

BIASI, ANDRES
Calidad e inocuidad

2013 72680

72680

MFN:
Clasif: T. 832

72680



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**CALIDAD E INOCUIDAD DE GRANOS DE
AMARANTO: MICROFLORA POTENCIALMENTE
TOXICOGÉNICA**

**Tesis presentada para optar por el grado de Magíster en
Inocuidad y Calidad de Alimentos**

Lic. Andrés Biasi

Río Cuarto, Septiembre 2013.

**CALIDAD E INOCUIDAD DE GRANOS DE
AMARANTO: MICROFLORA POTENCIALMENTE
TOXICOGÉNICA**



Maestrando

Lic. Andrés Biasi



Directora

Dra. María Laura Ramirez

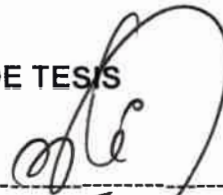


Co-directora

Dra. María Marta Reynoso

TRIBUNAL JURADO DE TESIS

Dra. Mariana Combina



Dra. Cecilia Frigerio



Dra. Susana Bettera



AGRADECIMIENTOS:

A Laura por su paciencia, su entrega, dedicación y tiempo

A María Marta, por observaciones y su apoyo

A Silvina por su colaboración en los días de laboratorio fundamentales para este trabajo

A todos los chicos de Microbiología, que estuvieron ayudándome con las muestras, los materiales y muchas cosas más.

A Cervantes porque sin su apoyo no hubiera podido realizarlo

A mi familia sólo por ser mi familia

GRACIAS!!!!!!

Índice

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. El amaranto	8
I.1.1. Origen y Generalidades	8
I.1.2. Taxonomía	8
I.1.3. Importancia económica y características de su siembra	10
I.1.4. Valor nutricional	12
I.1.5. Micobiota presente en los granos de amaranto	13
I.2. Micotoxinas	14
I.2.1. Generalidades	14
I.3. El género <i>Alternaria</i>	20
I.3.1. Generalidades	20
I.3.2. Taxonomía e identificación	21
I.3.3. Micotoxinas producidas por el género <i>Alternaria</i>	24
I.3.3.1. Generalidades	24
I.3.3.2. Incidencia en alimentos	26
I.3.3.3. Efectos tóxicos	27
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30
II.1. Hipótesis	31
II.2. Objetivos	31
III MATERIALES Y MÉTODOS	32
III.1. Determinación de la micobiota contaminante de granos de amaranto	33
III.1.1. Muestreo	33
III.1.2. Aislamiento de los diferentes géneros fúngicos	33
III.1.2.1 Medios de cultivo y soluciones	33
III.1.2.2. Método	34

III.1.3. Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> aisladas utilizando marcadores morfológicos	34
III.1.3.1. Medios de cultivo	34
III.1.3.2. Método	35
III.1.4. Análisis estadístico	36
III.1.5. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas	36
III.1.5.1. Medio de cultivo y soluciones	36
III.1.5.2. Producción y extracción de alternariol, alternariol, monometil éter y ácido tenuazónico	38
III.1.5.3. Detección y cuantificación de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia	39
IV. RESULTADOS	40
IV.1. Determinación de la microbiota contaminante de granos de amaranto	41
IV.2. Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> , utilizando marcadores morfológicos	43
IV.3. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas	48
V. DISCUSIÓN	50
V.1. Determinación de la microbiota contaminante de granos de amaranto	51
V.2. Identificación de las especies de <i>Alternaria</i> aisladas, utilizando marcadores morfológicos	52
V.3. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas	54
VI CONCLUSIONES	60
VII BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

En Argentina, el cultivo de amaranto se considera como una producción con alto potencial y de interés estratégico, ello se debe a las cualidades nutricionales y a la capacidad que tiene el cultivo de adaptarse a diversas condiciones hídricas y edáficas. Durante el presente trabajo se determinó la micobiota contaminante de granos de amaranto destinado a consumo humano, se identificó a nivel de especie los individuos pertenecientes al género *Alternaria* y se les determinó su capacidad de producir micotoxinas. En cuanto al estudio de la micobiota asociada a los granos de amaranto se observó la presencia de numerosos géneros fúngicos siendo el género *Alternaria* el predominante. Si bien los porcentajes de infección totales fueron siempre altos (>85%), independientemente de la época de siembra, se observó diferencias significativas ($P \leq 0,001$) en los porcentajes de infección con *Alternaria* sp. para esta variable. Tanto en *A. cruentus* como en *A. hypochondriacus*, el porcentaje de infección con *Alternaria* spp. disminuyó en la segunda época de siembra. Se identificaron un total de 112 aislados con características morfológicas del género *Alternaria* de las cuales 57 fueron identificadas como *A. alternata*, 48 como *A. infectoria* y 7 como *A. graminicola*. El 100% de las cepas de *Alternaria* analizadas, fueron productoras de alguna de las tres micotoxinas analizadas (alternariol: AOH, alternariol monometil éter: AME y ácido tenuazónico: ATe). El perfil toxicogénico más frecuentemente observado fue la co-ocurrencia de las 3 toxinas. La toxina producida en mayor concentración fue AOH, seguida por la producción de ATe y AME. Las máximas concentraciones de AOH y AME fueron producidas por dos cepas de *A. alternata*, mientras que la máxima concentración de ATe fue producida por una cepa de *A. infectoria*. La alta frecuencia de contaminación con especies de *Alternaria* potencialmente toxicogénicas reportada en el presente trabajo, muestra la necesidad de llevar a cabo más estudios en este sustrato sobre la contaminación natural con micotoxinas, el efecto del almacenamiento, procesamiento y los métodos de prevención, debido además a que los granos de amaranto tienen un uso directo o en la fabricación de alimentos destinados al consumo humano. Es por este motivo que debería considerarse el riesgo de la población a la exposición continua a las micotoxinas producidas por especies de *Alternaria* y se deberían establecer, en un futuro mediato, regulaciones respecto a los niveles máximos permitidos.

ABSTRACT

In Argentina, the cultivation of amaranth is considered a high production potential and strategic interest, this is due to the nutritional qualities and the ability of this crop to adapt to different soil and water conditions. The aims of the present study were:- to determine the mycobiota present in amaranth grain intended for human consumption, -to identify up-to species level strains belonging to the genus *Alternaria* and -to determine their ability to produce mycotoxins. The study of the associated mycobiota present in amaranth grains showed the presence of numerous fungal genera, being *Alternaria* the predominant one. Overall infection rates were always high (> 85%), regardless of the planting season analyzed, we observed significant differences ($P \leq 0.001$) in the percentages of infection with *Alternaria* sp. for this variable. In two out of three *Amaranthus* species analyzed, in *A. cruentus* and *A. hypochondriacus* the percentage of infection with *Alternaria* spp. declined in the second planting season assayed. We identified a total of 112 isolates with morphological characteristics of the genus *Alternaria* of which 57 were identified as *A. alternata*, 48 as *A. infectoria* and 7 as *A. graminicola*, respectively. All *Alternaria* isolates analyzed were able to produce any of the three toxins tested (alternariol: AOH, alternariol monomethyl ether: AME tenuazonic acid: ATE). The most frequently observed toxicogenic profile was the co-occurrence of the three toxins. AOH was produced in greater concentration, followed by ATe and AME, respectively. The highest concentrations of AOH and AME were produced by two strains of *A. alternata*, while the maximum concentration of ATe was produced by a strain of *A. infectoria*. The high frequency of contamination with potentially toxigenic *Alternaria* species reported in this study, showed the need for further studies on this substrate about natural contamination with mycotoxins, the effect of storage, processing and prevention methods, due mainly to the fact that amaranth grains have a direct use or in the manufacture of foods intended for human consumption. All these reasons should be considered as a risk to the population due to continuous exposure to mycotoxins produced by *Alternaria* species and should be set in a non distant future, regulations regarding the maximum permitted levels.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El amaranto

I.1.1. Origen y generalidades

El amaranto es uno de los cultivos más antiguos de América, se lo emplea desde más de 8.000 años. El hecho de que haya sobrevivido como planta útil es prueba fehaciente de su importancia y capacidad de adaptación a diferentes ambientes. En el momento de la conquista de América era el principal cultivo de América Central y ocupaba una región considerable en los Andes Sudamericanos (Perú) (Williams, 1995).

