y 0,99 de a_w para las 3 cepas pero hubo variaciones en cuanto a los días de incubación necesarios para obtener el máximo de producción, siendo de 14 días para 1 de las cepas y de 21 días para las cepas restantes. Si bien, las concentraciones de toxinas variaron en función de todos los factores evaluados, los máximos niveles de producción de las 3 toxinas a las diferentes temperaturas evaluadas (15, 25 y 30 °C) fueron obtenidos a 0,99 de a_w para las 3 cepas, exceptuando el de caso de ATe en una de las cepas a 15 °C (donde el óptimo se obtuvo a 0,96 de a_w).

Si bien todos los metabolitos fueron producidos en el rango de temperatura de 15 a 30 °C y en un rango de 0,95 a 0,99 de a_w , en general la producción disminuyó a 15 y 30 °C y los niveles fueron bajos a 0,95 y 0,96 de a_w . Inclusive para 1 de las cepas los niveles de AOH y AME producidos en a_w diferentes a 0,99, fueron marginales. Por lo que los rangos de temperatura y a_w adecuados para la producción de las toxinas fueron más estrechos que aquellos para el crecimiento de las cepas, en coincidencia con estudios previos (Lee y col., 2016). Con respecto a las concentraciones de micotoxinas, la mayor producción fue obtenida por la cepa 25.1, seguida por la cepa 7.5 y finalmente la cepa 5.5, para cada una de las 3 toxinas.

Existen algunos estudios sobre el efecto de diferentes condiciones ambientales sobre la producción de micotoxinas por *A. alternata* en medios sintéticos, pero ninguno fue realizado en medio simil uva, por lo que se hace dificultosa la comparación directa de los mismos con nuestros resultados. De todas formas, al igual que en nuestro estudio, Magan y Lacey (1984) encontraron que AOH, AME y altenueno fueron producidos a una temperatura óptima de 25 °C y a 0,98 de a_w en trigo y agar extracto de trigo y que a todas las temperaturas evaluadas (5, 15, 25 y 30 °C) se produjo una mayor concentración de toxina a la mayor a_w evaluada (0,98). Por el contrario, Magan y Baxter (1994) encontraron que cepas de *A. alternata* aisladas de sorgo tenían diferentes patrones de producción de ATe en un medio de cultivo a base de sorgo. Según estos autores, ATe era producido en un rango de 0,93 a 0,99 de a_w dentro de un período de 28 días. Pose y col. (2010) estudiaron los perfiles de producción de

AOH, AME y ATe por cepas de *A. alternata* en medio a base de tomate. Las condiciones óptimas para la acumulación de ATe fueron 0,982 de a_w y 21°C luego de 28 días de incubación, aunque fue producida a 0,982 y 0,954 de a_w en el rango de 15 a 35 °C. Luego de 28 días de incubación a 0,982 de a_w y 6 °C todavía se detectaban pequeñas cantidades de ATe. A menor a_w (0,922) sólo se detectaban altas concentraciones de ATe a 21 °C luego de 21 días de incubación, a pesar de que bajos niveles fueron también producidos a 35 °C luego de 28 días de incubación. El óptimo de producción de AOH ocurrió a 21 °C y 0,954 de a_w luego de 28 días de incubación y la condición más favorable para la síntesis de AOH fue 21 °C en todo el rango de a_w evaluado (0,922-0,982). La máxima concentración de AME fue determinada a 0,954 de a_w y 35 °C, a pesar de que también se produjeron grandes cantidades a 21 °C.

Por otra parte, es sabido que el tipo de sustrato puede determinar la producción o no de las toxinas. Se ha demostrado que algunas cepas de hongos productores de toxinas en medios de cultivo sintéticos, no fueron capaces de sintetizarlas cuando crecieron sobre un sustrato natural, o que sólo producían un determinado grupo químico de toxinas (Betina, 1989; Viñas y col., 1992). Para evaluar la producción de toxinas en el sustrato de origen, en el presente trabajo se analizó por primera vez, el efecto de la temperatura (15, 25 y 35 °C) y tiempo de incubación (10, 17 y 24 días) en la producción de ATe en uva para las 3 cepas de *A. alternata* previamente evaluadas en medio simil-uva (estudio *in situ*).

Es importante destacar que en todas las condiciones evaluadas (temperatura y tiempo) se verificó una infección del 100 % de uvas inoculadas alrededor de los 5 días de incubación, provocada por las cepas de *A. alternata* inoculadas en su CMI, que garantizó el crecimiento de las cepas.

Se observó que todos los factores ensayados, influyeron significativamente en la producción de ATe para las cepas evaluadas. La cepa que produjo los mayores niveles de ATe en medio simil uva, también produjo los mayores niveles de ATe en uva, mientras que la cepa que produjo los menores niveles de ATe en medio simil uva, no fue capaz de producir cantidades significativas de la toxina en uva, en todas las condiciones de temperatura y tiempo evaluadas.

Considerando que las uvas inoculadas fueron sometidas a un ambiente de 100 % de humedad relativa durante el ensayo, es posible que la a_w de las mismas fuera similar a la máxima a_w ensayada en el medio simil-uva (0,99) y en ese caso, la óptima a_w para la producción de ATe en medio-simil uva y en uva coincidirían, aunque las temperaturas presentarían ligeras diferencias en estos 2 estudios. En el medio simil-uva la producción máxima fue alcanzada a 25 °C mientras que en uva la máxima producción se observó tanto a 15 como a 25 °C, para todas las cepas ensayadas. Respecto a los tiempos de incubación para obtener los máximos de ATe, fueron en general menores en medio simil uva (14 y 21 días), con respecto a la uva (17 y 24 días), aunque no se utilizaron los mismos tiempos de incubación para ambos ensayos.

Cabe destacar también que los niveles de ATe producidos por las cepas en medio simil uva fueron mayores a los producidos en uva. Esto puede deberse a que si bien, las uvas contienen nutricionalmente los elementos necesarios para el desarrollo y producción de micotoxinas, la disponibilidad de los mismos es mucho mayor en el medio simil uva que en uva.

La comparación de nuestro estudio *in situ* con bibliografía precedente resulta difícil, ya que existen escasos estudios relacionados con el tema.

Si bien, algunos trabajos fueron capaces de demostrar la producción de ATe, AOH, AME, ALT y trazas de ATX-1 en sustratos naturales como manzanas, tomates, arándanos, naranjas y limones inoculados con cepas toxicogénicas de *Alternaria* aisladas de diversos tejidos vegetales y cepas de *Alternaria* spp. aisladas de los mismos sustratos posteriormente inoculados, no evaluaron el efecto de diferentes condiciones ambientales. Las incubaciones fueron realizadas a 21 °C por 21 días (Stinson y col., 1980) o a temperatura ambiente por 21-28 días (Stinson y col., 1981), y tanto en tomates, arándanos, naranjas y limones, la toxina de mayor producción en estas condiciones fue ATe.

Por otro lado, aunque otros estudios inocularon cepas de *A. alternata* en frutillas, arándanos, tomates y diferentes variedades de uva de mesa y manzanas e incubaron a distintas temperaturas y tiempos, o no detectaron ATe

sugiriendo que la cepa elegida podría no haber sido productora de esta micotoxina (Ozcelik y col., 1990) o no la evaluaron (Tournas y Stack, 2001).

Pardo y col. (2005) utilizaron un modelo similar al nuestro en uva con diferentes condiciones de temperatura (10, 20 y 30 °C) y humedad relativa (R.H.; 80, 90 y 100 %) pero para evaluar su efecto en el crecimiento y la producción de OTA por *Aspergillus ochraceus*.

El conocimiento de la interacción entre las condiciones de a_w y temperaturas marginales y sub-óptimas, proporciona información muy útil para predecir los posibles riesgos de contaminación con toxinas de *Alternaria* durante la maduración de la uva en el campo hasta el inicio de la vinificación, donde ciertas condiciones de temperatura y humedad pueden favorecer la producción de micotoxinas. Estas conclusiones son válidas debido a que los rangos de a_w y temperatura evaluados simularon los rangos que pueden ocurrir durante la maduración de la uva en el campo.

El hecho de que *A. alternata* pueda producir ATe en uvas para vinificar en un amplio margen de condiciones, como ha sido demostrado en el presente trabajo, pone de manifiesto la posibilidad de encontrar contaminación natural con ATe en uva para vinificar, como también ha sido reportado en la presente tesis y consecuentemente en vino (Lau y col., 2003; Scott y col., 2006; Broggi y col., 2013; Pizzutti y col., 2014; Fan y col., 2016; Lopez y col., 2016).

Por lo expuesto, la presencia del género *Alternaria* debe ser considerada un riesgo toxicológico para los consumidores y se deben tomar medidas para el control de su desarrollo y producción de toxinas en uva para vinificar.

V.7 Aislamiento e identificación de levaduras y organismos tipo levadura de uvas Malbec de la DOC San Rafael

En pos de seleccionar un posible agente de control biológico de *A. alternata* en uva para vinificar, se aislaron e identificaron levaduras del mismo ecosistema. El método de aislamiento aplicado fue el de la siembra directa de bayas de uvas Malbec de la DOC San Rafael de las vendimias 2011, 2012 y 2013 y el criterio de

aislamiento fue tomar colonias con características de levadura al cabo de 7 días de incubación.

