



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**“Caracterización morfológica, metabolómica y patogénica
de *Alternaria* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*)
cultivados en Argentina para su control”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Orgánica.

Ing. María Luisa Maldonado Haro

Directora de Tesis: **Prof. Dra. Andrea Patriarca**

Consejero de estudios: **Prof. Dr. Sergio Bonesi**

Lugar de trabajo: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, Departamento de Química Orgánica.

Fecha de defensa: 14 de mayo de 2024

Buenos Aires, 2024

Caracterización morfológica, metabolómica y patogénica de *Alternaria* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivados en Argentina para su control

RESUMEN

El tomate, un cultivo hortícola de gran importancia en Argentina, es susceptible a la contaminación por especies del género *Alternaria* en precosecha y durante su almacenamiento, lo que puede resultar en la acumulación de micotoxinas en el fruto. Aunque el procesamiento industrial elimina los hongos, las micotoxinas pueden persistir debido a su estabilidad térmica y acumularse en los productos finales, lo que representa un riesgo para la salud de los consumidores.

En este estudio, se caracterizaron los géneros fúngicos causantes de enfermedades en tomates de diferentes regiones de Argentina, obteniéndose 311 aislamientos a partir de 183 tomates con lesiones evidentes. Se identificó a *Alternaria* sp. como el género predominante, junto con otros géneros relevantes como *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Cladosporium* sp.

Se investigó la variabilidad morfológica, molecular y química de 120 aislamientos de *Alternaria* spp., determinando que *A. tenuissima* fue la especie predominante. Se identificaron 21 metabolitos secundarios característicos del género siendo el ácido tenuazónico (TeA) el más frecuente (76% de los extractos fúngicos).

La incidencia de toxinas en productos procesados de tomate comercializados en Argentina se evaluó en 79 muestras, detectando la presencia de al menos una toxina en el 37% de las muestras. TeA y tentoxina (TEN) fueron las predominantes (14% cada una), seguidas de alternariol (AOH, 13%), altenueno (ALT, 4%), alternariol monometil éter (AME, 4%) y altertoxina-I (ATX-I, 3%). TeA presentó las concentraciones más altas (211,4 - 495,7 µg/kg), mientras que ATX-I, rara vez reportada en alimentos, se detectó en dos muestras en concentraciones relativamente altas (146,8 y 233,9 µg/kg).

Se determinó la presencia del gen ALT1, responsable de la biosíntesis de toxinas AAL, en tres aislamientos de *Alternaria* spp., (cepa de referencia EGS 39128 *A. arborescens* y dos aislamientos nativos, TPP117 *A. tomaticola* y TPP173 *A. arborescens*).

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate y sobre la producción de micotoxinas a distintos tiempos de incubación. Los tres aislamientos presentaron un patrón de crecimiento similar, con una temperatura óptima de entre 25-30°C. El aislamiento TPP173 de *A. arborescens* produjo las mayores concentraciones de ATX-II (4712 µg/kg) y TEN (4270 µg/kg) a 25°C, mientras que la cepa de referencia EGS 39128 fue la mayor productora de AAL-TA (2512 µg/kg) a 30°C y TeA (2210 µg/kg) a 35°C. El aislamiento TPP117 destacó en la producción de AOH (1351 µg/kg) a 30°C y TEN (1029 µg/kg) a 35°C.

Finalmente, se analizó el efecto fungicida y fungistático de la radiación UV-C sobre los aislamientos. Se observaron efectos fungicidas a partir de una dosis promedio de 4,92 KJ/m² y fungistáticos desde 0,96 a 63 KJ/m², dependiendo de la variabilidad entre los aislamientos. Además, la radiación UV-C tuvo un impacto positivo en la calidad de los tomates, aumentando significativamente su capacidad antioxidante al aplicar una dosis de 20,1 KJ/m².

Palabras clave: Tomate, *Alternaria*, micotoxinas, caracterización polifásica, control

Morphological, metabolomic, and pathogenic characterization of *Alternaria* on tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) grown in Argentina for its control

ABSTRACT

Tomato, a horticultural crop of great importance in Argentina, is susceptible to contamination by species of the genus *Alternaria* during its growth and storage, which can result in the accumulation of mycotoxins in the fruit. Although industrial processing eliminates fungi, mycotoxins can persist due to their thermal stability and accumulate in the final products, posing a risk to consumer health.

In this study, the fungal genera causing diseases in tomatoes from different regions of Argentina were characterized, obtaining 311 isolates from 183 tomatoes with evident lesions. *Alternaria* sp. was identified as the predominant genus, along with other relevant genera such as *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., and *Cladosporium* sp.

The morphological, molecular, and chemical variability of 120 isolates of *Alternaria* spp. was investigated, determining that *A. tenuissima* was the predominant species. Twenty-one secondary metabolites characteristic of the genus were identified, with tenuazonic acid (TeA) being the most frequent (76% of the fungal extracts).

The incidence of toxins in processed tomato products marketed in Argentina was evaluated in 79 samples, detecting the presence of at least one toxin in 37% of the samples. TeA and tentoxin (TEN) were the predominant ones (14% each), followed by alternariol (AOH, 13%), altenuene (ALT, 4%), alternariol monomethyl ether (AME, 4%), and altertoxin-I (ATX-I, 3%). TeA presented the highest concentrations (211.4 - 495.7 µg/kg), while ATX-I, rarely reported in foods, was detected in two samples at relatively high concentrations (146.8 and 233.9 µg/kg).

The presence of the ALT1 gene, responsible for the biosynthesis of AAL toxins, was determined in three isolates of *Alternaria* spp. (reference strain EGS 39128

A.arborescens, and native isolates TPP117 *A. tomaticola*, and TPP173 *A. arborescens*).

The effect of temperature on the growth of tomato *Alternaria* spp. and mycotoxin production at different times was evaluated. The three isolates presented a similar growth pattern, with an optimum between 25-30°C. The TPP173 isolate of *A. arborescens* produced the highest concentrations of ATX-II (4712 µg/kg) and TEN (4270 µg/kg) at 25°C, while the reference strain EGS 39128 was the highest producer of AAL-TA (2512 µg/kg) at 30°C and TeA (2210 µg/kg) at 35°C. The TPP117 isolate showed high production of AOH (1351 µg/kg) at 30°C and TEN (1029 µg/kg) at 35°C.

Finally, the fungicidal and fungistatic effects of UV-C radiation on the isolates were analyzed. Fungicidal effects were observed from an average dose of 4.92 KJ/m² and fungistatic effects from 0.96 to 63 KJ/m², depending on the variability among the isolates. Furthermore, UV-C radiation had a positive impact on tomato quality, significantly increasing its antioxidant capacity when applying a dose of 20.1 KJ/m².

Keywords: Tomato, *Alternaria*, mycotoxins, polyphasic characterization, control.

“La felicidad está en mil cofres. Y todos tenemos alguna llave”.

José Narosky

*“La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos,
desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las
débiles”.*

Thomas Carlyle

A la memoria de mis abuelos, Arcesio, Esperanza y Donato.

A mis padres, Luisa y Juan.

A mi hermano, José Antonio.

A mi compañero de vida, Federico.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora, Andrea Patriarca, quien ha sabido guiarme durante todo este proceso y me ha transmitido su dedicación y pasión por la micología. Andre, quiero agradecerte por la confianza, por motivarme constantemente y por tu apoyo incondicional, no solo en el ámbito académico, sino también en el personal.

A Virgi, la reina madre de las chicas de micro, quien me abrió las puertas del labo y nos apoya *in aeternum*. Gracias por compartir no solo tu conocimiento, sino también tu calidad humana, algo difícil de encontrar en el mundo científico.

A Dianita, amiga y compañera del labo, gracias por recorrer este camino conmigo desde el principio hasta el final y por ser alguien con quien siempre puedo contar.

A “Las chicas de micro”, Agus, gracias por toda la ayuda y las experiencias compartidas. Luli, gracias por tu predisposición. A pesar de que ya no están en el labo, sabemos que siempre podemos contar con ustedes. Nil, gracias por tu apoyo constante, por hacernos sentir en familia, cuidarnos, por esos ricos mates y por hacernos el trabajo mucho más llevadero. Pauci, gracias por tu ayuda incondicional y ahora, por la transportación. Nico, gracias por la escucha y los buenos consejos. A Maty, gracias por todo lo compartido.

A Leo Iannone, por su generosa ayuda y por guiarme en mis primeros pasos en molecular.

A Vane Tossi, por su apoyo desinteresado y por los análisis de oxidación.

A Sergio Bonesi, por compartirme sus conocimientos en fotoquímica y facilitarme el equipo adaptado de UV-C.

A Gabriela Cabrera, por colaborar con las determinaciones analíticas de las toxinas de los productos de tomate.

A José Luis Mangione, gracias por abrirme las puertas del Laboratorio de Sanidad Vegetal del Mercado Central y por colaborarnos con las muestras de tomate.

A Kristian Fog Nielsen, por colaborar con las determinaciones analíticas de metabolitos secundarios.

A Sarah De Saeger y Marthe De Boevre, por permitirme trabajar en el laboratorio del Centro de Excelencia en Micotoxicología y Salud Pública de la Universidad de Gante, Bélgica.

A los chicos del INMIBO y el L69, siempre dispuestos a colaborar en lo que se necesite. Gracias especialmente por su calidad humana.

A todos los integrantes del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN. En particular, a Catalina Romano y Teresa Marzola, por sus palabras de aliento, su escucha y sus sabios consejos. A la juventud HyS: Caro, Lu, Deby x2, Belu, Juan y José, gracias por su compañía y las risas compartidas.

A todos los no docentes del DQO, especialmente a Beatriz, Nancy y Micaela, gracias a sus tareas esenciales, el departamento sigue funcionando.

A Federico Tella Arduino, cuyos conocimientos de Excel fueron fundamentales para organizar las interminables tablas de datos. Gracias por tu cariño, compañía, motivación y paciencia, sin los cuales no habría podido terminar este trabajo.

A mi amiga y hermana Michelle, por escucharme, estar siempre presente y por ser mi apoyo incondicional. Simplemente, gracias por todo.

A mis amigos de la vida, Xime y Aleja, aunque la distancia nos separa, sé que siempre puedo contar con ustedes. Dany, Nacho, Lucas, Nacho arepas y Milo, gracias por estar.

A mi familia argentina: Guille, Cirito, Vero, Olga, Lau, Walter, Rodri, Cami y Agus. Gracias por su cariño y motivación.

A mi familia, por sus palabras de aliento y por el cariño que permanece intacto a pesar de la distancia.

Finalmente, agradezco a todas las instituciones que hicieron posible este trabajo:

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, por la beca otorgada para iniciar mi doctorado.

Al CONICET, por la beca de finalización de doctorado.

Al CESAM y CEMPH, por la beca que me permitió realizar una estadía en la Universidad de Gante, Bélgica.

Al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Mercado Central de Buenos Aires, por facilitarme las muestras de tomate analizadas en este trabajo.

Al Instituto de Micología y Botánica (INMIBO) del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme el lugar de trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires.

ABREVIATURAS

AAL	toxina AAL. <i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
ACN	acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AhR	hidrocarburos de arilo
ALN	altenuisina
ALP	alterperilenol
ALS	altersetina
ALT	altenueno
AME	alternariol monometil éter
AME-3-G	alternariol monometil éter-3-glucósido
AME-3-S	alternariol monometil éter-3-sulfato
ANOVA	análisis de varianza
AOH	alternariol
AOH-3-G	alternariol-3-glucósido
AOH-3-S	alternariol-3-sulfato
APT	agar pulpa de tomate
APZ	agar papa zanahoria
ASA	<i>Alternaria</i> sección <i>Alternaria</i>
ATL	altenuisol
ATX	altertoxina
aw	actividad de agua
BHT	butilhidroxitolueno
BIC	criterio de información bayesiano
CAA	Código Alimentario Argentino
CDCs	cromosomas dispensables condicionales
CEMPH	Centro de Excelencia en Micotoxicología y Salud Pública
CID	energía de colisión
CYA	agar Czapek extracto de levadura
D	índice de Simpson
DAD	detector de arreglo de diodos
DCMA	agar diclorán cloranfenicol extracto de malta
DG18	agar diclorán 18% glicerol agar
dNTP	desoxinucleósido trifosfato
DRYES	agar diclorán rosa de bengala extracto de levadura sacarosa
DTU	Universidad Técnica de Dinamarca
EE	eficiencia de extracción
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGS	Colección Emory G. Simmons
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular
ESI	ionización por electrospray
ESS	tamaño efectivo de la muestra
EtOH	etanol

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	base de datos estadísticos corporativos de la FAO
gdp	guanosin difosfato
gr.-esp.	grupo especie
H'	índice de Shannon
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSTs	toxinas hospedador-específicas
IB	inferencia bayesiana
iso ALT	isoaltenueno
ITS	espaciador transcrito interno
K2	Kimura 2 parámetros
LC-MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LnL	logaritmo de verosimilitud
LOD	límite de detección
LOQ	límite de cuantificación
MDA	malondialdehído
MEA	agar extracto de malta
MeOH	metanol
MgCl ₂	cloruro de magnesio
MgSO ₄	sulfato de magnesio
ML	máxima verosimilitud
MP	máxima parsimonia
n	tamaño de muestra
N	nitrógeno
n.a.	no aplicable
Na ₂ PO ₄	fosfato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NaNO ₂	nitrito de sodio
NCBI	Centro Nacional para la información Biotecnológica
NEA	región Noreste
nHST	toxinas no hospedador específicas
NOA	región Noroeste
O ₃	ozono
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	agar papa dextrosa
pH	potencial de hidrógeno
PKS	policétido sintasa
PTFE	polímero de politetrafluoroetileno
QTOF	espectrómetro de masas de cuadrupolo y tiempo de vuelo
QuEChERS	Rápido, Sencillo, Económico, Efectivo, Robusto y Seguro
R ²	coeficiente de determinación

RE	receptores de estrógeno
rpb2	subunidad 2 de la ARN Polimerasa II
SO ₂	dióxido de azufre
SSE	supresión/realce de señal
STTX	stemphylltoxina
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBE	tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TeA	ácido tenuazónico
TEN	tentoxina
TP	tomate perita
TPC	tomate perita originario de la región Cuyo
TPNO	tomate perita originario de la región Noroeste
TPP	tomate perita originario de la región Pampeana
TR	tomate redondo
TRC	tomate redondo originario de la región Cuyo
TRNE	tomate redondo originario de la región Noreste
TRNO	tomate redondo originario de la región Noroeste
TRP	tomate redondo originario de la región Pampeana
TTC	umbral de preocupación toxicológica
UE	Unión Europea
UHPLC	cromatografía líquida de ultra alta resolución
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
UV/Vis	espectroscopía de absorción ultravioleta-visible
UV-C	radiación ultravioleta C
v/v	volumen/volumen
V8®	agar V8®
XEVO-TQ-S	espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	heptamolibdato de amonio

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. Introducción general	1
I.1 Tomate	2
I.1.1 Tomate en Argentina.....	3
I.1.2 Productos procesados de tomate	5
I.2 Deterioro fúngico de tomates	6
I.2.1 <i>Alternaria</i> como agente de deterioro de tomates	7
I.3 Género <i>Alternaria</i>	9
I.3.1 Taxonomía.....	9
I.3.2 Metabolitos secundarios	10
I.3.3 Toxicidad	13
I.4 Toxinas de <i>Alternaria</i> en tomate	14
I.5 Legislación de toxinas de <i>Alternaria</i>	16
I.6 Métodos de control de <i>Alternaria</i> en alimentos	17
I.7 Objetivos	19
I.7.1 Objetivo general.....	19
I.7.2 Objetivos específicos	20
I.8 Bibliografía.....	21
CAPÍTULO II. Caracterización de los agentes causales de deterioro fúngico de tomates cultivados en Argentina.....	29
II.1 Introducción.....	30
II.1.1 Tomate: Susceptibilidad a la contaminación fúngica	30
II.1.2 Enfermedades fúngicas en tomates.....	30
II.1.2.1 Riesgo de la presencia de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas	31
II.2 Materiales y Métodos	32
II.2.1 Muestras.....	32
II.2.2 Aislamiento fúngico	35
II.2.2.1 Identificación morfológica	35
II.2.3 Análisis de diversidad.....	37
II.2.4 Análisis estadístico.....	37
II.3 Resultados	38
II.4 Discusión.....	46

II.5 Conclusiones	49
II.6 Bibliografía.....	50
CAPÍTULO III. Identificación polifásica de aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomates.....	55
III.1 Introducción.....	56
III.2 Materiales y métodos	57
III.2.1 Muestras.....	57
III.2.2 Identificación morfológica.....	58
III.2.3 Identificación molecular	59
III.2.3.1 Extracción de ADN	59
III.2.3.2 Amplificación de la región génica ASA-05 (<i>Alternaria</i> Sección <i>Alternaria</i>)	60
III.2.3.2.a Procesamiento de datos.....	60
III.2.4 Caracterización química	61
III.2.4.1 Producción y extracción de metabolitos secundarios	61
III.2.4.2 Análisis de metabolitos secundarios por UHPLC-DAD-HRMS	61
III.2.4.2.a Procesamiento de datos.....	62
III.3 Resultados	62
III.3.1 Identificación morfológica.....	62
III.3.1.1 Descripción morfológica de especies de <i>Alternaria</i> spp.	64
III.3.1.1.a <i>Alternaria alternata</i>	64
III.3.1.1.b <i>Alternaria arborescens</i>	66
III.3.1.1.c <i>Alternaria tenuissima</i>	68
III.3.1.1.d <i>Alternaria tomaticola</i>	70
III.3.2 Identificación molecular	72
III.3.2.1 Amplificación de la región génica ASA-05	72
III.3.2.2 Secuenciación y filogenia.....	73
III.3.3 Caracterización metabolómica	76
III.4 Discusión.....	81
III.5 Conclusiones	85
III.6 Bibliografía.....	86
CAPÍTULO IV. Presencia de toxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate del mercado argentino	90
IV.1 Introducción	91
IV.2 Materiales y métodos.....	92
IV.2.1 Muestras	92
IV.2.2 Reactivos	93
IV.2.3 Preparación de soluciones madre y patrones de calibración	93

IV.2.4 Extracción de micotoxinas	94
IV.2.5 Parámetros instrumentales	94
IV.2.6 Análisis estadístico	95
IV.3 Resultados	95
IV.3.1 Desempeño del método de análisis por HPLC-MS.....	95
IV.3.2 Contaminación natural de seis micotoxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate.	96
IV.4 Discusión	101
IV.5 Conclusiones	105
IV.6 Bibliografía	107
CAPÍTULO V. Detección molecular del gen biosintético de la toxina AAL en aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomate	111
V.1 Introducción	112
V.2 Materiales y Métodos	114
V.2.1 Muestras	114
V.2.2 Extracción de ADN.....	114
V.2.3 Detección del gen ALT1.....	115
V.2.3.1 Amplificación de la región génica ALT1	115
V.2.3.2 Procesamiento de datos	115
V.3 Resultados	116
V.3.1 Detección del gen ALT1.....	116
V.3.1.1 Amplificación del gen ALT1.....	116
V.3.1.2 Secuenciación del gen ALT1	117
V.4 Discusión	119
V.5 Conclusiones	122
V.6 Bibliografía	123
CAPÍTULO VI. Ecofisiología de <i>Alternaria</i> spp. de frutos de tomate.....	126
VI.1 Introducción	127
VI.2 Materiales y Métodos.....	129
VI.2.1 Aislamientos	129
VI.2.2 Inoculación e incubación.....	129
VI.2.3 Medición del crecimiento	130
VI.2.4 Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas de <i>Alternaria</i>	130
VI.2.4.1 Reactivos y químicos	130
VI.2.4.2 Extracción de toxinas de <i>Alternaria</i>	131

VI.2.4.3 Cuantificación de toxinas por UPLC-MS/MS	132
VI.2.5 Análisis estadístico	134
VI.3 Resultados	134
VI.3.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomate.	134
VI.3.2 Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas nHSTs y HSTs por aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomate.	140
VI.4 Discusión	154
VI.5 Conclusiones	157
VI.6 Bibliografía	159
CAPÍTULO VII. Evaluación de los efectos de la radiación UV-C en aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. y frutos de tomate.....	162
VII.1 Introducción	163
VII.2 Materiales y métodos.....	164
VII.2.1 Preparación de la suspensión de esporas	164
VII.2.2 Inoculación	165
VII.2.2.1 Efecto fungicida.....	165
VII.2.2.2 Efecto fungistático.....	165
VII.2.3 Irradiación.....	165
VII.2.3.1 Efecto fungicida.....	166
VII.2.3.2 Efecto fungistático.....	167
VII.2.3.3 Efecto de la radiación UV-C sobre componentes del tomate.	168
VII.2.3.3.a Evaluación de estrés oxidativo.....	169
VII.2.4 Análisis estadístico	170
VII.3 Resultados	170
VII.3.1 Efecto fungicida	170
VII.3.2 Efecto fungistático.....	172
VII.3.3 Evaluación de estrés oxidativo	180
VII.3.3.1 Peroxidación lipídica.....	180
VII.3.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante total	180
VII.3.3.3 Determinación del contenido de flavonoides.....	181
VII.4 Discusión	182
VII.5 Conclusiones.....	186
VII.6 Bibliografía	188
CAPÍTULO VIII. Conclusiones	191
VIII.1 Conclusiones generales	192

VIII.1.1 Conclusiones específicas.....	193
VIII.2 Perspectivas futuras	195
Anexos	196

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Tipos comerciales de tomate más utilizados en Argentina (Gerencia de Calidad y Tecnología et al., 2015).i. Tomate redondo. ii.Tomate perita. iii. Tomate Cherry.	4
Figura I.2. Lesión causada por <i>Alternaria</i> (moho negro) en tomate.....	8
Figura II.1. Desarrollo y síntomas de enfermedades causadas por <i>Alternaria</i> . Adaptado de Agrios (2005).....	31
Figura II.2. Lesiones fúngicas evidentes en A: Tomate Perita (TP) y B: Tomate Redondo (TR).....	33
Figura II.3. Distribución geográfica y origen de las muestras de tomates por región de Argentina. Las provincias sombreadas en tono más intenso indican el origen de las muestras recolectadas en cada región. Los porcentajes corresponden a la proporción de muestras provenientes de cada región con relación al total. Los íconos representan los cultivares de tomate muestreados en cada provincia.	34
Figura II.4. Ilustración del método aplicado para el aislamiento e identificación de los géneros fúngicos causantes de lesiones en tomates cultivados en Argentina.....	36
Figura II.5. Número de aislamientos de los distintos géneros fúngicos aislados de tomates cultivados en Argentina discriminados por región y cultivar.....	38
Figura II.6. Características morfológicas de <i>Alternaria</i> sp. aislada de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) APZ; B) DRYES; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.	39
Figura II.7. Características morfológicas de <i>Geotrichum</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.	39
Figura II.8. Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.....	40
Figura II.9. Características morfológicas de <i>Mucor</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.....	40
Figura II.10. Características morfológicas de <i>Cladosporium</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) DRYES; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 100x; E) 400x; F) 1000x.....	41
Figura II.11. Características morfológicas de <i>Penicillium</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) CYA. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.	41

Figura II.12. Características morfológicas de <i>Rhizopus</i> sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.....	42
Figura II.13. Abundancia y frecuencia (%) de géneros fúngicos aislados de tomates afectados por deterioro fúngico cultivados en Argentina.	43
Figura II.14. Abundancia (%) de géneros fúngicos aislados de cultivares de tomate (Perita y Redondo), provenientes de cuatro regiones productoras de Argentina (Noreste, Pampeana, Noroeste y Cuyo).	44
Figura II.15. Frecuencia (%) de géneros fúngicos aislados de cultivares de tomate (Perita y Redondo), provenientes de cuatro regiones productoras de Argentina (Noreste, Pampeana, Noroeste y Cuyo).	45
Figura II.16. a) Índice de Shannon (H') e b) índice de Simpson (1-D) de los aislamientos clasificados por cultivar y origen. Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada parámetro (p<0,05)....	46
Figura III.1. Esquema del procedimiento de obtención de cultivos monospóricos de <i>Alternaria</i> spp. para la identificación morfológica a nivel de especie.....	59
Figura III.2. Número de aislamientos (n=120) de cada especie de <i>Alternaria</i> identificada en cultivares de tomate perita y redondo provenientes de diferentes regiones de Argentina.	64
Figura III.3. Características macro y microscópicas distintivas de <i>A. alternata</i> en diferentes medios de cultivo. A-E. Colonias típicas en: A. Agar V8®; B. APZ; C. DRYES; D. MEA; E. DG18. F-G. Patrón de esporulación en APZ observado a: F. 25x; G. 100x. H-I. Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: H. 400x; I. 1000x.....	65
Figura III.4. Características macro y microscópicas distintivas de <i>A. arborescens</i> en diferentes medios de cultivo. A-E. Colonias típicas en: A. Agar V8®; B. APZ; C. DRYES; D. MEA; E. DG18. F-G. Patrón de esporulación en APZ observado a: F. 15x; G. 100x. H-I. Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: H. 400x; I. 1000x.....	67
Figura III.5. Características macro y microscópicas distintivas de <i>A. tenuissima</i> en diferentes medios de cultivo. A-E. Colonias típicas en: A. Agar V8®; B. APZ; C. DRYES; D. MEA; E. DG18. F-G. Patrón de esporulación en APZ observado a: F. 25x; G. 100x. H-I. Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: H. 400x; I. 1000x.....	69
Figura III.6. Características macro y microscópicas distintivas de <i>A. tomaticola</i> en diferentes medios de cultivo. A-E. Colonias típicas en: A. Agar V8®; B. APZ; C. DRYES; D. MEA; E. DG18. F-G. Patrón de esporulación en APZ observado a: F. 20x; G. 50x. H-I. Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: H. 100x; I. 400x.....	71

Figura III.7. Productos de PCR de 4 cepas patrón de *Alternaria* spp. visualizados en gel de agarosa al 1% TBE. Marcador de peso molecular de 1kb. Amplificación de aproximadamente 600 pb de la región génica ASA-05..... 72

Figura III.8. Productos de PCR de 50 aislamientos de *Alternaria* spp. visualizados en gel de agarosa al 1% TBE. Bandas del marcador de peso molecular de 1kb. Amplificación de ~600 pb de la región génica ASA-05 (flecha azul). Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: i) Tomate Perita: TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste; ii) Tomate Redondo: TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo. 73

Figura III.9. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ASA-05 de aislamientos de *Alternaria* spp., cepas patrón (violeta) y secuencias de referencia publicadas (verde). Se señalan los dos clados principales (I en azul y II en rojo) con soportes de bootstrap y probabilidades posteriores en los nodos (valores superiores ML, medios IB e inferiores MP). Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: Perita - TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste. Redondo - TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo. 75

Figura III.10. Mapa de calor y dendrograma semicuantitativo de producción de metabolitos secundarios de aislamientos de *Alternaria* spp. Se señalan el clado I: verde y dos subclados; II.1: naranja y II.2: rojo. Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: Perita - TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste. Redondo - TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo. Mayor intensidad del color mayor área del pico cromatográfico. 80

Figura IV.1. Fotografías de los productos de tomate analizados. **A:** Conjunto de los diferentes productos de tomate adquiridos para el análisis. Se observan distintos tipos de envases, incluyendo latas, botellas de vidrio y Tetra Pak®. **B:** Detalle de los tipos específicos de productos que fueron analizados: puré, tomates enteros pelados, tomates triturados, extractos, salsa y pulpa de tomate. 93

Figura IV.2. Concentración (µg/kg) de cada toxina de *Alternaria* detectada en productos de tomate argentinos. **ALT:** altenueno, **AOH:** alternariol; **AME:** alternariol monometil éter; **ATX-I:** altertoxina-I; **TEN:** tentoxina; **TeA:** ácido tenuazónico. 98

Figura V.1. Estructuras de fumonisinas y toxinas AAL TA (Go & Tang, 2020) 113

Figura V.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (TBE) de productos de PCR amplificados con cebadores para la región génica ALT1 en aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate. Calles **A:** *A. tomaticola* (TPP117), **B:** *A. tenuissima* (EGS 34015), **C:** *A. alternata* (EGS 34016) **D:** *A. infectoria* (EGS 27198 ex type). **E:** *A. arborescens* (TPP173) **F:** *A. arborescens* (EGS 39128). **G:** Blanco, **H:** Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen™). La flecha azul indica la banda de ~1200 pares de bases correspondiente al gen ALT1. 116

Figura V.3. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del gen ALT1 obtenidas en este estudio (EGS 39128, TPP117 y TPP173) con secuencias de referencia. Se incluye la secuencia parcial de ADN correspondiente al gen ALT1 de

biosíntesis de las toxinas AAL en *A. alternata* (AB969680.1 - AB465676.1) y gen FUM1 de *Fusarium bulbicola* (KF415128.1). 118

Figura V.4. Ubicación e identidad de secuencias ALT1 en el clúster de genes responsables la biosíntesis de la toxina AAL en *A. alternata* (AB969680.1). Sombreado violeta indica las posiciones de las secuencias de los aislamientos TPP117, TPP173 y la cepa patrón EGS 39128. 119

Figura VI.1. Curvas de crecimiento de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT) incubados a distintas temperaturas (12, 25, 30, 35°C). **A.** Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), **B.** *A. tomaticola* (TPP117), **C.** *A. arborescens* (TPP173). Las barras indican el desvío estándar de 3 réplicas. 135

Figura VI.2. Registro fotográfico de crecimiento radial de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT), incubadas a 12°C. Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). d: día de registro. 136

Figura VI.3. Velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT). Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). Las líneas indican el desvío estándar. Las barras con distintas letras para cada aislamiento muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). 137

Figura VI.4. Fase de latencia (λ) de aislamientos de *Alternaria* spp. en Agar Pulpa de Tomate (APT). Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). Las líneas barras indican el desvío estándar. Las barras con distintas letras para cada aislamiento presentan diferencias significativas de Tukey ($p < 0,05$). 138

Figura VI.5. A. Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y **B.** Fase de latencia (λ) de aislamientos de *Alternaria* spp. en Agar Pulpa de Tomate (APT) en función de la temperatura. Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). 139

Figura VI.6. Concentración promedio de toxinas ($\mu\text{g/kg}$) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 145

Figura VI.7. Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de i. Altenueno (ALT), ii. Alternariol (AOH), iii. Alternariol monometil éter (AME) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 147

Figura VI.8. Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de **iv.** Ácido tenuazónico (TeA), **v.** Tentoxina (TEN), **vi.** Alvertoxina I (ATX-I) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey..... 150

Figura VI.9. Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de **vii.** Alvertoxina II (ATX-II), **viii.** Toxina AAL-TA (AAL-TA), **ix.** Toxina AAL-TB (AAL-TB) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey..... 153

Figura VII.1. Equipo de irradiación UV-C adaptado 166

Figura VII.2. Tomates desinfectados secándose en una cámara de flujo laminar antes de ser sometidos a tratamientos de irradiación UV-C. 168

Figura VII.3. Efecto fungicida de la radiación UV-C sobre aislamientos de *Alternaria* spp. en función el tiempo de exposición (minutos) y de la dosis (KJ/m^2). Las imágenes muestran el desarrollo de colonias en placas de Agar Papa Zanahoria (APZ) de una réplica después de 4 días de incubación a 25°C, tras ser sometidas a diferentes tratamientos de irradiación UV-C. Cada fila representa un aislamiento específico *A. arborescens* (EGS 39128 y TPP173) y *A. tomaticola* (TPP117). 171

Figura VII.4. Cinética de inactivación UV-C de conidios de *Alternaria* spp. en Agar Papa Zanahoria (APZ), donde N es el número de conidios supervivientes de *Alternaria* spp. después del tratamiento UV-C y N_0 es el número inicial de conidios. *A. arborescens* (EGS 39128 y TPP173) y *A. tomaticola* (TPP117). 172

Figura VII.5. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) de la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 173

Figura VII.6. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) del aislamiento de *A. tomaticola* (TPP117) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 174

Figura VII.7. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) del aislamiento de *A. arborescens* (TPP173) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de

la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 174

Figura VII.8. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) en función del tiempo de incubación. 175

Figura VII.9. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento de *A. tomaticola* (TPP117) en función del tiempo de incubación. 176

Figura VII.10. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento de *A. arborescens* (TPP173) en función del tiempo de incubación 176

Figura VII.11. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C (KJ/m^2) sobre la duración de la fase de latencia (λ) en el crecimiento de *Alternaria* spp. **A:** *A. arborescens* (EGS 39128), **B:** *A. tomaticola* (TPP117) y **C:** *A. arborescens* (TPP173). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 178

Figura VII.12. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C (KJ/m^2) sobre la duración de la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de *Alternaria* spp. **A:** *A. arborescens* (EGS 39128), **B:** *A. tomaticola* (TPP117) y **C:** *A. arborescens* (TPP173). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 179

Figura VII.13. Peroxidación lipídica (MDA eq. (nmol/ml) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m^2) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 180

Figura VII.14. Capacidad antioxidante (eq. μmol ácido ascórbico/kg) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m^2) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 181

Figura VII.15. Contenido de flavonoides (mg de equivalentes de quercetina/kg) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m^2) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey. 182

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1. Número de tomates muestreados de acuerdo con su origen y tipo de cultivar.....	33
Tabla III.1. Número de aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. obtenidos a partir de tomates de diferentes cultivares y origen en Argentina seleccionados para su caracterización.	58
Tabla III.2. Metabolitos secundarios producidos por aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomates cultivados en Argentina.....	77
Tabla III.3. Número de metabolitos detectados en los extractos fúngicos de los aislamientos de <i>Alternaria</i> spp.	77
Tabla IV.1. Parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de toxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate. Recuperación (TR, SSE y EE) $\pm$ desviación estándar (%), LOD y LOQ ($\mu\text{g/kg}$) de cada micotoxina en productos de tomate.	96
Tabla IV.2. Incidencia individual y simultánea de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate argentinos.	97
Tabla IV.3. Presencia natural de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate adquiridas en el mercado argentino.....	99
Tabla IV.4. Análisis de varianza (ANOVA) de la ocurrencia natural de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en productos de tomate.	100
Tabla IV.5. Productos de tomate que superan los niveles de concentración de toxinas recomendada por la EFSA (AOH = 10 $\mu\text{g/kg}$; AME = 5 $\mu\text{g/kg}$).	104
Tabla VI.1. Diseño experimental basado en combinaciones de aislamiento, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo de incubación (días) para la producción de toxinas por aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. de tomate.	130
Tabla VI.2. Parámetros instrumentales de MS/MS optimizados para cada micotoxina. AOH: alternariol, AME: alternariol monometil éter, ALT: altenueno, TeA: ácido tenuazonico, TEN: tentoxina, ATX-I: altertoxina-I, ATX-II: altertoxina-II, AAL-TA: toxina AAL TA, AAL-TB: toxina AAL TB. AOH-3-S: alternariol-3-sulfato, AME-3-S: alternariol monometil éter-3-sulfato, AOH-3-G: alternariol-3-glucósido, AME-3-G: alternariol monometil éter-3-glucósido.	133
Tabla VI.3. Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para cada metabolito de <i>Alternaria</i> en $\mu\text{g/kg}$. AOH: alternariol, AME: alternariol monometil éter, ALT: altenueno, TeA: ácido tenuazonico, TEN: tentoxina, ATX-I: altertoxina-I, ATX-II: altertoxina-II, AAL-TA: toxina AAL TA, AAL-TB: toxina AAL TB. AOH-3-S: alternariol-3-sulfato, AME-3-S: alternariol monometil éter-3-sulfato, AOH-3-G: alternariol-3-glucósido, AME-3-G: alternariol monometil éter-3-glucósido.....	134

Tabla VI.4. Concentración de toxinas producidas por la cepa patrón de <i>A. arborescens</i> (EGS 39128) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.....	141
Tabla VI.5. Concentración de toxinas producidas por el aislamiento de <i>A. tomaticola</i> (TPP117) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.....	142
Tabla VI.6. Concentración de toxinas producidas por el aislamiento de <i>A. arborescens</i> (TPP173) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.....	143

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Medios de cultivo	197
Anexo II. Número de identificaciones morfológicas por tipo de cultivar y región de origen de tomates de Argentina.....	198
Anexo III. Identificaciones morfológicas de <i>Alternaria</i> spp. aisladas de tomates cultivados en Argentina.....	198
Anexo IV. Submuestra de <i>Alternaria</i> spp. identificadas molecular y químicamente de aislamientos de tomates cultivados en Argentina.	201
Anexo V. Secuencias de referencia de GenBank para especies de <i>Alternaria</i> spp.	202
Anexo VI. Productos procesados de tomate y análisis de seis toxinas de <i>Alternaria</i>	203
Anexo VII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las velocidades de crecimiento (cm/día) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	205
Anexo VIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre la fase de latencia (días) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	205
Anexo IX. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones totales ($\mu\text{g/kg}$) de toxinas de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	206
Anexo X. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ALT ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	207
Anexo XI. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AOH ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	207
Anexo XII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AME ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	208
Anexo XIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de TeA ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	209
Anexo XIV. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de TEN ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	210
Anexo XV. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ATX-I ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	210
Anexo XVI. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ATX-II ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	211

Anexo XVII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AAL-TA ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	212
Anexo XVIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AAL-TB ($\mu\text{g/kg}$) de <i>Alternaria</i> spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$	213
Anexo XIX. Efecto fungicida de la radiación UV-C sobre aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. Tabla de número promedio de colonias por dosis (KJ/m^2) y tiempo de exposición (minutos) para cada aislamiento, luego de 4 días de incubación a 25°C	214
Anexo XX. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre la cepa patrón de <i>A. arborescens</i> (EGS 39128). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m^2) y el tiempo de incubación (días).	215
Anexo XXI. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre el aislamiento de <i>A. tomaticola</i> (TPP117). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m^2) y el tiempo de incubación (días).....	216
Anexo XXII. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre el aislamiento de <i>A. arborescens</i> (TPP173). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m^2) y el tiempo de incubación (días).....	217



CAPÍTULO I. Introducción general



I.1 Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea anual perteneciente a la familia *Solanaceae*, originaria de América Central y del Sur (Chime et al., 2017; Gerszberg et al., 2015; Knapp & Peralta, 2016). Esta especie es una de las hortalizas más consumidas en el mundo, tanto en fresco como procesada, en forma de salsas, conservas, jugos y ketchup, entre otros (Chime et al., 2017; Noris et al., 2024; Renna et al., 2019).

El tomate tiene dos variedades ampliamente distribuidas: la cultivada *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* y la maleza *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Chime et al., 2017; W. Liu et al., 2022). La forma ancestral del tomate cultivado se limitó originalmente a la zona Perú-Ecuador, y después de extenderse hacia el norte, posiblemente como maleza, en tiempos precolombinos, no se domesticó extensamente hasta que llegó a México, desde donde se diseminaron las formas cultivadas (Jenkins, 1948).

Este cultivo es reconocido por su alto valor nutricional, siendo una fuente importante de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos como licopeno, β -caroteno, flavonoides, vitamina C y derivados del ácido hidroxicinámico (Gerszberg et al., 2015; Perveen et al., 2015). El licopeno, el principal carotenoide presente en el tomate, ha sido asociado con propiedades antioxidantes y anticancerígenas, así como con la prevención de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Dawid, 2016; Perveen et al., 2015).

Diversos estudios han destacado el potencial del tomate y sus compuestos bioactivos en la prevención y manejo de trastornos metabólicos, como la obesidad, la hiperglucemia, la hipercolesterolemia y la diabetes tipo 2 (Banihani, 2018; Perveen et al., 2015). Además, se ha demostrado que el consumo de tomate y sus productos derivados puede contribuir a la reducción del estrés oxidativo, la inflamación y el daño tisular asociados a estas condiciones (Banihani, 2018).

A nivel mundial, el tomate es el segundo cultivo hortícola más importante después de la papa. En el 2022, se produjeron 186 millones de toneladas de tomate a nivel global, generando un valor de 130 mil millones de dólares. Mientras que, en el 2021, el

consumo diario per-carpita de tomates frescos se estima en 51,31 g (FAOSTAT, 2024).

Además de su importancia económica como cultivo fresco, el procesamiento del tomate genera cantidades considerables de residuos que son fuentes valiosas de compuestos bioactivos. Estos subproductos, como el orujo, las semillas y la piel, pueden ser reutilizados en diferentes productos alimenticios, alimentos para animales y aplicaciones no alimentarias, contribuyendo a la sostenibilidad de la industria y al aprovechamiento de sus propiedades beneficiosas para la salud (Kiralán & Ketenoglu, 2022).

I.1.1 Tomate en Argentina

Argentina es un importante productor de tomate, con condiciones agroecológicas propicias para el desarrollo de este cultivo en gran parte del país, a excepción de las provincias de la Patagonia, excluyendo Río Negro, debido a los períodos cortos libres de heladas que impiden su normal desarrollo (Secretaría de Agricultura, 2023a). En el 2022, la producción de tomate en Argentina alcanzó alrededor de 1 millón de toneladas, cultivadas en una superficie de 19 mil hectáreas destinadas a tomates frescos. Además, del consumo interno, que en el 2021 fue de 58,81 g por persona por día, se exportaron alrededor de 14 mil toneladas de tomates frescos (FAOSTAT, 2024).

La producción de tomate en Argentina se concentra principalmente en las provincias de Mendoza y San Juan (región cuyana), Salta y Jujuy (región NOA), Corrientes y Formosa (región NEA), Río Negro y Buenos Aires. En los últimos años, la producción total de tomate se ha destinado un 60-70% al mercado de consumo en fresco y un 30-40% a la industria. La cosecha de tomate para la industria se concentra entre diciembre y mayo, mientras que el tomate en fresco se produce y recolecta durante todo el año (Secretaría de Agricultura & Ministerio de Economía, 2023). En la temporada 2021-2022, la producción de tomates con destino industrial alcanzó una cosecha récord de alrededor de 600 mil toneladas, distribuidas en 7645 hectáreas cultivadas, con un rendimiento a nivel país de 81,9 toneladas por hectárea. A pesar de este aumento en la producción, Argentina es deficitaria en la producción de tomate para la industria, por lo que importa de Chile e Italia, y también exporta pequeñas

cantidades de tomate industrializado, principalmente a Paraguay, Uruguay y otros países vecinos (Secretaría de Agricultura, 2023a).

En Argentina, se cultiva una amplia variedad de tipos comerciales de tomate, entre los que destacan los cultivares Redondos, que incluyen los de larga vida, los Perita y los Cereza o Cherry (**Figura I.1**). Estos cultivares pueden presentar un hábito de crecimiento indeterminado o determinado, siendo los híbridos los más utilizados en la producción nacional (Secretaría de Agricultura, 2023a). De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA), los tomates se clasifican según su morfología en dos categorías principales: "Peritas" y "Redondos". Los frutos que se asemejan a las características de cultivares como Roma, Redtop, San Marzano, Rossel, UC 82 y Cal J, entre otros, se consideran "Peritas", mientras que aquellos que responden a las características de cultivares como Platense, Manzanita, Marglobe y Sioux, entre otros, se clasifican como "Redondos" (CAA, 2024).

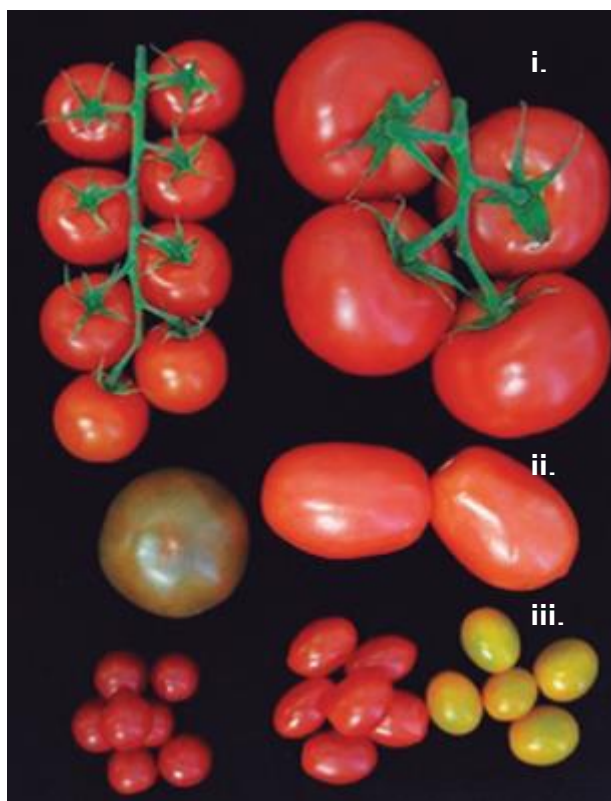


Figura I.1. Tipos comerciales de tomate más utilizados en Argentina (Gerencia de Calidad y Tecnología et al., 2015).i. Tomate redondo. ii.Tomate perita. iii. Tomate Cherry.

Según el informe técnico realizado por la Gerencia de Calidad y Tecnología de la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires (2015), la oferta de tomates frescos que se comercializó en el 2014 en el Mercado Central de Buenos Aires fue de 100 toneladas, y en la participación promedio de cada tipo comercial en la oferta en el periodo 2006-2014 fue de 62,1% para el Redondo, 33,6% para el tipo Perita y 4,2% para el Cherry.

I.1.2 Productos procesados de tomate

El tomate es una de las frutas más versátiles y utilizadas a nivel mundial, siendo consumida tanto en estado fresco como en una amplia gama de productos procesados (Borguini & Ferraz Da Silva Torres, 2009). Según Kozlova et al. (2020) se espera que la demanda de alimentos, incluyendo los productos procesados de tomate, aumente en las próximas décadas debido al crecimiento demográfico y la prosperidad.

En Argentina, los productos obtenidos de la transformación industrial del tomate se distinguen principalmente en tomates en conserva o pelados (enteros, cubeteados o en trozos) y pasta de tomate (extractos, puré y salsas) (Secretaría de Agricultura, 2023a). La pasta de tomate lidera el mercado y es la base para la producción de otros derivados, siendo tratada como un producto casi sin valor agregado (Secretaría de Agricultura & Ministerio de Economía, 2023). En los Artículos 942 al 948 del Capítulo XI del CAA se definen diversos productos procesados de tomate, como los tomates pelados, los concentrados de tomate, la pulpa de tomate y el tomate triturado, cada uno con sus características específicas de elaboración y envasado (CAA, 2024).

A nivel mundial, el consumo diario per cápita de pasta de tomate y tomates pelados es de 1,41 g y 0,86 g, respectivamente (FAOSTAT, 2024). En los Estados Unidos, la producción de pasta de tomate alcanzó varios millones de toneladas con un valor económico de varios miles de millones de dólares (Q. Xu et al., 2018). En Argentina, el consumo de pasta de tomate es de 0,64 g por persona por día y de tomates pelados de 3,23 g por persona por día, y se exporta pasta de tomate (4 mil toneladas) y tomates pelados (37 toneladas) (FAOSTAT, 2024). Sin embargo, el mercado argentino no logra autoabastecerse de tomate para industria, siendo la capacidad instalada y demanda muy superior a lo cultivado año tras año (Secretaría de Agricultura, 2023).

Tanto los tomates como sus derivados son ricos en compuestos antioxidantes como carotenoides (especialmente licopeno), ácido ascórbico y compuestos fenólicos, y su consumo regular se ha correlacionado con una reducción del riesgo de contraer diversos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Borguini & Ferraz Da Silva Torres, 2009). Además, la demanda de los consumidores de productos procesados de alta calidad con características de frescura ha aumentado notablemente en los últimos años, con preferencias hacia alimentos frescos, saludables, ricos en sabor, listos para comer y con una mayor vida útil (Wasim & Singh, 2015).

A pesar de los beneficios para la salud, el tomate es un producto agrícola muy problemático en términos de corta vida postcosecha debido a su alta perecebilidad. Para superar este problema, un tercio de la producción mundial total de tomates se procesa en productos menos perecederos, utilizando técnicas de procesamiento térmico como la pasteurización, la esterilización y el procesamiento aséptico (Jayathunge et al., 2019).

I.2 Deterioro fúngico de tomates

La producción de tomate se ve afectada por diversas enfermedades, principalmente las causadas por hongos fitopatógenos, que constituyen uno de los principales factores limitantes en la producción de tomate a nivel global (Singh & Sharma, 2018). El clima cambiante puede contribuir al desarrollo de enfermedades en diversos cultivos, afectando la interacción de la planta huésped y los patógenos, como hongos, bacterias, virus, nematodos, viroides, fitoplasmas y espiroplasmas, lo que abre las puertas para la aparición de nuevas enfermedades y patógenos en todo el mundo (Priyadi & Upadhyay, 2021).

Los hongos, organismos unicelulares o multicelulares que se reproducen mediante esporas, cumplen roles diversos como simbiontes, endófitos, parásitos o saprófitos (Bonfante et al., 2019) y son responsables de la mayoría de las enfermedades de las plantas vegetales (Mulvihill, 2023). Para superar las barreras presentes en el huésped, los hongos han desarrollado diversas estrategias, como la formación de estructuras de infección especializadas y la secreción de enzimas, toxinas y efectores que degradan la pared celular (Chethana et al., 2021). La contaminación con una variedad de hongos filamentosos puede causar el deterioro de los alimentos y productos

agrícolas, reduciendo la calidad y la vida útil de las frutas frescas y siendo una de las principales causas de pérdida económica en la industria mundial de frutas frescas (de Oliveira Filho et al., 2021).

Una amplia variedad de enfermedades fúngicas afecta a los tomates, algunas de ellas consideradas amenazas importantes para la producción, como la mancha negra causada por *Alternaria* spp., el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Colmán et al., 2018; Heli et al., 2022), la podredumbre por *Sclerotinia*, el marchitamiento por *Fusarium* y la pudrición de raíz y corona ocasionados por especies de los géneros *Fusarium* y *Phytophthora* (Dong et al., 2021; Mazumdar et al., 2021). Otros géneros fúngicos como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria* también pueden contaminar los tomates (Heli et al., 2022). Incluso en la etapa poscosecha, el tomate cherry es muy susceptible al deterioro por acción de hongos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Alternaria alternata* y *Rhizopus stolonifer* (W. Liu et al., 2021).

El cambio climático y el intercambio intensivo de material vegetal propician la aparición de nuevas enfermedades fúngicas en el cultivo, y patógenos como *A. solani*, *A. alternata* y *Colletotrichum coccodes* pueden infectar hojas, tallos y frutos (Kokaeva et al., 2020). De hecho, el tomate es particularmente vulnerable a hongos necrotróficos del género *Alternaria*, agentes causales del devastador tizón temprano que compromete severamente los rendimientos (Habib et al., 2021).

Se han realizado investigaciones para identificar y desarrollar variedades de tomate más resistentes para enfrentar diferentes condiciones de estrés y plagas, especialmente hongos. Sin embargo, la contaminación fúngica genera preocupación porque, si hay contaminación con especies micotoxigénicas, sus toxinas termorresistentes pueden permanecer incluso luego del procesamiento térmico (Heli et al., 2022).

1.2.1 *Alternaria* como agente de deterioro de tomates

El género *Alternaria* es uno de los más abundantes y ampliamente distribuidos en el mundo, siendo un contaminante frecuente de diversos cultivos, incluyendo el tomate (*Solanum lycopersicum*) (da Cruz Cabral et al., 2016; Mohammadi & Bahramikia, 2019; Patriarca, 2016; Pavicich et al., 2022). Las especies de *Alternaria* son responsables de la acumulación de micotoxinas y metabolitos secundarios bioactivos

en los alimentos, lo que puede causar importantes pérdidas económicas y representar un riesgo para la salud humana y animal (Patriarca et al., 2019; Twarużek et al., 2021).

Numerosos estudios han detectado una amplia variedad de especies de *Alternaria* en frutos de tomate con síntomas de deterioro. Gou et al. (2023) identificaron siete especies, incluyendo cuatro nuevas, en muestras de tomate y papa en China, destacando la importancia de los métodos de identificación precisos para la taxonomía de *Alternaria* de esporas pequeñas. Bessadat et al. (2021) encontraron que *Alternaria* se recuperó del 80% de las plantas enfermas de tomate en Argelia, siendo *A. alternata* y *A. tenuissima* las especies más comunes (Saleem & El-Shahir, 2022). Somma et al. (2011) analizaron 65 cepas de *Alternaria* aisladas de frutos de tomate afectados por moho negro (**Figura I.2**) y de puré de tomate en Argentina, identificando tres grupos principales correspondientes a *A. alternata* y *A. tenuissima* (67,7%), *A. arborescens* (23,1%) y un grupo desconocido (9,2%).



Figura I.2. Lesión causada por *Alternaria* (moho negro) en tomate.

La detección y caracterización de las especies de *Alternaria* en frutos de tomate es crucial para evaluar el riesgo toxicológico asociado a este patógeno y desarrollar

estrategias efectivas de control (Pavicich et al., 2022; Ramezani et al., 2019). La combinación de técnicas morfológicas y moleculares, junto con la evaluación del perfil toxigénico de las cepas, permite una identificación precisa y una mejor comprensión de la diversidad y el riesgo potencial para la salud asociado a las especies de *Alternaria* que contaminan los frutos de tomate (Patriarca et al., 2019; Somma et al., 2019)

I.3 Género *Alternaria*

I.3.1 Taxonomía

El género *Alternaria* pertenece a la familia *Pleosporaceae* (Orden *Pleosporales*, Clase *Dothideomycetes*, Phylum *Ascomycota*, Reino Fungi) (Index fungorum, 2023; Lawrence et al., 2016), y fue descrito inicialmente por Nees en 1816 con *A. tenuis* como única especie. Desde entonces, ha sido objeto de numerosas revisiones taxonómicas a lo largo de los años. Los primeros estudios se enfocaron principalmente en las características morfológicas de los conidios, como su septación, tamaño, forma de la célula apical y color (Ellis, 1976; Saccardo, 1886; Simmons, 1997). En su manual de identificación del género *Alternaria*, Simmons (2007) reconoció 276 especies, agrupándolas en dos secciones según la morfología de los conidios, patrones de esporulación, hospedantes, sustrato y tamaño. La Sección I incluyó especies con conidios medianos o grandes (60-100 μm), diferenciadas por la forma de la célula apical o pico, mientras que la Sección II agrupó especies con conidios pequeños (<60 μm) y patrones de esporulación simples o en cadenas ramificadas de más de 2 ó 3 conidios.

Posteriormente, gracias a la integración de estudios morfológicos y filogenéticos moleculares, el género *Alternaria* se dividió en 24 secciones, de las cuales 16 fueron redescritas y seis consideradas linajes monotípicos (Grum-Grzhimaylo et al., 2016; Woudenberg et al., 2013). Esta nueva clasificación resultó en la inclusión de varias especies con conidios pequeños, previamente descritas por Simmons, como *A. gaisen*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. longipes*, en la Sección *Alternaria*, conformando un complejo de 60 especies con *A. alternata* como especie tipo. Por otro lado, *A. infectoria*, también perteneciente al grupo de conidios pequeños, quedó establecida como especie tipo de la sección *Infectoriae*.

I.3.2 Metabolitos secundarios

Las especies del género *Alternaria* son reconocidas por su capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios derivados de diversas clases de compuestos químicos, incluyendo policétidos, compuestos que contienen nitrógeno, quinonas, terpenos y otros (Patriarca et al., 2019; Zhao et al., 2021). Se han identificado más de 70 metabolitos secundarios producidos por especies de *Alternaria*, algunos de los cuales han sido caracterizados químicamente y se ha reportado su actividad tóxica para humanos o animales, clasificándolos como micotoxinas (EFSA, 2016; Patriarca, 2019). La producción de estos compuestos por parte de *Alternaria* no solo tiene implicaciones en la salud humana y animal debido a su potencial toxicológico, sino que también puede causar pérdidas económicas al ser una herramienta de colonización para infectar plantas en el campo o deteriorar frutos en postcosecha (Patriarca et al., 2019).

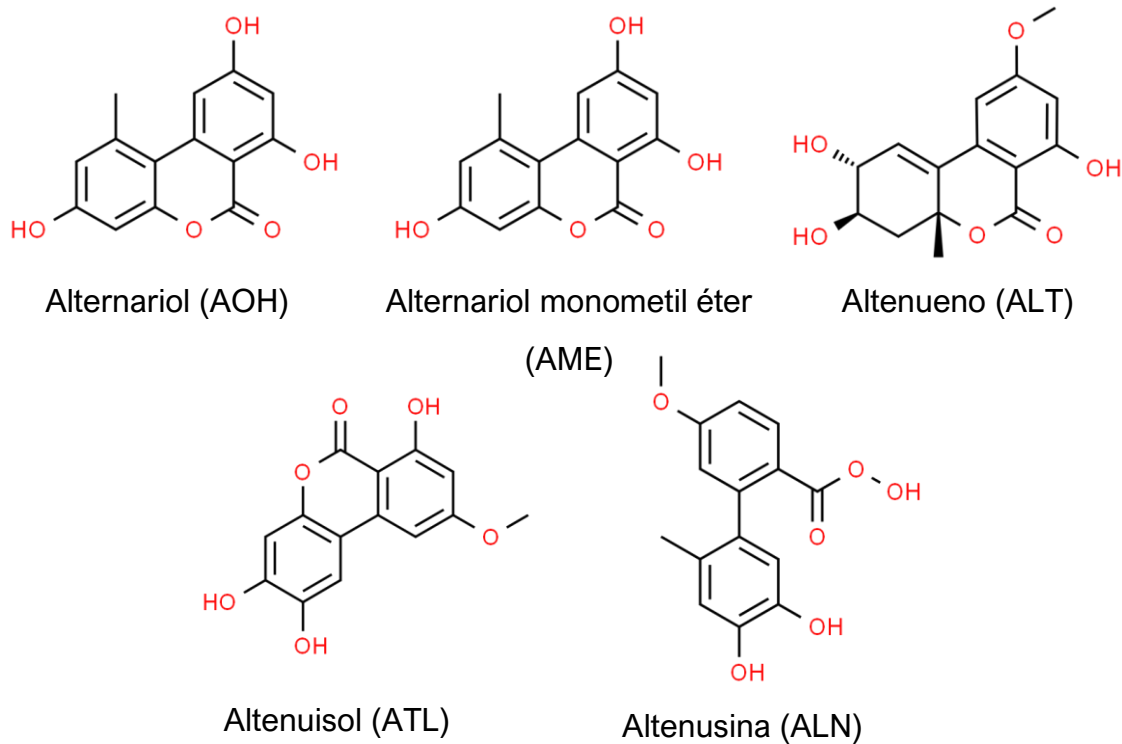
Los metabolitos secundarios de *Alternaria* componen una gran familia de compuestos con estructura química diversa y son producidos por diferentes vías metabólicas. Algunos de ellos sirven como factores de colonización (Graf et al., 2012), mientras que otros son toxinas específicas del huésped (HST) cuyos genes biosintéticos se agrupan en cromosomas condicionalmente dispensables y están asociados con la patogenicidad en un sustrato particular.

Aquellos metabolitos cuyas estructuras químicas han sido elucidadas, se pueden clasificar en cinco grupos principales de acuerdo con sus características estructurales (**Figura I.3**) (Pinto & Patriarca, 2017; Zwickel, Kahl, et al., 2016):

- i. Derivados de dibenzo- α -pirona (**Figura I.3.i**): alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), isoaltenueno (iso-ALT), altenuisol (ATL), altenusina (ALN).
- ii. Derivados del ácido tetrámico (**Figura I.3.ii**): ácido tenuazónico (TeA) y ácido isopropil tetrámico, altersetina (ALS)
- iii. Derivados del perileno (**Figura I.3.iii**): altertoxinas I, II, III (ATX-I, -II, -III), alterperilenol (ALP), stemphyltoxinas I, II, III (STTX-I, -II, -III).
- iv. Análogos de la esfingosina (amino pentol ésteres) (**Figura I.3.iv**): toxinas AAL (AAL-TA1, -TA2, -TB1, -TB2, -TC1, -TC2, -TD1, -TD2, -TE1, -TE2)

- v. Estructuras misceláneas (**Figura I.3.v**): tentoxina (TEN), un tetrapéptido cíclico, Ácido alténico-III, un derivado ácido resorcílico sustituido con butanólido y un segundo ácido carboxílico en la cadena lateral.

i. Derivados de dibenzo- α -pirona



ii. Derivados del ácido tetrámico

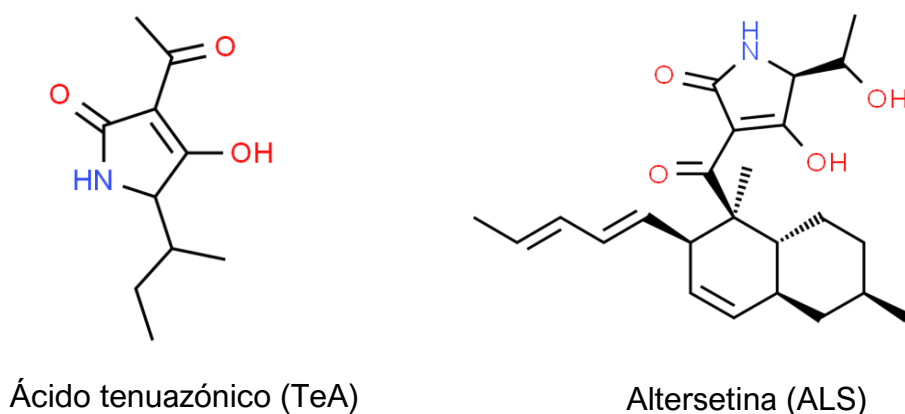
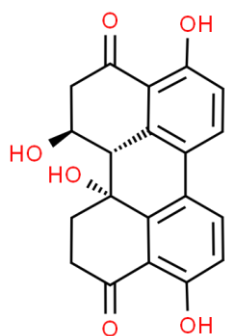
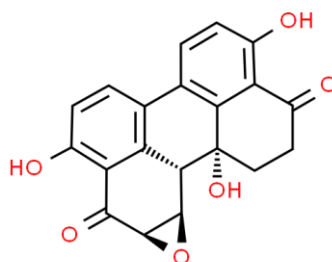


Figura I.3. Estructura química de las principales toxinas de *Alternaria* spp. (Adaptado de ChemSpider)

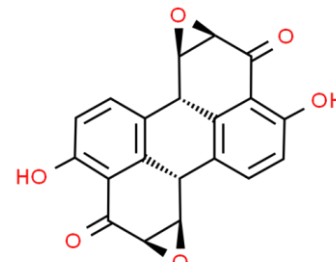
iii. Derivados del perileno



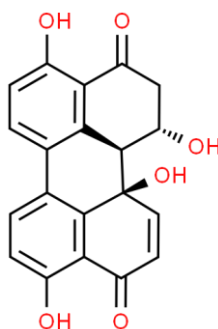
Altertoxina I (ATX-I)



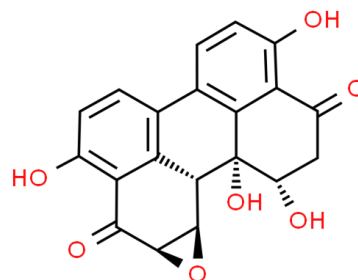
Altertoxina II (ATX-II)



Altertoxina III (ATX-III)

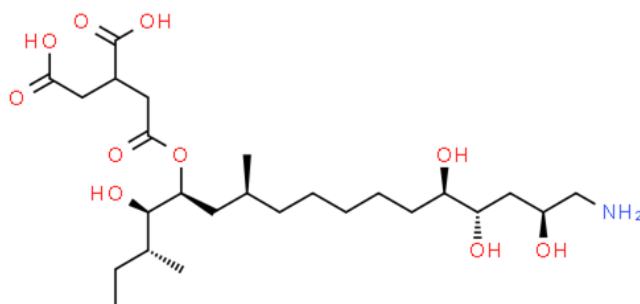


Alterperinelol

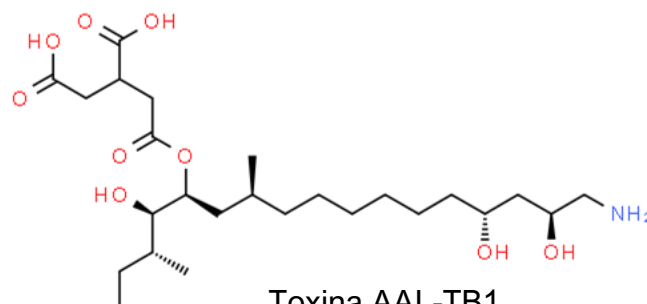


Stemphytoxina I (STTX-I)

iv. Análogos de la esfingosina

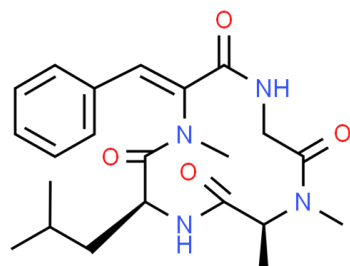


Toxina AAL-TA1

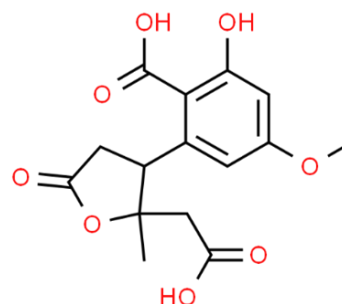


Toxina AAL-TB1

v. Estructuras misceláneas



Tentoxina (TEN)



Ácido alténico III

Figura I.3 (cont.). Estructura química de las principales toxinas de *Alternaria* spp.
(Adaptado de ChemSpider)

I.3.3 Toxicidad

Dentro de la amplia gama de metabolitos secundarios producidos por *Alternaria*, algunos han sido identificados como micotoxinas debido a su actividad tóxica en humanos y animales. Entre estas toxinas, el ácido tenuazónico (TeA) y el alternariol (AOH), junto con su metil éter (AME) han sido los más estudiados hasta el momento (EFSA, 2016). TeA ejerce efectos tóxicos leves en células de mamíferos, atribuidos principalmente a su potencial inhibitorio sobre la actividad ribosómica (Shigeura & Gordon, 1963; Vejdovsky et al., 2017). Aunque estudios *in vivo* en pollos y roedores han establecido valores de LD₅₀ para TeA (Giaambrone et al., 1978; EFSA, 2011), la EFSA concluyó que es poco probable que esta toxina suponga una amenaza para la salud humana, considerando la exposición estimada (EFSA, 2016).

Por otro lado, AOH y AME han generado mayor preocupación debido a que las exposiciones alimentarias crónicas estimadas superan el umbral toxicológico (EFSA, 2016). Estos derivados de la dibenzo- α -pirona poseen propiedades citotóxicas y genotóxicas en concentraciones micromolares (Bensassi et al., 2012; Fehr et al., 2009). Los efectos genotóxicos de AOH y AME se atribuyen principalmente a su capacidad para inhibir y envenenar las topoisomerasas (TOP), enzimas esenciales para mantener la integridad del ADN (Fehr et al., 2009). Además, la inducción de estrés oxidativo podría contribuir a sus propiedades dañinas para el ADN (Aichinger et al., 2017; Tiessen et al., 2013).

Otras toxinas de *Alternaria*, como las perilenquinonas, han cobrado relevancia en los últimos años. La altertoxina II (ATX-II) ha demostrado ser un potente inductor de daño en el ADN, superando la genotoxicidad de AOH (Fleck et al., 2012; Schwarz et al., 2012). Este efecto se atribuye a su fracción epoxi funcional, que puede reaccionar directamente con biomacromoléculas como el ADN, formando aductos persistentes (Soukup et al., 2020). Además, se ha descrito que las toxinas de *Alternaria*, como AOH y AME, pueden actuar como agonistas del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), desencadenando la expresión de enzimas metabólicas y potencialmente contribuyendo a la activación de ciertos tóxicos (Pahlke et al., 2016; Schreck et al., 2012).

Además, se han notificado nuevos aspectos de la bioactividad de las toxinas de *Alternaria*, como sus propiedades de alteración endocrina. AOH es capaz de unirse y activar los receptores de estrógeno (RE), especialmente el ER- β , lo que indica una posible influencia en las vías endocrinas (Lehmann et al., 2006). Además, se ha descrito que AOH y ATX-II pueden suprimir las respuestas proinflamatorias en células epiteliales humanas, células de carcinoma de colon y macrófagos, lo que podría provocar una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades (Grover & Lawrence, 2017; Kollarova et al., 2018; Schmutz et al., 2019).

Es importante destacar que las toxinas de *Alternaria* no se encuentran en los alimentos como compuestos aislados, sino en mezclas complejas. Varios estudios han abordado los efectos combinatorios de estas toxinas, encontrando efectos aditivos o incluso sinérgicos en la citotoxicidad y genotoxicidad (Aichinger et al., 2019; Bensassi et al., 2012; Vejdovszky et al., 2017). Además, la co-ocurrencia de metabolitos secundarios de plantas, como polifenoles, puede influir en los efectos adversos de las toxinas de *Alternaria*, ya sea reduciendo el estrés oxidativo y la genotoxicidad (Aichinger et al., 2017; Chiesi et al., 2015) o potenciando la actividad estrogénica (Vejdovszky et al., 2017).

I.4 Toxinas de *Alternaria* en tomate

Los frutos de tomate y sus derivados son alimentos ampliamente consumidos en todo el mundo. Sin embargo, la contaminación por micotoxinas, especialmente las producidas por especies de *Alternaria*, representa una amenaza para la seguridad alimentaria y la salud de los consumidores (Bacha et al., 2023a).

Estudios realizados en los últimos cuatro años han investigado la presencia de toxinas de *Alternaria* en frutos de tomate infectados y productos derivados del tomate. Qu et al. (2021) demostraron que las toxinas TeA, AOH, AME y TEN se produjeron en tomates inoculados con *Alternaria* spp. después de 5, 10 y 15 días de almacenamiento a 25°C, mientras que ALT se detectó solo el día 15. En este estudio, no se produjeron toxinas en los tomates almacenados a 4°C.

En cuanto a los productos derivados del tomate, la contaminación natural con toxinas de *Alternaria* ha sido determinada en diversos países y el riesgo asociado a su ingesta

fue evaluado teniendo en cuentas datos de consumo regional. Sedova et al. (2024) encontraron que las toxinas de *Alternaria* predominantes en pasta de tomate, ketchup y jugo de tomate en Rusia fueron TeA (61% de 64 muestras, en cantidades de 20,0 a 1065,5 µg/kg), ALT (52%, 8,9-200,1 µg/kg) y AOH (27%, 12,2-561,6 µg/kg). Además, se demostró que se podían ingerir altos niveles de AOH (hasta 56,77 ng/kg de peso corporal por día) mediante el consumo diario de jugo de tomate por adultos y niños menores de tres años.

Un estudio exhaustivo realizado en China (Ji et al., 2023a) reveló que el 58,8% de las muestras de tomates y productos derivados contenían una o más micotoxinas. Nuevamente TeA fue la micotoxina predominante, detectada en el 56,7% de las muestras con un nivel de ocurrencia de hasta 7,9 µg/kg. Además, aproximadamente el 39,2% de las muestras positivas presentaron la co-ocurrencia de más de una micotoxina, siendo AME + AOH + TeA la combinación más frecuente. La evaluación determinista del riesgo realizada por Ji et al. (2023) mostró que la exposición alimentaria promedio y del percentil 95 a estas micotoxinas, especialmente a AME y AOH, podría ser más alta en niños que en adultos en un factor de aproximadamente 2. Estos resultados indican que la presencia de micotoxinas de *Alternaria* en productos derivados del tomate podría representar un problema de salud, particularmente para los niños y las poblaciones que consumen grandes cantidades de estos productos.

En un estudio realizado por Nizamlioglu (2022) en Turquía, se analizaron muestras de pasta y jugo de tomate recolectadas de 15 empresas procesadoras durante los meses de agosto a octubre de 2020. En las muestras de pasta de tomate, no se detectó la presencia de AME, mientras que los niveles de ergosterol, AOH y TeA variaron entre 2,04 y 25,58 ppm, 0,0696 y 0,5821 ppm, y 0,608 y 10,56 ppm, respectivamente. Por otro lado, en las muestras de jugo de tomate, se encontraron niveles de ergosterol, AME, AOH y TeA que oscilaron entre 1,82 y 8,56 ppm, 0,972 y 12,86 ppm, 1,669 y 7,694 ppm, y 0,428 y 1,691 ppm, respectivamente.