La primera civilización en explotarlo como un cultivo altamente productivo fue la Maya, de quienes los Incas y los Aztecas incorporaron su cultivo y consumo. Se estima que cuando los españoles llegaron a América la producción anual de granos de amaranto superaba las 15.000 toneladas y además formaba parte de los tributos que estos imperios cobraban a los pueblos sometidos. El consumo del amaranto estaba muy arraigado entre los Aztecas y era considerado un alimento ritual. Consecuentemente, los colonizadores prohibieron el cultivo y el uso del amaranto por ser un gran impedimento en la conquista de América. Este hecho, sumado a la sustitución de los cultivos autóctonos por los europeos, redujo de manera significativa su producción manteniéndose solo en zonas de difícil acceso (Becerra, 2002; Brenner y col., 2000).

I.1.2. Taxonomía

El amaranto es una planta perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, la cual posee 70 géneros y más de 850 especies. El género *Amaranthus* posee más de 60 especies. Las características de cada especie difieren notablemente, dependiendo por ejemplo, del ambiente en que crecen, lo que dificulta la identificación de la plantas. Las especies más valoradas son: *A. hypochondriacus*,

A. cruentus y *A. caudatus* las que se producen en panojas repletas de una pequeña semilla.

A continuación se describen algunas características de cada una:

- ✓ *A. hypochondriacus*: es originaria de la parte central de México y se cultiva para obtener el grano. Se la conoce como “la planta inmarcesible”, que no se marchita, pero dependiendo de la región, país o presentación del producto recibe diversas denominaciones: hutli, bledo, alegría.
- ✓ *A. cruentus*: procede de México y Centroamérica, donde se la cultiva para obtener de ella el grano. También se consume como vegetal.
- ✓ *A. audatus*: se cultiva en la región de Los Andes y se comercializa como planta ornato, principalmente en Europa y Norteamérica.

Además de estas especies que producen granos, existen otras que ofrecen sus hojas como verdura de alto valor nutritivo tanto por su contenido de proteína como de vitaminas y minerales (Saunders y Becker, 1984).

El amaranto es un cultivo anual, altamente eficiente y de rápido crecimiento, que puede desarrollarse entre 0 a 3.300 metros sobre el nivel del mar y prosperar en condiciones agronómicas adversas (sequía, altas y bajas temperaturas, suelos salinos, ácidos o alcalinos), adaptándose fácilmente a distintos ambientes. Esto se debe a que por ser una especie C_4 , está capacitada para hacer un uso eficiente del agua y producir grandes volúmenes de biomasa (Kauffman y Weber, 1990; Weber, 1987).

La planta es anual, alcanza hasta alrededor de 2 metros de altura, consta de un eje central con pocas ramificaciones laterales, pero en la parte superior lo hace en forma irregular en ramas cortas donde se insertan las inflorescencias. La raíz es pivotante, corta y gruesa, de hasta 15 cm de largo, con abundantes pequeñas raíces laterales. El tallo, generalmente es estriado, con aristas prominentes, hueco en la madurez (Figura 1 1A). La hoja polimórfica, puede ser aovada, aovada romboidal, aovada deltoidea, con escasa pubescencia y a veces termina en un ápice agudo, se ubican alternamente en el tallo. Las inflorescencias pueden ser espigas, panojas, llegando a medir hasta 90 cm, compactas o sueltas (Figura 1

1B). La flor posee flores unisexuadas o bien bisexuadas, son ligeramente más grandes en los extremos. El grano, es de forma lenticular y tiene un diámetro aproximado de 1-1,5 mm. El embrión es anular y circunda externamente a todo el perispermo (Figura I 1C).

Entre los aspectos más importantes de variación en el amaranto, se consideran la forma de la inflorescencia, coloración del tallo, hojas y fruto y, color de la semilla (Hunzikier, 1991).

Técnicamente es considerado un pseudocereal, debido a la similitud con los cereales verdaderos de las monocotiledóneas. Su pequeño tamaño obliga a una molienda integral para la obtención de harinas, lo que conlleva a un aporte cuantitativamente importante de minerales (Pantanelli, 2005).

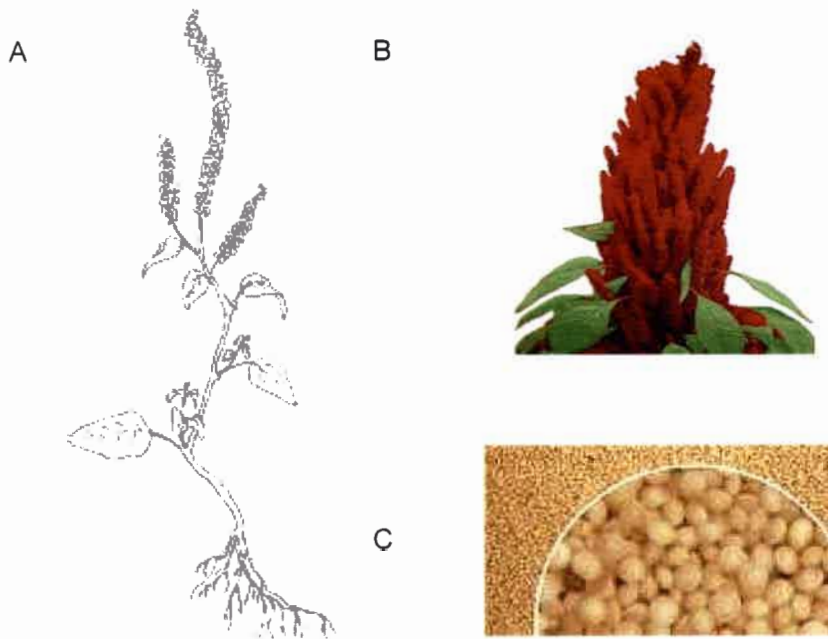


Figura I 1. A) Planta de amaranto; B) Inflorescencia en forma de panoja del amaranto; C) Granos de amaranto

I.1.3. Importancia económica y características de su siembra

En nuestra región el cultivo del amaranto se encuentra asociado al maíz, siendo la época de siembra entre noviembre y marzo. La semilla es pequeña, por lo cual debe ser enterrada sólo superficialmente. La cantidad de semillas que se

requiere para sembrar una hectárea es de 2-3 kg y el rendimiento, según las características de la zona y el uso de fertilizantes, es de aproximadamente 20-40 quintales/ha, con un precio de venta de \$ 8000 la toneladas según ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). Mientras que el maíz aproximadamente rinde 70 quintales/ha a un precio de \$ 700 la tonelada y la soja 32 quintales/ha a \$1270 la tonelada (ASERCA, 2005).

