

7. ALTERNARIA

El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobitas pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados. Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo (Andersen *et al.* 2001).

CULTIVOS

Las características del crecimiento constituyen uno de los criterios para la clasificación. En Czapek-Levadura (cap. 3) *A. alternata* y *A. infectoria* producen colonias de tamaño similar (56 - 63 mm de diámetro en 1 semana a 27°C), chatas y ligeramente algodonosas. El micelio aéreo es gris verdoso con reverso negro parduzco. Muchas cepas de *A. infectoria* forman escasos conidios, tienen un micelio algodonoso y el reverso de la colonia es oscuro en el centro rodeado de un anillo anaranjado pálido (Andrews 1992).

En Malta-Glucosa (cap. 3) *A. alternata* forma colonias algodonosas, elevadas, con micelio gris verdoso y esporos negro parduzco. *A. infectoria* tiene colonias pardo aceituna a negro parduzco, chatas y algodonosas, a veces con fascículos y esporulación moderada mostrando el micelio gris y con frecuencia un pigmento soluble verde amarillento. Otras especies casi no presentan esporulación sobre este medio (Andrews 1992).

En Czapek-Glicerol (cap. 3) *A. alternata* y *A. infectoria* producen colonias indistinguibles, de color pardo grisáceo a pardo oliva, 7 - 12 mm de diámetro en 1 semana a 27°C, con micelio poco denso. En Malta-Diclorán, las colonias tienen un diámetro de 40 - 45 mm en iguales condiciones. *A. alternata* muestra un color negro verdoso en anillos concéntricos, la colonia aterciopelada tiene largas cadenas no ramificadas de conidios lisos. *A. infectoria* tiene colonias fasciculadas, de color gris verdoso, con cadenas siempre ramificadas de conidios rugosos y con frecuencia forman estructuras teleomórficas inmaduras (Andrews 1992).

Las diferencias entre *A. longipes*, *A. alternata* y *A. gaisen* son mayores a 33°C, pues la primera no crece y la segunda alcanza un diámetro de colonia un 40% mayor que la última. A 20°C *A. gaisen* tiene colonias de color aceituna amarillento en Sacarosa-Dicloran (cap. 3) mientras que *A. alternata* muestra colonias verde oscuro y *A. longipes* un color amarillo paja (Andersen *et al.* 2001). *A. arborescens* forma colonias verde aceituna oscuro y *A. infectoria* de color blanco mientras que *A. tenuissima* suele presentar varios tonos de verde (Serdani *et al.* 2002).

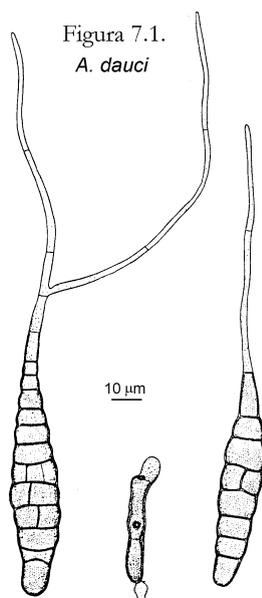
Pero el medio de cultivo conveniente para separar las especies de *Alternaria* en grupos con características macro y micromorfológicas similares es Papa-Zanahoria (cap. 3) si la incubación se hace a 25°C con luz fluorescente durante 8 hs seguida de 16 hs en la oscuridad (Andersen *et al.* 2001).

MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN

Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. La especie *A. infectoria* tiene un estado perfecto que pertenece al género *Pleospora*. Éste forma pseudotecios sobre el tallo de cereales o hierbas con ascas bitunicadas cilíndricas

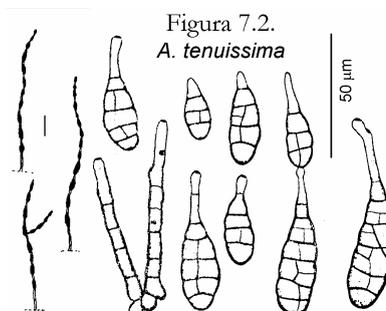
en los lóculos del estroma, dentro de las cuales hay 8 ascosporas provistas de septos transversales y longitudinales (Webster 1986). La especie predominante en Argentina es *A. alternata* (Chulze *et al.* 1994).