TeA resulta una de las principales toxinas halladas en productos de tomate, en cuanto a su frecuencia y los niveles detectados. En un estudio en Corea del sur, TeA se encontró en productos como puré de tomate (media = 211,07 µg/kg, máxima = 882,22 µg/kg), y ketchup (media = 73,26 µg/kg, máxima = 91,10 µg/kg) (Woo et al., 2022). Por

otro lado, Bertuzzi et al. (2021) determinaron que la incidencia de TeA en pasta concentrada de tomate obtenida en el mercado italiano alcanzó el 78,5%, con un valor máximo de 5955 µg/kg.

Si bien los datos disponibles en la actualidad sugieren la prevalencia de ciertas toxinas de *Alternaria* sobre otras, es de destacar la existencia de variaciones estacionales, y a largo plazo debido a los cambios en la tecnología implementada en prácticas agrícolas y en el almacenamiento postcosecha. Otro factor esencial sobre la acumulación de micotoxinas es el efecto del cambio climático, que puede favorecer la producción de ciertas toxinas sobre otras debido a sus efectos específicos incluso sobre un mismo microorganismo, cuyas vías metabólicas están reguladas por factores ambientales de forma diferencial. Las condiciones ambientales son un factor significativo en la incidencia de micotoxinas en los alimentos, y determinan tanto la colonización fúngica como la biosíntesis de metabolitos secundarios, afectando además la interacción planta-hongo. Por lo tanto, es crucial entender cómo el cambio climático afecta la ecología de los hongos en los sistemas agrícolas para anticipar y mitigar los riesgos asociados con la contaminación por micotoxinas en los cultivos.

Adicionalmente, la falta de estándares analíticos comerciales para varios de los metabolitos secundarios de *Alternaria* dificulta su detección. Es por ello que la mayoría de los trabajos se centran en las micotoxinas más comunes y disponibles para el análisis en sus formas comerciales, como TeA, AOH y AME, pero la incidencia de otras familias de compuestos del género *Alternaria* en alimentos, y en particular, en productos de tomate, aún resulta desconocido.

I.5 Legislación de toxinas de *Alternaria*

A pesar de la creciente evidencia sobre la presencia de toxinas de *Alternaria* en diversos alimentos y su potencial impacto en la salud humana, la regulación de estas micotoxinas por parte de las autoridades a nivel mundial es aún limitada. Hasta el momento, no existen límites máximos permitidos establecidos de manera oficial para las toxinas de *Alternaria* en alimentos, por lo que se las considera "micotoxinas emergentes" (Aichinger et al., 2021c). Esta falta de regulación se debe principalmente a la escasez de datos toxicológicos en humanos, lo que dificulta la determinación de niveles seguros de ingesta.

Sin embargo, algunas autoridades han comenzado a abordar esta problemática. En 2016, la Autoridad de Salud y Seguridad Alimentaria de Baviera estableció un límite máximo de 500 µg/kg para el ácido tenuazónico (TeA) en alimentos infantiles a base de sorgo/mijo (Rychlik et al., 2016). Por su parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha fijado valores de umbral de preocupación toxicológica (TTC) para el alternariol (AOH), el alternariol monometil éter (AME) y el TeA en 2,5 ng/kg, 2,5 ng/kg y 1500 ng/kg de peso corporal por día, respectivamente, como herramienta para la evaluación del riesgo (EFSA, 2012; Kroes et al., 2004).

Recientemente, en abril de 2022, la Comisión Europea estableció niveles orientativos en la Recomendación (UE) 2022/553 para el seguimiento de la presencia de AOH (10 µg/kg), AME (5 µg/kg) y TeA (500 µg/kg) en productos de tomate procesados. Además, estableció límites para otro tipo de alimentos como, pimentón en polvo, semillas de sésamo, semillas de girasol, aceite de girasol, frutos secos, higos secos y alimentos a base de cereales para lactantes y niños pequeños.

A pesar de estos avances, la falta de regulaciones oficiales a nivel mundial sigue siendo un motivo de preocupación, especialmente considerando la frecuencia de contaminación en diversos grupos de alimentos, particularmente en aquellos destinados a niños. La EFSA ha reunido grupos de expertos para analizar la información disponible y establecer criterios para fijar límites máximos permitidos de toxinas de *Alternaria* en los alimentos más afectados (EFSA, 2011, 2016). Estos informes han concluido que los datos de toxicidad y exposición dietaria son aún insuficientes para establecer límites definitivos, pero han identificado los productos a base de tomate, granos, frutas y vegetales como los principales contribuyentes a la exposición dietaria a estas micotoxinas en los países europeos.

I.6 Métodos de control de *Alternaria* en alimentos

La contaminación de alimentos por hongos del género *Alternaria* representa un desafío significativo para la industria alimentaria, ya que estos microorganismos no solo causan pérdidas económicas al deteriorar los productos, sino que también pueden producir micotoxinas perjudiciales para la salud humana. Sin embargo, hasta el momento, el principal recurso para prevenir la contaminación fúngica en productos agrícolas se basa en el uso de fungicidas, una práctica que resulta una amenaza para

el ambiente, por la generación de residuos tóxicos en los alimentos y la contaminación ambiental. En este contexto, se han investigado diversos métodos de control para prevenir y mitigar la presencia de *Alternaria* en alimentos, incluyendo el uso de extractos vegetales, agentes de biocontrol, tratamientos físicos y químicos.

Algunos extractos de plantas han demostrado ser una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos para el control de *Alternaria*. Por ejemplo, Rizwana et al. (2021) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de frutos de *Annona muricata* L. contra *A. alternata* en tomates, encontrando que los extractos de semillas inhibieron el crecimiento micelial y redujeron significativamente el diámetro de las lesiones en los frutos. Por su parte, Sharma et al. (2021) demostraron la eficacia del extracto de ajo al 10% en la reducción de la intensidad de la enfermedad y el aumento del rendimiento de tomate en condiciones de campo.

El control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas también ha sido explorado como una estrategia ecológica para combatir *Alternaria*. Bosqueiro et al. (2023) identificaron la cepa de levadura *Torulaspora* como un agente de biocontrol efectivo contra *A. arborescens* en tomates en postcosecha, sugiriendo que la producción de compuestos volátiles y la competencia por nutrientes son mecanismos putativos de inhibición. Asimismo, Al-Maawali et al. (2021) encontraron que la levadura *Meyerozyma guilliermondii* y las bacterias *Enterobacter roggenkampii* y *Pseudomonas aeruginosa* redujeron significativamente el tamaño de las lesiones de pudrición causadas por *A. alternata* en frutos de tomate.

Los tratamientos físicos, como la radiación ultravioleta-C (UV-C), han mostrado resultados prometedores en la degradación de micotoxinas de *Alternaria* y la inhibición del crecimiento fúngico. Han et al. (2023) demostraron que la irradiación UV-C a 3500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante 90 min degradó eficazmente el alternariol (AOH) y el alternariol monometil éter (AME) en muestras de metanol, solución acuosa y estado sólido. Además, Leng et al. (2022) encontraron que la combinación de la levadura antagonista *Wickerhamomyces anomalus* con el tratamiento UV-C mejoró el control de la pudrición postcosecha causada por *A. tenuissima* en tubérculos de papa, activando la respuesta relacionada con la defensa en los tubérculos.

En cuanto a los tratamientos químicos, Qiao et al. (2020) compararon la capacidad inhibitoria del dióxido de azufre (SO₂) y el ozono (O₃) sobre el crecimiento de *A. alternata*, encontrando que el tratamiento prolongado con baja concentración de SO₂ (20 µl/l, 5 días) combinado con almacenamiento a temperatura ambiente inhibió eficazmente el crecimiento del hongo. Silva et al. (2020) evaluaron la eficacia del ozono y el dióxido de cloro en el control de *Alternaria* en frutos de mango, observando que el tratamiento con dióxido de cloro mostró una eficiencia significativa en el control de la penetración de los hongos en el interior de los frutos.

Existe una amplia gama de métodos de control para hacer frente a la contaminación por *Alternaria* en alimentos, incluyendo extractos vegetales, agentes de biocontrol, tratamientos físicos y químicos. La elección del método más adecuado dependerá del tipo de alimento, las condiciones de almacenamiento y los recursos disponibles. La integración de diferentes estrategias en un enfoque de manejo integrado puede ofrecer una solución efectiva y sostenible para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos, reduciendo las pérdidas económicas y protegiendo la salud de los consumidores.

I.7 Objetivos

I.7.1 Objetivo general

El objetivo general de esta investigación es contribuir al conocimiento científico y al desarrollo de estrategias de control eficaces para *Alternaria* en tomates y productos derivados, a fin de reducir las pérdidas económicas causadas por el deterioro de los frutos y reducir el riesgo para la salud relacionado con la contaminación con micotoxinas en productos de tomate.

El objetivo general se logrará a través de los objetivos específicos que abarcan la caracterización de la microbiota, la evaluación de la variabilidad morfológica, molecular y química de los aislamientos de *Alternaria*, la determinación de la presencia de genes responsables de la producción de toxinas HSTs y la evaluación de su capacidad toxicogénica bajo distintas condiciones ambientales, así como el estudio del efecto de la radiación UV-C como una posible estrategia de control.

I.7.2 Objetivos específicos

- a. Caracterizar los agentes fúngicos causantes de enfermedades en frutos de tomate de distintas regiones productoras de Argentina, identificando los géneros fúngicos predominantes y evaluando su diversidad y abundancia relativa (CAPÍTULO II).
- b. Investigar la variabilidad morfológica, molecular y química de los aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates, analizando características morfológicas, genéticas y perfiles de metabolitos secundarios (CAPÍTULO III).
- c. Evaluar la incidencia de las toxinas de *Alternaria* en productos procesados de tomate comercializados en Argentina, mediante técnicas analíticas de detección y cuantificación de micotoxinas (CAPÍTULO IV).
- d. Determinar la presencia de genes responsables de la biosíntesis de toxinas AAL en los aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate (CAPÍTULO V).
- e. Evaluar la ecofisiología en cuanto al crecimiento y la producción de micotoxinas de los aislamientos de *Alternaria* de tomate (CAPÍTULO VI).
- f. Analizar la eficacia de la radiación UV-C como una estrategia de control de *Alternaria*, a través de la evaluación *in vitro* de sus efectos fungicida y fungistático, y determinar su impacto sobre frutos de tomate (CAPÍTULO VII).

I.8 Bibliografía

- Aichinger, G., Beisl, J., & Marko, D. (2017). Genistein and delphinidin antagonize the genotoxic effects of the mycotoxin alternariol in human colon carcinoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(2). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600462>
- Aichinger, G., Del Favero, G., Warth, B., & Marko, D. (2021). *Alternaria* toxins—Still emerging? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4390-4406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12803>
- Aichinger, G., Krüger, F., Puntschner, H., Preindl, K., Warth, B., & Marko, D. (2019). Naturally occurring mixtures of *Alternaria* toxins: anti-estrogenic and genotoxic effects in vitro. *Archives of Toxicology*, 93(10), 3021-3031. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02545-z>
- Al-Maawali, S. S., Al-Sadi, A. M., Ali Khalifa Alsheriqi, S., Nasser Al-Sabahi, J., & Velazhahan, R. (2021). The potential of antagonistic yeasts and bacteria from tomato phyllosphere and fructoplane in the control of *Alternaria* fruit rot of tomato. *All Life*, 14(1), 34-48. <https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1858975>
- Bacha, S. A. S., Li, Y., Nie, J., Xu, G., Han, L., & Farooq, S. (2023). Comprehensive review on patulin and *Alternaria* toxins in fruit and derived products. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1139757>
- Banihani, S. A. (2018). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and type 2 diabetes. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 99-105. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1439959>
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Hajlaoui, M. R., Bacha, H., & Lemaire, C. (2012). Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 915-923. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.014>
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Pietri, A., & Giorni, P. (2021). *Alternaria* toxins in tomato products in Northern Italy in the period 2017-2019. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 14(3), 170-176. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1895325>
- Bessadat, N., Hamon, B., Bataillé-Simoneau, N., Mabrouk, K., & Simoneau, P. (2021). Characterization of new small-spored *Alternaria* species isolated from Solanaceae in Algeria. *Life*, 11(12), 1291.
- Beydaghi, M., Panjehkeh, N., & Rezaei, R. (2016). Identification fungal causing leaf spot on tomato and biological control by the antagonists isolated from the rhizosphere of tomato in sistán. *Biol Control Pests Plant Dis*, 6, 23–39. https://jbiocontrol.ut.ac.ir/article_62731.html?lang=en
- Bonfante, P., Venice, F., & Lanfranco, L. (2019). The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. En *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 49, pp. 18-25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.004>
- Borguini, R. G., & Ferraz Da Silva Torres, E. A. (2009). Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants. *Food Reviews International*, 25(4), 313-325. <https://doi.org/10.1080/87559120903155859>

- Bosqueiro, A. S., Bizarria Jr., R., & Rosa-Magri, M. M. (2023). Biocontrol of post-harvest tomato rot caused by *Alternaria arborescens* using *Torulaspora indica*. *Biocontrol Science and Technology*, 33(2), 115-132. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2163982>
- CAA. (2024). Código Alimentario Argentino. En Capítulo XI. Alimentos vegetales. Hortalizas. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulo/pdf/Capitulo_XI.pdf
- Chethana, K. W. T., Jayawardena, R. S., Chen, Y.-J., Konta, S., Tibpromma, S., Abeywickrama, P. D., Gomdola, D., Balasuriya, A., Xu, J., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2021). Diversity and Function of Appressoria. *Pathogens*, 10(6), 746. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060746>
- Chiesi, C., Fernandez-Blanco, C., Cossignani, L., Font, G., & Ruiz, M. J. (2015). Alternariol-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oil. *Toxicon*, 93, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.230>
- Chime, A., Aiwansoba, R., Osawaru, M., & Ogwu, M. (2017). Morphological Evaluation of Tomato (*Solanum lycopersicum* Linn.) Cultivars. *Makara Journal of Science*, 21(2). <https://doi.org/10.7454/mss.v21i2.7421>
- Colmán, A., Alves, J., Da Silva, M., & Barreto, R. (2018). *Phoma* destructiva causing blight of tomato plants: a new fungal threat for tomato plantations in Brazil? *Tropical Plant Pathology*, 43, 257-262. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0200-2>
- da Cruz Cabral, L., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Fog Nielsen, K., & Patriarca, A. (2016). Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.005>
- Dawid, J. (2016). The role of tomato products for human health (*Solanum lycopersicum*)-A review. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 33, 66-74.
- de Oliveira Filho, J. G., Silva, G. da C., Cipriano, L., Gomes, M., & Egea, M. B. (2021). Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. *Journal of Food Science*, 86(8), 3341-3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- Dong, C., Wang, L., Li, Q., & Shang, Q. (2021). Epiphytic and Endophytic Fungal Communities of Tomato Plants. *Horticultural Plant Journal*, 7(1), 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.09.002>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). *EFSA Journal*. <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>

- EFSA. (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. EFSA Journal, 14(12), e04654. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>
- Ellis, M. B. (1976). More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute.
- FAOSTAT. (2024). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Database. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/SCL>
- 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 & Food Research, 53(4), 441-451. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700379>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.003>
- Gerencia de Calidad y Tecnología, Corporación de Mercado Central de Buenos Aires, INTA, & Ministerio de Agricultura, G. y P. (2015). Ficha técnica de Tomate.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 120(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Giaambrone, J. J., Davis, N. D., & Diener, U. L. (1978). Effect of Tenuazonic Acid on Young Chickens. Poultry Science, 57(6), 1554-1558. <https://doi.org/10.3382/ps.0571554>
- Gou, Y., Aung, S. L. L., Guo, Z., Li, Z., Shen, S., & Deng, J. (2023). Four New Species of Small-Spored *Alternaria* Isolated from *Solanum tuberosum* and *S. lycopersicum* in China. Journal of Fungi, 9(9), 880. <https://doi.org/10.3390/jof9090880>
- Graf, E., Schmidt-Heydt, M., & Geisen, R. (2012). HOG MAP kinase regulation of alternariol biosynthesis in *Alternaria alternata* is important for substrate colonization. International Journal of Food Microbiology, 157(3), 353-359. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.004>
- Grover, S., & Lawrence, C. (2017). The *Alternaria alternata* Mycotoxin Alternariol Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. International Journal of Molecular Sciences, 18(7), 1577. <https://doi.org/10.3390/ijms18071577>
- Grum-Grzhimaylo, A. A., Georgieva, M. L., Bondarenko, S. A., Debets, A. J. M., & Bilanenko, E. N. (2016). On the diversity of fungi from soda soils. Fungal Diversity, 76(1), 27-74. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2>
- Habib, W., Masiello, M., El Ghorayeb, R., Gerges, E., Susca, A., Meca, G., Quiles, J. M., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2021). Mycotoxin Profile and Phylogeny of Pathogenic *Alternaria* Species Isolated from Symptomatic Tomato Plants in Lebanon. Toxins, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080513>

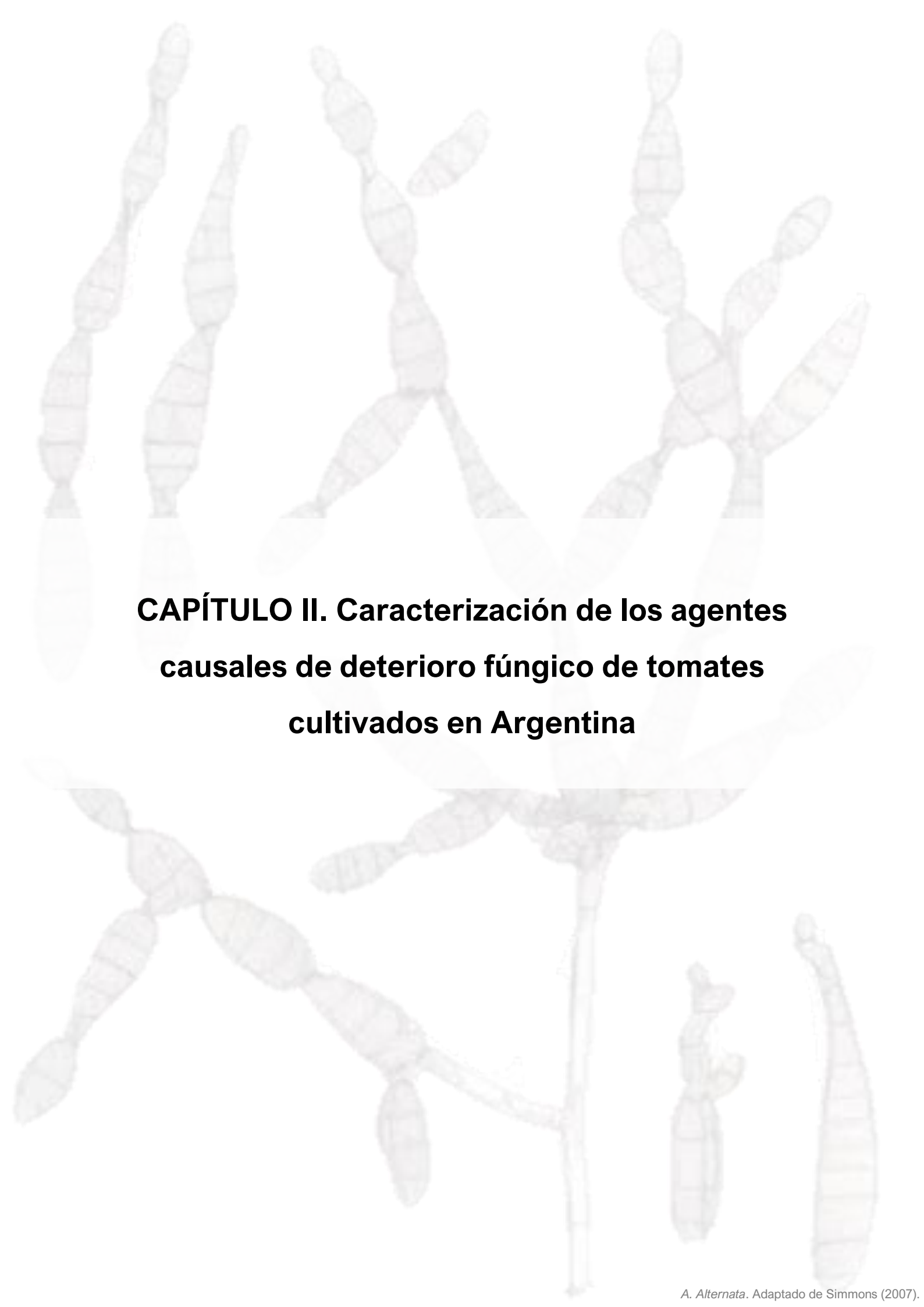
- Han, Y., Zhou, Z., Cao, Z., Zong, W., Zhao, G., & Wang, X. (2023). Degradation of *Alternaria* mycotoxins by UV-C irradiation: Effect of selected process and exposure to food components. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 40(1), 134-146. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2151646>
- Heli, Z., Hongyu, C., Dapeng, B., Yee Shin, T., Yejun, Z., Xi, Z., & Yingying, W. (2022). Recent advances of γ -aminobutyric acid: Physiological and immunity function, enrichment, and metabolic pathway. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1076223>
- Index fungorum. (2023). *Alternaria*. <https://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
- Jayathunge, K. G. L. R., Stratakos, A. Ch., Delgado-Pando, G., & Koidis, A. (2019). Thermal and non-thermal processing technologies on intrinsic and extrinsic quality factors of tomato products: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13901. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13901>
- Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392. <https://doi.org/10.1007/BF02859492>
- Ji, X., Deng, T., Xiao, Y., Jin, C., Lyu, W., Wu, Z., Wang, W., Wang, X., He, Q., & Yang, H. (2023). Emerging *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in tomatoes and derived tomato products from the China market: Occurrence, methods of determination, and risk evaluation. *Food Control*, 145, 109464. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109464>
- Kiralan, M., & Ketenoglu, O. (2022). Utilization of Tomato (*Solanum lycopersicum*) by-Products: An Overview. En *Mediterranean Fruits Bio-wastes* (pp. 799-818). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-84436-3_34
- Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., *Solanaceae*) and Its Botanical Relatives (pp. 7-21). https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2
- Kokaeva, L., Chudinova, E., Berezov, A., Yarmeeva, M., Balabko, P., Belosokhov, A., & Elansky, S. (2020). Fungal diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves and fruits in Russia. *Journal of Central European Agriculture*, 21(4), 809-816. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2869>
- Kollarova, J., Cenik, E., Schmutz, C., & Marko, D. (2018). The mycotoxin alternariol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in THP-1 derived macrophages targeting the NF- κ B signalling pathway. *Archives of Toxicology*, 92(11), 3347-3358. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2299-4>
- Kozlova, I., Esaulova, L., & Garkusha, S. (2020). Mechanical harvesting and processing of tomato varieties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1001(1), 012126. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1001/1/012126>
- Kroes, R., Renwick, A. G., Cheeseman, M., Kleiner, J., Mangelsdorf, I., Piersma, A., Schilter, B., Schlatter, J., van Schothorst, F., Vos, J. G., & Würtzen, G. (2004). Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 65-83. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.006>

- Lawrence, D. P., Rotondo, F., & Gannibal, P. B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, 15(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1144-x>
- Lehmann, L., Wagner, J., & Metzler, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 398-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.013>
- Leng, J., Dai, Y., Qiu, D., Zou, Y., & Wu, X. (2022). Utilization of the antagonistic yeast, *Wickerhamomyces anomalus*, combined with UV-C to manage postharvest rot of potato tubers caused by *Alternaria tenuissima*. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109782. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109782>
- Liu, W., He, X., Fu, J., & Wu, J. (2021). Identification and toxigenic analysis of *Alternaria* sp. in tomato.
- Liu, W., Liu, K., Chen, D., Zhang, Z., Li, B., El-Mogy, M. M., Tian, S., & Chen, T. (2022). *Solanum lycopersicum*, a Model Plant for the Studies in Developmental Biology, Stress Biology and Food Science. *Foods*, 11(16), 2402. <https://doi.org/10.3390/foods11162402>
- Mazumdar, P., Singh, P., Kethiravan, D., Ramathani, I., & Ramakrishnan, N. (2021). Late blight in tomato: insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. *Planta*, 253, 119. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03636-x>
- Mohammadi, A., & Bahramikia, S. (2019). Molecular identification and genetic variation of *Alternaria* species isolated from tomatoes using ITS1 sequencing and inter simple sequence repeat methods. *Current Medical Mycology*. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.2.1154>
- Mulvihill, S. (2023). *The Vegetable Garden Problem Solver Handbook: Identify and Manage Diseases and Other Common Problems on Edible Plants*. Cool Springs Press. <https://books.google.com.ar/books?id=LZYaEAAAQBAJ>
- Nizamlioglu, N. M. (2022). Relationship between ergosterol and mycotoxins in tomato paste and tomato juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16937>
- Noris, E., Matic, S., & Davino, S. (2024). Tomato. En *Viral Diseases of Field and Horticultural Crops* (pp. 361-368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90899-3.00068-9>
- Pahlke, G., Tiessen, C., Domnanich, K., Kahle, N., Groh, I. A. M., Schreck, I., Weiss, C., & Marko, D. (2016). Impact of *Alternaria* toxins on CYP1A1 expression in different human tumor cells and relevance for genotoxicity. *Toxicology Letters*, 240(1), 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.003>
- Patriarca, A. (2016). *Alternaria* in food products. *Current Opinion in Food Science*, 11, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.007>
- Patriarca, A., da Cruz Cabral, L., Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Andersen, B. (2019). Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.022>

- Pavichich, M. A., Nielsen, K. F., & Patriarca, A. (2022). Morphological and chemical characterization of *Alternaria* populations from apple fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109842>
- Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., & Ahmad, S. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 919-929. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657809>
- Pinto, V. E. F., & Patriarca, A. (2017). *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins (pp. 13-32). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_2
- Priyadi, M., & Upadhyay, P. (2021). Emerging Plant Diseases Under Changing Climate Scenario. En *Emerging Trends in Plant Pathology* (pp. 19-31). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4_2
- Qiao, Y.-P., Ding, Z.-Z., Ma, Y., Wang, Y.-B., Zhao, X.-Y., & Zhang, C. (2020). Effect of sulfur dioxide and ozone treatments on growth inhibition of *Alternaria alternata*.
- Qu, J., Lin, Y., Mao, X., Lu, G., Yuan, Z., Zhang, Y., You, Y., & Li, Y. (2021). Occurrence patterns of *Alternaria* toxins in tomatoes inoculated with *Alternaria* spp.
- Ramezani, Y., Taheri, P., & Mamarabadi, M. (2019). Identification of *Alternaria* spp. associated with tomato early blight in Iran and investigating some of their virulence factors. *Journal of Plant Pathology*, 101(3), 647-659. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00259-w>
- Renna, M., D'Imperio, M., Gonnella, M., Durante, M., Parente, A., Mita, G., Santamaria, P., & Serio, F. (2019). Morphological and Chemical Profile of Three Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Landraces of A Semi-Arid Mediterranean Environment. *Plants*, 8(8), 273. <https://doi.org/10.3390/plants8080273>
- Rizwana, H., Bokahri, N. A., Alsahli, S. A., Al Showiman, A. S., Alzahrani, R. M., & Aldehaish, H. A. (2021). Postharvest disease management of *Alternaria* spots on tomato fruit by *Annona muricata* fruit extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2236-2244. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.014>
- Rychlik, M., Lepper, H., Weidner, C., & Asam, S. (2016). Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control*, 68, 181-185.
- Saccardo, P. A. (1886). *Fungi italici autographice delineati:(additis nonnullis extra-italicis, Asterisco notatis)*. (Vol. 1). Sumpt. Auctoris (Lithogr. P. Fracanzani).
- Saleem, A., & El-Shahir, A. A. (2022). Morphological and Molecular Characterization of Some *Alternaria* Species Isolated from Tomato Fruits Concerning Mycotoxin Production and Polyketide Synthase Genes. *Plants*, 11(9), 1168. <https://doi.org/10.3390/plants11091168>
- Schmutz, C., Cenk, E., & Marko, D. (2019). The *Alternaria* Mycotoxin Alternariol Triggers the Immune Response of IL-1 β -stimulated, Differentiated Caco-2 Cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(20). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900341>

- Schreck, I., Deigendesch, U., Burkhardt, B., Marko, D., & Weiss, C. (2012). The *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether induce cytochrome P450 1A1 and apoptosis in murine hepatoma cells dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Toxicology*, 86(4), 625-632. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0781-3>
- Schwarz, C., Tiessen, C., Kreutzer, M., Stark, T., Hofmann, T., & Marko, D. (2012). Characterization of a genotoxic impact compound in *Alternaria alternata* infested rice as Alternotoxin II. *Archives of Toxicology*, 86(12), 1911-1925. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0958-4>
- Secretaría de Agricultura, G. y P., & Ministerio de Economía. (2023). Economía Regional.Tomate Industria. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/economias-regionales/producciones-regionales/informes/Informe_Tomate.pdf
- Secretaría de Agricultura, G. y Pesca. (2023). Producción de tomate en Argentina. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/2022.
- Sedova, I. B., Chalyy, Z. A., Ivanova, U. V., & Tutelyan, V. A. (2024). *Alternaria* toxins in tomato products marketed in the Russian Federation. *Problems of Nutrition*, 93(1), 103-111. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2024-93-1-103-111>
- Sharma, R. L., Ahir, R. R., Yadav, S. L., Sharma, P., & Ghasolia, R. P. (2021). Effect of nutrients and plant extracts on *Alternaria* blight of tomato caused by *Alternaria Alternata*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(4), 951-960. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00485-4>
- Shigeura, H. T., & Gordon, C. N. (1963). The Biological Activity of Tenuazonic Acid *. *Biochemistry*, 2(5), 1132-1137. <https://doi.org/10.1021/bi00905a039>
- Silva, E. P. da, Neto, A. F., Silva, J. C., Donzeli, V. P., Costa, M. S., Costa, J. D. S., & Figueiredo, R. M. C. (2020). Effects of Sanitizers on the Control of *Alternaria* sp. Fungus for 'Palmer' Mango Conservation. *Journal of Agricultural Science*, 12(9), 216. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n9p216>
- Simmons, E. G. (1997). *Alternaria* themes and variations (151-223).
- Singh, D., & Sharma, R. (2018). Chapter 1 - Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management. En M. W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 1-52). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00001-7>
- Somma, S., Amatulli, M. T., Masiello, M., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2019). *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.006>

- Soukup, S. T., Fleck, S. C., Pfeiffer, E., Podlech, J., Kulling, S. E., & Metzler, M. (2020). DNA reactivity of altertoxin II: Identification of two covalent guanine adducts formed under cell-free conditions. *Toxicology Letters*, 331, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.018>
- Tiessen, C., Fehr, M., Schwarz, C., Baechler, S., Domnanich, K., Böttler, U., Pahlke, G., & Marko, D. (2013). Modulation of the cellular redox status by the *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Toxicology Letters*, 216(1), 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.005>
- Twarużek, M., Soszczyńska, E., & Kwiatkowska-Giżyńska, J. (2021). Molds in Food Spoilage. En *Encyclopedia of Mycology* (pp. 208-214). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21048-0>
- Vejdovszky, K., Hahn, K., Braun, D., Warth, B., & Marko, D. (2017). Synergistic estrogenic effects of *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in vitro. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1447-1460. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1795-7>
- Wasim, S. M., & Singh, J. P. (2015). Compositional alterations in tomato products during storage. *Res. J. Chem. Environ*, 19(2), 82-87.
- Woo, S. Y., Lee, S. Y., Jeong, T. K., Park, S. M., Auh, J. H., Shin, H.-S., & Chun, H. S. (2022). Natural Occurrence of *Alternaria* Toxins in Agricultural Products and Processed Foods Marketed in South Korea by LC–MS/MS. *Toxins*, 14(12), 824. <https://doi.org/10.3390/toxins14120824>
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Xu, Q., Adyatni, I., & Reuhs, B. (2018). Effect of Processing Methods on the Quality of Tomato Products. *Food and Nutrition Sciences*, 09(02), 86-98. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.92007>
- Zhao, K., Zha, Z., Li, H., & Wu, J. (2021). Early detection of moldy apple core based on time-frequency images of vibro-acoustic signals. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111589. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111589>
- Zwicker, T., Kahl, S., Klaffke, H., Rychlik, M., & Müller, M. (2016). Spotlight on the Underdogs—An Analysis of Underrepresented *Alternaria* Mycotoxins Formed Depending on Varying Substrate, Time and Temperature Conditions. *Toxins*, 8(11), 344. <https://doi.org/10.3390/toxins8110344>



CAPÍTULO II. Caracterización de los agentes causales de deterioro fúngico de tomates cultivados en Argentina

II.1 Introducción

II.1.1 Tomate: Susceptibilidad a la contaminación fúngica

Los tomates son extremadamente perecederos y propensos a daños mecánicos debido a su alto contenido de agua y nutrientes, lo cual los convierte en un sustrato ideal para el crecimiento fúngico. Su fragilidad inherente los hace susceptibles a contaminación fúngica durante la cosecha, postcosecha, transporte, procesamiento y almacenamiento (Molina et al., 2023; B. Rodrigues & Kakde, 2019; Thole et al., 2020). El debilitamiento y daño del tejido, ya sea por condiciones ambientales por humedad y temperatura o por manipulación inadecuada, facilita el ingreso para la infección fúngica. Si existen las condiciones de germinación apropiadas, las esporas pueden infectar tallos, sépalos o la piel del fruto (Brdar et al., 2021). De hecho, las frutas y hortalizas en general son propensas a infecciones fúngicas durante toda la cadena de producción y comercialización (You et al., 2022).

II.1.2 Enfermedades fúngicas en tomates

Los hongos son organismos que cumplen diversos roles como saprófitos, endófitos, parásitos o simbioses. Se reproducen mediante esporas y son los causantes de la mayoría de las enfermedades en plantas y frutos (Bonfante et al., 2019; Mulvihill, 2023). La contaminación fúngica no sólo reduce la calidad y vida útil de los frutos, sino que también genera grandes pérdidas económicas en la industria frutihortícola (de Oliveira Filho et al., 2021; Olowe et al., 2022). Las interacciones patogénicas exitosas requieren que los hongos utilicen estructuras de infección especializadas, tales como apresorios, así como la secreción de efectores para degradar los tejidos del huésped (Chethana et al., 2021). Además, el cambio climático puede provocar desequilibrios que afectan la interacción planta-patógeno, propiciando de esta manera la aparición de nuevas enfermedades (Priyadi & Upadhyay, 2021).

El tomate es susceptible a varias enfermedades fúngicas graves como el tizón temprano causado por *Alternaria* spp. y el tizón tardío ocasionado por *Phytophthora infestans*, consideradas serias amenazas para la producción (Adhikari et al., 2017; Colmán et al., 2018; Mazumdar et al., 2021; Rodrigues & Furlong, 2022). En la **Figura II.1** se muestra un esquema de desarrollo y síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria* (Agrios, 2005). Asimismo, patógenos tales como *Fusarium*, *Aspergillus*,

Penicillium, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum* y *Pythium* impactan el cultivo de tomate a nivel global (Malik et al., 2022; Singh & Sharma, 2018). Las enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos constituyen un factor limitante clave que requiere estrategias efectivas de manejo y mitigación (Dong et al., 2021; Kokaeva et al., 2020; X. Liu et al., 2020). Además, la contaminación del cultivo con especies toxicogénicas genera gran preocupación, dado que sus micotoxinas termorresistentes pueden persistir incluso luego de un procesamiento térmico (Rodrigues & Furlong, 2022).

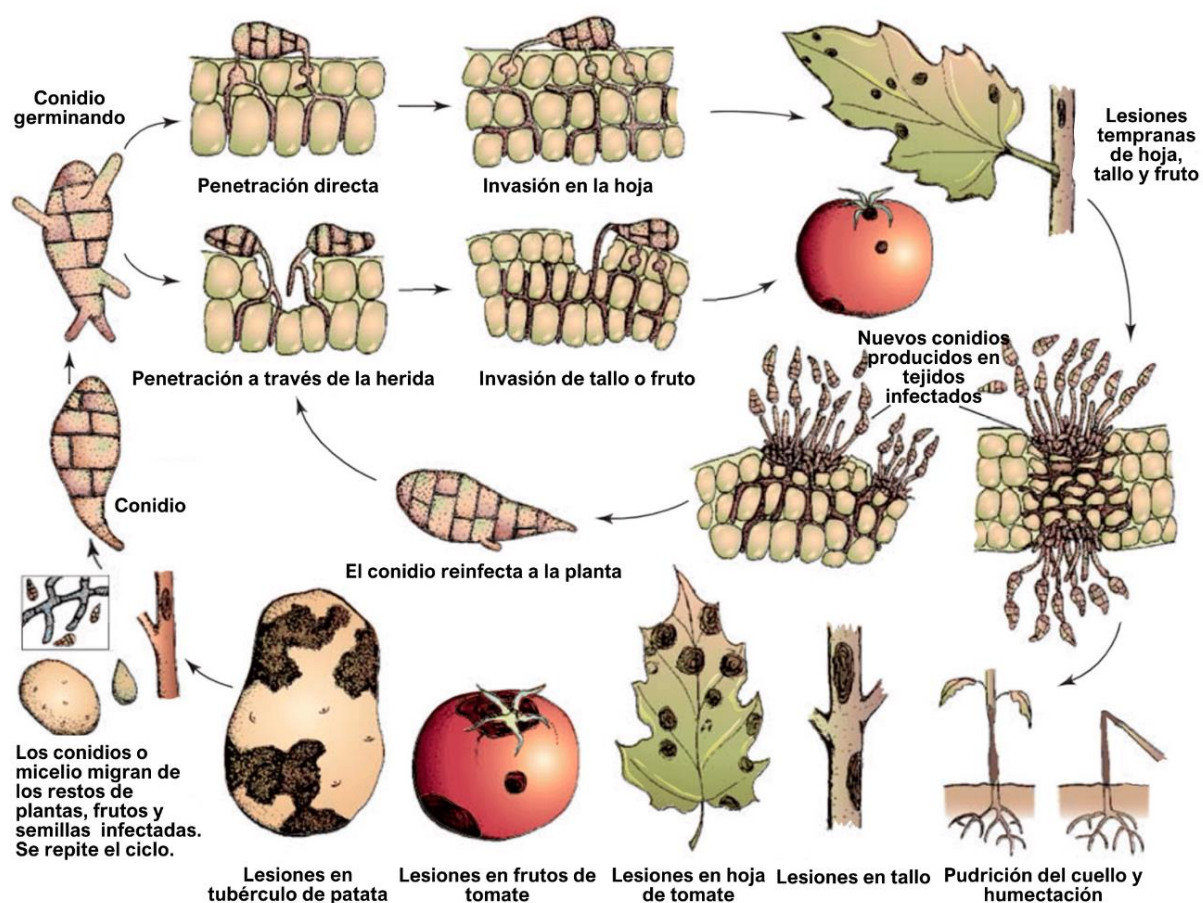


Figura II.1. Desarrollo y síntomas de enfermedades causadas por *Alternaria*. Adaptado de Agrios (2005).

II.1.2.1 Riesgo de la presencia de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos no esenciales para el crecimiento del hongo, pero capaces de provocar efectos tóxicos en humanos y

animales (Kuhnert & Collemare, 2022; Pleadin et al., 2019). La contaminación de alimentos por especies fúngicas toxigénicas, como las de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, representa una amenaza a la inocuidad alimentaria, dado que sus micotoxinas muestran actividad inmunotóxica, carcinogénica, nefrotóxica y neurotóxica (Hamad et al., 2023; Iqbal, 2021). *Alternaria* es un género micotoxigénico destacado, con más de 70 metabolitos reportados que exhiben mutagenicidad, rotura de ADN y alteración enzimática (Escrivá et al., 2017). Sus micotoxinas presentes en otros frutos evidencian el riesgo para consumidores y la necesidad de control (Aloi et al., 2021a; da Cruz Cabral et al., 2016; Y. Li et al., 2023; Pavicich et al., 2022).

En tomate, *Alternaria* spp. resulta destructivo no solo por sus impactos en la producción, sino también por la capacidad de acumular en el fruto micotoxinas perjudiciales para la salud (Bello et al., 2016; Sanzani et al., 2021). Si bien la Unión Europea posee límites regulatorios para ciertas micotoxinas, aún no existen para las de *Alternaria*, por lo que las autoridades sanitarias demandan evaluaciones de riesgo (Sanzani et al., 2021).

Controlar estos hongos fitopatógenos productores de micotoxinas en tomate es clave para garantizar inocuidad y seguridad alimentaria. En líneas generales, resulta fundamental caracterizar y conocer los agentes fúngicos causantes de enfermedades en los tomates cultivados en Argentina, dado que esto permitirá diseñar estrategias de manejo adaptadas a las principales especies prevalentes a nivel local.

Por ello, se plantea como objetivo del presente capítulo, caracterizar los agentes fúngicos causantes de enfermedades en frutos de tomates de distintas regiones productivas en Argentina, para poder mitigar su impacto sobre la producción nacional de tomate y reducir el riesgo de contaminación con micotoxinas perjudiciales para la salud pública.

II.2 Materiales y Métodos

II.2.1 Muestras

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico intencional o por conveniencia (Martínez, 2012) de tomates (*Solanum lycopersicum*), dividido en 37 lotes. Este

consistió en la selección de un total de 183 tomates con evidentes lesiones fúngicas (**Figura II.2**), aplicando un diseño anidado o jerarquizado en dos niveles. El primer nivel correspondió al tipo de cultivar, distinguiendo Tomates Perita (TP) y Tomates Redondos (TR). Dentro de cada subgrupo cultivar se anidó un segundo nivel según el origen geográfico, abarcando diversas regiones productoras.

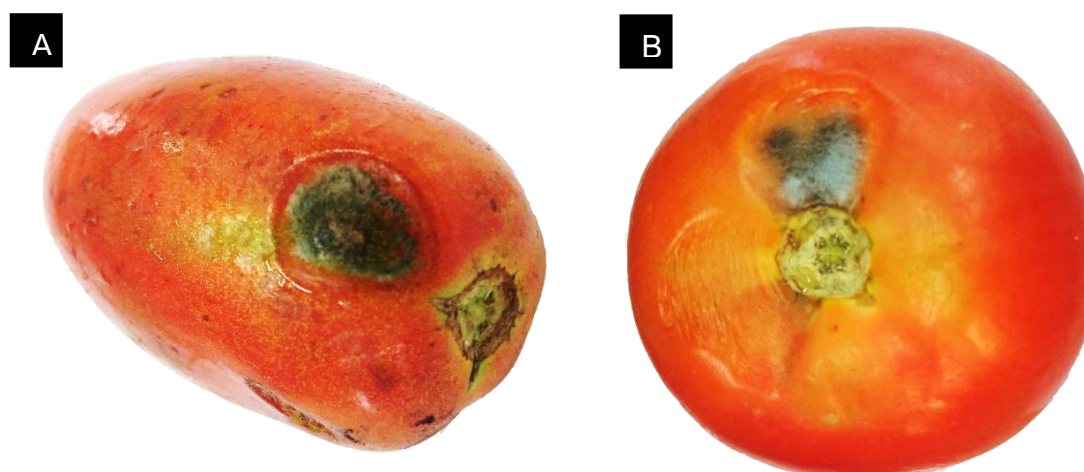


Figura II.2. Lesiones fúngicas evidentes en A: Tomate Perita (TP) y B: Tomate Redondo (TR).

Del total de frutos, 135 pertenecían al cultivar TP y 48 al cultivar TR. En la **Tabla II.1** se muestra el número de tomates muestreados según su origen.

Tabla II.1. Número de tomates muestreados de acuerdo con su origen y tipo de cultivar.

Cultivar	Lotes	Unidades	Región	Provincia	Unidades
Tomate perita (TP)	27	135	Noroeste	Salta	58
			Cuyo	Mendoza	35
			Pampeana	Buenos Aires	34
			Noroeste	Jujuy	8
Tomate redondo (TR)	10	48	Cuyo	Mendoza	15
			Pampeana	Buenos Aires	14
			Noroeste	Jujuy	11
			Noreste	Corrientes	6
			Noroeste	Salta	2
Total	37	183			

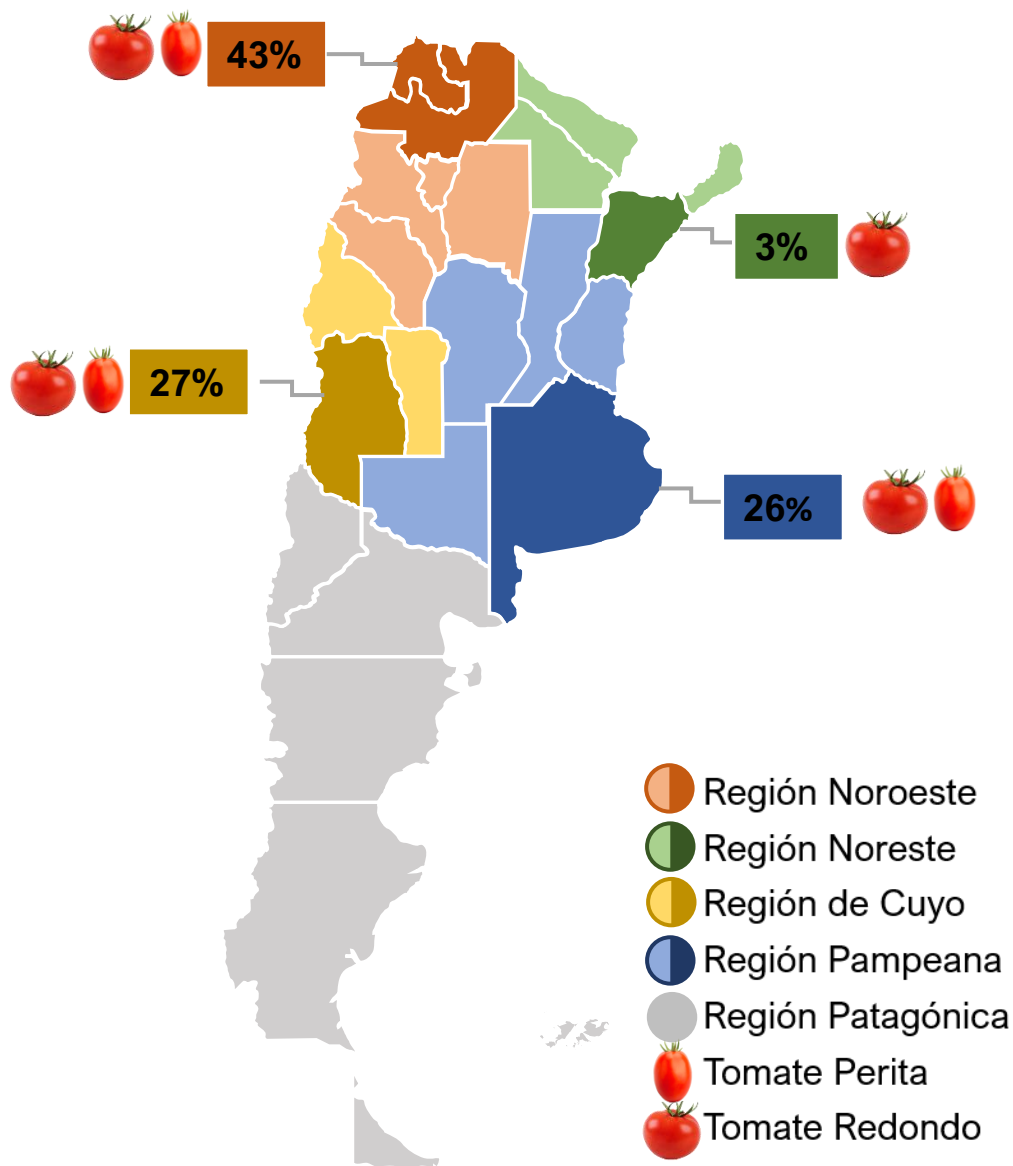


Figura II.3. Distribución geográfica y origen de las muestras de tomates por región de Argentina. Las provincias sombreadas en tono más intenso indican el origen de las muestras recolectadas en cada región. Los porcentajes corresponden a la proporción de muestras provenientes de cada región con relación al total. Los íconos representan los cultivares de tomate muestreados en cada provincia.

Con el propósito de representar la distribución geográfica de la muestra total de tomates analizados, en la **Figura II.3** se presentan los porcentajes de procedencia por región; además, se resalta las provincias de las cuales se originan. La región con mayor representatividad en la muestra fue el noroeste, abarcando un 43% del total de tomates examinados. Esta zona se caracterizó por aportar ejemplares de los dos

cultivares en estudio, TP y TR. Por otro lado, la región con menor presencia fue el noreste, correspondiente al 3% de la muestra, área donde sólo se recolectó TR.

Los tomates fueron recolectados en el Mercado Central de Buenos Aires, considerado como el principal punto de distribución de la producción frutícola a nivel nacional, abasteciendo a los mercados locales minoristas para obtener muestras representativas de las principales regiones productoras del país. Para llevar a cabo este muestreo, se contó con la colaboración del personal del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires.

II.2.2 Aislamiento fúngico

Las cepas fúngicas fueron aisladas utilizando el medio de cultivo Agar Diclorán Cloranfenicol Malta (DCMA), el cual fue vertido en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Para el aislamiento se procedió a la transferencia del tejido externo de tomate que presentaba lesiones fúngicas evidentes, y se incubó a una temperatura de 25°C durante 7 días.

II.2.2.1 Identificación morfológica

Para la identificación de los géneros fúngicos aislados (**Figura II.4**), se obtuvieron cultivos axénicos a partir de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo DCMA. Los aislamientos fúngicos se inocularon en placas de Petri que contenían diferentes medios de cultivo, en las cuales se transfirió fragmentos de micelio y conidios usando un asa recta estéril. Para los aislamientos generales se empleó Agar Papa Dextrosa (PDA), para los aislamientos presuntivos, Agar Papa Zanahoria (APZ), Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES) y Diclorán 18% Glicerol Agar (DG18), y para otros géneros fúngicos, Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Extracto de Levadura Czapek (CYA) y DG18 (Samson et al., 2010). Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días. Posteriormente, se realizó la caracterización macroscópica de las colonias fúngicas resultantes, examinando el diámetro, coloración del anverso y reverso y textura.

Para la observación microscópica, se prepararon montajes de cada uno de los aislamientos. Utilizando un asa recta estéril, se tomó una porción de la colonia con micelio y estructuras de esporulación. En los casos donde hubo exceso de conidios, éstos se dispersaron en una gota de etanol al 70% depositada sobre un portaobjetos,

para luego transferir parte de esta suspensión a un nuevo portaobjetos con una gota del agente de montaje correspondiente. Para los aislamientos de *Alternaria* sp. se empleó ácido láctico, con el fin de preservar la pigmentación natural de los conidios. En los montajes de los demás géneros, se utilizó lactofucsina o azul de lactofenol para teñir las estructuras fúngicas y lograr un mayor contraste durante la observación microscópica.

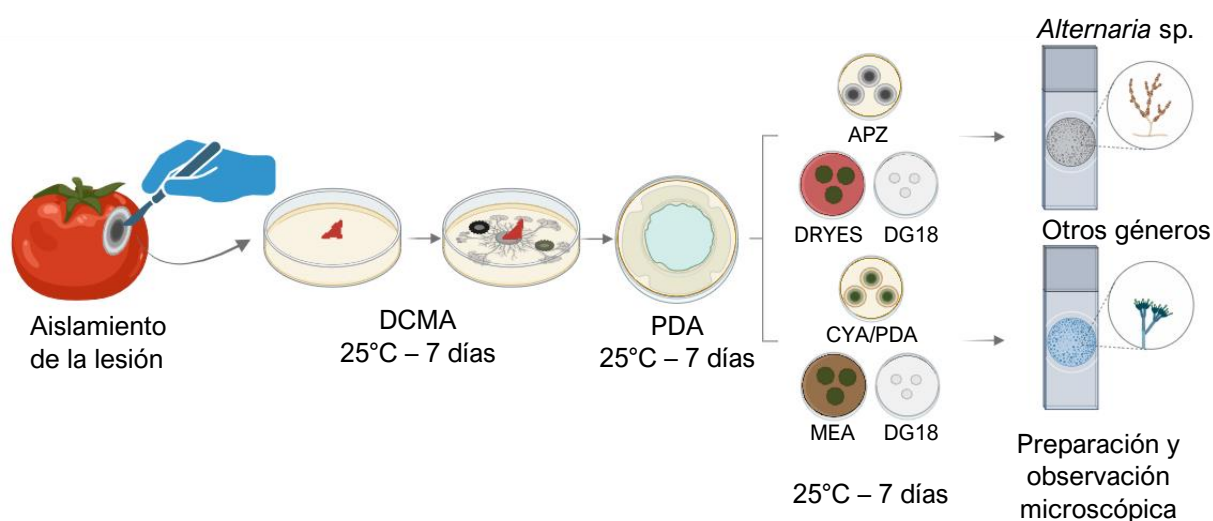


Figura II.4. Ilustración del método aplicado para el aislamiento e identificación de los géneros fúngicos causantes de lesiones en tomates cultivados en Argentina.

La identificación morfológica de los géneros fúngicos aislados se realizó mediante la observación detallada de preparaciones microscópicas utilizando un microscopio óptico Carl Zeiss Axiostar serie 41351. Se examinaron las características de los conidióforos, incluyendo forma (ramificados, no ramificados, digitados, verticilados), tamaño (largo y ancho), modo de ramificación cuando presente (dicotómica, verticilada, irregular) y disposición (solitarios, en grupos). También se observaron las fiálides, describiendo su forma (cilíndricas, ampuliformes, aciculares), tamaño y disposición sobre el conidióforo (laterales, terminales, verticiladas). En cuanto a los conidios, se analizó su forma (globosos, elipsoidales, fusiformes, filiformes), tamaño, coloración, textura de la pared (lisa, verrucosa, equinulada), tipo de septación (transversal, longitudinal o ambas) y presencia de conexiones formando cadenas. Respecto de las hifas, se registraron diámetro, pigmentación, ramificaciones y tipo de

septación. Estos rasgos micro-morfológicos fueron comparados con claves taxonómicas para la identificación de hongos contaminantes de alimentos (Pitt & Hocking, 2009; Samson et al., 2010), lo cual permitió determinar el género fúngico correspondiente a cada aislamiento.

II.2.3 Análisis de diversidad

Para evaluar la diversidad de los géneros fúngicos identificados en muestras de los cultivares de tomate perita (TP) y redondo (TR) provenientes de cuatro regiones de Argentina, se estimó abundancia y frecuencia de cada género. La abundancia se definió como la proporción del número de aislamientos de cada género sobre el número total de aislamientos. La frecuencia se calculó como el número de aislamientos de cada género dividido por la cantidad de unidades muestrales (frutos) contaminados con dicho género. Se calcularon además los índices de diversidad. Se aplicó la fórmula del índice de Simpson (D) para obtener una medida de la diversidad, donde valores altos denotan mayor diversidad y equitatividad en la comunidad fúngica, mientras que valores bajos sugieren el predominio de ciertos géneros entre los aislamientos analizados. Adicionalmente, se estimó el índice de Shannon (H') que proporciona una medida de la heterogeneidad y equidad en la distribución de los géneros, siendo valores cercanos a 0 indicativos de comunidades dominadas por unas pocas especies, y valores elevados representativos de una comunidad diversa y balanceada (Shannon & Weaver, 1949; Simpson, 1949).

II.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha=0,05$) para determinar si existían diferencias significativas entre los cultivares y su origen con respecto a los índices de diversidad. Se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos utilizando el método de Tukey. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando el software RStudio 2023.06.1+524, los resultados se presentaron en términos de estadísticas de prueba, valores p y comparaciones de medias.

II.3 Resultados

Se obtuvieron un total de 311 aislamientos fúngicos a partir de 183 tomates con lesiones evidentes. De estos aislamientos, 240 (77%) correspondieron al cultivar tomate perita y 71 (23%) al cultivar tomate redondo. En cuanto a la región de origen, 117 aislamientos (38%) procedieron de la región Noroeste, 95 (31%) de la región Pampeana, 87 (28%) de la región de Cuyo y 12 (4%) de la región Noreste. La identificación morfológica de dichos aislamientos permitió determinar la presencia de 12 géneros fúngicos (**Figura II.5**).

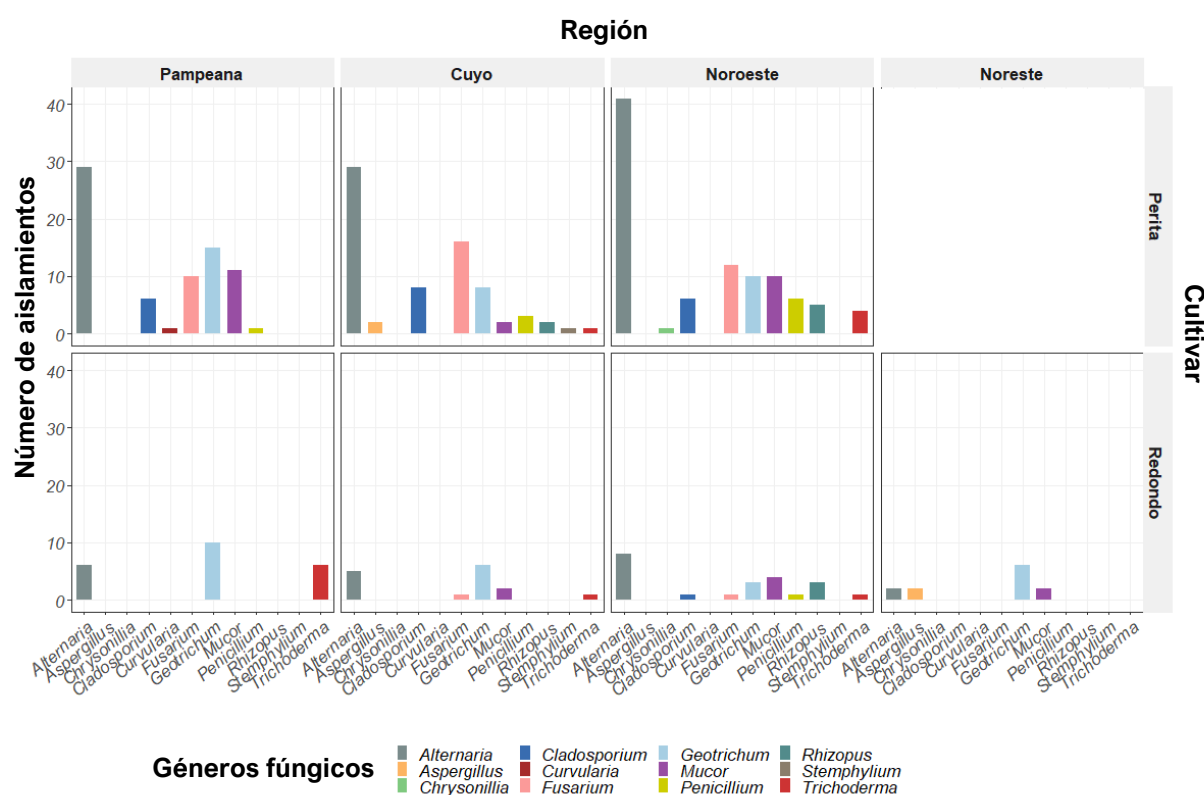


Figura II.5. Número de aislamientos de los distintos géneros fúngicos aislados de tomates cultivados en Argentina discriminados por región y cultivar.

En las **Figuras II.6 a la II.12** se exhiben las principales características micro y macro-morfológicas de los géneros fúngicos predominantes.

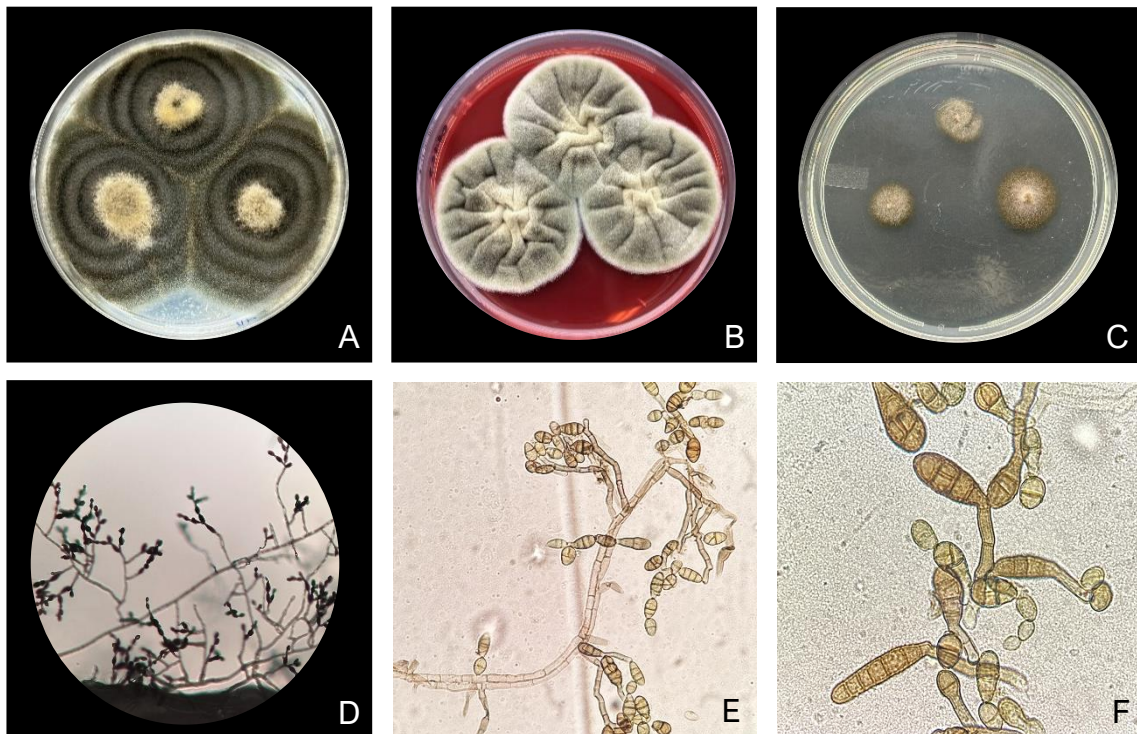


Figura II.6. Características morfológicas de *Alternaria* sp. aislada de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) APZ; B) DRYES; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

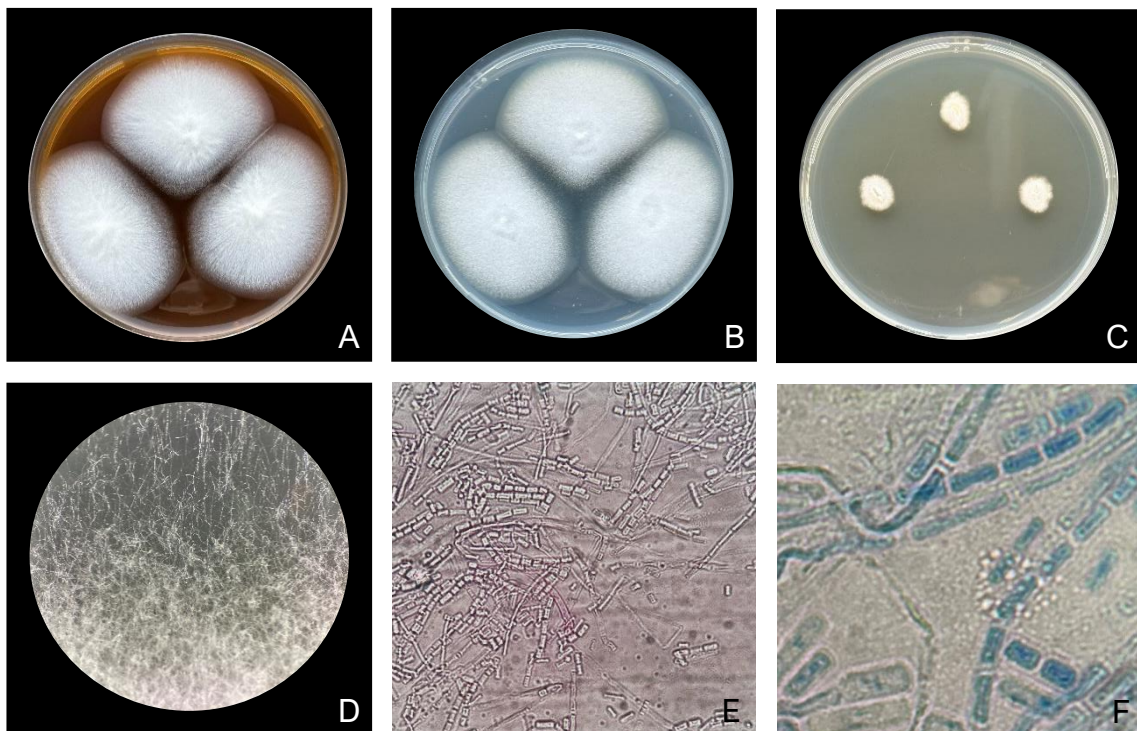


Figura II.7. Características morfológicas de *Geotrichum* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

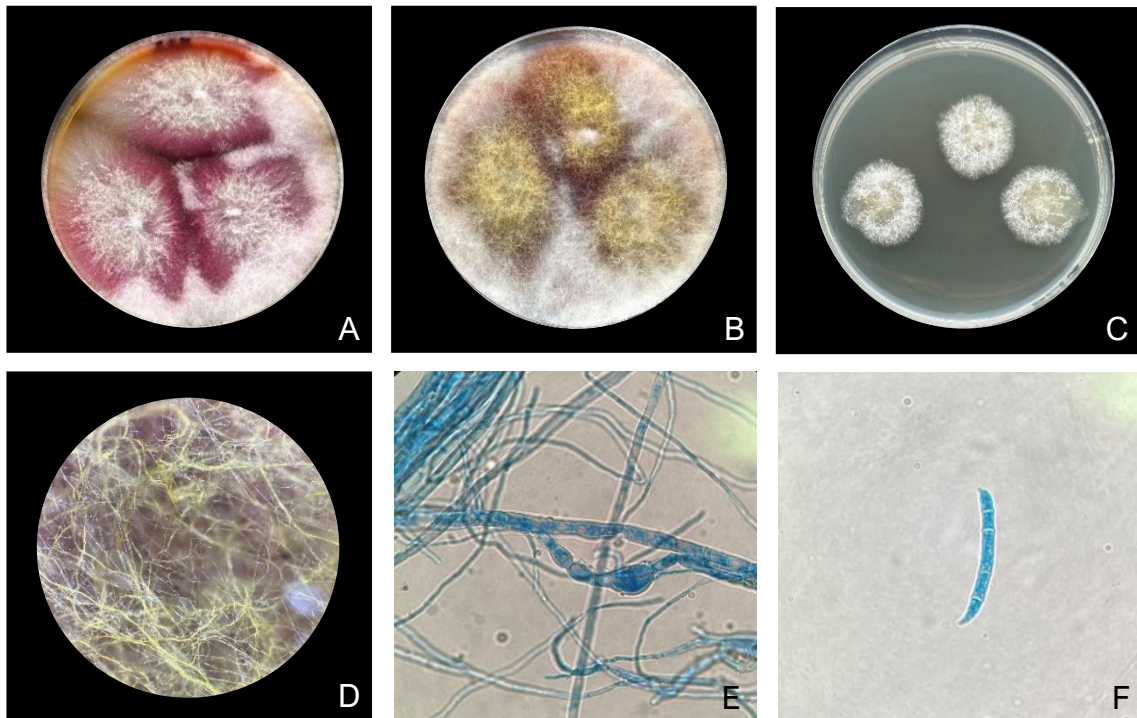


Figura II.8. Características morfológicas de *Fusarium* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

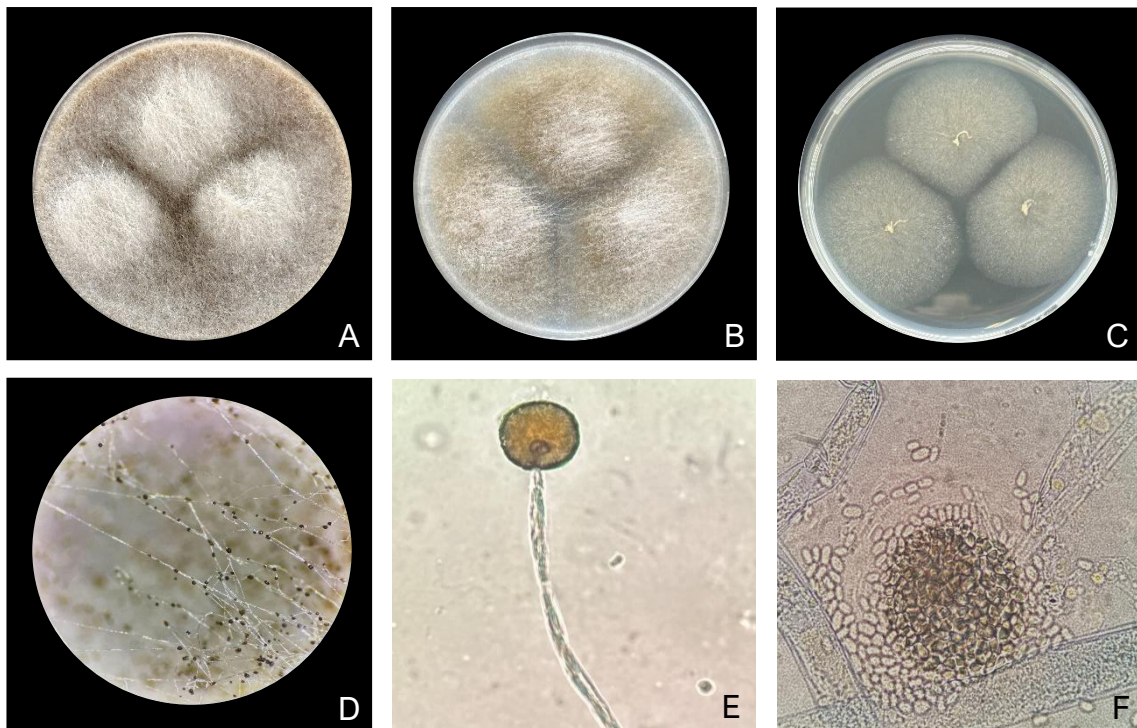


Figura II.9. Características morfológicas de *Mucor* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

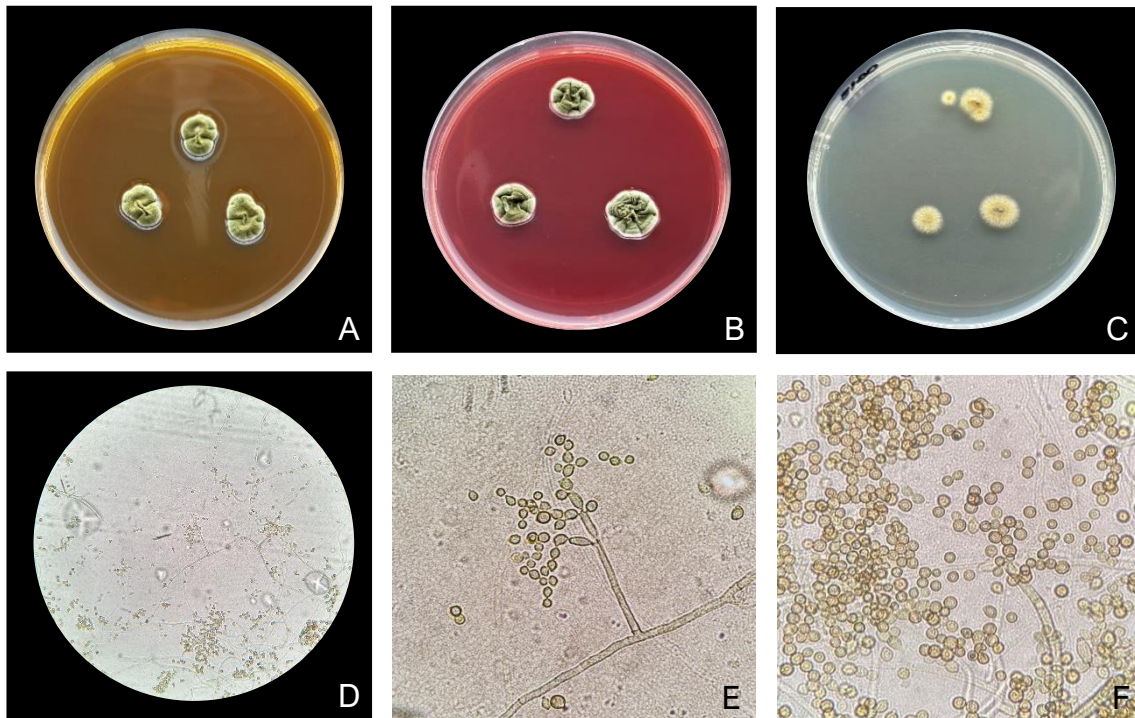


Figura II.10. Características morfológicas de *Cladosporium* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) DRYES; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 100x; E) 400x; F) 1000x.