La cosecha se realiza mecánicamente, se forman las gravillas, que se exponen al medio ambiente para que terminen de secarse y luego se realiza la trilla y el venteo. Se almacena en iguales condiciones que el resto de los cereales, con mínimos requerimientos, en condiciones adecuadas de luz y humedad.

Los factores que actualmente condicionan la producción de dicho cultivo son numerosos: el primero de ellos es la producción, expresada en kg/ha. El proceso de introducción en los sistemas agrícolas es más fácil cuanto mayor es la producción por unidad de área. El segundo factor lo constituye la tecnología de postcosecha, que incluye aspectos del cultivo asociados al almacenamiento, procesamiento, propiedades funcionales, desarrollo de productos y aceptabilidad.

Éste está más asociado a la producción ya que, implícitamente, incluye al mercado, sin el cual la producción no tiene mayor significado ni para el productor ni para el consumidor. Estas características están condicionadas por los componentes químicos del grano y determinadas por la composición genética de la especie o variedad. El tercer factor es el valor nutritivo, es importante debido a que representa beneficios para el consumidor y, en el caso específico del amaranto, su valor nutritivo, como el alto aporte de calcio, lisina y proteínas totales en comparación con otros cereales sin gluten, es una característica que se usa para incentivar y fomentar su producción y utilización (Bressani, 1994). Por consiguiente, en los diversos sistemas de postcosecha que se están desarrollando con el amaranto, es necesario preservar hasta donde sea posible, la calidad nutritiva del alimento, optimizando las condiciones de procesamiento de los productos derivados de éste cereal.

En la ciudad de Río Cuarto, el amaranto se produce en el campo de la Universidad Nacional, donde se destinan dos hectáreas por año para su cultivo,

con un rinde de 12 a 20 quintales/ha, y se encuentra disponible a todo aquel que necesite utilizarlo con fines investigativos y de escasa comercialización (Peiretti, 2011).

Las especies cultivadas en la zona son: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, dentro de las principales especies, se han obtenido diferentes variedades: Candil, Dorado, Antorcha y Chingolo. Ellos son fenotipos de comprobada adaptabilidad, uniformidad y rendimiento (Peiretti, 2011).

El principal objetivo de estos agricultores es incentivar el consumo de amaranto como un alimento que forme parte de la dieta habitual de la población. Por su parte, en el mercado de la ciudad el grano disponible es difícil de encontrar debido a que proviene de otras provincias y no se justifica su almacenamiento en relación a la baja demanda.

I.1.4. Valor nutricional

Una de las particularidades más importantes del amaranto es su alto valor nutricional. El grano tiene un contenido de almidón de 50-60%, 15-17% de proteína, 5-8% de lípidos, 6,7% de fibra dietética y un aporte energético de aproximadamente 370 Kcal por cada 100 g, dependiendo de la variedad. Por su composición, la proteína del amaranto se asemeja a la de la leche y se acerca mucho a la proteína ideal propuesta por la FAO para la alimentación humana. Según la FAO/OMS/ONU (1985), sobre un valor proteico ideal 100, el amaranto posee 75, la leche vacuna 72, la soja 68, el trigo 60 y el maíz 44. Además, la digestibilidad de su grano es del 93%. Cuando se realizan mezclas de harina de amaranto con harina de maíz, la combinación resulta excelente, llegando a índices cercanos a 100, porque el aminoácido que es deficiente en uno abunda en el otro, fundamentalmente en su aporte de lisina (16% del total del aporte proteico), aminoácido esencial para el ser humano, que comúnmente es más limitante en otros cereales (maíz, arroz, trigo).

Además, el grano de amaranto no posee gluten, por lo que es un alimento apto para celíacos. Otra de sus cualidades nutricionales importantes es su alto

contenido de calcio, ya que posee entre 250 a 350 mg %, sin gran cantidad de factores inhibidores de su absorción, es decir que no sólo contiene mayor cantidad en comparación con otros cereales (20 mg% maíz, 32 mg% arroz, 41 mg% trigo) sino que también este mineral es más biodisponible (Gorinstein y col., 2002).

El componente principal de la semilla del amaranto es el almidón, el cual representa entre 50 y 60 % de su peso seco. El diámetro del gránulo de almidón oscila entre 1 y 3 μm , mientras que los de maíz son hasta 10 veces más grandes y los de papa pueden ser hasta 100 veces mayores. Esta reducida dimensión facilita su digestión, que resulta de 2,4 a 5 veces más rápida que el almidón de maíz. A su vez, este tamaño le confiere propiedades aglutinantes y espesantes inusuales, pudiéndose utilizar como espesantes de alimentos, como sustituto de las grasas, y también en la industria cosmética (Písaříková y col., 2005).

En cuanto a las características de los lípidos, del total mencionado (5-8%) aproximadamente el 8% es escualeno, un excelente aceite para la piel, lubricante y precursor del colesterol que se obtiene comúnmente de animales como la ballena y el tiburón (Písaříková y col., 2005).

Países con alta demanda de alimentos como India y China son los que han prestado más atención a este cultivo y son los principales productores de amaranto. China es actualmente el país donde más se cultiva amaranto, con unas 150.000 ha. (FAO, 2004a).

I.1.6. Micobiota presente en los granos de amaranto

El amaranto, al igual que otros cereales y oleaginosas, es susceptible de contaminación fúngica y la consecuente producción de micotoxinas durante el desarrollo a campo, cosecha, transporte y almacenamiento. Sin embargo, es importante destacar que el amaranto posee atributos no comunes en comparación con otras plantas cultivables, tales como resistencia a la sequía, al exceso de humedad, al calor y a las enfermedades, además se adapta rápidamente a nuevos ambientes (NAS, 1984).

La microbiota presente en los granos de amaranto no ha sido demasiado investigada por cuanto se trata de un cultivo no tradicional frente a otros como soja, maíz o trigo de gran importancia económica. Se ha informado que los géneros que se aíslan con mayor frecuencia en granos de amaranto son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria*, tanto a cosecha como así también durante su almacenamiento (Bresler, 1995; Noelting y col., 2004). También se ha encontrado que el amaranto no sería un buen sustrato para la producción de aflatoxinas y zerealenona (Bresler y col, 1998).

I.2. Micotoxinas

I.2.1. Generalidades

Los hongos filamentosos han evolucionado para lograr una utilización más eficiente de los sustratos sólidos, por medio del crecimiento en la superficie y la penetración en la matriz sólida. Dichos organismos son capaces de secretar enzimas que desdoblan macromoléculas complejas en compuestos menores los cuales son utilizados para el crecimiento y el metabolismo, pueden absorber nutrientes de bajo peso molecular y también secretar metabolitos secundarios (Steyn, 1998). Estos últimos son compuestos de peso molecular bajo, que no están asociados al proceso de crecimiento. En un cultivo continuo en condiciones de laboratorio, dichos compuestos son generalmente producidos en niveles altos durante la fase estacionaria del crecimiento y su formación está asociada con un proceso de diferenciación morfológica (Moss, 1996).

Los hongos tienen un papel activo en el reciclaje de la materia orgánica en la biosfera, y el crecimiento de los mismos hace que se produzcan cambios en las características organolépticas de los sustratos, debido a la acción de enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas. Este proceso causa deterioro químico sobre el sustrato, el cual puede ser: asimilativo, cuando los hongos utilizan el sustrato como fuente de nutriente, y no asimilativo, cuando los hongos producen

metabolitos como las micotoxinas, antibióticos, alcaloides, pigmentos, entre otros, los que han sido definidos como metabolitos secundarios (Magan y Aldred, 2007).