Es común observar en los hongos una plasticidad morfológica. Cuando las especies de *Alternaria* crecen en medios ricos y en la obscuridad bajo condiciones ambientales no controladas, se forma un exceso de micelio aéreo que afecta al desarrollo tridimensional de la esporulación. Al hacer las preparaciones húmedas se destruyen las estructuras y como resultado solo se observan conidios (Andersen *et al.* 2001). El examen directo de los cultivos sobre Papa-Zanahoria permite diferenciar grupos de especies según los tipos de esporulación (Simmons & Roberts 1993) lo que fué corroborado por el análisis molecular y químico (Roberts *et al.* 2000, Andersen *et al.* 2001, 2002). La capacidad de los "primers" para detectar especies en extractos de tejidos vegetales infectados (semillas o raíces) tiene una sensibilidad de 0,5-1 ng de ADN del patógeno en un material con 10-20 ng de ADN vegetal (Konstantinova *et al.* 2002).

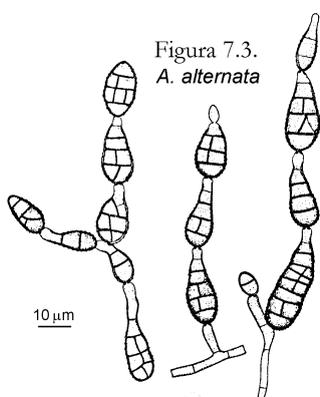


A las cepas se las solía dividir en tres secciones según formaran o no cadenas de dictiosporas, y si tales cadenas eran cortas o largas (Chou & Wu 2002) pero luego se tomó en cuenta el aspecto de los conidióforos y se las reunió en otras tres secciones que abarcan seis grupos de especies en base a la morfología sobre Papa-Zanahoria, a 25°C con alternancia día-noche (Andersen *et al.* 2001). Una sección comprende especies fitopatógenas que forman conidios solitarios con grandes picos, rara vez en cadenas de 2 o 3 conidios, como por ejemplo *A. dauci* que se transmite a través de las semillas de zanahoria (Konstantinova *et al.* 2002). La figura 7.1 muestra conidióforo y conidios de *A. dauci* (Ellis 1971), con 5 a 11 septos transversales y 1 a varios longitudinales u oblicuos.

Otra sección reúne a las especies que producen conidios en cadenas no ramificadas, por ejemplo *A. gaisen* con esporas ovoides gruesas en cadenas relativamente cortas (Andersen *et al.* 2001). El grupo *A. tenuissima* tiene cadenas rectas relativamente largas de esporas nacidas sobre cortos conidióforos primarios, pero ocasionalmente hay una ramificación corta sobre un conidióforo secundario nacido en la base de la cadena desde una célula intercalar del conidio. En cultivo las cadenas tienen una posición erguida, vertical (Roberts *et al.* 2000). La figura 7.2



muestra conidios de *A. tenuissima* (Ellis 1971).



La tercera sección comprende a los grupos de especies cuyas cadenas están ramificadas de manera diversa y abarca especies toxigénicas y otras que no lo son. El grupo *A. alternata* produce cadenas de 10 o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales, en relación 1:1, dando un aspecto abierto (Andersen *et al.* 2001). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados (Roberts *et al.* 2000). La figura 7.3 muestra conidios de *A. alternata* (Ellis 1971) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos.

A. arborescens (= *A. alternata* f.sp. *lycopersici*) posee largos conidióforos primarios con conidios en cadenas ramificadas. La ramificación ocurre predominantemente desde el ápice conidial y el conidio primario puede alcanzar hasta dos veces el tamaño de conidio siguiente llevando un corto conidióforo secundario geniculado con varios lóculos. La proliferación apical predomina resultando un aspecto relativamente compacto y complejo (Andersen *et al.* 2001). La figura 7.4 muestra el aspecto general de esporulación de *A. arborescens* (Andersen *et al.* 2002).