La mayoría (82%) del total de aislados durante las vendimias 2011, 2012 y 2013, fue identificado como el organismo “yeast-like” o tipo levadura *A. pullulans*. Según sus características fisiológicas, este organismo conforma junto con las levaduras basidiomicetes oxidativas y algunas bacterias ácido lácticas uno de los tres grandes grupos en los que se puede dividir el consorcio microbiano del vino (CMV) (Barata y col., 2012). Este grupo oligotrófico se encuentra favorecido por ambientes pobres de nutrientes como lo son las uvas sanas. Estudios recientes han demostrado que este grupo es el dominante en las superficies de uva (Sabate y col., 2002; Subden y col., 2003; Prakitchaiwattana y col., 2004; Raspor y col., 2006) y podría ser consecuencia del uso creciente de métodos de análisis directo de uva, en vez de la fermentación del jugo (Davenport, 1973, 1974). De manera similar a nuestro trabajo, *A. pullulans* ha sido encontrado como la principal especie aislada de uvas inmaduras, maduras, sanas y dañadas (Prakitchaiwattana y col., 2004; Barata y col., 2011; 2012), así como se encuentra informada en numerosos estudios de levaduras presentes en uvas para vinificar a tiempo de cosecha (Barnett y col., 1972; Guerzoni y Marchetti, 1987; Sabate y col., 2002; Subden y col., 2003; Raspor y col., 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Clavijo y col., 2010; Baffi y col., 2011). No obstante, existen algunos estudios en donde la presencia de *A. pullulans* no ha sido informada (Renouf y col., 2005; Barata y col., 2008a; 2008b; Chavan y col., 2009; Li y col., 2010), en particular, durante el estudio de levaduras asociadas a uvas Malbec de Mendoza, Argentina, durante las vendimias 2000 y 2001 (Combina y col., 2005). Esto podría deberse a los métodos utilizados para su aislamiento, a la ausencia de la especie microbiana *A. pullulans* o a las controversias acerca de su clasificación como levadura, ya que es un organismo polimorfo (Cooper y Gadd, 1984). Si bien, ha sido concebido dentro de la categoría de hongos que se asemejan a las levaduras u organismo tipo-levadura (“yeast-like”), perteneciente a la clase Euascomycetes, orden Dothideales, familia Dothideaceae, numerosos trabajos lo han tratado como una levadura (Barnett y col., 1972; Guerzoni y Marchetti, 1987;

Sabate y col., 2002; Subden y col., 2003; Prakitchaiwattana y col., 2004; Raspor y col., 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Clavijo y col., 2010; Baffi y col., 2011) e inclusive algunos investigadores consideran a esta especie como una auténtica levadura (Chi y col., 2007, 2009; Ni y col., 2009).

Los géneros y/o especies de levaduras aislados en este trabajo: *H. uvarum* (6,3 %), *M. pulcherrima* o spp. (5,4 %), *Cr. Laurentti II* (2,7 %), *C. zemplanina* (2,7 %) y *Rhodotorula* spp. (0,9 %), son levaduras no-*Saccharomyces* que coinciden con las levaduras encontradas en superficie de uva para vinificación de distintas regiones vitivinícolas (Fleet y col., 2002; Sabate y col., 2002; Subden y col., 2003; Prakitchaiwattana y col., 2004; Combina y col., 2005; Renouf y col., 2005; Raspor y col., 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Barata y col., 2008a, 2008b; Chavan y col., 2009; Clavijo y col., 2010; Li y col., 2010.; Baffi y col., 2011). Las especies *Cr. laurentti II* y *Rhodotorula* spp. son basidiomicetes oxidativos que se encontrarían en el grupo oligotrófico junto con *A. pullulans*, mientras que las especies de levaduras *H. uvarum*, *C. zemplanina* y *M. pulcherrima* (fermentativas débiles apiculadas o fermentativas) estarían incluidas dentro del segundo gran grupo definido por Barata y col. (2012) como copiotrófico. Este grupo presenta mayores requerimientos nutricionales y está directamente vinculado con la mayor disponibilidad de nutrientes que ocurre en la uva a tiempo de cosecha debido a la liberación de jugo de las uvas maduras y el aumento de exósmosis de pequeñas moléculas a la superficie, entre otros sucesos (Barata y col., 2012).

Existen numerosos factores que pueden afectar al número y tipo de levaduras y organismos tipo levadura presentes en uva a tiempo de cosecha, entre ellos las diferencias en las regiones vitivinícolas evaluadas, el clima cerca de la cosecha, el estado de las uvas y el uso de tratamientos fitosanitarios, los más influyentes (Riberau-Gayon y col., 2000; Comitini y Ciani, 2008; Barata y col., 2012; Martins y col., 2012).

En el presente trabajo, se encontró diversidad en las especies de levadura presentes entre las diferentes vendimias muestreadas. Si bien *H. uvarum* fue la levadura de mayor presencia luego de *A. pullulans* considerando todas las vendimias analizadas juntas, no significó la población mayoritaria en ninguna

de las vendimias en particular. En contraposición a nuestros resultados, algunos estudios han observado la presencia frecuente de levaduras apiculadas, como *H. uvarum*, pudiendo representar desde el 50 al 99 % de la población total en uvas sanas maduras (Barnett y col., 1972; Yanagida y col., 1992; Fleet y Heard, 1993; Riberau Gayon y col., 2000; Jolly y col., 2003; Combina y col., 2005; Nisiotou y Nychas, 2007; Clavijo y col., 2010; Li y col., 2010; Baffi y col., 2011). Por otra parte, las levaduras encontradas durante la vendimia 2013 fueron similares a lo observado en algunos estudios previos en donde las especies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Candida* estuvieron entre las más frecuentes (Yanagida y col., 1992; Sanchez de Cos y col., 1999; Rementeria y col., 2003; Renouf y col., 2005; Barata y col., 2008a; 2008b). Llamativamente, la presencia de *M. pulcherrima* o *Metschnikowia* spp. se detectó solo durante la vendimia 2011. Una de las posibles explicaciones podría ser un aumento de las precipitaciones durante la maduración de la uva en el campo durante este año, como ha sido previamente reportado (Combina y col., 2005; Longo y col., 1991).

Por otro lado, las diferencias halladas entre los distintos tratamientos aplicados en campo no fueron consistentes durante las vendimias analizadas, por lo que no se podrían atribuir a un tratamiento en particular. Si bien durante la vendimia 2011, sólo se aislaron cepas de la especie *M. pulcherrima* o *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* en uvas con la aplicación del tratamiento orgánico, ésta diferencia no se repitió en la vendimia 2012, donde todos los aislados pertenecieron a *A. pullulans*, independientemente de la aplicación del tratamiento orgánico. Durante la vendimia 2013, la población de levaduras aislada de uvas con tratamiento orgánico resultó ser mayoritariamente *A. pullulans*, seguida por *Cr. laurentii* II, mientras que los aislados de uvas con tratamiento no orgánico (con fungicida de la familia de los ditiocarbamatos) resultaron pertenecer mayoritariamente a *A. pullulans*, seguida por *H. uvarum*, *C. zemplinina* y *Rhodotorula* spp.

Aunque el efecto de los tratamientos fitosanitarios en la comunidad de levaduras epífitas de uva, no está del todo claro, algunos estudios revelaron una disminución en la misma causada por el uso de pesticidas para combatir

organismos como *U. necator*, *P. viticola*, *B. cinerea* y *S. necator* (Comitini y Ciani, 2008; Cadez y col., 2010; Cordero-Bueso y col., 2011; Grube y col. 2011; Schmid y col., 2011). Recientemente, Martins y col. (2014), encontraron que el conteo de levadura fue significativamente mayor en uvas cultivadas bajo tratamiento orgánico que en aquellas sometidas a tratamiento convencional, mientras que el contenido de cobre fue mayor en estas últimas. Por lo que las diferencias en la densidad de la población microbiana se atribuyeron a los tratamientos con fungicidas con base de cobre, que inhibiría esta comunidad de microorganismos.

V.8 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva, confirmación de su identidad y evaluación de su capacidad de controlar la producción de ácido tenuazónico

La prevención del crecimiento de hongos productores de micotoxinas es la estrategia más efectiva para controlar la presencia de micotoxinas en los alimentos (Hocking y col., 2007). En los últimos 25 años, debido al aumento de las regulaciones y las demandas de los consumidores por productos más saludables, se ha incrementado el interés por el control biológico como método alternativo a la aplicación de fungicidas orgánicos y/o químicos para el control del crecimiento fúngico en frutos (Liu y col., 2013). En este sentido, las levaduras epífitas de uva para vinificar resultan prometedoras para el control biológico de *Alternaria*, debido a que, como componentes mayoritarios adaptados fenotípicamente a este nicho, son capaces de colonizar más efectivamente y competir por los nutrientes y el espacio además de poder permanecer en las superficies de planta o heridas durante largos periodos y condiciones secas (Suzzi y col., 1995).