Actualmente el debate continua sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el rol que dichos metabolitos tienen en la biología de los organismos que los producen, muchos de estas sustancias tienen actividad biológica y pueden ser tóxicas para los microorganismos (antibióticos), las plantas (fitoxinas) o los animales (micotoxinas) (Fox y Howlett, 2008).

Por definición las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Peraica y col., 1999; Richard, 2007). La producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el huésped, el ambiente y la especie toxicogénica; la interacción entre estos factores puede influenciar en mayor o menor producción de las toxinas (Magan y Aldred, 2007). La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas y unas pocas son patógenas facultativas de plantas (Bennet y Klinch, 2003). Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002) (Figura 1 2).

Se han identificado aproximadamente 400 micotoxinas diferentes, pero sólo alrededor de 20, producidas por diferentes especies fúngicas, son de relevancia como contaminantes naturales en los productos agrícolas. Han sido detectadas en una amplia variedad de productos de origen vegetal (almidón, arroz, trigo, centeno, cebada, maíz, sorgo, frutas secas, etc.), en alimentos y bebidas (jugos y concentrados de frutas, cervezas y vinos) en raciones y productos de origen animal (derivados lácteos, cárnicos y huevos, etc.) (Tabla 1 1) (FAO, 2004a).

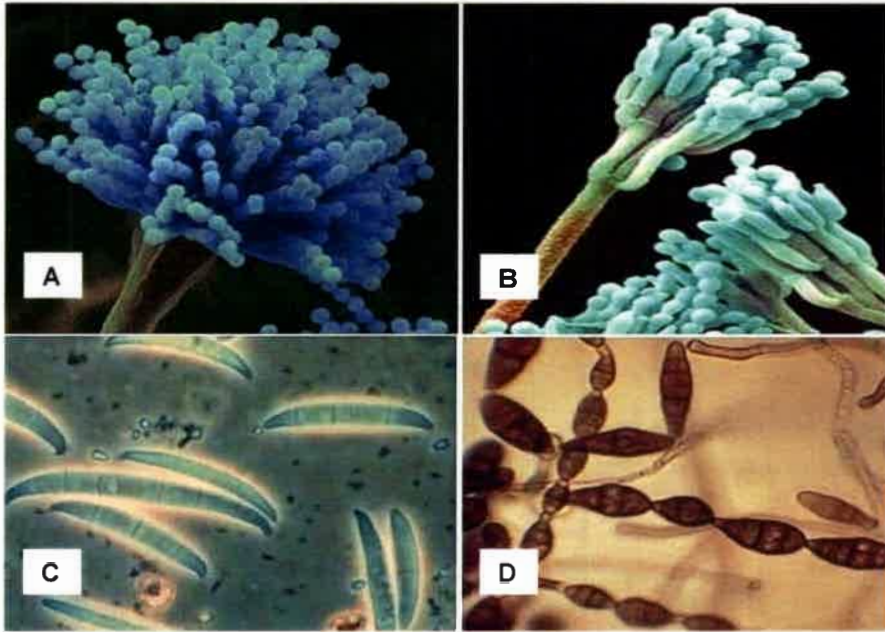


Figura 1.2. Principales géneros involucrados en la producción de micotoxinas, *Aspergillus* (A), *Penicillium* (B), *Fusarium* (C) y *Alternaria* (D). Fuente: <http://img32.imageshack.us/img32/7180/generosfungicos.png>

Es difícil clasificar a las micotoxinas dentro de una única categoría química, ya que no poseen características moleculares comunes. Son producidas por grupos taxonómicos restringidos, no son esenciales para el organismo que las produce y son sintetizadas por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos generales (del metabolismo primario). En la naturaleza hay una variación enorme en el metabolismo secundario, esta variación puede ser intergéneros, intraespecífica y aún entre cepas de la misma especie (Keller y col., 2005).

Tabla 1. Micotoxinas de relevancia para la salud humana y animal.

Género fúngico	Micotoxinas	Sustrato
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxinas	Maní, maíz, algodón, leche y derivados
	Ácido ciclopiazónico	Maní, maíz, girasol
	Esterigmatocistina	Café, trigo, quesos duros
	Ocratoxina A	Trigo, cebada, maíz, maní, vino, uva
<i>Penicillium</i>	Patulina	Manzana y derivados
	Ocratoxina A	Queso, frutas secas
	Citrinina	Trigo, cebada, maíz, arroz
	Ácido ciclopiazónico	Maní, maíz
	Ácido penicílico	Maíz almacenado, porotos secos, tabaco
<i>Fusarium</i>	Toxina T2	Trigo, maíz, alimento balanceado
	Deoxivalenol	Trigo, harina, maíz, alimento balanceado
	Nivalenol	Trigo, maíz, alimento balanceado
	Zearalenona	Maíz, alimento balanceado, trigo, amaranto
	Diacetilcirpenol	Trigo, maíz, alimento balanceado
	Fumonisinias	Maíz, polenta
<i>Alternaria</i>	Acido tenuazónico	Girasol
	Alternariol	Sorgo, cebada
	Alternariol monometiléter	Girasol
<i>Claviceps</i>	Alcaloides del Ergot	Trigo

(CAST, 2003; Geisen, 1998)

Las micotoxinas, como otros metabolitos secundarios se sintetizan cerca del final de la fase primaria de crecimiento, frecuentemente durante la fase estacionaria y no cumplen un rol en la fisiología del organismo productor. Existen numerosas hipótesis sobre la función que cumplirían las micotoxinas, entre ellas podemos citar: a) cumplirían un rol ecológico en la naturaleza; b) podrían participar en las relaciones ecológicas del microorganismo productor. Por ejemplo, la presencia de micotoxinas tremorgénicas y las aflatoxinas en los esclerocios de

Aspergillus flavus se ha interpretado ecológicamente como un medio de defensa químico contra los predadores potenciales, relacionando también la importancia de los esclerocios para la supervivencia del hongo (Betina, 1989); c) las micotoxinas podrían actuar como reguladores del metabolismo. Esta hipótesis fue planteada en base a una similitud entre las micotoxinas y los antibióticos, debido a que se ha comprobado que en los microorganismos productores de antibióticos estas sustancias regulan el metabolismo primario inhibiendo varios procesos como la síntesis de proteínas y ADN (Campbell y col., 1982); d) la biosíntesis de las micotoxinas cumpliría un rol regulador o al menos coincidente con la diferenciación, como ocurre con la esporulación asexual (Hicks y col., 1997).

Cuando las toxinas fúngicas son ingeridas o inhaladas en determinadas concentraciones por los animales o por el hombre producen un cuadro clínico-patológico conocido como micotoxicosis. Esto resulta en efectos perjudiciales para la salud, debido a que disminuyen la disponibilidad de alimentos proteicos, afectan la inmunidad humoral y celular causando una mayor predisposición a las infecciones microbianas y por la morbi-mortalidad de animales de producción (Bräse y col., 2009). Las alteraciones asociadas con micotoxicosis son: reacciones alérgicas, inmunosupresión, cuadros nerviosos y hemorrágicos, disminución de la eficiencia productiva y reproductiva, deficiencias metabólicas y bioquímicas, enfermedades autoinmunes, alteraciones genéticas, teratogénesis, carcinogénesis y hasta la muerte (CAST, 2003). Las intoxicaciones de los animales y el hombre asociadas con los alimentos han sido reconocidas o sospechadas durante siglos.