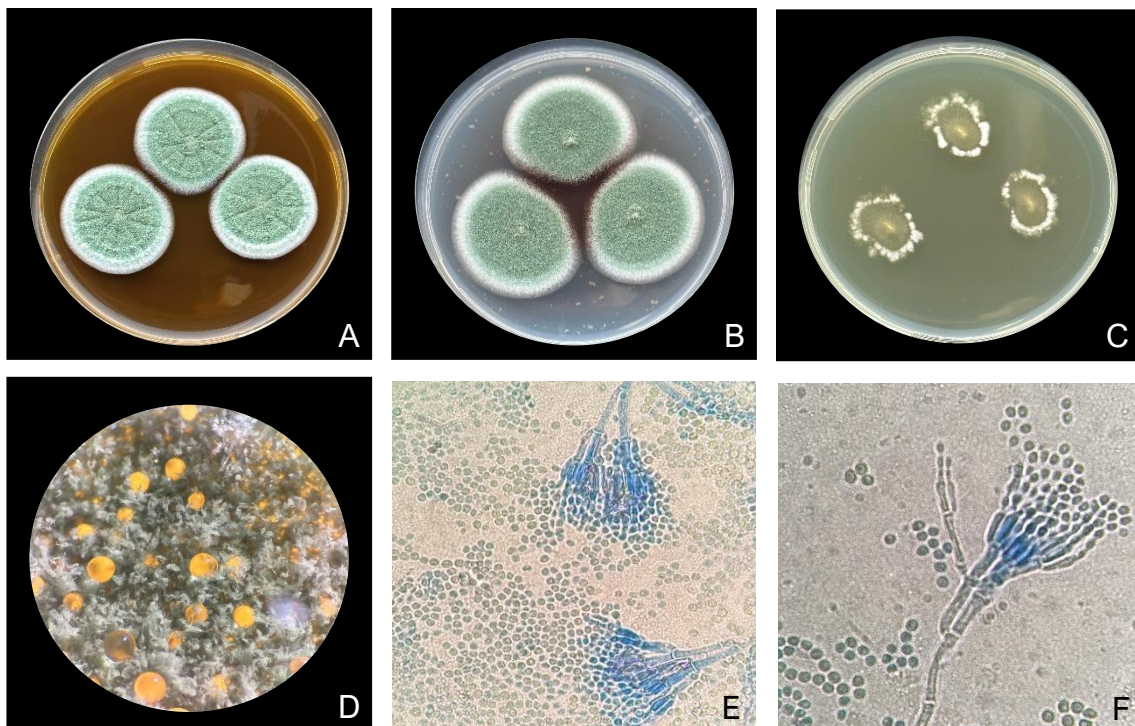


Figura II.11. Características morfológicas de *Penicillium* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) CYA. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

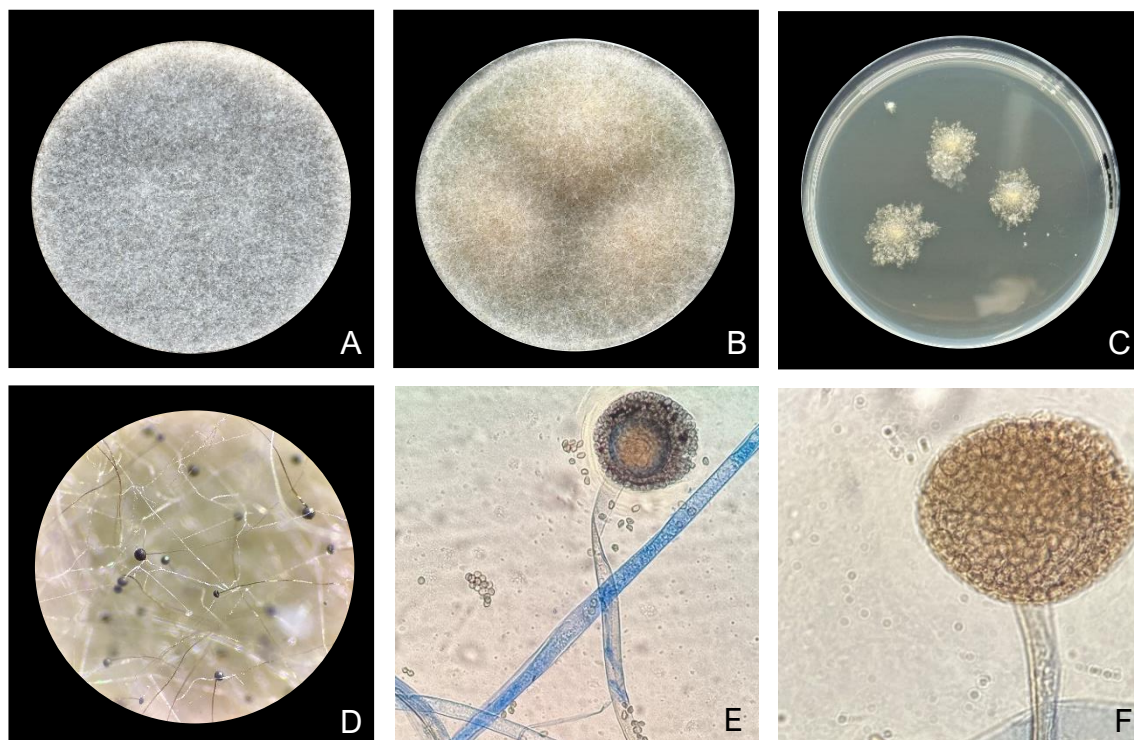


Figura II.12. Características morfológicas de *Rhizopus* sp. aislado de tomate. Colonias después de 7 días de incubación a 25°C en: A) MEA; B) PDA; C) DG18. Observaciones microscópicas a: D) 70x; E) 400x; F) 1000x.

Sobre el conjunto de 311 aislamientos fúngicos identificados, se determinaron las abundancias y frecuencias correspondientes a cada género (**Figura II.13**). *Alternaria* sp. fue el género predominante, representando el 39% de la abundancia y una frecuencia de aislamiento del 66%. Otros géneros mayoritarios fueron *Geotrichum* sp., con una abundancia del 19% y frecuencia del 32%, y *Fusarium* sp. con 13% y 22%, respectivamente. Dentro de los géneros menos comunes se encontraron *Mucor* sp. (10% de abundancia y 17% de frecuencia) y *Cladosporium* sp. (7% y 11%, respectivamente). Los géneros minoritarios detectados fueron *Trichoderma* sp. (4% y 7%), *Penicillium* sp. (4% y 6%), *Rhizopus* sp. (3% y 5%) y *Aspergillus* sp. (1% y 2%). Por último, se identificaron con abundancias y frecuencias menores al 1% los géneros *Stemphylium* sp., *Chrysosporium* sp. y *Curvularia* sp.

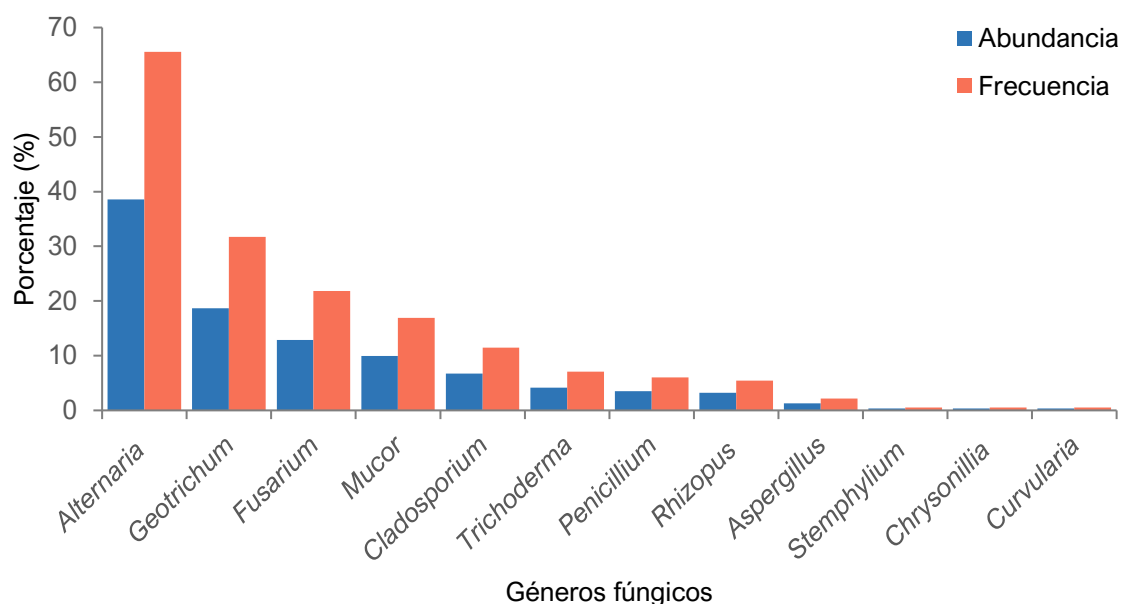


Figura II.13. Abundancia y frecuencia (%) de géneros fúngicos aislados de tomates afectados por deterioro fúngico cultivados en Argentina.

En las **Figuras II.14 y II.15** se muestran la abundancia y frecuencia de los aislamientos fúngicos diferenciados por cultivar y región de origen. Del total de aislamientos fúngicos obtenidos, 240 (77%) provenían del cultivar tomate perita (TP) y 71 (23%) del cultivar tomate redondo (TR).

Alternaria sp. fue el género predominante en TP en las tres regiones evaluadas, con una abundancia de 40-43%. Sin embargo, en TR dicho género sólo fue mayoritario en el Noroeste (36%), mientras que en las demás regiones su abundancia osciló entre 17-33%, ubicándose en segundo lugar. Por el contrario, *Geotrichum* sp. mostró mayor abundancia en las muestras de TR (14-50%) en comparación con el cultivar perita (11-21%), constituyendo el género principal en TR de tres regiones. Otra diferencia relevante entre cultivares fue la mayor abundancia de *Fusarium* sp. en TP (22-13%) para las tres regiones, mientras que en TR este género sólo alcanzó valores de 7% en Cuyo y 5% en Noroeste. Géneros minoritarios como *Stemphylium* sp., *Chrysonillia* sp. y *Curvularia* sp. exhibieron abundancias menores al 1% en la mayoría de las regiones y cultivares.

En cuanto a las frecuencias, se observaron diferencias entre cultivares y regiones para algunos géneros fúngicos. *Geotrichum* sp. estuvo presente en el 100% y 71% de las

muestras de TR provenientes de las regiones Noreste y Pampeana respectivamente, mientras que en TP sus frecuencias fueron menores (15-44%). Por el contrario, *Alternaria* sp. mostró altas frecuencias en muestras de TP de las regiones Pampeana (85%) y Cuyo (83%), superando a las de TR. En la región Noroeste ambos cultivares igualaron su frecuencia para este género (62%). Otra variación relevante fue la presencia de *Fusarium* sp. en el 46% de las muestras de TP de Cuyo, mientras que en TR estuvo ausente en las regiones Noreste y Pampeana. *Trichoderma* sp. alcanzó una frecuencia del 43% en TR de la región Pampeana, mientras que en TP estuvo ausente en la misma región. Finalmente, géneros minoritarios como *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., y *Cladosporium* sp. se detectaron en frecuencias menores al 35% en las muestras de ambos cultivares y regiones.

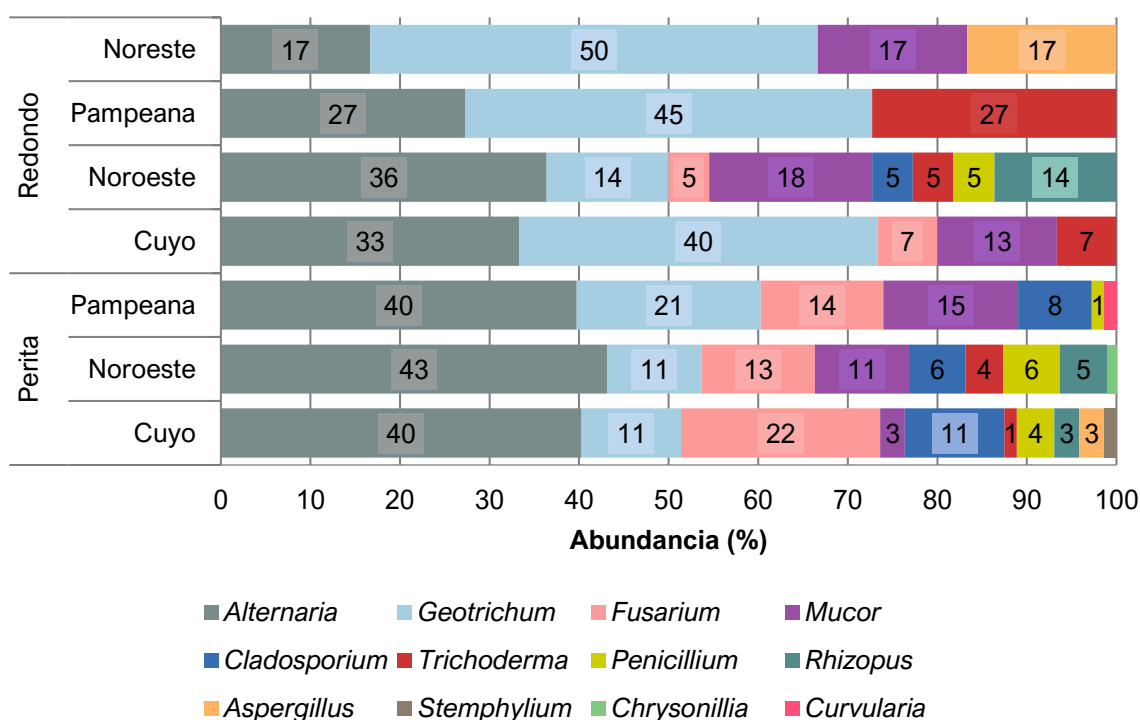


Figura II.14. Abundancia (%) de géneros fúngicos aislados de cultivares de tomate (Perita y Redondo), provenientes de cuatro regiones productoras de Argentina (Noreste, Pampeana, Noroeste y Cuyo).

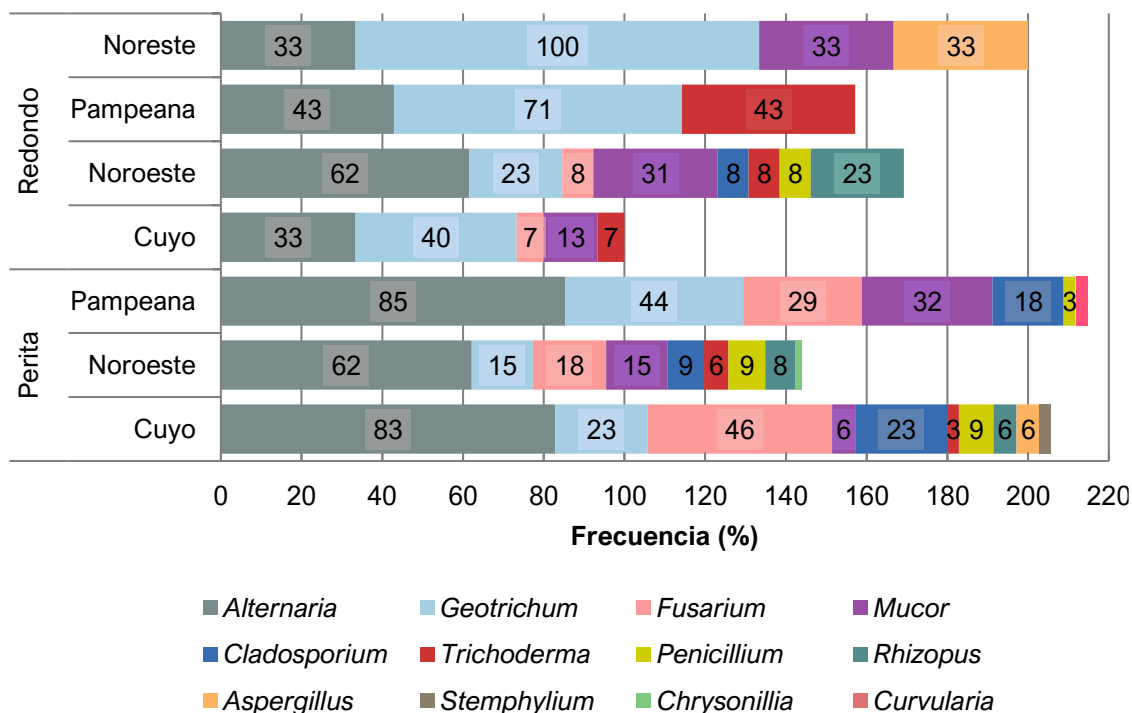


Figura II.15. Frecuencia (%) de géneros fúngicos aislados de cultivares de tomate (Perita y Redondo), provenientes de cuatro regiones productoras de Argentina (Noreste, Pampeana, Noroeste y Cuyo).

En cuanto a la diversidad (**Figura II.16**), el análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en el índice de diversidad de Shannon (H') tanto entre regiones como entre cultivares ($p < 0,05$). La prueba de diferencia de medias de Tukey evidenció que la diversidad fue significativamente menor en la región Pampeana de TR (1,07). Las diversidades más altas se observaron en el Noroeste, tanto en TP (1,78) como en TR (1,78) y en TP de Cuyo (1,74) sin diferir estadísticamente entre sí. En TP, el índice de diversidad fue significativamente menor en la región Pampeana que en Cuyo y Noroeste. Esto mismo se observó en TR, donde la diversidad se incrementó en el orden Pampeana < Noreste = Cuyo < Noroeste.

A la vez, el índice de Simpson (1-D) también indicó diferencias significativas entre regiones y cultivares ($p < 0,05$). La prueba de Tukey mostró que la diversidad estimada por este índice fue significativamente menor en TR en las regiones Pampeana y Noreste (0,29 y 0,33, respectivamente) que en TP y a la vez, la mayor diversidad se encontró en el Noroeste (0,58) en este mismo cultivar. En TP no se encontraron diferencias significativas en la diversidad indicada por este índice entre regiones.

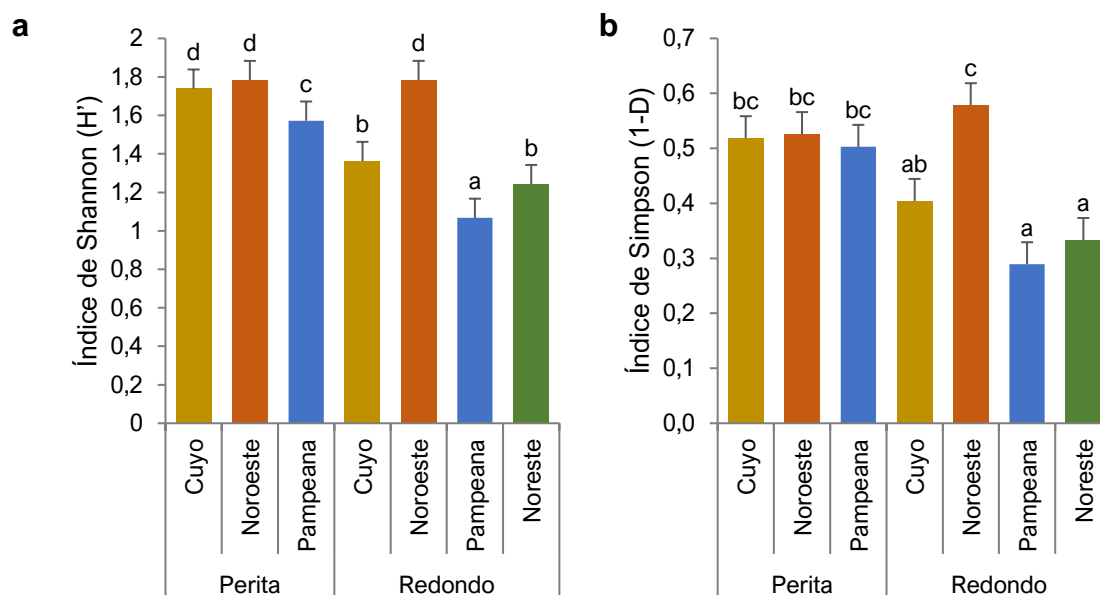


Figura II.16. a) Índice de Shannon (H') e b) índice de Simpson (1-D) de los aislamientos clasificados por cultivar y origen. Las líneas indican el desvío estándar y las letras los grupos con diferencias significativas para cada parámetro ($p < 0,05$).

II.4 Discusión

Los resultados del presente estudio revelaron que *Alternaria* fue el género fúngico predominante en frutos de tomate con lesiones evidentes, representando el 39% del total de los aislamientos identificados. Este hallazgo concuerda con diversos reportes previos que han identificado a *Alternaria* como el principal género fitopatógeno en cultivos de tomate, con frecuencias de aislamiento similares a las encontradas en este trabajo (Habib et al., 2021; Kokaeva et al., 2020; B. Rodrigues & Kakde, 2019; M. Rodrigues & Furlong, 2022). Adicionalmente, la identificación de otros géneros fúngicos mayoritarios como *Geotrichum*, *Fusarium*, *Mucor* y *Cladosporium* coincide con reportes previos sobre la composición de la micobiota en muestras de tomate a nivel global (Akbar et al., 2018; B. Rodrigues & Kakde, 2019; M. Rodrigues & Furlong, 2022; Sanzani et al., 2021).

Alternaria es el agente causal de la enfermedad conocida como tizón temprano o mancha negra del tomate, la cual se caracteriza por el desarrollo de lesiones necróticas circulares en hojas, tallos y frutos. Además, el tizón tardío en tomate es ocasionado por *Phytophthora infestans* (T. Adhikari et al., 2023; Anand et al., 2023; Pathania & Kumar, 2022; Roy et al., 2019). Por otro lado, Petrasch et al., (2019) y Silva

et al., (2021) indican que dentro de los hongos fitopatógenos más devastadores del cultivo de tomate se encuentran aquellos con estilos de vida necrotróficos, como *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizopus*, capaces de ocasionar podredumbres blandas que deterioran rápidamente los frutos. *Botrytis* provoca la podredumbre gris, produciendo lesiones acuosas que se expanden velozmente causando pudrición blanda. *Fusarium* puede infectar raíces y frutos, y *Rhizopus* origina podredumbre blanda en la poscosecha, al crecer agresivamente y segregar enzimas degradadoras de pared celular.

Al enfocar el análisis por cultivar, se reveló una mayor diversidad fúngica en el cultivar TP, del cual se obtuvieron 240 aislamientos a partir de 135 frutos (1,8 aislamientos/fruto). En contraste, del cultivar TR se aislaron 71 hongos de 48 frutos (1,5 aislamientos/fruto). Las diferencias entre cultivares se reflejan en los índices de diversidad (**Figura II.16**). Al comparar entre regiones, las mayores diversidades fúngicas se registraron en Noroeste y Cuyo para ambos cultivares. Estos resultados sugieren que la composición de las comunidades fúngicas estaría determinada por la interacción entre las condiciones agroclimáticas de cada zona y factores inherentes a los genotipos.

Las regiones evaluadas presentan condiciones agroclimáticas contrastantes durante los meses de producción de tomate. La región Noreste posee un clima subtropical árido y seco, con temperaturas máximas entre 14°C y 23°C de mayo a octubre, respectivamente. Cuyo tiene un clima árido, registrando temperaturas máximas promedio de 30°C en enero y 15°C en junio. La región Pampeana presenta un clima subtropical húmedo, con oscilaciones térmicas estacionales entre 26°C en noviembre y 14°C en julio. Por último, en la región Noroeste predomina un clima cálido subtropical de marzo a diciembre, con temperaturas máximas de 25°C a 30°C (Magyp, 2016; Secretaría de Agricultura, 2023; Servicio Meteorológico Nacional, 2023).

Al contrastar las temperaturas de las regiones con los rangos óptimos de crecimiento fúngico, se observan condiciones propicias en varias zonas para ciertos géneros. La región Noreste alcanza temperaturas de 25°C a 30°C en los meses de producción de tomate en esa región, coincidentes con el óptimo de 20-37°C para *Aspergillus* sp. reportado por Kumar et al., (2021), lo cual concuerda con la alta presencia de este

género en dicha región. La abundancia y frecuencia en todas las regiones del género *Alternaria* sp. se corresponden con su óptimo de crecimiento a 25°C y 90-100% de humedad descrito por Bijarniya et al. (2021). Para otros géneros prevalentes, como *Fusarium* sp. y *Geotrichum* sp., la temperatura óptima oscila entre 20-25°C.

La mayor diversidad fúngica en el cultivar TP comparado con TR podría deberse al uso diferencial de estas variedades, siendo TP mayoritariamente para procesamiento industrial y TR para consumo fresco, con modificaciones genéticas que prolongan su vida útil postcosecha (Bahillo et al., 2023). Un reporte publicado por el Gobierno de Mendoza (2022) informa que el 78% del cultivo de tomate en esa provincia se realiza a campo y un 22% bajo invernáculo o malla. La producción protegida busca controlar variables ambientales, asegurar rendimiento, su calidad y su vida útil (Zambrano, 2009). Los invernaderos requieren de instalaciones con una cobertura que protege los cultivos, favoreciendo el control y manejo de las variables que inciden en el mismo obteniendo mayores rendimientos, calidad, e ingreso a los mercados en contra estación o primicia para lograr mejores precios (Secretaría de Agricultura, 2023). Generalmente los cultivares para consumo en fresco, como TR, suelen ser los preferidos para la producción en invernadero, lo que podría explicar la menor diversidad fúngica observada en este cultivar.

Las variaciones genotípicas entre cultivares, sumado a las diferencias en las condiciones edafoclimáticas y prácticas agronómicas entre regiones y sistemas de cultivo, determinarían en conjunto la composición de las comunidades fúngicas en los frutos. Menor diversidad indicaría predominio de ciertos géneros adaptados a ambientes y huéspedes particulares (da Cruz Cabral et al., 2019a; Walker & White, 2017; Zambrano, 2009) .

Las temperaturas registradas podrían también promover la producción de micotoxinas por géneros toxicogénicos prevalentes, como *Alternaria* sp. (Sanzani et al., 2021). Según Lee et al. (2015) las condiciones óptimas para la producción de toxinas por especies de *Alternaria* varían dependiendo del tipo de toxina y especie. En general, se ha reportado que la temperatura óptima para la síntesis de toxinas como el alternariol, altertoxinas y ácido tenuazónico se encuentra alrededor de los 25-30°C. En cuanto a la actividad de agua (a_w), los niveles cercanos a 0,98 a_w promueven una

alta producción de estas micotoxinas. Si bien este estudio identificó a los agentes de deterioro fúngico solo a nivel de género, se requiere la caracterización de las especies predominantes mediante técnicas morfológicas, moleculares y químicas, para evaluar el riesgo micotoxicológico asociado a la contaminación fúngica de tomates, dada la capacidad toxicogénica de algunas especies de *Alternaria* (Habib et al., 2021; Rodrigues & Furlong, 2022).

II.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo presentan un relevamiento actualizado sobre los agentes causales de enfermedades fúngicas relevantes en cultivares de tomate en Argentina. Se caracterizaron los agentes fúngicos causantes de enfermedades en frutos de tomate procedentes de distintas regiones productoras del país. Se determinó que *Alternaria* representa el género fúngico claramente predominante en las muestras analizadas, denotando su importancia como fitopatógeno asociado al cultivo de tomate a nivel nacional. Asimismo, se identificaron otros géneros relevantes como *Geotrichum*, *Fusarium*, *Mucor* y *Cladosporium*.

En cuanto a la diversidad de los géneros fúngicos identificados, se observaron diferencias significativas entre cultivares y regiones. El tomate perita (TP) exhibió una mayor diversidad comparada con tomate redondo (TR). Las mayores diversidades se registraron en muestras provenientes de las regiones Noroeste y Cuyo.

Se resalta la necesidad de investigar los factores que modulan la diversidad fúngica y las condiciones que favorecen a los hongos fitopatógenos. El predominio de *Alternaria* sp. destaca la importancia de profundizar los conocimientos sobre este género fúngico a nivel local.

II.6 Bibliografía

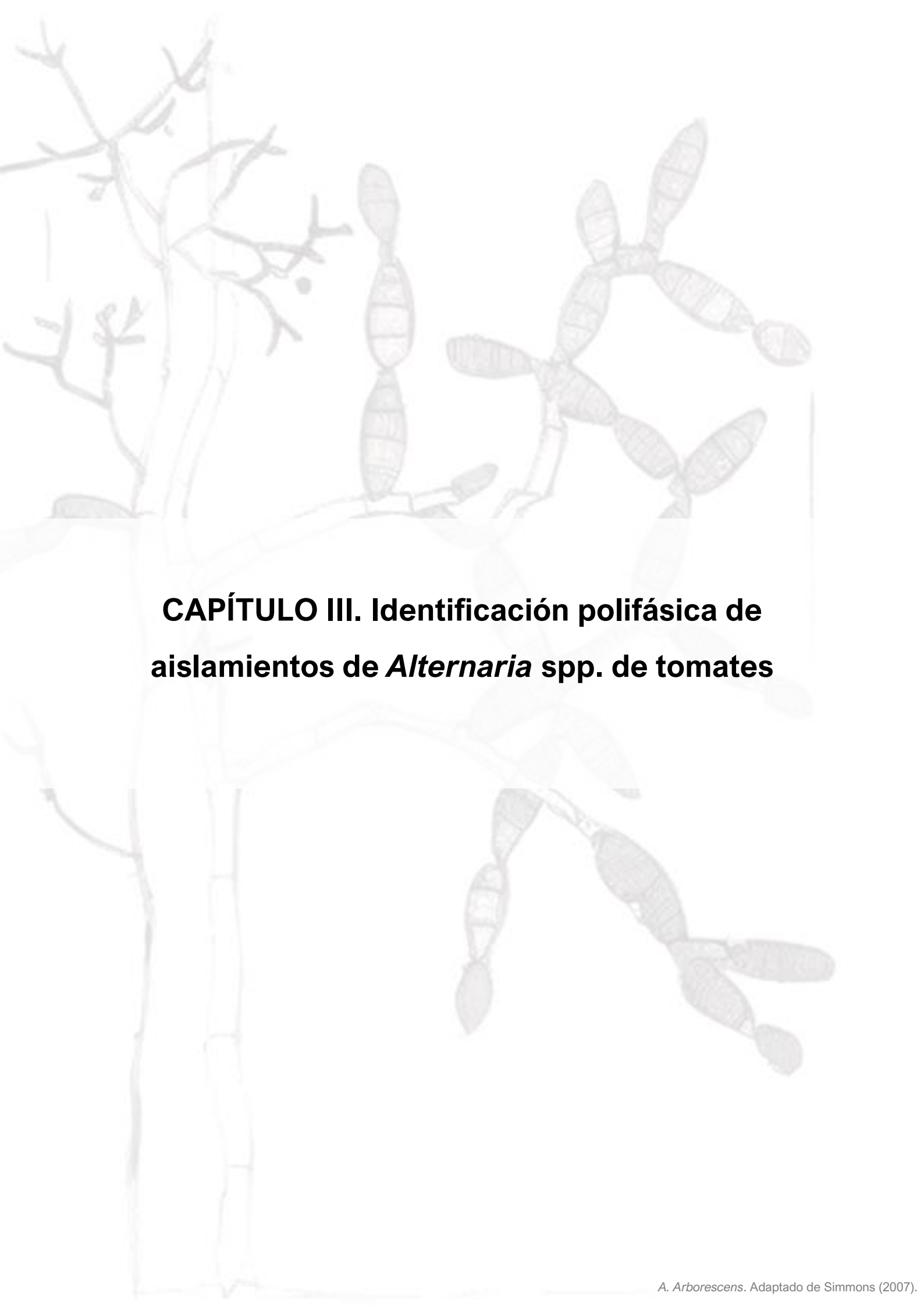
- Adhikari, P., Oh, Y., & Panthee, D. (2017). Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18102019>
- Adhikari, T., Siddique, M., Louws, F., Sim, S., & Panthee, D. (2023). Molecular mapping of quantitative trait loci for resistance to early blight in tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1135884>
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Science.
- Akbar, A., Hussain, S., Ullah, K., Fahim, M., & Ali, G. S. (2018). Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. *PLOS ONE*, 13(9), e0203613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203613>
- Aloi, F., Riolo, M., Sanzani, S. M., Mincuzzi, A., Ippolito, A., Siciliano, I., Pane, A., Gullino, M. L., & Cacciola, S. O. (2021). Characterization of *Alternaria* Species Associated with Heart Rot of Pomegranate Fruit. *Journal of Fungi*, 7(3), 172. <https://doi.org/10.3390/jof7030172>
- Anand, T., Senthilraja, G., & Senthilkumar, P. (2023). Biological management of Early blight disease of tomato caused by *Alternaria solani*. *Journal of Mycopathological research*, 61(1). <https://doi.org/10.57023/JMycR.61.1.2023.091>
- Bello, O., Habib, U., Odunayo, O., Opeyemi, A., Alafe, A., & Owaode Temilade. (2016). Microorganisms causing post-harvest tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit decay in Nigeria. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1), 374-377. <https://www.researchgate.net/publication/371957222>
- Bijarniya, P., Singh, M., Lakhran, L., & Nehra, D. (2021). Effect of Physical Parameters on the Growth and Sporulation of the *Alternaria alternata* in Coriander. *Chemical Science Review and Letters*, 10, 550-554.
- Bonfante, P., Venice, F., & Lanfranco, L. (2019). The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. *En Current Opinion in Microbiology* (Vol. 49, pp. 18-25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.004>
- Brdar, S., Panić, M., Hogeveen-Van Echtelt, E., Mensink, M., Grbović, Ž., Woltering, E., & Chauhan, A. (2021). Predicting sensitivity of recently harvested tomatoes and tomato sepals to future fungal infections. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02302-2>
- Chethana, K. W. T., Jayawardena, R. S., Chen, Y.-J., Konta, S., Tibpromma, S., Abeywickrama, P. D., Gomdola, D., Balasuriya, A., Xu, J., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2021). Diversity and Function of Appressoria. *Pathogens*, 10(6), 746. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060746>
- Colmán, A., Alves, J., Da Silva, M., & Barreto, R. (2018). *Phoma* destructiva causing blight of tomato plants: a new fungal threat for tomato plantations in Brazil? *Tropical Plant Pathology*, 43, 257-262. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0200-2>
- da Cruz Cabral, L., Rodríguez, A., Delgado, J., & Patriarca, A. (2019). Understanding the effect of postharvest tomato temperatures on two toxigenic *Alternaria* spp.

- strains: growth, mycotoxins and cell-wall integrity-related gene expression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(15), 6689-6695. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9950>
- da Cruz Cabral, L., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Fog Nielsen, K., & Patriarca, A. (2016). Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.005>
- de Oliveira Filho, J. G., Silva, G. da C., Cipriano, L., Gomes, M., & Egea, M. B. (2021). Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. *Journal of Food Science*, 86(8), 3341-3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- Dong, C., Wang, L., Li, Q., & Shang, Q. (2021). Epiphytic and Endophytic Fungal Communities of Tomato Plants. *Horticultural Plant Journal*, 7(1), 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.09.002>
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., & Manyes, L. (2017). *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2017/1569748>
- Gobierno de Mendoza. (2022). La superficie cultivada con tomate en Mendoza se incrementó 29,5% en el último año. <https://www.mendoza.gov.ar/prensa/la-superficie-cultivada-con-tomate-en-mendoza-se-incremento-un-295-en-el-ultimo-ano/>.
- Habib, W., Masiello, M., El Ghorayeb, R., Gerges, E., Susca, A., Meca, G., Quiles, J. M., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2021). Mycotoxin Profile and Phylogeny of Pathogenic *Alternaria* Species Isolated from Symptomatic Tomato Plants in Lebanon. *Toxins*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080513>
- Hamad, G. M., Mehany, T., Simal-Gandara, J., Abou-Alella, S., Esua, O. J., Abdel-Wahhab, M. A., & Hafez, E. E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, 144, 109350. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109350>
- Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.07.003>
- Kokaeva, L., Chudinova, E., Berezov, A., Yarmeeva, M., Balabko, P., Belosokhov, A., & Elansky, S. (2020). Fungal diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves and fruits in Russia. *Journal of Central European Agriculture*, 21(4), 809-816. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2869>
- Kuhnert, E., & Collemare, J. (2022). A genomic journey in the secondary metabolite diversity of fungal plant and insect pathogens: from functional to population genomics. *Current Opinion in Microbiology*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102178>
- Kumar, A., Pathak, H., Bhadauria, S., & Sudan, J. (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>

- Lee, H. B., Patriarca, A., & Magan, N. (2015). *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, 43(2), 93-106. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>
- Li, Y., Shao, Y., Zhu, Y., Chen, A., Qu, J., Gao, Y., Lu, S., Luo, P., & Mao, X. (2023). Temperature-dependent mycotoxins production investigation in *Alternaria* infected cherry by ultra-high performance liquid chromatography and Orbitrap high resolution mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 388, 110070. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110070>
- Liu, X., Gao, Y., Yang, H., Li, L., Jiang, Y., Li, Y., & Zheng, J. (2020). *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal community succession during cherry tomato fruit storage. *Food Microbiology*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103404>
- Magyp. (2016). Información técnica. Características de la región. <https://forestindustria.magyp.gob.ar/archivos/informacion-por-region/noa.pdf>
- Malik, M., Haider, S., Rehman, A., Rehman, S., Jamil, M., Naz, I., & Anees, M. (2022). Biological control of fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by chitinolytic bacterial strains. *Journal of Basic Microbiology*, 62(1), 48-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202100512>
- Martínez, C. (2012). Estadística y muestreo: Vol. 13ra Edición. Ecoe Ediciones. <https://books.google.com.ar/books?id=mfVeDwAAQBAJ>
- Mazumdar, P., Singh, P., Kethiravan, D., Ramathani, I., & Ramakrishnan, N. (2021). Late blight in tomato: insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. *Planta*, 253, 119. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03636-x>
- Molina, J., Tappi, S., Gherardi, M., de Flaviis, R., Laika, J., Peralta, Y., Paparella, A., & Chaves, C. (2023). Cold Atmospheric plasma treatments trigger changes in sun-dried tomatoes mycobiota by modifying the spore surface structure and hydrophobicity. *Food Control*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109453>
- Mulvihill, S. (2023). The Vegetable Garden Problem Solver Handbook: Identify and Manage Diseases and Other Common Problems on Edible Plants. Cool Springs Press. <https://books.google.com.ar/books?id=LZyaEAAAQBAJ>
- Olowe, O. M., Nicola, L., Dare Asemoloye, M., Olalekan Akanmu, A., & Oluranti Babalola, O. (2022). *Trichoderma*: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. *Microbiological Research*, 257, 126978. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126978>
- Pathania, S., & Kumar, M. (2022). Computational identification of key genes and regulatory miRNAs responsible for differential regulation of host-pathogen response during early and late blight diseases in tomato. *Plant Stress*, 5, 100098. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100098>
- Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Patriarca, A. (2022). Morphological and chemical characterization of *Alternaria* populations from apple fruit. *International Journal*

- of Food Microbiology, 379, 109842.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109842>
- Petrusch, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., van den Abeele, C., Papin, V., Fernandez-Acero, F. J., Knapp, S. J., & Blanco-Ulate, B. (2019). Infection Strategies Deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a Function of Tomato Fruit Ripening Stage. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00223>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (Ailsa D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed (pp. 297-345). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>
- Priyadi, M., & Upadhyay, P. (2021). Emerging Plant Diseases Under Changing Climate Scenario. En *Emerging Trends in Plant Pathology* (pp. 19-31). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4_2
- Rodrigues, B., & Kakde, U. (2019). Post harvest fungi associated with *Solanum lycopersicum* (Tomato) fruits collected from different markets of Mumbai. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 9, 52-60.
- Rodrigues, M., & Furlong, E. (2022). Fungal diseases and natural defense mechanisms of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101906>
- Roy, C., Akter, N., Sarkar, M., Pk, M., Begum, N., Zenat, E., & Jahan, M. (2019). Control of Early Blight of Tomato Caused by *Alternaria solani* and Screening of Tomato Varieties against the Pathogen. *The Open Microbiology Journal*, 13(1), 41-50. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010041>
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J., & Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. <https://books.google.com.ar/books?id=Az6-ZwEACAAJ>
- Sanzani, S., Djenane, F., Incerti, O., Admane, N., Mincuzzi, A., & Ippolito, A. (2021). Mycotoxigenic fungi contaminating greenhouse-grown tomato fruit and their alternative control. *Revista Europea de Fitopatología*, Volume 160, 287-300. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02240-9>
- Secretaría de Agricultura, G. y Pesca. (2023). Producción de tomate en Argentina. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/2022.
- Servicio Meteorológico Nacional. (2023). SMN. Características: Estadísticas de largo plazo. Valores Medios de Temperatura y Precipitación. <https://www.smn.gob.ar/estadisticas>
- Shannon, C., & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. The University of Illinois Press, 1-117.
- Silva, C., van den Abeele, C., Ortega-Salazar, I., Papin, V., Adaskaveg, J., Wang, D., Casteel, C., Seymour, G., & Blanco-Ulate, B. (2021). Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune

- responses. *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2696-2709.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa601>
- Simpson, E. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688.
<https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, D., & Sharma, R. (2018). Chapter 1 - Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management. En M. W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 1-52). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00001-7>
- Thole, V., Vain, P., Yang, R. Y., Almeida Barros da Silva, J., Enfissi, E. M. A., Nogueira, M., Price, E. J., Alseekh, S., Fernie, A. R., Fraser, P. D., Hanson, P., & Martin, C. (2020). Analysis of Tomato Post-Harvest Properties: Fruit Color, Shelf Life, and Fungal Susceptibility. *Current protocols in plant biology*, 5(2).
<https://doi.org/10.1002/CPPB.20108>
- Walker, G. M., & White, N. A. (2017). Introduction to Fungal Physiology. En *Fungi* (pp. 1-35). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119374312.ch1>
- You, Y., Zhou, Y., Duan, X., Mao, X., & Li, Y. (2022). Research progress on the application of different preservation methods for controlling fungi and toxins in fruit and vegetable. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-12.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2101982>
- Zambrano, A. (2009). Manual del cultivo de tomate en invernadero. En https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2196/43989_55756.pdf?sequence=1 (Vol. 1).

A faint, light-colored illustration of a tomato plant branch with several small, oval-shaped fruiting bodies (sclerotia) attached to the stem and leaves. The fruiting bodies are dark and have a segmented, ribbed appearance. The background is a light, textured gray.

CAPÍTULO III. Identificación polifásica de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates

III.1 Introducción

En el Capítulo II se demostró la abundancia del género *Alternaria* como agente causal de deterioro fúngico en tomates de los cultivares perita y redondo. Dada la reconocida capacidad toxicogénica de las especies de *Alternaria* (Nagda & Meena, 2023), resulta fundamental profundizar en la caracterización de las especies asociadas al cultivo de tomate en Argentina (da Cruz Cabral et al., 2019b).

El género *Alternaria* comprende cerca de 300 especies de hongos ubicuos, dentro de la familia *Pleosporaceae*. Actúan como patógenos o saprófitos de una amplia variedad de plantas a nivel pre y poscosecha, causando importantes pérdidas económicas en diversos cultivos (DeMers, 2022). En Argentina se ha reportado la presencia de *Alternaria* spp. en trigo, cebada, tomate, pimiento, arándano, manzana, nueces, peras y cítricos, entre otros (Andersen et al., 2015; Castañares et al., 2021; da Cruz Cabral et al., 2016, 2017; Patriarca, 2016). Dentro del género *Alternaria*, las especies de esporas pequeñas revisten particular importancia en inocuidad alimentaria por su alta frecuencia, amplia distribución en cultivos y capacidad de producir micotoxinas como ácido tenuazónico, alternariol, alternariol monometil éter, altenueno y altertoxinas, entre otros metabolitos secundarios potencialmente tóxicos (Aichinger et al., 2021c; Andersen et al., 2015; Patriarca et al., 2019).

Históricamente, la taxonomía de *Alternaria* a nivel de especie se basaba únicamente en análisis de características morfológicas macro y microscópicas, como tamaño y forma de conidios, patrones de ramificación de cadenas de esporas y aspecto de colonias en medios de cultivo estandarizados (Aloi et al., 2021b; Dandago et al., 2023; Simmons, 2007). Sin embargo, los rasgos fenotípicos son susceptibles a variaciones por factores ambientales y de cultivo, por lo que actualmente se emplean métodos moleculares complementarios para mejorar la resolución taxonómica de especies (Lücking et al., 2020; Ma et al., 2021; Ramezani et al., 2019). Estos incluyen secuenciación de regiones genómicas conservadas como ITS (Dandago et al., 2023; El-Ganainy, 2021; Mohammadi & Bahramikia, 2019; Saleem & El-Shahir, 2022), endoPG, rpb2, tef 1 (Woudenberg et al., 2015) y análisis filogenéticos multilocus (Dandago et al., 2023; Dettman & Eggertson, 2022; Somma et al., 2019). Asimismo, la caracterización del perfil de metabolitos secundarios mediante técnicas

cromatográficas y espectrométricas permite examinar la diversidad química de las poblaciones de *Alternaria* en diferentes cultivos, constituyendo información valiosa sobre su potencial toxicológico y riesgo alimentario (Erkmen, 2022; Gao et al., 2021).

En Argentina, la mayor parte de los aislamientos de *Alternaria* en alimentos corresponden a especies de esporas pequeñas (<60 µm) con alto potencial toxicogénico, representando un riesgo a la salud pública. En estudios previos sobre trigo, tomate, pimientos, nueces, manzanas, peras y arándanos se emplearon técnicas morfológicas, de biología molecular (PCR, secuenciación) y química analítica (HPLC, LC-MS) para caracterizar *Alternaria* spp. (Patriarca et al., 2019; Pavicich et al., 2022; Somma et al., 2011a; Vaquera et al., 2016). Sin embargo, la información sobre diversidad genética y capacidad metabólica de estas poblaciones fúngicas es aún escasa (Andersen et al., 2015).

Si bien se han logrado avances en las herramientas disponibles para la identificación de *Alternaria*, esta sigue representando desafíos dado que los métodos morfológicos son susceptibles a variaciones ambientales y los métodos moleculares requieren mejoras en la curación de bases de datos de secuencias y documentación de la variabilidad intra-específica (Lücking et al., 2020; Twarużek et al., 2021). Por ello, se promueve un abordaje polifásico que combine diferentes líneas de evidencia morfológicas, moleculares y químicas para una caracterización integral de las especies de *Alternaria* (Andersen et al., 2009; Blagojević et al., 2020; da Cruz Cabral et al., 2017; Jones, 2012).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue caracterizar los aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos previamente a partir de frutos de tomate mediante un abordaje polifásico, involucrando técnicas morfológicas, moleculares y químicas, para lograr así una segregación robusta de los aislamientos en grupos taxonómicos.

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Muestras

Se analizaron un total de 120 aislamientos de *Alternaria* spp., los cuales fueron obtenidos previamente a partir de muestras de tomate provenientes de diferentes regiones productoras de Argentina, como se detalla en el Capítulo II. La **Tabla III.1**

muestra la distribución de los aislamientos de *Alternaria* spp. seleccionados según el tipo de cultivar y origen de los tomates.

Tabla III.1. Número de aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos a partir de tomates de diferentes cultivares y origen en Argentina seleccionados para su caracterización.

		Cultivar		Total
		Perita	Redondo	
Región de origen	Cuyo	29	5	34
	Noroeste	41	8	49
	Pampeana	29	6	35
	Noreste		2	2
Total		99	21	120

III.2.2 Identificación morfológica

La identificación morfológica de los aislamientos se realizó siguiendo la metodología ilustrada en la **Figura III.1**. Los aislamientos se transfirieron a placas de 55 mm con medio V8® y se incubaron en ciclos de 8 horas de luz blanca fluorescente y 16 horas de oscuridad a 23°C durante 7 días. Luego, se realizaron cultivos monospóricos en placas de 90 mm con medio Agar Papa Zanahoria (APZ). Para ello, con un asa estéril, se distribuyeron 5 gotas de agua destilada estéril en cada placa. Se tomó una asada de micelio y conidios de la placa de V8® y se descargó sobre la primera gota; consecutivamente se distribuyó en las 4 gotas restantes. Las placas se incubaron a 25°C por 24 horas. Utilizando una lupa binocular estereoscópica (70x), se transfirió un conidio con tubos germinativos a una nueva placa de 55 mm con APZ y se incubó a 23°C durante 7 días en ciclos de luz (8 h luz blanca/16 h oscuridad). Este procedimiento garantizó la obtención de cultivos axénicos. Finalmente, una porción de micelio y conidios de la nueva colonia se transfirió a una placa de 90 mm inoculando en 3 puntos e incubó a 23°C con ciclos de luz por 7 días. Transcurrido este tiempo, se procedió a la identificación morfológica. Siguiendo las claves taxonómicas de Simmons (2007), se observaron características de las colonias (color, textura, crecimiento y anillos de esporulación) y el patrón de esporulación (70x). Además, se realizaron preparados microscópicos montados con ácido láctico y usando cinta adhesiva transparente para levantar el material directamente de la placa y fijarlo en el portaobjetos preservando así intactos los patrones tridimensionales de esporulación.

Usando un microscopio (Carl Zeiss Axiostar serie 41351) se observaron características de conidióforos primarios y secundarios, forma, color, tamaño y ornamentación de conidios (400x y 1000x).

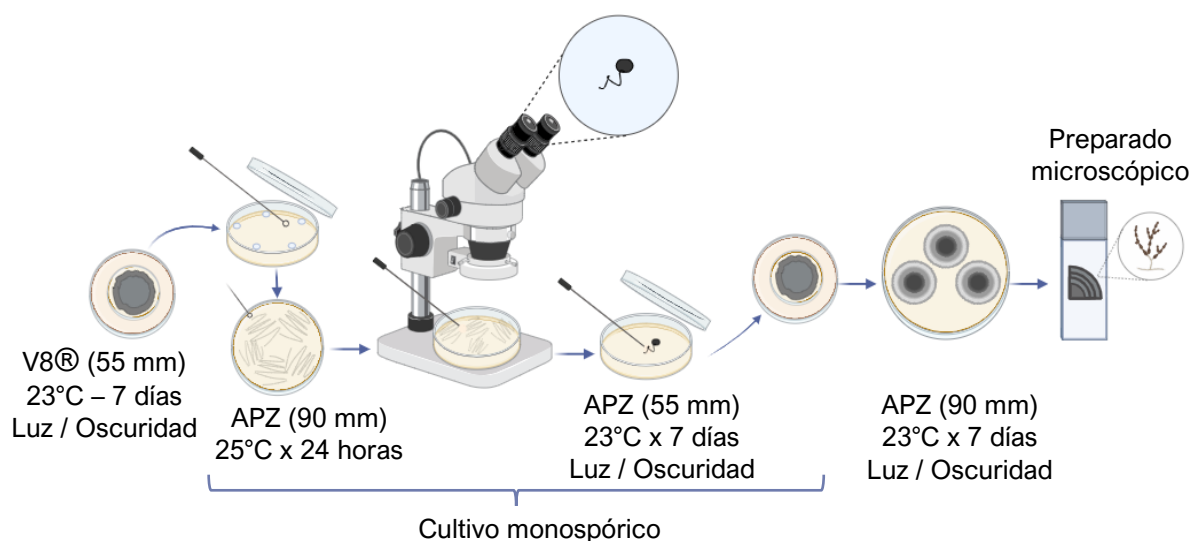


Figura III.1. Esquema del procedimiento de obtención de cultivos monospóricos de *Alternaria* spp. para la identificación morfológica a nivel de especie.

III.2.3 Identificación molecular

De los 120 aislamientos, se tomó una submuestra de 50 aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate. Además, se utilizaron como referencia cepas patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tenuissima* (EGS 34015), *A. alternata* (EGS 34016) y *A. infectoria* (EGS 27198 ex type).

III.2.3.1 Extracción de ADN

Los aislamientos seleccionados se transfirieron a placas de 55 mm que contenían medio Agar Papa Zanahoria (APZ) y se incubaron a 25°C durante 5 días en condiciones de oscuridad para evitar la esporulación y favorecer el desarrollo de micelio. El ADN total se aisló de aproximadamente 50 mg de micelio fresco en crecimiento activo, que se retiró de la placa raspando de forma superficial con la ayuda de un bisturí y fue posteriormente molido en un microtubo de 1,5 ml con un mortero de propileno, utilizando el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™ (ZymoResearch, Irvine, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN

aislado se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) y las muestras se diluyeron con agua miliQ hasta una concentración final de 3 ng/μl.

III.2.3.2 Amplificación de la región génica ASA-05 (*Alternaria* Sección *Alternaria*)

Una región del gen se amplificó utilizando los marcadores moleculares ASA_g1627_F54 (5' AGCTCGGTCACCAGAATACATG 3') y ASA_g1627_R557 (5' CATTTGGTTCGGTCCGCAAGT 3') según Dettman & Eggertson, (2022).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Modelo TC1000-G marca Dlab) sobre un volumen total de 50 μl que contenía 5 μl de buffer de PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, cada uno de los dNTPs 0,2 mM, 0,025 U/μl de Taq DNA Polimerasa recombinante (Inbio Highway), 0,2 nM de cada marcador (Invitrogen™) y 3 ng de ADN genómico, llevado a volumen con agua miliQ.

El programa de PCR empezó con una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 30 s, annealing durante 30 s a 58°C, una extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-Boric-EDTA (TBE) teñido con GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, CA) con transiluminación UV. La purificación y secuenciación de los productos de PCR fue realizada por Macrogen Inc (Seúl, Corea) utilizando los mismos cebadores que para la amplificación.

III.2.3.2.a Procesamiento de datos

Se verificaron los electroferogramas de ambas hebras, se ensamblaron las secuencias con el programa Vector NTI™ Advance 10 (Invitrogen) y se organizaron en una matriz que también incluía secuencias de *Alternaria* spp. obtenidas de Genbank (Dettman & Eggertson, 2022). La matriz fue alineada utilizando el paquete de programas BioEdit v1994.10.3 de Clustal W (Thompson et al., 1994) asignando un costo de 15 a la apertura de la brecha y 6 a la extensión de la brecha. Los análisis filogenéticos de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) se realizaron en MEGA 7.0 (Tamura et al., 2013) y análisis bayesianos en MrBayes 3.2. Los mejores modelos evolutivos para cada conjunto de datos se estimaron con MEGA 7.0. Para verificar la convergencia de las cadenas de análisis del MrBayes se utilizó el programa Tracer

v1.7.1 (Rambaut et al., 2018) . La topología del árbol obtenido se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut & Drummond, 2012).

III.2.4 Caracterización química

El análisis químico se llevó a cabo sobre la submuestra empleada previamente para la identificación molecular.

III.2.4.1 Producción y extracción de metabolitos secundarios

Los aislamientos de *Alternaria* spp. fueron inoculados transfiriendo porciones de micelio e inoculando en tres puntos en placas de Petri conteniendo agar Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES) (Samson et al., 2010). Las placas inoculadas se incubaron durante 14 días en condiciones de oscuridad a una temperatura controlada de 25°C. Transcurrido este periodo, se procedió a la extracción de los metabolitos siguiendo un protocolo específico para metabolitos de *Alternaria* modificado de Andersen et al. (2015). Brevemente, el proceso consistió en cortar dos discos de agar de 6 mm de diámetro provenientes del centro de cada colonia fúngica desarrollada (6 en total), los cuales se depositaron en viales de 2 ml. Se agregó 1 ml de una solución de acetato de etilo al 1% de ácido fórmico (v/v) a cada vial, y posteriormente fueron sometidos a ultrasonificación durante 60 minutos para favorecer la difusión de los metabolitos al solvente orgánico. Los extractos resultantes se transfirieron a viales limpios, donde se eliminó el disolvente mediante evaporación bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, los extractos secos se resuspendieron en 400 µl de metanol grado HPLC, se sometieron nuevamente a ultrasonificación y se filtraron a través de filtros de PTFE de 0,45 µm previo a su análisis. Los extractos así purificados se conservaron a -18°C hasta la determinación del perfil de metabolitos mediante técnicas analíticas instrumentales.

III.2.4.2 Análisis de metabolitos secundarios por UHPLC-DAD-HRMS

El análisis metabolómico se realizó en colaboración con la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU). La separación cromatográfica de los metabolitos se llevó a cabo mediante UPLC acoplado a detección por UV/Vis y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). La separación cromatográfica de metabolitos se efectuó mediante un sistema UPLC Agilent Infinity 1290 acoplado a un detector de arreglo de diodos y a un equipo de MS/MS de alta resolución Agilent 6545 QTOF. Se utilizó una columna

Agilent Poroshell 120 fenil-hexilo que se mantuvo a 60°C. Los metabolitos fueron eluidos mediante un gradiente lineal de 10-100% acetonitrilo en 15 minutos. Tanto la fase móvil acuosa como orgánica fueron ajustadas a pH ácido con ácido fórmico 20 mM. Los espectros UV/Vis de los picos cromatográficos fueron registrados en un rango de 200-700 nm. Los datos de MS fueron adquiridos en modo de ionización dual ESI+ y ESI-, con una tasa de 10 espectros/s. El análisis de datos de alta resolución incluyó: i) desreplicación agresiva para todos los iones y aductos de composición elemental conocida descripta para *Alternaria* y géneros relacionados; ii) verificación de la composición elemental por masa exacta, radios isotópicos y frecuencia isotópica; iii) comparación de los espectros de MS/HRMS contra base de datos de 2000 metabolitos de *Alternaria* y géneros relacionados; iv) confirmación de la identificación mediante comparación de los datos de UV-Vis con datos de la librería interna de la DTU. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software MassHunter Quantitative Analysis.

III.2.4.2.a Procesamiento de datos

Las áreas bajo cada pico cromatográfico correspondientes a los metabolitos identificados para cada cepa fueron transferidas a una hoja de datos de Microsoft Excel. Se construyó un mapa de calor con opciones de agrupamiento y dendrograma utilizando RStudio 2023.06.1+524.

III.3 Resultados

III.3.1 Identificación morfológica

Alternaria fue el género fúngico que se aisló con mayor abundancia a partir de los frutos de tomate muestreados, tal como se evidenció en la Figura II.14 del Capítulo II. Un total de 120 aislamientos monospóricos de *Alternaria* obtenidos en dicho muestreo fueron examinados morfológicamente. La caracterización detallada de rasgos distintivos permitió categorizar los aislamientos en tres grupos morfoespecie, de acuerdo con lo establecido en la taxonomía de Simmons (2007) para el género *Alternaria*. Las especies identificadas pertenecen a la sección II de *Alternaria*, correspondiente al grupo de esporas pequeñas (longitud media de conidios <50(-60) µm).

Específicamente, *A. tenuissima* fue la especie identificada en mayor número de aislamientos (46, 38,3% del total), seguido por *A. tomaticola* con 31 aislamientos (25,8%), *A. arborescens* con 27 (22,5%) y finalmente *A. alternata* con 16 aislamientos (13,3%). En la **Figura III.2** se presenta en detalle el número de aislamientos de *Alternaria* spp. identificados y diferenciados tanto por cultivar como por región de origen. Allí se evidencia que ciertas morfoespecies predominaron en algunas zonas; por ejemplo, 39 de los 46 aislamientos identificados como *A. tenuissima* se obtuvieron de muestras del cultivar perita, especialmente 16 procedentes de la región Noroeste. Asimismo, 27 de los 31 aislamientos determinados de *A. tomaticola* también provinieron del cultivar Perita, en su mayoría provenientes de la misma región. Por otra parte, en tomate redondo, la especie más frecuente fue *A. arborescens*, con 11 aislamientos, mientras que *A. tenuissima* ocupó el segundo lugar con 7.

En los **Anexos II y III**, se muestra en detalle la distribución de las morfoespecies discriminadas tanto por cultivares como regiones de procedencia.

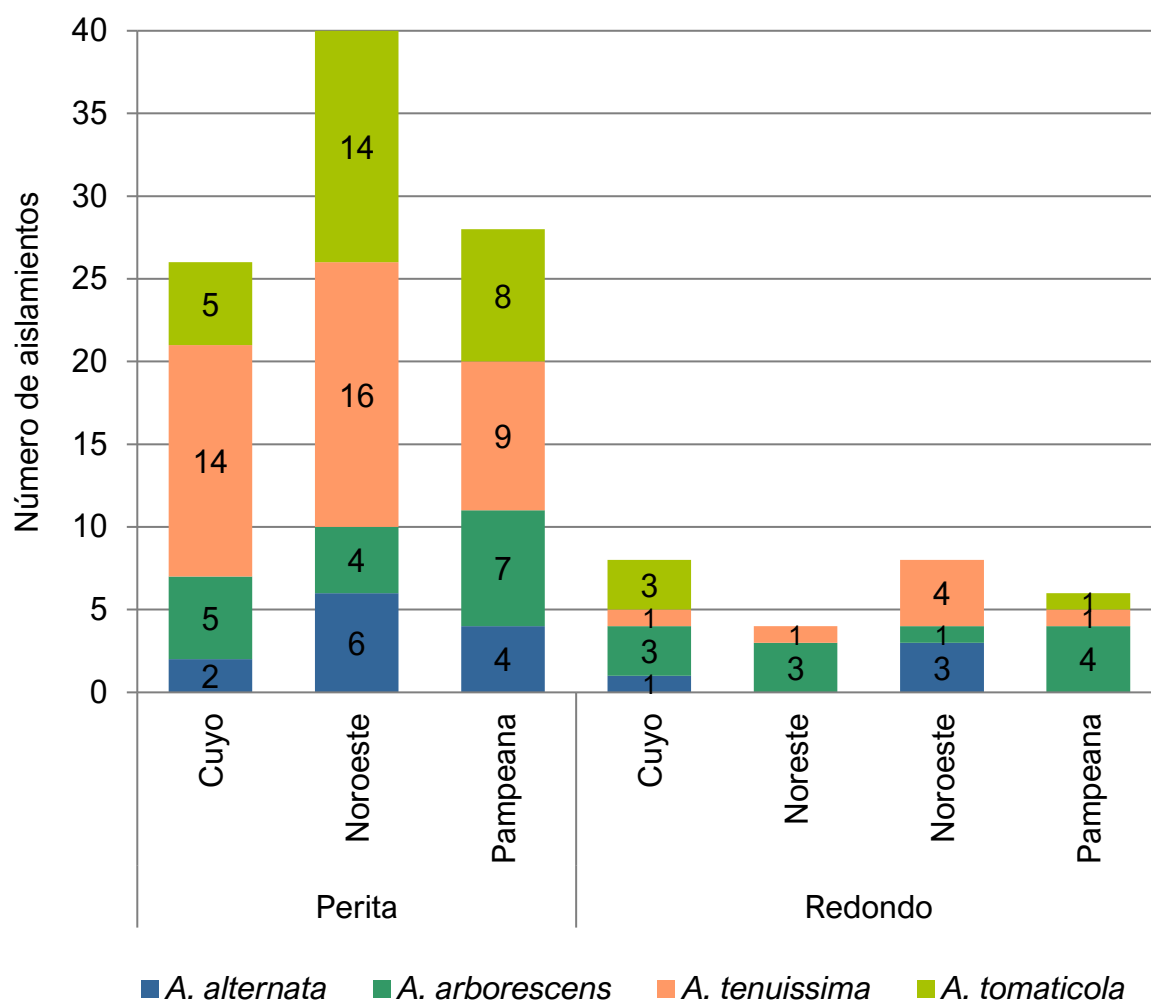


Figura III.2. Número de aislamientos (n=120) de cada especie de *Alternaria* identificada en cultivares de tomate perita y redondo provenientes de diferentes regiones de Argentina.

III.3.1.1 Descripción morfológica de especies de *Alternaria* spp.

III.3.1.1.a *Alternaria alternata*

La morfoespecie *A. alternata*, perteneciente al grupo “J” según la taxonomía de Simmons (2007), presentó variabilidad tanto macroscópica como microscópica entre los aislamientos categorizados dentro del mismo. En cuanto a las características macroscópicas (**Figura III.3.A-E**), en Agar V8® se observaron colonias de color negro y textura velutinosa; en APZ fueron grandes, con múltiples anillos concéntricos, oscuras y de aspecto pulverulento; en DRYES las colonias fueron de color verde oscuro, velutinosa; gris oscuro en MEA, y gris con tonalidades amarronadas en DG18. Respecto a las estructuras microscópicas distintivas, su patrón de esporulación (**Figura III.3.F-G**) presentó abundante grado de ramificación y conidióforos primarios

cortos (40-70 μm), con cadenas de conidios constituídas por 4-10 unidades. La morfología de los conidios (**Figura III.3.H-I**) varió desde formas elipsoidales grises de paredes lisas, hasta ovoidales de color oscuro y paredes rugosas. Frecuentemente se observaron también conidióforos secundarios originados a partir del cuerpo de los conidios.

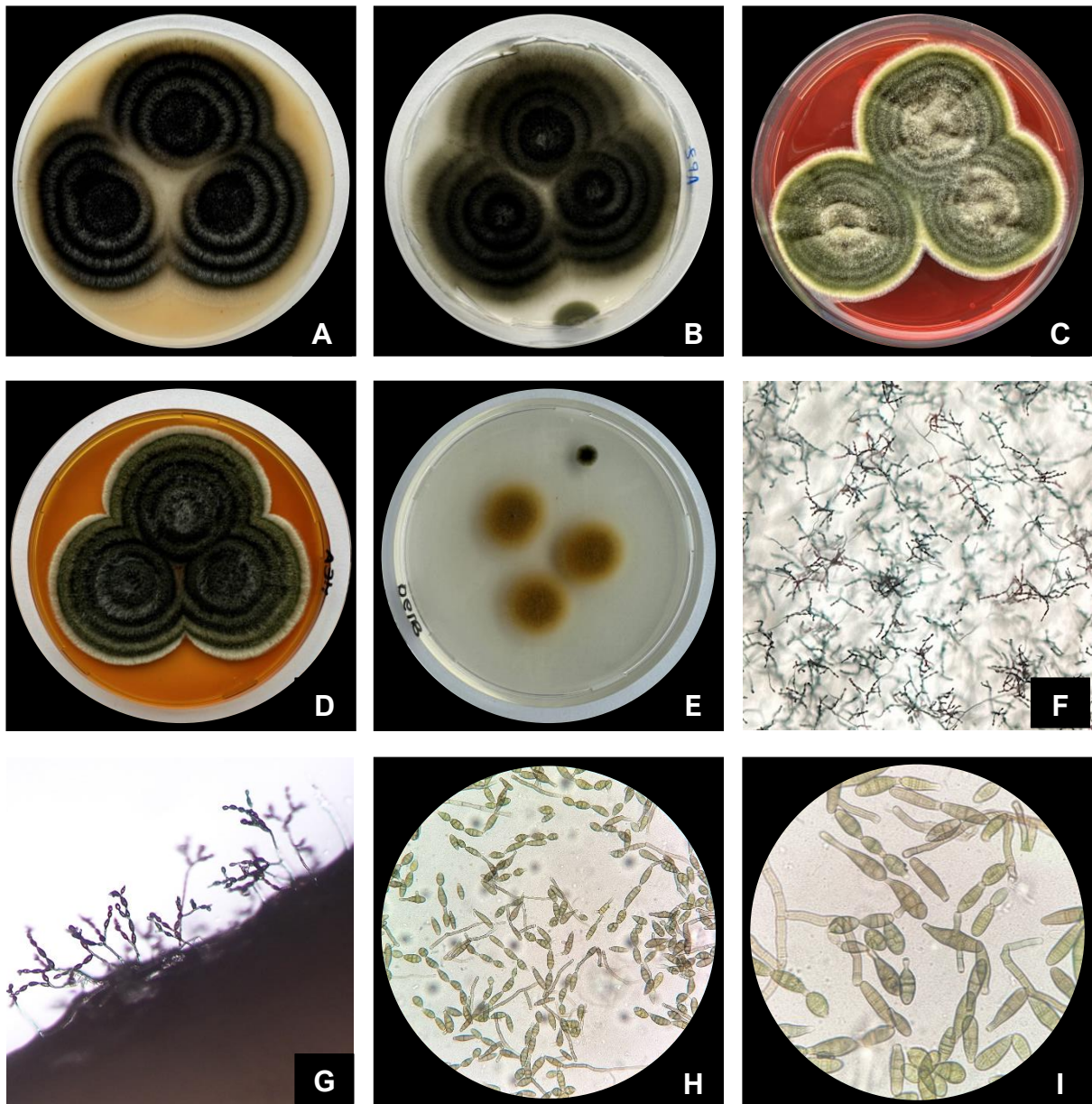


Figura III.3. Características macro y microscópicas distintivas de *A. alternata* en diferentes medios de cultivo. **A-E.** Colonias típicas en: **A.** Agar V8®; **B.** APZ; **C.** DRYES; **D.** MEA; **E.** DG18. **F-G.** Patrón de esporulación en APZ observado a: **F.** 25x; **G.** 100x. **H-I.** Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: **H.** 400x; **I.** 1000x.

III.3.1.1.b *Alternaria arborescens*

La morfoespecie *A. arborescens*, perteneciente al grupo “L” según la taxonomía de Simmons (2007), presentó características distintivas tanto macroscópicas como microscópicas. Respecto a las estructuras macroscópicas en diferentes medios de cultivo (**Figura III.4.A-E**), en Agar V8® se observaron colonias negras con micelio aéreo grisáceo; en APZ las colonias fueron oscuras con múltiples anillos concéntricos y micelio aéreo; mientras que en DRYES se registraron colonias de color verde oscuro con textura velutinoso. Por otro lado, en MEA las colonias fueron gris oscuro con centro negro y en DG18 con tonalidades anaranjado-marrones. En cuanto a las estructuras microscópicas, los conidióforos primarios fueron largos (200-500 μm) y presentaron una disposición arbórea de las cadenas de conidios, con abundantes ramificaciones debidas a la presencia de conidióforos secundarios geniculados (**Figura III.4.F-G**). Los conidios en este grupo morfoespecie fueron distintivamente ovoides, de color oscuro y paredes rugosas (**Figura III.4.H-I**).