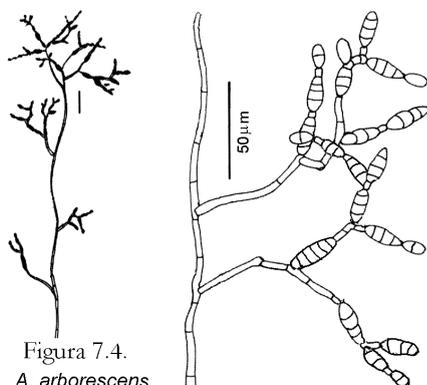


Figura 7.4.
A. arborescens

El grupo *A. infectoria*, se caracteriza por los largos conidióforos secundarios apicales, con varios lóculos conidiógenos, lo que resulta en una ramificación abierta. Los conidióforos primarios son cortos y se producen en manojos dando al cultivo un aspecto granular. La

forma de los conidios, el color y la superficie de la colonia varía dentro de este grupo de especies. Las colonias tienen un aspecto granular (Roberts *et al.* 2000). La figura 7.5 muestra el aspecto de la esporulación de *A. infectoria* (Andersen *et al.* 2002, Ellis 1971).

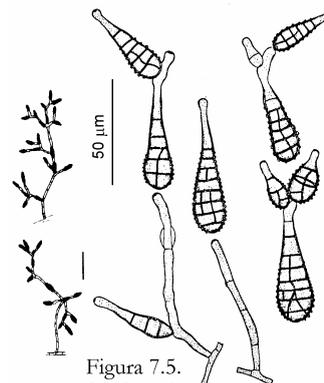


Figura 7.5.
A. infectoria

AMBIENTE

Los hongos presentes sobre las plantas antes de la cosecha son llamados "hongos del campo" e incluyen especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*. Después de la cosecha, estos hongos pueden mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteran su aspecto. También persisten en los granos de cereales almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium* (Lacey 1989).

Alternaria es, después de las especies de *Cladosporium*, el moho cuyos esporos se encuentran suspendidos en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración sub-epidérmica si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. El género *Alternaria* compite espacialmente con los otros hongos sobre la superficie vegetal y es antagonista de *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (Lacey 1989).

La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de 15°C o por sobre 33°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo es 0,88 y la óptima casi 1,00. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15%CO₂ o con 2,8% O₂ (Lacey 1989).

Alternaria crece sobre el trigo almacenado si los granos tienen una humedad del 22 - 23% (Swanson 1987). La producción de alternueno, alternariol y alternariol monometil-éter es óptima a 25°C con una actividad del agua de 0,98 sobre granos de trigo, mientras que la producción máxima de ácido tenuazónico por *A. tenuissima* ocurre a 20°C y una actividad del agua muy próxima a 1,0 (Moss 1991). La infección de tomates por este género es favorecida con la humedad debida a la lluvia o el rocío y una temperatura subóptima (<15°C), pudiendo causar importantes pérdidas de los frutos (Stinson *et al.* 1981).

El agregado de benzoato de sodio y sobato de potasio al substrato en cantidades mayores que 10 mg/kg inhiben el desarrollo de *Alternaria* y la producción de ácido tenuazónico (Trucksess 2001).

TOXINAS

Las especies de *Alternaria* son capaces de producir una variedad de compuestos diferentes, algunos de los cuales son tóxicos para los mamíferos y aves (micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas) como la tentoxina un tetrapéptido cíclico (Minoletti *et al.* 2000). La producción de metabolitos secundarios (identificados o no) se ha usado para distinguir entre especies morfológicamente similares, especialmente entre las especies de esporas pequeñas (Andersen & Thrane 1996).

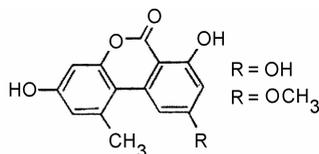


Figura 7.6. Alternariol y alternariol-metiléter.