Sin embargo, la implicancia de las micotoxinas se reconoció en 1960 con el descubrimiento de las aflatoxinas (Asplin y Carnaghan, 1961; Blount, 1961). Sin embargo, establecer que una toxina específica es la causante de una micotoxicosis es una tarea bastante difícil. La identificación de los hongos contaminantes por sí sola, tiene un valor limitado en el diagnóstico de las micotoxicosis, ya que las conclusiones finales sólo pueden ser obtenidas una vez detectadas e identificadas las toxinas debido a que: la presencia de una especie toxicogénica no asegura que haya producido la toxina en el sustrato; una toxina determinada puede persistir en un producto aunque la especie toxicogénica no

esté presente; una especie toxicogénica puede ser capaz de producir más de una toxina; la producción de una micotoxina particular depende de factores biológicos, químicos y físicos; y una determinada micotoxina puede ser producida por más de un género fúngico (Bennet y Klinch, 2003).

Es importante destacar que la presencia de una especie toxicogénica en un alimento es, sin duda, un llamado de atención del peligro potencial de encontrar micotoxinas. Entre los sustratos más apropiados para la biosíntesis de micotoxinas se ubican los productos de origen vegetal (cereales y oleaginosas), ricos en proteínas y calorías, las cuales constituyen un aporte valioso para la dieta de gran parte de la población mundial. El crecimiento fúngico y la producción de las micotoxinas puede ocurrir en los granos en cualquier etapa de la cadena alimentaria: antes de la cosecha (en el campo), entre la cosecha y el secado, y durante el almacenamiento (Smith y Moss, 1985).

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que hasta un 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas cada año (Wilson y Otsuki, 2001; Stepien y col., 2007). La presencia de micotoxinas en los productos vegetales ocasiona pérdidas económicas y como resultado causan una disminución en la producción y en la calidad de los granos, y reducción en la producción animal (baja convertibilidad alimentaria). A dicho efecto se debe agregar el costo que representa el diseño de programas de monitoreo y la necesidad de establecer regulaciones que determinen los niveles máximos permitidos a fin de minimizar los riesgos para la salud humana y animal. Además, se deben considerar las pérdidas económicas indirectas, las cuales si bien son difíciles de cuantificar, son las de mayor magnitud. Los productores reciben baja rentabilidad por rechazo de sus productos en los mercados internos y externos (FAO, 2004a).

1.3. El género *Alternaria*

1.3.1. Generalidades

Alternaria es un género dictiospórico de la familia Dematiaceae, orden Hyphomycetes establecido por Nees en 1817, con la especie tipo *A. alternata* (originalmente *A. tenuis*). Las especies incluidas en el género están ampliamente distribuidas en la naturaleza, aislándose de diferentes cultivos agrícolas, del suelo, el polvo ambiental, como también de la materia orgánica en descomposición. El género incluye especies saprófitas y patógenas de plantas y son responsables del deterioro de frutas y vegetales en el campo y durante el transporte y el almacenamiento. Las especies del género *Alternaria* necesitan alta humedad relativa para desarrollar (28-34%), es por ello que la infección de los frutos o las semillas ocurre generalmente antes de la cosecha de los mismos, cuando la humedad o a_w del sustrato es aún alta. Después de la cosecha, las especies de *Alternaria* pueden permanecer sobre las frutas y las hortalizas produciendo 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, 1992). Las especies de *Alternaria* pueden, además, crecer a temperaturas bajas, y se las identifica frecuentemente como agentes de deterioro de los frutos refrigerados (Visconti y Sibila, 1994).

En general, las especies de *Alternaria* son patógenos foliares que provocan una destrucción relativamente lenta de los tejidos del huésped a través de la reducción del potencial fotosintético. Una infección conduce a la formación de lesiones necróticas, originadas por la difusión de los metabolitos del hongo, tales como las micotoxinas (Tewari, 1983; Agarwal y col., 1997).

El hongo puede sobrevivir como micelio o esporas en restos vegetales en descomposición durante un tiempo considerable, o como una infección latente en las semillas (Rotem, 1994). Si se transmite por semilla, *Alternaria* puede atacar a la plántula una vez que la semilla ha germinado. En otros casos, una vez que se producen las esporas se propagan principalmente por el viento a la superficie de

las plantas donde la infección puede ocurrir. Normalmente, los tejidos debilitados, ya sea por la acción de los insectos, el estrés por frío, la sobremaduración de los frutos, las tensiones, la senescencia, entre otros, son más susceptibles a la infección por *Alternaria* que los tejidos sanos (Thomma, 2003).

A pesar de las diferencias taxonómicas y patogénicas entre las especies de *Alternaria*, la mayoría de ellas causan un patrón de infección similar. Las esporas inactivas presentan paredes muy melanizadas que, en condiciones favorables, son capaces de producir uno o más tubos germinativos que penetran la cutícula, a través de estomas o heridas, e invaden la planta. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son los colonizados por especies de *Alternaria*, por lo que pueden ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha (Thomma, 2003).

Alternaria alternata es considerada la especie más frecuentemente aislada dentro del género y es quizás la especie más cosmopolita, se la ha aislado en todo el mundo, tanto en los climas templados como en los tropicales. Puede crecer en una variedad amplia de sustratos que incluyen plantas muertas, alimentos, suelo, cuero, textiles, etc., crece también como saprófita en la superficie de las raíces, hojas y semillas (Thomma, 2003).

1.3.2. Taxonomía e identificación

Los conidios de *Alternaria* poseen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, son de color pardo y poseen un extremo apical en pico (faeodictiosporas). Se originan por brotación apical a partir de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso, a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote, es decir, que los conidios de este género presentan un desarrollo acrópeto (Simmons, 2007).

Es común observar en los hongos plasticidad morfológica. Cuando las especies de *Alternaria* crecen en medios de cultivo ricos en nutrientes y en la oscuridad bajo condiciones ambientales no controladas, se forma un exceso de

micelio aéreo que afecta al desarrollo tridimensional del cultivo. Al realizar las preparaciones frescas se destruyen las estructuras y como resultado sólo se observan conidios (Andersen y col., 2001). El examen directo de los cultivos sobre agar papa zanahoria (APZ) permite diferenciar grupos especies según los tipos de esporulación (Simmons y Roberts, 1993; Simmons, 2007), la separación en grupos especies fue corroborado por análisis químico y molecular (Andersen y col., 2001 y 2002; Roberts y col., 2000).

Dentro del género *Alternaria*, las especies se definen principalmente por las características de los conidios. Se han descrito más de 270 especies en todo el mundo (Simmons, 2007). Sin embargo, la considerable variabilidad de los conidios en cuanto tamaño, forma y tabicación, dentro de cada especie, así como dentro de una misma colonia, la superposición de las características conidiales entre especies estrechamente relacionadas, sumado a la influencia de los factores intrínsecos y a diferentes condiciones ambientales, hace que la morfología sea un criterio poco fiable para el establecimiento de los límites de identificación entre las especies. Como resultado de esto, es posible que una única especie se haya dividido accidentalmente en varias especies diferentes (Rotem, 1994). Esto se refleja en el hecho que *A. alternata* es capaz por sí sola de atacar a más de 100 huéspedes, además de mostrar variaciones morfológicas (Groves y Skolko, 1944).

Sin embargo, la variación morfológica ha dado lugar probablemente a la descripción de algunas especies de *Alternaria* nunca antes descritas (Rotem, 1994). Debido a la similitud morfológica, aunque con diferencias en patogenicidad, las cepas de una determinada especie, principalmente de *A. alternata*, se han definido como formas especiales o "razas" (Nishimura y Kohmoto, 1983).