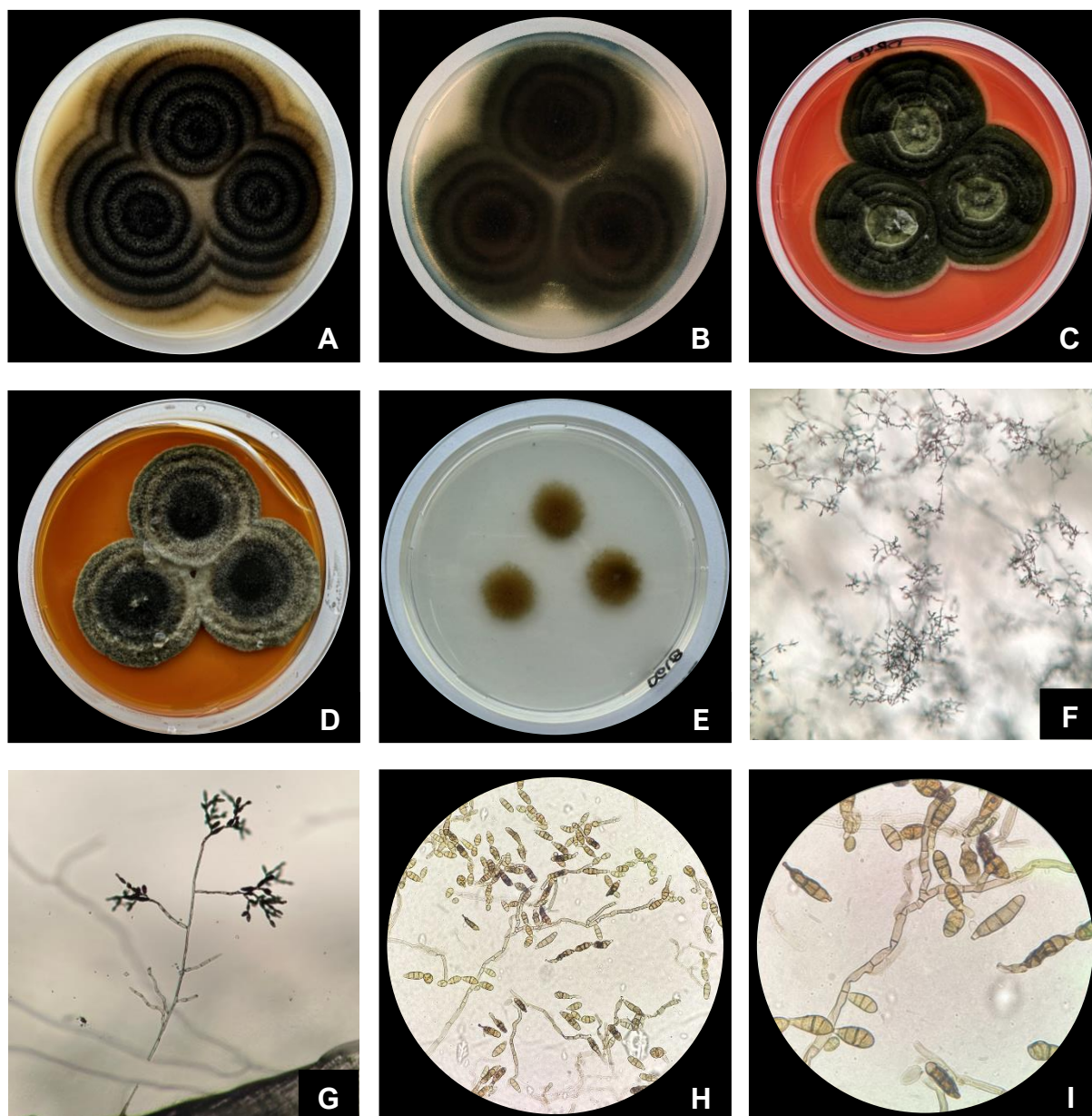


Figura III.4. Características macro y microscópicas distintivas de *A. arborescens* en diferentes medios de cultivo. **A-E.** Colonias típicas en: **A.** Agar V8®; **B.** APZ; **C.** DRYES; **D.** MEA; **E.** DG18. **F-G.** Patrón de esporulación en APZ observado a: **F.** 15x; **G.** 100x. **H-I.** Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: **H.** 400x; **I.** 1000x.

III.3.1.1.c *Alternaria tenuissima*

El grupo morfoespecie *A. tenuissima*, perteneciente al grupo “H” según la taxonomía de Simmons (2007), presentó características macro y microscópicas distintivas. A nivel macroscópico (**Figura III.5.A-E**), en Agar V8® las colonias fueron de color gris y aspecto vellosa; mientras que en APZ se observaron colonias grises con anillos concéntricos moderadamente definidos. Por otro lado, en DRYES las colonias fueron verde claras a grisáceas y de textura flocosa; en tanto que en MEA se registró coloración gris verdosa de aspecto algodonoso y en DG18 marrón con bordes irregulares. Microscópicamente (**Figura III.5.F-I**), este grupo morfoespecie presentó cadenas largas de 6-10 conidios en conidióforos cortos (32-45 μm) y escasos conidióforos secundarios basales de pequeño tamaño. Los conidios fueron mayoritariamente de forma elipsoidal, color grisáceo a marrón claro y paredes lisas.

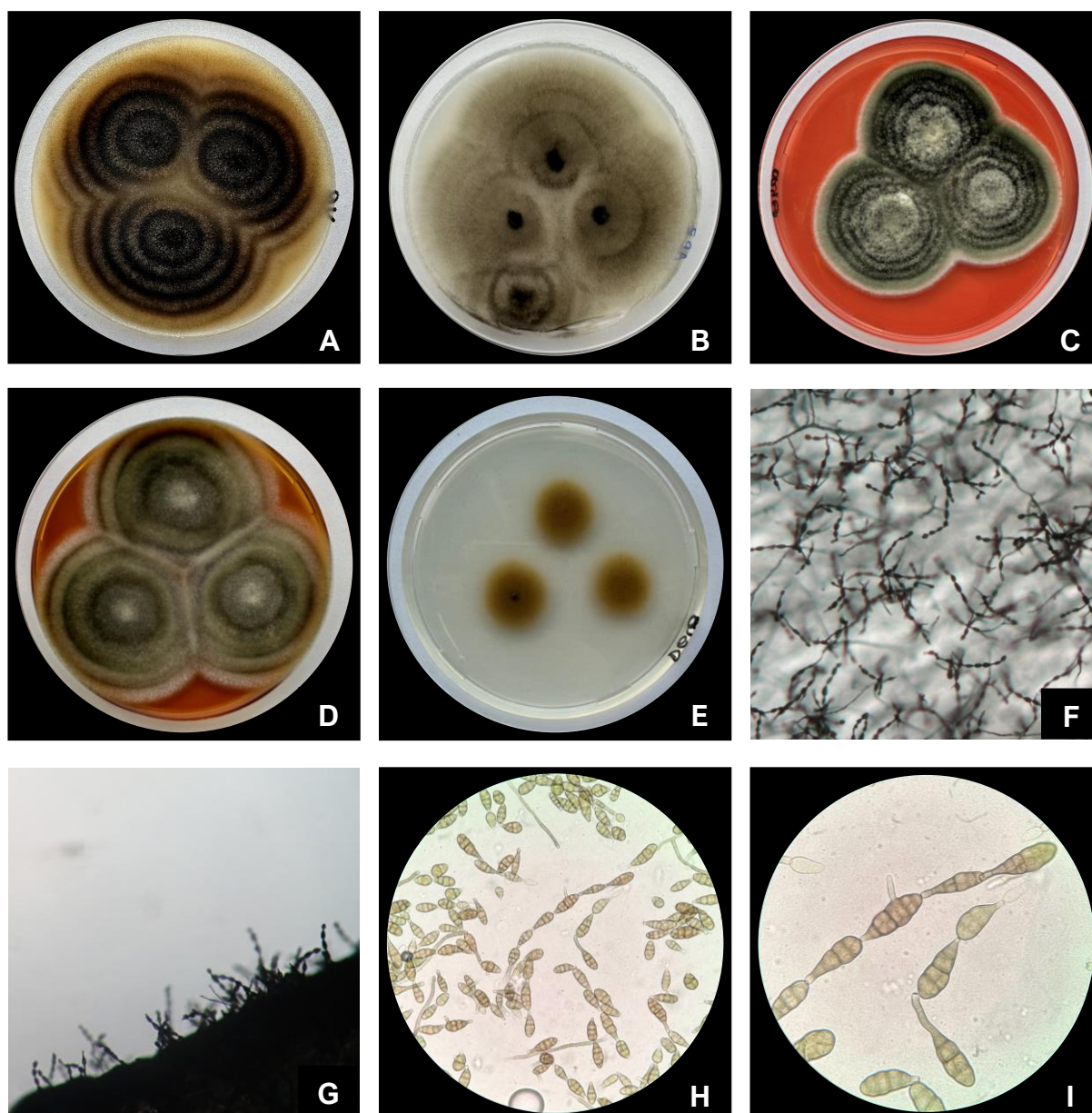


Figura III.5. Características macro y microscópicas distintivas de *A. tenuissima* en diferentes medios de cultivo. **A-E.** Colonias típicas en: **A.** Agar V8®; **B.** APZ; **C.** DRYES; **D.** MEA; **E.** DG18. **F-G.** Patrón de esporulación en APZ observado a: **F.** 25x; **G.** 100x. **H-I.** Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: **H.** 400x; **I.** 1000x.

III.3.1.1.d *Alternaria tomaticola*

Al igual que *A. tenuissima*, *A. tomaticola* pertenece al morfogrupo “H” de Simmons (2007). Esta morfoespecie presentó características distintivas macro y microscópicas. Respecto a las estructuras macroscópicas (**Figura III.6.A-E**), en Agar V8® se observaron colonias oscuras de aspecto vellosas; mientras que en APZ fueron gris verdoso oscuro y ligeramente vellosas. En DRYES las colonias se tornaron verde grisáceo con centro más claro; en MEA, gris de textura algodonosa; y en DG18 con coloración amarronada clara. Microscópicamente (**Figura III.6 F-I**), la esporulación se caracterizó por abundante micelio aéreo y cadenas simples de 10-15 conidios sobre conidióforos largos (45-70 μm), con 1-2 conidióforos secundarios. Las cadenas jóvenes presentaron conidios pequeños próximos a la base, mientras que en cadenas maduras se originó ocasionalmente una ramificación corta. Los conidios fueron mayoritariamente elipsoidales u ovoides, con color grisáceo a marrón claro.

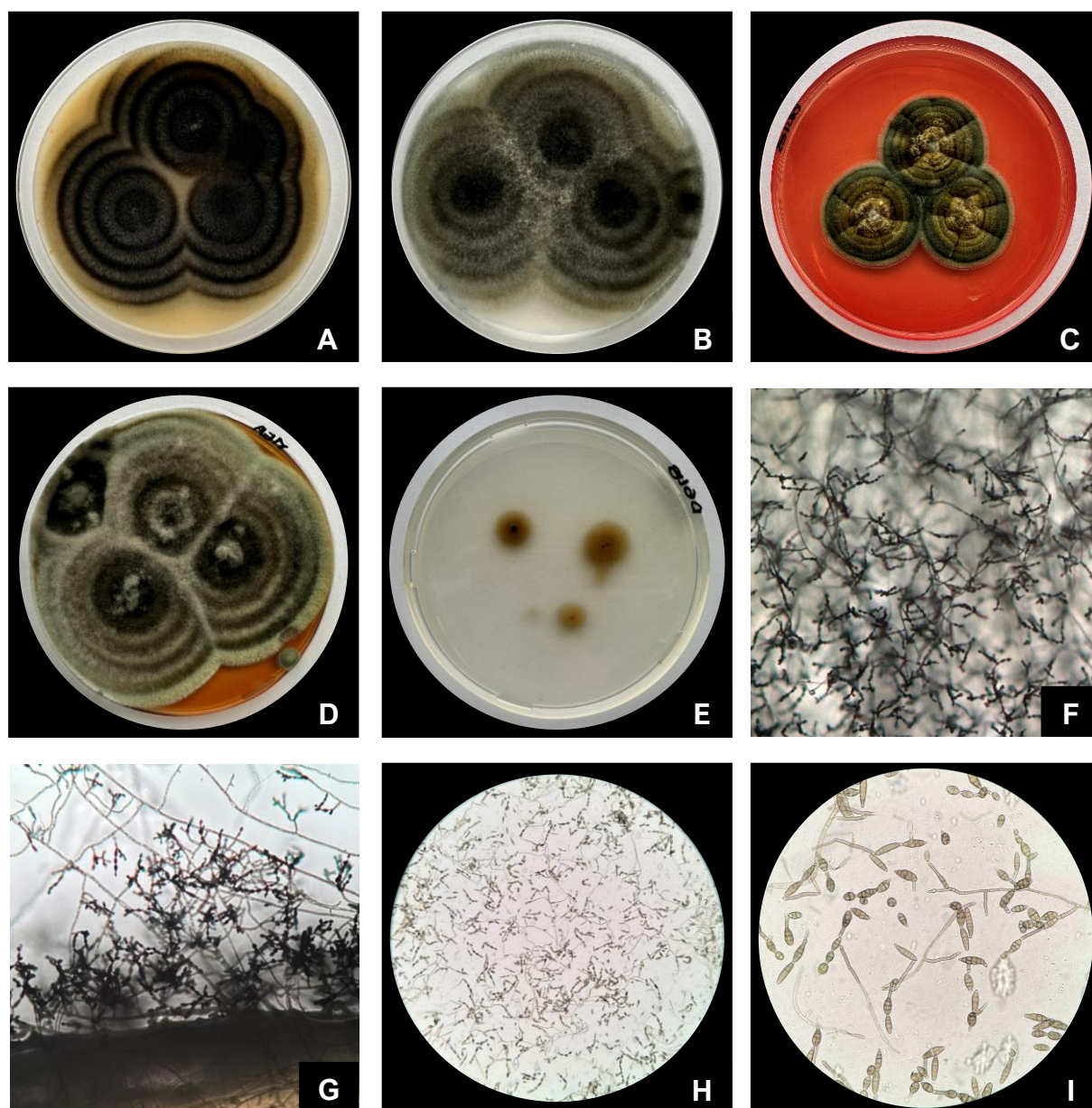


Figura III.6. Características macro y microscópicas distintivas de *A. tomaticola* en diferentes medios de cultivo. **A-E.** Colonias típicas en: **A.** Agar V8®; **B.** APZ; **C.** DRYES; **D.** MEA; **E.** DG18. **F-G.** Patrón de esporulación en APZ observado a: **F.** 20x; **G.** 50x. **H-I.** Morfología de conidios en preparados de APZ teñidos con ácido láctico vistos a: **H.** 100x; **I.** 400x.

III.3.2 Identificación molecular

Complementando la caracterización morfológica, se seleccionaron 50 aislamientos (Anexo IV). monospóricos de *Alternaria* spp. de tomate para su tipificación molecular mediante secuenciación de la región génica ASA-05. Los aislamientos habían sido designados preliminarmente dentro de las morfoespecies *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. tomaticola* según sus rasgos macro y microscópicos distintivos. Adicionalmente, como controles de referencia se incluyeron en los análisis moleculares cepas patrón de las especies *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tenuissima* (EGS 3445), *A. alternata* (EGS 34016) y *A. infectoria* (EGS 2795 ex type).

III.3.2.1 Amplificación de la región génica ASA-05

Se amplificó la región génica ASA-05 a partir del ADN de los 50 aislamientos de *Alternaria* spp. y las cuatro cepas patrón. Los tamaños de los fragmentos determinados por electroforesis fueron de aproximadamente 600 ± 100 pb. En la **Figura III.7** se muestra el gel de agarosa de las cepas de colección y en la **Figura III.8** se muestran los 50 aislamientos de *Alternaria* spp.

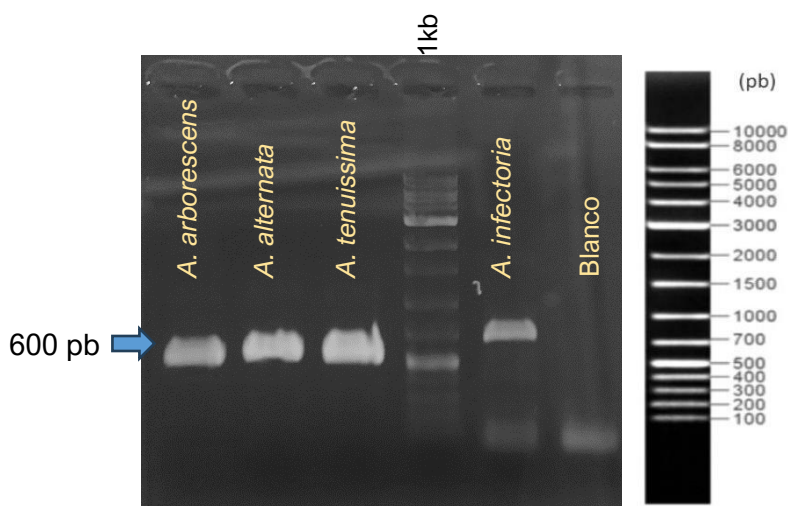


Figura III.7. Productos de PCR de 4 cepas patrón de *Alternaria* spp. visualizados en gel de agarosa al 1% TBE. Marcador de peso molecular de 1kb. Amplificación de aproximadamente 600 pb de la región génica ASA-05.

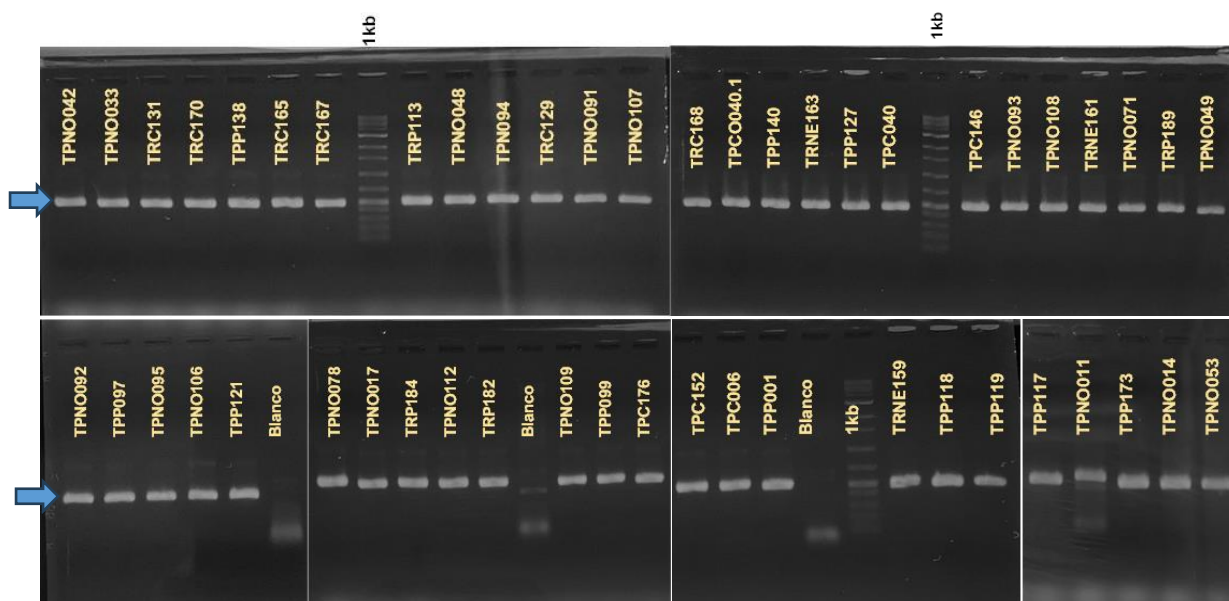


Figura III.8. Productos de PCR de 50 aislamientos de *Alternaria* spp. visualizados en gel de agarosa al 1% TBE. Bandas del marcador de peso molecular de 1kb. Amplificación de ~600 pb de la región génica ASA-05 (flecha azul). Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: i) Tomate Perita: TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste; ii) Tomate Redondo: TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo.

III.3.2.2 Secuenciación y filogenia

Se obtuvieron 53 secuencias de los productos de PCR del gen ASA-05, con un tamaño aproximado de 600 ± 100 pares de bases. Si bien la cepa patrón de *A. infectoria* evidenció una banda de amplificación en el gel de agarosa, la calidad de su secuencia fue deficiente, impidiendo incluirla en los análisis filogenéticos. La identificación morfológica previa pudo validarse al obtener valores de similitud cercanos al 97-98% contra secuencias depositadas en GenBank (NCBI) de las respectivas especies mediante BLAST. Para complementar los análisis filogenéticos, la matriz de secuencias se enriqueció con ocho depositadas en GenBank por Dettman & Eggertson, (2022) correspondientes a *A. alternata* (OL451987.1), *A. arborescens* (OL451999.1 y OL451998.1), *A. gaisen* (OL451968.1 y OL451996.1), y *A. longipes* (OL451992.1, OL451991.1 y OL451990.1) y una secuencia de *A. solani* (CP022025.1) de Wolters et al. (2018) para enraizar el árbol filogenético. De esta manera, la matriz final empleada para la inferencia filogenética consistió en 53 secuencias correspondientes a los aislamientos monospóricos recuperados de tomate, más 9 secuencias de referencia (**Anexo V**).

El árbol de máxima parsimonia (MP) para las 62 secuencias de *Alternaria* spp. evidenció una topología robusta, respaldada por los altos valores de soporte en el análisis de bootstrap. El mismo presentó una longitud de 89 pasos, con un índice de consistencia de 0,94 y retención de 0,98. Los modelos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB) convergieron hacia filogenias proporcionadas con MP. El modelo seleccionado para ML fue K2 (Kimura 2 parámetros), con 122 parámetros y criterios corregidos de AIC y BIC de 2138,501 y 3116,198 respectivamente. Las topologías de los árboles obtenidos por MP, ML e IB fueron congruentes (**Figura III.9**). Se obtuvieron valores de log-verosimilitud (LnL), donde el tamaño efectivo de la muestra (ESS) alcanzó un valor de 1121, indicando que la estimación de la distribución posterior fue eficiente (>200).

El árbol filogenético inferido presentó dos clados principales (I y II) con altos valores de soporte, denotando la diferenciación evolutiva entre los grupos que reúnen. El clado I evidenció a su vez subdivisión en dos subclados: el subclado **I.1** agrupó la secuencia de referencia y cepa patrón de *A. alternata* con una secuencia de la especie próxima *A. gaisen* y aislamientos identificados morfológicamente también como *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. tomaticola*; mostrando congruencia entre caracteres fenotípicos y moleculares. El subclado **I.2** contiene exclusivamente secuencias de referencia de *A. longipes* y *A. gaisen*. Por su parte, el clado II reunió todas las secuencias de *A. arborescens*, incluyendo las de referencia, cepa patrón y los aislamientos de estudio categorizados en este taxón mediante rasgos distintivos. Las longitudes de rama indican las distancias genéticas acumuladas desde la divergencia de linajes a partir de ancestros comunes. La topología permite reconocer grupos de especies filogenéticamente afines e inferir eventos evolutivos. Además, la distribución de aislamientos en los subclados se realizó sin distinción aparente por cultivar o región de origen.

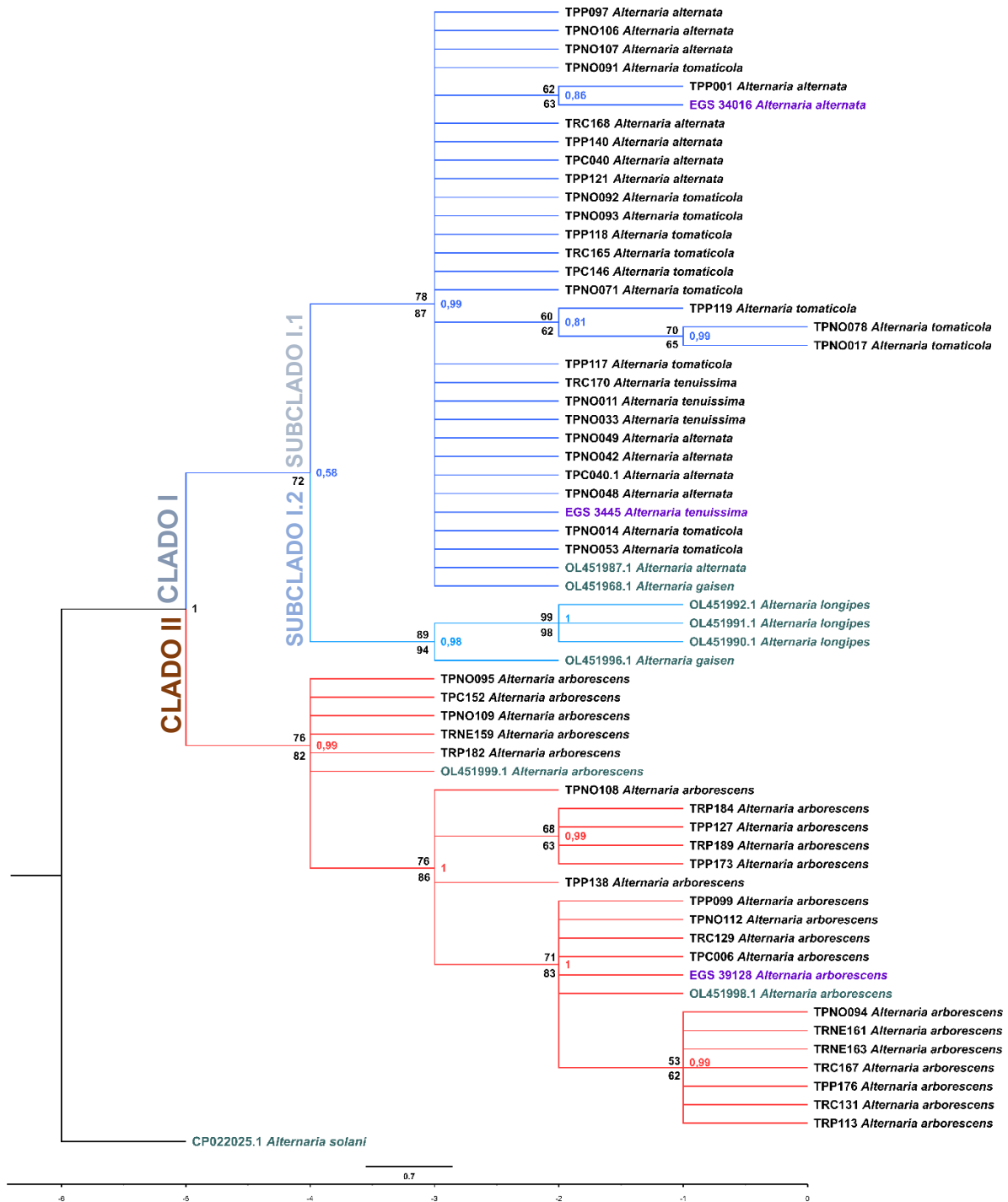


Figura III.9. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ASA-05 de aislamientos de *Alternaria* spp., cepas patrón (violeta) y secuencias de referencia publicadas (verde). Se señalan los dos clados principales (I en azul y II en rojo) con soportes de bootstrap y probabilidades posteriores en los nodos (valores superiores ML, medios IB e inferiores MP). Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: Perita - TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste. Redondo - TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo.

III.3.3 Caracterización metabolómica

El perfil de metabolitos secundarios se realizó sobre la submuestra de 50 aislamientos de *Alternaria* spp. previamente caracterizados a nivel morfológico y molecular y las cuatro cepas de referencia. La identificación preliminar de dichos compuestos se llevó a cabo mediante el tiempo de retención en la fase estacionaria, la masa monoisotópica y el patrón de fragmentación del espectro UV/vis para cada analito. Posteriormente, aquellos metabolitos con identidad sugerida fueron confirmados por espectrometría de masas (MS/MS), validando su estructura. Los metabolitos cuya estructura química pudo ser confirmada mediante este procedimiento fueron utilizados para la caracterización metabolómica. Se identificaron 21 metabolitos secundarios producidos por el género *Alternaria* (**Tabla III.2**). El predominante fue el ácido tenuazónico, que se detectó en el 76% del total de extractos fúngicos, seguido de altecromona A (67%), mientras que altecromona B y toxina AAL TB1, se detectaron únicamente en el 2% de los extractos. La variabilidad en el número de metabolitos secundarios detectados en los extractos fúngicos de *Alternaria* spp. se muestra en la **Tabla III.3**. La mayor cantidad de analitos (19 de 21) se detectaron en el aislamiento TPNO053, identificado morfológica y molecularmente como *A. tomaticola*, proveniente del cultivar perita de la región Noroeste. Le siguieron en orden decreciente el aislamiento TPP140 (*A. alternata*, Perita, Pampeana) y TPNO014 (*A. tomaticola*, Perita, Noroeste) con 16 metabolitos, y TRNE163 (*A. arborescens*, Redondo, Noreste) con 15 metabolitos. Los aislamientos de *A. tomaticola* del cultivar perita, TPC146 (Cuyo), TPNO078 (Noroeste), TPP117 (Pampeana) y la cepa patrón de *A. infectoria* (EGS 27198 ex type) no produjeron ninguno de los 21 metabolitos identificados.

Tabla III.2. Metabolitos secundarios producidos por aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates cultivados en Argentina.

Metabolito*	Número de aislamientos productores (n=54)	Porcentaje de aislamientos productores (%)
Ácido tenuazónico (TeA)	41	76
Altecromona A	36	67
Ácido isopropil tetrámico	31	57
Dihidrotentoxina	27	50
Alternariol (AOH)	22	41
Tentoxina (TEN)	21	39
Altertoxina-II (ATX-II)	19	35
Alternariol monometil éter (AME)	17	31
Altertoxina-III (ATX-III)	14	26
Ácido pyrenochaético	13	24
Alterperilenol	12	22
Ácido alternarienónico	11	20
Altenueno (ALT)	10	19
Altersetina	9	17
Altertoxina-I (ATX-I)	6	11
3-Hidroxialternariol 5-O-metil éter	5	9
Altenusina	5	9
Stemphytoxina III	4	7
Ácido alténico II	3	6
Altecromona B	1	2
Toxina AAL TB1	1	2

*Metabolitos en negrita son considerados micotoxinas.

Tabla III.3. Número de metabolitos detectados en los extractos fúngicos de los aislamientos de *Alternaria* spp.

Aislamiento	Cultivar	Origen	Identificación nivel especie	Número de metabolitos (n=21)
TPNO053	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	19
TPP140	Perita	Pampeana	<i>A. alternata</i>	16
TPNO014	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	16
TRNE163	Redondo	Noreste	<i>A. arborescens</i>	15
TPNO109	Perita	Noroeste	<i>A. arborescens</i>	14
TPNO095	Perita	Noroeste	<i>A. arborescens</i>	12
TPC152	Perita	Cuyo	<i>A. arborescens</i>	12
TPP121	Perita	Pampeana	<i>A. alternata</i>	12
TPP001	Perita	Pampeana	<i>A. alternata</i>	11
TPNO093	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	10
TPNO042	Perita	Noroeste	<i>A. alternata</i>	9
TPNO071	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	8

Aislamiento	Cultivar	Origen	Identificación nivel especie	Número de metabolitos (n=21)
TPNO017	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	8
TPNO091	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	7
TRC168	Redondo	Cuyo	<i>A. alternata</i>	7
TRP182	Redondo	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	7
TRC170	Redondo	Cuyo	<i>A. tenuissima</i>	7
TPNO011	Perita	Noroeste	<i>A. tenuissima</i>	7
TPNO106	Perita	Noroeste	<i>A. alternata</i>	6
TPNO033	Perita	Noroeste	<i>A. tenuissima</i>	6
EGS 34016		Cepa patrón	<i>A. alternata</i>	6
TPNO107	Perita	Noroeste	<i>A. alternata</i>	5
TPC040	Perita	Cuyo	<i>A. alternata</i>	5
TRP189	Redondo	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	5
TPNO049	Perita	Noroeste	<i>A. alternata</i>	5
TPC040.1	Perita	Cuyo	<i>A. alternata</i>	5
TPNO048	Perita	Noroeste	<i>A. alternata</i>	5
TPP097	Perita	Pampeana	<i>A. alternata</i>	4
TPC006	Perita	Cuyo	<i>A. arborescens</i>	4
TPP119	Perita	Pampeana	<i>A. tomaticola</i>	4
EGS 39128		Cepa patrón	<i>A. arborescens</i>	4
TPNO094	Perita	Noroeste	<i>A. arborescens</i>	3
TPP099	Perita	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	3
TPNO112	Perita	Noroeste	<i>A. arborescens</i>	3
TRC129	Redondo	Cuyo	<i>A. arborescens</i>	3
TRNE161	Redondo	Noreste	<i>A. arborescens</i>	3
TPP176	Perita	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	3
TRNE159	Redondo	Noreste	<i>A. arborescens</i>	3
TRC131	Redondo	Cuyo	<i>A. arborescens</i>	3
TPNO092	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	3
TRP113	Redondo	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	3
TRC165	Redondo	Cuyo	<i>A. tomaticola</i>	3
TPNO108	Perita	Noroeste	<i>A. arborescens</i>	2
TRP184	Redondo	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	2
TRC167	Redondo	Cuyo	<i>A. arborescens</i>	2
TPP138	Perita	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	2
TPP173	Perita	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	2
EGS 34015		Cepa patrón	<i>A. tenuissima</i>	2
TPP127	Perita	Pampeana	<i>A. arborescens</i>	1
TPP118	Perita	Pampeana	<i>A. tomaticola</i>	1
TPC146	Perita	Cuyo	<i>A. tomaticola</i>	0
TPNO078	Perita	Noroeste	<i>A. tomaticola</i>	0
TPP117	Perita	Pampeana	<i>A. tomaticola</i>	0
EGS 27198 ex type		Cepa patrón	<i>A. infectoria</i>	0

El análisis del perfil de metabolitos secundarios mediante un mapa de calor y un dendrograma (**Figura III.10**) reveló la presencia de dos clados principales (**I** y **II**). El clado **I** agrupa a los aislamientos en los que se detectó el mayor número de metabolitos, oscilando entre 12 y 19 compuestos. Este clado está compuesto por 4 aislamientos de *A. arborescens*, 2 de *A. tomaticola* y 1 de *A. alternata*. Aunque el clado **I** se subdivide en dos subclados, estos no se consideran representativos en cuanto a número de aislamientos y, por lo tanto, no se han etiquetado de manera específica.

El clado **II** se divide en dos subclados principales. El subclado **II.1** agrupa 16 aislamientos de *A. arborescens*, 4 de *A. alternata*, 3 de *A. tomaticola* y 2 de *A. tenuissima*, en los cuales se detectaron entre 2 y 8 metabolitos, con una presencia destacada de ácido tenuazónico, ácido isopropil tetrámico y altecromona A. Por otro lado, el subclado **II.2** está compuesto por 8 aislamientos de *A. alternata*, 5 de *A. tomaticola*, 3 de *A. arborescens* y 2 de *A. tenuissima*, en los que se identificaron entre 1 y 12 metabolitos. A diferencia de los aislamientos del subclado **II.1**, solo 9 de los 18 aislamientos pertenecientes al subclado **II.2** produjeron ácido tenuazónico, y ninguno de ellos presentó ácido isopropil tetrámico. Además, la mayoría de los aislamientos del subclado **II.2** son productores de altecromona A, altertoxinas y tentoxinas.

Aunque no se identificó un compuesto específico que permita discriminar completamente los morfogrupos establecidos según la clave taxonómica de Simmons (2007), se observa una agrupación consistente de los aislamientos de *A. arborescens*. El 70% de los aislamientos de esta especie se concentraron en el subclado **II.1**, donde se detectó predominantemente la producción de ácido tenuazónico y ácido isopropil tetrámico.

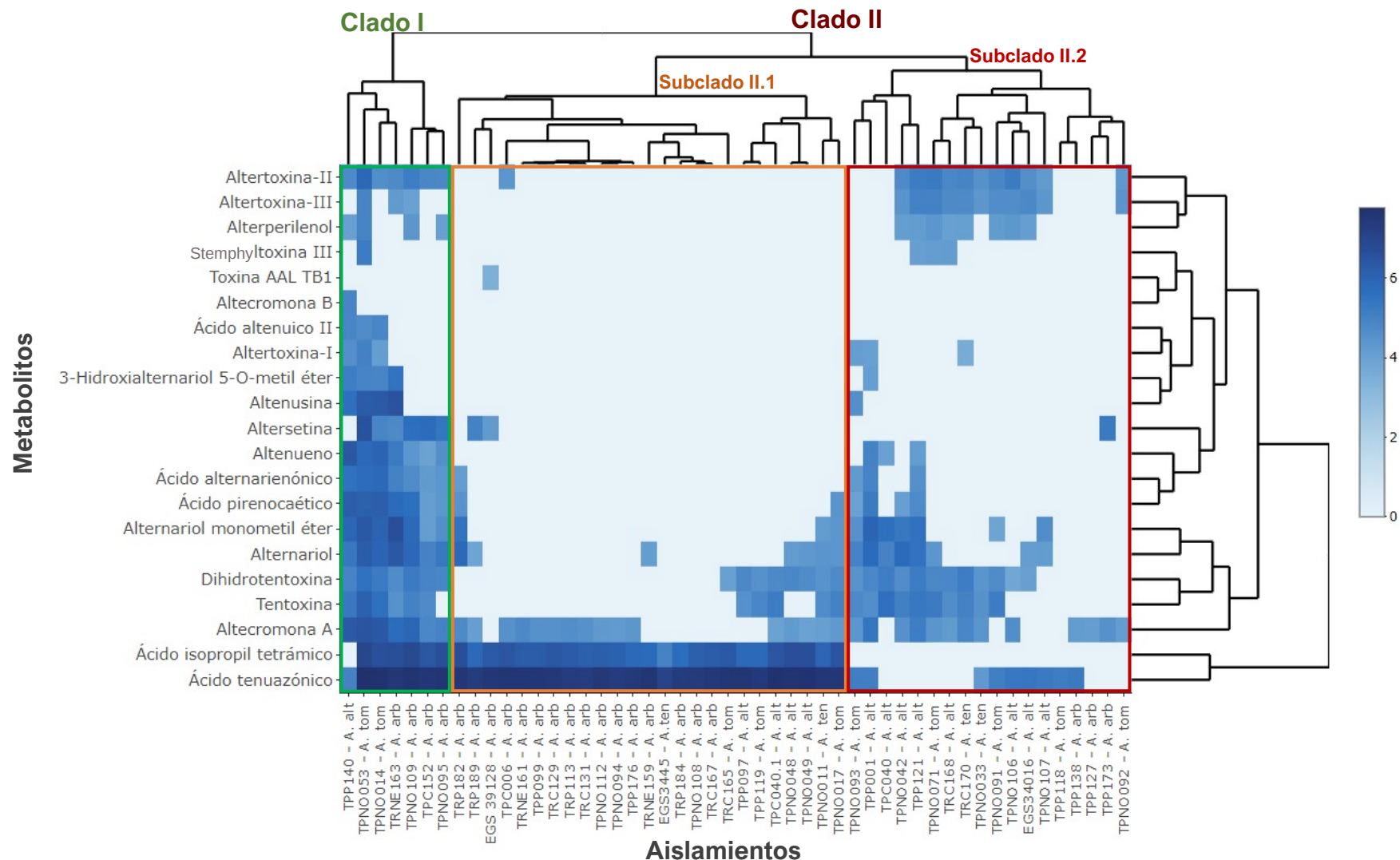


Figura III.10. Mapa de calor y dendrograma semicuantitativo de producción de metabolitos secundarios de aislamientos de *Alternaria* spp. Se señalan el clado I: verde y dos subclados; II.1: naranja y II.2: rojo. Códigos de identificación de aislamientos por cultivar y origen geográfico: Perita - TPP: Pampeana, TPC: Cuyo, TPNO: Noroeste. Redondo - TRP: Pampeana, TRNE: Noreste, TRC: Cuyo. Mayor intensidad del color mayor área del pico cromatográfico.

III.4 Discusión

En este estudio, se aplicó una estrategia polifásica para identificar los aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos a partir de frutos de tomate. Se empleó una combinación de métodos morfológicos, moleculares y químicos, lo que permitió una aproximación multimetodológica para identificar congruencias y discrepancias entre la estructura filogenética inferida y los rasgos fenotípicos observables. Este enfoque integrado facilita la elucidación de patrones evolutivos y la identificación de bases genéticas que determinan características funcionales de interés, como la producción de metabolitos secundarios. La implementación de esta estrategia polifásica proporciona una visión más completa y robusta de la diversidad y las relaciones entre los aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates.

Numerosos estudios previos enfatizan la importancia y necesidad de este enfoque combinado para la correcta delimitación taxonómica de las especies de *Alternaria* (Aung et al., 2020; Blagojević et al., 2020; Y.-J. Chen et al., 2018; Ramires et al., 2018). En Argentina se ha aplicado a especies de tomate y otros cultivos de importancia agronómica, como cereales, frutas y hortalizas (da Cruz Cabral et al., 2017).

La identificación mediante observación de características macro y microscópicas distintivas en condiciones estandarizadas permitió categorizar los 120 aislamientos en cuatro especies, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. tomaticola*. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de diversos estudios realizados que han reportado la presencia de estas especies de *Alternaria* en tomate. Da Cruz Cabral et al. (2017) dividieron la población estudiada en tres grupos: *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. alternata*, basándose en el análisis morfológico. Ramezani et al. (2019) identificaron morfológicamente seis especies de *Alternaria* causantes de la enfermedad del tizón temprano en tomate en Irán: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. mimicula*, *A. interrupta* y *A. infectoria*, siendo *A. alternata* la más frecuente y *A. infectoria* la menos frecuente. Saleem & El-Shahir (2022) aislaron e identificaron morfológicamente a nivel de especie veinte aislados de *Alternaria* de frutos de tomate infectados en Egipto en *A. alternata*, *A. brassicicola*, *A. citri*, *A. radicina* y *A. tenuissima*. Beydaghi et al. (2016) obtuvieron 102 aislamientos a partir

de muestras de tomate en Sistán, Irán, identificando seis especies de *Alternaria* (*A. alternata*, *A. dumosa*, *A. tenuissima*, *A. mimicula*, *A. tomaticola*).

La amplificación y secuenciación del marcador molecular ASA-05 validó dichas asignaciones al evidenciar similitudes cercanas al 98-99% contra secuencias de referencia en GenBank dadas por Dettman & Eggertson (2022), quienes diseñaron y secuenciaron tres nuevos marcadores (ASA-05, ASA-10, ASA-19). Al evaluar su desempeño en la identificación diagnóstica de linajes principales de *Alternaria* sección *Alternaria* (ASA), lograron clasificar sistemáticamente las cepas en los grupos *A. alternata*, *A. longipes*, *A. arborescens* y *A. gaisen*, superando incluso al marcador *rpb2*, utilizado habitualmente en filogenias de hongos. Los marcadores ASA lograron la delimitación de los linajes de *Alternaria*, mientras que *rpb2* recuperó tres de los cuatro linajes (*arborescens*, *gaisen* y *longipes*), pero solo la rama de *arborescens* recibió soporte significativo. Además, la cepa divergente KAS6097 según los marcadores ASA no pudo ser distinguida del linaje *alternata* por *rpb2*. Por lo tanto, la capacidad del marcador ASA-05 para diferenciar *A. arborescens* y congéneres cercanos ya cuenta con validación previa y demuestra ser una herramienta molecular confiable para la identificación de estos linajes.

La topología filogenética obtenida separó los aislamientos en dos grupos principales. El **clado I**, específicamente en el subclado **I.1**, reunió principalmente aislamientos de las especies *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. tomaticola* sin una distinción clara entre ellas, denotando una estrecha relación. Diversos estudios previos han reportado la dificultad de diferenciar *A. alternata* y *A. tenuissima* mediante el uso de marcadores ITS (T. Wang et al., 2019), atribuible a su reciente divergencia evolutiva. En un análisis filogenético de secuencias ITS1 e ITS2, los aislamientos de ambas especies se agruparon en un solo clado indistinguible (T. Wang et al., 2019). Similarmente, un estudio en Irán basado en los marcadores ITS, *gpd* y *rpb2* no pudo discriminar entre *A. alternata* y otras especies de esporas pequeñas, identificando todos los aislamientos como *A. alternata* (Khodaei & Arzanlou, 2013). En este estudio, el **clado II** agrupó todas las secuencias de *A. arborescens* junto a la cepa patrón EGS 39128, manteniendo coherencia entre la clasificación morfológica inicial y la posición

filogenética inferida. Esto concuerda con lo reportado por Dettman & Eggertson, (2022).

La congruencia en la topología de los árboles filogenéticos inferidos mediante los distintos métodos de máxima parsimonia, verosimilitud y bayesiano, sumado a los altos valores de soporte estadístico en los análisis de bootstrap y posteriores, evidencia la capacidad del marcador molecular ASA-05 para resolver de manera robusta las relaciones evolutivas entre algunas de las principales especies del género *Alternaria* identificadas en los aislamientos de tomate. En particular, la región evaluada permitió distinguir filogenéticamente, con fuerte respaldo, el agrupamiento del grupo especie “H” (*A. tenuissima* y *A. tomaticola*) y el grupo “J” (*A. alternata*), del grupo especie “L” (*A. arborescens*). Por lo tanto, el gen ASA-05 constituye un buen candidato para la tipificación molecular de estas especies fúngicas de importancia fitopatológica.

Además, resulta fundamental incorporar información multilocus o genómicas completas en futuros análisis para resolver las relaciones filogenéticas intra-clado, tal como destacan (Somma et al., 2019a), quienes emplearon una aproximación multilocus basada en los genes EF-1 α , β -tubulina, *gpd* y *alt-a1* para estudiar la variabilidad y filogenia del género *Alternaria*. Identificaron dos clados principales, clado I (*A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens*), clado II (*A. infectoria* y *A. triticina*) donde los aislamientos se agruparon estrictamente por afinidad evolutiva y no según características morfológicas. El uso de marcadores moleculares múltiples para la delimitación de especies, con genes y procedimientos estandarizados y consensuados es de preferencia para el género *Alternaria* (Gou et al., 2023).

Los análisis metabolómicos evidenciaron variabilidad semicuantitativa en los perfiles de aislamientos de *Alternaria*, aún dentro de una misma especie designada fenotípicamente. Ello limita la utilidad de dichos compuestos como marcadores quimiotaxonómicos exclusivos. No obstante, se hallaron patrones asociados a grupos filogenéticos, donde el clado I y subclado II.1 con predominancia de *A. arborescens* reunieron mayormente los aislamientos productores de ácido tenuazónico y ácido isopropil tetrámico, mientras que en el subclado II.2, constituido por otras especies (*A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. tomaticola*), hubo una baja presencia de estos metabolitos. Tales congruencias entre relaciones evolutivas y funcionales pueden

deberse a conservación de rutas biosintéticas especie-específicas (Patriarca et al., 2019).

Se ha reportado previamente una alta diversidad química en el grupo de especies de esporas pequeñas, detectándose 78 metabolitos distintos en 360 aislamientos a partir de varios cultivos argentinos, 31 de ellos con estructura conocida (Andersen et al., 2015; Patriarca et al., 2019). Las mayores diferencias metabolómicas se dieron entre las secciones *Alternaria* e *Infectoriae*, con perfiles distintivos. Así, las infectopironas, novae-zelandinas y fomapironas fueron exclusivas de *Infectoriae*, mientras que, compuestos como ALT, AOH, AME, TEN y TeA predominaron en la sección *Alternaria*, a la que pertenecen las especies de tomate aisladas en el presente estudio (Andersen et al., 2015; Patriarca et al., 2019). Incluso dentro de esta última sección no se distinguieron químicamente *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. tenuissima*, lo que coincide los resultados del presente trabajo.

En tanto, un estudio sobre 95 aislamientos de esporas pequeñas detectó variabilidad cuantitativa en la producción individual de toxinas, encontrando mayoritariamente las cinco micotoxinas principales (ALT, AOH, AME, TeA y ATX), aunque en distintas concentraciones según la cepa (Kahl et al., 2015). Un análisis de conglomerados tampoco pudo diferenciar grupos-especie por sus perfiles toxigénicos, denotando similitud metabolómica.

Si bien los aislamientos de tomate no se diferencian entre sí a nivel fenotípico y metabolómico, la congruencia entre la taxonomía fenotípica y la relación filogenética basada en los patrones de metabolitos sugiere que probablemente existan vías bioquímicas y reguladores específicos de especie determinando la producción particular de ciertos compuestos claves, como el ácido tenuazónico en *A. arborescens*.

Por lo tanto, el abordaje polifásico implementado en este trabajo aporta mayor robustez sobre aspectos taxonómicos, evolutivos y funcionales diferenciales en especies de *Alternaria* de importancia fitopatológica. No obstante, quedan aún interrogantes por resolver en cuanto a la delimitación precisa de los grupos-especie de *Alternaria* de esporas pequeñas, tales como la existencia de bases genéticas determinantes de rasgos fenotípicos de interés, dinámica de las interacciones

hospedor-patógeno y estrategias efectivas de control dirigido sobre toxinas fúngicas. La continuación de estudios integrales como el presente, mediante el incremento en la densidad de muestreo, incorporación de técnicas genómicas y ensayos biológicos, permitiría seguir profundizando en el entendimiento de este complejo grupo de especies.

III.5 Conclusiones

Se implementó un abordaje polifásico para la caracterización de aislamientos de *Alternaria* spp. provenientes de frutos de tomate, integrando criterios morfológicos, moleculares y químicos.

La utilización combinada de dichas técnicas complementarias permitió una categorización taxonómica inicial mediante rasgos fenotípicos macro y micro-morfológicos, validada posteriormente por el análisis filogenético del marcador ASA-05 en cuanto a la distinción del grupo especie “H” (*A. tenuissima* y *A. tomaticola*) y el grupo “J” (*A. alternata*), del grupo especie “L” (*A. arborescens*).

Si bien no fue posible establecer metabolitos secundarios exclusivos para cada grupo especie, la detección de perfiles característicos asociados a los distintos linajes identificados filogenéticamente denota la presencia de rutas biosintéticas conservadas en cada especie.

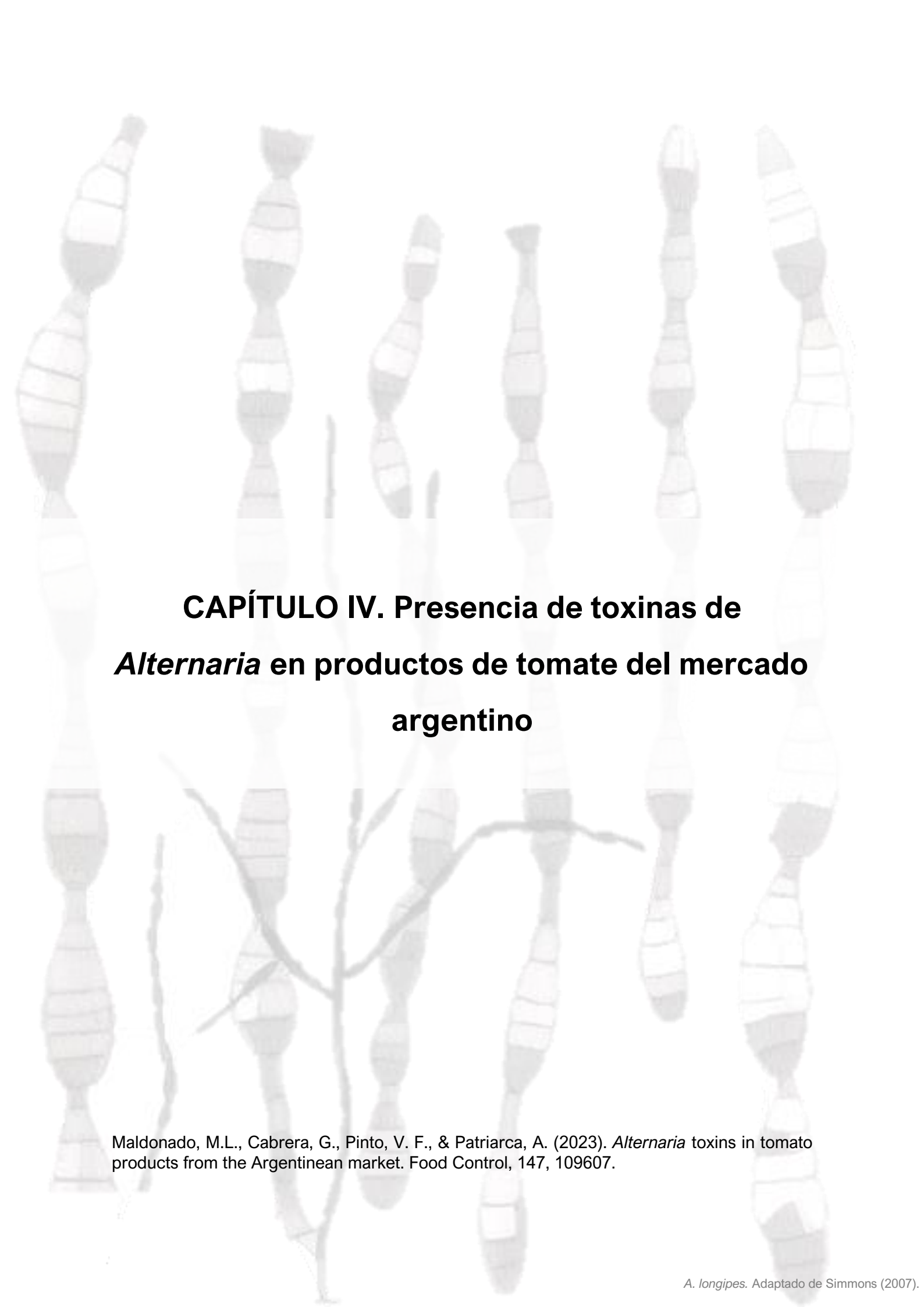
III.6 Bibliografía

- Aichinger, G., Del Favero, G., Warth, B., & Marko, D. (2021). *Alternaria* toxins—Still emerging? Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20(5), 4390-4406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12803>
- Aloi, F., Riolo, M., Sanzani, S. M., Mincuzzi, A., Ippolito, A., Siciliano, I., Pane, A., Gullino, M. L., & Cacciola, S. O. (2021). Characterization of *Alternaria* Species Associated with Heart Rot of Pomegranate Fruit. Journal of Fungi, 7(3), 172. <https://doi.org/10.3390/jof7030172>
- Andersen, B., Nielsen, K. F., Fernández Pinto, V., & Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. International Journal of Food Microbiology, 196, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.11.029>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.005>
- Aung, S. L. L., Liu, H. F., Pei, D. F., Lu, B. Bin, Oo, M. M., & Deng, J. X. (2020). Morphology and Molecular Characterization of a Fungus from the *Alternaria alternata* Species Complex Causing Black Spots on Pyrus sinkiangensis (Koerle pear). Mycobiology, 48(3), 233-239. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1745476>
- Blagojević, J. D., Vukojević, J. B., & Ivanović, Ž. S. (2020). Occurrence and characterization of *Alternaria* species associated with leaf spot disease in rapeseed in Serbia. Plant Pathology, 69(5), 883-900. <https://doi.org/10.1111/ppa.13168>
- Castañares, E., da Cruz Cabral, L., Dinolfo, M. I., Andersen, B., Stenglein, S. A., & Patriarca, A. (2021). *Alternaria* in malting barley: Characterization and distribution in relation with climatic conditions and barley cultivars. International Journal of Food Microbiology, 357, 109367. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109367>
- Chen, Y.-J., Meng, Q., Zeng, L., & Tong, H.-R. (2018). Phylogenetic and morphological characteristics of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease on Camellia sinensis in China. Australasian Plant Pathology, 47(3), 335-342. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0561-0>
- da Cruz Cabral, L., Rodriguero, M., Stenglein, S., Fog Nielsen, K., & Patriarca, A. (2017). Characterization of small-spored *Alternaria* from Argentinean crops through a polyphasic approach. International Journal of Food Microbiology, 257, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.026>
- da Cruz Cabral, L., Rodríguez, A., Delgado, J., & Patriarca, A. (2019). Understanding the effect of postharvest tomato temperatures on two toxigenic *Alternaria* spp. strains: growth, mycotoxins and cell-wall integrity-related gene expression. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(15), 6689-6695. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9950>

- da Cruz Cabral, L., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Fog Nielsen, K., & Patriarca, A. (2016). Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.005>
- Dandago, M. A., Yunusa, A. K., Rilwan, A., Yahaya, S. M., Nassarawa, S. S., & Khaleel, A. G. (2023). Molecular identification of fungal species infesting tomato (*Lycopersicon esculentum*) at postharvest phase in Kwanar Gafan, Kano State. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 349-360.
- DeMers, M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology*, 168(3). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001153>
- Dettman, J. R., & Eggertson, Q. (2022). New molecular markers for distinguishing the main phylogenetic lineages within *Alternaria* section *Alternaria*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(5), 754-766. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2061605>
- El-Ganainy, S. M. (2021). Morphological and Molecular Characterization of Large-spored *Alternaria* Species Associated with Potato and Tomato Early Blight in Egypt. *International Journal of Agriculture and Biology*, 25(05), 1101-1110. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1769>
- Erkmen, O. (2022). Isolation and counting of toxigenic fungi. En *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments* (pp. 301-306). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00055-0>
- Gao, J., Yang, M. J., Xie, Z., Lu, B. H., Hsiang, T., & Liu, L. P. (2021). Morphological and molecular identification and pathogenicity of *Alternaria* spp. associated with ginseng in Jilin province, China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(4), 537-550. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1858167>
- Gou, Y., Aung, S. L. L., Guo, Z., Li, Z., Shen, S., & Deng, J. (2023). Four New Species of Small-Spored *Alternaria* Isolated from *Solanum tuberosum* and *S. lycopersicum* in China. *Journal of Fungi*, 9(9), 880. <https://doi.org/10.3390/jof9090880>
- Jones, A. L. (2012). The Future of Taxonomy (pp. 23-35). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394381-1.00002-7>
- Kahl, S. M., Ulrich, A., Kirichenko, A. A., & Müller, M. E. H. (2015). Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria* infectoria from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), 1637-1650. <https://doi.org/10.1111/jam.12951>
- Khodaei, S., & Arzanlou, M. (2013). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Alternaria* species, involved in leaf spot disease of sunflower in northern Iran. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46(18), 2224-2234. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.790259>
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R., Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi:

- where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? IMA Fungus, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Ma, G., Bao, S., Zhao, J., Sui, Y., & Wu, X. (2021). Morphological and Molecular Characterization of *Alternaria* Species Causing Leaf Blight on Watermelon in China. Plant Disease, 105(1), 60-70. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0130-RE>
- Mohammadi, A., & Bahramikia, S. (2019). Molecular identification and genetic variation of *Alternaria* species isolated from tomatoes using ITS1 sequencing and inter simple sequence repeat methods. Current Medical Mycology. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.2.1154>
- Nagda, A., & Meena, M. (2023). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: Occurrence, biosynthesis, toxicity, analytical methods, control and detoxification strategies. Food Control, 110211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110211>
- Patriarca, A. (2016). *Alternaria* in food products. Current Opinion in Food Science, 11, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.007>
- Patriarca, A., da Cruz Cabral, L., Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Andersen, B. (2019). Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. International Journal of Food Microbiology, 291, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.022>
- Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Patriarca, A. (2022). Morphological and chemical characterization of *Alternaria* populations from apple fruit. International Journal of Food Microbiology, 379, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109842>
- Rambaut, A., & Drummond, A. (2012). FigTree version 1.4. 0. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. Systematic Biology, 67(5), 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ramezani, Y., Taheri, P., & Mamarabadi, M. (2019). Identification of *Alternaria* spp. associated with tomato early blight in Iran and investigating some of their virulence factors. Journal of Plant Pathology, 101(3), 647-659. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00259-w>
- Ramires, F., Masiello, M., Somma, S., Villani, A., Susca, A., Logrieco, A., Luz, C., Meca, G., & Moretti, A. (2018). Phylogeny and Mycotoxin Characterization of *Alternaria* Species Isolated from Wheat Grown in Tuscany, Italy. Toxins, 10(11), 472. <https://doi.org/10.3390/toxins10110472>
- Saleem, A., & El-Shahir, A. A. (2022). Morphological and Molecular Characterization of Some *Alternaria* Species Isolated from Tomato Fruits Concerning Mycotoxin Production and Polyketide Synthase Genes. Plants, 11(9), 1168. <https://doi.org/10.3390/plants11091168>
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J., & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. <https://books.google.com.ar/books?id=Az6-ZwEACAAJ>

- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria: An Identification Manual : Fully Illustrated and with Catalogue Raisonné 1796-2007*. CBS Fungal Biodiversity Centre. https://books.google.com.ar/books?id=F_AzKgAACAAJ
- Somma, S., Amatulli, M. T., Masiello, M., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2019a). *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 34-43. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.01.001>
- Somma, S., Amatulli, M. T., Masiello, M., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2019b). *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.006>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673-4680.
- Twarużek, M., Soszczyńska, E., & Kwiatkowska-Giżyńska, J. (2021). Molds in Food Spoilage. En *Encyclopedia of Mycology* (pp. 208-214). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21048-0>
- Vaquera, S., Patriarca, A., & Fernández Pinto, V. (2016). Influence of environmental parameters on mycotoxin production by *Alternaria arborescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 219, 44-49. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.12.003>
- Wang, T., Zhao, J., Ma, G., Bao, S., & Wu, X. (2019). Leaf blight of sunflower caused by *Alternaria tenuissima* and *A. alternata* in Beijing, China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(3), 372-378. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1583288>
- Wolters, P. J., Faino, L., van den Bosch, T. B. M., Evenhuis, B., Visser, R. G. F., Seidl, M. F., & Vleeshouwers, V. G. A. A. (2018). Gapless Genome Assembly of the Potato and Tomato Early Blight Pathogen *Alternaria solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 31(7), 692-694. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0309-A>
- Woudenberg, J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J., & Crous, P. W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

The background of the page features a detailed, light-colored illustration of the Alternaria longipes fungus. It shows several long, slender, and slightly curved conidia (spores) with distinct transverse septa. These spores are arranged in a way that suggests they are part of a larger, branching structure, possibly a sporangium or a fruiting body, though the latter is less clearly defined. The overall style is scientific and artistic, typical of botanical or microbiological illustrations.

CAPÍTULO IV. Presencia de toxinas de *Alternaria* en productos de tomate del mercado argentino

Maldonado, M.L., Cabrera, G., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2023). *Alternaria* toxins in tomato products from the Argentinean market. Food Control, 147, 109607.

IV.1 Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales más consumidos a nivel global. Una gran parte de la producción se destina a la elaboración de diversos productos procesados, como salsas, purés, jugos, conservas y pasta de tomate, entre otros (Bertuzzi et al., 2021; Xu et al., 2018). Como se determinó en el Capítulo II, este fruto es susceptible a varios agentes fúngicos de deterioro, y con mayor abundancia predomina el género *Alternaria*, que además puede contaminar el fruto con sus toxinas (Andersen & Frisvad, 2004; Pose et al., 2009; Sanzani et al., 2021; Somma et al., 2011b).

En el Capítulo III, se confirmó que las especies de *Alternaria* causantes de deterioro de frutos de tomate producen un amplio espectro de metabolitos secundarios, incluyendo conocidas micotoxinas, como altemuena (ALT), alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), altertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II, ATX-III), ácido tenuazónico (TeA), tentoxina (TEN), entre otras (Bacha et al., 2023b; Q. F. Chen et al., 2011; Nagda & Meena, 2024). Estos compuestos tienen capacidad genotóxica, mutagénica, cancerígena y citotóxica, lo que puede afectar la salud humana y animal (Arcella et al., 2016; Crudo et al., 2021)

Considerando los altos niveles de consumo y el importante volumen destinado a procesamiento, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) identificó a los productos de tomate entre los principales contribuyentes a la exposición dietaria a toxinas de *Alternaria* (Arcella et al., 2016). Recientemente, la Comisión Europea emitió una recomendación para monitorear los niveles de estas toxinas emergentes en tomates y derivados, entre otros grupos de alimentos (European Commission, 2022).

Aunque aún son consideradas "micotoxinas emergentes" debido a la escasez de datos sobre toxicidad y exposición, se ha demostrado que las poblaciones humanas están expuestas a estas toxinas a través de la dieta. Por ejemplo, la presencia de AOH, AME, TeA y TEN se ha detectado frecuentemente en muestras de orina de la población china (Fan et al., 2021; Z. Liu et al., 2020; X. Qiao et al., 2020). Más preocupante aún es la evidencia de exposición de madres lactantes y bebés, un grupo altamente vulnerable, a través de la detección de estas toxinas en leche materna en distintos países (Aichinger et al., 2021a).

A pesar de que estas toxinas son químicamente estables y persisten durante el procesamiento industrial (Pavicich et al., 2020; Puntscher et al., 2019), su presencia en productos de tomate ha sido escasamente estudiada en Argentina. Hace más de 15 años, Terminiello et al. (2006) reportaron altos niveles de contaminación con AOH, AME y TeA en conservas y salsas comerciales. Considerando la evolución del mercado de productos procesados y los avances en métodos analíticos desde entonces, se requiere una actualización de esta información.

Por otro lado, aunque se ha documentado más recientemente la capacidad toxigénica de aislamientos locales de *Alternaria* provenientes de tomate (Somma et al., 2011b), así como su potencial para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios (Andersen et al., 2015; da Cruz Cabral et al., 2017; Patriarca et al., 2019), no existen estudios recientes sobre la ocurrencia efectiva de estas toxinas en derivados de tomate que se comercializan actualmente en Argentina.

En base a esto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la incidencia de seis importantes toxinas de *Alternaria* (ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA) en una variedad de productos procesados de tomate adquiridos en mercados de Argentina. Los resultados generados permitirán estimar el riesgo de exposición local a estas micotoxinas emergentes a través del consumo de productos de tomate.

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Muestras

Se analizaron un total de 79 muestras de distintos productos derivados de tomate, adquiridos de manera aleatoria en supermercados y almacenes de Argentina entre los años 2019 y 2021. La selección incluyó todas las marcas de productos de tomate disponibles en el mercado local, tomando al azar una muestra por marca en los diferentes puntos de venta. Con el fin de representar las marcas tanto nacionales como importadas que se comercializan en el país, se incorporaron 6 muestras de origen italiano, mientras que los 73 restantes fueron de fabricación argentina. Los tipos de productos analizados (**Figura IV.1**) fueron: 38 purés de tomate, 15 tomates enteros pelados, 13 tomates triturados, 7 extractos de tomate, 4 salsas de tomate y 2 pulpas de tomate. Todas las muestras estaban destinadas al mercado minorista, dentro del período de vida útil indicado y con envases íntegros (latas, botellas de vidrio o envases

asépticos). Las muestras se conservaron en sus envases originales bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas por cada fabricante, hasta su posterior análisis.



Figura IV.1. Fotografías de los productos de tomate analizados. **A:** Conjunto de los diferentes productos de tomate adquiridos para el análisis. Se observan distintos tipos de envases, incluyendo latas, botellas de vidrio y Tetra Pak®. **B:** Detalle de los tipos específicos de productos que fueron analizados: puré, tomates enteros pelados, tomates triturados, extractos, salsa y pulpa de tomate.

IV.2.2 Reactivos

Los estándares analíticos de ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA utilizados fueron adquiridos a Toronto Research Chemicals (Canadá). Los solventes empleados fueron: ácido fórmico $\geq 85\%$ (grado analítico) provisto por Reactivos S.A. (Santa Fe, Argentina), acetonitrilo (grado HPLC) y acetato de etilo (grado analítico) adquiridos a Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina), metanol grado HPLC y ácido fórmico (p.a., ACS) de Merck (Darmstadt, Alemania), y metanol y agua grado LC/MS adquiridos a Carlo Erba (Milán, Italia). Todos estos reactivos se emplearon tanto para la preparación de estándares como de muestras y fases móviles utilizadas en las técnicas de HPLC-MS.

IV.2.3 Preparación de soluciones madre y patrones de calibración

Se prepararon soluciones stock de micotoxinas de *Alternaria* (ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA) en metanol a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir de estas, se realizaron diluciones para obtener soluciones estándar de concentraciones de 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$, que fueron empleadas para construir las curvas de calibración. Para la optimización y puesta a punto del método, se utilizaron tomates frescos sanos, los cuales fueron licuados y cocidos durante 10 minutos a 60°C . El puré obtenido se enfrió

y conservó congelado a -18°C hasta su utilización. Previo a la extracción, alícuotas del puré de tomate previamente descongelado fueron fortificadas con las soluciones estándar. Las muestras se sometieron a agitación en vortex (LP Vortex Mixer, Thermo Scientific) a 3200 rpm durante 1 minuto y luego se mantuvieron una hora en oscuridad para permitir la interacción y equilibrio de los analitos con la matriz.

IV.2.4 Extracción de micotoxinas

La extracción simultánea de ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA se realizó según la metodología descrita por Van de Perre et al. (2014). Se pesaron 5 gramos de muestra homogeneizada en tubos de centrifuga de 50 ml, a los que se agregaron 10 ml de la mezcla acetonitrilo: acetato de etilo: ácido fórmico (60:39:1 v/v/v). Las muestras se agitaron inicialmente en vórtex durante 1 minuto a 3200 rpm y luego en un agitador orbital plano (IKA® KS 260) a 350 rpm por 30 minutos. Posteriormente, los extractos fueron centrifugados (Dlab DM0412) a 4000 rpm por 15 minutos. Se transfirieron 5 ml del sobrenadante a tubos de vidrio, donde fueron secados bajo corriente suave de nitrógeno (MD200). Los extractos secos fueron reconstituidos con 1 ml de metanol y filtrados a través de filtros de jeringa de 0,45 µm hacia viales de HPLC de 2 ml. Finalmente, las muestras fueron conservadas congeladas a -18°C hasta su análisis mediante HPLC-MS.

IV.2.5 Parámetros instrumentales

El análisis mediante HPLC-MS/MS se realizó en un equipo HPLC Agilent 1200, con inyector automático y detector de diodos, acoplado a un espectrómetro de masas QTOF Bruker (microTOF-Q II®). La separación cromatográfica se logró mediante un gradiente lineal a un flujo de 0,3 ml/min, utilizando A) ácido fórmico al 0,1% y B) metanol como fases móviles de acuerdo con el siguiente gradiente: 0-15 min, A:80, B:20; 15-25 min, A:0, B:100. La columna se mantuvo a una temperatura constante de 30°C. Las condiciones de ionización en la fuente ESI en modo positivo fueron: voltaje del capilar 4,5 kV, presión del gas nebulizador 3 bar, flujo de gas seco 6 L/min y temperatura 200°C. El análisis MS/MS se realizó por selección automática de iones precursores en el cuadrupolo y se aplicaron energías de colisión (CID) de entre 15 y 25 eV en la celda de colisión, utilizando argón como gas. La calibración del equipo se realizó con formiato de sodio antes de cada serie de muestras. La adquisición y

procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el software Bruker Compass® DataAnalysis v4.4. Todas las relaciones m/z se adquirieron en alta resolución, permitiendo determinar las fórmulas moleculares de los analitos. La identificación de las micotoxinas se confirmó por comparación de tiempos de retención y espectros MS/MS con sus respectivos estándares analíticos.

Para la validación del método de extracción, se analizaron muestras de tomate fresco sin contaminar, que fueron procesadas y fortificadas con los analitos tal como se detalla en la sección IV.2.3. Cada nivel de concentración fue preparado por triplicado. La recuperación total (TR), supresión/realce de señal (SSE) y eficiencia de extracción (EE) fueron calculados según Sulyok et al. (2006) mediante las ecuaciones: $TR (\%) = 100 \times \text{pendiente } c / \text{pendiente } a$; $SSE (\%) = 100 \times \text{pendiente } b / \text{pendiente } a$; $EE (\%) = 100 \times \text{pendiente } c / \text{pendiente } b$; donde "a" es la pendiente de patrones puros, "b" de extractos antes de inyección y "c" de extractos enriquecidos. El límite de detección (LOD) se determinó como $LOD = 3 S_{BI} / S$, siendo S_{BI} el error estándar de la intersección y S la pendiente de la curva. El límite de cuantificación (LOQ) se estableció como 2 veces el LOD.

IV.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA utilizando el software RStudio 2023.06.1+524. Para la comparación de medias entre grupos se aplicó la prueba de diferencias de medias de Tukey. En todos los análisis se consideró un nivel de significancia estadística de $\alpha=0,05$.

IV.3 Resultados

IV.3.1 Desempeño del método de análisis por HPLC-MS

El método para la detección y cuantificación de seis micotoxinas de *Alternaria* fue evaluado mediante parámetros de rendimiento, cuyos resultados se muestran en la **Tabla IV.1** para las seis toxinas, ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA. Se obtuvieron recuperaciones totales (TR), con valores entre 62-87%, siendo ligeramente menor para TeA. La supresión/realce de señal (SSE) resultó mayor al 79% para todos los analitos, mientras que la eficiencia de extracción (EE) sólo fue menor al 90% para TeA. Estos parámetros presentaron una desviación estándar relativa inferior al 15% en todos los casos, indicando una buena repetibilidad. Los límites de detección (LOD)

variaron entre 2,1-7,3 µg/kg, mientras que los límites de cuantificación (LOQ) resultaron entre 4,2-14,6 µg/kg. Las curvas de calibración mostraron un excelente ajuste lineal con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,98 en todos los casos.