El trabajo realizado en la presente tesis resulta el primero en evaluar la capacidad antagonista de levaduras y organismos tipo-levadura frente a *A. alternata* en uva para vinificar. En pos de generar una presión de selección durante el aislamiento, las colonias con características de levadura se aislaron al cabo de 7 días de incubación de bayas de uvas Malbec colocadas directamente

sobre el medio agarizado con dicloran y rosa de bengala (DRBC), para someterlas a una convivencia obligada con hongos. Por otra parte, la selección fue realizada directamente mediante ensayos *in situ* (bayas de uva separadas).

El porcentaje de cepas antagonistas obtenido, bajo el criterio de reducción de un 60 % del porcentaje de uvas infectadas por cada una de las cepas de *Alternaria alternata* empleadas, fue de 22,1 % (15/67) y si se excluye la población del organismo tipo levadura *A. pullulans*, el porcentaje de levaduras con capacidad antagonista asciende a 75 % (15/20).

Existen algunos trabajos previos en donde la selección de levaduras antagonistas fue realizada en uva de mesa. Nally y col. (2013) evaluaron la capacidad antagonista de 234 levaduras aisladas de diferentes ambientes vitícolas: mosto en fermentación (207), tierra de viñedo (8) y uvas de mesa sanas (18) para controlar a *B. cinerea* y a los hongos que componen el complejo de podredumbre del racimo en uvas de mesa (*A. caelatus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *F. oxysporum*, *P. commune*, *R. stolonifer* y *Ulocladium* sp.), con la misma metodología empleada en nuestro trabajo. En este estudio el 18,4 % de las levaduras evaluadas logró disminuir significativamente la infección (60 % o más) de al menos uno de los hongos que componen el complejo de podredumbre ácida en uvas de mesa, mientras que el 0,4 a 4 % de las mismas disminuyó la infección de alguno de ellos en particular. Por otra parte, Zahavi y col. (2000) encontraron que un 19 %, de un total de 129 levaduras y organismos tipo levadura epífitos de uva de mesa y uvas para vinificar evaluados, fueron capaces de reducir un 60 % la infección producida por *B. cinerea* en bayas de uvas de mesa. Es posible que la búsqueda de levaduras antagonistas en el mismo nicho ecológico al de los organismos a controlar, sumado a una metodología de pre-selección como la aplicada en el presente trabajo, hayan contribuido al alto porcentaje de antagonistas obtenido entre los aislados.

El biocontrol puede visualizarse como un sistema, en donde existe una relación cuantitativa entre la concentración de las células del antagonista, concentración de organismo a controlar y el resultante biocontrol (Schisler y col., 2011). En este sistema, resulta importante conocer la concentración del patógeno a la cual se lo

puede controlar, así como definir la concentración del antagonista necesario para tal fin. En ese marco, la utilización de la concentración mínima infectiva del organismos a controlar (CMI), utilizada en el presente trabajo, evitaría el exceso del mismo resultando en una detección más sensible de la capacidad antagonista de los organismos evaluados.

La capacidad antagonista de las levaduras evaluadas durante el presente trabajo resultó elevada en comparación con otros estudios. La mayoría (14/15) de las levaduras aplicadas a razón de 20 μ l de una concentración de 10^6 células/mL en una herida de sobre una baya de uva Malbec, 2 horas previas a la inoculación de *A. alternata*, evitó por completo la infección de las 3 cepas *A. alternata* inoculadas en sus respectivas CMI. Nally y col. (2013), encontraron dos levaduras, inoculadas bajo las mismas condiciones que nuestro trabajo, capaces de evitar la infección producida por *A. terreus* y una de ellas además capaz de evitar la infección por *P. commune*, la concentración de los hongos empleados en este estudio fue de 10^4 esporas/mL, sin tener en cuenta su CMI. Por otra parte, Zahavi y col. (2000) también encontraron sólo una levadura, de la que se aplicó 10 μ l de 10^8 - 10^9 cel/mL 1-2 horas previas a la inoculación del patógeno, capaz de evitar la infección producida por *B. cinerea*, siendo este último inoculado a razón de 10 μ l de una concentración de 5×10^4 conidios/mL, independientemente de su CMI. El nivel de control logrado por las levaduras antagonistas en el presente trabajo es el recomendado para seleccionar un antagonista con buenas perspectivas de ser efectivo a campo (Chaluzt y Droby, 1998).

Por otro lado, la identificación de las levaduras con capacidad antagonista mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada por el método de PCR-RFLP, exceptuando el caso de 5 cepas pertenecientes al género *Metchnikowia*. Es importante resaltar que la técnica de PCR-RFLP no tiene la sensibilidad adecuada para discernir entre las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, ya que sólo un 2,2 % de sustituciones (11 de 499 posiciones de nucleótidos compartidas) separa a una especie de otra (Kurtzman y Droby, 2001). Esta sutil diferencia hace que inclusive, mediante la

técnica de 26S, resulte compleja la asignación de especie a las cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*. La construcción de los árboles filogenéticos permitió asignar sólo una de las 6 cepas de *Metschnikowia* aisladas a la especie *M. pulcherrima*, mientras que los 5 restantes fueron ubicadas cercanas tanto a *M. pulcherrima* como a *M. fructicola*, no siendo posible afirmar a cuál de estas dos especies pertenecerían. Por otra parte, la asignación de *S. bacillaris* como sinónimo obligado de *C. zemplinina* es relativamente reciente (Duarte y col., 2012).

El trabajo realizado en la presente tesis resulta el primer informe acerca del uso de cepas de *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* como antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar y particularmente, el primer informe de la levadura *S. bacillaris* (o *C. zemplinina*) con capacidad biocontroladora.

Existen numerosos estudios en la literatura sobre de actividad antagónica de cepas de levadura tales como *Candida* spp., *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* frente a distintos patógenos fúngicos de frutos. Teixido y col. (1998) lograron reducir la incidencia y severidad, entre un 50 y 60 %, de la podredumbre azul producida por *P. expansum* en manzanas mediante la aplicación a campo de cepas de *C. sake* con capacidad antagonista. Heibig (2002) observaron que la aplicación de *Cr. albidus* durante la floración reducía la incidencia de la podredumbre gris post-cosecha en cerezas maduras. La exitosa actividad de la levadura antagonista *C. oleophila* en frutos cítricos post-cosecha frente a *P. italicum* (podredumbre azul) y *P. digitatum* (podredumbre gris) (Chalutz y Wilson, 1990; Chalutz y col., 1998; Mcguire 1994; Wilson y Chalutz, 1989) resultó en su comercialización bajo el nombre de Aspire (Ecogen, Inc., Langhore, PA) (Droby y col., 1993,1998).

Con respecto a levaduras de ambientes vitivinícolas, Nally y col. (2013) encontraron 43 levaduras con actividad antagonistas (entre las que se encontraron cepas de *C. catenulata*, *C. famata*, *C. rugosa*, y *C. sake*) contra alguno de los hongos componentes del complejo de podredumbre del racimo en uvas de mesa (*A. caelatus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *F. oxysporum*, *P. comune*, *R. stolonifer* y *Ulocladium* spp.).

Por otro lado, Zahavi y col. (2000), encontraron que *C. guillermondii* aislada de la flora epífita de uvas de mesa y uvas para vinificación fue efectiva en reducir la incidencia de podredumbre causada por *B. cinerea*, *R. stolonifer* y *A. niger* en uvas de mesa y uvas para vinificar. Así también, Bleve y col. (2006) informaron que cepas aisladas de la flora epífita asociada a las bayas de uva de la variedad Negroamaro, entre las que se encontraron *M. pulcherrima* y *C. incommunis*, fueron capaces de disminuir la colonización de las uvas por *A. carbonarius* y *A. niger*.

Es interesante el trabajo de Karabulut y col. (2003) donde se aplicó la levadura *M. fructicola* 24 hs previas a la cosecha de uvas de mesa para controlar la incidencia de enfermedades post-cosecha generadas por *B. cinerea*, *Alternaria* spp., o *A. niger*. Después del almacenamiento por 30 días a 1 °C seguido de 2 días a 20 °C, se logró reducir la incidencia de la enfermedad en aproximadamente el 60 % y persistió la población de *M. fructicola* en las uvas durante su almacenamiento. Esto derivó en la comercialización de la misma en Israel bajo el nombre de Shemer (Agrogreen, Asgdod) (Kurtzman y Droby 2001; Karabulut y col., 2002 y 2003) para el control de enfermedades post-cosecha en varios frutos incluyendo uvas, frutos de pepita y cítricos.

La levadura *Kloeckera apiculata* (Teleomorfo: *H. uvarum*), aislada de podredumbre de cítricos fue efectiva en el control de *P. italicum* y *B. cinerea* en cítricos y uvas (Long y col., 2005).