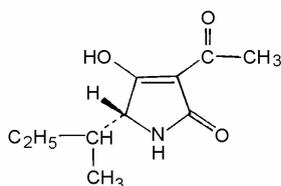
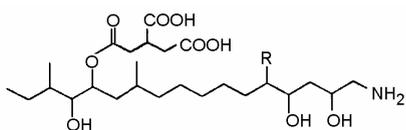


Figura 7.7. Ácido L- tenuazónico.



TA R = OH
TB R = H

Figura 7.8. Toxinas AAL.

(fig. 7.8), que inducen apoptosis en células renales de mono e inhiben la biosíntesis de esfingolípidos en hepatocitos de rata (Morisseau *et al.* 1999).

La presencia de toxinas de *Alternaria* spp. en sorgo y trigo está correlacionada con el grado de obscurecimiento de los granos. Entre el 76 y 90% de las cepas forman toxinas cuando crecen sobre maíz, cebada o girasol (Sanchis *et al.* 1993, Torres *et al.* 1993). Los niveles de alternariol varían de 0,3 a 2,1 mg/kg de maíz y 0,4 a 9,9 mg/kg de arroz, y los de alternariol metiléter van de 0,3 a 3,3 mg/kg de ambos productos (Torres *et al.* 1998). Estas toxinas no son mutagénicas en el ensayo de Ames (Davis & Stack 1994). En tomates y morrones suele observarse, respectivamente, alrededor de 1,3 y 0,6 mg de alternariol/kg, y 270 y 50 µg de alternariol-metiléter/kg (Bottalico *et al.* 1989).

La producción de toxinas en sorgo suele alcanzar a 2,5-7,9 mg de alternariol y su éter metílico/kg, 0,12-1,5 mg de alenueno /kg y solamente trazas de altertoxina I (Yoshizawa 1991). También es posible la transferencia de toxinas al aceite de olivas (Bottalico & Logrieco 1993). El ácido tenuazónico es un metabolito nefro y hepatóxico cuya dosis oral letal (DL₅₀) en ratas y ratones es 87-186 mg/kg de peso corporal (Scott & Kanhere 1980). En tomate alcanza un nivel de hasta 7,2 mg/kg y en morrones 54 µg/kg (Bottalico *et al.* 1989). El tratamiento en autoclave a 121°C durante 1 hora reduce significativamente las concentraciones a alternariol, alternariol-metiléter y ácido tenuazónico en harina de girasol (Trucksess 2001).

Los compuestos alternariol, alternariol monometil-éter, alenueno y altertoxina I son más solubles en metanol que en cloroformo. El ácido tenuazónico es soluble en n-heptano y metanol-ácido, y puede ser extraído de una solución clorofórmica como sal sódica al igual que otras toxinas ácidas (Paterson & Bridge 1994, Scott & Kanhere 1980). A continuación se da un esquema de una técnica analítica para el

análisis de las toxinas en los cultivos de 21 días a 25°C sobre 30 g de arroz con 45% de humedad (Kostecki *et al.* 1991).

- *Extracción.* Tratar con 4 porciones de 30 mL de metanol y filtrar (filtrado 1). Luego extraer con metanol, previamente llevado a pH 2 mediante ácido clorhídrico, y filtrar (filtrado 2).
- *Limpieza.*
 - Pasar el filtrado 1 por una columna con 2/3 de gel de sílice 60, malla 200-300, y arriba 1/3 de celite 545. Eluir con metanol (eluato 1: alternariol, alternariol monometil-éter, alternueno y altertoxina I).
 - Neutralizar el filtrado 2 con bicarbonato de sodio 0,2 M y tratar con cloroformo en ampolla de decantación. Tomar la fase acuosa, acidificar a pH=2 y extraer con cloroformo. Pasar por una columna de gel de sílice 60 y eluir con n-heptano (eluato 2: ácido tenuazónico).
- *Concentración* Evaporar separadamente los eluatos bajo presión reducida y disolver en un pequeño volumen de metanol.
- *Cromatografía.* Sembrar en placas de gel de sílice 60 junto con las soluciones testigo de concentración conocida, desarrollar con tolueno - acetato de etilo - ácido fórmico 90% (6+3+1 volúmenes). Observar la fluorescencia con luz UV de 366 y 280 nm.