Debido a la diversidad de las especies de *Alternaria*, han sido propuestos varios grupos de subgéneros que incluyen especies con características conidiales similares. Por otra parte, Simmons (1992) ha organizado al género en una serie de grupos especies, cada uno de ellos caracterizados por una especie tipo que los representa. Las especies del grupo *A. alternata*, por ejemplo, incluye especies con esporas pequeñas en cadenas, como *A. alternata*, y el grupo especie *A. porri* incluye especies con esporas grandes, largas y no encadenadas, como *A. porri*.

Otros grupos especies son el grupo *A. brassicicola*, el grupo *A. cheiranthi* y el grupo *A. infectoria* (Simmons, 1995) (Figura I 3). Sin embargo, existen controversias sobre si estos caracteres morfológicos deben ser utilizados como únicos criterios para la delimitación de las especies en grupos, especialmente aquellos taxones de esporas pequeñas en cadena (Andersen y col., 2001 y 2002; Peever y col., 2004).

Andersen y col. (2001) consideraron el aspecto de los conidióforos y agruparon a las especies en tres secciones que abarcaban seis grupos especies en base a la morfología sobre APZ a 25 °C bajo alternancia de un fotoperíodo día-noche. Por otro lado, Chou y Wu (2002) dividieron a las especies en tres secciones según formaran o no cadenas de dictiosporas, y consideraron, además, el largo de las cadenas de las esporas (cortas o largas).

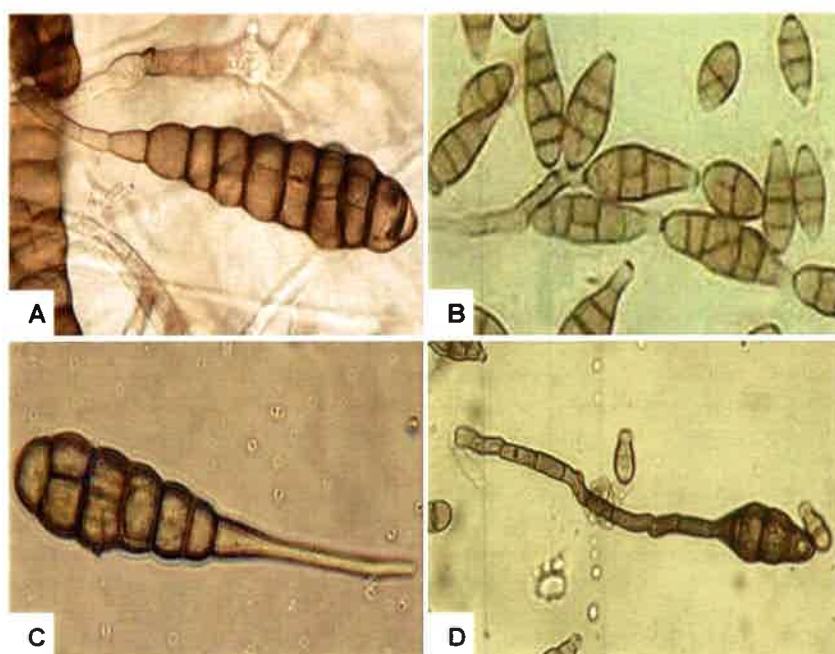


Figura I 3. Conidios típicos de especies de *Alternaria* representativas de los grupos especies: *Alternaria porri* (A); *Alternaria alternata* (B); *Alternaria solani* (C); *Alternaria infectoria* (D). Fuente: <http://img848.imageshack.us/img848/9003/alternaria.png>

Recientemente, Simmons (2007) describió un sistema taxonómico basado en una clave dicotómica que considera la observación de las características morfológicas en el cultivo. Se tienen en cuenta las siguientes características: a) desarrollo de la colonia y apariencia; b) tipo de esporulación visible a 50X; c) patrones de esporulación; d) conidióforos; e) conidios e hifas accesorias observables a mayor magnificación; y f) comparación de taxas similares. Una primera separación de las especies del género en categorías mayores fue realizada en base a la morfología del conidio y a los patrones de esporulación.

Para las especies con esporas relativamente grandes, la característica principal es la naturaleza del desarrollo apical del conidio. Para las especies con esporas relativamente pequeñas, se considera la relación conidióforo-conidio en el desarrollo del patrón de esporulación. Si bien se requiere para una correcta identificación que las condiciones de cultivo (ciclos de luz, medios de cultivo, temperatura, etc.) sean minuciosamente controlados y de algún modo estandarizados obteniéndose así resultados confiables.

Aunque el uso de los grupos especies para la identificación no se resuelve definitivamente, el concepto de grupo especie proporciona un marco importante para la prueba de hipótesis en estudios avanzados en la filogenia de *Alternaria*.

I.3.3 Micotoxinas producidas por el género *Alternaria*

I.3.3.1. Generalidades

La necesidad de establecer una definición correcta sobre la identificación de las especies de *Alternaria* se relaciona con la capacidad conocida de muchas especies para producir numerosos metabolitos secundarios, sobre todo fitotoxinas, que pueden jugar un papel importante en la patogénesis de las plantas. Por otra parte, algunas especies, en particular *A. alternata*, pueden producir micotoxinas en las plantas infectadas y/o en los productos agrícolas derivados. Cuando el secado de los granos en el campo se retrasa por la lluvia y la alta humedad, las infecciones por las especies de este género pueden ser importantes dando lugar a

la producción de metabolitos secundarios (Davis y Diener, 1987). Por lo tanto, una correcta identificación de las especies de *Alternaria* en combinación con el conocimiento acerca de los cultivos potencialmente contaminables, son una clave importante para determinar el riesgo toxicológico relacionado a la toxicidad de estas micotoxinas y la posible presencia natural de estas en los productos agrícolas (Logrieco y col., 2009).

Las especies de *Alternaria* pueden producir más de 70 metabolitos secundarios, la mayoría de ellos son sintetizados por *A. alternata*. Las micotoxinas más importantes producidas por este género fueron aisladas y caracterizadas por primera vez entre los años 1953-1986 (Ostry, 2008).

Las micotoxinas de *Alternaria* se clasifican dentro de 5 grupos químicos: a) dibenzo- α -pironas: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT); b) ácido tenuazónico (ATe) e iso- ácido tenuazónico (iso-ATe); c) perilenquinonas: altertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II y ATX-III) y estenfiltoxina III; d) toxinas de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (AAL-toxinas): AAL-TA y AAL-TB; e) estructuras misceláneas como la tentoxina (TEN), un tetrapeptido cíclico. Las estructuras químicas de algunas de las micotoxinas se muestran en la figura I 4 (EFSA, 2011).

Sin embargo sólo 7 de ellas, han sido reconocidas como posibles contaminantes naturales de alimentos y con potencial riesgo toxicológico. Estas micotoxinas son las derivadas de las benzopironas; AOH, AME y ALT; derivadas del ácido tetramico; ATe y derivadas de perilenos; ATX I, ATX II, ATX III (Ostry, 2008; Scott, 2001).

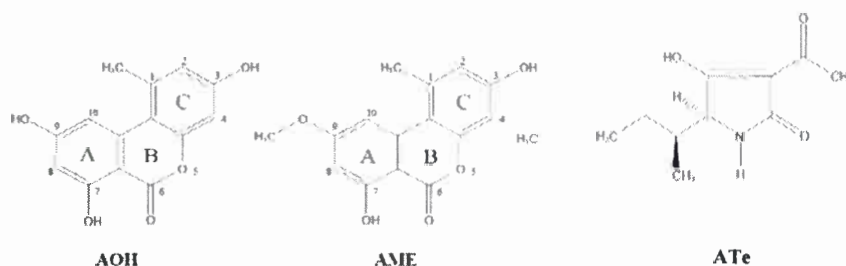


Figura I 4. Estructuras químicas de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y tenuazónico (ATe) (EFSA, 2011).