Con respecto al biocontrol del patógeno *A. alternata*, Tian y col. (2004) intentaron reducir las podredumbres causadas por patógenos post-cosecha *A. alternata*, *M. fructicola*, *P. expansum* y *B. cinerea* en cerezas dulces aplicando aislados de *Trichosporon pullulans*, *Cr. laurentii* y *R. glutinis*, en huertos previo a la cosecha, resultando *Cr. laurentii* el antagonista más efectivo. Wang y col. (2008) encontraron que la levadura marina *Rhodosporidium paludigenum*, aislada del mar al este de China inhibió efectivamente a *A. alternata* en tomates cherry. Suzzi y col. (1995) también encontraron actividad antagonista en medio de cultivo Agar Sabourand de levaduras naturales del vino aisladas de baya de uva contra hongos patógenos de planta (*A. niger*, *A. alternata*, *B. squamosa*, *C.*

variable, *C. acutatum*, *F. oxysporum*, *M. phaseolina*, *P. digitatum*, *Phomopsis longicola*, *R. fragariae*, *S. sclerotium* y *T. viride*). Entre los antagonistas más prometedores, que exhibieron el mayor espectro de actividad se encontraron 2 cepas de *S. cerevisiae* y una cepa identificada como *Zygosaccharomyces* spp.

Es llamativo que ninguna de las cepas pertenecientes al organismo *A. pullulans* evaluadas haya resultado antagonista de *A. alternata* en uva para vinificar. *A. pullulans* ha demostrado actividad antagónica frente a distintos patógenos de frutos (Schena y col., 1999; Castoria y col., 2001) y es integrante mayoritario de la flora de uvas para vinificar (Barata y col., 2012). Existen estudios donde se ha observado su actividad antagónica frente a *A. carbonarius* (causante de la pudrición ácida) en uvas tintas de Grecia (Dimakopoulou y col., 2008). Desde el punto de vista fisiológico, *A. pullulans* es un organismo con requerimientos mínimos para su supervivencia en uva (Barata y col., 2012). Es probable que esta poca exigencia para sobrevivir constituya una presión selectiva negativa para el desarrollo de mecanismos para la competencia por nutrientes, uno de los más utilizados por los organismos antagonistas (Liu y col., 2013). Esta idea se vería reforzada con la evidencia de que las cepas de levadura pertenecientes a las especies *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp. evaluadas tampoco resultaron antagonistas durante el presente estudio. Estas especies están incluidas dentro de las levaduras basidiomicetes oxidativas, y también integran junto con *A. pullulans*, el grupo de las “oligotróficas” o aquellas con requerimientos mínimos para su desarrollo (Barata y col., 2012).

Se ha discutido reiteradamente acerca del biocontrol como una característica dependiente de la cepa y no de la especie (Suzzi y col., 1995), pero no se han hecho análisis a la luz de los requerimientos fisiológicos de las levaduras evaluadas. En este trabajo, la mayoría de las cepas evaluadas pertenecientes al grupo de las copiotróficas -las apiculadas débilmente fermentativas como *H. uvarum* y las fermentativas como *C. zemplinina* y *M. pulcherrima* o *M. fructicola*- resultaron antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar, mientras que ninguna de las cepas incluidas dentro del grupo de oligotróficas -*A. pullulans*, *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp. de menores requerimientos nutricionales lo

fueron. Esto sugeriría una correlación positiva entre la capacidad antagonista y los mayores requerimientos nutricionales de los organismos evaluados.

Por otra parte, resulta importante evaluar si el uso de levaduras antagonistas capaces de controlar el crecimiento fúngico evita la producción de las micotoxinas. Existe información sobre que la adición de fungicidas, también utilizados para el control, puede generar efectos estimulantes sobre la producción de micotoxinas por cepas toxigénicas, posiblemente por el estrés que generan (Moss y col., 1991; Dalcero y col., 1995, Ramirez y col., 2004). Debido a lo expuesto anteriormente, durante el presente trabajo se evaluó la capacidad de levaduras previamente seleccionadas por proteger a la uva de la infección producida por *A. alternata*, de controlar también la producción de ácido tenuazónico bajo las mejores condiciones de producción del mismo, previamente determinadas (25 °C, 24 días de incubación y R.H. 100 %).

Todas las levaduras evaluadas (6) demostraron capacidad de disminuir la producción de ATe en uva, y la mayoría (5) de ellas logró evitar la producción de ATe de las 2 cepas de *A. alternata* empleadas, obteniendo valores similares a los controles con agua y levaduras, sin *A. alternata*. Aunque no se probaron todas las levaduras previamente seleccionadas por su capacidad de evitar la infección en uva, la selección realizada mediante este criterio, sería apropiada para obtener levaduras que también eviten o disminuyan la producción de ATe en uva. No obstante, sería necesario evaluar que ocurre con la producción de otras micotoxinas producidas por *A. alternata*.

Hasta el momento, no existen estudios previos sobre el uso de levaduras antagonistas para controlar la producción de las toxinas producidas por *A. alternata*. Mientras que varios estudios han demostrado la capacidad de levaduras antagonistas tanto para disminuir tanto el crecimiento como la producción (o degradación) de OTA de algunas especies de *Aspergillus* en uvas para vinificar (Dimakopoulou y col., 2008; Ponsone y col., 2011; Cubaiu y col., 2012; Kapetanakou y col., 2012; Zhang y col., 2016).

Las levaduras antagonistas seleccionadas en la presente tesis resultan prometedoras para el control biológico de *A. alternata* en uva para vinificar. Será

necesario determinar la influencia de distintos factores en su efectividad y estudiar los posibles mecanismos involucrados en el biocontrol, así como sus efectos en la vinificación. Esto permitirá elegir a las mejores antagonistas factibles de ser propuestas como componentes de un biofungicida para ser usado en uvas para vinificar.

VI. CONCLUSIONES

- El género *Alternaria* es un componente mayoritario de la microbiota presente en uvas Malbec de la región vitivinícola DOC San Rafael.
- Mediante marcadores morfológicos y moleculares se identificó como única especie presente a *Alternaria alternata*.
- La mayoría de las cepas de *A. alternata* produjeron alguna de las 3 micotoxinas evaluadas (AOH, AME y especialmente ATe) y demostraron una alta capacidad patogénica en uva.
- La metodología analítica optimizada para evaluar la incidencia natural de ATe en uvas para vinificación, basada en QuEChERS-HPLC-UV, mostró niveles de recuperación adecuados, mayor a 82 % y buena reproducibilidad intralaboratorio.
- Más de la mitad (57 %) de las muestras de uva analizadas, presentó contaminación natural con ATe, aportando información original a nivel nacional y mundial sobre la contaminación natural de esta toxina en uvas para vinificar.
- Estudios ecofisiológicos *in situ* e *in vitro* realizados en 3 cepas de *A. alternata* aisladas de uva, demostraron que el crecimiento y la producción de AOH, AME y ATe ocurrieron en condiciones de disponibilidad de agua y temperatura que simulaban las condiciones de maduración de las uvas, desde envero a cosecha (rango de 0,95 a 0,99 de aw, y temperatura de 15 a 35 °C).
- El hecho de que *A. alternata* pueda producir sus micotoxinas en un amplio rango de condiciones en uvas para vinificar, pone de manifiesto la posibilidad de encontrar contaminación natural en las mismas, por lo que la presencia del género *Alternaria* debe alertar sobre un posible riesgo toxicológico para los consumidores de vino.
- Se lograron aislar e identificar levaduras del mismo ecosistema, capaces de ejercer un control biológico de *A. alternata* en uva para vinificar.

- Con la metodología de selección empleada, se obtuvo un gran porcentaje (22,4 %) del total de levaduras y organismos tipo levadura aislados de uvas Malbec evaluados que presentaron actividad antagonista de *A. alternata* en uva.
- La mayoría de las levaduras seleccionadas mostraron una gran capacidad antagonista logrando un efecto preventivo de la infección de *A. alternata* en uva.
- Todas las cepas de levadura de mayores requerimientos nutricionales evaluadas, *Metchnikowia* spp., *Candida zemplinina* y la mayoría de *Hanseniaspora uvarum*, mostraron capacidad antagonista frente a *A. alternata*, no así las cepas de menores requerimientos, pertenecientes al organismo tipo levadura *Aureobasidium pullulans* y a las especies de levadura *Cryptococcus laurentii* II y *Rhodotorula* spp.
- Se obtuvieron levaduras, entre las seleccionadas, que no sólo previnieron la infección por *A. alternata*, sino que además lograron disminuir la producción de ATe. Resultando prometedoras como agentes de control biológico de *Alternaria* en uva para vinificar.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, H. K., Tanaka, T., Shier, W. T. (1995). Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* toxin (AAL-toxin) and fumonisin in plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry*, 40(6), 1681-1689.

Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venâncio, A. (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 240-242.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86(2), 412-431.

Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R. G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105(03), 291-299.

Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106(02), 170-182.

Andersen, B., Dongo, A., Pryor, B. M. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*, 112(2), 241-250.

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(9), 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(18), 5232-5237.

Aurand, J. (2016). Aspectos de la coyuntura mundial. Organización Internacional de la viña y el vino (OIV). www.oiv.int/public/medias/4588/oiv-noteconjmars2016-es.pdf.