Tabla IV.1. Parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de toxinas de *Alternaria* en productos de tomate. Recuperación (TR, SSE y EE) $\pm$ desviación estándar (%), LOD y LOQ (µg/kg) de cada micotoxina en productos de tomate.

Parámetro	ALT	AOH	AME	ATX-I	TEN	TeA
TR (%)	78 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	87 $\pm$ 2	77 $\pm$ 5	83 $\pm$ 1	62 $\pm$ 3
SSE (%)	79 $\pm$ 6	86 $\pm$ 4	88 $\pm$ 3	81 $\pm$ 2	85 $\pm$ 4	67 $\pm$ 5
EE (%)	92 $\pm$ 4	90 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1	102 $\pm$ 3	91 $\pm$ 3	77 $\pm$ 6
LOD (µg/kg)	7,3	2,3	3,4	3,8	2,1	4,3
LOQ (µg/kg)	14,6	4,6	6,7	7,6	4,2	8,6
R^2	0,9944	0,9964	0,9937	0,9897	0,9980	0,9828

ALT: altenueno, **AOH:** alternariol; **AME:** alternariol monometil éter; **ATX-I:** altertoxina-I; **TEN:** tentoxina; **TeA:** ácido tenuazónico.

TR: recuperación total, SSE: supresión/relace de la señal; EE: eficiencia de extracción; R^2 coeficiente de determinación de las curvas de calibración estándar.

IV.3.2 Contaminación natural de seis micotoxinas de *Alternaria* en productos de tomate.

En ninguna de las 6 muestras de origen italiano comercializadas en Argentina se detectó la presencia de las toxinas ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA. En cuanto a las muestras de producción nacional, en 29 de las 73 muestras (40%) se detectó contaminación con al menos una de las toxinas evaluadas. En la **Tabla IV.2** se muestra la co-ocurrencia de las 6 micotoxinas en productos de tomate. En la mayoría de los 29 productos se detectó una micotoxina (28,8%); la co-ocurrencia de dos micotoxinas se observó en 5 muestras (6,8%) y de tres micotoxinas en 3 muestras (4,1%). TeA y TEN fueron las toxinas predominantes, presentes cada una de ellas en 15% de las muestras, seguidas por AOH (14%). AME sólo se detectó en 3 muestras (4%), en la misma proporción que ALT. ATX-I fue la toxina menos frecuente, presente en sólo 2 muestras de puré de tomate (3%).

Tabla IV.2. Incidencia individual y simultánea de micotoxinas de *Alternaria* en productos de tomate argentinos.

Contaminación natural con:	Incidencia simultánea	Frecuencia por toxina (%)	Frecuencia total (%)
Ninguna micotoxina (n=44)	-	-	60,3
Una micotoxina (n=21)	ALT	2,7	28,8
	AOH	5,5	
	AXT-I	2,7	
	TEN	8,2	
	TeA	9,6	
Dos micotoxinas (n=5)	TEN-AOH	1,4	6,8
	AOH-AME	2,7	
	TEN-TeA	1,4	
	AOH-TeA	1,4	
Tres micotoxinas (n=3)	ALT-TEN-AOH	1,4	4,1
	TEN-AOH-TeA	1,4	
	TEN-AOH-AME	1,4	

ALT: altenueno, **AOH:** alternariol; **AME:** alternariol monometil éter; **ATX-I:** altertoxina-I; **TEN:** tentoxina; **TeA:** ácido tenuazónico.

En la **Figura IV.2** se muestran las concentraciones y niveles promedio de cada toxina de *Alternaria* detectada en los productos de tomate argentinos, mediante gráficos de caja y bigotes. Se observa que la toxina TeA presentó los mayores niveles de contaminación, con un rango de concentraciones entre 211,4 y 495,7 µg/kg y un promedio de 342,8 µg/kg. Le sigue en orden decreciente de concentraciones la toxina ATX-I, con un promedio de 190,4 µg/kg, mientras que ALT presentó un promedio de 59,8 µg/kg. Las toxinas AOH, AME y TEN se detectaron en menores niveles, con promedios de 40,7, 27,8 y 5,2 µg/kg respectivamente. Particularmente TEN exhibió el rango más acotado, de 3,7 a 6,8 µg/kg entre las muestras positivas.

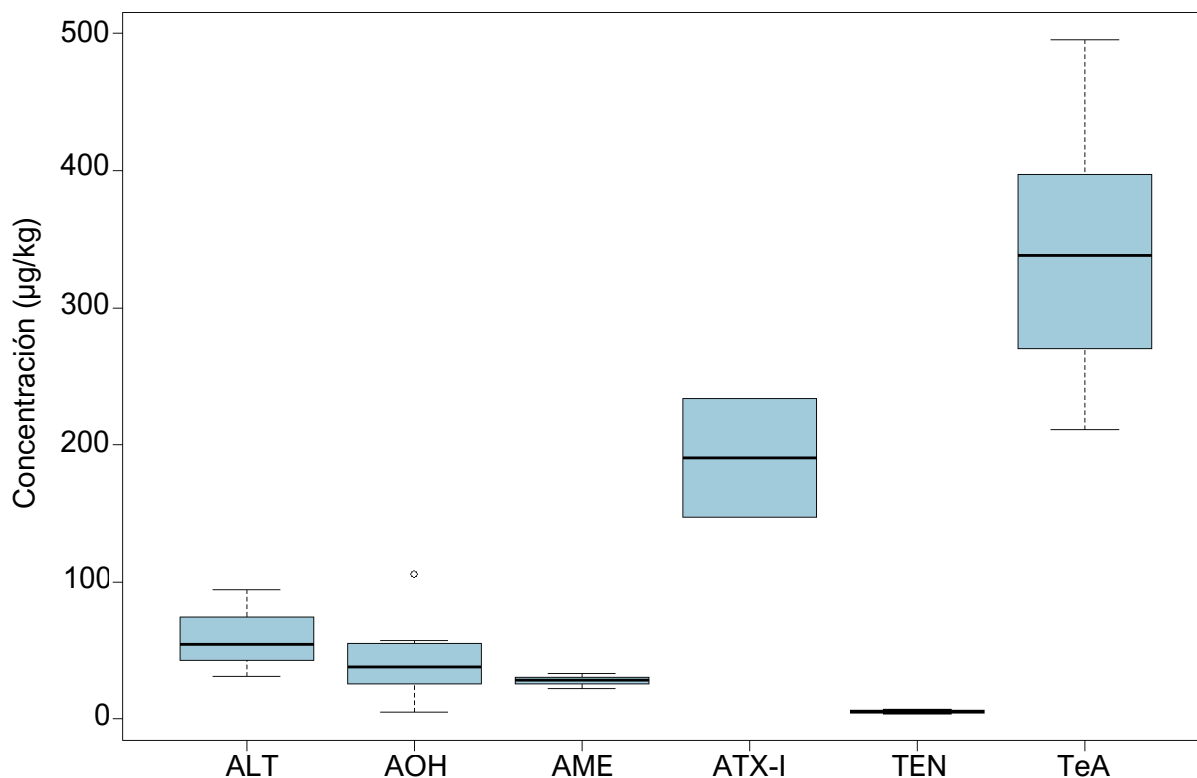


Figura IV.2. Concentración ($\mu\text{g/kg}$) de cada toxina de *Alternaria* detectada en productos de tomate argentinos. **ALT**: altenueno, **AOH**: alternariol; **AME**: alternariol monometil éter; **ATX-I**: altertoxina-I; **TEN**: tentoxina; **TeA**: ácido tenuazónico.

Se observaron diferencias en los patrones de contaminación con toxinas de *Alternaria* entre los distintos tipos de productos derivados de tomate analizados (**Tabla IV.3**). Los purés presentaron la mayor frecuencia de contaminación sobre el total de muestras positivas (62%), seguidos por los tomates enteros pelados (17%), triturados (14%) y extractos (7%). No se detectó presencia de toxinas en salsas ni pulpas. El puré de tomate fue el único producto en el que se hallaron las 6 toxinas estudiadas, siendo además el único donde se encontraron ALT, AME y ATX-I. Asimismo, la máxima concentración de TeA se registró en una muestra de puré de tomate (495,7 $\mu\text{g/kg}$). En los tomates pelados enteros, la toxina más frecuente fue TEN (27% de positividad), mientras que TeA sólo se detectó en 1 de las 13 muestras analizadas (211,4 $\mu\text{g/kg}$). Por su parte, los tomates triturados presentaron bajos niveles de AOH y TEN, con altos niveles de TeA (338,2 $\mu\text{g/kg}$) en un caso. Finalmente, de las muestras de extractos de tomate, solo una resultó positiva para AOH y otra para TeA, ambas a concentraciones elevadas.

Tabla IV.3. Presencia natural de micotoxinas de *Alternaria* en productos de tomate adquiridas en el mercado argentino.

Producto de tomate ¹		ALT	AOH	AME	ATX-I	TEN	TeA
Puré (n = 38) (n ⁺ =18)	Muestras positivas	3 (8%)	7 (18%)	3 (8%)	2 (5%)	5 (13%)	8 (21%)
	Rango (µg/kg)	30,8 – 94,3	25,8 – 57,1	22,3 – 33,1	146,8 – 233,9	4,2 – 6,7	255,4 – 495,7
	Promedio (µg/kg)	59,8	41,6	27,8	190,4	5	347,5
Tomates enteros pelados (n =15) (n ⁺ =5)	Muestras positivas	–	–	–	–	4 (27%)	1 (7%)
	Rango (µg/kg)	–	–	–	–	3,7 ² – 6,8	211,4
	Promedio (µg/kg)	–	–	–	–	5,7	211,4
Tomates triturados (n =13) (n ⁺ =4)	Muestras positivas	–	2 (15%)	–	–	2 (15%)	1 (8%)
	Rango (µg/kg)	–	4,7 – 5,4	–	–	3,7 ² – 5,5	338,2
	Promedio (µg/kg)	–	5,1	–	–	4,6	338,2
Extractos de tomate (n = 7) (n ⁺ =2)	Muestras positivas	–	1 (14%)	–	–	–	1 (14%)
	Rango (µg/kg)	–	105,3	–	–	–	442
	Promedio (µg/kg)	–	105,3	–	–	–	442
Total (n = 79) (n ⁺ =29)	Muestras positivas	3 (4%)	10 (13%)	3 (4%)	2 (3%)	11 (14%)	11 (14%)
	Rango (µg/kg)	30,8 – 94,3	4,7 – 105,3	22,3 – 33,1	146,8 – 233,9	3,7 ² – 6,8	211,4 – 495,7
	Promedio (µg/kg)	59,8 ^a	50,7 ^a	27,8 ^a	190,4 ^b	5,1 ^a	334,8 ^c

ALT: altenueno, **AOH:** alternariol; **AME:** alternariol monometil éter; **ATX-I:** altertoxina-I; **TEN:** tentoxina; **TeA:** ácido tenuazónico. –: toxinas no detectadas. El rango y el promedio fueron calculados en base a las muestras positivas (n⁺). Las concentraciones promedio con el mismo superíndice no son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).

¹Las muestras de salsa de tomate (n = 4) y pulpa de tomate (n = 2) no se muestran ya que en ninguna se detectaron las toxinas analizadas.

²Valor entre el LOD y LOQ

Según los resultados del análisis de varianza (**Tabla IV.4**) sobre los niveles de micotoxinas de *Alternaria* cuantificados entre los distintos productos derivados de tomate, indicaron que tanto el factor micotoxinas como el factor tipo de producto tuvieron un efecto significativo sobre las concentraciones de toxinas en los productos de tomate. El factor micotoxinas mostró un efecto más marcado ($p < 0,0001$) en comparación con el tipo de producto ($p = 0,0335$). La interacción entre ambos factores no resultó significativa ($p = 0,1989$), lo que sugiere que el efecto de las micotoxinas sobre las concentraciones fue independiente del tipo de producto.

La prueba de Tukey para las micotoxinas reveló que las concentraciones de TeA fueron significativamente superiores al resto, con una media de 334,8 µg/kg, seguida por ATX-I con 190,4 µg/kg. Las toxinas ALT, AOH, AME y TEN presentaron concentraciones medias significativamente menores, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas, con valores entre 5,1 y 59,8 µg/kg.

En cuanto al factor tipo de producto, la prueba de Tukey mostró que el extracto de tomate presentó concentraciones significativamente más altas, con una media de 273,7 µg/kg, en comparación con los otros tipos de productos (Tomate entero pelado, Puré de tomate y Tomate triturado), que no difirieron significativamente entre sí, con medias entre 108,6 y 115,9 µg/kg.

Tabla IV.4. Análisis de varianza (ANOVA) de la ocurrencia natural de micotoxinas de *Alternaria* en productos de tomate.

Origen de las variaciones	GL	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Micotoxinas	5	800283	160057	77,74	<0,0001
Productos	3	20714	6905	3,35	0,0335
Micotoxinas x productos	4	13309	3327	1,62	0,1984
Residuos	27	55586	2059		

Micotoxinas: **ALT**: altenueno, **AOH**: alternariol; **AME**: alternariol monometil éter; **ATX-I**: altertoxina-I; **TEN**: tentoxina; **TeA**: ácido tenuazónico. Productos: Puré de tomate, Tomate entero pelado, Tomate triturado y Extracto de tomate.

En el **Anexo VI**, se muestra el listado de todos productos procesados de tomate analizados con las concentraciones (µg/kg) detectadas de cada micotoxina.

IV.4 Discusión

En el presente trabajo se detectaron 6 toxinas de *Alternaria* (ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA). El método aplicado fue originalmente desarrollado y validado por Van de Perre et al. (2014) en tomates y derivados. A pesar de que los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos en este estudio fueron superiores a los reportados en publicaciones más recientes (Walravens et al., 2016a; Zwickel, Klaffke, et al., 2016) estos valores se encuentran por debajo de las recomendaciones establecidas por la Comisión Europea para las toxinas AOH, AME y TeA, lo que lo vuelve apropiado para los fines del presente trabajo. Además, el método empleado presenta la ventaja de ser simple, relativamente económico y adaptable a los instrumentos disponibles a nuestro alcance.

En el presente estudio, ninguno de los analitos analizados pudo ser detectado en muestras de origen italiano destinadas al mercado argentino. Sin embargo, investigaciones realizadas en Italia reportaron frecuente contaminación de productos de tomate con TeA, con una predominancia casi excluyente de esta micotoxina y ausencia del resto, particularmente de los alternarios, cuya presencia en tomates suele ser frecuente. Lattanzio et al. (2022) recopilaban datos de incidencia en diversos alimentos y hallaron una contaminación generalizada de jugo y puré de tomate con TeA, en algunos casos a niveles considerablemente altos (hasta 485 µg/kg), pero no detectaron ALT, AOH, AME ni TEN en ningún producto analizado. A pesar de que reportaron una mayor frecuencia de TeA en productos de tomate, el nivel promedio fue menor que los encontrados en las muestras argentinas. Resultados similares obtuvieron Bertuzzi et al. (2021), centrados específicamente en muestras de pasta, salsa, pulpa de tomate y ketchup del norte de Italia. En este caso, TeA también fue la única toxina presente en muestras de pasta concentrada de tomate, salsa, pulpa y ketchup, con una alta incidencia, de entre 47,4 y 78,5% según el tipo de producto. La pasta concentrada de tomate fue el producto con mayores niveles y frecuencia de incidencia, pero la contaminación media (243 µg/kg) fue inferior a la del presente estudio (442 µg/kg). De Berardis et al. (2018) analizaron la presencia de estas toxinas en 47 muestras de productos de tomate provenientes de 21 productores diferentes de Italia. TeA resultó ser la única toxina encontrada por encima de los límites detectables, presente en solo tres muestras, con concentraciones que oscilaron entre

167 y 814 µg/kg. Por otro lado Puntischer et al. (2019), confirmaron el predominio de TeA (70%, máximo 691 µg/kg) en salsas de tomates italianos en el mercado austriaco, con niveles bajos de AOH, AME y TEN (máx. 20,8, 4,7 y 1,2 µg/kg respectivamente), resultando ser inferiores al promedio de los productos argentinos.

Si bien TeA parece ser la toxina de *Alternaria* predominante en productos de tomate italianos, se han detectado otras micotoxinas en muestras de distinto origen europeo. Estiarte et al. (2018) reportaron un 47% de muestras positivas para AOH (22,6-137,4 µg/kg) en concentrado de tomate español, mientras que AME no fue detectada. Similares resultados obtuvieron López et al. (2016) al encontrar bajos niveles de AOH y AME (50% de positivas) y 100% de contaminación con TeA (66-462 µg/kg) en salsas holandesas. En ambos estudios, los niveles fueron equiparables a este trabajo. Gotthardt et al. (2019) detectaron en Alemania una sopa de tomate con bajos niveles de AME y TeA, y una salsa con co-ocurrencia de AOH (54,2 µg/kg), AME (7,56 µg/kg), TEN (0,44 µg/kg) y TeA (505 µg/kg), superando la máxima concentración detectada en los productos argentinos. Walravens et al. (2016) reportaron en Bélgica un 100% de muestras de tomate positivas para TeA (hasta 333 µg/kg) y frecuente aparición de AOH, AME, TEN y ALT (21-86%, máx. 62 µg/kg). La co-ocurrencia de 4, 3 y 2 toxinas se observaron en el 8, 12 y 29% de las muestras, respectivamente. Aunque el nivel de TeA fue menor que nuestros resultados, la frecuencia de contaminación fue mucho mayor que en el presente estudio. Por último, la mayor diversidad en Europa fue registrada por Puntischer et al. (2019) en productos de Austria, Croacia e Italia. Se cuantificaron AOH, AME, ALT, TeA, TEN, ATX-I, ALP (Alterperilenol) y sus conjugados, además de ALT, que fue detectado, pero en niveles <LOQ. Nuevamente TeA fue la micotoxina mayoritaria (71%, 691 µg/kg), seguida por AME (55%) y AOH (30%). Se destaca en este estudio la primera detección de ATX-I y ALP en productos de tomate. En síntesis, a diferencia de los tomates italianos, una mayor variedad de toxinas de *Alternaria* suele hallarse en productos de otros países europeos, donde TeA continúa predominando.

Además, estudios recientes ponen de manifiesto la elevada incidencia de toxinas de *Alternaria* en productos derivados de tomate en el continente asiático. Según reportan Ji et al. (2023), el análisis de 194 muestras de distintos procesados de tomate del

mercado chino reveló la presencia de estas micotoxinas emergentes en el 58,8% de los casos, en un 100% de muestras de polvo de tomate, 89,6% de salsas de tomate, 82,1% de ketchup, 46,7% de jugos de tomate y 20% de tomates deshidratados, con una predominancia de TeA, detectada en el 56,7% de las muestras en niveles de hasta 7985 µg/kg. Además, el 39,2% de las muestras positivas presentaron incidencia simultánea de más de una micotoxina, siendo la combinación de AME+AOH+TeA la más frecuente. Finalmente, el trabajo de Xu et al. (2024) analizó 174 productos derivados de tomate del mercado chino, reportando contaminación con al menos una toxina en el 95% de las muestras, nuevamente con predominancia de TeA en concentraciones máximas de 770 µg/kg; para AOH y AME se cuantificaron valores máximos de 27,2 y 38,5 µg/kg respectivamente y para TEN 8,4 µg/kg.

Si bien TeA ha demostrado ser ubicua a nivel global, la distribución y concentraciones relativas del resto de las toxinas de *Alternaria* parecen responder a factores regionales específicos de cada área de producción y procesamiento que no han sido aun completamente dilucidados. Los perfiles de toxinas de las poblaciones locales de hongos productores podrían jugar un rol determinante, constituyendo la primera fuente de variación, a las que se sumarían después las condiciones ambientales distintivas de cada zona (Alizadeh et al., 2022; Bacha et al., 2023b; Nagda & Meena, 2024).

Aunque los productos de tomate argentinos también evidenciaron un predominio de TeA, su incidencia resultó menor al promedio global. No obstante, fue la única toxina detectada de forma ubicua en casi todos los productos (excepto salsas y pulpas), alcanzando las mayores concentraciones en comparación con el resto (495,7 µg/kg). TEN exhibió una frecuencia similar, pero sin presencia en extractos de tomate, y con niveles netamente inferiores (máx. 6,8 µg/kg), aunque equiparables a reportes previos. Estudios europeos señalan medias <10 µg/kg para AOH. El promedio en los productos analizados en este trabajo fue de 50,7 µg/kg, con un máximo de 105,3 µg/kg en un extracto de tomate. Considerando el máximo de 10 µg/kg de AOH recomendado por la EFSA en estos alimentos, los valores hallados resultan preocupantes. Algunas de las muestras positivas de puré y extractos de tomate superaron dicho umbral. Mientras

que en todas las muestras en que se cuantificó AME, esta toxina superó la concentración máxima recomendada de 5 µg/kg (**Tabla IV.5**).

Tabla IV.5. Productos de tomate que superan los niveles de concentración de toxinas recomendada por la EFSA (AOH = 10 µg/kg; AME = 5 µg/kg).

Micotoxina	Tipo de producto	Código	Concentración (µg/kg)
AOH	Puré de tomate	TPM024	25,8
	Puré de tomate	TPM040	31,1
	Puré de tomate	TPM066	36,1
	Puré de tomate	TPM063	39,7
	Puré de tomate	TPM031	46,3
	Puré de tomate	TPM060	55,3
	Puré de tomate	TPM018	57,1
	Extracto de tomate	TPM047	105,3
AME	Puré de tomate	TPM060	22,3
	Puré de tomate	TPM040	28,1
	Puré de tomate	TPM024	33,1

AOH: Alternariol, **AME:** Alternariol monometil éter.

El último antecedente sobre toxinas de *Alternaria* en productos de tomate en Argentina fue un estudio realizado por Terminiello et al. (2006), reportando un 49% de muestras de tomate argentinas contaminadas con AOH, AME o TeA. Si bien las tasas de positividad para TeA y AME resultaron superiores a este trabajo (29% y 26% respectivamente), solo el 6% evidenció presencia de AOH. La principal divergencia radica en los niveles cuantificados en las muestras positivas, significativamente más elevados en aquel momento: TeA 39-4021 µg/kg; AOH 187-8756 µg/kg; AME 84-1734 µg/kg. Estos máximos superan en 8, 83 y 52 veces, respectivamente, a los detectados en el presente estudio. La significativa mejora en cuanto a la calidad sanitaria de los productos de tomate en los últimos 15 años podría atribuirse a diversos factores, como la incorporación reciente de límites para varias micotoxinas (Resolución Conjunta 22/2019, RESFC-2019-22-APN-SRYGS#MSYDS) al Código Alimentario Argentino (CAA, 2024), incrementando la vigilancia en distintos productos procesados del país. Los resultados sugieren un impacto positivo de las regulaciones sobre la gestión de riesgos en la industria local. Si bien las toxinas de *Alternaria* aún no están legisladas, productores y consumidores han tomado conciencia sobre el riesgo de ingerir alimentos enmohecidos o procesados a partir de materias primas contaminadas. En productos de tomate, la única herramienta de control aplicada actualmente en

Argentina es el recuento de mohos por el método de Howard-Stephenson (HMC), un método microscópico para cuantificar fragmentos fúngicos (Horwitz, 1975; Howard & Stephenson, 1917). Su objetivo es monitorear la contaminación fúngica en la materia prima mediante un límite de fragmentos fúngicos (micelio y/o esporas) en el producto final. Sin embargo, presenta baja precisión, repetibilidad y sensibilidad variable según especies. Al detectar hongos inespecíficos, no mantiene correlación con la presencia de micotoxinas en el producto. Por tanto, se requieren controles más eficaces para garantizar la inocuidad alimentaria.

Los datos sobre la presencia natural de toxinas de *Alternaria* en alimentos resultan necesarios para evaluar la exposición dietaria de la población a dichos contaminantes. Como confirma este estudio, existen diferencias geográficas en los perfiles de contaminación, que pueden atribuirse a factores ambientales, agronómicos y procesos industriales particulares de cada región. Los resultados pueden además variar en el tiempo ante modificaciones de dichas condiciones. Por ende, se requiere información actualizada para estimar los riesgos potenciales para la población.

Argentina posee un patrón alimentario con elevado consumo de tomates y sus derivados. Si bien según la FAO un adulto promedio ingirió 34 g/día de tomates frescos en 2019, no se dispone de datos sobre procesados excepto pasta y tomates pelados. Considerando el alto consumo local de purés, entre otros, es probable que la exposición a estas toxinas emergentes se encuentre subestimada. Se necesitan más estudios para realizar una adecuada evaluación de riesgo.

IV.5 Conclusiones

Los resultados del presente capítulo mostraron la presencia natural de seis toxinas de *Alternaria* (ALT, AOH, AME, ATX-I, TEN y TeA) en productos derivados de tomate comercializados en el mercado argentino. TeA fue la micotoxina más frecuente y la que se detectó en mayor concentración (495,7 µg/kg). También se detectó una incidencia significativa de AOH en altos niveles, superando en el 11% de las muestras los 10 µg/kg recomendados por la EFSA para esta toxina. Asimismo, el 4% excedió el nivel sugerido para AME de 5 µg/kg. Son necesarios más estudios para evaluar la exposición de la población a las toxinas de *Alternaria*. Adicionalmente, se deberían

incluir las formas modificadas de alternarioles en futuros relevamientos, evaluando en mayor profundidad su contribución al riesgo para la salud.

IV.6 Bibliografía

- Aichinger, G., Del Favero, G., Warth, B., & Marko, D. (2021). *Alternaria* toxins. Still emerging? Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20(5), 4390-4406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12803>
- Alizadeh, A., Shakeri, G., Marhamati, M., & Afshari, A. (2022). A systematic review on the diversity and importance of mycotoxins in tomato and derived products. CABI Reviews. <https://doi.org/10.1079/cabireviews202217015>
- Andersen, B., & Frisvad, J. C. (2004). Natural Occurrence of Fungi and Fungal Metabolites in Moldy Tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(25), 7507-7513. <https://doi.org/10.1021/jf048727k>
- Andersen, B., Nielsen, K. F., Fernández Pinto, V., & Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. International Journal of Food Microbiology, 196, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.11.029>
- Arcella, D., Eskola, M., & Gómez Ruiz, J. A. (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. EFSA Journal, 14(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>
- Bacha, S. A. S., Li, Y., Nie, J., Xu, G., Han, L., & Farooq, S. (2023). Comprehensive review on patulin and *Alternaria* toxins in fruit and derived products. Frontiers in Plant Science, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1139757>
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Pietri, A., & Giorni, P. (2021). *Alternaria* toxins in tomato products in Northern Italy in the period 2017-2019. Food Additives & Contaminants: Part B, 14(3), 170-176. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1895325>
- Chen, Q. F., Zhou, M., Yang, T., Chen, X. Z., Wang, C., Zhang, G. L., & Li, G. Y. (2011). Secondary metabolites from fungus *Alternaria* sp. CIB 108. Chinese Chemical Letters, 22(10), 1226-1228. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2011.05.036>
- Código Alimentario Argentino. (2024). C.A.A. En Capítulo XI. Alimentos vegetales. Codigo Alimentario Argentino. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/marco/CAA/Capitulo_11.htm
- Crudo, F., Aichinger, G., Mihajlovic, J., Varga, E., Dellaflora, L., Warth, B., Dall'Asta, C., Berry, D., & Marko, D. (2021). In vitro interactions of *Alternaria* mycotoxins, an emerging class of food contaminants, with the gut microbiota: a bidirectional relationship. Archives of Toxicology, 95(7), 2533-2549. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03043-x>
- da Cruz Cabral, L., Rodriguero, M., Stenglein, S., Fog Nielsen, K., & Patriarca, A. (2017). Characterization of small-spored *Alternaria* from Argentinean crops through a polyphasic approach. International Journal of Food Microbiology, 257, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.026>
- De Berardis, S., De Paola, E. L., Montevecchi, G., Garbini, D., Masino, F., Antonelli, A., & Melucci, D. (2018). Determination of four *Alternaria alternata* mycotoxins by

- QuEChERS approach coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in tomato-based and fruit-based products. *Food Research International*, 106(January), 677-685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.032>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- Estiarte, N., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). Occurrence of *Alternaria* mycotoxins and quantification of viable *Alternaria* spp. during the food processing of tomato products in Spain. *World Mycotoxin Journal*, 1-10. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2282>
- European Commission. (2022). Recomendación (UE) 2022/553 de la comisión de 5 de abril de 2022 sobre el seguimiento de la presencia de toxinas de *Alternaria* en los alimentos. En *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Fan, K., Guo, W., Huang, Q., Meng, J., Yao, Q., Nie, D., Han, Z., & Zhao, Z. (2021). Assessment of Human Exposure to Five *Alternaria* Mycotoxins in China by Biomonitoring Approach. *Toxins*, 1-11.
- Gotthardt, M., Asam, S., Gunkel, K., Moghaddam, A. F., Baumann, E., Kietz, R., & Rychlik, M. (2019). Quantitation of six *Alternaria* toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00109>
- Horwitz, W. (1975). Official methods of analysis (Vol. 222). Association of Official Analytical Chemists Washington, DC.
- Howard, B. J., & Stephenson, C. H. (1917). Microscopical studies on tomato products (Número 581). US Department of Agriculture.
- Ji, X., Deng, T., Xiao, Y., Jin, C., Lyu, W., Wu, Z., Wang, W., Wang, X., He, Q., & Yang, H. (2023). Emerging *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in tomatoes and derived tomato products from the China market: Occurrence, methods of determination, and risk evaluation. *Food Control*, 145, 109464. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109464>
- Lattanzio, V. M. T., Verdini, E., Sdogati, S., Bibi, R., Ciasca, B., & Pecorelli, I. (2022). Monitoring *Alternaria* toxins in Italian food to support upcoming regulation. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 15(1), 42-51. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.2000505>
- Liu, Z., Zhao, X., Wu, L., Zhou, S., Gong, Z., Zhao, Y., & Wu, Y. (2020). Development of a sensitive and reliable UHPLC-MS/MS method for the determination of multiple urinary biomarkers of mycotoxin exposure. *Toxins*, 12(3), 1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins12030193>
- López, P., Venema, D., De Rijk, T., De Kok, A., Scholten, J., Mol, H., & De Nijs, M. (2016). Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control*, 60, 196-204. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2015.07.032>

- Nagda, A., & Meena, M. (2024). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: Occurrence, biosynthesis, toxicity, analytical methods, control and detoxification strategies. *Food Control*, 158, 110211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110211>
- Patriarca, A., da Cruz Cabral, L., Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Andersen, B. (2019). Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.022>
- Pavicich, M. A., De Boevre, M., Vidal, A., Iturmendi, F., Mikula, H., Warth, B., Marko, D., De Saeger, S., & Patriarca, A. (2020). Fate of free and modified *Alternaria* mycotoxins during the production of apple concentrates. *Food Control*, 118(April), 107388. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107388>
- 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(1), 60-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.018>
- Puntscher, H., Cobankovic, I., Marko, D., & Warth, B. (2019). Quantitation of free and modified *Alternaria* mycotoxins in European food products by LC-MS/MS. *Food Control*, 102(December 2018), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.019>
- Qiao, X., Zhang, J., Yang, Y., Yin, J., Li, H., Xing, Y., & Shao, B. (2020). Development of a simple and rapid LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of five *Alternaria* mycotoxins in human urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1144(January), 122096. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122096>
- Sanzani, S., Djenane, F., Incerti, O., Admane, N., Mincuzzi, A., & Ippolito, A. (2021). Mycotoxigenic fungi contaminating greenhouse-grown tomato fruit and their alternative control. *Revista Europea de Fitopatología*, Volume 160, 287-300. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02240-9>
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.006>
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(18), 2649-2659. <https://doi.org/10.1002/rcm.2640>
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., & Fernandez Pinto, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22(4), 236-240. <https://doi.org/10.1007/BF02946748>
- Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. (2014). Screening

of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. Food Control, 37, 165-170. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.09.034>

- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Devos, T., Njumbe Ediage, E., Diana Di Mavungu, J., Jacxsens, L., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L., & De Saeger, S. (2016). Validated UPLC-MS/MS Methods to Quantitate Free and Conjugated *Alternaria* Toxins in Commercially Available Tomato Products and Fruit and Vegetable Juices in Belgium. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(24), 5101-5109. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01029>
- Xu, Q., Adyatni, I., & Reuhs, B. (2018). Effect of Processing Methods on the Quality of Tomato Products. Food and Nutrition Sciences, 09(02), 86-98. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.92007>
- Xu, W., Han, X., Zhang, J., Xu, J., & Bai, L. (2024). Occurrence and Co-occurrence of *Alternaria* toxins in tomato-based products collected in China. Food Control, 155, 110030. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110030>
- Zwickel, T., Klaffke, H., Richards, K., & Rychlik, M. (2016). Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification of various *Alternaria* toxins in wine, vegetable juices and fruit juices. Journal of Chromatography A, 1455, 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.066>

**CAPÍTULO V. Detección molecular del gen
biosintético de la toxina AAL en aislamientos de
Alternaria spp. de tomate**

V.1 Introducción

Como se reportó en los Capítulos II y III de este trabajo, *Alternaria* es uno de los géneros más abundantes que invade los tomates. Los frutos del tomate se infectan fácilmente debido a su piel blanda y tejidos débiles que permiten una rápida penetración y crecimiento. Mientras que *A. arborescens* (syn. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersci*) es una de las especies responsables del moho negro en frutos de tomate, es también el agente causal del cancro del tallo del tomate, siendo capaz de causar infección primaria de hojas, tallos y frutos en cultivares susceptibles (Mesbah et al., 2000; Somma et al., 2011b).

Ciertas especies de *Alternaria* son capaces de producir varias micotoxinas en plantas infectadas y en productos agrícolas (Aichinger et al., 2021b). Estas toxinas se clasifican en dos categorías principales: toxinas no específicas de hospedador (nHST) y toxinas específicas de hospedador (HST) (Kodama, 2019; Li et al., 2020; Meena et al., 2017). Las HST son de particular interés, ya que intervienen en interacciones altamente compatibles y específicas con las plantas hospedadoras susceptibles, siendo determinantes para el desarrollo de la enfermedad (Meena et al., 2017; Meena & Samal, 2019). Estas HSTs y los patotipos productores se distinguen por provocar sintomatologías necróticas características en sus huéspedes blanco, tanto por infección del patógeno como por aplicación de la toxina purificada (Izumi et al., 2012; D. J. Siler & Gilchrist, 1983). Se han descrito diversos patotipos de *Alternaria alternata* capaces de producir las correspondientes HSTs: patotipo tomate (toxina AAL), manzana (toxina AM), limón (toxina ACR), mandarina (toxina ACT), pera japonesa (toxina AK), tabaco (toxina AT) y frutilla o fresa (toxina AF) (Ali et al., 2023; Li et al., 2020; Wang et al., 2022).

Las toxinas AAL, producidas por el patotipo tomate de *A. arborescens* (syn. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersci*), son HSTs de gran importancia en la patogenicidad de este hongo en plantas de tomate. Como señalan Akimitsu et al. (2014), actúan como factores de patogenicidad, siendo requeridas para invadir el tejido y causar enfermedades. Además, la sensibilidad de las plantas a las toxinas AAL está directamente relacionada con su susceptibilidad al patógeno productor de dichas

toxinas (Abbas et al., 1995; Ali et al., 2023; Brandwagt et al., 1998, 2000; Kodama, 2019).

Estructuralmente, las toxinas AAL están relacionadas con las fumonisinas producidas por especies de *Fusarium* (**Figura V.1**). Ambas son micotoxinas análogas a la esfinganina que causan inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos *in vitro* y son tóxicas para algunas especies de plantas y líneas celulares de mamíferos (Abbas et al., 1995; J. Chen et al., 2020; Yamagishi et al., 2006).

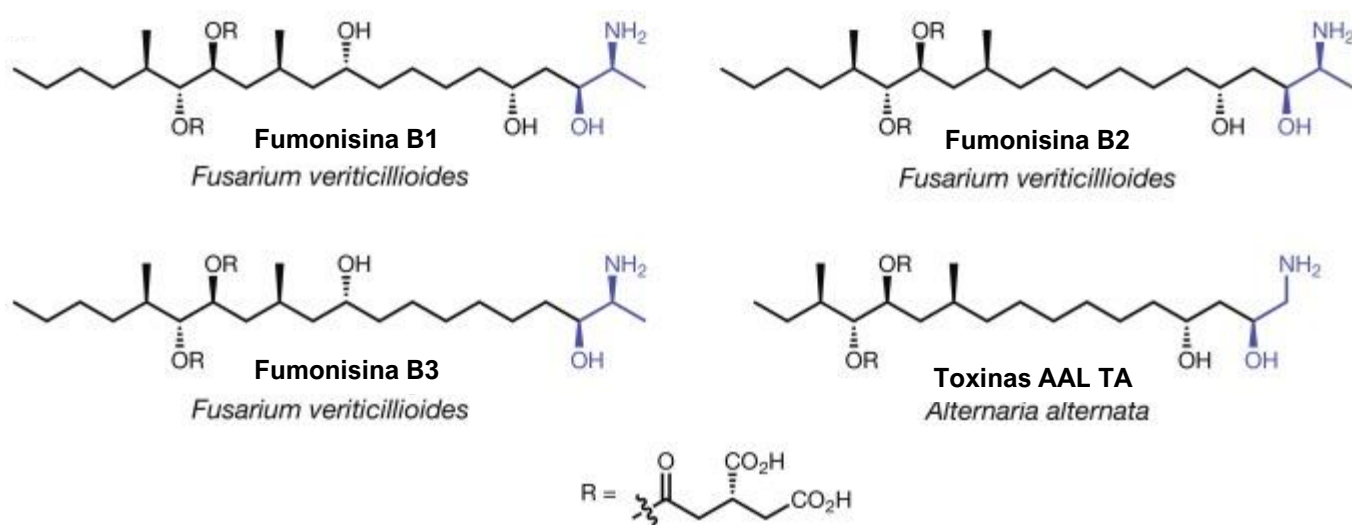


Figura V.1. Estructuras de fumonisinas y toxinas AAL TA (Go & Tang, 2020)

Los genes que codifican la síntesis de las HSTs en *Alternaria* usualmente se hallan agrupados en cromosomas dispensables condicionales (CDCs). Estos CDCs pueden intercambiarse horizontalmente entre distintos patotipos mediante transferencia génica o cromosómica, generando cepas patogénicas de amplio rango de hospedadores con combinaciones de genes de virulencia (Ali et al., 2023; Kodama, 2019; Li et al., 2020).

Los genes responsables de la síntesis de las toxinas AAL se localizan agrupados en el locus Asc presente en el cromosoma 3 del patotipo tomate de *A. arborescens* (syn. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersci*) (Akamatsu, 2003; Clouse, 1987; Tsuzuki et al., 2020). En particular, el gen ALT1, que codifica una policétido sintasa (PKS),

desempeña un papel clave en la biosíntesis de estas HSTs (P. Adhikari et al., 2017b; Meena et al., 2017; Zhu et al., 2008).

La identificación y caracterización de los genes involucrados en la producción de las toxinas AAL es fundamental para comprender las bases moleculares de la patogenicidad de este importante fitopatógeno (Yamagishi et al., 2006). Además, como sugieren Tsuge et al. (2016) y Tsuzuki et al. (2020), las HSTs como las toxinas AAL podrían utilizarse como agentes selectivos en la selección *in vitro* a nivel celular para desarrollar tomates resistentes a *Alternaria* y sus toxinas.

Por lo cual, el objetivo de este capítulo fue detectar molecularmente el gen ALT1, responsable de la biosíntesis de las toxinas específicas de hospedador AAL, en aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de frutos de tomate.

V.2 Materiales y Métodos

V.2.1 Muestras

Se utilizó una submuestra de 50 aislamientos de *Alternaria* spp. de frutos de tomate, los cuales fueron previamente identificados a nivel de especie mediante marcadores moleculares según lo descrito en el Capítulo III. Adicionalmente, se emplearon cepas patrón de las especies *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tenuissima* (EGS 34015), *A. alternata* (EGS 34016) y *A. infectoria* (EGS 27198 ex type).

V.2.2 Extracción de ADN

Los aislamientos seleccionados se transfirieron a placas de 55 mm que contenían medio Agar Papa Zanahoria (APZ) y se incubaron a 25°C durante 5 días en condiciones de oscuridad para evitar la esporulación y favorecer el desarrollo de micelio. El ADN total se aisló de aproximadamente 50 mg de micelio fresco en crecimiento activo, que se retiró de la placa raspando de forma superficial con la ayuda de un bisturí y fue posteriormente molido en un microtubo de 1,5 ml con un mortero de propileno, utilizando el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™ (ZymoResearch, Irvine, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN aislado se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) y las muestras se diluyeron con agua miliQ hasta una concentración final de 3 ng/μl.

V.2.3 Detección del gen ALT1

V.2.3.1 Amplificación de la región génica ALT1

Se amplificó la región ALT1 del ADN utilizando los marcadores moleculares A1, (5' CGAATCGCATCAGCTACGAA 3'; A2, (5' GATTGCACAGTGTGTATGCC 3') según Yamagishi et al. (2006).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Modelo B-86G, Marca Boeco) sobre un volumen total de 50 µl que contenía 5 µl de buffer de PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, cada uno de los dNTPs 0,2 mM, 0,025 U/µl de Taq DNA Polimerasa recombinante (Inbio Highway), 0,2 nM de cada marcador (Invitrogen™) y 3 ng de ADN genómico, llevado a volumen con agua miliQ.

El programa de PCR empezó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 40 ciclos a 95°C durante 15 s, annealing durante 30 s a 65°C, una extensión a 72°C durante 1,5 min y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-Boric-EDTA (TBE) teñido con GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, CA) con transiluminación UV (Uvitec Cambridge) al 70% utilizando una fuente de alimentación (Sigma Chemical Company) a 94 Voltios. La purificación y secuenciación de los productos de PCR fue realizada por Macrogen Inc (Seúl, Corea) utilizando los mismos cebadores que para la amplificación.

V.2.3.2 Procesamiento de datos

Los electroferogramas de ambas hebras de ADN se verificaron y las secuencias se ensamblaron utilizando el programa Vector NTI™ Advance 10 (Invitrogen). Posteriormente, las secuencias ensambladas se organizaron en una matriz junto con secuencias adicionales obtenidas de la base de datos GenBank, las cuales mostraron similitud según el análisis realizado con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Akagi et al., 2009, 2018). La matriz fue alineada utilizando el paquete de programas BioEdit v1994.10.3 de Clustal W (Thompson et al., 1994) asignando un costo de 15 a la apertura de la brecha y 6 a la extensión de la brecha.

V.3 Resultados

V.3.1 Detección del gen ALT1

V.3.1.1 Amplificación del gen ALT1

Se amplificó un fragmento génico de aproximadamente 1200 pares de bases correspondiente a la región ALT1 de *A. arborescens* (sinónimo *A. alternata* f. sp. *lycopersici*). Los productos resultantes se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa. Tal como se observa en la **Figura V.2**, se detectó la presencia de una banda de ~1200 pb en tres de los aislamientos analizados: la cepa patrón *A. arborescens* (EGS 39128), y dos aislamientos de tomate TPP117 y TPP173 identificados morfológica y molecularmente como *A. tomaticola* y *A. arborescens*, respectivamente. Por otro lado, en las cepas patrón *A. tenuissima* (EGS 34015), *A. alternata* (EGS 34016) y *A. infectoria* (EGS 27128 ex type), así como en el resto de los aislamientos de tomate analizados, no se obtuvo amplificación del gen ALT1 mediante el uso de los cebadores específicos empleados en este estudio.

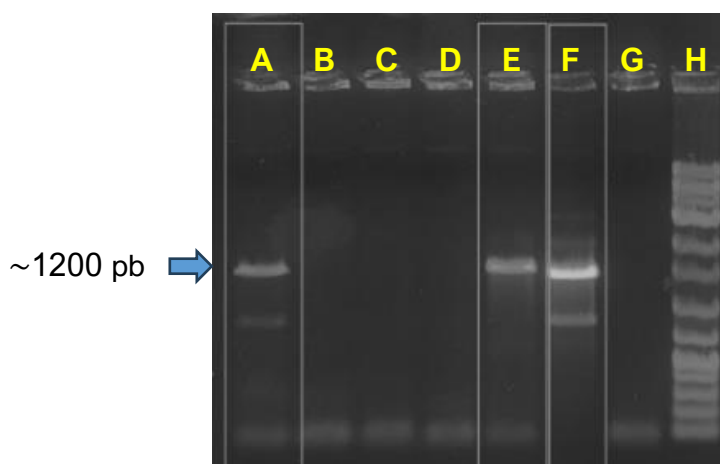


Figura V.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (TBE) de productos de PCR amplificados con cebadores para la región génica ALT1 en aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate. Calles **A:** *A. tomaticola* (TPP117), **B:** *A. tenuissima* (EGS 34015), **C:** *A. alternata* (EGS 34016) **D:** *A. infectoria* (EGS 27198 ex type). **E:** *A. arborescens* (TPP173) **F:** *A. arborescens* (EGS 39128). **G:** Blanco, **H:** Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen™). La flecha azul indica la banda de ~1200 pares de bases correspondiente al gen ALT1.

V.3.1.2 Secuenciación del gen ALT1

Se obtuvieron 3 secuencias de ~1200 pares de bases correspondientes a productos de PCR del gen ALT1. El análisis mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) frente a la base de datos GenBank permitió validar su identidad, con porcentajes de similitud de 98,96-100% respecto a secuencias previamente depositadas para el gen ALT1 de un aislamiento de *A. alternata* (As-27) (Siler & Gilchrist, 1983), obtenido a partir de cancro de tallo de tomate de origen estadounidense AB969680.1 (124657 pb) y AB465676.1 (668 pb) (Akagi et al., 2009, 2018). Como referencia adicional se empleó la secuencia parcial del gen FUM1 de *Fusarium bulbicola* KF415128.1 (662 pb) depositada por Proctor et al. (2013) que tuvo 73,4% de similitud con las secuencias analizadas. En la **Figura V.3** se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias del gen ALT1 para los aislamientos del presente estudio, con alta similitud con la región correspondiente al gen ALT1 presente en el grupo de genes responsables de la biosíntesis de toxinas AAL en *A. alternata* (AB969680.1), así como con el gen FUM1 de *F. bulbicola*.

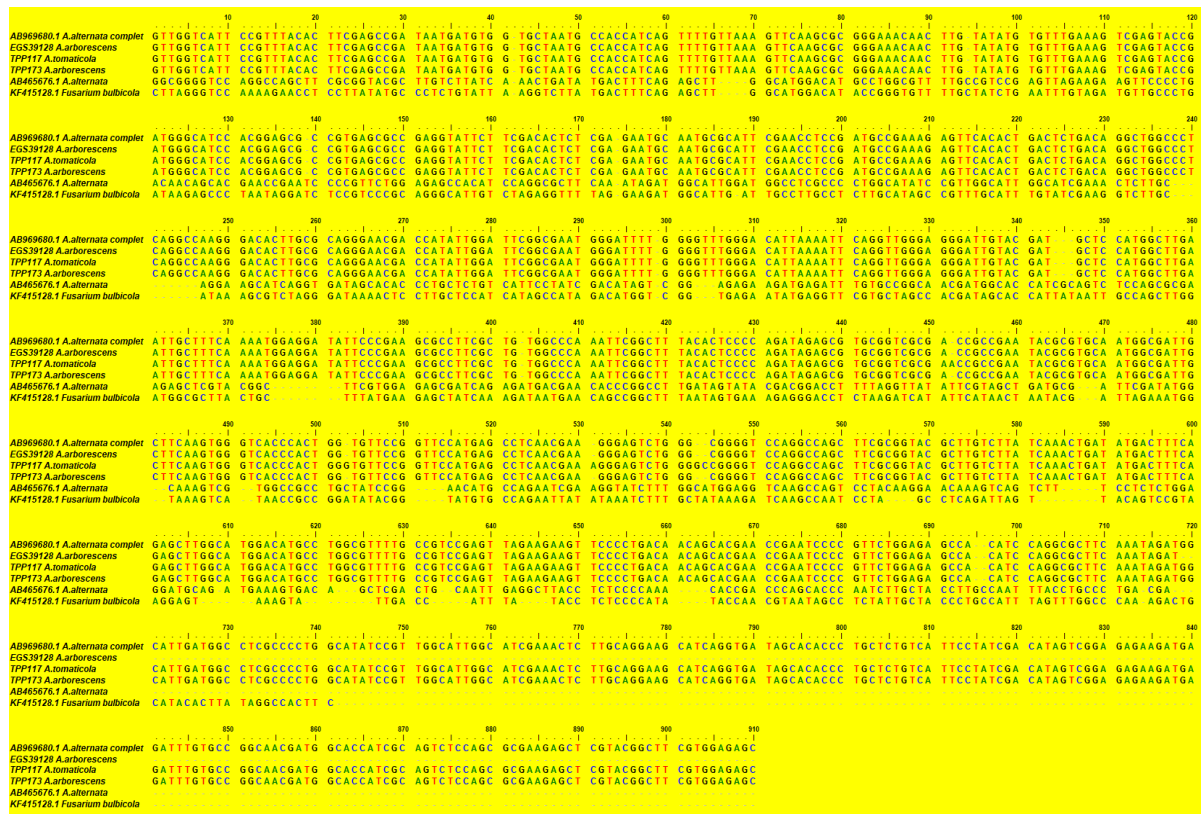


Figura V.3. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del gen ALT1 obtenidas en este estudio (EGS 39128, TPP117 y TPP173) con secuencias de referencia. Se incluye la secuencia parcial de ADN correspondiente al gen ALT1 de biosíntesis de las toxinas AAL en *A. alternata* (AB969680.1 - AB465676.1) y gen FUM1 de *Fusarium bulbicola* (KF415128.1).

En la **Figura V.4** se muestra el alineamiento de las secuencias del gen ALT1 obtenidas en este trabajo frente a la secuencia completa de 124657 pares de bases (GenBank AB969680.1) correspondiente al grupo de genes biosintéticos de toxinas AAL en *A. alternata* (Akagi et al., 2018). La secuencia del aislamiento TPP117 presenta un tramo de 1114 pares de bases que se alinea entre las posiciones 25448-26556 k con un 99.46% de identidad y solo 1 diferencia (mismatch). El aislamiento TPP173 contiene un fragmento de 1097 pb que se alinea desde 25459 hasta 26555 k, con un 99,6% de identidad y 4 mismatches. Finalmente, la cepa control EGS 39128 arrojó un tramo de 707 pb (25652-26358 k) alineado sin mismatches y 100% de identidad. En contraste, la similitud de estas secuencias con el gen FUM1 (KF415128.1) fue del 73,4%, con 127 mismatches, evidenciando una divergencia mayor.

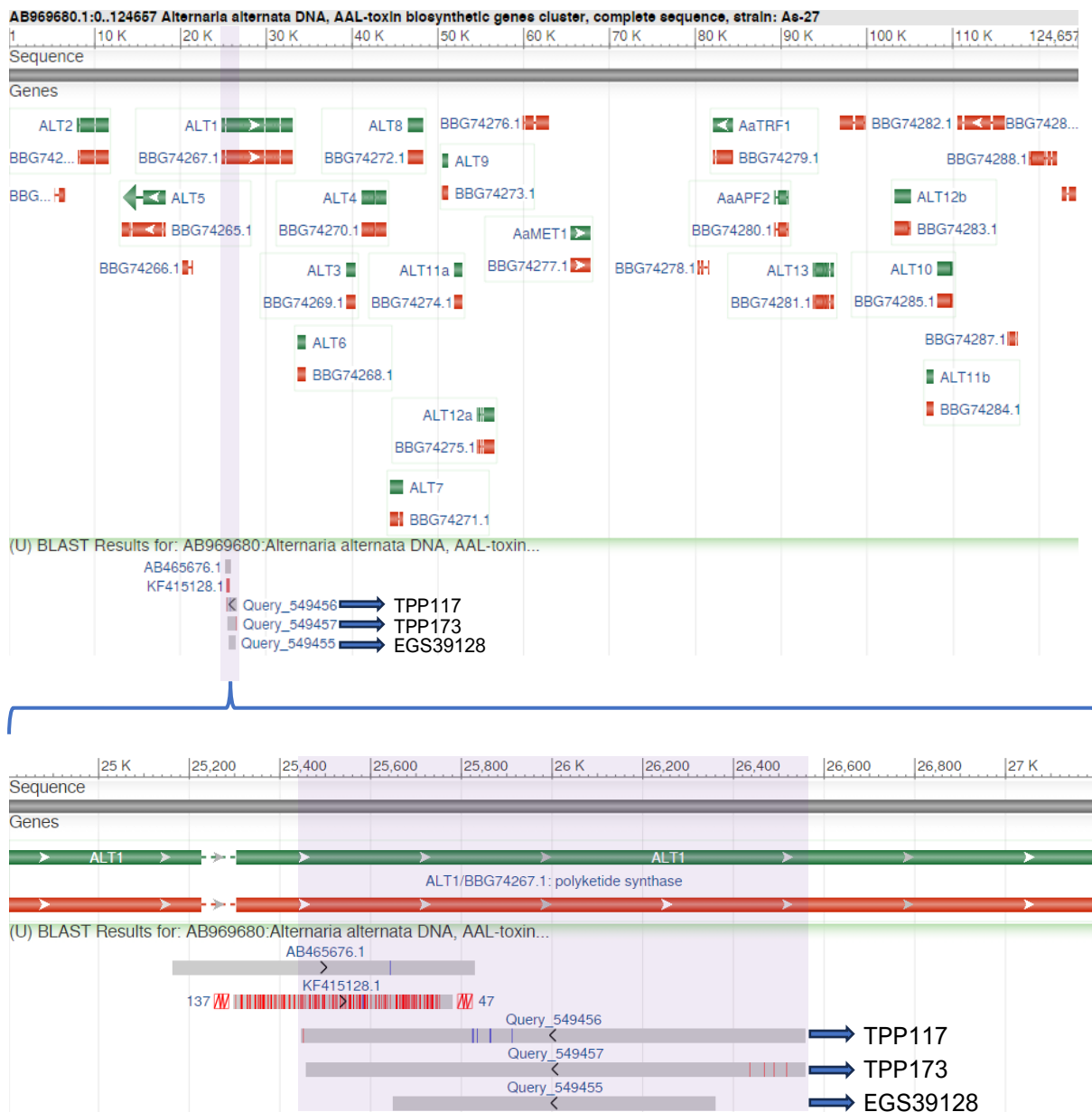


Figura V.4. Ubicación e identidad de secuencias ALT1 en el clúster de genes responsables la biosíntesis de la toxina AAL en *A. alternata* (AB969680.1). Sombreado violeta indica las posiciones de las secuencias de los aislamientos TPP117, TPP173 y la cepa patrón EGS 39128.

V.4 Discusión

En el presente trabajo se logró detectar la presencia del gen ALT1, involucrado en la biosíntesis de toxinas AAL, en 3 de los aislamientos (cepa patrón EGS 39128, TPP117 y TPP173) de *Alternaria* spp. obtenidos de frutos de tomate. La amplificación de un fragmento de ~1200 pb correspondiente a la región ALT1 y su posterior secuenciación, reveló un 99,4-100% de similitud con secuencias de referencia en GenBank para ALT1 de *A. alternata*. Esto confirmó la conservación de esta región

génica asociada a la ruta de síntesis de AAL (Akagi et al., 2009, 2018). Estos resultados concuerdan con la amplificación obtenida por Yamagishi et al. (2006), en donde se amplificó una banda de 1200 pares de bases de 6 aislamientos de *Alternaria alternata* patotipo tomate (As-27, H6, AL4, VU2001, O-229 y EGS 39128) aunque en este estudio las bandas no fueron secuenciadas, por lo que no se pudo comparar con los aislamientos del presente estudio. Los 6 aislamientos también produjeron la toxina AAL TA y además se comprobó su patogenicidad en hojas de planta de tomate.

El análisis de alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio con AB969680.1 obtuvo una alta cobertura e identidad; EGS 39128 presentó un 100% tanto de identidad como de cobertura, TPP117 mostró una cobertura del 99,6% y una identidad del 99,9%, y TPP173 exhibió una cobertura del 99,9% y una identidad del 99,5%. Por otro lado, en el alineamiento con la secuencia completa AB465676.1, a pesar de los altos porcentajes de similitud, los fragmentos alineados resultaron relativamente cortos. La cepa EGS 39128 presentó un 100% de identidad y una cobertura del 25%, TPP117 mostró una identidad del 99,9% y una cobertura del 34,4%, mientras que TPP173 exhibió una identidad del 100% y una cobertura del 16,8%.

Además, se incluyó en el análisis la secuencia KF415128.1 de *F. bulbicola* debido a la similitud estructural entre las toxinas AAL producidas por *A. arborescens* (patotipo tomate) y las fumonisinas sintetizadas por *Fusarium spp.* Ambas toxinas son compuestos análogos de la esfinganina y su biosíntesis está relacionada con la vía biosintética de los esfingolípidos (Caldas et al., 1998). La comparación de KF415128.1 con las secuencias de este estudio mostró que la cepa patrón EGS 39128 obtuvo una identidad del 82,9% y una cobertura del 10,7%, TPP117 alcanzó una identidad del 75,6% y una cobertura del 24,7%, mientras que TPP173 presentó una identidad del 75,6% y una cobertura del 25,1%.

Es importante destacar que las secuencias AB969680.1, AB465676.1 y KF415128.1 fueron las únicas que alinearon con las secuencias obtenidas en este trabajo al utilizar el algoritmo BLAST en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). GenBank forma parte de la Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos, que incluye la base

de datos de ADN de Japón (DDBJ) y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL). Estas organizaciones intercambian datos diariamente y reciben secuencias genéticas generadas en laboratorios de todo el mundo.

Li et al. (2009) demostraron la similitud estructural entre las toxinas AAL y las fumonisinas. Estas toxinas contienen una cadena policétida lineal dimetilada, pero difieren en la longitud de la cadena y las posiciones de metilación. Al transformar un mutante nulo de fumonisina de *Fusarium verticillioides* con el gen de la policétido sintasa de las toxinas AAL (ALT1), los metabolitos resultantes mantuvieron la longitud de la cadena y el patrón de metilación característicos de las fumonisinas. Este hallazgo sugiere que la sincronización y la regiospecificidad de la metiltransferasa de la policétido sintasa ALT1 podrían reprogramarse en este transformante de *Fusarium*. El estudio respalda la hipótesis de una posible transferencia horizontal de genes entre especies fúngicas, lo que podría explicar la similitud estructural y biosintética observada entre las toxinas AAL y las fumonisinas.

Por otra parte, Akagi (2009) propone que la capacidad de producir toxinas AAL e infectar una planta podría distribuirse potencialmente entre las cepas de *A. alternata* mediante la transferencia horizontal de un cromosoma de patogenicidad completo, lo que podría proporcionar un posible mecanismo por el cual surjan nuevos patógenos en la naturaleza. En este contexto, nuestro trabajo demuestra que los aislamientos de *Alternaria* spp. que contienen el gen ALT1 no se encuentran únicamente en la planta, sino también en los frutos. Estos resultados sugieren que las cepas salvajes de *A. arborescens* (TPP173) y *A. tomaticola* (TPP117) que contienen el gen ALT1 podrían haber ingresado de modo oportunista a los frutos, o utilizando las toxinas AAL como vehículo de infección dado que ya se encontraban presentes en la planta. Si bien las toxinas AAL resultan cruciales para la infección de tallo y hojas en plantas de tomate, su rol en la infección de frutos aún no ha sido descrita.

La detección del gen ALT1 en aislamientos obtenidos a partir de frutos de tomate resalta la importancia de este estudio, ya que proporciona evidencia de la presencia de cepas potencialmente patógenas para la planta en los frutos de tomate. Además, la identificación de este gen en aislamientos de *A. arborescens* y *A. tomaticola* amplía

el conocimiento sobre la distribución de la capacidad de producir toxinas AAL entre las especies de *Alternaria* asociadas al tomate.

V.5 Conclusiones

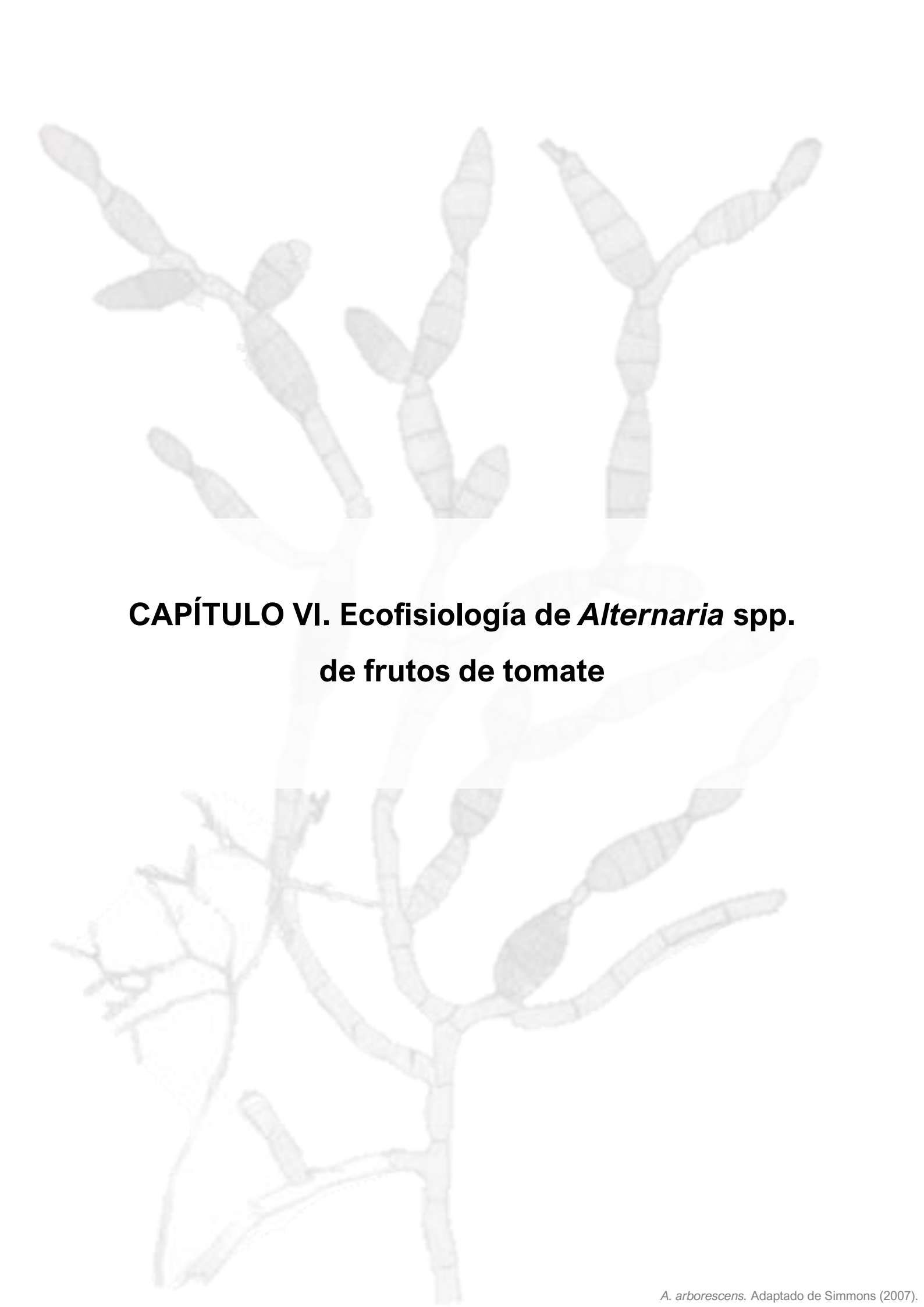
Se detectó el gen ALT1, responsable de la biosíntesis de la toxina específica de hospedador AAL, en aislamientos de *Alternaria* spp. obtenidos de frutos de tomate. La amplificación y secuenciación de un fragmento de ~1200 pb correspondiente a la región ALT1 confirmó la conservación de esta región génica asociada a la ruta de síntesis de AAL en la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) y dos aislamientos salvajes de *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). La detección del gen ALT1 en aislamientos obtenidos a partir de frutos de tomate proporciona evidencia de la presencia de cepas potencialmente patógenas para la planta y expande el espectro de especies de *Alternaria* con la capacidad de sintetizar dichas toxinas.

V.6 Bibliografía

- Abbas, H. K., Tanaka, T., & Duke, S. O. (1995). Pathogenicity of *Alternaria alternata* and *Fusarium moniliforme* and Phytotoxicity of AAL-toxin and Fumonisin B₁ on Tomato Cultivars. *Journal of Phytopathology*, 143(6), 329-334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1995.tb00270.x>
- Adhikari, P., Oh, Y., & Panthee, D. (2017). Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms18102019>
- Aichinger, G., Del Favero, G., Warth, B., & Marko, D. (2021). *Alternaria* toxins. Still emerging? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4390-4406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12803>
- Akagi, Y., Akamatsu, H., Otani, H., & Kodama, M. (2009). Horizontal Chromosome Transfer, a Mechanism for the Evolution and Differentiation of a Plant-Pathogenic Fungus. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1732-1738. <https://doi.org/10.1128/EC.00135-09>
- Akagi, Y., Akamatsu, H., Takao, K., Tsuge, T., & Kodama, M. (2018). AAL-toxin biosynthetic genes cluster in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB969680.1>
- Akamatsu, H. (2003). Characterization of a gene cluster for host-specific AAL-toxin biosynthesis in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Newsl*, 50, 355.
- Akimitsu, K., Tsuge, T., Kodama, M., Yamamoto, M., & Otani, H. (2014). *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. *Journal of General Plant Pathology*, 80(2), 109-122. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0498-7>
- Ali, S., Tyagi, A., Rajarammohan, S., Mir, Z. A., & Bae, H. (2023). Revisiting *Alternaria*-host interactions: New insights on its pathogenesis, defense mechanisms and control strategies. *Scientia Horticulturae*, 322, 112424. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112424>
- Brandwagt, B., Mesbah, L., Laurent, P., Takken, F., Kneppers, T., John, H., Nijkamp, J., & Hille, J. (1998). The Interaction of *Alternaria alternata* f.sp. *Lycopersici* and its AAL-Toxins with Tomato (pp. 317-330). https://doi.org/10.1007/978-94-011-5218-1_36
- Brandwagt, B., Mesbah, L., Takken, F., Laurent, P., Kneppers, T., Hille, J., & Nijkamp, H. (2000). A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B₁. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4961-4966. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4961>
- Caldas, E. D., Sadilkova, K., Ward, B. L., Jones, A. D., Winter, C. K., & Gilchrist, D. G. (1998). Biosynthetic Studies of Fumonisin B₁ and AAL Toxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4734-4743. <https://doi.org/10.1021/jf980210j>

- Chen, J., Li, Z., Cheng, Y., Gao, C., Guo, L., Wang, T., & Xu, J. (2020). Sphinganine-Analog Mycotoxins (SAMs): Chemical Structures, Bioactivities, and Genetic Controls. *Journal of Fungi*, 6(4), 312. <https://doi.org/10.3390/jof6040312>
- Clouse, S. D. (1987). Interaction of the asc Locus in F 8 Paired Lines of Tomato with *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and AAL-Toxin. *Phytopathology*, 77(1), 80. <https://doi.org/10.1094/phyto-77-80>
- Go, E. Bin, & Tang, Y. (2020). Fungal Highly-Reducing Polyketide Synthases and Associated Natural Products. En *Comprehensive Natural Products III* (pp. 333-364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14732-8>
- Izumi, Y., Ohtani, K., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T. L., & Akimitsu, K. (2012). A Polyketide Synthase Gene, ACRTS2, Is Responsible for Biosynthesis of Host-Selective ACR-Toxin in the Rough Lemon Pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(11), 1419-1429. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0155-R>
- Kodama, M. (2019). Evolution of pathogenicity in *Alternaria* plant pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, 85(6), 471-474. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00877-3>
- Li, J., Cornelissen, B., & Rep, M. (2020). Host-specificity factors in plant pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 103447. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103447>
- Li, Y., Shen, Y., Zhu, X., & Du, L. (2009). Introduction of the AAL-Toxin Polyketide Synthase Gene ALT1 into FUM1 -disrupted *Fusarium verticillioides* Produces Metabolites with the Fumonisin Methylation Pattern. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1328-1330. <https://doi.org/10.1021/np900193j>
- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2017). *Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>
- Meena, M., & Samal, S. (2019). *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Reports*, 6, 745-758. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>
- Mesbah, L. A., Van Der Weerden, G. M., Nijkamp, H. J. J., & Hille, J. (2000). Sensitivity among species of Solanaceae to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Plant Pathology*, 49(6), 734-741. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00499.x>
- Proctor, R. H., Van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., van der Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A., & Ward, T. J. (2013). Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Molecular Microbiology*, 90(2), 290-306. <https://doi.org/10.1111/mmi.12362>
- Siler, D., & Gilchrist, D. (1983). Properties of host specific toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in culture and in tomato plants. *Physiological Plant Pathology*, 23(2), 265-274. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90009-7)

- Siler, D. J., & Gilchrist, D. G. (1983). Properties of host specific toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in culture and in tomato plants. *Physiological Plant Pathology*, 23(2), 265-274. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90009-7)
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.006>
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673-4680.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Hanada, K., Akagi, Y., Kodama, M., Akimitsu, K., & Yamamoto, M. (2016). Evolution of pathogenicity controlled by small, dispensable chromosomes in *Alternaria alternata* pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 95, 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.02.009>
- Tsuzuki, R., Cabrera Pintado, R. M., Biondi Thorndike, J. A., Gutiérrez Reynoso, D. L., Amasifuen Guerra, C. A., Guerrero Abad, J. C., Aragón Caballero, L. M., Huarhua Zaquinaula, M. H., Ureta Sierra, C., Alberca Cruz, O. I., Elespuru Suna, M. G., Blas Sevillano, R. H., Torres Arias, I. C., Flores Ticona, J., de Baldárrago, F. C., Pérez, E. R., Hozum, T., Saito, H., Kotera, S., Arie, T. (2020). Mutations Found in the Asc1 Gene That Confer Susceptibility to the AAL-Toxin in Ancestral Tomatoes from Peru and Mexico. *Plants*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.3390/plants10010047>
- Wang, H., Guo, Y., Luo, Z., Gao, L., Li, R., Zhang, Y., Kalaji, H. M., Qiang, S., & Chen, S. (2022). Recent Advances in *Alternaria* Phytotoxins: A Review of Their Occurrence, Structure, Bioactivity, and Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 8(2), 168. <https://doi.org/10.3390/jof8020168>
- Yamagishi, D., Akamatsu, H., Otani, H., & Kodama, M. (2006). Pathological evaluation of host-specific AAL-toxins and fumonisin mycotoxins produced by *Alternaria* and *Fusarium* species. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 323-327. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0291-y>
- Zhu, X., Vogeler, C., & Du, L. (2008). Functional Complementation of Fumonisin Biosynthesis in FUM1 -Disrupted *Fusarium verticillioides* by the AAL-Toxin Polyketide Synthase Gene ALT1 from *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 957-960. <https://doi.org/10.1021/np8000514>



CAPÍTULO VI. Ecofisiología de *Alternaria* spp. de frutos de tomate

VI.1 Introducción

Los hongos del género *Alternaria* son saprófitos o patógenos de una amplia variedad de plantas y frutos tanto en la cosecha como en la post cosecha (Ali et al., 2023; Lee et al., 2015b). Estudios previos han demostrado que los tomates albergan una gran abundancia de *Alternaria* spp. como agentes fúngicos de deterioro (Capítulos II y III). Además, se ha evidenciado que la mayoría de estos hongos transmitidos por los alimentos tienen el potencial de producir metabolitos secundarios (Capítulo III), los cuales se han detectado y cuantificado en productos derivados del tomate (Capítulo IV), representando un peligro potencial para la salud.

El crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas están influenciados por diversos factores ambientales, siendo la actividad de agua (a_w) y la temperatura los más importantes (Magan et al., 1984; Prendes et al., 2017). Estos factores intrínsecos y extrínsecos controlan las especies capaces de crecer en un ecosistema particular, y su conocimiento es fundamental para desarrollar estrategias que prevengan el desarrollo fúngico y evaluar el riesgo para la salud del consumidor (Pose et al., 2009).