I.3.3.2. Incidencia en alimentos

Numerosos trabajos han sido publicados sobre la incidencia natural de las micotoxinas producidas por las especies del género *Alternaria* en diversos sustratos (Bottalico y Logrieco, 1998; Fernández-Cruz y col., 2010; Ostry, 2008; Scott, 2001). Los datos sobre la presencia de dichas micotoxinas en los alimentos muestran que AOH, AME y ATe son las micotoxinas de *Alternaria* más frecuentemente evaluadas en distintos países (Logrieco y col., 2009). La incidencia natural se ha observado frecuentemente en manzanas, mandarinas, aceitunas, pimientos, tomates, semillas de girasol, sorgo, trigo (Scott, 2001; Ostry, 2008) y aceites comestibles (de oliva, colza, sésamo, girasol) (Kocher, 2007).

Cuando la infección con *Alternaria* es visible en los productos afectados, la exposición humana a estas micotoxinas, por el consumo directo de los productos frescos, no parece ser relevante debido a que la parte contaminada puede ser fácilmente eliminada, o bien el producto en si es rechazado por el consumidor (Logrieco y col., 2009). Los niveles máximos de dichas micotoxinas se han observado en muestras visiblemente infectadas por *Alternaria*, es decir, en productos no aptos para el consumo (Ostry, 2008).

Por otro lado, los productos procedentes del campo podrían ser una fuente importante de contaminación con micotoxinas de *Alternaria*, debido al procesamiento que sufren a lo largo de toda la cadena alimentaria. De esta manera, el consumo de estos productos podría contribuir significativamente a un aumento en la ingestión de micotoxinas de *Alternaria* en la dieta de quienes los consumen (Logrieco y col., 2009).

Datos actuales sobre la presencia natural de estas micotoxinas muestran una baja exposición en la dieta humana. Sin embargo, es necesario obtener mayor información sobre la ocurrencia y la caracterización de los posibles peligros para el consumidor, a fin de evaluar la necesidad de establecer regulaciones legales.

Una visión general de la incidencia natural de AOH, AME, ALT y ATe, en diferentes productos se muestra en la tabla I 2.

Tabla I 2. Incidencia natural de micotoxinas producidas por especies de *Alternaria* en alimentos.

País	Alimento	Año	Micotoxina	Referencia
República Checa	Trigo	2003-2005	AOH y ALT	Ostry, 2008
Argentina	Trigo	2004-2005	AOH, AME y ATe	Azcarate y col., 2008
	Soja	2009-2012	AOH y AME	Oviedo y col., 2012
Argentina	Puré de tomate	2006	AOH, AME y ATe	Terminiello y col., 2006
Suecia	Cebada y trigo	2006	AOH, AME y ATe	Häggbloom y col., 2007
Canadá	Vino tinto	2006	AOH y AME	Scott y col., 2006
Canadá	Vino de zonas frías	2007	ATe	Abramson y col., 2007

I.3.3.3. Efectos tóxicos

Diversas especies de *Alternaria* son conocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios, y algunas de ellas como potentes productoras de micotoxinas. Los efectos tóxicos de las toxinas producidas por estas especies aún no han recibido la misma atención que otras micotoxinas producidas por especies fúngicas pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Sin embargo, las micotoxinas de *Alternaria* no deben ser subestimadas, ya que son producidas por varias especies de este género asociadas frecuentemente con una amplia gama de enfermedades en plantas de alto valor agroalimentario. Por lo tanto, se pueden producir micotoxinas de *Alternaria* en muchos productos alimenticios en los que a menudo pueden co-ocurrir con otras micotoxinas producidas por especies fúngicas pertenecientes a otros géneros (Logrieco y col., 2009).

La exposición a las toxinas de *Alternaria* ha sido vinculada a una gran variedad de efectos adversos para la salud humana y animal, como el desarrollo de cáncer en mamíferos (Thomma, 2003).

Se sabe que AOH y AME, no son agudamente tóxicas, pero son mutagénicas y existen evidencias de propiedades carcinogénicas y tumorigénicas, *in vitro* e *in vivo* (Brugger y col., 2006; Lehmann y col., 2006; Ostry, 2008; Logrieco y col., 2009; EFSA, 2011). Además, ambas toxinas son genotóxicas, aunque varios estudios han demostrado que AOH es más genotóxica que AME en células del carcinoma del colon en humanos (Ostry, 2008). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que AOH y AME inhiben la topoisomerasa II α , incrementando significativamente la tasa de ruptura de las hebras de ADN en células de carcinomas del colon en humanos (Marko, 2007; Fehr y col., 2009), e inhiben la secreción de progesterona, *in vitro*, en las células del ovario y, posiblemente podrían tener también efectos negativos *in vivo* en cerdos (Tiemann y col., 2009). Fehr y col., (2007) reportaron, *in vitro*, la citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad de AOH.

Esta toxina mostró capacidad para reducir la viabilidad de las células endometriales porcinas al afectar la expresión genética a nivel de la traducción (Wollenhaupt y col., 2008). Por otra parte, Lehmann y col., (2006) demostraron que AOH podría inhibir la proliferación de células de adenocarcinoma del endometrio humano (Ishikawa) y líneas celulares de hámster (V79) al interferir con la vida celular. Simultáneamente demostraron la acción estrogénica de esta micotoxina hacia ambas líneas celulares al aumentar el nivel de fosfatasa alcalina ARNm y la actividad enzimática de esta enzima en la línea celular de Ishikawa.

Por último, AOH y AME mostraron tener propiedades cancerígenas en células de la mucosa esofageal de ratones (Yekeler y col., 2001).

El ATe puede actuar como micotoxina y fitotoxina, y existen reportes que es más tóxica que AOH y AME en varias especies de animales, como ratones, gallinas y perros (Woody y Chu, 1992; Visconti y Sibilia, 1994; Bottalico y Logrieco, 1998; Logrieco y col., 2003). En particular, el aumento de ATe en la alimentación de pollos de niveles subletales a letales, puede reducir

progresivamente la eficiencia alimenticia, la ganancia de peso y el aumento de hemorragias internas (Griffin y Chu, 1983; Schrader y col., 2001). Por otra parte, esta micotoxina ha sido asociada con trastornos hematológicos humanos como la enfermedad de Onyalai, una forma de trombocitopenia, que sólo parece ocurrir en el centro sur de África (Bottalico y Logrieco, 1998). Finalmente, el ATe ha demostrado actividad celular hacia tres líneas celulares de mamíferos, con capacidad de inhibir la biosíntesis de proteínas, ya que reduce el índice de contenido de proteína total en las tres líneas de células (Zhou y Qiang, 2008).

El último grupo de las principales toxinas de *Alternaria*, los derivados perileno, representada por las ALTX I, II y III, presentan una actividad biológica relacionada con su capacidad mutagénica superior al de AOH en ratones (Ostry, 2008). Entre ellas, ALTX-I produce toxicidad aguda en ratones y es altamente mutagénica en líneas celulares de mamíferos (Schrader y col., 2006), mientras que ALTX-I y ALTX- III están relacionadas con un posible papel en la transformación celular (Ostry, 2008).

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

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

La contaminación con especies fúngicas micotoxicogénicas en granos de amaranto cosechados en Argentina afectan la inocuidad y calidad de los mismos por la posible presencia de micotoxinas.