- Badenoch, P. R., Halliday, C. L., Ellis, D. H., Billing, K. J., Mills, R. A. D. (2006). *Ulocladium atrum* keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1190-1193.
- Baffi, M. A., dos Santos Bezerra, C., Arévalo-Villena, M., Briones-Pérez, A. I., Gomes, E., Da Silva, R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Annals of Microbiology*, 61(1), 75-78.
- Baker, K. F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1), 67-85.
- Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., Loureiro, V. (2008a). Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1008-1017.
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2008b). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1182-1191.
- Barata, A., Pais, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2011). Influence of sour rotten grapes on the chemical composition and quality of grape must and wine. *European Food Research and Technology*, 233(2), 183-194.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259.
- Barkai-Golan, R., Paster, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 147-159.
- Barnett, J. A., Delaney, M. A., Jones, E., Magson, A. B., Winch, B. (1972). The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Archiv für Mikrobiologie*, 83(1), 52-55.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Varrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3-rd Edition, Univ. Press, Cambridge.
- Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 53-60.

Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Minguez, S., Cabañes, F. J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 125-130.

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M. L., Ramos, A. J., Bragulat, M. R. (2006a). Mycobiota and ochratoxin A producing from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 40-45.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2006b). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23(10), 1021-1029.

Bennet JW, Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.

Betina V. (1989). Mycotoxins as Secondary Metabolites. Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam, pp. 27-41.

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 204-209.

Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 139-148.

Bottalico A, Logrieco A. (1992). *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. En: Chelowski J, Visconti A (eds.), *Alternaria Biology, Plants Diseases and Metabolites*. Elsevier, pp. 67-76.

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, Nueva York, pp. 65-108.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabanes, F.J. (2008). Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 286-289.

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

Brugger, E.M., Wagner, J., Schumacher, D.M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. and Lehman, L. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 164, 221-230.

Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Farris, G.A., Madau, G., Emonti, G. (1999). Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3854-3857.

Cabras, P., Angioni, A. (2000). Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 967-973.

Cadez, N., Zupan, J., Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *F.E.M.S. Yeast Research*, 10, 619-630.

Calhelha, R. C., Andrade, J. V., Ferreira, I. C., Estevinho, L. M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology*, 23(4), 393-398.

Catania, C. D., Martín Uliarte, E., Monte, R. F. D., Avagnina de del Monte, S., Antelo Bruno, L., Molina, J., Zanus, M. C. (2012). En: Tonietto, J., Sotés Ruiz, V., Gómez-Miguel, V. (Eds). *Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas iberoamericanas*. CYTED, Madrid, pp. 51-96.

Castoria, R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S. De Cicco V. (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biological Technology*, 22, 7-17

Chalutz, E., Wilson, C.L. (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74, 134-137.

Chalutz, E., Droby, S. (1998). Biological control of postharvest disease. En: Boland, G.J., Kuykendall, L.D- (Eds.), *Plant-Microbe interactions and Biological Control*. Dekker, New York, pp.157-170.

Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26, 801-808.

Clavijo, A., Calderón, I.L., Paneque, P. (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de

Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 241–245.

Chi, Z., Ma, C., Wang, P., Li, H.F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98, 534-538.

Chi, Z., Wang, F., Chi, Zhe, Yue, L., Liu, G., Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 793–804.

Chiotta, M., Ponsone, M.L., Combina, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N. (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 137-141.

Chiotta, M., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M., Chulze, S.N. (2010). Influence of *Planococcus ficus* on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A incidence in vineyards from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 212-218.

Chiotta, M. L., Ponsone, M. L., Sosa, D. M., Combina, M., Chulze, S. N. (2013). Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiology*, 36(2), 182-190.

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

Chung, I. M., Ju, H. J., Sim, S. C., Paik, S. B., Yu, S. H. (1998). Agriculture: survey and control of the occurrence of mycotoxins from postharvest vegetables in Korea (2) detection of major mycotoxins from diseased spice vegetables (onions, garlics and peppers). *Analytical Science and Technology*, 11(3), 206-206.

Chunmei, J., Junling, S., Qian H., Yanlin L. (2013). Occurrence of toxin-producing fungi in intact and rotten table and wine grapes and related influencing factors. *Food Control*, 31, 5-13.

Christensen, K.B., van Klink, J.W., Weavers, R.T., Larsen, T.O., Andersen, B., Phipps R.K. (2005). Novel chemotaxonomic markers for the *Alternaria infectoria* species group. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 431-435.

Chulze, S., Torres, A., Dalcero, A., Combina, M. (1994). Production of alternariol and alternariol monomethyl ether in natural substrates in comparison with semisynthetic culture medium. *Mycotoxin Research*, 10, 79-84.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S5-S9.

Clouvel, P., Bonvarlet, L., Martinez, A., Lagouarde, P., Dieng, I., Martin, P. (2008). Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 74-80.

Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1055-1061.

Comitini, F., Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, 58(3), 489-493.

Cook, R.J., Baker, K.F. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. En: American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Cooper, L. A., Gadd, G. M. (1984). The induction of mycelial development in *Aureobasidium pullulans* (IMI 45533) by yeast extract. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50(3), 249-260.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., Valero, E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 132-139.

Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A.D., Budroni, M., Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4, 1468-1481.

Cucchi, N., Becerra, V. (2009). *Manual de tratamiento Fitosanitario para cultivos de clima templado bajo riego*. Sección III. Vid- Tomo I. EDICIONES INTA, Argentina.

Dalcero, A., Chulze, S., Torres, A., Rodríguez, M., Combina, M. (1995). Effect of pesticides in *Alternaria alternata* mycotoxins production. *Mycotoxin Research*, 11(2), 69-74.

Dallyn H, Fox A. (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En: Goud GH, Corry EL (eds.), *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*. Academic Press, London- New York, pp.129-139.

Da Motta S., Valente Soares L., (2000) Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acid in tomato products. *Food Chemistry*, 71, 111-116.

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

Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdiou, D. (2000). Identification and quantification of geosmin, a powerful earthy odorant contaminating wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4835-4838.

Davenport, R.R. (1973). Vineyard yeasts—an environmental study. En: Board, R.G., Lovelock, D.H. (Eds.), *Sampling—Microbiological Monitoring of Environments*. Academic Press, London, pp. 143-174.

Davenport, R.R. (1974). Microecology of yeasts and yeast like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, 13, 123-130.

Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosach, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.

De Koch, S. (1998). Control of post-harvest decay of fruit by means of antagonistic microorganisms. Ph.D. dissertation. University of Stellenbosch, Stellenbosch.

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

Desjardins A.E. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA, 260 pp.

Diaz, G.A., Torres, R., Vega, M., Latorre, B.A. (2009). Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *Food Microbiology*, 133, 195-199.

Diguta, C.F., Vincent, B., Guilloux-Bénatier, M., Alexandre, H., Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28, 1145-1154.

Dimakopoulou, M., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E.A., Tjamos, E.C., 2008. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control*, 46, 158-165.

Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guérin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M. (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis e potentialities and limit of the method. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1340-1350.

Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E. (1993). Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control*, 3, 47-52.

Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, E., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzour, M., Shachnai, A. (1998). Commercial testing of Aspire: a biocontrol preparation for the control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12, 97-101.

Duarte, F. L., Pimentel, N.H., Teixeira, A., Fonseca, A. (2012). *Saccharomyces bacillaris* not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 653-658

Dugan, F. M.; Lupien, S. L.; Grove, G. G. (2002). Incidence, aggressiveness and *in planta* interactions of *Botrytis cinerea* and other filamentous fungi quiescent in grape berries and dormant buds in Central Washington State. *Phytopathology*, 150, 375-381.

EC. (2006). Commission Regulation (EC) No 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.

EFSA on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011). Scientific opinion on the risk for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. E.F.S.A. Journal, 9(10): 2407. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407> (97 pp.)

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by R.F.L.P. analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 329–337.

Fan, Q., Tian, S.P. (2000). Postharvest biological control of *Rhizopus* rot on nectarine fruit by *Pichia membranefaciens* Hansen. *Plant Disease*, 84, 1212–1216.

Fan, C., Cao, X., Liu, M., Wang, W. (2016). Determination of *Alternaria* mycotoxins in wine and juice using ionic liquid modified countercurrent chromatography as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1436, 133-140.

Fleck, S. C., Burkhardt, B., Pfeiffer, E., Metzler, M. (2012). *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 214(1), 27-32.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M.O., Boege F., Altemöller M., Podlech J., Marko D. (2009). Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 441-451

Felsöciová, S., Rybárik, L., Tancinová, D., Masková, Z., Kacániová, M. (2015). Microfungi and mycotoxins of grapes from tokaj wine region. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 16-18.

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

Fernandez-Espinar, M. T., Marorell, P., De Llanos, R., Querol, A. (2006). Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages.

En: Querol A., Fleet, G. (Eds.), *Yeast in Food and Beverages*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, pp. 55-82.

Fleet, G.H., Heard, G.M. (1993). Yeasts—growth during fermentation. En: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27- 55.

Fleet, G.H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. En: Wood, B.J. (Ed.), *The Microbiology of Fermented Foods*, 2nd edn. Vol. 1. Blackie Academic and Professional, London, pp. 217-262.

Fleet, G. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 101-117.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. En: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, Signpost, Kerala, India, pp. 1- 17.