Como se mencionó previamente, el género *Alternaria* produce diversas toxinas como parte de sus mecanismos de patogenicidad, incluyendo toxinas no específicas de hospedador (nHST) y toxinas específicas en determinados hospedadores (HSTs) (Li et al., 2020; Meena et al., 2017). Entre las nHSTs se encuentran altenueno (ALT), alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico (TeA), tentoxina (TEN) y altertoxinas I, II y III (ATX-I, II y III) (Aichinger et al., 2021c; Meena et al., 2017; Patriarca et al., 2019; Pinto & Patriarca, 2017). Estas toxinas son las que comúnmente se encuentran como contaminantes naturales de alimentos, tanto en materias primas como procesados. Adicionalmente, estos metabolitos secundarios pueden ser modificados por conjugación produciendo derivados sulfonados o glucosilados, que pueden revertir a su forma natural durante la producción de alimentos o a través del metabolismo en humanos y animales. De esta manera estas toxinas modificadas, como AOH-3-S, AOH-3-G, AME-3-S, y AME-3-G, pueden contribuir a la ingesta de las formas nativas de las respectivas micotoxinas.

Por otro lado, este género también produce toxinas específicas en determinados hospedadores (HSTs) como las toxinas AAL producidas por *A. arborescens* (syn.

Alternaria alternata f. sp. *lycopersci*) patotipo tomate. (Brandwagt et al., 1998; Kodama, 2019; J. Li et al., 2020; Meena & Samal, 2019; Tsuge et al., 2016).

Aunque se ha estudiado la toxicología de algunas micotoxinas de *Alternaria*, los datos disponibles aún son insuficientes para establecer límites seguros en alimentos (Lee et al., 2015b; Oviedo et al., 2011).

Comprender la ecofisiología de *Alternaria*, es decir, la adaptación de su fisiología a las condiciones ambientales en sustratos alimentarios, es crucial para prevenir su desarrollo y evaluar el riesgo para la salud del consumidor (Pose et al., 2009). Aunque se ha descrito el crecimiento de especies micotoxigénicas de *Alternaria* y su relación con la a_w y la temperatura en diferentes sustratos, incluyendo el tomate (Magan et al., 1984; Oviedo et al., 2011; Pose et al., 2010), la variabilidad inter e intraespecífica requiere del conocimiento de las poblaciones fúngicas regionales para desarrollar estrategias de control adecuadas. Adicionalmente, la adaptación de los microorganismos patógenos al cambio climático demanda una constante revisión y actualización de los factores ambientales determinantes para su desarrollo y toxigenicidad.

Para *A. alternata*, la máxima velocidad de crecimiento se encuentra en el rango de 25 a 30°C, aunque es capaz de desarrollar entre 1 y 35°C. Altos niveles de a_w favorecen su desarrollo, siendo óptimos entre 0,99 y 0,995; sin embargo, se ha observado germinación y crecimiento a niveles de a_w tan bajos como 0,84-0,85. La información respecto de la influencia de los factores ambientales sobre la producción de toxinas es escasa, y la mayoría de los estudios se limitan a las tres toxinas más comúnmente detectadas en alimentos: AOH, AME y TeA. En general, la máxima producción de AOH, AME y ALT se da a condiciones cercanas a 25°C y 0,98 a_w , mientras que el óptimo para TeA se describe a 0,90 a_w y 25°C (Magan et al., 1984; Pitt & Hocking, 2022). Sin embargo, estos datos varían considerablemente entre especies, e incluso entre aislamientos de la misma especie. Adicionalmente, el efecto del sustrato sobre la producción de toxinas puede ser aún mayor que sobre el crecimiento, por lo cual es relevante incluirlo en ensayos de ecofisiología cuando se estudian las poblaciones causantes de deterioro en un determinado cultivo.

La plasticidad fisiológica de los hongos filamentosos como *Alternaria* les confiere una gran capacidad de adaptación y colonización en ambientes extremos, siendo competitivos gracias a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, metabolitos secundarios y volátiles (Medina et al., 2015). Las especies de *Alternaria* pueden crecer a bajas temperaturas y se asocian predominantemente con el deterioro de frutas y hortalizas durante el transporte y almacenamiento refrigerados (Sanchis & Magan, 2004).

Los datos ecofisiológicos sobre la producción simultánea de micotoxinas por diferentes especies de *Alternaria* son una herramienta útil para que los productores determinen las condiciones de manejo seguras y para que las autoridades reguladoras establezcan programas de monitoreo de alimentos susceptibles (Vaquera et al., 2014). Se necesita información precisa acerca del impacto de factores ambientales clave, como la temperatura, sobre las condiciones marginales y óptimas para el crecimiento de hongos y la producción de toxinas (Oviedo et al., 2011).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento y la producción de toxinas en aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates.

VI.2 Materiales y Métodos

VI.2.1 Aislamientos

Se seleccionaron para el estudio de ecofisiología los aislamientos de *Alternaria* spp. de frutos de tomate portadores del gen ALT1 (EGS 39128, TPP117 y TPP173). Estos aislamientos fueron elegidos por su amplia capacidad de producción de toxinas, así como por su capacidad de biosíntesis tanto de toxinas nHST como HST *in vitro*.

VI.2.2 Inoculación e incubación

A partir de aislamientos de *Alternaria* spp. en placas de Agar V8®, incubadas bajo ciclos de luz/oscuridad a 23°C durante 7 días, se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 al 0,05% hasta obtener una concentración final de 10^5 conidios/ml. Utilizando un asa de siembra de rulo calibrada de 10 µl, se inoculó en el centro de placas de Petri conteniendo Agar Puré de Tomate (APT). Las placas inoculadas se colocaron en bandejas cubiertas con bolsas permeables al oxígeno e impermeables

al agua para preservar la humedad y se incubaron a 4 temperaturas: 12, 25, 30 y 35°C. Cada condición se evaluó por triplicado.

VI.2.3 Medición del crecimiento

Se realizaron mediciones periódicas del diámetro de la colonia desde el momento de la inoculación hasta que al menos una de las réplicas cubriese completamente la superficie del medio de cultivo. Se registraron 2 diámetros perpendiculares de cada colonia y se graficó el diámetro promedio vs tiempo para obtener las curvas de crecimiento. Se calcularon las velocidades máximas de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) (cm/día) y la fase de latencia (λ) (días), a partir de la pendiente y la abscisa, respectivamente, mediante regresión lineal (Vaquera et al., 2014).

VI.2.4 Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas de *Alternaria*

Para la determinación de toxinas de *Alternaria* bajo distintas temperaturas en función del tiempo, se implementó un diseño factorial que combinó tres factores: aislamiento, temperatura de incubación (°C) y tiempo de incubación (días), como se detalla en la **Tabla VI.1**. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

Tabla VI.1. Diseño experimental basado en combinaciones de aislamiento, temperatura (°C) y tiempo de incubación (días) para la producción de toxinas por aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate.

Aislamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
EGS 39128; TPP117; TPP173.	12	15
		30
		45
	25	15
		30
		45
	30	15
		30
		45
	35	15
		30
		45

VI.2.4.1 Reactivos y químicos

Los estándares de altenueno (ALT), alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y altertoxina-I (ATX-I) se obtuvieron de Fermentek (Jerusalén, Israel) y se

disolvieron en metanol (MeOH). Los estándares certificados de ácido tenuazónico (TeA) y tentoxina (TEN) fueron adquiridos de Romer Laboratories Diagnostic GmbH (Tulln, Austria) y se solubilizaron en acetonitrilo (ACN) grado LC-MS. El estándar de altertoxina-II (ATX-II), provisto por el Centro de Excelencia en Micotoxicología y Salud Pública (CEMPH), así como las toxinas de *Alternaria* conjugadas, sulfatos y glucósidos (AOH-3-S, AOH-3-G, AME-3-S, AME-3-G), se solubilizaron en MeOH. Los estándares AAL TA y AAL TB, adquiridos de Sigma Chemical (Alemania), también se solubilizaron en MeOH.

Como estándar interno, se utilizó ácido tenuazónico $^2\text{H-13}$ (Toronto Research Chemical), el cual fue disuelto en MeOH. Además, se empleó agua ultrapura obtenida de un sistema Arium® pro (Sartorius). El ACN (grado HPLC HiPerSolv Chromanorm) se adquirió de VWR International (Lovaina, Bélgica), mientras que el cloruro de sodio (NaCl) y el sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica), respectivamente.

VI.2.4.2 Extracción de toxinas de *Alternaria*

Al final del periodo de incubación correspondiente, según se detalla en la **Tabla VI.1**, se procedió a la extracción y cuantificación de las toxinas de *Alternaria*. El procedimiento de extracción se realizó utilizando un método validado desarrollado en el Centro de Excelencia en Micotoxicología y Salud Pública (CEMPH) de la Universidad de Gante, Bélgica, para la detección y cuantificación de ALT, AOH, AME, TeA, TEN, ATX-I, AAL TA, AAL TB, AOH-3-S, AOH-3-G, AME-3-S y AME-3-G con modificaciones menores (Walravens et al., 2016b). A partir de las placas de Agar Puré de Tomate (APT) con desarrollo fúngico se pesaron $2,0000 \pm 0,0020$ g en un tubo de extracción. Se añadió el estándar interno, ácido tenuazónico $^2\text{H-13}$ en concentraciones de $10 \mu\text{g/kg}$, después de 10 s de agitación en vórtex, las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 10 ml de ACN grado HPLC y los tubos se agitaron durante 30 min. Los extractos se centrifugaron brevemente (1 min, 3200 g), y se añadió sal anhidra de MgSO_4 ($2,00 \pm 0,05$ g) y NaCl ($0,50 \pm 0,05$ g). Luego, los tubos se agitaron vigorosamente en forma manual durante 30 s, se colocaron en un agitador durante 15 min y se centrifugaron (10 min, 3200 g). Se transfirieron 6 ml del sobrenadante a un tubo y se evaporaron

hasta sequedad usando un módulo Turbovap LV (Biotage AB, Uppsala, Suecia) mantenido a 40°C. Finalmente, el residuo se redisolvió en 100 µl de solvente de inyección (agua ultrapura/ACN grado LCMS, 70/30, v/v), se agitó en vórtex durante 30 s y se centrifugó (unidades de filtración centrífuga de membrana PTFE Ultrafree-MC, 0,22 µm; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 10 min a 10000 g antes del análisis. Además, se prepararon blancos (Agar Pure de Tomate) que se enriquecieron con las micotoxinas estudiadas a niveles de concentración de entre 5 a 100 µg/kg, se mantuvieron por 15 minutos en obscuridad para su absorción y se prosiguió con la extracción tal como se describe previamente.

VI.2.4.3 Cuantificación de toxinas por UPLC-MS/MS

La determinación y cuantificación de las micotoxinas objeto de estudio se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución UPLC (sistema Acquity) acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (XEVO TQ-S) de Waters (Milford, MA, EE. UU.). La separación cromatográfica de los analitos se logró en una columna Acquity UPLC High Strength Silica C18 trifuncional (HSS T3, 1,8 µm x 2,1 mm x 100 mm) de fase estacionaria híbrida, usando una mezcla de ácido acético 0,1% en agua (A) y ácido acético 0,1% en acetonitrilo (B) como fases móviles a un caudal de 0,4 ml/min. El gradiente cromatográfico, así como la ionización en modo negativo y los parámetros de detección se optimizaron según lo informado previamente por (Walravens et al., 2014). Se establecieron dos transiciones de precursor a ion producto por analito para garantizar sensibilidad y selectividad. Los límites de detección y cuantificación, tiempos de retención, transiciones de interés y voltajes de colisión aplicados se resumen en las **Tablas VI.2 y VI.3**. El procesamiento y análisis de cromatogramas se realizó con los softwares MassLynx y QuanLynx (Waters).

Tabla VI.2. Parámetros instrumentales de MS/MS optimizados para cada micotoxina. AOH: alternariol, AME: alternariol monometil éter, ALT: altenueno, TeA: ácido tenuazónico, TEN: tentoxina, ATX-I: altertoxina-I, ATX-II: altertoxina-II, AAL-TA: toxina AAL TA, AAL-TB: toxina AAL TB. AOH-3-S: alternariol-3-sulfato, AME-3-S: alternariol monometil éter-3-sulfato, AOH-3-G: alternariol-3-glucósido, AME-3-G: alternariol monometil éter-3-glucósido.

Analito	Ion precursor (m/z)	Ión Molecular	Voltaje del cono (V)	Ion Cuantificador I (m/z)	Energía de colisión I (eV)	Ion Cuantificador II (m/z)	Energía de colisión II (eV)
ALT	291,2	[M-H] ⁻	40	203,1	33	248,2	27
AOH	257,1	[M-H] ⁻	75	215,1	35	213,1	28
AME	271,2	[M-H] ⁻	60	256,2	21	228,2	28
TeA	196,2	[M-H] ⁻	60	139,1	20	112	23
TEN	413,4	[M-H] ⁻	45	141,1	20	271,2	16
ATX-I	351,4	[M-H] ⁻	35	315,1	15	333,2	12
ATX-II	349,1	[M-H] ⁻	88	285,1	35	332	13
AAL-TA	520,3	[M-H] ⁻	45	157,1	40	69	30
AAL-TB	504,3	[M-H] ⁻	45	157,1	40	69	20
AOH-3-S	337,1	[M-H] ⁻	35	257,2	21	213,1	38
AME-3-S	351,1	[M-H] ⁻	35	271,2	22	256,1	35
AOH-3-G	419,2	[M-H] ⁻	70	228,1	35	256,1	28
AME-3-G	433,2	[M-H] ⁻	65	270,1	31	227,1	45

Tabla VI.3. Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para cada metabolito de *Alternaria* en µg/kg. AOH: alternariol, AME: alternariol monometil éter, ALT: altenueno, TeA: ácido tenuazonico, TEN: tentoxina, ATX-I: albertoxina-I, ATX-II: albertoxina-II, AAL-TA: toxina AAL TA, AAL-TB: toxina AAL TB. AOH-3-S: alternariol-3-sulfato, AME-3-S: alternariol monometil éter-3-sulfato, AOH-3-G: alternariol-3-glucósido, AME-3-G: alternariol monometil éter-3-glucósido.

	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
ALT	1,1	3,6
AOH	1,3	4,3
AME	0,3	1,1
TeA	1,3	4,4
TEN	1,0	3,4
ATX-I	1,5	5,0
ATX-II	1,7	3,4
AAL-TA	1,9	5,0
AAL-TB	1,8	4,9
AOH-3-S	0,4	12,4
AME-3-S	1,5	4,8
AOH-3-G	0,7	2,2
AME-3-G	1,5	4,8

VI.2.5 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) multifactoriales utilizando el software RStudio versión 2023.06.1+524, con el objetivo de evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales ensayadas ($\alpha=0,05$). Estos análisis se aplicaron tanto para los datos de crecimiento como para determinar el efecto de los factores aislamiento, temperatura y tiempo de incubación, así como las interacciones entre dichas variables, sobre la producción de toxinas.

VI.3 Resultados

VI.3.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate.

Las curvas de crecimiento radial (diámetros vs. tiempo) de los tres aislamientos portadores del gen ALT1 (cepa control EGS 39128 de *A. arborescens*; aislamiento TPP117 de *A. tomaticola*; y aislamiento TPP173 de *A. arborescens*) a las diferentes

temperaturas ensayadas (12, 25, 30, 35°C) se muestran en la **Figura VI.1** y en la **Figura VI.2** se ejemplifica el registro fotográfico de los tres aislamientos a 12°C.

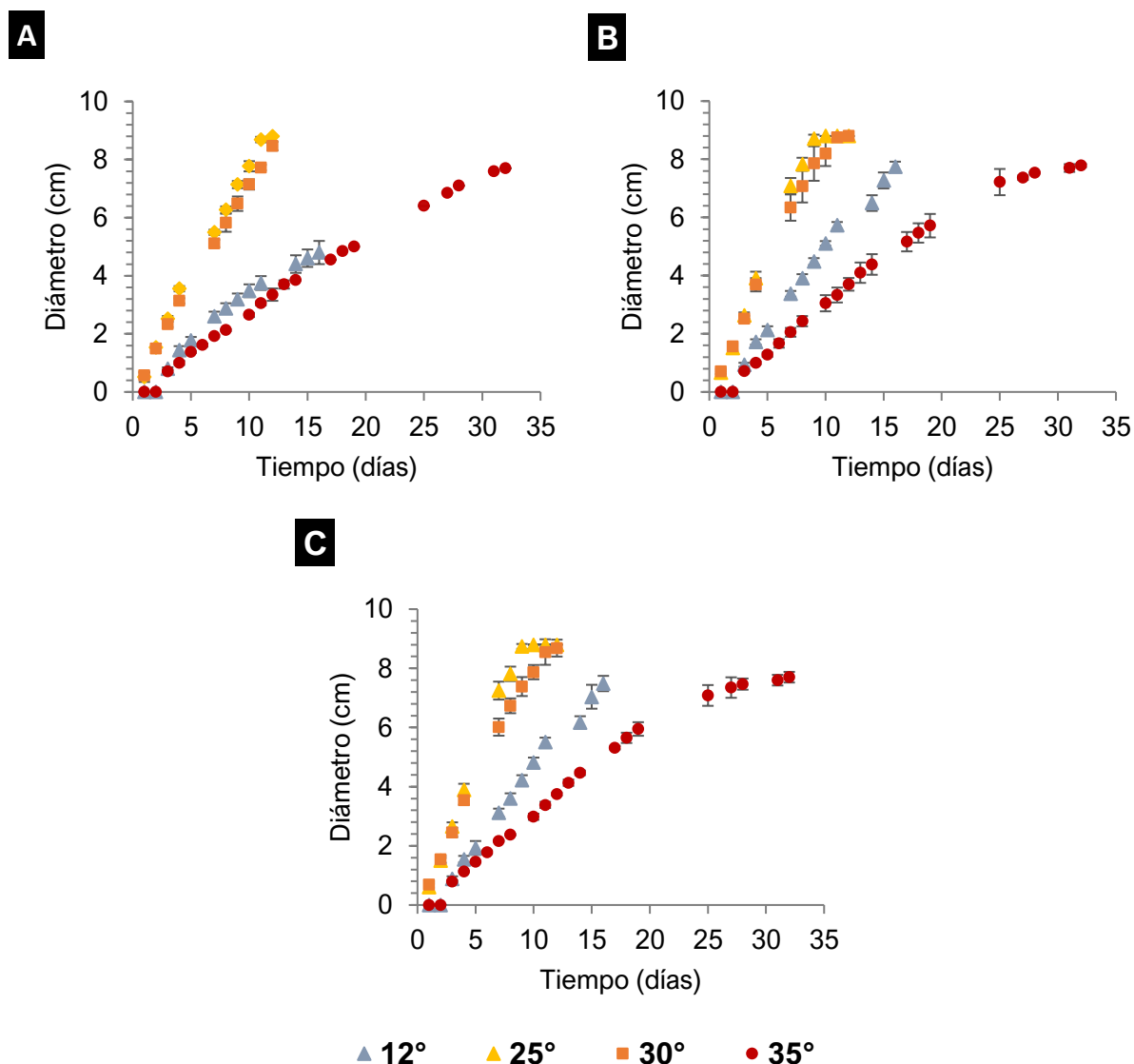


Figura VI.1. Curvas de crecimiento de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT) incubados a distintas temperaturas (12, 25, 30, 35°C). **A.** Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), **B.** *A. tomatocola* (TPP117), **C.** *A. arborescens* (TPP173). Las barras indican el desvío estándar de 3 réplicas.

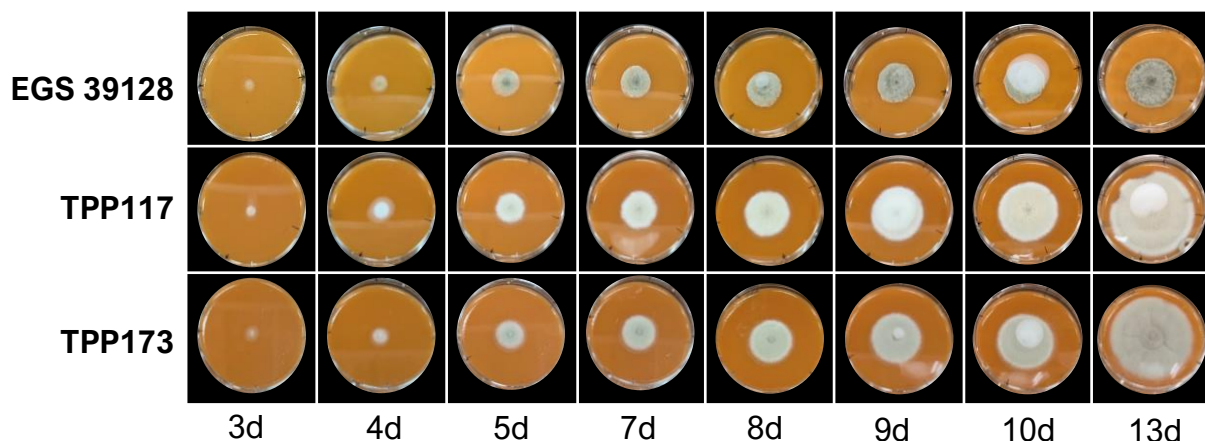


Figura VI.2. Registro fotográfico de crecimiento radial de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT), incubadas a 12°C. Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). d: día de registro.

En la **Figura VI.3** se muestran las velocidades máximas de crecimiento radial ($\mu_{\text{máx}}$), calculadas a partir de la zona de crecimiento lineal de las curvas para cada condición de temperatura y aislamiento. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la mayoría de las medias, excepto entre 12 y 35°C para la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) que presentó valores de $\mu_{\text{máx}}$ de 0,28 y 0,25 cm/día, respectivamente. En contraste, los aislamientos TPP117 y TPP173 mostraron diferencias significativas de $\mu_{\text{máx}}$ ($p < 0,05$) entre todas las condiciones de temperatura evaluadas. Los tres aislamientos presentaron mayores $\mu_{\text{máx}}$ a 25°C con valores de 0,76; 1,06 y 0,82 cm/día, para EGS 39128, TPP117 y TPP173, respectivamente. A 30°C también se observaron valores altos de $\mu_{\text{máx}}$, ligeramente menores a las detectadas a 25°C (0,71; 0,82 y 0,76 cm/día, respectivamente).

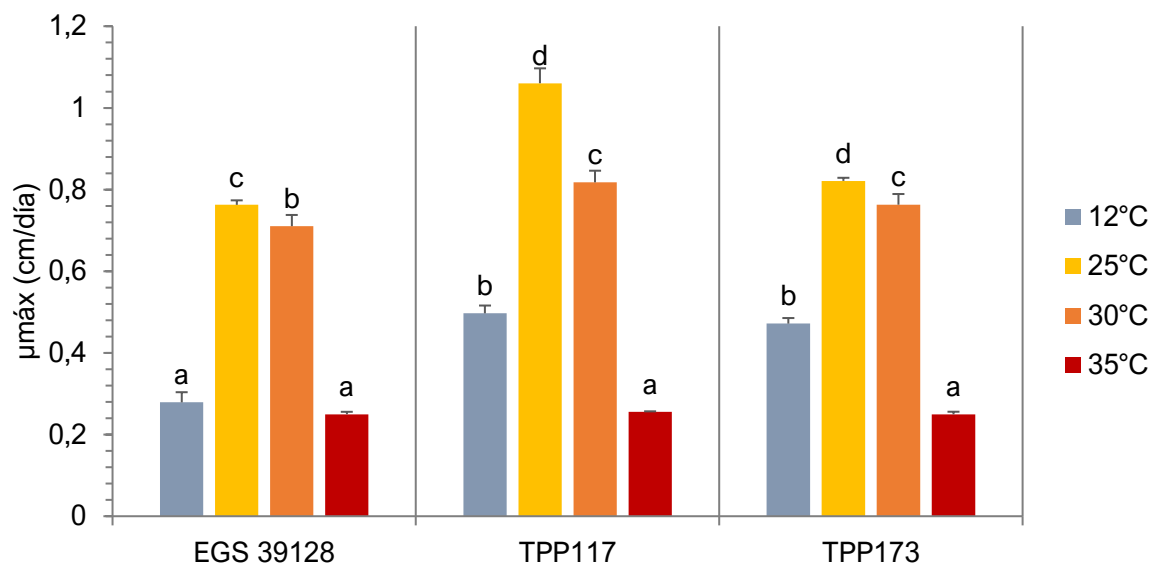


Figura VI.3. Velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$) de aislamientos de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate (APT). Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). Las líneas indican el desvío estándar. Las barras con distintas letras para cada aislamiento muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la **Figura VI.4** se muestra la fase de latencia promedio (λ) de los aislamientos EGS 39128, TPP117 y TPP173 de *Alternaria* spp. a distintas temperaturas. Los resultados del análisis de varianza revelaron un efecto significativo ($p < 0,0001$) en todos los casos. Las pruebas de Tukey indicaron que las temperaturas óptimas para una λ más corta difieren entre los aislamientos, siendo 30°C (0,05 días) y 25°C (0,08 días) las más favorables para EGS 39128 (sin diferencias significativas entre sí), y 30°C para TPP117 (0,22 días) y TPP173 (0,15 días).

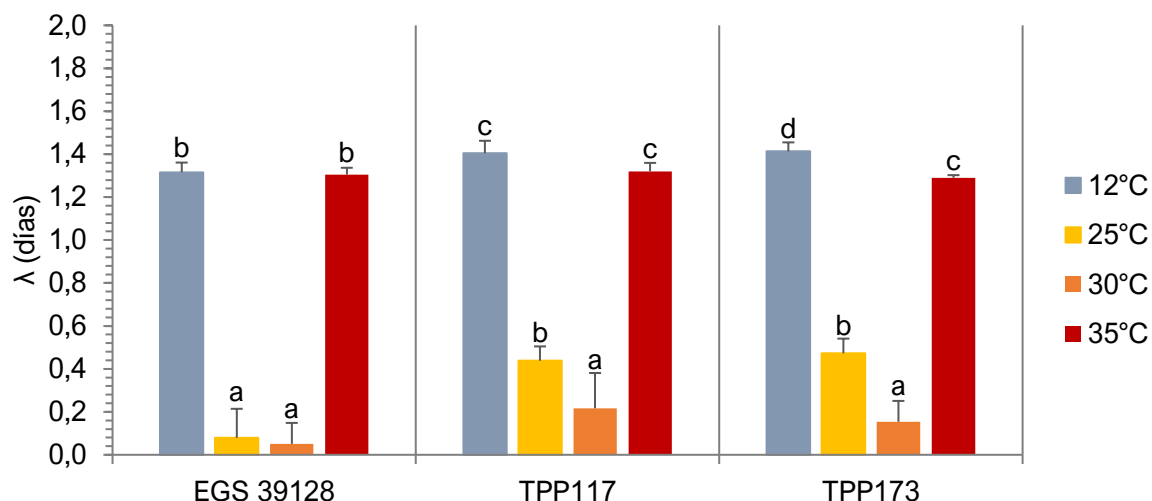
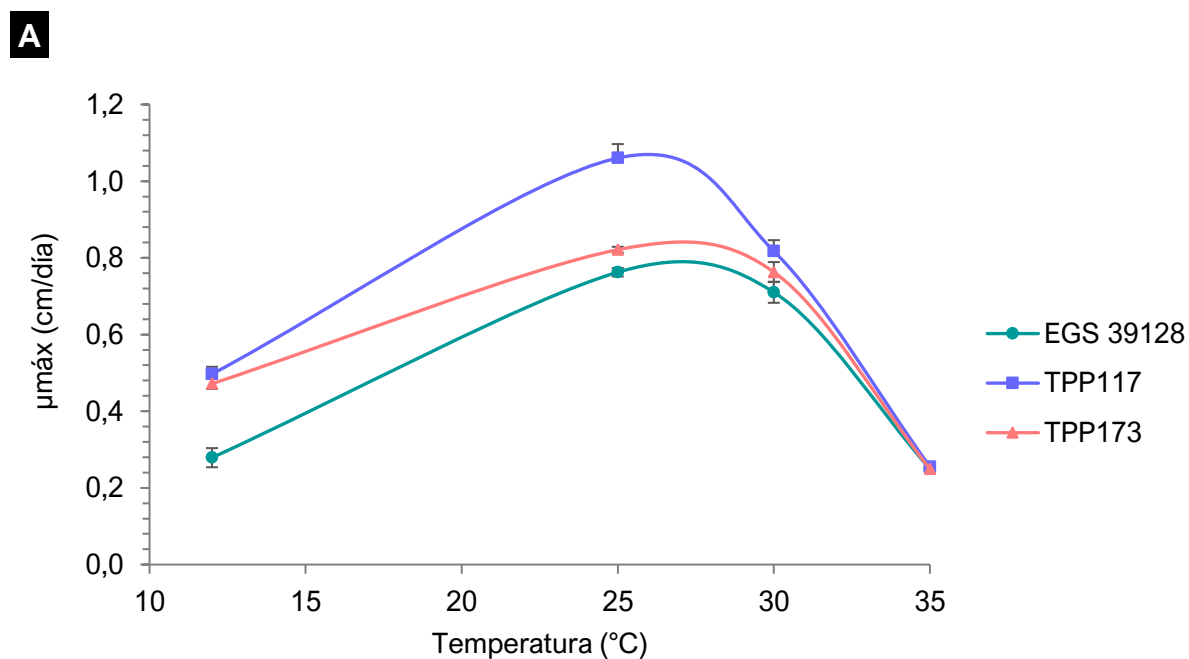


Figura VI.4. Fase de latencia (λ) de aislamientos de *Alternaria* spp. en Agar Pulpa de Tomate (APT). Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomaticola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173). Las líneas barras indican el desvío estándar. Las barras con distintas letras para cada aislamiento presentan diferencias significativas de Tukey ($p < 0,05$).

La relación entre los parámetros de crecimiento, velocidad máxima de crecimiento radial ($\mu_{\text{máx}}$) y fase de latencia (λ), con la temperatura está representada en la **Figura VI.5.**



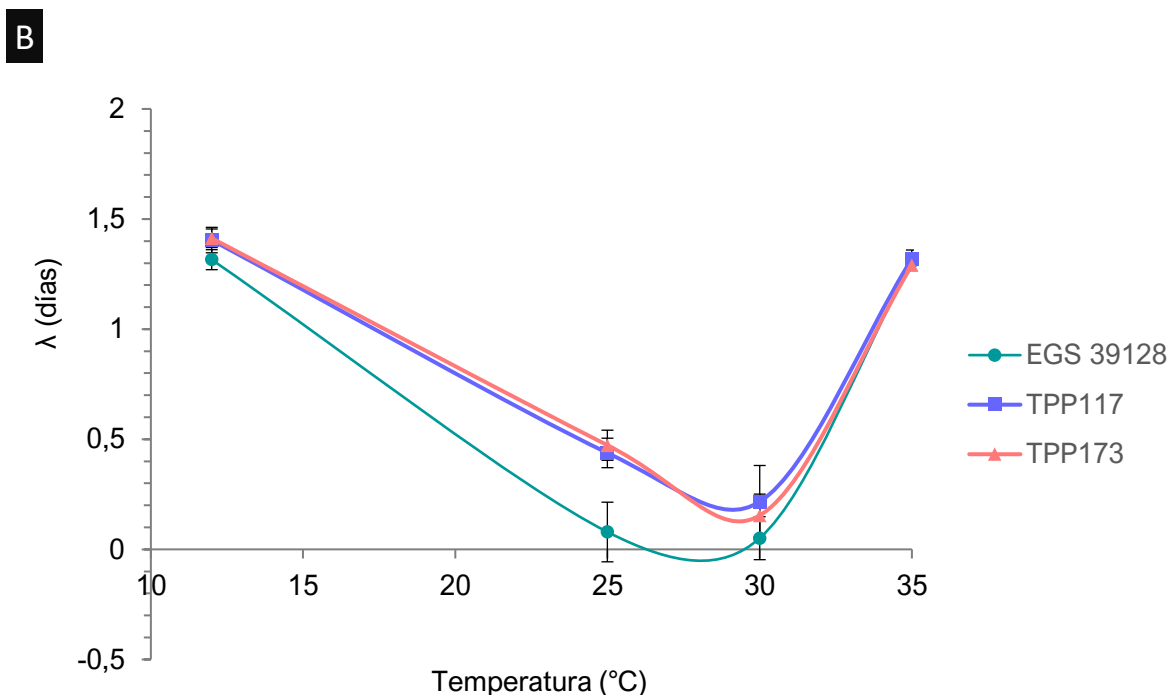


Figura VI.5. A. Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y **B.** Fase de latencia (λ) de aislamientos de *Alternaria* spp. en Agar Pulpa de Tomate (APT) en función de la temperatura. Cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128), *A. tomatocola* (TPP117) y *A. arborescens* (TPP173).

Las curvas de velocidad de crecimiento en función de la temperatura muestran que la temperatura óptima de crecimiento para los distintos aislamientos de *Alternaria* spp. se encuentra entre 25 y 30°C (aproximadamente 26-27°C). A temperaturas superiores a 30°C, las velocidades de crecimiento caen rápidamente hasta 35°C. En la zona de temperaturas menores a la óptima, la disminución de $\mu_{\text{máx}}$ ocurre de manera paulatina; a 12°C, la mayoría de los aislamientos presenta velocidades de crecimiento de entre 40 y 55% respecto de la $\mu_{\text{máx}}$ a la temperatura óptima.

El efecto de la temperatura sobre la fase de latencia (λ), también mostró una tendencia similar para los tres aislamientos. Las mínimas λ (0,05-0,2 días) se observaron a temperaturas cercanas a 30°C (~29°C). Estas se extendieron significativamente a ambos extremos de temperatura (12°C y 35°C), alcanzando máximos de entre 1,3 y 1,4 días.

VI.3.2 Efecto de la temperatura sobre la producción de toxinas nHSTs y HSTs por aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate.

En las **Tablas VI.4, VI.5 y VI.6** se detallan las concentraciones promedio para cada toxina producida por cada aislamiento a las distintas temperaturas (12, 25, 30 y 35°C) y tiempos de incubación (15, 30 y 45 días) evaluados. Los aislamientos de *Alternaria* spp. seleccionados evidenciaron la capacidad de producir todas las micotoxinas analizadas bajo ciertas condiciones experimentales ensayadas en este estudio, excepto por el aislamiento TPP173, que no produjo AAL-TB en ninguna de las condiciones analizadas. Sin embargo, ninguna de las toxinas modificadas analizadas, sulfatos y glucósidos de AOH y AME (AOH-3-S, AOH-3-G, AME-3-S y AME-3-G), fueron producidas *in vitro* en las condiciones del presente ensayo.

Las concentraciones máximas de toxinas producidas por los distintos aislamientos de *Alternaria* spp. bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación fue variable. El aislamiento TPP173 produjo las concentraciones más altas, con 4712 µg/kg de ATX-II a 25°C luego 15 días de incubación, seguido de 4270 µg/kg de TEN a la misma temperatura, pero luego de 45 días de incubación. Por otro lado, el aislamiento EGS 39128 fue el que produjo las concentraciones máximas de AAL-TA (2512 µg/kg a 30°C luego de 15 días), y de TeA (2210 µg/kg a 35°C y 30 días). En cuanto al aislamiento TPP117, fue el mayor productor de AOH (1351 µg/kg a 35°C y 30 días) y produjo cantidades elevadas de TEN (1029 µg/kg a 25°C y 30 días).

Tabla VI.4. Concentración de toxinas producidas por la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Concentración de toxina (µg/kg)								
		ALT	AOH	AME	TeA	TEN	ATX-I	ATX-II	AAL-TA	AAL-TB
12	15	<LOD	42,6 ± 0,1	22,4 ± 0,1	1629 ± 52	39,3 ± 0,1	38,6 ± 0,4	18 ± 6	29 ± 25	43,3 ± 0,1
	30	<LOD	<LOD	<LOD	1318 ± 33	<LOD	47 ± 8	187 ± 79	7 ± 4	<LOD
	45	<LOD	<LOD	<LOD	1380 ± 34	<LOD	25 ± 26	185 ± 77	5,2 ± 0,4*	<LOD
25	15	55 ± 8	60 ± 5	32 ± 2	1809 ± 131	63 ± 4	40 ± 1	31 ± 15	44,1 ± 0,1	43,3 ± 0,1
	30	56 ± 2	47 ± 1	26,0 ± 0,3	1961 ± 45	66 ± 7	40 ± 2	8 ± 1	63 ± 14	44,6 ± 0,2
	45	47 ± 2	43,3 ± 0,2	24 ± 1	1832 ± 65	67 ± 6	38,3 ± 0,3	3 ± 2*	49 ± 2	43,4 ± 0,1
30	15	51 ± 6	57 ± 5	36 ± 4	1913 ± 43	39,3 ± 0,2	41 ± 1	54 ± 21	2512 ± 1157	100 ± 47
	30	47 ± 2	47 ± 2	31 ± 5	1854 ± 42	39,2 ± 0,2	38,2 ± 0,2	25 ± 24	1910 ± 1736	64 ± 26
	45	46 ± 3	44,4 ± 0,1	31 ± 2	1862 ± 59	39,1 ± 0,1	38,3 ± 0,3	26 ± 13	1420 ± 398	67 ± 29
35	15	32 ± 28	61 ± 4	32 ± 5	2037 ± 85	39,1 ± 0,1	47 ± 6	41 ± 34	91 ± 42	47 ± 4
	30	46 ± 4	45 ± 2	31 ± 5	2210 ± 122	39,1 ± 0,1	38,3 ± 0,2	19 ± 25	344 ± 79	64 ± 6
	45	46 ± 5	44 ± 1	31 ± 1	2099 ± 65	39 ± 2	38,2 ± 0,1	20 ± 18	186 ± 20	53 ± 2
**Promedio (µg/kg)		47	49	30	1825	47	39,1	51,3	555,1	56,9
**Min (µg/kg)		32	43	22	1318	39,1	25	3	5,2	43,3
**Máx (µg/kg)		56	61	36	2210	67	47	187	2512	100

Los valores de concentración de toxinas corresponden al promedio de tres réplicas ± un desvío estándar para cada condición. *Valores entre LOD y LOQ. <LOD.: menor que el límite de detección. **Concentraciones promedio considerando las concentraciones >LOD de todas las combinaciones de temperatura y tiempo para cada toxina. Valor máximo (Máx) y mínimo (Min) detectados en el total de muestras para cada toxina, sin discriminar condiciones experimentales. **AOH**: alternariol, **AME**: alternariol monometil éter, **ALT**: altenueno, **TeA**: ácido tenuazonico, **TEN**: tentoxina, **ATX-I**: altertoxina-I, **ATX-II**: altertoxina-II, **AAL-TA**: toxina AAL TA, **AAL-TB**: toxina AAL TB.

Tabla VI.5. Concentración de toxinas producidas por el aislamiento de *A. tomaticola* (TPP117) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Concentración de toxina (µg/kg)								
		ALT	AOH	AME	TeA	TEN	ATX-I	ATX-II	AAL-TA	AAL-TB
12	15	14 ± 24	139 ± 50	199 ± 206	262 ± 286	94 ± 72	47 ± 14	<LOD	51 ± 9	43,7 ± 0,3
	30	<LOD	30 ± 51	21 ± 37	545 ± 356	131 ± 36	44 ± 18	44 ± 42	2 ± 3*	<LOD
	45	<LOD	4 ± 6*	38 ± 36	108 ± 87	815 ± 1002	19 ± 16	89 ± 98	8 ± 10	<LOD
25	15	52 ± 5	159 ± 42	51 ± 33	89 ± 29	375 ± 159	38,5 ± 0,2	<LOD	48 ± 2	43,5 ± 0,1
	30	49 ± 5	129 ± 53	66 ± 25	109 ± 86	1029 ± 191	<LOD	<LOD	48 ± 4	43,6 ± 0,3
	45	53 ± 10	198 ± 127	167 ± 219	80 ± 38	772 ± 342	26 ± 22	<LOD	47 ± 4	43,5 ± 0,1
30	15	56 ± 11	1214 ± 581	267 ± 175	38 ± 34	269 ± 76	42 ± 2	480 ± 522	44,6 ± 0,2	43,4 ± 0,1
	30	210 ± 237	394 ± 269	341 ± 321	23 ± 39	288 ± 96	<LOD	257 ± 352	44,6 ± 0,7	43,5 ± 0,2
	45	101 ± 27	317 ± 55	105 ± 17	58 ± 28	289 ± 61	<LOD	<LOD	44,8 ± 0,9	43,4 ± 0,1
35	15	70 ± 86	51 ± 11	49 ± 41	26 ± 23	43 ± 6	92 ± 89	<LOD	29 ± 26	43,3 ± 0,1
	30	44 ± 1	1351 ± 504	317 ± 102	43 ± 39	50 ± 11	39 ± 1	568 ± 252	46 ± 3	43,4 ± 0,2
	45	59 ± 13	550 ± 435	237 ± 182	41 ± 3	71 ± 40	13 ± 23	<LOD	44,3 ± 0,1	43,3 ± 0,1
**Promedio (µg/kg)		65	378	155	119	352	40	119,8	36	36,2
**Min (µg/kg)		14	4*	21	23	43	13	44	2*	43,3
**Máx (µg/kg)		210	1351	341	545	1029	92	568	51	43,7

Los valores de concentración de toxinas corresponden al promedio de tres réplicas ± un desvío estándar para cada condición.

*Valores entre LOD y LOQ. <LOD.: menor que el límite de detección. **Concentraciones promedio considerando las concentraciones >LOD de todas las combinaciones de temperatura y tiempo para cada toxina. Valor máximo (Máx) y mínimo (Min) detectados en el total de muestras para cada toxina, sin discriminar condiciones experimentales. **AOH**: alternariol, **AME**: alternariol monometil éter, **ALT**: altenueno, **TeA**: ácido tenuazonico, **TEN**: tentoxina, **ATX-I**: altertoxina-I, **ATX-II**: altertoxina-II, **AAL-TA**: toxina AAL TA, **AAL-TB**: toxina AAL TB.

Tabla VI.6. Concentración de toxinas producidas por el aislamiento de *A. arborescens* (TPP173) en µg/kg en Agar Pulpa de Tomate a 12, 25, 30 y 35°C, luego de 15, 30 y 45 días.

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Concentración de toxina (µg/kg)								
		ALT	AOH	AME	TeA	TEN	ATX-I	ATX-II	AAL-TA	AAL-TB
12	15	<LOD	<LOD	<LOD	14 ± 7	<LOD	701 ± 49	1562 ± 418	3 ± 3*	<LOD
	30	<LOD	<LOD	<LOD	556 ± 103	19 ± 14	744 ± 473	1297 ± 831	8 ± 9*	<LOD
	45	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	169 ± 56	616 ± 272	1104 ± 301	10 ± 6	<LOD
25	15	<LOD	359 ± 113	<LOD	<LOD	1060 ± 560	488 ± 159	4712 ± 1744	4 ± 3*	<LOD
	30	<LOD	48 ± 23	<LOD	43 ± 39	921 ± 83	28 ± 13	1012 ± 520	4 ± 3*	<LOD
	45	<LOD	188 ± 67	<LOD	475 ± 411	4270 ± 2696	98 ± 66	240 ± 299	4,7 ± 0,1*	<LOD
30	15	6 ± 11	677 ± 536	195 ± 209	50 ± 83	<LOD	444 ± 146	931 ± 713	5 ± 5*	<LOD
	30	<LOD	114 ± 62	16 ± 18	138 ± 238	8 ± 13	90 ± 92	435 ± 282	6 ± 11	<LOD
	45	123 ± 167	206 ± 178	189 ± 269	449 ± 354	65 ± 52	28 ± 18	1060 ± 690	3 ± 3*	<LOD
35	15	<LOD	265 ± 231	139 ± 137	1593 ± 885	41 ± 50	99 ± 77	173 ± 133	4 ± 3*	<LOD
	30	<LOD	229 ± 134	205 ± 81	786 ± 1339	<LOD	75 ± 34	95 ± 88	4 ± 3*	<LOD
	45	<LOD	153 ± 112	336 ± 237	58 ± 74	<LOD	16 ± 9	383 ± 408	4 ± 3*	<LOD
**Promedio (µg/kg)		65	249	180	416	819	286	1084	4,9	<LOD
**Min (µg/kg)		6	48	16	14	8	16	95	3	n.a.
**Máx (µg/kg)		123	677	336	1593	4270	744	4712	10	n.a.

Los valores de concentración de toxinas corresponden al promedio de tres réplicas ± un desvío estándar para cada condición.

*Valores entre LOD y LOQ. <LOD.: menor que el límite de detección. **Concentraciones promedio considerando las concentraciones >LOD de todas las combinaciones de temperatura y tiempo para cada toxina. Valor máximo (Máx) y mínimo (Min) detectados en el total de muestras para cada toxina, sin discriminar condiciones experimentales. **AOH**: alternariol, **AME**: alternariol monometil éter, **ALT**: altenueno, **TeA**: ácido tenuazonico, **TEN**: tentoxina, **ATX-I**: altertoxina-I, **ATX-II**: altertoxina-II, **AAL-TA**: toxina AAL TA, **AAL-TB**: toxina AAL TB.

Para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación en la producción total de toxinas de *Alternaria* spp., se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los 3 aislamientos (EGS 39128, TPP117 y TPP173) (**Anexos VII-XVIII**), independientemente de cada una de las toxinas analizadas. Estos análisis se llevaron a cabo para determinar si la temperatura y el tiempo de incubación ejercen un efecto significativo sobre la variable respuesta de concentración total de toxinas ($\mu\text{g/kg}$). De esta manera es posible identificar los factores clave que afectan la producción de toxinas en general, sin enfocarse en cada una en particular, lo cual se aborda más adelante.

La temperatura fue un factor significativo sobre la concentración de toxinas en general para los aislamientos EGS 39128 ($p < 0,0001$) y TPP173 ($p < 0,01$). En el caso del aislamiento TP117, si bien en la **Tabla VI.5** se observa que para algunas toxinas la temperatura muestra variaciones significativas, el efecto sobre la biosíntesis de micotoxinas en general no fue significativo ($p = 0,1955$). Por otra parte, el tiempo de incubación no produjo diferencias significativas en general sobre la producción de toxinas para ninguno de los aislamientos.

La **Figura VI.6** muestra las concentraciones promedio de toxinas totales producida por cada aislamiento a distintas temperaturas. La prueba de Tukey mostró que para el aislamiento EGS 39128 se produjo una acumulación significativamente mayor de micotoxinas a 30°C , mientras que el resto de las temperaturas no resultaron en diferencias significativas. A pesar de que 30°C también resultó la temperatura más favorable para la producción de toxinas por el aislamiento TPP117, las diferencias entre temperaturas no fueron significativas. Por otra parte, para el aislamiento TPP173, la temperatura de 25°C resultó en una concentración de toxinas significativamente mayor que las demás. Aunque el resto de las temperaturas no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey, es destacable que la producción de micotoxinas a 12°C es elevada y comparable con la observada a 25, 30 y 35°C , temperaturas que se consideran más favorables para la producción de toxinas que las bajas temperaturas.

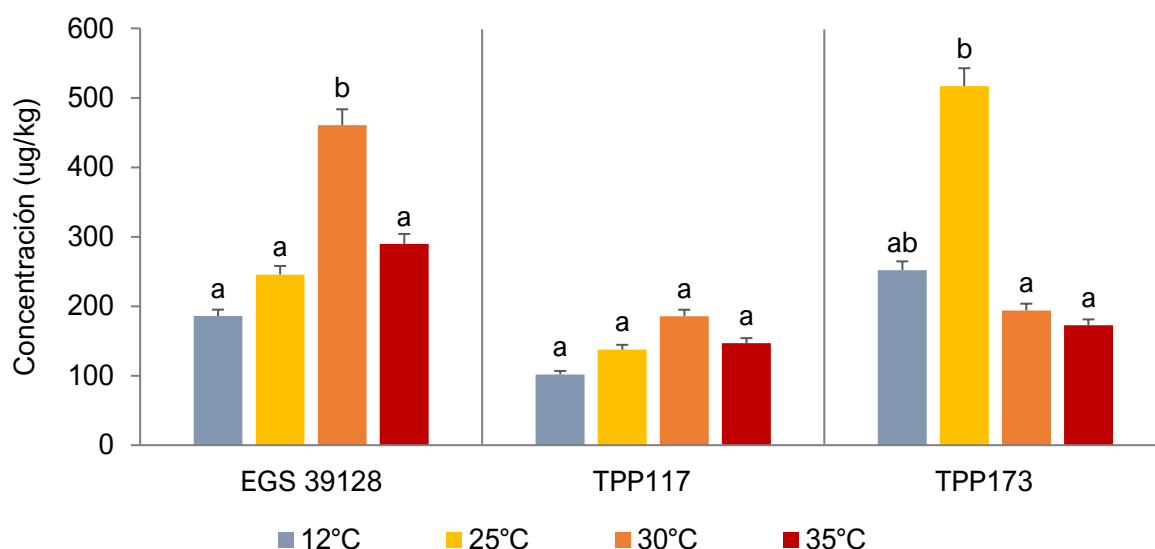


Figura VI.6. Concentración promedio de toxinas ($\mu\text{g/kg}$) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

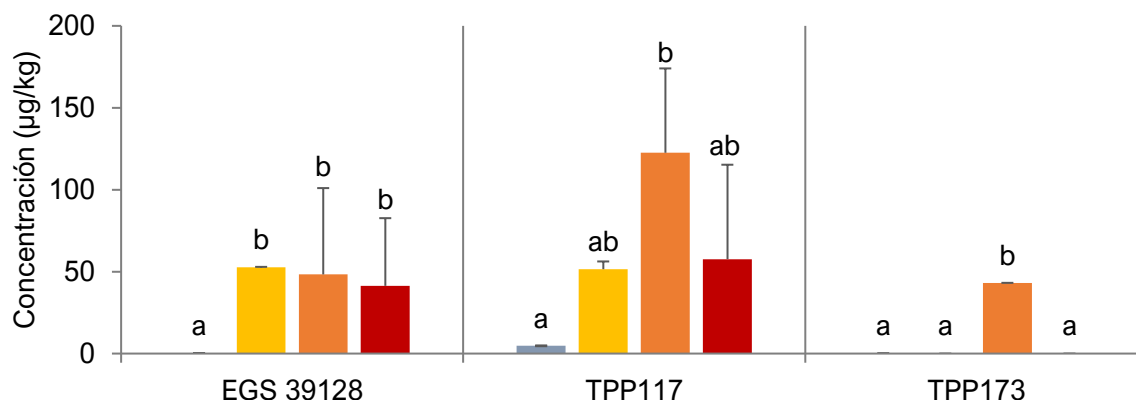
Para evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la concentración de cada toxina producida por los aislamientos EGS 39128, TPP117 y TPP173 de *Alternaria* spp., se realizaron análisis de varianza (ANOVA) individuales por aislamiento y micotoxina. Además, dada la falta de significancia estadística del tiempo de incubación sobre la concentración de toxinas, se graficaron las concentraciones promedio de cada toxina en función de la temperatura (**Figuras VI.7, VI.8, VI.9**), lo que permite visualizar de manera más clara el efecto de este factor sobre la producción de toxinas en los aislamientos estudiados.

En el caso de ALT (**Figura VI.7.i**), los resultados fueron variables entre los tres aislamientos estudiados. Para EGS 39128, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0,0001$), con concentraciones significativamente mayores a 25°C ($52,72 \mu\text{g/kg}$), 30°C ($48,28 \mu\text{g/kg}$) y 35°C ($41,32 \mu\text{g/kg}$) que a 12°C ($0,19 \mu\text{g/kg}$). Para TPP117, la temperatura también tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$), con concentraciones significativamente mayores a 30°C ($122,54 \mu\text{g/kg}$) que a 12°C ($4,72 \mu\text{g/kg}$), mientras que en TPP173, la temperatura tuvo efecto significativo observándose mayor producción a 30°C ($43,2 \mu\text{g/kg}$) que a cualquier otra temperatura.

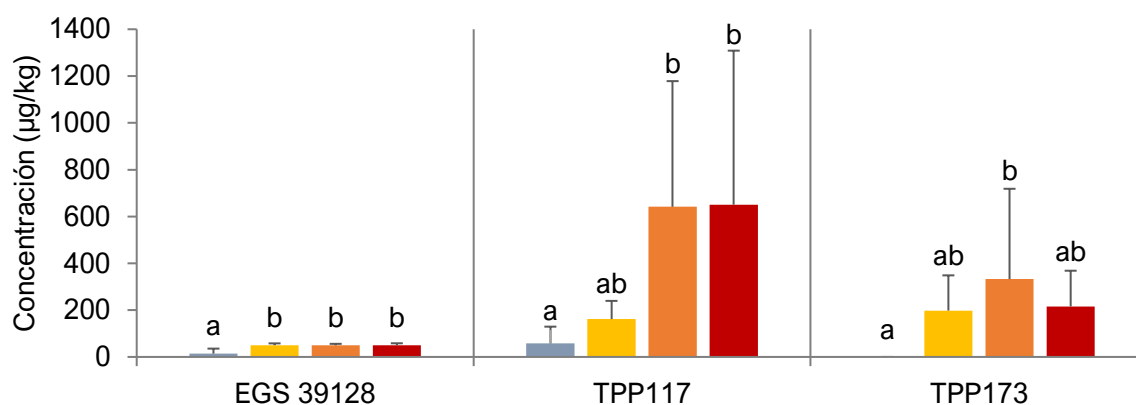
Para la toxina AOH (**Figura VI.1.ii**), los análisis de varianza revelaron un efecto significativo de la temperatura y el tiempo de incubación sobre su concentración en los tres aislamientos estudiados. En el caso de EGS 39128, los niveles de AOH fueron bajos a todas las temperaturas, aunque a 25, 30 y 35°C se detectaron concentraciones significativamente mayores que a 12°C. La interacción mostró que las concentraciones más altas se obtuvieron a 15 días de incubación y temperaturas de 25°C (59,7 µg/kg), 30°C (57,4 µg/kg) y 35°C (60,7 µg/kg). Para el aislamiento TPP117, la temperatura y la interacción temperatura-tiempo tuvieron un efecto significativo ($p=0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente), con concentraciones promedio de AOH significativamente mayores a 30°C (641,39 µg/kg) y 35°C (650,41 µg/kg) que a 12°C (57,70 µg/kg) y 25°C (161,61 µg/kg). La interacción reveló que las concentraciones más altas se obtuvieron a 15 días de incubación y 30°C (1213,60 µg/kg) y 35°C (1350,60 µg/kg). En TPP173, la temperatura ($p<0,01$) y el tiempo de incubación ($p<0,05$) tuvieron un efecto significativo, con concentraciones de AOH significativamente mayores a 30°C (332,38 µg/kg) que a 12°C ($<1,3$ µg/kg), y a 15 días de incubación (325,06 µg/kg) en comparación con 30 días (97,63 µg/kg).

Los análisis de varianza revelaron que la temperatura y el tiempo de incubación influyeron de manera significativa en la concentración de AME en los aislamientos EGS 39128 y TPP173, pero no en TPP117 (**Figura VI.1.iii**). En EGS 39128, la temperatura ($p<0,0001$), el tiempo de incubación ($p<0,0001$) y su interacción ($p<0,0001$) tuvieron un efecto significativo, con concentraciones promedio de AME significativamente mayores a 15 días (30,42 µg/kg) que a 30 (22,03 µg/kg) y 45 días (21,68 µg/kg), y a temperaturas de 30°C (32,67 µg/kg) y 35°C (31,46 µg/kg) que a 12°C (7,47 µg/kg) y 25°C (27,24 µg/kg). La interacción reveló la concentración más alta a 15 días y 30°C (35,53 µg/kg). En TPP173, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p<0,01$), con concentraciones de AME significativamente mayores a 35°C (226,64 µg/kg) que a 12°C y 25°C ($<LOD$), mientras que el tiempo de incubación y la interacción temperatura-tiempo no mostraron un efecto significativo. En contraste, en TPP117, ninguno de los factores estudiados ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de AME. Este resultado puede ser explicado por la alta varianza entre réplicas de un mismo tratamiento.

i.ALT



ii.AOH



iii.AME

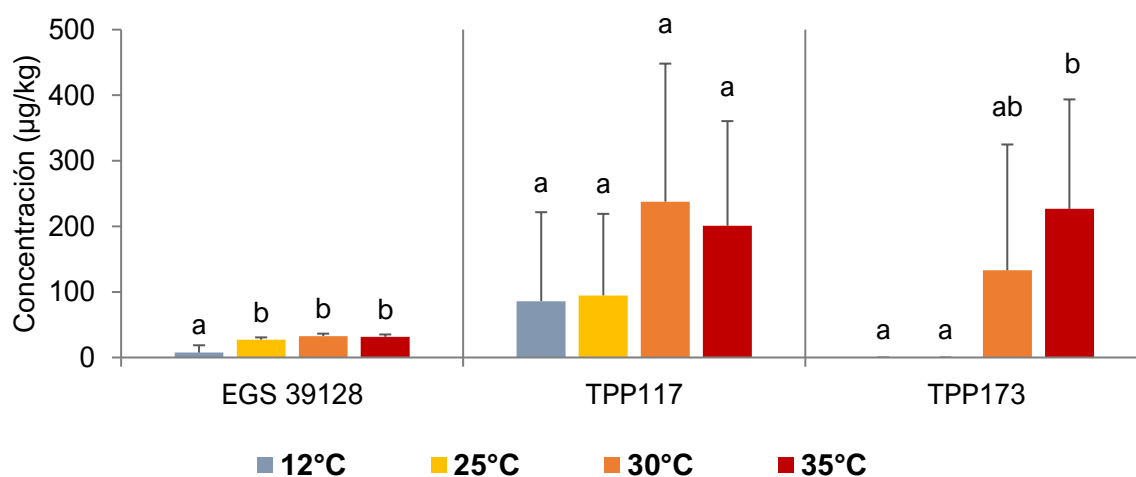


Figura VI.7. Concentración promedio (µg/kg) de i. Altenueno (ALT), ii. Alternariol (AOH), iii. Alternariol monometil éter (AME) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

La temperatura tuvo un efecto significativo sobre la concentración de TeA (**Figura VI.8 iv**) en los aislamientos EGS 39128 ($p<0,0001$) y TPP117 ($p=0,001$), pero no en TPP173. En EGS 39128, las concentraciones de TeA aumentaron significativamente con la temperatura, siendo la más alta a 35°C (2115,07 µg/kg), seguida por 30°C (1876,56 µg/kg) y 25°C (1867,12 µg/kg) y finalmente 12°C (1442,06 µg/kg). Además, la interacción temperatura-tiempo fue significativa ($p=0,0001$), con la concentración más alta a 35°C y 30 días de incubación (2209,60 µg/kg). En TPP117, por el contrario, la temperatura de 12°C produjo concentraciones de TeA significativamente mayores (304,95 µg/kg) que las demás temperaturas, sin diferencias significativas entre 25°C, 30°C y 35°C. El tiempo de incubación y la interacción temperatura-tiempo no tuvieron un efecto significativo en este aislamiento. Por otro lado, en TPP173, ni la temperatura, ni el tiempo de incubación, ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de TeA.

Para TEN se reveló un efecto significativo de la temperatura en los tres aislamientos estudiados: EGS 39128 ($p<0,0001$), TPP117 ($p<0,01$) y TPP173 ($p<0,0001$) (**Figura VI.8 v**). En EGS 39128, la concentración de TEN fue significativamente mayor a 25°C (65,33 µg/kg), seguida por 30°C (39,22 µg/kg) y 35°C (39,13 µg/kg), y menor a 12°C (13,10 µg/kg). Además, el tiempo de incubación ($p<0,0001$) y la interacción temperatura-tiempo ($p<0,0001$) también tuvieron un efecto significativo, con concentraciones significativamente mayores a los 15 días (45,15 µg/kg) en comparación con 30 (36,17 µg/kg) y 45 días (36,28 µg/kg), y las concentraciones más altas a 25°C y 45 días (66,80 µg/kg) y 25°C y 30 días (66,30 µg/kg). En TPP117, la temperatura de 25°C produjo concentraciones de TEN significativamente mayores (725,22 µg/kg) que 30°C (282,28 µg/kg) y 35°C (54,53 µg/kg), sin diferencias con 12°C (346,69 µg/kg). El tiempo de incubación y la interacción temperatura-tiempo no tuvieron un efecto significativo en este aislamiento. En TPP173, la concentración de TEN fue significativamente mayor a 25°C (2083,93 µg/kg) en comparación con las demás temperaturas, sin diferencias significativas entre 12°C (62,82 µg/kg), 30°C (24,36 µg/kg) y 35°C (13,56 µg/kg). Además, el tiempo de incubación tuvo un efecto significativo ($p<0,05$), con concentraciones significativamente mayores a los 45 días (1126,06 µg/kg) en comparación con 15 (275,27 µg/kg) y 30 días (237,18 µg/kg). La

interacción temperatura-tiempo también fue significativa ($p<0,01$), con la concentración más alta a 25°C y 45 días (4270,36 µg/kg).

Los análisis de varianza para la toxina ATX-I mostraron resultados diferentes en los tres aislamientos estudiados (**Figura VI.8 vi**). En EGS 39128, ni la temperatura, ni el tiempo de incubación, ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de ATX-I. Para TPP117, el tiempo de incubación tuvo un efecto significativo ($p<0,01$), con una concentración de ATX-I significativamente mayor a los 15 días (54,90 µg/kg) en comparación con 30 (20,83 µg/kg) y 45 días (14,54 µg/kg), mientras que la temperatura y la interacción temperatura-tiempo no mostraron un efecto significativo. En TPP173, tanto la temperatura ($p<0,0001$) como el tiempo de incubación ($p<0,01$) tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de ATX-I. Esta fue significativamente mayor a 12°C (687,14 µg/kg) en comparación con las demás temperaturas, sin diferencias significativas entre 25°C (204,62 µg/kg), 30°C (187,38 µg/kg) y 35°C (63,46 µg/kg). Además, la concentración de ATX-I fue significativamente mayor a los 15 días de incubación (432,93 µg/kg) en comparación con 30 (234,25 µg/kg) y 45 días (189,77 µg/kg). La interacción temperatura-tiempo no tuvo un efecto significativo en este aislamiento.

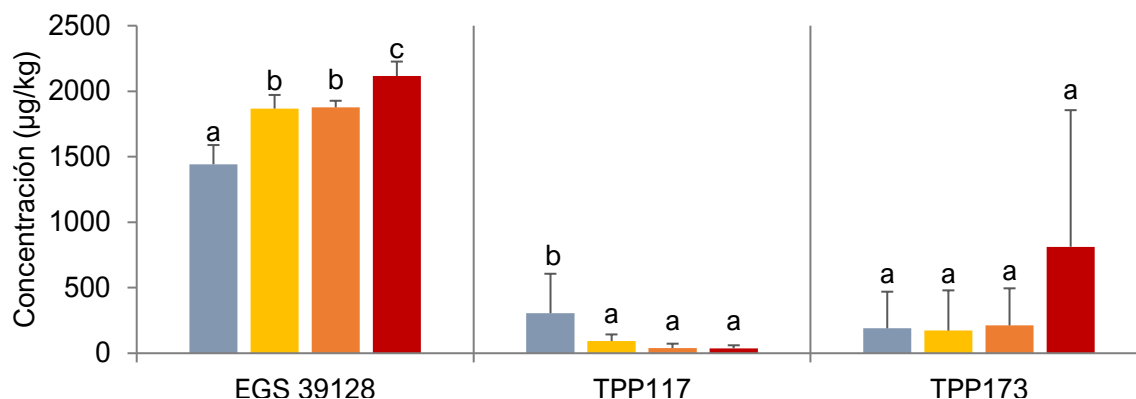
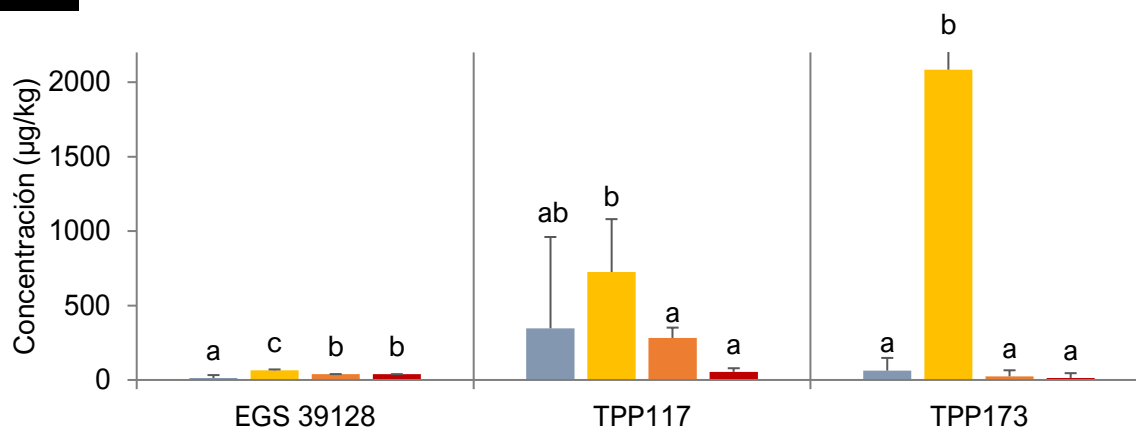
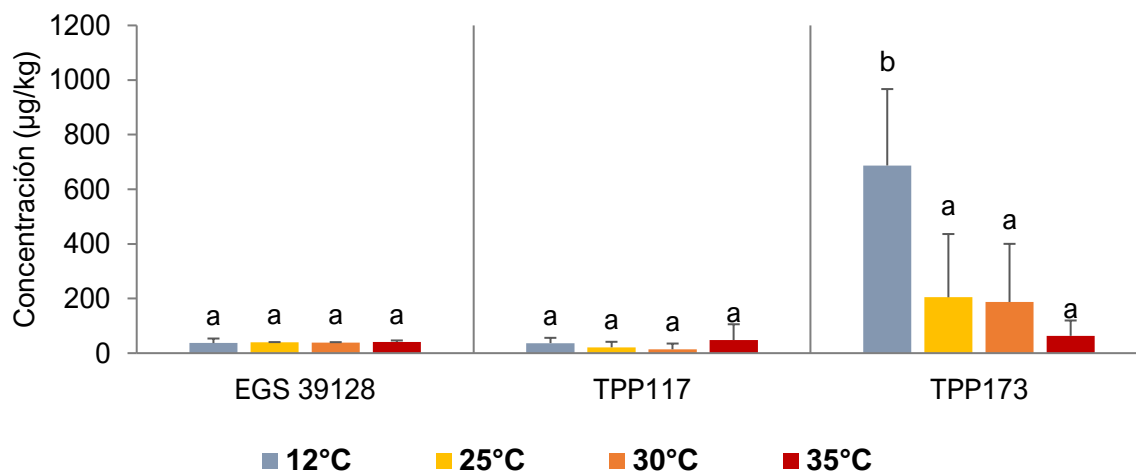
iv.TeA

v.TEN

vi.ATX-I


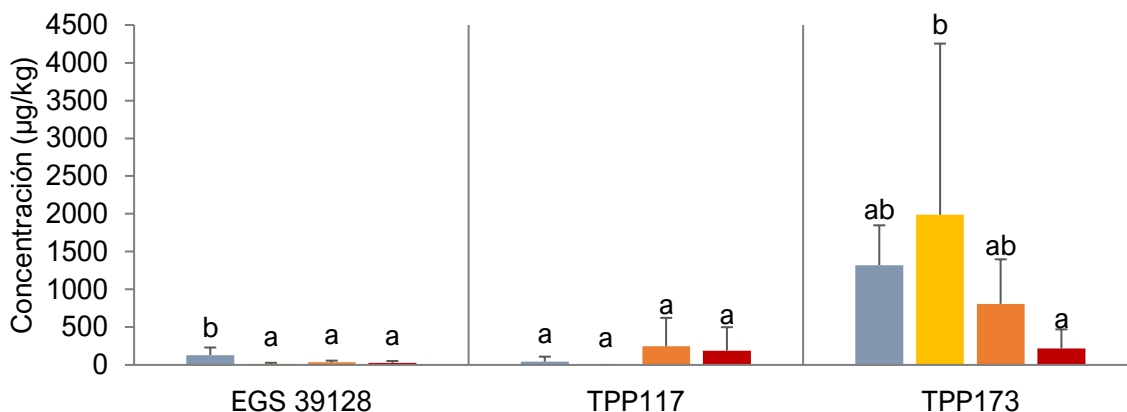
Figura VI.8. Concentración promedio (µg/kg) de **iv.** Ácido tenuazónico (TeA), **v.** Tentoxina (TEN), **vi.** Altertoxina I (ATX-I) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Los análisis de varianza para la toxina ATX-II mostraron resultados diferentes en los tres aislamientos estudiados (**Figura VI.9 vii**). En EGS 39128, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0,0001$), con concentraciones significativamente mayores a 12°C (130,22 µg/kg) que a las demás temperaturas, sin diferencias entre 25°C (13,62 µg/kg), 30°C (34,90 µg/kg) y 35°C (26,47 µg/kg). La interacción temperatura-tiempo también fue significativa ($p < 0,001$), con las concentraciones más altas a 12°C y 45 días (185,20 µg/kg) y 12°C y 30 días (187,40 µg/kg). El tiempo de incubación no mostró un efecto significativo en este aislamiento. En TPP117, ni la temperatura, ni el tiempo de incubación, ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de ATX-II. Para TPP173, tanto la temperatura ($p < 0,001$) como el tiempo de incubación ($p < 0,001$) y su interacción ($p < 0,0001$) tuvieron un efecto significativo. La concentración de ATX-II fue significativamente mayor a 25°C (1987,89 µg/kg) que a 35°C (216,92 µg/kg), seguida de 12°C (1320,75 µg/kg) y 30°C (808,50 µg/kg) aunque sin diferencias significativas con estas temperaturas. Además, la concentración fue significativamente mayor a los 15 días de incubación (1844,24 µg/kg) en comparación con 30 (709,53 µg/kg) y 45 días (696,78 µg/kg). La interacción reveló que la concentración más alta se obtuvo a 25°C y 15 días (4711,77 µg/kg).

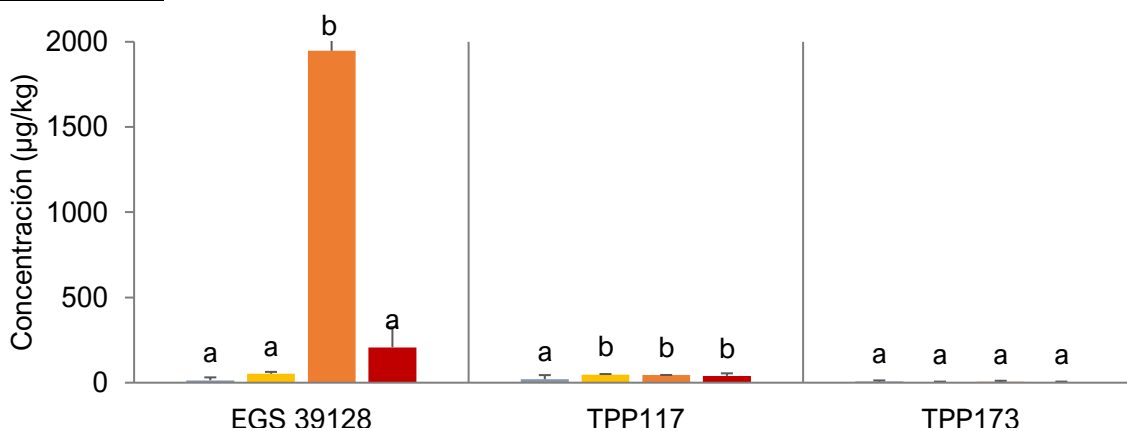
Para la toxina AAL-TA (**Figura VI.9 viii**). En EGS39128, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0,0001$), con una concentración significativamente mayor a 30°C (1947,19 µg/kg) en comparación con las demás temperaturas, sin diferencias entre 12°C (13,84 µg/kg), 25°C (52,20 µg/kg) y 35°C (207,20 µg/kg). No se observó un efecto significativo del tiempo de incubación o de la interacción temperatura-tiempo en este aislamiento. En TPP117, la temperatura ($p < 0,0001$) y la interacción temperatura-tiempo ($p < 0,0001$) tuvieron un efecto significativo, con concentraciones significativamente mayores a 25°C (47,69 µg/kg), 30°C (44,66 µg/kg) y 35°C (39,89 µg/kg) en comparación con 12°C (20,33 µg/kg). La interacción reveló que las concentraciones más altas se obtuvieron a 12°C y 15 días (50,87 µg/kg), 25°C y 15 días (48,27 µg/kg), 25°C y 30 días (47,53 µg/kg) y 25°C y 45 días (47,27 µg/kg). El tiempo de incubación no tuvo un efecto significativo en este aislamiento. En contraste, en TPP173, ni la temperatura, ni el tiempo de incubación, ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de AAL-TA, que se produjo en concentraciones menores que para los otros aislamientos.