REFERENCIAS

- Andersen B *et al.* 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105: 291-299.
- Andersen B *et al.* 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. Mycological Research 106: 170-182.
- Andersen B, Thrane U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *A. alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. Canadian Journal of Microbiology 42: 685-689.
- Andrews S. 1992. Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. pp. 351-355 en: Samson RA *et al.*, editores. Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam.
- Bilgrami KS *et al.* 1994. Mycotoxin production by some Indian *Alternaria* species. Mycotoxin Research 10: 56-59.
- Bottalico A, Logrieco A. 1993. Mycotoxins in *Alternaria alternata* infected olive fruits and their possible transfer into oil. Bulletin OEPP 23: 473-479.
- Bottalico A *et al.* 1989. Presenza di isolati tossigeni e micotossine di *Alternaria alternata* nei frutti di pomodoro e di peperone affetti da nerume. La difesa delle piante 12: 163-168.
- Chulze S *et al.* 1994. Producción de alternariol y alternariol monometil-éter por cepas de *Alternaria alternata* aisladas de maíz en la República argentina. La Alimentación Latinoamericana 200: 19.
- Chou HH, Wu WS. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcriber spacer regions of the genus *Alternaria* and the significance of filament-beaked conidia. 106: 164-169.
- Davis ND, Diener UL. 1987. Mycotoxins. pp. 517-570 en: Beuchat LR, editor. Food and Beverage Mycology. 2ª edición. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Davis VM, Stack ME. 1994. Evaluation of alternariol and alternariol-methylether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology 60: 3901-3902.
- Ellis MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew.
- Konstantinova P *et al.* 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycological Research 106: 23-33.
- Kostecki M *et al.* 1991. Biosynthesis and preparation of five *Alternaria* metabolites. Mycotoxin Research 7: 3 - 7.
- Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored

- products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*: 11S-25S.
- Minoletti C *et al.* 2000. 3D Model of the F1 part of chloroplast ATP-synthase interacting with the phytotoxin tentoxin. resumen 198, EBEC 2000 (<http://www.ebec2000.com/abstracts/198.htm>)
 - Moss MO. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Smith JE, Henderson RS, editores. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Rton, Florida.
 - Morisseau C *et al.* Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and their relationship to medium composition and host-specific toxin production. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2388-2395.
 - Müller M, Lepom P. 1992. Nachweis von *Alternaria* mykotoxinen in laborkulturen. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 147: 197 – 206.
 - Paterson RRM, Bridge PD. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. CAB International, Wallingford. pp. 60, 89.
 - Roberts RG *et al.* 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104: 151-160.
 - Sanchis V *et al.* 1993. Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. *Journal of Food Protection* 56: 246-248.
 - Scott PM, Kanhere SR. 1980. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acids in tomato paste. *Journal of Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 612 – 621.
 - Serdani M *et al.* 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot apples in South Africa. *Mycological Research* 106: 561-569.
 - Swanson BG. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207: 49 – 61.
 - Stinson EE *et al.* 1981. Mycotoxihn production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29: 790-792.
 - Torres A *et al.* 1993. *Alternaria* metabolites in sunflower seeds. Incidence and effect of pesticides on their production. *Mycopathologia* 121: 17 – 20.
 - Torres A *et al.* 1998. Production of alternariol and alternariol mono-metil-eter by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants* 15: 56-60.
 - Trucksess MW. Mycotoxins. *Journal of AOAC International* 84: 202-211.
 - Webster J. 1986. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press. pp. 393, 555-557.
 - Yoshizawa T. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals. pp. 301-324 en: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Rton, Florida.