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *Food Microbiology*, 86, 11-32.

Fox E.M., Howlett B.J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 481-487.

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

Gomez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabanes, F.J., (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology*, 23, 541-545.

Gonzalez, H.H.L., Pacin, A., Resnik, S.L., Martinez, E.J. (1996). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, 135, 129-134.

Greco, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernandez Pinto, V., Pose, G. (2012). Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 187-191.

Guérin, L., Guyot, F., Vincent, B., Lempereur, V. (2007). Schémas épidémiologiques des déviations nommées goût moisi-terreux (G.M.T.) dans différents vignobles. Symposium Bordeaux, juin 2007. <http://www.techniloire.com/documents/124963587/article45.pdf>

Guerzoni, E., Marchetti, R., (1987). Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 571-576.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169, 387-392.

Guinebretiere, M.H., Nguyen-The, C., Morrison, N., Reich, M., Nicot, P. (2000). Isolation and characterisation of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, 63, 386- 394.

Grube, M., Schmid, F., Berg, G., (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, 115, 978-986.

Guzzon, R., Franciosi, E., Larcher, R. (2014). A new resource from traditional wines: characterisation of the microbiota of "Vino Santo" grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *European Food Research and Technology*, 239(1), 117-126.

Hiltunen, M., Söderhäll, K. (1992). Inhibition of polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 1043-1045.

Helbig J. (2002). Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *Biocontrol*, 47, 85-99.

Heydari A, Pessarakli M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Science*, 10, 273-290.

Hocking, A., Leong, S., Kazi, B., Emmett, R., Scott, E. (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *Food Microbiology*, 119, 84-88.

Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., Pryor, B.M. (2005). Alt a1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119-129.

Horwitz, W., Albert, R. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1095-1109.

Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2016). Producción total de uva según origen del viñedo. Elaborado: Departamento de Estadísticas y Estudios de Mercado.

Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2016). Registro de viñedos y superficie año 2015. Elaborado: Departamento de Estadísticas y Estudios de Mercado.

Janisiewicz, W. J. (1987). Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*, 77(3), 481-485.

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I. (2003) The occurrence of non- *Saccharomyces* yeast species over three vintages on four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24, 35-42.

Kakalikova, L., Jankura, E., Srobarova, A. (2009). First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 68-69.

Kapetanakou, A. E., Kollias, J. N., Drosinos, E. H., Skandamis, P. N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 91-99.

Karabulut, O. A., Cohen, L., Wiess, B., Daus, A., Lurie, S., Droby, S. (2002). Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biology and Technology*, 24(2), 103-111.

Karabulut, O.A., Smilanick, J.L., Gabler, F.M., Mansour, M., Droby, S. (2003). Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Disease*, 87, 1384-1389.

Kassemeyer, H.H., Berkelmann-Löhnertz, B. (2009). Fungi of grapes. En: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 61-87.

Kocher U. (2007). Determination of 7 *Alternaria* Toxins in edible oil and oilseeds by LC-MS/MS. En: Gesellschaft für Mycotoxin Forschung (ed.). *Proceeding of the 29th Mycotoxin Workshop*. Stuttgart-Fellbach, Germany. p. 72.

Kocher U. (2006). Multimethode zur Bestimmung von *Alternaria* toxin en mittels LC-MS/MS. En: Gesellschaft für Mykotoxin Forschung (ed.) *Proceedings of the 28th Mycotoxin Workshop*. Bydgoszcz, Poland. p. 92.

Konstantinova, P., Bonants P.J.M., Gent-Pelzar M.P.E., Van der Zouwen, P., Van den Bulk, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* ssp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106, 23-33.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). *The Yeasts: A taxonomic Study*. 3rd edition. Elsevier Science Publications, Amsterdam, The Netherlands.

Kurtzman, C.P., Phaff, H.J. (1987). Molecular taxonomy. En: Rose A.H., Harrison A.J.S (Eds.), *The Yeasts: Biology of Yeasts*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 63-94.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds). (1998). *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4th edn. Elsevier Science, B.V., The Netherlands.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.

Kurtzman, C.P., Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 393-399.

La Guerche, S., Gracia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D., Labarère, J. (2004). Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. *Current Microbiology*, 48, 405-411.

- La Guerche, S., Chamont, S., Blancard, D., Dubourdieu, D., Darriet, P. (2005). Origin of (-)-geosmin on grapes: on the complementary action of two fungi, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 131-139.
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9193-9200.
- La Guerche, S., De Senneville, L., Blancard, D., Darriet, P. (2007). Impact of the *Botrytis cinerea* strain and metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 331-341.
- Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J.J., Monet, C., Dupont, J., Bouix, M., (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Applied Microbiology*, 107, 1208-1218.
- Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A., (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 376-379.
- Lasram, S., Barketi, A., Mliki, A., Ghorbel, A. (2012). Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different pHs and grape maturation stages. *Letters in Applied Microbiology*, 54, 418-524.
- 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(1), 119-131.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M. (2013). The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105, 530-546.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Dugan F.M., Pryor B.M. (2014). Characterization of *Alternaria* isolates from the infectoria species group and a new taxon from *Arrhenatherum*, *Pseudo Alternaria arrhenatheria* sp. nov. *Mycological Progress*, 13, 257-276
- Lawrence, D. P., Rotondo, F., Gannibal, P. B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, 15, 1-22.

Lee, H. B., Patriarca, A., Magan, N. (2015). *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, 43(2), 93-106.

Lehmann, L., Wagner, J., Metzler, M., (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 398-408.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S. (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, 110, S10-S17.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa: Blackwell Profess.

Ley nacional 25.163, Argentina. (1999). Vinos y bebidas espirituosas de origen vnico.

Li, F., Toyazaki, N., Yoshizawa, T. (2001). Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather-damaged wheat. *Journal of Food Protection*, 64, 567-571.

Li, S.S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.Y., Yan, B., Han, B.-Z., Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology* 138, 85-90.

Lillehoj, E., B., Elling, F. (1983). Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 33(2), 113-128.

Liu, G.T., Qian, Y.Z., Zhang, P., Dong, Z.M., Shi, Z.Y., Zhen, Y.Z., Miao, J., Xu, Y.M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. 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, Lyon, France, pp. 258-262.

Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., Guo, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105, 394-400.

Liu, J., Sui, J., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 153-160.

Logrieco, A., Bottalico, A., Visconti, A., Vurro, M. (1988). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in some plant products. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 6, 13-17.

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(4), 501-505.

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., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129-140.

Long, C.A., Zheng, W., Deng, B.X. (2005). Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. *European Food Research and Technology*, 211, 197-201.

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape justs from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 141-144.

López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten, J. M., Mol, H. G., de Nijs, M. (2016). Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control*, 60, 196-204.

Lorenzini, M., Zapparoli, G. (2014). Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 1-5.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 723-730.

Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 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*. CAB International, Wallingford, pp. 1043-1046.

Magan, N., Lacey, J. (1984). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 71-81.

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(13), 4980-4986.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcerro, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.

Mamgain, A., Roychowdhury, R., Tah, J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1, 1-9.

Martinez de Toda, F. (2008). Nuevas Técnicas de estimación y control de la calidad de la uva en el viñedo. Claves de la viticultura de calidad. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., Masneuf-Pomarède, I. (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 93-100.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21-28.

Marko D. (2007). Mechanisms of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins. En: Gesellschaft für Mycotoxin Forschung (ed.). *Proceeding of the 29th Mycotoxin Workshop*, Stuttgart-Fellbach, Germany, p. 48.

Masková, Z., Tancinová, D., Rybárik, L., Felsöciová, S., Kacinová, J. (2013). Colonization of grape berries by representatives of the genus *Alternaria* and their occurrence in the stem. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2, 1754-1764.

Mcguire, R., G., (1994). Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control*, 4(1), 1-7.

Medina, A., Mateo, R., Laura Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F. M., Jimenez, M. (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4696-4702.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A., Mliki, A., (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 245-250.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Mliki, A. (2009). Isolation and characterization of ochratoxin A and aflatoxin B1 producing fungi infecting grapevines cultivated in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 523-527.

Mikušová, P., Santini, A., Ritieni, A., Pavlokin, J., Šrobárová, A. (2012). Berries contamination by microfungi in Slovakia vineyard regions: Impact of climate conditions on microfungi biodiversity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 126-131.

Mikušová, P., Sulyok, M., & Šrobárová, A. (2014). *Alternaria* mycotoxins associated with grape berries *in vitro* and *in situ*. *Biologia*, 69(2), 173-177.

Milholland, R. D. (1973) A leaf spot disease of highbush blueberry caused by *Alternaria tenuissima*. *Phytopathology*, 63, 1395-1397.

Morales-Valle, H., Silva, L.C., Paterson, R.R., Oliviera, J.M., Venacio, A., Lima, N., (2010). Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal « off » volatiles in grape juice. *Journal of Microbiology Methods*, 83, 48-52.

Morales-Valle, H., Silva, L.C., Paterson, R.R., Venacio, A., Lima, N. (2011). Effects of the origins of *Botrytis cinerea* on earthy aromas from grape broth

media further inoculated with *Penicillium expansum*. *Food Microbiology*, 28, 1048-1053.