Para la toxina AAL-TB (**Figura VI.9 ix**), en EGS 39128, tanto la temperatura ($p < 0,0001$) como el tiempo de incubación ($p < 0,05$) tuvieron un efecto significativo, con una concentración mayor a 30°C (77,01 µg/kg) y 35°C (54,79 µg/kg), aunque sin diferencias significativas entre sí, pero significativamente mayor que a 25°C (43,42 µg/kg), y 12°C (14,43 µg/kg). No se observaron diferencias significativas entre los tiempos de incubación evaluados. En TPP117, la temperatura ($p < 0,0001$), el tiempo de incubación ($p < 0,0001$) y su interacción ($p < 0,0001$) tuvieron un efecto significativo, con concentraciones significativamente mayores a 25°C (43,53 µg/kg), 30°C (43,37 µg/kg) y 35°C (43,33 µg/kg) en comparación con 12°C (14,57 µg/kg), y a los 15 días de incubación (43,48 µg/kg) en comparación con 30 (32,58 µg/kg) y 45 días (32,54 µg/kg). La interacción reveló que las concentraciones más altas se obtuvieron a 12°C y 15 días (43,70 µg/kg), 25°C y 15 días (43,53 µg/kg), 25°C y 30 días (43,57 µg/kg) y 25°C y 45 días (43,50 µg/kg). En contraste, en TPP173, no se detectó la presencia de AAL-TB ($< \text{LOD}$) en ninguna de las condiciones evaluadas.

vii.ATX-II



viii.AAL-TA



ix.AAL-TB

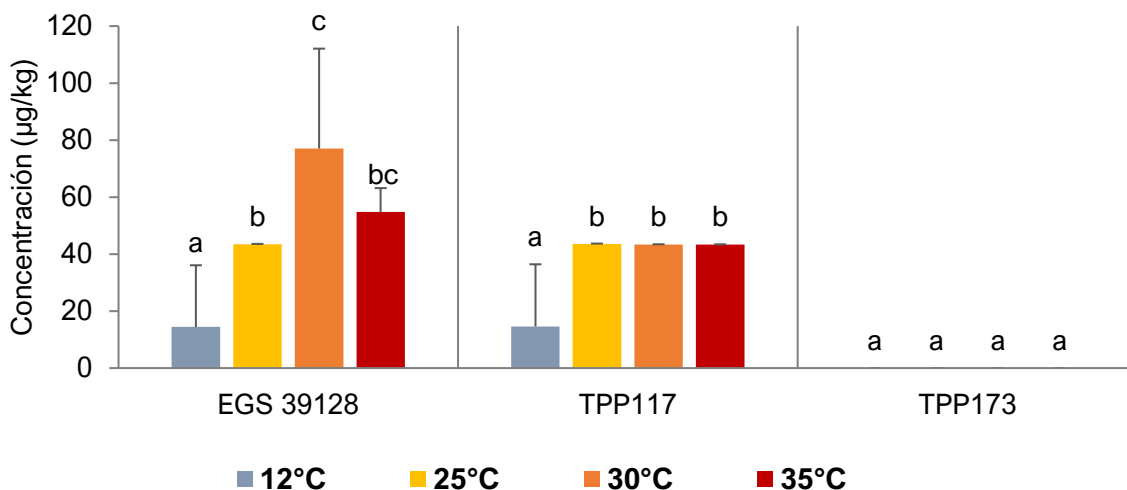


Figura VI.9. Concentración promedio (µg/kg) de **vii.** Altertoxina II (ATX-II), **viii.** Toxina AAL-TA (AAL-TA), **ix.** Toxina AAL-TB (AAL-TB) por temperatura de incubación (12, 25, 30 y 35°C) para cada uno de los aislamientos de *Alternaria* spp. EGS 39128 (*A. arborescens*), TPP117 (*A. tomaticola*) y TPP173 (*A. arborescens*); cultivados en Agar Pulpa de Tomate (APT). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

VI.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información valiosa sobre la ecofisiología, en cuanto al crecimiento y la producción de toxinas por aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate, bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

En cuanto al crecimiento, se observaron tendencias similares respecto del efecto de la temperatura sobre las velocidades máximas de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y las fases de latencia (λ) para los tres aislamientos EGS 39128, TPP117 y TPP173. La temperatura óptima para el crecimiento se ubicó entre 25 y 30°C, más precisamente entre 26 y 27°C para los tres aislamientos. Asimismo, las fases de latencia (λ) más cortas se hallaron a temperaturas cercanas a 30°C. Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que la temperatura óptima para el crecimiento de *Alternaria* spp. se encuentra entre 25°C y 30°C (Anal et al., 2021; Lee et al., 2015). Sin embargo, es importante conocer el comportamiento ecofisiológico de los aislamientos nativos, ya que estos pueden presentar adaptaciones a las condiciones climáticas o prácticas postcosecha para un determinado cultivo.

Los únicos datos disponibles sobre el efecto de la temperatura en el desarrollo de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate en Argentina son los reportados por Pose et al. (2009) y Vaquera et al. (2014). Pose et al. (2009) describe una temperatura óptima para aislamientos de *A. alternata* de tomate de 21°C a una a_w de 0,982. Vaquera et al. (2014), en cambio, mostró que 30°C produjo un óptimo crecimiento de *A. arborescens* a 0,995 a_w . En el presente estudio no se modificó la a_w del medio APT debido a la intención de simular un ambiente similar al de los frutos de tomate (0,95-0,98). Sin embargo, los resultados son similares a los descriptos por Vaquera et al. (2014), en cuanto al efecto de la temperatura sobre el crecimiento. Cabe destacar que en el trabajo de Pose et al. (2009) no se evaluaron temperaturas intermedias entre 21 y 35°C, lo que puede explicar las diferencias observadas con los resultados del presente trabajo.

Las temperaturas óptimas para el crecimiento de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate halladas en el presente estudio muestran un riesgo elevado, ya que se encuentran entre las temperaturas a las que el cultivo puede estar expuesto en los

meses de verano y en postcosecha, cuando se almacena a temperatura ambiente. Estas condiciones resultan altamente favorables para el desarrollo del patógeno, por lo que una infección puede rápidamente causar el deterioro del fruto. Sin embargo, es de destacar que para los tres aislamientos, también se observó crecimiento, si bien a menor velocidad, a 12°C, una temperatura que representa la de las cámaras de almacenamiento de tomate en postcosecha. Dado que el tomate es altamente susceptible al daño por frío, no se recomienda su almacenamiento por periodos prolongados a temperaturas por debajo del rango 10-12°C. Dado que las altas temperaturas en verano presentan un impacto negativo en la vida útil del tomate, una práctica aconsejable es su rápido transporte a cámaras de almacenamiento refrigeradas. No obstante, los resultados del presente estudio demostraron que algunas especies de *Alternaria* son capaces de proliferar y colonizar el fruto a las temperaturas habituales de las cámaras de almacenamiento, e incluso, algunos aislamientos pueden llegar a desarrollar a mayor velocidad que a 35°C en estas condiciones. Si bien a 12°C las fases de latencia se extienden respecto de la temperatura óptima, la variación es de apenas 1-1,3 días, lo cual no representa una ventaja significativa durante el periodo de vida útil del fruto. Es por ello que el control de *Alternaria* spp. debe incluir un manejo integral desde etapas precosecha hasta el almacenamiento en postcosecha, aún cuando este se realice en cámaras refrigeradas.

En relación con la producción de toxinas, los aislamientos estudiados mostraron la capacidad de producir todas las micotoxinas analizadas, con la excepción de AAL-TB por el aislamiento TPP173. Estos resultados coinciden con estudios previos que reportan la capacidad de *Alternaria* spp. para producir múltiples micotoxinas en diferentes sustratos, incluyendo tomates (Pose et al., 2010; Vaquera et al., 2014).

Los análisis de varianza revelaron que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la producción total de toxinas en los aislamientos EGS 39128 y TPP173, con concentraciones máximas a 30°C y 25°C, respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que indican que temperaturas entre 25°C y 30°C son favorables para la producción de toxinas por *Alternaria* spp. (Oviedo et al., 2011; Pose et al., 2010; Vaquera et al., 2014).

Al comparar las concentraciones de toxinas obtenidas en este estudio con las reportadas por otros autores, se observan algunas similitudes y diferencias. Por ejemplo, Pose et al. (2010) encontraron que la producción óptima de AOH por *A. alternata* en tomate ocurrió a 0,954 aw y 21°C (1,8 µg/g), mientras que, en este estudio, la concentración máxima de AOH se observó a 30°C en TPP117 (641,39 µg/kg) y a 25°C en TPP173 (198,07 µg/kg). Sin embargo, estas temperaturas no fueron incluidas en el estudio previamente mencionado, lo que justifica las diferencias observadas. Por otro lado, Vaquera et al. (2014) reportaron que la producción óptima de AOH y AME por *A. arborescens* en tomate se produjo a 0,975 a_w y 30°C (14,8 y 8,1 µg/g, respectivamente), lo que coincide con las condiciones óptimas observadas en nuestro estudio para estos metabolitos en el aislamiento EGS 39128.

En cuanto a TeA, Oviedo et al. (2011) encontraron que la producción máxima por *A. alternata* en soja ocurrió a 0,98 a_w y 25°C (5,9 µg/g), mientras que, en este estudio, la concentración máxima de TeA se observó a 35°C en EGS 39128 (2115,07 µg/kg) y a 12°C en TPP117 (304,95 µg/kg). Estas diferencias podrían atribuirse a las distintas especies de *Alternaria* y sustratos evaluados en cada estudio, así como a la variabilidad entre aislamientos de la misma especie.

Asimismo, se observaron diferencias en la capacidad de producción de toxinas entre los aislamientos estudiados. Por ejemplo, TPP173 presentó las concentraciones más altas de ATX-II (6155,9 µg/kg a 25°C) y TEN (5853,3 µg/kg a 25°C), mientras que EGS 39128 mostró las concentraciones máximas de AAL-TA (3511,1 µg/kg a 30°C) y TeA (2322,2 µg/kg a 35°C). Estos hallazgos coinciden con estudios previos que reportan variabilidad en la producción de toxinas entre diferentes aislamientos de *Alternaria* spp. (Lee et al., 2015; Pose et al., 2010; Vaquera et al., 2014).

Los resultados del presente estudio muestran que, en promedio, la máxima acumulación de toxinas por los distintos aislamientos ocurre entre 25 y 30°C, por lo que estas temperaturas representarían el máximo riesgo para la contaminación de frutos de tomate con micotoxinas. Sin embargo, debido a las diferencias entre aislamientos y entre las toxinas analizadas, algunas de ellas pueden acumularse en cantidades significativas a temperatura de almacenamiento en postcosecha (12°C). Es de esperar que, si la contaminación ocurre durante el almacenamiento en cámaras,

los frutos presenten altas concentraciones de AME, TeA, TEN y/o ATX-I, dependiendo del aislamiento que infecte los frutos.

En general, los resultados obtenidos en este estudio resaltan la importancia de considerar las condiciones ambientales específicas, como la temperatura y el tiempo de incubación, al evaluar la ecofisiología y la producción de toxinas por aislamientos de *Alternaria* spp. Además, las diferencias observadas entre los aislamientos estudiados y en comparación con otros estudios sugieren la necesidad de realizar evaluaciones en las poblaciones nativas y con el máximo número posible de aislamientos, con el fin de comprender mejor su comportamiento y su potencial para producir micotoxinas en diferentes sustratos, como lo sugieren estudios previos (Oviedo et al., 2011; Pose et al., 2009; Vaquera et al., 2014).

Los resultados obtenidos tienen implicaciones importantes para el manejo de *Alternaria* spp. en la producción, almacenamiento y procesamiento de tomates y productos derivados. La identificación de las condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de toxinas por diferentes aislamientos puede ayudar a desarrollar estrategias de control más efectivas, con el fin de prevenir la contaminación por micotoxinas y garantizar la inocuidad de los alimentos.

VI.5 Conclusiones

El presente estudio proporciona una visión actualizada sobre la ecofisiología y síntesis de toxinas por aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate, bajo diversas condiciones de temperatura y tiempos de incubación. Es destacable también que es el primer estudio que identifica toxinas específicas del huésped (AAL) en aislamientos nativos causantes de deterioro de frutos de tomate.

Los resultados subrayan la importancia de considerar las condiciones ambientales y las variaciones entre los aislamientos al evaluar el riesgo de contaminación por micotoxinas en tomates y sus derivados. Estos resultados *in vitro* se podrían extrapolar al riesgo de deterioro de los frutos de tomate y la acumulación de toxinas, tanto en fruto como en sus productos derivados causado por este patógeno, principal responsable del moho negro en frutos maduros de tomate. La comprensión de los factores ambientales que influyen en el crecimiento fúngico es esencial para crear

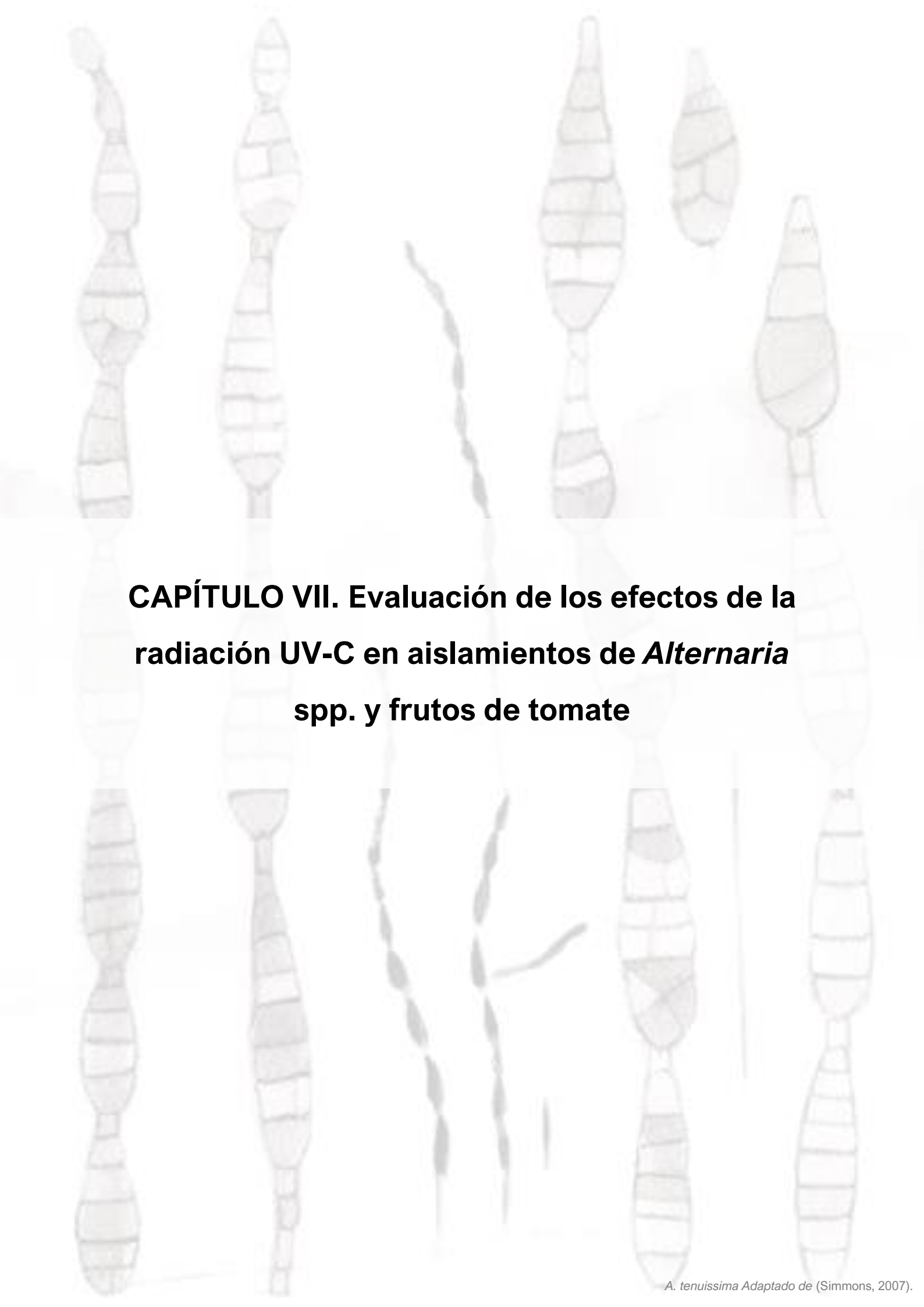
entornos de almacenamiento que minimicen la producción de micotoxinas. Dado el potencial toxicogénico de *Alternaria*, y su capacidad para acumular micotoxinas en condiciones de temperatura que abarcan las distintas etapas de producción del tomate, es importante controlar adecuadamente las materias primas a fin de reducir el riesgo para la salud del consumidor asociado con la ingesta de productos procesados a base de tomate.

VI.6 Bibliografía

- Aichinger, G., Del Favero, G., Warth, B., & Marko, D. (2021). *Alternaria* toxins—Still emerging? Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20(5), 4390-4406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12803>
- Ali, S., Tyagi, A., Rajarammohan, S., Mir, Z. A., & Bae, H. (2023). Revisiting *Alternaria*-host interactions: New insights on its pathogenesis, defense mechanisms and control strategies. *Scientia Horticulturae*, 322, 112424. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112424>
- Anal, A. K. D., Kumar, V., & Varma, A. (2021). Ecophysiology of *Alternaria alternata* Causing Diseases in Litchi (*Litchi chinensis*). *Erwerbs-Obstbau*, 63(2), 163-173. <https://doi.org/10.1007/s10341-021-00554-w>
- Brandwagt, B., Mesbah, L., Laurent, P., Takken, F., Kneppers, T., John, H., Nijkamp, J., & Hille, J. (1998). The Interaction of *Alternaria Alternata* f.sp. *lycopersici* and its AAL-Toxins with Tomato (pp. 317-330). https://doi.org/10.1007/978-94-011-5218-1_36
- Kodama, M. (2019). Evolution of pathogenicity in *Alternaria* plant pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, 85(6), 471-474. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00877-3>
- Lee, H. B., Patriarca, A., & Magan, N. (2015). *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, 43(2), 93-106. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>
- Li, J., Cornelissen, B., & Rep, M. (2020). Host-specificity factors in plant pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 103447. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103447>
- Magan, N., Cayley, G. R., & Lacey, J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 1113-1117. <https://doi.org/10.1128/aem.47.5.1113-1117.1984>
- Medina, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2015). 4 Changes in environmental factors driven by climate change: effects on the ecophysiology of mycotoxigenic fungi. *En Climate Change and Mycotoxins* (pp. 71-90). DE GRUYTER. <https://doi.org/10.1515/9783110333619-006>
- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2017). *Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>
- Meena, M., & Samal, S. (2019). *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Reports*, 6, 745-758. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>
- 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(2), 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.007>
- Patriarca, A., da Cruz Cabral, L., Pavicich, M. A., Nielsen, K. F., & Andersen, B. (2019). Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. International Journal of Food Microbiology, 291, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.022>
- Pinto, V. E. F., & Patriarca, A. (2017). *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins (pp. 13-32). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_2
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). Fungi and Food Spoilage. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>
- 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(1), 60-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.018>
- 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(3), 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.017>
- Prendes, L. P., Zachetti, V. G. L., Pereyra, A., Morata de Ambrosini, V. I., & Ramirez, M. L. (2017). Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. Journal of Applied Microbiology, 122(2), 481-492. <https://doi.org/10.1111/jam.13351>
- Sanchis, V., & Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. En Mycotoxins in Food (pp. 174-189). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855739086.2.174>
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Hanada, K., Akagi, Y., Kodama, M., Akimitsu, K., & Yamamoto, M. (2016). Evolution of pathogenicity controlled by small, dispensable chromosomes in *Alternaria alternata* pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 95, 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.02.009>
- Vaquera, S., Patriarca, A., & Fernández Pinto, V. (2014). Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. International Journal of Food Microbiology, 185, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.007>
- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Devos, T., Njumbe Ediage, E., Diana Di Mavungu, J., Jacxsens, L., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L., & De Saeger, S. (2016). Validated UPLC-MS/MS Methods to Quantitate Free and Conjugated *Alternaria* Toxins in Commercially Available Tomato Products and Fruit and Vegetable Juices in Belgium. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(24), 5101-5109. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01029>
- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Ediage, E. N., Di Mavungu, J. D., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L., & De Saeger, S. (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. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.10.083>

A detailed microscopic illustration of Alternaria spp. The image shows several long, multi-segmented hyphae with distinct conical spores at their tips. The spores are elongated and have a characteristic pattern of transverse and longitudinal ridges. The hyphae are thin and filamentous, with some showing a slight curve. The overall appearance is typical of the genus Alternaria, which is known for its long, branched hyphae and characteristic spore morphology.

CAPÍTULO VII. Evaluación de los efectos de la radiación UV-C en aislamientos de *Alternaria* spp. y frutos de tomate

VII.1 Introducción

El tomate es un fruto ampliamente consumido tanto en fresco como procesado, y su consumo ha sido asociado con diversos beneficios debido a su contenido de antioxidantes (Salehi et al., 2019; Waheed et al., 2019). Sin embargo, los tomates frescos son altamente susceptibles a la contaminación fúngica, especialmente por especies del género *Alternaria*, como se evidenció en los Capítulos II y III de este trabajo. Estas infecciones causan deterioro en los frutos tanto en el campo como durante la cosecha y el almacenamiento (Chudinova et al., 2020; Kokaeva et al., 2020), lo que no solo reduce los rendimientos cuantitativamente, sino que también deteriora su calidad y expone al consumidor a las toxinas producidas por este hongo (Bello et al., 2016; Bhat, 2016).

En el Capítulo IV se evidenció la presencia de toxinas de *Alternaria* en los productos procesados de tomate, mientras que en el Capítulo VI se analizó la producción de toxinas por aislamientos de *Alternaria* bajo diferentes condiciones de temperatura asociadas con diversas etapas del cultivo. Debido a la naturaleza altamente perecedera de los tomates después de la cosecha (C. Silva et al., 2021), es crucial encontrar alternativas de control para este género fúngico, con el fin de evitar la presencia de toxinas y prevenir el deterioro poscosecha, lo que a su vez ayudaría a reducir las grandes pérdidas económicas asociadas a este problema.

Tradicionalmente, los fungicidas se han utilizado para prevenir enfermedades de etiología fúngica. Sin embargo, la creciente resistencia de los hongos filamentosos a los fungicidas ha provocado un aumento de las dosis y la frecuencia de su uso, lo que supone una amenaza para la salud pública y un alto riesgo de contaminación ambiental (Rusakovich et al., 2021). Entre los métodos alternativos de saneamiento, la luz ultravioleta (UV) se ha convertido en una tecnología física no térmica elegida por sus ventajas: eficacia contra una amplia gama de microorganismos patógenos y de deterioro, un estado no tóxico y libre de residuos, lo que la convierte en estrategia de bajo impacto ambiental, un efecto negativo mínimo sobre las propiedades organolépticas y nutricionales, y costos relativamente bajos y bajo uso de energía en comparación con las tecnologías de descontaminación térmica (Abadias et al., 2021).

La radiación ultravioleta se divide en tres bandas: UV-A, UV-B y UV-C. La UV-C (100–280 nm) es altamente germicida y se usa comúnmente para la esterilización de superficies, agua y aire (Valero et al., 2007). El mecanismo de acción de la luz UV-C está relacionado principalmente con la absorción de UV por los componentes de ácidos nucleicos, causando daño en el ADN/ARN y la formación de dímeros entre las timinas adyacentes en las cadenas de polinucleótidos del ADN (Khan et al., 2022; Narita et al., 2020). Además, la irradiación con UV-C no solo puede controlar el desarrollo de enfermedades, sino también inducir la biosíntesis de compuestos fenólicos en frutos de tomate (Liu et al., 2018). Estos compuestos, productos del metabolismo secundario, se consideran parte de los mecanismos de defensa en las plantas y pueden inhibir eficazmente la acumulación de micotoxinas (Han et al., 2023b; Jiang et al., 2019).

Por lo cual, el objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de la radiación UV-C como estrategia de control de *Alternaria*. Para ello, se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de los efectos fungicida y fungistático de esta radiación sobre aislamientos de este género. Además, se determinó el impacto de la radiación UV-C sobre frutos de tomate. Los resultados obtenidos en este estudio podrían tener aplicaciones prácticas en la mejora de la inocuidad y calidad de los tomates, así como en la extensión de su vida útil con fines comerciales, con el fin de reducir las pérdidas económicas asociadas al deterioro causado por *Alternaria*.

VII.2 Materiales y métodos

VII.2.1 Preparación de la suspensión de esporas

Se seleccionaron tres aislamientos de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173) que previamente habían amplificado el gen ALT1. Estos aislamientos se cultivaron por triplicado en medio V8® y se incubaron durante 7 días a 23°C con ciclos alternados de luz y oscuridad para favorecer su esporulación. Tras el periodo de incubación, se recolectaron las esporas de cada aislamiento utilizando un asa de siembra estéril y se transfirieron a tubos de vidrio que contenían 1 ml de una solución de Tween 80 al 0,05% para facilitar su dispersión. La concentración de conidios en las suspensiones obtenidas se determinó mediante el método de recuento en cámara de Neubauer (Mahasneh & Bdour, 2006), para estandarizar la concentración de los inóculos.

VII.2.2 Inoculación

VII.2.2.1 Efecto fungicida

Se prepararon diluciones seriadas de las suspensiones de conidios en Tween 80 al 0,05% hasta obtener una concentración final de 10^3 conidios/ml. A partir de esta dilución, se inocularon 100 μ l en placas de Petri que contenían Agar Papa Zanahoria (APZ). Los conidios se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del medio utilizando un asa de Drigalsky estéril. Las placas inoculadas se dejaron reposar durante 5 minutos antes de ser sometidas a los tratamientos de irradiación UV-C.

VII.2.2.2 Efecto fungistático

Se preparó una suspensión de conidios a una concentración de 10^5 conidios/ml. A partir de esta suspensión, se transfirió un volumen de 10 μ l al centro de placas de Petri que contenían agar Papa Zanahoria (APZ), utilizando un asa de siembra estéril calibrada. Las placas inoculadas se incubaron a 25°C durante 24 horas para permitir el crecimiento inicial de las colonias fúngicas para su posterior tratamiento con radiación UV-C.

VII.2.3 Irradiación

Se emplearon dos lámparas UV-C (YLX F18T8/GL) que emitían luz a una longitud de onda de 254 nm. La intensidad de la radiación UV-C se midió utilizando un fotómetro equipado con un sensor específico para UV-C (Extech SDL470) y se expresó en mW/cm². Los tratamientos de irradiación se llevaron a cabo en un dispositivo de irradiación personalizado, diseñado y adaptado específicamente para este estudio, el cual se muestra en la **Figura VII.1**.

La dosis de irradiación se calculó mediante la ecuación (López-Rubira et al., 2007):

$$D = \left(\frac{I \cdot t}{1000} \right)$$

Donde:

D = Dosis de irradiación aplicada (KJ/m²)

I = Intensidad de irradiación bajo el área de la luz UV-C (W/m²)

t = tiempo de exposición (s)

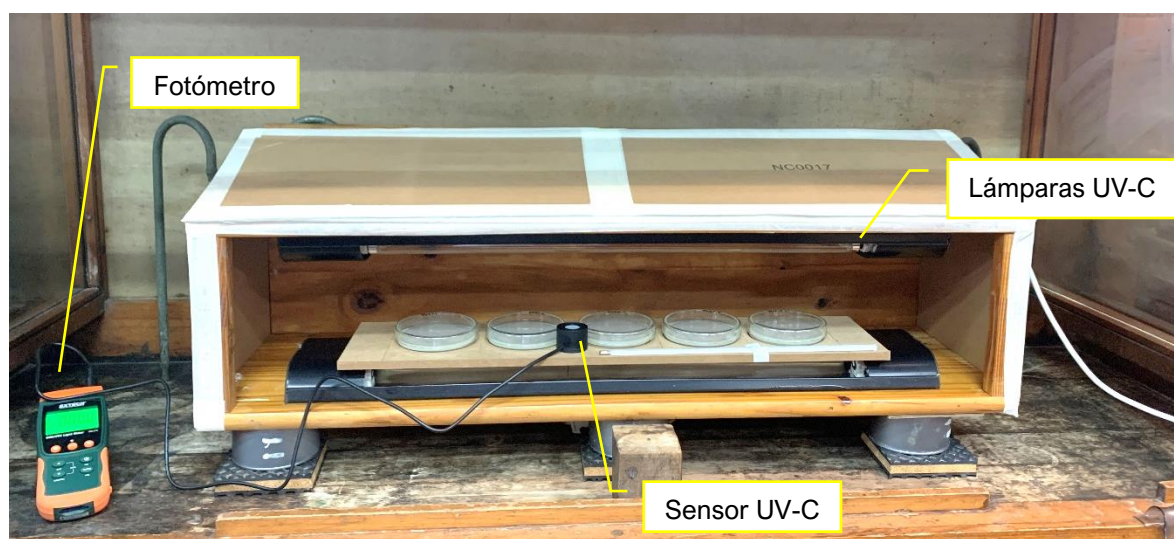


Figura VII.1. Equipo de irradiación UV-C adaptado

VII.2.3.1 Efecto fungicida

Los aislamientos de *Alternaria* spp. fueron inoculados en placas de agar Papa Zanahoria (APZ), preparadas según el método descrito en la sección VII.2.2.1. Posteriormente, las placas fueron expuestas a diferentes tiempos de radiación UV-C. Las intensidades de radiación UV-C específicas para cada aislamiento se midieron con el radiómetro y resultaron de: 1,581 mW/cm² para la cepa patrón EGS 39128, 1,675 mW/cm² para el aislamiento TPP117 y 1,665 mW/cm² para TPP173. Los intervalos de tiempo de exposición fueron de 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos. Las dosis de radiación UV-C (KJ/m²) se calcularon empleando la ecuación descrita en el apartado VII.2.3 (López-Rubira et al., 2007) teniendo en cuenta la equivalencia de unidades como se describe en el ejemplo.

Ejemplo: Para una intensidad de 1,581 mW/cm² aplicada por 30 segundos, se convierten las unidades de intensidad de mW/cm² a W/m² (1 mW/cm² = 10 W/m²) y, teniendo en cuenta que las unidades de W · s son equivalentes a J, se convierten a KJ (1000 J = 1 KJ), y se calcula la dosis en KJ/m² con la siguiente fórmula:

$$D = \left(\frac{I \cdot t}{1000} \right)$$

$$D = \left(\frac{15,81 \frac{W}{m^2} \cdot 30 s}{1000} \right)$$

$$D = 0,47 \frac{KJ}{m^2}$$

Después de cada tratamiento, las placas irradiadas con cada una de las dosis tratamiento se incubaron a 25°C durante 4 días para evaluar el efecto de la radiación UV-C sobre la germinación de los conidios. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las colonias generadas a partir de los conidios irradiados en cada placa de APZ. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se incluyó un control no irradiado para cada aislamiento.

Adicionalmente, se elaboraron curvas de supervivencia utilizando el logaritmo de la fracción de supervivencia ($\log N/N_0$), donde N representa el número de conidios que sobrevivieron y germinaron después de la aplicación de la dosis de UV-C, y N_0 corresponde al número inicial de conidios sin exposición a la radiación UV-C (dosis 0).

VII.2.3.2 Efecto fungistático

Los aislamientos de *Alternaria* spp. fueron inoculados en placas de APZ, preparadas según el procedimiento descrito en la sección VII.2.2.2. En primera instancia, se midieron los diámetros de las colonias después de las 24 horas de incubación. Posteriormente, las placas fueron expuestas a diferentes tiempos de irradiación con UV-C. Los tratamientos de irradiación se aplicaron utilizando las siguientes intensidades de luz UV-C específicas para cada aislamiento: 1,750 mW/cm² para la cepa patrón EGS 39128, 1,593 mW/cm² para el aislamiento TPP117 y 1,726 mW/cm² para TPP173. Los intervalos de tiempo de exposición fueron de 2, 5, 7, 10, 20, 30 y 60 minutos. Después de la irradiación, las placas de Petri se incubaron nuevamente a 25°C y se monitoreó el crecimiento de las colonias fúngicas mediante la medición periódica del diámetro (cm) en los días posteriores al tratamiento. Se registró la medición de dos diámetros perpendiculares de cada colonia diariamente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, incluyendo un control no irradiado para cada aislamiento. Las mediciones del diámetro de las colonias se llevaron a cabo desde el momento de la inoculación hasta que los tratamientos cubrieron completamente la superficie del medio de cultivo.

Se comparó el logaritmo de la fracción del diámetro ($\log D/D_0$), donde D representa el diámetro de la colonia después de la aplicación de la dosis de UV-C, y D_0 corresponde al diámetro de la colonia después de 24 horas de incubación entre los tratamientos y los controles para cada aislamiento.

Adicionalmente, se graficaron las curvas de crecimiento (diámetro de las colonias en función del tiempo) y se calcularon dos parámetros de crecimiento: la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) expresada en cm/día y la fase de latencia (λ) expresada en días. Estos parámetros se obtuvieron a partir de la pendiente y la abscisa, respectivamente, de la regresión lineal aplicada a los datos (Vaquera et al., 2014).

VII.2.3.3 Efecto de la radiación UV-C sobre componentes del tomate.

Se obtuvieron tomates de cultivar perita de comercios locales, los cuales se lavaron con agua potable y se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 2 minutos. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en una cámara de flujo laminar para garantizar condiciones asépticas (**Figura VII.2**). Los frutos se sometieron a tratamientos de irradiación UV-C durante 5, 10 y 20 minutos, utilizando una intensidad promedio de 1,679 mW/cm². Para cada tiempo de exposición, se incluyeron controles no irradiados. Posteriormente, se mantuvieron en una incubadora a 25°C por 12 días. Luego del periodo de incubación se realizaron los análisis que se describen a continuación. Cada tratamiento se evaluó por quintuplicado.



Figura VII.2. Tomates desinfectados secándose en una cámara de flujo laminar antes de ser sometidos a tratamientos de irradiación UV-C.

VII.2.3.3.a Evaluación de estrés oxidativo

Se separaron cuidadosamente muestras de 0,5 g del epicarpio de cada tomate utilizando un pelador de verduras, asegurando que sólo se obtuviera la capa más externa del fruto. Las muestras recolectadas se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4°C para preservar su integridad y evitar el deterioro hasta el momento de su posterior análisis.

Peroxidación lipídica

El monitoreo de los niveles de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinó como equivalentes de malondialdehído (MDA) según Vavilin et al. (1998), con algunas modificaciones. Brevemente, se homogeneizaron 0,5 g con nitrógeno líquido luego se agregó a cada muestra 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se centrifugaron 20 min a 17500 x g. Se tomaron 0,6 ml de sobrenadante a los que se agregaron 0,6 ml de una mezcla de TCA 20% + ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) + 0,06 ml de butilhidroxitolueno (BHT 2% p/v en etanol absoluto). Después de calentar durante 30 min a 95°C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 5 min a 17500 x g para obtener un sobrenadante transparente. La cantidad de equivalentes de MDA por ml de extracto fue determinada después de leer las muestras a 440, 532 y 600 nm utilizando las ecuaciones de Hodges et al. (1999). Se prepararon blancos sin TBA con el fin de verificar que la presencia de pigmentos no interfiera significativamente con las estimaciones de TBARS.

Determinación del contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado según Woisky & Salatino (1998), con algunas modificaciones. Brevemente, 0,5 g de muestra se pulverizaron con N líquido y se extrajeron con 2 ml de EtOH 80%. Del extracto etanólico obtenido, parte se utilizó para determinar la concentración de flavonoides a 510 nm y parte se utilizó para estimar el contenido de compuestos con absorbancia a 315 nm, en la zona del UV. Siguiendo el protocolo de Woisky & Salatino (1998), luego de 60 minutos de iniciada la extracción, las muestras se centrifugaron 10 min a 10000 x g. Se tomaron 400 µl de sobrenadante, se agregó NaNO₂ 5% (30 µL) y, al cabo de 5 minutos, AlCl₃ 10% (30 µL). Luego de 30 minutos se agregaron 200 µl de NaOH 1 mM y se añadió agua

bidestilada hasta completar un volumen final de 1 ml. Se midió la absorbancia a 510 nm, expresándose los resultados como unidades relativas de absorbancia.

Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en extractos acuosos se estimó colorimétricamente mediante la formación de un complejo de fosfomolibdeno como se describe en Prieto et al. (1999). La mezcla de reacción contenía 30 µl de muestra (0,5 gr polvo N² + 2 mL EtOH) + 70 µl H₂O + 1 ml de reactivo (ácido sulfúrico 0,6 M + Na₂PO₄ 28 mM + (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4 mM). Se usó ácido ascórbico como estándar.

VII.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software RStudio 2023.06.1+524. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de los tratamientos, y se compararon esas medias mediante las pruebas de rangos múltiples de Tukey. Las diferencias en $p < 0,05$ se consideraron significativas.

VII.3 Resultados

VII.3.1 Efecto fungicida

Se registró el número de colonias de los tres aislamientos de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173) después de 4 días de incubación posteriores a la irradiación de los conidios con UV-C. La **Figura VII.3** muestra el efecto de las diferentes dosis de UV-C sobre la germinación de los conidios y subsecuente formación de colonias, evidenciando una reducción en el número de colonias a medida que aumenta la dosis de radiación. En comparación con el control sin irradiación, las placas irradiadas muestran el efecto fungicida de la luz UV-C. A partir de un tiempo de exposición de 5 minutos, no se detectaron colonias para ninguno de los aislamientos evaluados. Para confirmar la no viabilidad de los conidios, estas placas se mantuvieron a 25°C durante un periodo de 30 días, luego del cual no se observó el desarrollo de colonias. En el **Anexo XIX** se muestran los datos detallados del número promedio de colonias y las diferencias de medias significativas ($p < 0,05$) para cada combinación de dosis y aislamiento. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre las dosis de radiación UV-C aplicadas para los tres aislamientos, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,99, lo que indica que más del 99% de la variabilidad

en el número de colonias se puede atribuir a las dosis de radiación UV-C. La prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) reveló que, para los tres aislamientos, las dosis más altas de radiación UV-C (desde 4,74 hasta 56,92 KJ/m² para EGS 39128, desde 4,02 hasta 60,30 KJ/m² para TPP117 y desde 4,00 hasta 59,94 KJ/m² para TPP173) resultaron en un número significativamente menor o la ausencia de colonias en comparación con las dosis más bajas y el control sin irradiación.

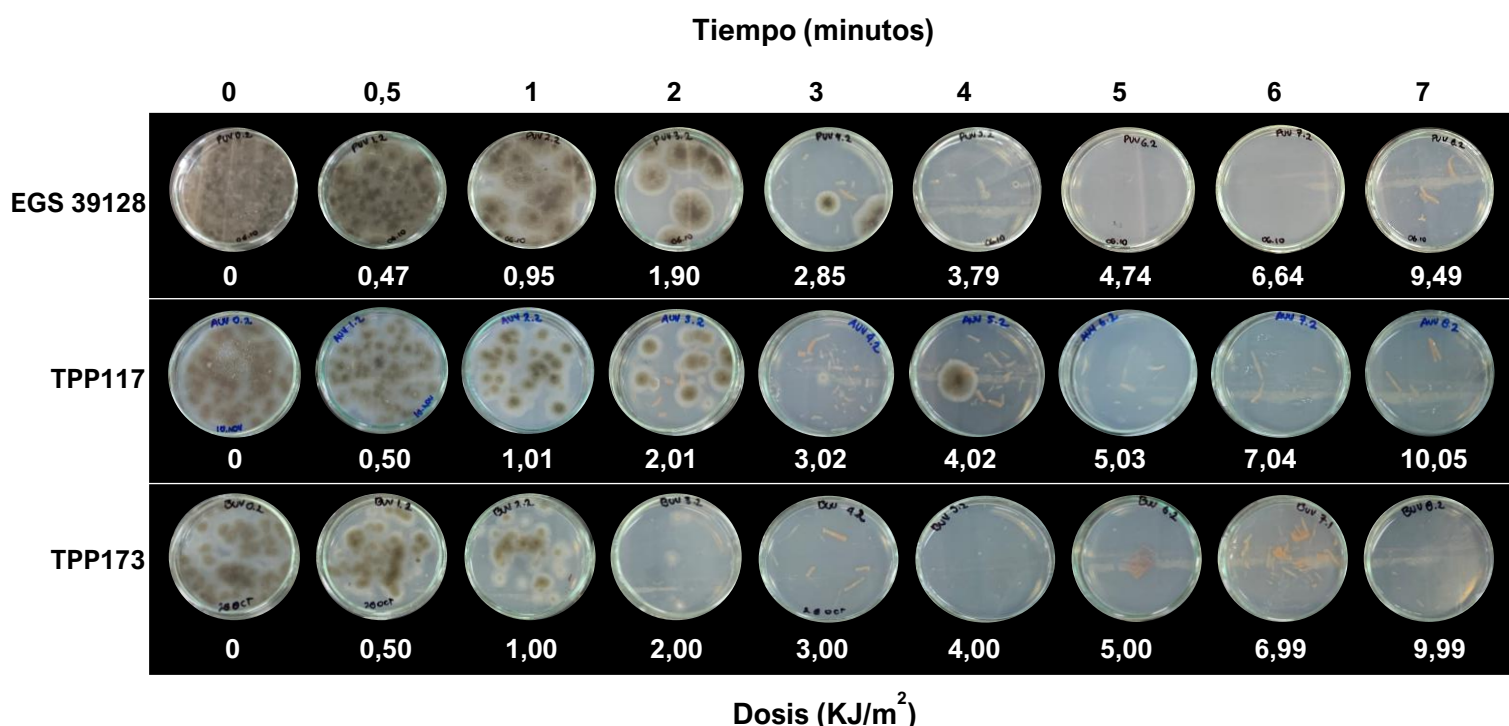


Figura VII.3. Efecto fungicida de la radiación UV-C sobre aislamientos de *Alternaria* spp. en función el tiempo de exposición (minutos) y de la dosis (KJ/m²). Las imágenes muestran el desarrollo de colonias en placas de Agar Papa Zanahoria (APZ) de una réplica después de 4 días de incubación a 25°C, tras ser sometidas a diferentes tratamientos de irradiación UV-C. Cada fila representa un aislamiento específico *A. arborescens* (EGS 39128 y TPP173) y *A. tomaticola* (TPP117).

La **Figura VII.4** presenta la cinética de inactivación de conidios de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173) en función de la dosis de radiación UV-C aplicada. En el eje de las abscisas se representan las dosis de UV-C en KJ/m², mientras que el eje de las ordenadas muestra el logaritmo de la fracción de supervivencia ($\log(N/N_0)$). Las curvas de inactivación para cada aislamiento se ajustan a un modelo polinómico de segundo grado, lo que sugiere una relación no lineal entre la dosis de UV-C y la inactivación de los conidios. Se puede observar que a medida que aumenta la dosis

de radiación UV-C, el logaritmo de la fracción de supervivencia disminuye, indicando una mayor inactivación de los conidios.

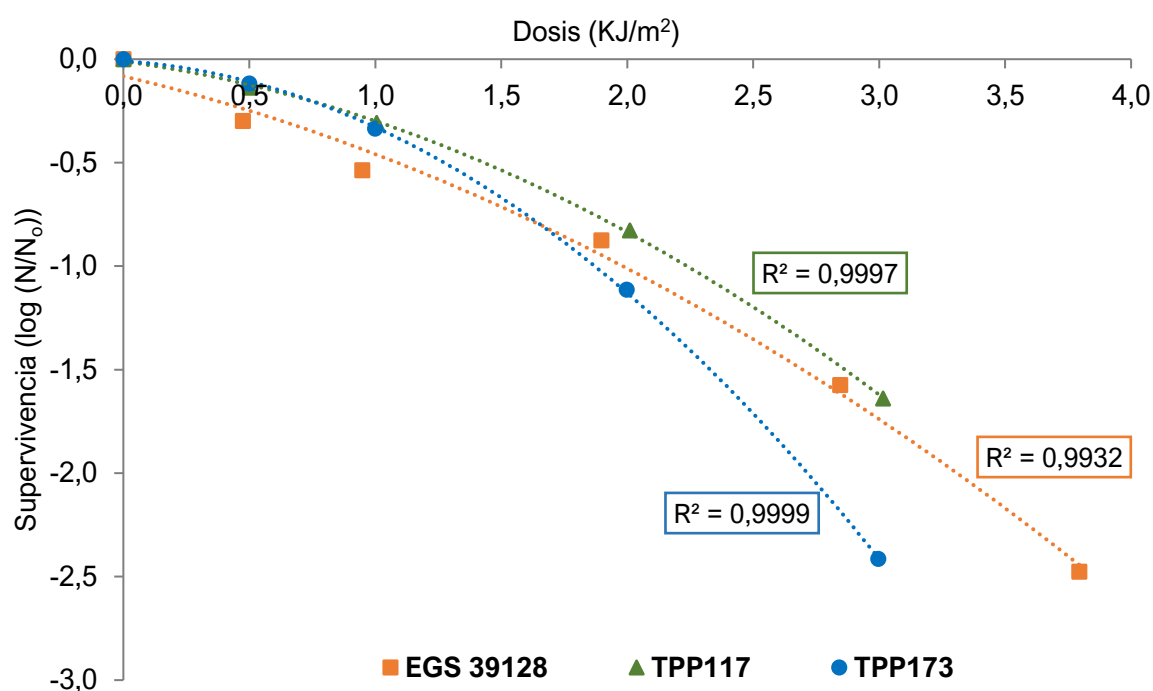


Figura VII.4. Cinética de inactivación UV-C de conidios de *Alternaria* spp. en Agar Papa Zanahoria (APZ), donde N es el número de conidios supervivientes de *Alternaria* spp. después del tratamiento UV-C y N_0 es el número inicial de conidios. A. *arborescens* (EGS 39128 y TPP173) y A. *tomaticola* (TPP117).

VII.3.2 Efecto fungistático

Se registró el diámetro de las colonias de tres aislamientos de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173), luego de ser sometidas a diferentes tratamientos con radiación UV-C, a lo largo del tiempo, realizando mediciones periódicas para cada tratamiento (**Anexos XX-XXII**).

Se determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, y, a fines de estandarizar diferencias debido a diferentes diámetros iniciales de colonias previo a la irradiación, se calculó el logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) donde D es el diámetro de la colonia después de cada tratamiento y D_0 es el diámetro inicial de la colonia sin irradiar a cada tiempo. Los resultados se presentan en gráficos de barras en las **Figuras VII.5, VII.6 y VII.7**.

Para el aislamiento EGS 39128, se observaron diferencias significativas entre las dosis de radiación UV-C y el control hasta los 9 días de incubación ($p < 0,0001$). Las dosis más altas (63, 31,5 y 21 KJ/m^2) presentaron los valores más bajos de $\text{Log}(D/D_0)$. En el día 10, las diferencias fueron menos pronunciadas, pero aún significativas entre el control y las dosis más altas (10,50, 21, 31,5 y 63 KJ/m^2) ($p = 0,0005$).

En el caso del aislamiento TPP117, los resultados revelaron diferencias significativas entre las dosis de radiación UV-C y el control a los 2 días ($p < 0,0001$) y solamente con las tres dosis más altas a los 5 días ($p = 0,0005$). A partir del día 6, las diferencias con el control dejaron de ser significativas y desde el día 8 no se observaron diferencias entre dosis ($p > 0,05$).

Para el aislamiento TPP173, se observaron diferencias significativas entre las dosis de radiación UV-C y respecto del control en los días 2 a 4 de incubación ($p < 0,0001$, $p = 0,0001$ y $p = 0,0002$, respectivamente). A partir del día 7, las diferencias dejaron de ser significativas ($p > 0,05$).

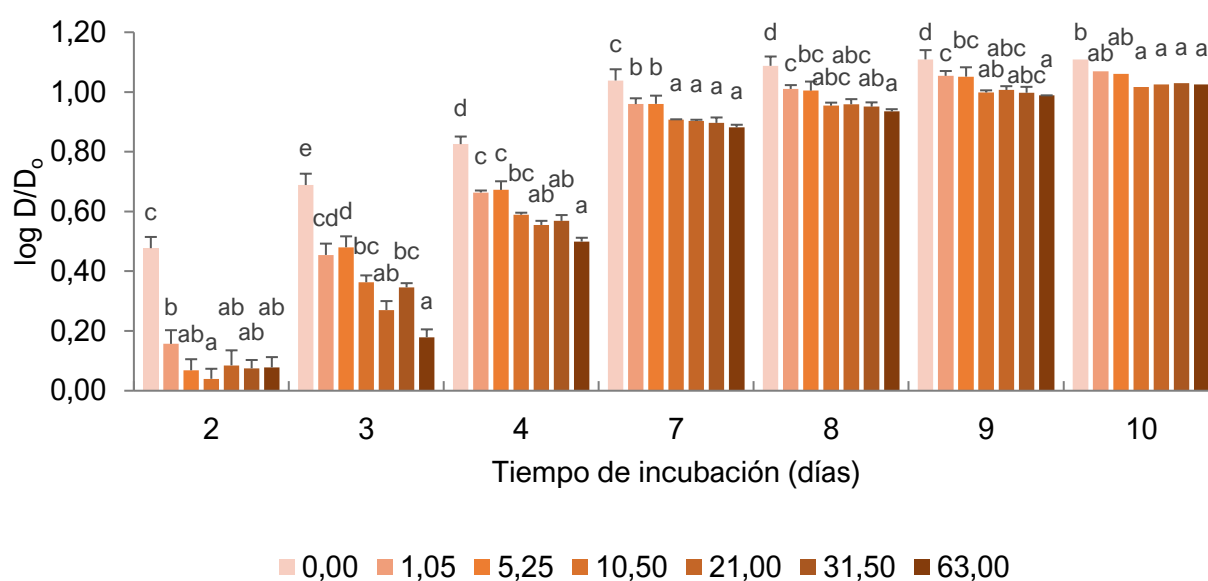


Figura VII.5. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) de la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

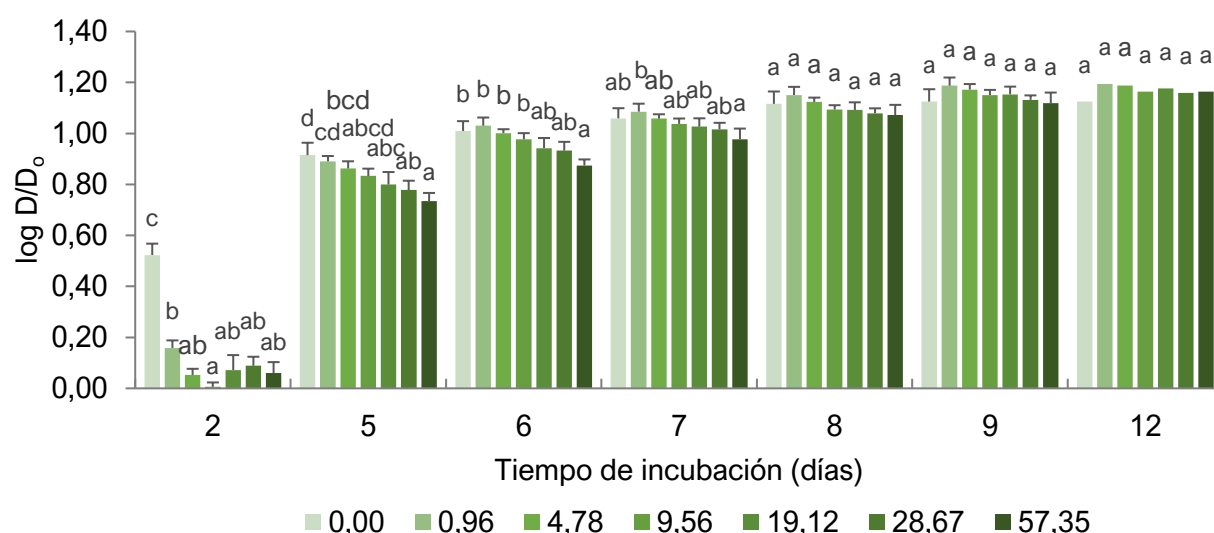


Figura VII.6. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) del aislamiento de *A. tomaticola* (TPP117) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

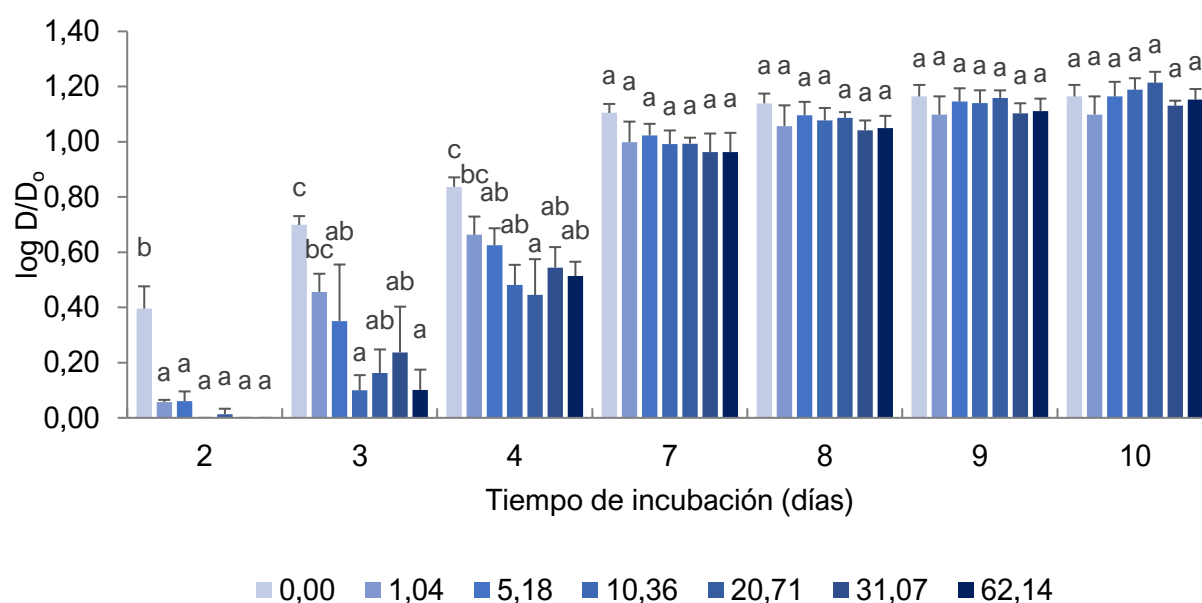


Figura VII.7. Logaritmo del diámetro relativo de las colonias ($\text{Log}(D/D_0)$) del aislamiento de *A. arborescens* (TPP173) en función del tiempo de incubación para diferentes dosis de radiación UV-C. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Dado que los resultados de las distintas dosis aplicadas fueron variables en el tiempo, se construyeron curvas de crecimiento (diámetro promedio de las colonias en función del tiempo de incubación) para evaluar el efecto de las diferentes dosis de radiación UV-C aplicadas sobre los parámetros de crecimiento de cada aislamiento. Las **Figuras VII.8, VII.9 y VII.10** muestran las curvas de crecimiento.

En todos los casos, se observó un crecimiento sostenido de las colonias luego de su irradiación durante todo el periodo de incubación. Las curvas de crecimiento de los tres aislamientos mostraron una cinética similar, aunque con un desfase en el inicio del desarrollo respecto del control, lo que sugiere que el efecto de la radiación UV-C se manifiesta sobre la fase de latencia, pero no afecta la velocidad máxima de crecimiento de los aislamientos irradiados. Para verificar esta hipótesis se calcularon las fases de latencia (λ) y velocidades máximas de crecimiento ($\mu_{\max}$) para cada aislamiento y cada dosis de UV-C.

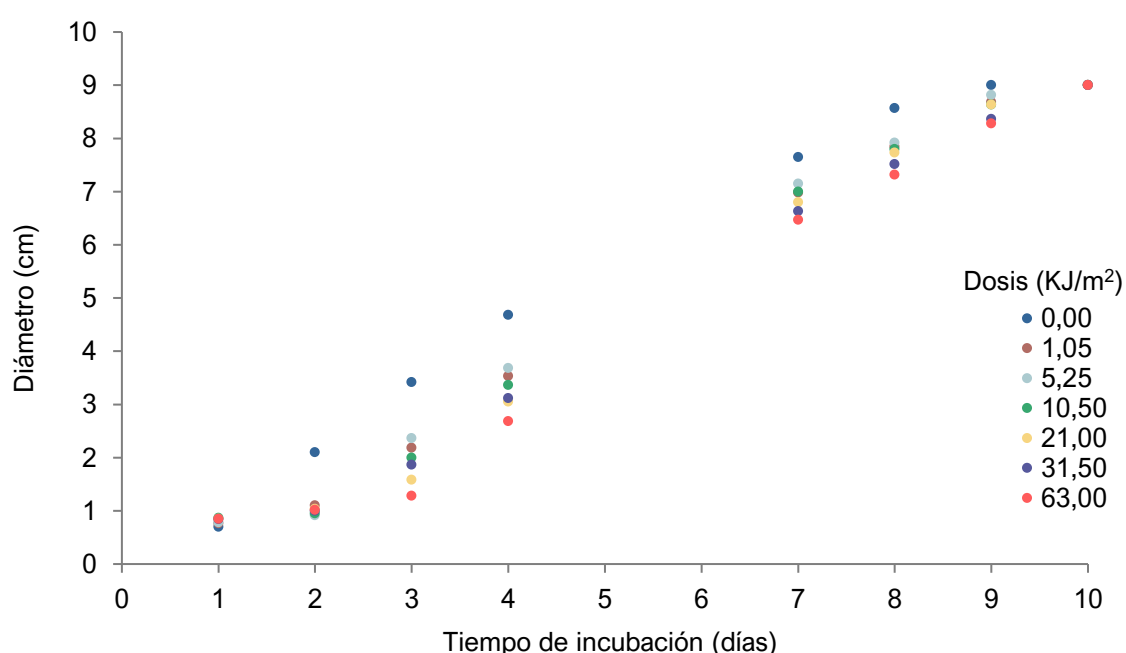


Figura VII.8. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento patrón de *A. arborescens* (EGS 39128) en función del tiempo de incubación.

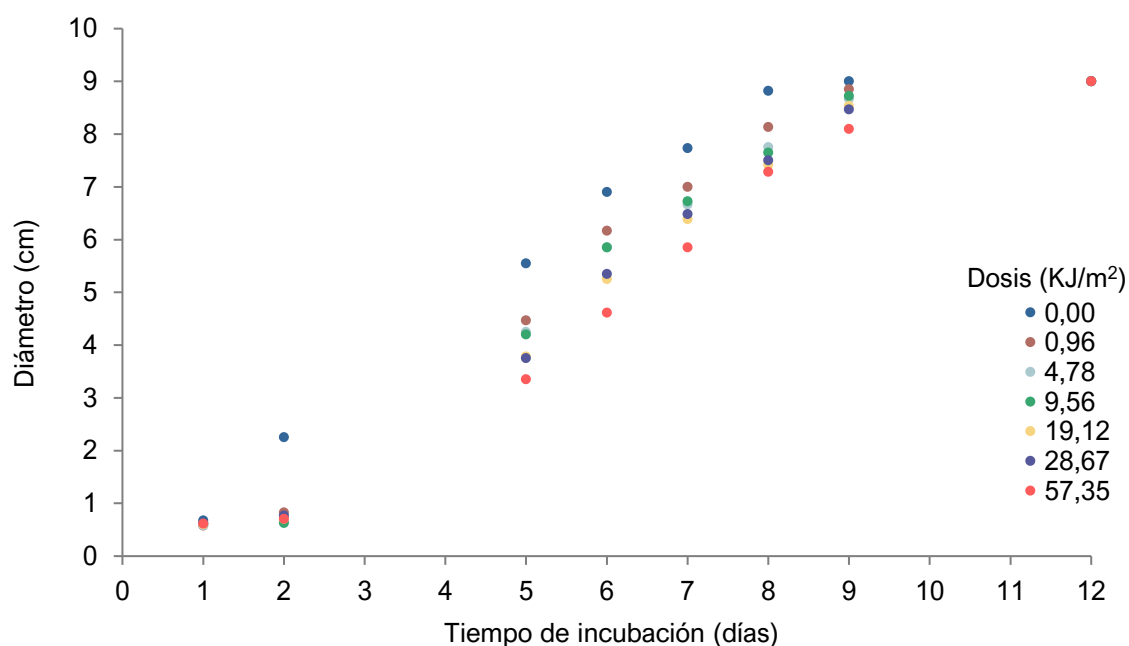


Figura VII.9. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento de *A. tomaticola* (TPP117) en función del tiempo de incubación.

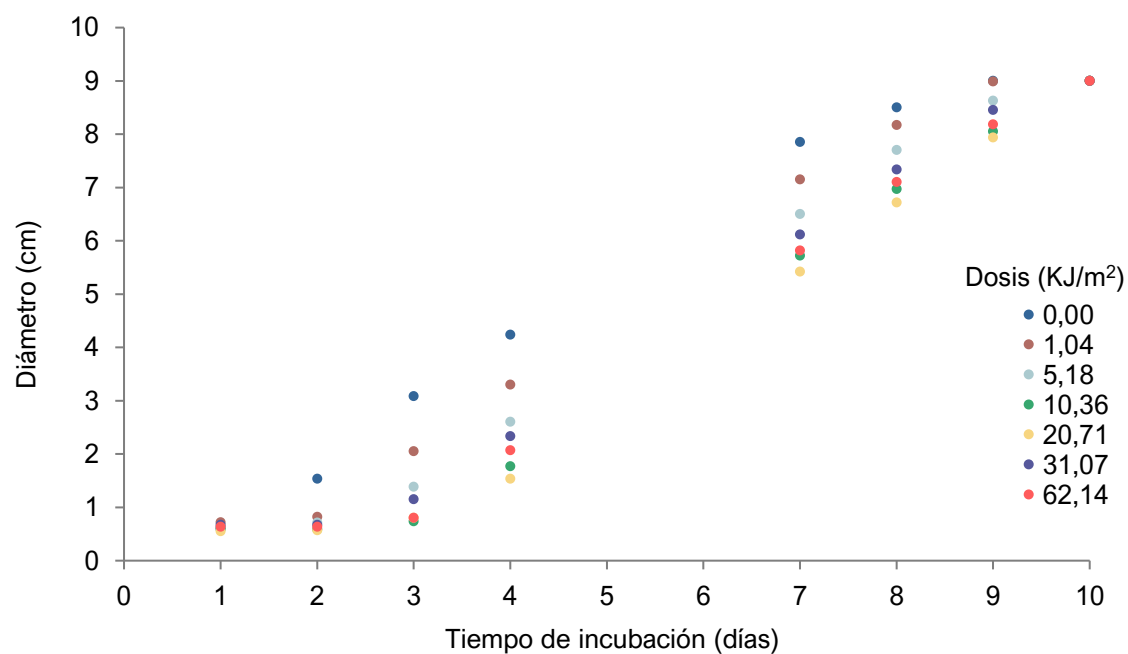


Figura VII.10. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre el crecimiento del aislamiento de *A. arborescens* (TPP173) en función del tiempo de incubación

La **Figura VII.11** muestra el efecto de diferentes dosis de radiación UV-C sobre la duración de la fase de latencia en el crecimiento de tres aislamientos de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173). En todos los casos se observó que la exposición a la radiación UV-C incrementó significativamente la fase de latencia respecto del control sin irradiar ($p < 0,0001$). La tendencia general es un aumento de la fase de latencia a medida que se incrementa la dosis de UV-C, aunque la respuesta varió entre los aislamientos. Para el aislamiento EGS 39128, λ se prolongó con el aumento de la dosis de UV-C, observándose los mayores valores luego de la aplicación de las dosis más altas (21-63 KJ/m²). En el caso del aislamiento TPP117, también se observó una prolongación de λ con el incremento de la dosis de UV-C, aunque la respuesta fue escalonada. El control sin irradiación presentó la λ más corta y fue significativamente diferente de todos los tratamientos con UV-C; el resto de las dosis no presentaron diferencias significativas, excepto por la dosis más alta (57,35 KJ/m²), que produjo la mayor λ (2,2 días). Para el aislamiento TPP173, se evidenció un claro incremento en la duración de λ a medida que aumentó la dosis de UV-C hasta alcanzar la dosis de 10,36 KJ/m². Las dosis superiores a esta no resultaron en diferencias significativas.

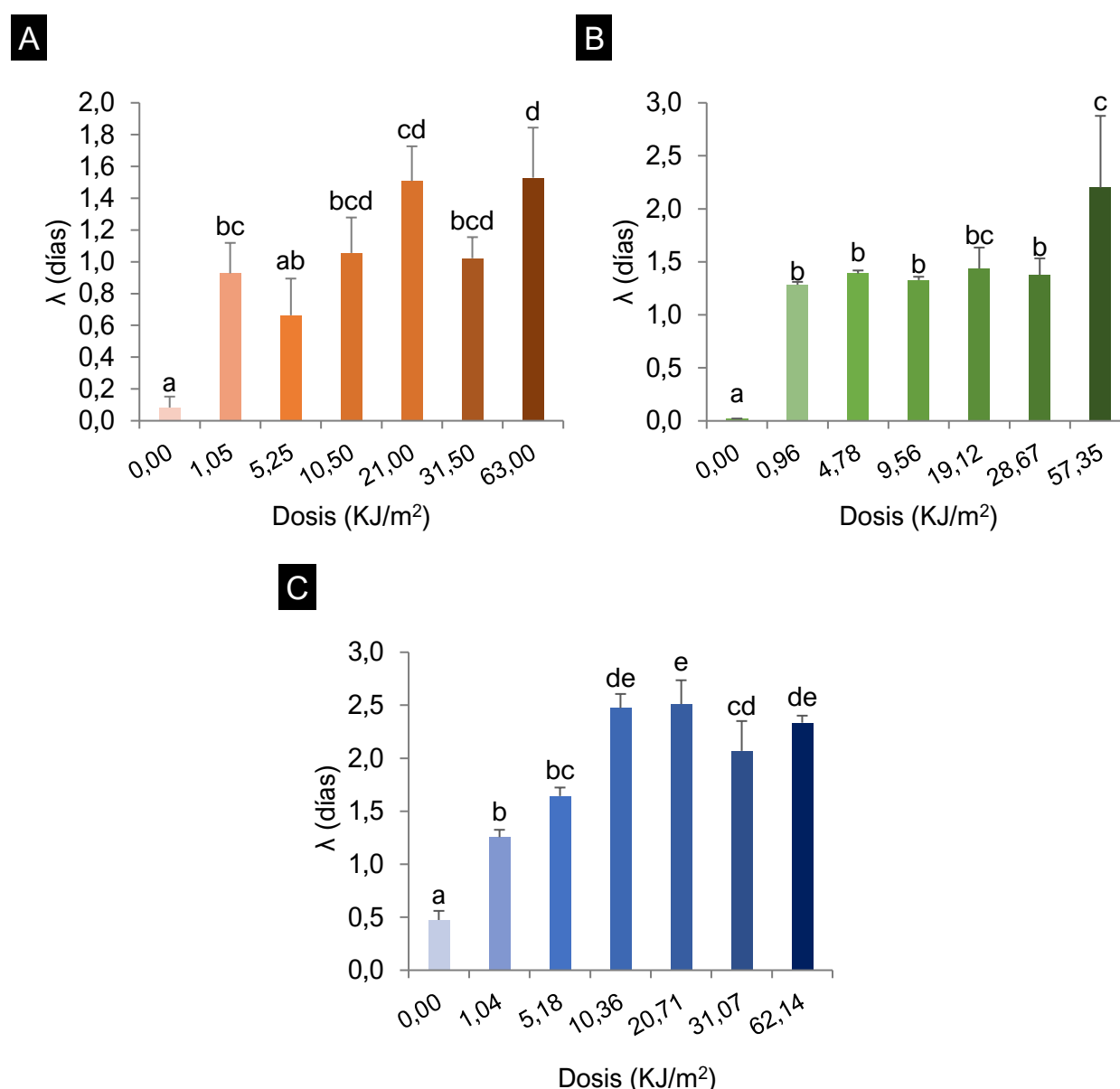


Figura VII.11. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C (KJ/m²) sobre la duración de la fase de latencia (λ) en el crecimiento de *Alternaria* spp. **A:** *A. arborescens* (EGS 39128), **B:** *A. tomaticola* (TPP117) y **C:** *A. arborescens* (TPP173). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

En cuando a la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) (**Figura VII.12**), el análisis de varianza reveló diferencias significativas entre las dosis aplicadas para dos de los aislamientos (EGS 39128 y TPP117), con valores de p de 0,0056 y 0,0047, respectivamente. Sin embargo, para el aislamiento TPP173, no se observaron diferencias significativas entre las dosis ($p = 0,1088$). En el caso del aislamiento EGS 39128, aunque algunas dosis resultaron en velocidades de crecimiento significativamente menores que otras,

ninguna de ellas resultó significativamente diferente a la del control. Por otro lado, para el aislamiento TPP117, las dosis de 0,96 y 57,35 mW/cm² resultaron en velocidades de crecimiento significativamente mayores que el control.

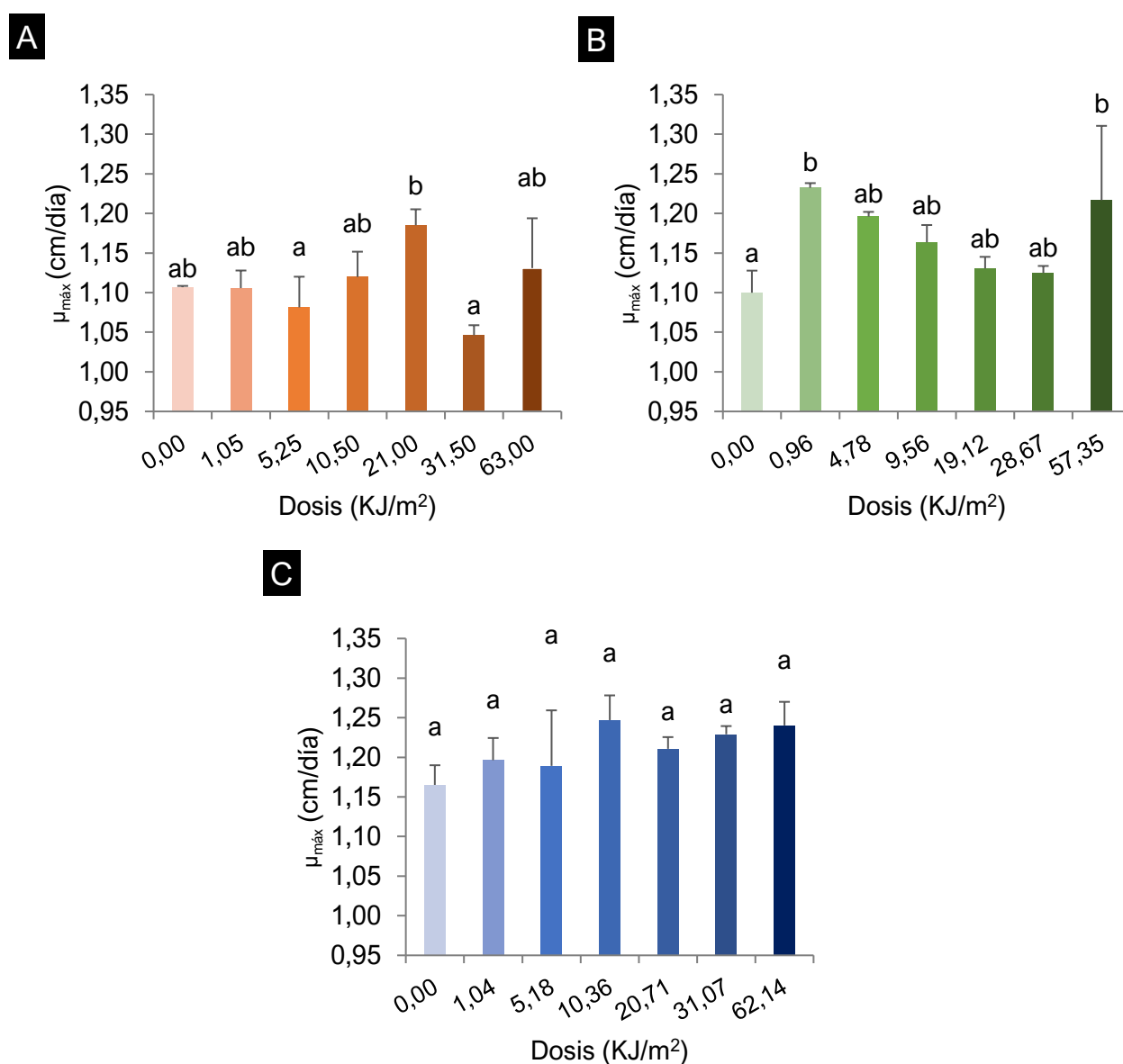


Figura VII.12. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-C (KJ/m²) sobre la duración de la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de *Alternaria* spp. **A:** *A. arborescens* (EGS 39128), **B:** *A. tomaticola* (TPP117) y **C:** *A. arborescens* (TPP173). Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

VII.3.3 Evaluación de estrés oxidativo

VII.3.3.1 Peroxidación lipídica

Se evaluó el efecto de la radiación UV-C sobre la generación de MDA, producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, y considerado como el principal indicador de peroxidación lipídica en general, expresado como MDA equivalentes de nanomoles por mililitro (MDA eq. (nmol/ml)) en el epicarpio de tomate (**Figura VII.13**). El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha=0,05$) A pesar de que se observó una tendencia decreciente en los niveles de peróxido de hidrógeno a medida que aumentaba el tiempo de exposición a la radiación UV-C, con medias de 0,69 MDA eq. (nmol/ml) para el control, y 0,64, 0,50 y 0,47 MDA eq. (nmol/ml) para las dosis de 5, 10,1 y 20,1 KJ/m² respectivamente, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

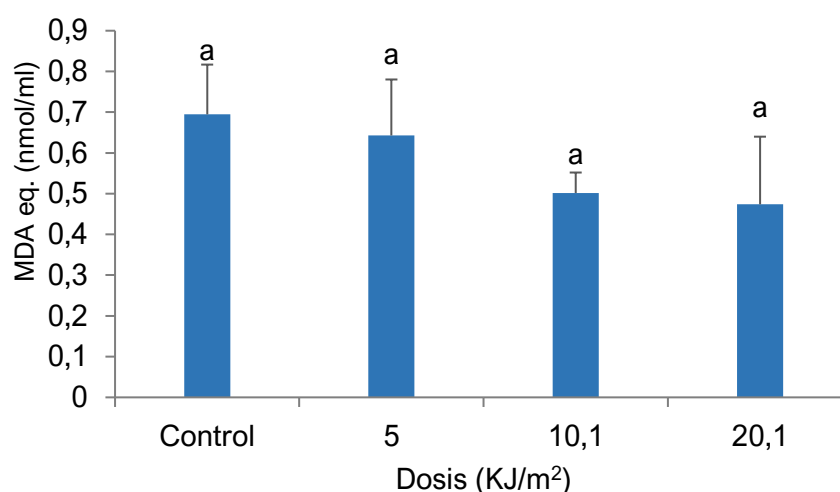


Figura VII.13. Peroxidación lipídica (MDA eq. (nmol/ml)) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m²) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

VII.3.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante total

Se evaluó el efecto de la radiación UV-C sobre la capacidad antioxidante en el epicarpio de tomate, expresada en equivalentes de micromoles de ácido ascórbico por kilogramo de peso fresco (eq. μmol ácido ascórbico/kg) (**Figura VII.14**). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0,0001$), lo que indica que la irradiación UV-C tuvo efecto sobre la capacidad antioxidante.

La prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) reveló que el tratamiento UV-C de dosis 20,1 KJ/m² presentó la mayor capacidad antioxidante, con una media de 5,00 eq. μ mol ácido ascórbico/kg, siendo significativamente diferente de los demás tratamientos. Los tratamientos control, 10 y 5 KJ/m² no mostraron diferencias significativas entre sí, con medias de 3,60, 3,66 y 4,01 eq. μ mol ácido ascórbico/kg, respectivamente.

Estos resultados sugieren que la irradiación UV-C en una dosis de 20,1 KJ/m² tiene un efecto positivo en la capacidad antioxidante del epicarpio de tomate, aumentando significativamente los niveles de ácido ascórbico en comparación con los demás tratamientos.

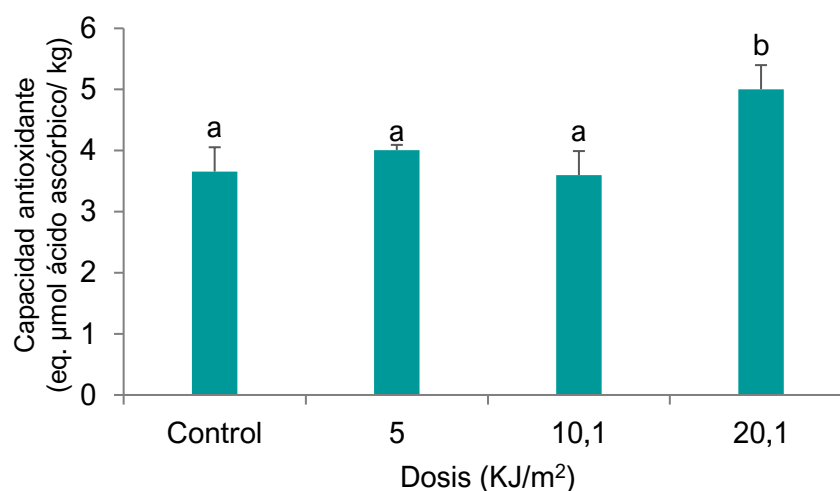


Figura VII.14. Capacidad antioxidante (eq. μ mol ácido ascórbico/kg) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m²) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

VII.3.3.3 Determinación del contenido de flavonoides

Se evaluó el efecto de la radiación UV-C sobre el contenido de flavonoides en el epicarpio de tomate, expresado en miligramos de equivalentes de quercetina por kilogramo de peso fresco (mg eq. quercetina/kg) (**Figura VII.15**). El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,1083$), lo que indica que la irradiación de los tomates con UV-C no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de flavonoides. La prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) tampoco reveló diferencias significativas entre los pares de tratamientos.

La falta de significancia estadística puede atribuirse a los altos valores de varianza observada en las mediciones. A pesar de ello, se pudo comprobar una tendencia creciente en el contenido de flavonoides a medida que aumentaba la dosis de UV-C. El tratamiento aplicado con 20,1 KJ/m² presentó la media más alta, con 119,9 mg eq. quercetina/kg, seguido de 100,2 y 89,4 mg de mg eq. quercetina/kg, para las dosis de 10,1 y 5 KJ/m² respectivamente. Sin embargo, estas diferencias numéricas no fueron lo suficientemente grandes como para ser consideradas estadísticamente significativas.

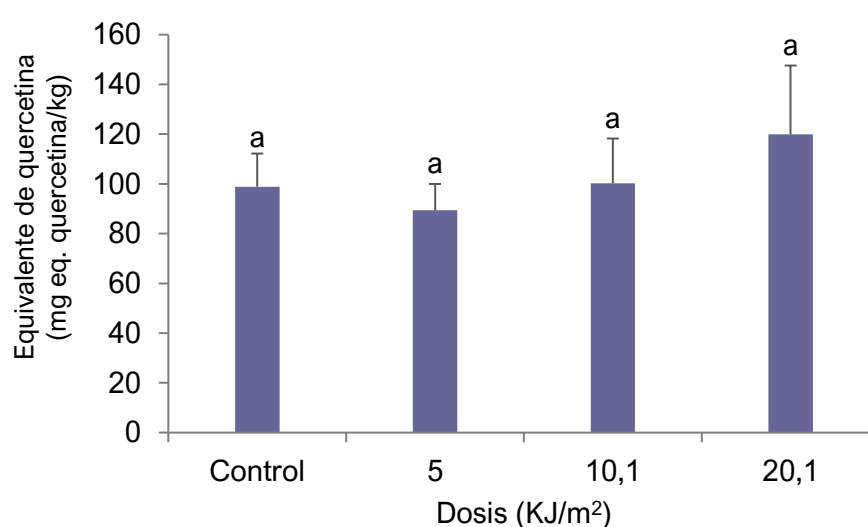


Figura VII.15. Contenido de flavonoides (mg de equivalentes de quercetina/kg) en el endocarpio de tomates irradiados con UV-C con tres dosis (0, 5, 10,1 y 20,1 KJ/m²) almacenados a 25°C por 12 días. Las barras representan la desviación estándar de la media en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

VII.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la irradiación con luz UV-C tiene un efecto fungicida y fungistático sobre los aislamientos de *Alternaria* spp. (EGS 39128, TPP117 y TPP173) y que puede influir en la capacidad antioxidante de frutos de tomate.

El efecto fungicida se evidenció por una reducción en el número de colonias formadas a partir de conidios irradiados a medida que aumentaba la dosis de radiación UV-C. A partir de los 5 minutos de exposición de UV-C con una dosis promedio de 4,92 KJ/m²,

no se produjo la germinación de los conidios seguida de formación de colonias para ninguno de los aislamientos. Un estudio realizado por Valero et al. (2007), evaluó la resistencia a radiación UV-C de esporas de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium janthinellum* y *Alternaria alternata*. Las esporas (100-250 por placa) se irradiaron con una intensidad de 75,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante 0 (control), 10, 20, 30, 60, 300 y 600 segundos. Tras la irradiación, las placas se incubaron a 25°C y se realizó un recuento diario de colonias durante 7 días. Los resultados revelaron que *A. alternata* y *A. carbonarius* fueron los hongos más resistentes, con una reducción de la germinación de conidios de aproximadamente 25% después de 10 segundos de exposición, en contraste con una reducción superior al 70% para las demás especies. Las esporas de *P. janthinellum* mostraron la mayor susceptibilidad a la luz UV-C. Exposiciones de 5 minutos (300 s) (equivalentes a una dosis de 0,23 KJ/m^2) inhibieron completamente el crecimiento de todos los aislados, a excepción de *A. alternata*, destacando la variabilidad en la sensibilidad a la radiación UV-C entre las diferentes especies fúngicas.

Además del efecto fungicida, en el presente estudio se observó un efecto fungistático al irradiar colonias desarrolladas luego de 24 h de incubación, ya que las fases de latencia se prolongaron con una tendencia creciente al incrementarse la dosis de UV-C. Este efecto inhibitorio dependió tanto de la dosis aplicada como del aislamiento, lo que sugiere una variabilidad en la sensibilidad a la radiación UV-C entre los aislamientos de *Alternaria* spp. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que han demostrado la eficacia de la luz UV-C para controlar el crecimiento de *Alternaria* spp. en tomates (Gündüz & Korkmaz, 2019; Rusakovich et al., 2021). Rusakovich et al. (2021) demostraron que la irradiación UV-C suprimió completamente el desarrollo de los aislamientos de *A. radicina* y *A. alternata* incubadas a 25°C durante los primeros 3 días posteriores al tratamiento, con una reducción del área de las colonias que osciló entre el 30% y el 66%, dependiendo de la duración de la exposición (30, 60 o 180 minutos). Aunque el crecimiento del micelio se restableció al quinto día, de manera similar a lo observado en el presente estudio, el tamaño de las colonias irradiadas fue significativamente menor en comparación con el control.

Además, Jiang et al. (2019) encontraron que un tratamiento UV-C de 0,25 KJ/m² inhibió significativamente el desarrollo de la mancha negra en frutos maduros de tomate inoculados con la cepa de *A. alternata* FQ 18, con reducciones del 19,2% y 15,6% en los diámetros de lesión después de 9 y 11 días de almacenamiento a 20°C, respectivamente, en comparación con los frutos no tratados. Sin embargo, no observaron diferencias significativas en el diámetro de la lesión entre el tratamiento con 0,50 KJ/m² de UV-C y el control, mientras que hubo una mayor susceptibilidad a la enfermedad con dosis más altas (> 0,75 KJ/m²). Por otro lado, Obande et al. (2011) evaluaron el crecimiento al inocular *Penicillium digitatum* sobre frutos de tomate que fueron incubados a 20°C por 12 horas y luego expuestos a dosis de UV-C de 3 y 8 KJ/m². Observaron que el hongo creció a tasas similares en los frutos control y los tratados con la dosis UV-C más baja (3 KJ/m²), aunque el diámetro de la lesión fúngica en el día 10 fue mayor en el control. En contraste, el aumento en el diámetro de la lesión ocurrió más lentamente para los frutos tratados con una dosis de 8 KJ/m², y, luego de 10 días de incubación, el diámetro de lesión resultó considerablemente menor que en el control y la dosis más baja. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Huang et al. (2015), quienes analizaron el efecto del tratamiento UV-C en el control de *F. oxysporum* y *A. alternata* en fruto de melón. Encontraron que la exposición a los rayos UV-C de 2, 4 y 6 KJ/m² redujo significativamente la incidencia de deterioro causado tanto por *Fusarium* como por *Alternaria* en la fruta del melón, y que el diámetro de la lesión de las infecciones producidas por ambos patógenos también fue significativamente menor en frutos tratados con UV-C en comparación con los controles no tratados, excepto a la menor dosis (2 kJ/m²) en el caso de *Alternaria*.

En cuanto al efecto de la radiación UV-C sobre los frutos de tomate, aunque no se halló un efecto estadísticamente significativo sobre la peroxidación lipídica y flavonoides en el epicarpio, sí se observó un aumento significativo en la capacidad antioxidante, especialmente con una dosis de 20 KJ/m². Estos resultados sugieren que la irradiación con UV-C podría ser una herramienta útil para controlar el desarrollo de la enfermedad y simultáneamente aumentar las propiedades antioxidantes de los tomates, lo que podría tener implicaciones positivas para la calidad y su valor nutricional (Bhat, 2016). Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Bravo et al.

(2012), quienes encontraron que los tomates expuestos a diferentes dosis de irradiación UV-C (1,0, 3,0 y 12,2 KJ/m²) presentaron un aumento significativo en el contenido de licopeno, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en comparación con las muestras no tratadas. Asimismo, Liu et al. (2012) observaron que la irradiación con UV-C a 4 y 8 KJ/m² aumentó significativamente el contenido fenólico total, la acumulación de flavonoides totales y la actividad antioxidante en frutos de tomate verde maduro. Las diferencias entre estos resultados y los del presente trabajo pueden deberse al diferente estado de madurez de los tomates utilizados o la variedad de los mismos. Además, estudios previos han demostrado que la irradiación UV-C puede retrasar la maduración de los tomates, tanto en la fase verde madura como en la madura, y aumentar la resistencia a las pudriciones de almacenamiento (Liu et al., 1993; Obande et al., 2011). Estos efectos podrían estar relacionados con la inducción de compuestos fenólicos por parte de la radiación UV-C, los cuales han mostrado una capacidad para inhibir la producción de micotoxinas de *Alternaria* (Jiang et al., 2019).

Los resultados mostraron que la mejor estrategia es la prevención, mediante la inactivación de los conidios presentes en la superficie del fruto antes de que ocurra la colonización (efecto fungicida), lo cual se logró con bajas dosis de UV-C. Sin embargo, una vez iniciada la colonización, la infección incipiente puede pasar desapercibida y esta suele ser un problema en tomates destinados a industria, donde la selección de la materia prima se realiza por inspección visual. En este caso, el efecto fungistático logrado por la irradiación con UV-C puede retrasar el avance del deterioro y prolongar la vida útil de los frutos. No obstante, dado que el desarrollo continúa luego de la irradiación, una vez que la colonia ha comenzado a desarrollar, es relevante conocer el efecto de la radiación UV-C sobre la producción de micotoxinas y su posible degradación mediante el uso de esta tecnología.

En el trabajo realizado por Han et al. (2023), se investigó la fotodegradación de alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) por irradiación UV-C *in vitro*, evaluando el efecto de la intensidad UV-C, el pH, el tiempo de tratamiento, los disolventes y la exposición a componentes de los alimentos. Los autores encontraron que el tratamiento con UV-C podría reducir eficazmente el contenido de AOH y AME, con la mayor eficiencia lograda en metanol y ambiente alcalino, sugiriendo que la

utilización de la radiación UV-C parece ser un enfoque potencialmente útil para disminuir el riesgo subyacente de contaminación por micotoxinas de *Alternaria* en alimentos. Sin embargo, la eficacia de esta herramienta de degradación debe probarse en frutos, ya que los componentes del tomate pueden interactuar con su eficacia, así como su bajo pH. El único trabajo que ha evaluado su eficacia para reducir la contaminación de frutos con micotoxinas del género *Alternaria*, hasta el momento, es el de Jiang et al. (2019), en el cual lograron reducir la concentración de AOH, AME y TeA en un 79,6, 76,4 y 51,4%, respectivamente, al irradiar los frutos contaminados con una dosis de UV-C de 0,25 KJ/m². Los autores atribuyen este efecto de la radiación UV-C con la formación de metabolitos antifúngicos y la activación de mecanismos de resistencia en el fruto. En dicho trabajo, la radiación aplicada indujo la acumulación de compuestos fenólicos como p-cumarina, ácidos ferúlico y protocatecúico en los frutos de tomate. En un ensayo adicional, comprobaron que el ácido ferúlico, en una concentración de 1,0 mM produjo una fuerte inhibición en la producción de AOH y AME, mientras que el ácido p-cumárico, en la misma concentración redujo la concentración de TeA. Estos resultados resultan promisorios para la utilización de la radiación UV-C como estrategia para el control de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas en tomate. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar las dosis óptimas para el control del desarrollo y la reducción de micotoxinas en simultaneo, teniendo en cuenta diferentes aislamientos de *Alternaria* spp., variedades de tomate y estados de madurez de los frutos, entre los principales factores que pueden influir en la eficacia del tratamiento.

VII.5 Conclusiones

Este estudio demuestra que la radiación UV-C es una estrategia eficaz para el control de *Alternaria* spp. *in vitro*, con efectos fungicidas desde una dosis promedio de 4,92 KJ/m² y fungistáticos a partir de 0,96 a 63 KJ/ m² dependientes de la variabilidad entre los aislamientos. La radiación UV-C también tuvo un impacto positivo en la calidad de los frutos de tomate, al aumentar significativamente su capacidad antioxidante, al aplicar una dosis de 20,1 KJ/m².

Estos resultados respaldan el uso potencial de la irradiación de frutos de tomate con UV-C como una estrategia de control de *Alternaria* spp. Además, podría mejorar las

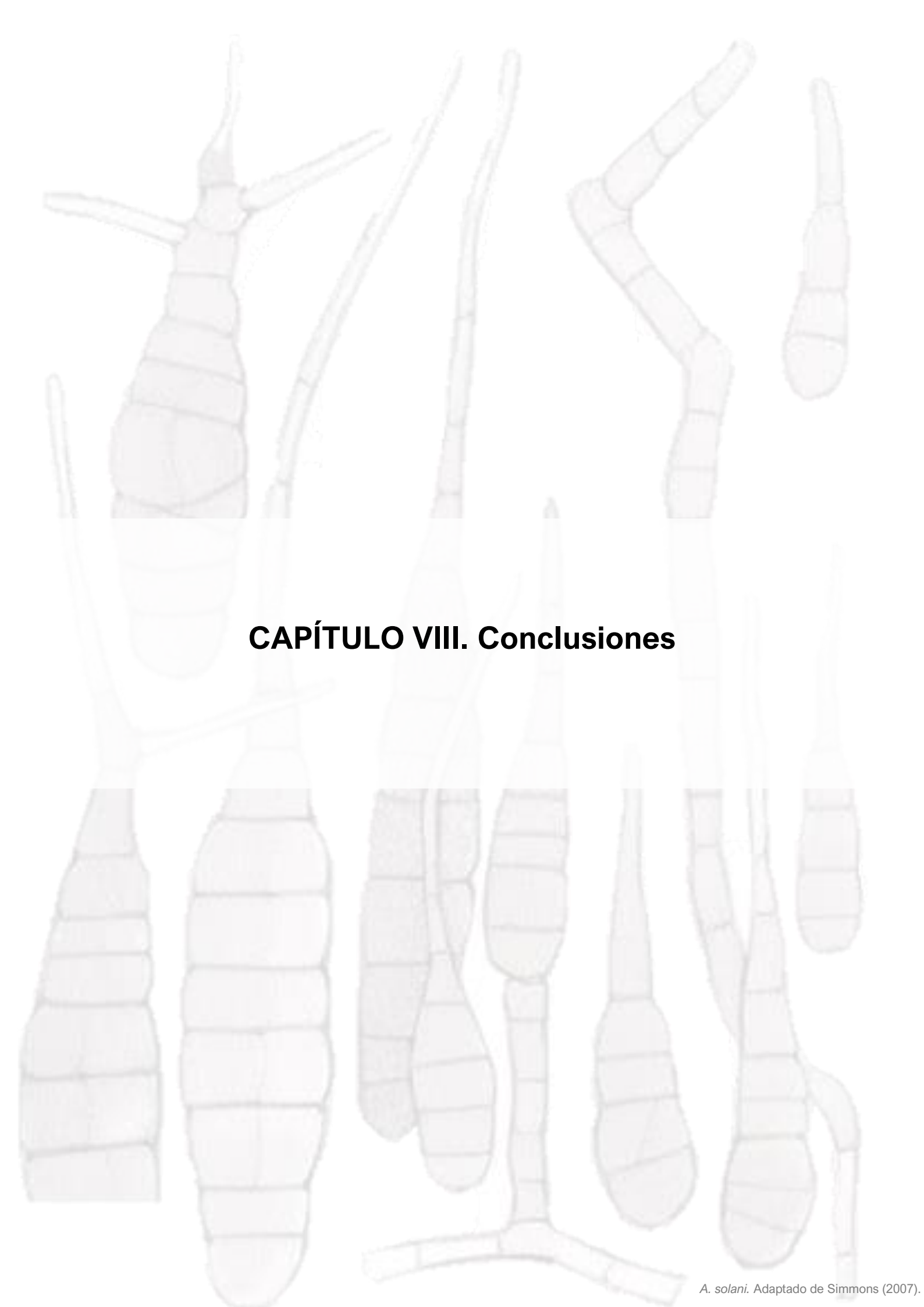
propiedades antioxidantes de los tomates y retrasar su maduración, lo que tendría implicaciones positivas para la calidad y la vida útil de este producto. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para optimizar las dosis y los tiempos de aplicación, así como para evaluar los efectos de la irradiación en diferentes variedades de tomate, en diferentes etapas de maduración y con mayor diversidad de aislamientos de *Alternaria* spp. Futuras investigaciones incluirán ensayos *in vivo* incorporando estas variables y modificando las condiciones de almacenamiento de los frutos, simulando condiciones de postcosecha del tomate, tanto para consumo en fresco como para la industrialización.

VII.6 Bibliografía

- Abadias, M., Colás-Medà, P., Viñas, I., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2021). Application of an innovative water-assisted ultraviolet C light technology for the inactivation of microorganisms in tomato processing industries. *Food Microbiology*, 94, 103631. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103631>
- Bello, O., Habib, U., Odunayo, O., Opeyemi, A., Alafe, A., & Owaode Temilade. (2016). Microorganisms causing post-harvest tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit decay in Nigeria. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1), 374-377. <https://www.researchgate.net/publication/371957222>
- Bhat, R. (2016). Impact of ultraviolet radiation treatments on the quality of freshly prepared tomato (*Solanum lycopersicum*) juice. *Food Chemistry*, 213, 635-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.096>
- Bravo, S., García-Alonso, J., Martín-Pozuelo, G., Gómez, V., Santaella, M., Navarro-González, I., & Periago, M. J. (2012). The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Research International*, 49(1), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.018>
- Chudinova, E. M., Shkunkova, T. A., & Elansky, S. N. (2020). Fungal pathogens of tomato in south-western Russia (Krasnodar Territory). *Plant Protection News*, 103(3), 210-212. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-4998>
- Gündüz, G. T., & Korkmaz, A. (2019). UV-C treatment for the inhibition of molds isolated from dried persimmons (*Diospyros kaki* L.) and modelling of UV-C inactivation kinetics. *LWT*, 115, 108451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108451>
- Han, Y., Zhou, Z., Cao, Z., Zong, W., Zhao, G., & Wang, X. (2023). Degradation of *Alternaria* mycotoxins by UV-C irradiation: Effect of selected process and exposure to food components. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 40(1), 134-146. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2151646>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Huang, K., Zou, Y., Luo, J., & Liu, Y. (2015). Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 14307-14313. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4687-0>
- Jiang, N., Li, Z., Wang, L., Li, H., Zhu, X., Feng, X., & Wang, M. (2019). Effects of ultraviolet-c treatment on growth and mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomato fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 311, 108333. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108333>
- Khan, M., McDonald, M., Mundada, K., & Willcox, M. (2022). Efficacy of Ultraviolet Radiations against Coronavirus, Bacteria, Fungi, Fungal Spores and Biofilm. *Hygiene*, 2(3), 120-131. <https://doi.org/10.3390/hygiene2030010>

- Kokaeva, L., Chudinova, E., Berezov, A., Yarmeeva, M., Balabko, P., Belosokhov, A., & Elansky, S. (2020). Fungal diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves and fruits in Russia. *Journal of Central European Agriculture*, 21(4), 809-816. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2869>
- Liu, C., Cai, L., Lu, X., Han, X., & Ying, T. (2012). Effect of Postharvest UV-C Irradiation on Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Tomato Fruit During Storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1), 159-165. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(12\)60794-9](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(12)60794-9)
- Liu, C., Zheng, H., Sheng, K., Liu, W., & Zheng, L. (2018). Effects of postharvest UV-C irradiation on phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes in tomato fruit. *Scientia Horticulturae*, 241, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.075>
- Liu, J., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Adeyeye, O., Kabwe, M. K., Pusey, P. L., Chalutz, E., Sultana, T., & Droby, S. (1993). Application of Ultraviolet-C Light on Storage Rots and Ripening of Tomatoes. *Journal of Food Protection*, 56(10), 868-873. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.10.868>
- López-Rubira, V., Artés-Hernandez F, & Artés, F. (2007). Evaluación de la calidad de granadas tratadas con UV-C y almacenadas en atmósfera controlada. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. <https://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/491/ecg.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mahasneh, A. M., & Bdour, S. M. (2006). *Microbiology Laboratory Manual*. Academic for Publishing & Distribution Company. <https://books.google.com.ar/books?id=0WBRDwAAQBAJ>
- Narita, K., Asano, K., Naito, K., Ohashi, H., Sasaki, M., Morimoto, Y., Igarashi, T., & Nakane, A. (2020). Ultraviolet C light with wavelength of 222 nm inactivates a wide spectrum of microbial pathogens. *Journal of Hospital Infection*, 105(3), 459-467. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.030>
- Obande, M. A., Tucker, G. A., & Shama, G. (2011). Effect of preharvest UV-C treatment of tomatoes (*Solanum lycopersicum* Mill.) on ripening and pathogen resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 62(2), 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.06.001>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a *Phosphomolybdenum* Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Rusakovich, A. A., Shashko, A. Yu., Viatoshkin, A. A., Saldatsenka, A. A., Balvanovich, U. V., Smolich, I. I., Sokolik, A. I., Shashko, Y. K., & Demidchik, V. V. (2021). The effect of ultraviolet diode radiation on the growth rate of *Alternaria* colonies. *Journal of the Belarusian State University. Biology*, 2, 19-28. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-19-28>
- Salehi, B., Sharifi-Rad, R., Sharopov, F., Namiesnik, J., Roointan, A., Kamle, M., Kumar, P., alia Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). Beneficial effects and potential risks

- of tomato consumption for human health: An overview.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.01.012>
- Silva, C., van den Abeele, C., Ortega-Salazar, I., Papin, V., Adaskaveg, J., Wang, D., Casteel, C., Seymour, G., & Blanco-Ulate, B. (2021). Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune responses. *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2696-2709. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa601>
- Valero, A., Begum, M., Leong, S. L., Hocking, A. D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2007). Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 238-243. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x>
- Vavilin, D. V., Ducruet, J.-M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S., & Rubin, A. B. (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42(3), 233-239. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00076-1)
- Waheed, K., Nawaz, H., Hanif, M. A., & Rehman, R. (2019). Tomato. En *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery* (pp. 631-644). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00046-X>
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>



CAPÍTULO VIII. Conclusiones

VIII.1 Conclusiones generales

Los resultados del presente trabajo de tesis permitieron caracterizar los principales géneros fúngicos causantes de deterioro de frutos de tomate cultivados en distintas regiones de Argentina. Se verificó la prevalencia del género *Alternaria* y se caracterizaron las especies causantes de deterioro para un mejor conocimiento del patógeno. Dichas especies mostraron una alta capacidad de producción de metabolitos secundarios *in vitro*, algunos de los cuales son reconocidas micotoxinas. Las toxinas de *Alternaria* fueron detectadas en muestras comerciales de productos de tomate del mercado argentino, demostrando la necesidad de control para garantizar la inocuidad alimentaria.

Se detectó por primera vez el gen responsable de la producción de toxinas hospedador-específicas (HSTs) en aislamientos de *Alternaria* spp. causantes de deterioro de frutos de tomate. Estos hallazgos amplían las especies con la capacidad de sintetizar dichas toxinas conocidas hasta el momento y destacan su presencia en frutos.

Para un desarrollo efectivo de estrategias de control, se determinaron las condiciones óptimas de temperatura para el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas en sustrato tomate a distintos tiempos de almacenamiento. Los resultados demostraron que, aunque el máximo desarrollo se produce a temperaturas cercanas a temperatura ambiente en periodos de primavera-verano (25-30°C), el almacenamiento en cámaras refrigeradas (12°C), no resulta suficiente para prevenir el crecimiento de *Alternaria* spp. ni la producción de sus micotoxinas.

Por último, se evaluó la efectividad de la irradiación con UV-C como estrategia de control para *Alternaria* spp. en tomates. La radiación UV-C mostró un efecto fungicida a dosis relativamente bajas sobre los conidios y un efecto fungistático sobre colonias con desarrollo incipiente. Más aún, mostró un efecto benéfico sobre los tomates, aumentando su capacidad antioxidante. Estos resultados resultan promisorios para su evaluación como agente de control de *Alternaria* spp. en tomates en etapas pre- y postcosecha.

En general, los resultados del presente trabajo amplían el conocimiento sobre una problemática que tiene un doble impacto: económico, debido a las pérdidas en la producción hortícola, y sanitario, por el riesgo asociado al consumo de productos contaminados con micotoxinas. Un conocimiento detallado del patógeno permite realizar una adecuada evaluación del riesgo asociado y determinar las condiciones y/o prácticas recomendadas para la prevención. Se obtuvieron resultados preliminares que justifican la investigación de la radiación UV-C como estrategia de control para la reducción de la contaminación de tomate y productos derivados con *Alternaria* y sus micotoxinas.

VIII.1.1 Conclusiones específicas

1. *Alternaria* es el género fúngico predominante entre los causantes de deterioro en frutos de tomate cultivados en Argentina.
2. El tomate perita (TP) exhibió una mayor diversidad fúngica comparada con tomate redondo (TR). Las mayores diversidades se registraron en muestras provenientes de las regiones Noroeste y Cuyo.
3. El enfoque polifásico permitió una caracterización a nivel de especies. *A. tenuissima* fue la especie identificada en mayor número de aislamientos (38,3%), seguida por *A. tomaticola* (25,8%), *A. arborescens* (22,5%) y *A. alternata* (13,3%).
4. La identificación morfológica fue congruente con la caracterización molecular basada en la región génica ASA-05. Esta región fue efectiva para discriminar los aislamientos de *A. arborescens* (syn. *A. alternata* f. sp. *lycopersici* = *A. alternata* patotipo tomate) respecto de las otras especies.
5. Los aislamientos de *Alternaria* spp. de tomate presentaron una alta capacidad de producción de metabolitos secundarios, siendo el ácido tenuazónico el más frecuente (76% de los aislamientos).
6. La detección de perfiles de metabolitos secundarios característicos asociados a los distintos linajes identificados filogenéticamente denota la presencia de rutas biosintéticas conservadas en cada especie.
7. El 40% de las muestras comerciales de productos de tomate analizadas presentó contaminación con al menos una toxina de *Alternaria*. TeA presentó los mayores niveles de contaminación, con un rango de concentraciones entre 211,4 y 495,7

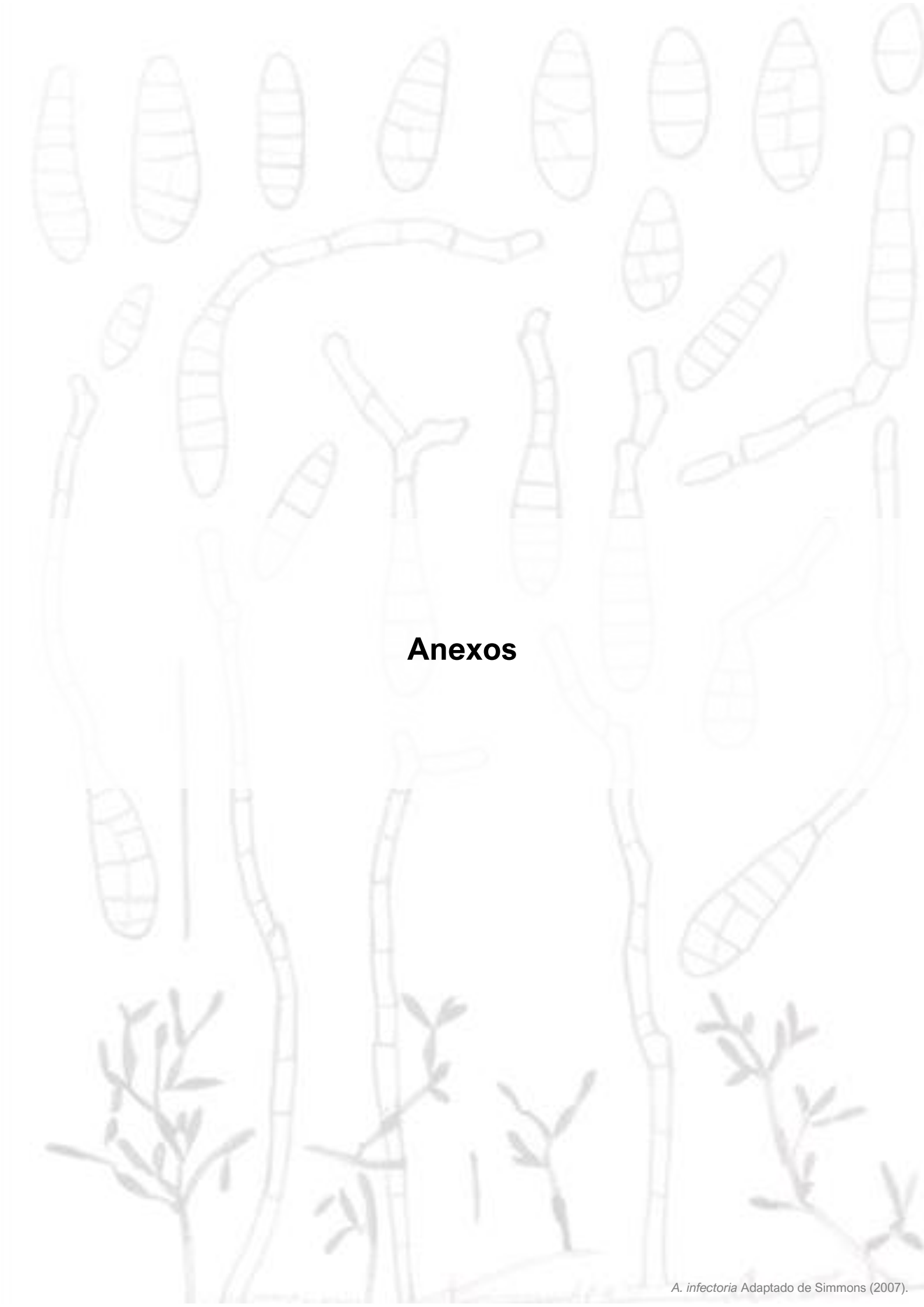
µg/kg y un promedio de 342,8 µg/kg. Junto con TEN fue la toxina hallada en mayor frecuencia (11%).

8. El pure de tomate fue el producto más frecuentemente contaminado con toxinas de *Alternaria* (47%) seguido por tomates enteros pelados (33%). No se detectaron toxinas en salsas ni pulpas.
9. Se detectó por primera vez el gen ALT1, responsable de la biosíntesis de la toxina específica de hospedador AAL, en *Alternaria* spp. aisladas de frutos de tomate. Los aislamientos nativos portadores del gen correspondieron a las especies *A. arborescens* y *A. tomaticola*.
10. Se determinó que la temperatura óptima para el crecimiento de especies de *Alternaria* de tomate fue de 26-27°C. Asimismo, las fases de latencia (λ) más cortas se hallaron a temperaturas cercanas a 30°C.
11. La temperatura tuvo un efecto significativo sobre la producción total de toxinas, con concentraciones máximas entre 25°C y 30°C, aunque los resultados dependieron de la micotoxina y el aislamiento.
12. Algunas toxinas de *Alternaria* pueden acumularse en cantidades significativas a temperatura de almacenamiento de tomate en postcosecha (12°C).
13. La radiación UV-C resultaría una estrategia eficaz para el control de *Alternaria* spp. *in vitro*, con efectos fungicidas desde una dosis promedio de 4,92 KJ/m² y fungistáticos de dosis desde 0,96 a 63 KJ/ m² dependientes de la variabilidad entre los aislamientos.
14. La radiación UV-C tuvo un impacto positivo en la calidad de los frutos de tomate, al aumentar significativamente su capacidad antioxidante, con una dosis de 20,1 KJ/m².

VIII.2 Perspectivas futuras

El presente trabajo de tesis doctoral se vio afectado por el periodo de aislamiento social preventivo y obligatorio (ASPO) a raíz de la pandemia de COVID-19. Por este motivo, algunos de los experimentos previstos no pudieron ser llevados a cabo. En esta sección se menciona el posible seguimiento de las investigaciones en una etapa postdoctoral.

Los resultados del presente estudio mostraron resultados promisorios respecto de la utilización de la radiación UV-C como estrategia de control para prevenir la contaminación de frutos de tomate con *Alternaria* y sus micotoxinas. Sin embargo, a partir de estos datos preliminares, se precisan estudios adicionales a fin de determinar las dosis óptimas de irradiación a través de ensayos *in vivo* (en fruto). Asimismo, una vez establecidas las dosis, es necesario definir la etapa de aplicación y sus condiciones. Para su aplicación en postcosecha, deberá determinarse el tiempo de aplicación y la necesidad de dosis de refuerzo en el caso de almacenamiento prolongado en cámaras. Asimismo, se requieren estudios incluyendo distintos estados de maduración de los tomates, tanto para evaluar la infección del patógeno, como para determinar posibles efectos beneficiosos de la radiación UV-C sobre los componentes del tomate. Una vez optimizados los parámetros, es recomendable la validación con un mayor número de aislamientos de *Alternaria* spp., incluyendo la determinación de micotoxinas en frutos irradiados en el caso de que ocurra crecimiento fúngico luego de la irradiación con UV-C. Finalmente, resulta de interés conocer los productos de degradación de micotoxinas, su estructura química y toxicidad en sistemas biológicos para garantizar su uso seguro y la inocuidad de los productos de tomate.



Anexos

Capítulo II

Caracterización de los agentes causales de deterioro fúngico de tomates cultivados en Argentina

Anexo I. Medios de cultivo

Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA)

KH₂PO₄ 1 g
 Concentrado Czapek 10 ml
 Solución de metales traza 1 ml
 Extracto de levadura 5 g
 Sacarosa 30 g
 Agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Papa blanca 200 g
 D-glucosa 20 g
 Agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Agar Papa Zanahoria (APZ)

Papa blanca 20 g
 Zanahoria 20 g
 ZnSO₄•7H₂O 0,01 g
 CuSO₄•5H₂O 0,005 g
 Agar 20 g
 Agua destilada 1 L

Agar Pulpa de Tomate (APT)

Pulpa de tomate 800 ml
 Agar 15 g
 Agua destilada 200 ml

Agar V8®

Jugo V8® 175 ml
 CaCO₃ 3 g
 ZnSO₄•7H₂O 0,01 g
 CuSO₄•5H₂O 0,005 g
 Agar 20 g
 Agua destilada 825 ml

Diclorán Cloranfenicol Malta Agar (DCMA)

Extracto de malta 10 g
 Diclorán 2 mg
 Cloranfenicol 0,1 g
 Agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES)

Extracto de Levadura 20 g
 Sacarosa 150 g
 Diclorán 2 mg
 Rosa de Bengala 25 mg
 Cloranfenicol 0,05 g
 MgSO₄•7H₂O 0,5 g
 ZnSO₄•7H₂O 0,01 g
 CuSO₄•5H₂O 0,005 g
 Agar 20 g
 Agua destilada 885 mL

Diclorán 18% Glicerol Agar (DG18)

D-glucosa 10 g
 Peptona 5 g
 KH₂PO₄ 1 g
 MgSO₄•7H₂O 0,5 g
 Diclorán 2 mg
 Cloranfenicol 0,1 g
 Glicerol 220 g
 Agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Extracto de Malta Agar (MEA)

Extracto de malta 20 g
 D-glucosa 20 g
 Peptona 1 g
 Agar 20 g
 Agua destilada 1 L

Capítulo III

Identificación polifásica de aislamientos de *Alternaria* spp. de tomates

Anexo II. Número de identificaciones morfológicas por tipo de cultivar y región de origen de tomates de Argentina.

		<i>A. alternata</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. tomaticola</i>	Total
Perita	Cuyo	2	5	14	5	26
	Noroeste	4	4	16	16	40
	Pampeana	4	7	9	8	28
Redondo	Cuyo	1	3	1	3	8
	Noreste	-	3	1	-	4
	Noroeste	3	1	4	-	8
	Pampeana	-	4	1	1	6
Total		14	27	46	33	120

Anexo III. Identificaciones morfológicas de *Alternaria* spp. aisladas de tomates cultivados en Argentina.

Cultivar	Region	Lote	Código	Especie
Perita	Pampeana	3694	TPP001	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP001.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3595	TPC006	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	3598	TPNO007	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3598	TPNO008	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3598	TPNO011	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3603	TPNO014	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3603	TPNO017	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3603	TPNO017.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3596	TPNO018	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	3601	TPNO033	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC034	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC035	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC036	<i>A. arborescens</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC038	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC040	<i>A. alternata</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC040.1	<i>A. alternata</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC041	<i>A. arborescens</i>
Perita	Cuyo	3589	TPC041.1	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO042	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO043	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO044	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO045	<i>A. tenuissima</i>

Cultivar	Region	Lote	Código	Especie
Perita	Noroeste	3631	TPNO046	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO046.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO047	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO048	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO049	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO051	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO052	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3631	TPNO053	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3632	TPNO055	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3632	TPNO055.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3632	TPNO058	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3622	TPC061	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3622	TPC062	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3622	TPC064	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3622	TPC065	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3622	TPC066	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3604	TPP067	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3604	TPP068	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3616	TPNO071	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3611	TPNO072	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3611	TPNO072.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3605	TPNO075	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3624	TPNO078	<i>A. tomaticola</i>
Redondo	Noroeste	3612	TPNO079	<i>A. alternata</i>
Redondo	Noroeste	3612	TPNO081	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Noroeste	3612	TPNO082	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3657	TPNO086	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3657	TPNO087	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3657	TPNO088	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3657	TPNO089	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO090	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO091	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO092	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO093	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO094	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	3649	TPNO095	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3671	TPP097	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	3671	TPP099	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3671	TPP100	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3671	TPP102	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3671	TPP103	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Noroeste	3637	TPNO104	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Noroeste	3637	TPNO106	<i>A. alternata</i>
Redondo	Noroeste	3637	TPNO107	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	3638	TPNO108	<i>A. arborescens</i>

Cultivar	Region	Lote	Código	Especie
Perita	Noroeste	3638	TPNO109	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noroeste	3659	TPNO111	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Noroeste	3659	TPNO112	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	3692	TRP113	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	3692	TRP113.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP114	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP115	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP117	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP117.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP118	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP119	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP119.1	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP120	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP121	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP121.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3694	TPP121.2	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3691	TPP127	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	3705	TRC129	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	3705	TRC131	<i>A. arborescens</i>
Perita	Cuyo	3698	TPC132	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3698	TPC133	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3698	TPC133.1	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3698	TPC134	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3698	TPC136	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Pampeana	3713	TPP138	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3713	TPP140	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	3713	TPP140.1	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3713	TPP141	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3711	TPC142	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3711	TPC143	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3711	TPC145	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3711	TPC146	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	3711	TPC146.1	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3712	TPC149	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	3712	TPC152	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	3766	TRNE159	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	3766	TRNE160	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Noreste	3766	TRNE161	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	3766	TRNE163	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC165	<i>A. tomaticola</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC166	<i>A. tomaticola</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC167	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC168	<i>A. alternata</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC169	<i>A. tomaticola</i>
Redondo	Cuyo	3764	TRC170	<i>A. tenuissima</i>

Cultivar	Region	Lote	Código	Especie
Perita	Pampeana	3746	TPP173	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	3746	TPP174	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	3746	TPP176	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	3749	TRP182	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	3723	TRP184	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	3723	TRP188	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Pampeana	3723	TRP189	<i>A. arborescens</i>

Anexo IV. Submuestra de *Alternaria* spp. identificadas molecular y químicamente de aislamientos de tomates cultivados en Argentina.

Cultivar	Región	Código	Especie
Redondo	Pampeana	TRP189	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	TRP184	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	TRP182	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Pampeana	TRP113	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	TRNE163	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	TRNE161	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Noreste	TRNE159	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	TRC170	<i>A. tenuissima</i>
Redondo	Cuyo	TRC168	<i>A. alternata</i>
Redondo	Cuyo	TRC167	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	TRC165	<i>A. tomaticola</i>
Redondo	Cuyo	TRC131	<i>A. arborescens</i>
Redondo	Cuyo	TRC129	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP176	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP173	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP140	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	TPP138	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP127	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP121	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	TPP119	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	TPP118	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	TPP117	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Pampeana	TPP099	<i>A. arborescens</i>
Perita	Pampeana	TPP097	<i>A. alternata</i>
Perita	Pampeana	TPP001	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO112	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	TPNO109	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	TPNO108	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	TPNO107	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO106	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO095	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	TPNO094	<i>A. arborescens</i>
Perita	Noroeste	TPNO093	<i>A. tomaticola</i>

Cultivar	Región	Código	Especie
Perita	Noroeste	TPNO092	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	TPNO091	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	TPNO078	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	TPNO071	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	TPNO053	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO049	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO048	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO042	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO033	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Noroeste	TPNO017	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Noroeste	TPNO014	<i>A. alternata</i>
Perita	Noroeste	TPNO011	<i>A. tenuissima</i>
Perita	Cuyo	TPC152	<i>A. arborescens</i>
Perita	Cuyo	TPC146	<i>A. tomaticola</i>
Perita	Cuyo	TPC040.1	<i>A. alternata</i>
Perita	Cuyo	TPC040	<i>A. alternata</i>
Perita	Cuyo	TPC006	<i>A. arborescens</i>
Cepa patrón		EGS 39128	<i>A. arborescens</i>
Cepa patrón		EGS 34015	<i>A. tenuissima</i>
Cepa patrón		EGS 34016	<i>A. alternata</i>
Cepa patrón		EGS 27198 ex type	<i>A. infectoria</i>

Anexo V. Secuencias de referencia de GenBank para especies de *Alternaria* spp.

Fuente	Código adhesión GenBank	Especie
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451987.1	<i>A. alternata</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451999.1	<i>A. arborescens</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451998.1	<i>A. arborescens</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451968.1	<i>A. gaisen</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451996.1	<i>A. gaisen</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451992.1	<i>A. longipes</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451991.1	<i>A. longipes</i>
Dettman & Eggertson, (2022)	OL451990.1	<i>A. longipes</i>
Wolters et al., (2018)	CP022025.1	<i>A. solani</i>

Capítulo IV
Presencia de toxinas de *Alternaria* en productos de tomate
del mercado argentino

Anexo VI. Productos procesados de tomate y análisis de seis toxinas de *Alternaria*.

Código	Tipo de producto	Concentración (µg/kg)					
		ALT	AOH	AME	ATX-I	TEN	TeA
TPM001	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM002*	Salsa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM003	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM004	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM005	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM006	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM007	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM008	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM009	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM010	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM011	Puré de tomate	—	—	—	—	—	336,3
TPM012	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM013	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM014	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM015	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM016*	Salsa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM017*	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM018	Puré de tomate	54,4	57,1	—	—	6,7	—
TPM019	Tomate entero pelado	—	—	—	—	5,5	—
TPM020	Puré de tomate	—	—	—	233,9	—	—
TPM021	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM022	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM023	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM024	Puré de tomate	—	25,8	33,1	—	—	—
TPM025	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM026	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM027	Tomate triturado	—	5,4	—	—	—	—
TPM028	Tomate triturado	—	4,7	—	—	—	—
TPM029	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM030	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM031	Puré de tomate	—	46,3	—	—	5,0	419,8
TPM032	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	211,4
TPM033	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM034*	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM035	Salsa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM036	Pulpa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM037	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM038	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—

Código	Tipo de producto	Concentración (µg/kg)					
		ALT	AOH	AME	ATX-I	TEN	TeA
TPM039	Tomate entero pelado	—	—	—	—	6,8	—
TPM040	Puré de tomate	—	31,1	28,1	—	4,3	—
TPM041	Tomate entero pelado	—	—	—	—	3,7	—
TPM042	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM043*	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM044*	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM045	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM046	Pulpa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM047	Extracto de tomate	—	105,3	—	—	—	—
TPM048	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM049	Salsa de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM050	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM051	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM052	Puré de tomate	—	—	—	146,8	—	—
TPM053	Tomate triturado	—	—	—	—	5,5	—
TPM054	Puré de tomate	—	—	—	—	4,2	277,3
TPM055	Puré de tomate	—	—	—	—	—	262,4
TPM056	Tomate triturado	—	—	—	—	3,7	338,2
TPM057	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM058	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM059	Puré de tomate	—	—	—	—	—	358,0
TPM060	Puré de tomate	—	55,3	22,3	—	—	—
TPM061	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM062	Puré de tomate	—	—	—	—	—	255,4
TPM063	Puré de tomate	—	39,7	—	—	—	374,7
TPM064	Puré de tomate	—	—	—	—	—	495,7
TPM065	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM066	Puré de tomate	—	36,1	—	—	—	—
TPM067	Puré de tomate	30,8	—	—	—	—	—
TPM068	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM069	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	442,0
TPM070	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM071	Puré de tomate	94,3	—	—	—	—	—
TPM072	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM073	Tomate entero pelado	—	—	—	—	6,8	—
TPM074	Puré de tomate	—	—	—	—	4,6	—
TPM075	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM076	Puré de tomate	—	—	—	—	—	—
TPM077	Tomate entero pelado	—	—	—	—	—	—
TPM078	Tomate triturado	—	—	—	—	—	—
TPM079	Extracto de tomate	—	—	—	—	—	—

ALT: altenueno, **AOH:** alternariol; **AME:** alternariol monometil éter; **ATX-I:** altertoxina-I; **TEN:** tentoxina; **TeA:** ácido tenuazónico. —: toxinas no detectadas.

*Productos de origen italiano.

Capítulo VI

Ecofisiología de *Alternaria* spp. de frutos de tomate

Anexo VII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las velocidades de crecimiento (cm/día) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Velocidad					
EGS 39128	1,57	3	0,52	1126,33	<0,0001
Temperatura	1,57	3	0,52	1126,33	<0,0001
Error	0,01	26	4,60E-04		
Total	1,58	29			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Velocidad					
TPP117	2,19	3	0,73	956,5	<0,0001
Temperatura	2,19	3	0,73	956,5	<0,0001
Error	0,02	23	7,60E-04		
Total	2,21	26			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Velocidad					
TPP173	1,08	3	0,36	1352,02	<0,0001
Temperatura	1,08	3	0,36	1352,02	<0,0001
Error	0,01	23	2,70E-04		
Total	1,08	26			

Anexo VIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre la fase de latencia (días) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Fase de latencia					
EGS 39128	11,22	3	3,74	402,92	<0,0001
Temperatura	11,22	3	3,74	402,92	<0,0001
Error	0,24	26	0,01		
Total	11,46	29			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Fase de latencia					
TPP117	7,53	3	2,51	258,5	<0,0001
Temperatura	7,53	3	2,51	258,5	<0,0001
Error	0,22	23	0,01		
Total	7,76	26			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Fase de latencia					
TPP173	7,45	3	2,48	580,98	<0,0001
Temperatura	7,45	3	2,48	580,98	<0,0001
Error	0,09	22	4,30E-03		
Total	7,55	25			

Anexo IX. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones totales ($\mu\text{g/kg}$) de toxinas de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	106628756	13	8202212	75,54	<0,0001
Temperatura	3382789,81	3	1127596,6	10,39	<0,0001
Tiempo	83158,14	2	41579,07	0,38	0,6822
Toxina	103162808	8	12895351	118,77	<0,0001
Error	33658686,5	310	108576,41		
Total	140287443	323			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	5607567,27	13	431351,33	7,05	<0,0001
Temperatura	288906,87	3	96302,29	1,57	0,1955
Tiempo	194367,15	2	97183,57	1,59	0,2058
Toxina	5124293,26	8	640536,66	10,47	<0,0001
Error	18961932,1	310	61167,52		
Total	24569499,4	323			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	43696643,4	13	3361280,26	7,5	<0,0001
Temperatura	6135852,51	3	2045284,17	4,56	0,0038
Tiempo	1838609,93	2	919304,97	2,05	0,1304
Toxina	35722181	8	4465272,62	9,96	<0,0001
Error	138963001	310	448267,75		
Total	182659644	323			

Anexo X. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ALT ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	16220,99	11	1474,64	18,53	<0,0001
Temperatura	15665,26	3	5221,75	65,62	<0,0001
Tiempo	43,86	2	21,93	0,28	0,7615
Temperatura*Tiempo	511,88	6	85,31	1,07	0,4063
Error	1909,84	24	79,58		
Total	18130,83	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	102471,29	11	9315,57	1,71	0,1305
Temperatura	63378,46	3	21126,15	3,89	0,0214
Tiempo	5303,65	2	2651,83	0,49	0,6199
Temperatura*Tiempo	33789,18	6	5631,53	1,04	0,4268
Error	130455,25	24	5435,64		
Total	232926,54	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	41508,93	11	3773,54	1,62	0,1572
Temperatura	12571,21	3	4190,4	1,79	0,1752
Tiempo	7234,43	2	3617,21	1,55	0,233
Temperatura*Tiempo	21703,29	6	3617,21	1,55	0,2053
Error	56047,15	24	2335,3		
Total	97556,08	35			

Anexo XI. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AOH ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	13454,34	11	1223,12	192,6	<0,0001
Temperatura	8578,22	3	2859,41	450,26	<0,0001
Tiempo	3627	2	1813,5	285,57	<0,0001
Temperatura*Tiempo	1249,12	6	208,19	32,78	<0,0001
Error	152,41	24	6,35		
Total	13606,75	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	6737739,49	11	612521,77	8,34	<0,0001
Temperatura	2637009,19	3	879003,06	11,97	0,0001
Tiempo	264261,46	2	132130,73	1,8	0,1871
Temperatura*Tiempo	3836468,84	6	639411,47	8,71	<0,0001
Error	1762793,03	24	73449,71		
Total	8500532,52	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	1225430,53	11	111402,78	3,15	0,009
Temperatura	513417,67	3	171139,22	4,84	0,0089
Tiempo	354697,95	2	177348,97	5,02	0,0151
Temperatura*Tiempo	357314,92	6	59552,49	1,69	0,1677
Error	847764,43	24	35323,52		
Total	2073194,97	35			

Anexo XII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AME ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	4845,93	11	440,54	56,81	<0,0001
Temperatura	3713,1	3	1237,7	159,62	<0,0001
Tiempo	587,3	2	293,65	37,87	<0,0001
Temperatura*Tiempo	545,52	6	90,92	11,73	<0,0001
Error	186,1	24	7,75		
Total	5032,03	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	438364,77	11	39851,34	1,75	0,122
Temperatura	156205,29	3	52068,43	2,29	0,1045
Tiempo	17984,09	2	8992,04	0,39	0,6782
Temperatura*Tiempo	264175,39	6	44029,23	1,93	0,1164
Error	546790,54	24	22782,94		
Total	985155,31	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	452615,25	11	41146,84	2,5	0,0295
Temperatura	330425,77	3	110141,92	6,68	0,0019
Tiempo	35331	2	17665,5	1,07	0,3582
Temperatura*Tiempo	86858,48	6	14476,41	0,88	0,5254
Error	395524,68	24	16480,2		
Total	848139,93	35			

Anexo XIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de TeA ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	2371559,57	11	215596,32	41,82	<0,0001
Temperatura	2116947,28	3	705649,09	136,88	<0,0001
Tiempo	19284,57	2	9642,28	1,87	0,1758
Temperatura*Tiempo	235327,72	6	39221,29	7,61	0,0001
Error	123727,91	24	5155,33		
Total	2495287,48	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	734703,09	11	66791,19	3,47	0,0052
Temperatura	435215,24	3	145071,75	7,54	0,001
Tiempo	74543,87	2	37271,94	1,94	0,1661
Temperatura*Tiempo	224943,98	6	37490,66	1,95	0,1138
Error	462001,37	24	19250,06		
Total	1196704,46	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	7429183,59	11	675380,33	2,75	0,0187
Temperatura	2609370,94	3	869790,31	3,54	0,0298
Tiempo	191881,99	2	95941	0,39	0,6812
Temperatura*Tiempo	4627930,65	6	771321,78	3,14	0,0205
Error	5903204,09	24	245966,84		
Total	13332387,7	35			

Anexo XIV. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de TEN ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	15393,53	11	1399,41	160,76	<0,0001
Temperatura	12277,49	3	4092,5	470,13	<0,0001
Tiempo	637,91	2	318,96	36,64	<0,0001
Temperatura*Tiempo	2478,13	6	413,02	47,45	<0,0001
Error	208,92	24	8,7		
Total	15602,45	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	3736019,19	11	339638,11	3,37	0,0062
Temperatura	2094012,21	3	698004,07	6,92	0,0016
Tiempo	518774,39	2	259387,19	2,57	0,0972
Temperatura*Tiempo	1123232,58	6	187205,43	1,86	0,1303
Error	2420030,39	24	100834,6		
Total	6156049,58	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	49992204,4	11	4544745,85	7,18	<0,0001
Temperatura	28388755,7	3	9462918,56	14,95	<0,0001
Tiempo	6061632,46	2	3030816,23	4,79	0,0178
Temperatura*Tiempo	15541816,3	6	2590302,71	4,09	0,0058
Error	15195054,3	24	633127,26		
Total	65187258,7	35			

Anexo XV. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ATX-I ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	968,87	11	88,08	1,36	0,2552
Temperatura	80,99	3	27	0,42	0,7432
Tiempo	306,42	2	153,21	2,36	0,116
Temperatura*Tiempo	581,46	6	96,91	1,49	0,2229
Error	1557,99	24	64,92		
Total	2526,86	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	23249,97	11	2113,63	2,6	0,0243
Temperatura	6343,23	3	2114,41	2,6	0,0753
Tiempo	11315,67	2	5657,84	6,96	0,0041
Temperatura*Tiempo	5591,08	6	931,85	1,15	0,3664
Error	19498,93	24	812,46		
Total	42748,91	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	2748386,44	11	249853,31	8,16	<0,0001
Temperatura	2041119,81	3	680373,27	22,21	<0,0001
Tiempo	402335,45	2	201167,72	6,57	0,0053
Temperatura*Tiempo	304931,18	6	50821,86	1,66	0,1746
Error	735241,95	24	30635,08		
Total	3483628,39	35			

Anexo XVI. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de ATX-II ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	137311,68	11	12482,88	9,6	<0,0001
Temperatura	76805,88	3	25601,96	19,69	<0,0001
Tiempo	4298,17	2	2149,09	1,65	0,2125
Temperatura*Tiempo	56207,62	6	9367,94	7,21	0,0002
Error	31200,35	24	1300,01		
Total	168512,03	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	1369744,45	11	124522,22	3,17	0,0087
Temperatura	366893,43	3	122297,81	3,12	0,0449
Tiempo	228189,8	2	114094,9	2,91	0,0739
Temperatura*Tiempo	774661,21	6	129110,2	3,29	0,0166
Error	941302,45	24	39220,94		
Total	2311046,9	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	50690386,6	11	4608216,96	9,85	<0,0001
Temperatura	15307186,4	3	5102395,47	10,91	0,0001
Tiempo	10417560,7	2	5208780,37	11,14	0,0004
Temperatura*Tiempo	24965639,4	6	4160939,9	8,9	<0,0001
Error	11224121,1	24	467671,71		
Total	61914507,7	35			

Anexo XVII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AAL-TA ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	25336356,7	11	2303305,15	6,12	0,0001
Temperatura	23443306,8	3	7814435,61	20,75	<0,0001
Tiempo	399109,63	2	199554,82	0,53	0,5954
Temperatura*Tiempo	1493940,19	6	248990,03	0,66	0,6813
Error	9037116,61	24	376546,53		
Total	34373473,3	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	8845,46	11	804,13	10,96	<0,0001
Temperatura	4083,93	3	1361,31	18,56	<0,0001
Tiempo	486,29	2	243,14	3,31	0,0536
Temperatura*Tiempo	4275,25	6	712,54	9,71	<0,0001
Error	1760,39	24	73,35		
Total	10605,85	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP173	149,94	11	13,63	0,51	0,877
Temperatura	66,17	3	22,06	0,83	0,492
Tiempo	18,1	2	9,05	0,34	0,7156
Temperatura*Tiempo	65,67	6	10,95	0,41	0,8648
Error	640,09	24	26,67		
Total	790,03	35			

Anexo XVIII. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las concentraciones de AAL-TB ($\mu\text{g/kg}$) de *Alternaria* spp. en agar pulpa de tomate. $\alpha=0,05$.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
EGS 39128	24953,58	11	2268,51	7,25	<0,0001
Temperatura	18306,33	3	6102,11	19,5	<0,0001
Tiempo	2243,29	2	1121,64	3,58	0,0434
Temperatura*Tiempo	4403,97	6	733,99	2,35	0,0633
Error	7509,2	24	312,88		
Total	32462,78	35			

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Concentración					
TPP117	9435,63	11	857,78	45412,1	<0,0001
Temperatura	5616,22	3	1872,07	99109,8	<0,0001
Tiempo	952,67	2	476,34	25217,8	<0,0001
Temperatura*Tiempo	2866,74	6	477,79	25294,7	<0,0001
Error	0,45	24	0,02		
Total	9436,08	35			

Capítulo VII
Evaluación de los efectos de la radiación UV-C en aislamientos de *Alternaria*
spp. y frutos de tomate

Anexo XIX. Efecto fungicida de la radiación UV-C sobre aislamientos de *Alternaria* spp. Tabla de número promedio de colonias por dosis (KJ/m²) y tiempo de exposición (minutos) para cada aislamiento, luego de 4 días de incubación a 25°C.

Tiempo (min)	EGS 39128		TPP117		TPP173	
	Dosis (KJ/m ²)	Nº colonias	Dosis (KJ/m ²)	Nº colonias	Dosis (KJ/m ²)	Nº colonias
0	0,00	100,0	0,00	87,3	0,00	86,7
0,3	0,47	50,3 ^d	0,50	63,7 ^d	0,50	66,0 ^c
1	0,95	29,0 ^c	1,01	43,0 ^c	1,00	40,0 ^b
2	1,90	13,3 ^b	2,01	13,0 ^b	2,00	6,7 ^a
3	2,85	2,7 ^a	3,02	2,0 ^a	3,00	0,3 ^a
4	3,79	0,3 ^a	4,02	1,3 ^a	4,00	0,3 ^a
5	4,74	0,0 ^a	5,03	0,0 ^a	5,00	0,0 ^a
7	6,64	0,0 ^a	7,04	0,0 ^a	6,99	0,0 ^a
10	9,49	0,0 ^a	10,05	0,0 ^a	9,99	0,0 ^a
15	14,23	0,0 ^a	15,08	0,0 ^a	14,99	0,0 ^a
20	18,97	0,0 ^a	20,10	0,0 ^a	19,98	0,0 ^a
30	28,46	0,0 ^a	30,15	0,0 ^a	29,97	0,0 ^a
60	56,92	0,0 ^a	60,30	0,0 ^a	59,94	0,0 ^a

A. arborescens (EGS 39128 y TPP173) y *A. tomaticola* (TPP117). Letras diferentes muestran las diferencias de medias significativas de Tukey (P<0,05).

Anexo XX. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre la cepa patrón de *A. arborescens* (EGS 39128). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m²) y el tiempo de incubación (días).

Tiempo de irradiación (min)	Dosis (KJ/m ²)	Tiempo de incubación (días)							
		1	2	3	4	7	8	9	10
0	0,00	0,8	1,9	3,4	4,6	7,8	8,4	9,0	9,0
0	0,00	0,7	2,2	3,5	4,7	7,6	8,7	9,0	9,0
0	0,00	0,7	2,3	3,5	4,9	7,7	8,7	9,0	9,0
2	1,05	0,8	1,2	1,9	3,2	6,8	7,7	8,5	9,0
2	1,05	0,8	1,1	2,5	4,0	7,3	7,9	8,8	9,0
2	1,05	0,8	1,1	2,2	3,5	7,0	8,1	8,8	9,0
5	5,25	0,8	0,9	2,2	3,6	7,2	7,9	8,9	9,0
5	5,25	0,8	0,9	2,5	3,8	7,1	7,9	8,7	9,0
5	5,25	0,9	1,0	2,5	3,7	7,2	8,0	8,9	9,0
10	10,50	0,9	1,0	2,0	3,3	7,0	7,7	8,7	9,0
10	10,50	0,9	1,0	2,2	3,6	7,1	7,9	8,6	9,0
10	10,50	0,9	1,0	1,9	3,3	7,0	7,9	8,6	9,0
20	21,00	0,9	1,1	1,8	3,3	7,0	7,7	8,9	9,0
20	21,00	0,8	0,9	1,4	2,8	6,7	7,6	8,5	9,0
20	21,00	0,9	1,1	1,7	3,2	6,8	8,0	8,5	9,0
30	31,50	0,9	1,0	2,1	3,4	6,6	7,6	8,4	9,0
30	31,50	0,8	1,0	1,7	3,0	6,6	7,5	8,2	9,0
30	31,50	0,9	1,0	1,9	3,1	6,7	7,5	8,5	9,0
60	63,00	0,9	1,0	1,3	2,8	6,6	7,4	8,2	9,0
60	63,00	0,9	1,1	1,2	2,8	6,6	7,2	8,2	9,0
60	63,00	0,9	1,0	1,4	2,5	6,3	7,5	8,5	9,0

Anexo XXI. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre el aislamiento de *A. tomatocola* (TPP117). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m²) y el tiempo de incubación (días).

Tiempo de irradiación (min)	Dosis (KJ/m ²)	Tiempo de incubación (días)							
		1	2	5	6	7	8	9	12
0	0,00	0,8	2,3	5,6	6,9	7,9	9,0	9,0	9,0
0	0,00	0,7	2,4	5,7	6,9	7,8	8,8	9,0	9,0
0	0,00	0,6	2,2	5,5	6,9	7,6	8,7	9,0	9,0
2	0,96	0,6	0,8	4,5	6,1	7,0	8,2	8,8	9,0
2	0,96	0,6	0,9	4,4	6,1	7,0	8,1	8,9	9,0
2	0,96	0,6	0,8	4,5	6,4	7,0	8,2	8,9	9,0
5	4,78	0,6	0,8	4,2	5,7	6,7	7,9	8,8	9,0
5	4,78	0,6	0,7	4,4	6,0	6,8	7,8	8,7	9,0
5	4,78	0,6	0,6	4,3	5,9	6,6	7,7	8,6	9,0
10	9,56	0,7	0,7	4,3	5,8	6,8	7,7	8,8	9,0
10	9,56	0,6	0,7	4,3	6,1	7,0	7,8	8,8	9,0
10	9,56	0,6	0,6	4,1	5,8	6,5	7,6	8,6	9,0
20	19,12	0,6	0,8	4,1	5,7	6,8	7,7	8,5	9,0
20	19,12	0,7	0,7	3,6	5,1	6,4	7,5	8,6	9,0
20	19,12	0,6	0,7	3,7	5,0	6,1	7,2	8,6	9,0
30	28,67	0,6	0,9	4,0	5,7	6,8	7,7	8,5	9,0
30	28,67	0,6	0,8	3,8	5,4	6,6	7,6	8,5	9,0
30	28,67	0,7	0,7	3,6	5,1	6,2	7,3	8,4	9,0
60	57,35	0,7	0,7	3,2	4,6	5,8	7,1	8,1	9,0
60	57,35	0,7	0,8	3,8	5,3	6,5	7,5	8,2	9,0
60	57,35	0,6	0,6	3,2	4,1	5,3	7,3	8,1	9,0

Anexo XXII. Efecto fungistático de la radiación UV-C sobre el aislamiento de *A. arborescens* (TPP173). Diámetro de la colonia (cm) en función de la dosis (KJ/m²) y el tiempo de incubación (días).

Tiempo de irradiación (min)	Dosis (KJ/m ²)	Tiempo de incubación (días)							
		1	2	3	4	7	8	9	10
0	0,00	0,7	1,8	3,2	4,3	8,0	8,6	9,0	9,0
0	0,00	0,6	1,6	3,0	4,2	7,7	8,4	9,0	9,0
0	0,00	0,7	1,3	3,1	4,3	8,0	8,6	9,0	9,0
2	1,04	0,8	0,9	2,1	3,2	6,9	8,0	9,0	9,0
2	1,04	0,6	0,7	2,1	3,3	7,3	8,4	9,0	9,0
2	1,04	0,8	0,9	2,1	3,5	7,3	8,2	9,0	9,0
5	5,18	0,7	0,9	0,9	3,1	7,1	8,0	8,9	9,0
5	5,18	0,6	0,7	1,3	2,6	6,5	7,8	8,7	9,0
5	5,18	0,6	0,6	2,0	2,2	6,0	7,3	8,4	9,0
10	10,36	0,6	0,6	0,8	2,0	5,9	7,0	8,1	9,0
10	10,36	0,7	0,7	0,8	1,7	5,6	6,9	8,0	9,0
10	10,36	0,6	0,6	0,7	1,6	5,7	7,0	8,2	9,0
20	20,71	0,5	0,5	0,9	1,0	5,0	6,3	7,7	9,0
20	20,71	0,6	0,6	0,9	1,8	5,7	6,9	8,0	9,0
20	20,71	0,6	0,7	0,7	1,9	5,6	7,0	8,2	9,0
30	31,07	0,7	0,7	1,4	2,5	6,5	7,5	8,7	9,0
30	31,07	0,7	0,7	1,4	2,5	6,5	7,5	8,7	9,0
30	31,07	0,7	0,7	0,8	2,0	5,4	7,0	8,1	9,0
60	62,14	0,7	0,7	0,8	2,0	5,4	7,0	8,1	9,0
60	62,14	0,6	0,6	0,8	2,2	6,1	7,3	8,4	9,0
60	62,14	0,6	0,6	0,9	2,1	6,1	7,1	8,2	9,0