Mortimer, R., Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), 199-204.

Moss, M., Chełkowski, J. (1991). Influence of agricultural biocides on mycotoxin formation in cereals. En: Chełkowski, J. (Ed.), *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*, Elsevier, Amsterdam. Pp. 281-295.

Mundy, D., C., Casonato, S.G., Manning, M.A. (2009). Incidence of fungi isolated from grape trunks in New Zealand vineyards. The Australasian Plant Pathology Society, New Castle City Hall NSW Australia, p. 86.

Myresiotis, C. K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G. S., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. *Food Chemistry*, 182, 81-88.

Nair, N. G. (1985). Fungi associated with bunch rot of grapes in the Hunter Valley. *Australian Journal of Agriculture and Wine Research*, 36, 435-442.

Nally, M.C., Pesce, V., M., Maturano, Y. P., Munoz, C.J., Combina, M., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64, 40-48.

Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Toro, M. E., Combina, M., Castellanos de Figueroa L. I., Vazquez, F. (2013). Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 456-462.

Ni, X., Yue, L., Chi, Z., Li, J., Wang, X., Madzak, C. (2009). Alkaline protease gene cloning from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the protease surface display on *Yarrowia lipolytica* for bioactive peptide production. *Marine Biotechnology*, 11, 81-89.

Nisiotou, A. A., Nychas, G. J. E. (2007). Yeast populations residing on healthy or Botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765-2768.

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(4), 265-271.

Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C., C., P., Lucci, P. (2012). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1228, 298-323.

Organization Internationale de la Vigne et du Vine (OIV). (2016). Aspectos de la coyuntura mundial.

Ostry, V., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A., Malir, F., Ruprich, J. (2007). Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. *Czech Mycology*, 59, 241-254.

Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, 175-178.

Oviedo, M. S., Ramirez, M. L., Barros, G. G., Chulze, S. N. (2009). Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1186-1192.

Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Barros, G.G., Chulze, S.N. (2010). Impact of water activity and temperature on growth and alternariol and alternariol monomethyl ether production of *Alternaria alternata* isolated from soybean. *Journal of Food Protection*, 73, 336-43

Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Barros, G.G., Chulze, S.N. (2011). Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 127-32.

Oviedo, M.S., Barros, G.G., Chulze S.N., Ramirez, M.L. (2012). Natural occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether on soya bean. *Mycotoxin Research*, 28, 169-174.

Oviedo, M. S., Sturm, M. E., Reynoso, M. M., Chulze, S. N., Ramirez, M. L. (2013). Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and

Alternaria infectoria occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 447-455.

Ozcelik, S., Ozcelik, N., Beuchat, L. R. (1990). Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food microbiology*, 11(3), 187-194.

Padgett, M., Morrison, J. C. (1990). Changes in grape berry exudates during fruit development and their effect on mycelial growth of *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(2), 269-273.

Panigrahi, S. (1997). *Alternaria* toxins. En: D'Mello, J.P.F. (Ed.) Handbook of plant and fungal toxins. *CRC Press*, Boca Raton, USA, pp. 319-337.

Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2005). Impact of relative humidity and temperature on visible growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology*, 22, 383-9.

Paterson, R. R. M., Lima, N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44(9), 2555-2566.

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

Patriarca A., Medina A., Fernández Pinto V., Magan N. (2014). Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal*, 7, 329-34.

Pavón, M. Á., González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*, 21(12), 1745-1756.

Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1772-1781.

Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (1996). En Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (Eds). Plagas y enfermedades de la vid. Madrid: Mundi-Prensa, pp. 26-27.

Peever, T. L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L. W. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1), 119-134.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2006). Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, 162, 233-243.

Pitt, J., Hocking, A. (2009). Fungi and Food Spoilage (3rd ed.). New York: Springer.

Pizzutti, I., Kok, A., Scholten, J., Righi, L., Cardoso, C., Rohers, G., Da Silva, R. C. (2014). Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 352-363.

Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., Musetti, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), 162-171.

Ponsone, M. L., Combina, M., Dalcerro, A., Chulze, S. (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 131-135.

Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Combina, M., Dalcerro, A., Chluze, S. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 70-77.

Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V. (2009). Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 60-63.

Pose G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández, Pinto, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 348-53.

Prakitchaiwattana, C., J., Fleet, G., H., Heard, G., M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 865-877.

Prendes, L.P., Merín, M.G., Andreoni, M.A., Ramirez, M.L., Morata de Ambrosini, V.I. (2015). Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina. *Food Control*, 57, 122-128.

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(1), 161-167.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20, 61-74.

Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium, novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

Pryor, B. M., Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92(4), 406-416.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15 (3), 439-446.

Ramirez, M. L., Chulze, S., Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117-125

Raspor, P., Milek, D., M., Polanc, J., Možina, S., S., Čadež, N., (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1), 97-102.

Rementeria, A., Rodriguez, J., A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J., R., Hernando, F., L., Sevilla, M., J., (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 201-207.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (Eds) (2000) Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeast. Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications. Vol. 1, John Wiley and Sons Ltd, New York, NY, USA, pp. 1-49.

Richard J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.

Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Suzzi, G. (2001). Yeasts from water buffalo mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 45-51.

Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity (Vol. 201). St. Paul: APS Press.

Rotondo, F., Collina M., Brunelli A., Pryor B. (2012). Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AM-toxin producing strains. *Phytopathology*, 102, 1130-1142

Rousseau, S., Donèche, B. (2001). Effects of water activity (aw) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 40(2), 75-78.

Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoi-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M. (2014). Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104-121.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoro, B., Guillamon, J.M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbial Research*, 157, 267-274.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E. E. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1306-1311.

Sage, L., Garon, D., Egle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 5764-5768.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Sanchez de Cos, P., Gonzalez, S., Cardell, E. (1999). Isolation and identification of the yeast biota in the D.O. Valle de La Orotava (1st part). *Viticultural and Enological Sciences*, 5, 21-25.

Sanchis, V., Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing Ltd, Oxford, pp. 174-189.

SANCO. (2013). SANCO/12571/2013 guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 189-199.

Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Vleggaar, R., Marasas, W.F.O. (1991). Reversed phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 566(1), 195-205.

Schisler, D., Janisiewicz, W., Boekhout, T., Kurtzman, C. (2011). Agriculturally important yeasts: biological control of field and postharvest diseases using yeast antagonists, and yeasts as pathogens of plants. En: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeast, a Taxonomic Study*, vol 1. Elsevier: San Diego, CA., pp 45-52.

Schmid, F., Moser, G., Muller, H., Berg, G. (2011). Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Applied Environmental Microbiology*, 77, 2188-2191.

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.

Scott, P.M. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International*, 84, 1809-1817.

Scott, P.M., Kanhere, S.R. (2001). Stability of *Alternaria* toxins in fruit juices and wine. *Mycotoxin Research*, 17(1), 9-14.

Scott, P.M. (2004). Other mycotoxins. En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.). *Micotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 406-409.

Scott, P., Lawrence, B., Lau, B. (2006). Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22, 142-147.

Serdani, M., Kang, J., Andersen, B., Crous, P. (2002). Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106, 561-569.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venancio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 63-68.

Serra, R., Bragab, A., Venâncio, A. (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156, 515-521.

Serra, R., Lourenço, A., Alipio, P., Venancio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110, 971-978.

Sidhu, G.S. (2002). Mycotoxin genetics and gene clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 705-11.

Siegel, D., Rasenko, T., Koch, M., Nehls, I. (2009). Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 1216 (21), 4582-4588.

Siegel, D., Merkel, S., Koch, M., Nehls, I. (2010). Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. *Food Chemistry*, 120(3), 902-906.

Simmons, E.G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59, 67-92.

Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. En: Chelkowski, J., Visconti, A. (Eds.). *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp. 1-35.

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

Simmons, E.G. (1995). *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon*, 55, 55-163.

Simmons, E.G. (2007). *Alternaria: an Identification Manual*. CBS biodiversity series 6. R. Samson (Ed.), Netherlands.

Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716-6724.

Smedsgaard, J. (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolites production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760, 264-270.

Smith, M.T. (1998). *Hanseniaspora* Zikes. En: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 214-220

Solfrizzo, M., Girolamo, A., Vitri, C., Visconti, A., Van Den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *Journal of AOAC international*, 87, 101-106.

Solfrizzo, M., Girolamo, A., D., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczęsna, J., Szopińska, D., Dorna, H. (2005). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 302-308.

Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mule, G., Fernandez Pinto, V., Moretti, A. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 414-419.

Steel, C.C., Greer, L.A., Savocchia, S. (2007). Studies on *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*: two fungi associated with bunch rot of grapes in sub-tropical Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 23-29.

Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5189-5206.

Stinson, E.E., Bills, D.D., Osman, S.F. (1980). Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 960-963.

Stinson, E.E., Osman, S.F., Heisler, E.G. (1981). Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 790-2.

Subden, R.E.; Husnik, J.I.; Van Twest, R.; Van der Merwe, G.; Van Vuuren, H.J.J. (2003). Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula ice wine must. *Food Research International*, 36, 747-751.

Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 304-308.

Swart, A.E., Holz, G. (1994). Colonization of table grapes by *Alternaria alternata* and rot of cold-stored grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 15, 19-25.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101, 11030-11035.

Tančinová, D., Rybárik, L., Masková, Z., Felsöciová, S., Cisarová, M. (2015). Endogenous colonization of grapes berries. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 69-73.

Tančinová, D., Mašková, Z., Rybárik, L., Felšöciová, S., Cíсарová, M. (2016). Colonization of grapes berries by *Alternaria* sp. and their ability to produce mycotoxins. *Potravinárstvo: Scientific Journal for Food Industry*, 10(1), 7-13.

Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z. (2009). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 257-268.

Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. (1998). Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88(9), 960-964.

Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., Pinto, V.F. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22(4), 236-240.

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

Tian, S., Qin, G., Xu, Y. (2004). Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 33(3), 327-331.

Tournas, V., Stack, M. (2001). Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria alternata* grown on fruits at various temperatures. *Journal of Food Protection*, 64, 528-532.

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.

Turner, N., W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S., A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.

Uyovbisere, E., Alabi, O., Akpa, A., D., Chindo, P., S. (2007). Seasonality of the mycoflora on the crown disease complex of the vegetative organs of the grapevine *Vitis vinifera* var Anap-e-Shahe. *African Journal of Biotechnology*, 6, 544-552.

Vaclavik, L., Zachariasova, M., Hrbek, V., Hajslova, J. (2010). Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 82, 1950-1957.

Valero, A., Begum, M., Leong, L., Hocking, A.D., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2007). Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 238-243.

Vaquera, S., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V. (2014). Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 136-139.

Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. (2013). Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(15), 5087-5104.

Vargas Trinidad, A.S., Ganoza, F.Q., Pinto, V.F., Patriarca, A. (2015). Determination of mycotoxin profiles characteristic of *Alternaria* strains isolated from Malbec grapes. En *BIO Web of Conferences*. Vol. 5, p. 02004. EDP Sciences.

Vakalounakis, D.J. (1990). Host range of *Alternaria alternata* f. sp. cucurbitae causing leaf spot of cucumber. *Plant Disease*, 74(3), 227-230.

Viñas I, Bonet J, Sanchis V. (1992). Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples. *Letters on Applied Microbiology*, 14, 284-287.

Visconti, A., Logrieco, A., Bottalico, A. (1986). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives—their production and possible transfer into the oil. *Food Additives and Contaminants*, 3(4), 323-330.

Visconti, A., Sibilio, A., (1994). *Alternaria* toxins. En: Miller, J. D., Trenholm, H., L. (Eds.) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp. 315-336.

Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D. (2014). Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous

determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1372, 91-101.

Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., Zheng, X. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 234-239.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J., W.T., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White T.J. (Eds.), *PCR Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, Academic Press, pp. 315-322

Wilson, C.L., Chalutz, E. (1989). Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 40(2), 105-112.

Woody, M.A., Chu, F.S. (1992). Toxicology of *Alternaria* mycotoxins. En: Chelkowski, J., Visconti, A. (Eds), *Alternaria: Biology, Plant Diseases, and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam

Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.

Yanagida, F., Ichinose, F., Shinohara, T., Goto, S. (1992). Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at Central Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 38, 505-509.

Yekeler, H., Bitmiş, K., Özçelik, N., Doymaz, M.Z., Çalta, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology*, 29(4), 492-497.

Yoder, O.C. (1980). Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 103-129.

Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, J., Ben-Arie, R., Droby, S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 115-124.

Zhang, H., Apaliya, M.T., Mahunu, G.K., Chen, L., Li, W. (2016). Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review. *Trends in Food Science Technology*, 51, 88-97.

Zhou, B., Qiang, S. (2008). Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1151-1156.

VII. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

- Prendes, L. P., Merín, M.G., Andreoni, M.A., Ramirez, M.L., Morata de Ambrosini, V. I. (2015). Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina. *Food Control* 57, 122-128.

PUBLICACIONES EN CONGRESOS, JORNADAS Y ENCUENTROS CIENTÍFICOS:

Congresos:

- Fontana, A.R, Prendes, L., Morata, V., Bottini, R. "QuEChERS acoplado a HPLC-UV para la rápida determinación de la micotoxina ácido tenuazóico en uvas para vinificación". 8° Congreso Argentino de Química Analítica- a realizarse del 3-6 noviembre de 2015. La Plata, Bs Aires.

- Prendes, L.P., Merín, M.G., Ramirez, M.L., Andreoni, M.A., Morata de Ambrosini, V.I. "Micobiota y cepas de *Alternaria alternata* toxicogénicas en uvas Malbec de la DOC San Rafael, Argentina". IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas- CLICAP 15, 16 y 17 de Abril de 2015. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria- Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, Mendoza. Modalidad: exposición de trabajo completo.

- Prendes L.P., Ramirez, M.L., Andreoni, M.A., Morata V.I. "*Alternaria* toxicogénica en uvas Malbec de la DOC San Rafael". VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología- del 3 al 6 de diciembre 2013. Universidad Nacional de Río Cuarto y Sociedad Latinoamericana de Micotoxicología, Río Cuarto, Córdoba. Modalidad: póster.

- Prendes L.P., Morata V.I. "Estudio de la población de Hongos filamentosos ecotípicos en uvas Malbec de la DOC San Rafael". IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos- 14, 15 y 16 de Noviembre 2012.

Universidad Nacional de Córdoba- MINCYT- Córdoba. Modalidad: póster.
Pendrive póster nro 395.

- Prendes, L.P., Andreoni, M., Morata, V.I. "Influencia de diferentes condiciones ecofisiológicas en la población de levaduras y hongos filamentosos en viñedos de uvas Malbec". III Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas- CLICAP 28, 29 y 30 de Marzo de 2012. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria- Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, Mendoza. Modalidad: póster. CD póster Nro 105.

Jornadas y Encuentros:

- Morata, V.I. (director); Martín, M. C (codirector); Integrantes: Merín, M.G.; Prendes, L.P.; Bignert, M.; Margara, D.; Carrión, R.O. "Microorganismos de ecosistemas uva-mosto-vino con potencial biotecnológico biocontrol y enzimas liberadoras de compuestos con actividad biológica" -Área Tecnología- XXIV Jornadas de Investigación y VI Jornadas de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, 10, 11 y 12 de noviembre 2015, Mendoza, modalidad: póster y exposición oral.

- Prendes, L.P., Ramirez, M.L., Morata de Ambrosini, V.I. "Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema". VIII Encuentro de Investigadores y docentes de Ingeniería EnIDI- del 9/9/15 al 11/9/15. Los Reyunos, San Rafael, Mendoza. Modalidad: exposición oral.

- Prendes, L.P., Merín, M.G., Andreoni, M.A., Morata, V.I. "Aislamiento, identificación y selección de levaduras biocontroladoras de *Alternaria alternata* en uvas Malbec de la DOC San Rafael". XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral del 5, 6 y 7 de Agosto de 2015. Centro de convenciones, Santa Fe capital. Modalidad: póster.

- Prendes, L.P., Ramirez, M.L., Andreoni, M.A., Morata, V.I. "Hongos filamentosos en uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial toxicogénico." Terceras Jornadas Bromatológicas, Facultad de Ciencias Aplicadas a la

Industria- UnCuyo- 8 al 10 de Mayo de 2014 en San Rafael, Mendoza.
Modalidad: mesa de comunicación.

- Prendes, L.P., Merín, M.G., Martín, M. C., Carrión, R.O., Cabeza, M.S., Morata, V.I. “Especies microbianas asociadas a uvas para vinificar de la DOC San Rafael y sus potenciales aplicaciones tecnológicas” VII Encuentro de Investigadores y docentes de Ingeniería EnIDI, 12 y 13 de setiembre 2013, Los Reyunos, San Rafael, Mendoza, modalidad: póster.

- Prendes, L.P., Ramirez, M.L., Andreoni, M.A., Morata, V.I. “*Alternaria* como agente toxicogénico a biocontrolar en uvas Malbec de la región DOC San Rafael (Mza)” IV Jornada Sudamericana de Biología y Biotecnología de levaduras, 2 y 3 de setiembre de 2013 en Santiago de Chile, Chile. Modalidad: póster.

- Morata, V.I. (director), Merín, M.G. (codirector); Integrantes: Prendes, L.P., Cabeza, M. S., Margara, D., Martín, M. C. “Estudio ecofisiológico de las interacciones microbianas en uvas, mostos y vinos. Potencial biocontrol de microorganismos de deterioro.” XXIII Jornadas de Investigación y V Jornadas de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, 9,10 y 11 de abril 2013, Mendoza, modalidad: exposición oral director.

- Martín, M.C., Merín, M.G., Prendes, L.P., Morata, V.I. “Líneas de Investigación del Laboratorio de Biotecnología de la FCAI-UNCuyo.” VI Encuentro de Investigadores y docentes de Ingeniería EnIDI, del 10 al 13 de Mayo de 2011, los Reyunos, San Rafael-Mendoza. Modalidad: exposición oral director.