II.2. Objetivos

1. Determinar la microbiota contaminante de granos de amaranto.
2. Evaluar la incidencia e identificar las especies de *Alternaria* presentes.
3. Determinar el perfil toxicogénico de las especies de *Alternaria* aisladas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Determinación de la microbiota contaminante de granos de amaranto

III.1.1. Muestreo

El estudio se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, durante la campaña 2008/2009 y se evaluaron dos épocas de siembras. Se utilizó un diseño en bloques (4 x 36 m) al azar con tres repeticiones (parcelas de 2,25 x 4 m). Las parcelas fueron sembradas el 8 de noviembre de 2008 (1^{ra} época) y el 24 de enero de 2009 (2^{da} época). Se evaluaron 3 genotipos: *A. cruentus* cv Candil, *A. hypochondriacus* cv Dorado y la variedad "PI 538326" que corresponde a la introducción de la red de Bancos de Germoplasma de EEUU y pertenece a la especie *A. hybridus*. El ensayo de 1ra época fue cosechado en marzo y el de 2da época en mayo de 2009.

Una vez cosechadas, 100 g de semillas de cada tratamiento fueron enviadas al laboratorio en bolsas de papel, donde se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

III.1.2. Aislamiento de los diferentes géneros fúngicos

III.1.2.1 Medios de cultivo y soluciones

✚ **Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC):** glucosa 10 g; peptona 5 g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄ (7 H₂O) 0,5 g; cloranfenicol 0,001 g; dicloran 0,002 g; rosa de bengala 0,0025 g; agar 15 g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

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

- ✚ **Solución stock de rosa de bengala:** se mezclaron 25 mg de rosa de bengala con 30 ml de etanol al 95% y se llevó a 100 ml con agua destilada.
- ✚ **Solución stock de dicloran:** 200 mg de dicloran se diluyeron en 100 ml con etanol.
- ✚ **Solución stock de cloranfenicol:** se disolvieron 250 mg de cloranfenicol en 100 ml de etanol 95%.

III.1.2.2. Método

El aislamiento de los distintos géneros fúngicos presentes en granos de amaranto se realizó por el método de siembra directa. Se tomaron 100 granos de amaranto y se los colocó en el medio de cultivo DRBC a razón de 20 semillas por placa de Petri. Las placas se incubaron a 25 °C por 7 días en oscuridad.

Luego del período de incubación se observaron macroscópicamente las colonias desarrolladas y se determinó el porcentaje de infección total y el porcentaje de los diferentes géneros fúngicos presentes. Todas las colonias con características del género *Alternaria* fueron transferidas al medio ANS y cuando se observó un buen crecimiento de los cultivos se almacenaron a 4 °C hasta su posterior identificación a nivel de especie.

III.1.3. Identificación de las especies de *Alternaria* aisladas, utilizando marcadores morfológicos

III.1.3.1. Medios de cultivo

- ✚ **Agar agua (AA):** agar 15 g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.
- ✚ **Agar papa zanahoria (APZ):** papa 20 g; zanahoria 20 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. Las papas y las zanahorias con cáscara se lavaron, se cortaron en trozos, y se hidrataron con 500 ml de agua, se hirvieron en autoclave a vapor

fluente durante 45 minutos. Se filtró el caldo con las papas y las zanahorias a través de una gasa y se adicionó el agar. La pulpa de la papa y la zanahoria se homogeneizó para obtener un puré y posteriormente se adicionó al caldo y el agar, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 ml). Se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

✚ **Medio de cultivo V8 (V8):** jugo V8 (comercial) 175 ml; CaCO₃ 3 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

III.1.3.2. Método

Se identificaron un total de 112 cepas con características morfológicas del género *Alternaria* a partir de los cultivos en ANS de las especies fúngicas aisladas de los granos de amaranto. Se realizó un aislamiento monospórico de cada cultivo, para lo cual se tomó una pequeña cantidad superficial de micelio y se preparó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Se vertieron los 10 ml de la suspensión sobre una placa de Petri con medio AA y se diseminó la suspensión por rotación para que las esporas se fijaran al agar, descartándose el resto de agua. Las placas de Petri se incubaron inclinadas (aprox. 45 °) durante 16 h a 25 °C. A partir de dichas placas se aislaron esporas (usando una lupa estereoscópica) y se realizaron siembras monospóricas en el medio ANS. Los cultivos se incubaron a 25°C bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (8/16 h) por 7 días. Finalizado el período de incubación los cultivos se transfirieron a los medios de cultivo recomendados para la identificación de las especies de *Alternaria*: APZ y V8 (Simmons, 2007). Los cultivos se incubaron bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (8/16 h) a 22 °C para inducir la formación de los patrones de esporulación característicos. La identificación se realizó según la metodología propuesta por Simmons (2007) en base a las características que se detallan en la tabla III 1.

Una vez identificadas a nivel de especie las cepas fueron conservadas en una solución de glicerol al 15% a -80°C.

Tabla III 1. Características evaluadas para la identificación.

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

III.1.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del porcentaje de infección con especies de *Alternaria* fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (especies de amaranto, época de siembra) y sus interacciones sobre este parámetro. Se utilizó el programa SigmaStat para Windows Versión 2.03 (SPSS Inc.). El nivel de significancia usado fue de $P < 0,001$.

III.1.5. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas

III.1.5.1. Medio de cultivo y soluciones

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

✚ **Preparación de la solución madre de ATe:** se disolvieron 2 mg de tenuazonato de cobre en 500 μ l de cloruro de metileno y se pasó la solución a través de una columna empaquetada con Dowex 50 w (intercambio iónico) de 1,5 cm de altura. El acondicionamiento de la resina se realizó por lavado de la columna con 4 ml de cloruro de metileno, se agregó sobre la columna el tenuazonato de cobre diluido y se eluyó con 8 ml de cloruro de metileno. El solvente se evaporó a sequedad y el ácido tenuazónico se resuspendió en metanol. Para calcular la concentración de ATe se utilizó el factor de conversión de 0,72. La concentración de la solución testigo se calculó usando $\Sigma 277 = 12,980$.

✚ **Solución de trabajo de ATe:** se partió de una solución madre con una concentración de 3,42 mg/ml en metanol. A partir de la misma, se tomaron 292,40 μ l y se resuspendieron en 1000 μ l de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/ml. A partir de esta solución se tomaron 5, 10, 20 y 30 μ l, se secaron con N_2 y se resuspendieron en 1000 μ l de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 μ g/ml.

✚ **Solución de trabajo de AME:** se partió de una solución madre con una concentración de 0,5 mg/ml en metanol. A partir de la misma, se tomaron 2 ml y se resuspendieron en 1000 μ l de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/ml. A partir de esta solución se tomaron 10, 20, 40 y 60 μ l, se secaron bajo flujo de N_2 y se resuspendieron en 1000 μ l de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 μ g/ml.

✚ **Solución de trabajo de AOH:** se partió de una solución madre con una concentración de 1 mg/ml en metanol. A partir de la misma, se tomó 1 ml y se resuspendió en 1000 μ l de metanol, obteniéndose de esta manera una concentración de toxina de 1 mg/ml. A partir de esta solución se tomaron 10, 20, 40 y 60 μ l, se secaron bajo flujo de N_2 y se resuspendieron en 1000 μ l de metanol. Se obtuvieron así concentraciones de 0,5- 1,0- 2,0 y 3,0 μ g/ml.

III.1.5.2. Producción y extracción de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico

Se evaluó el perfil toxicogénico de un total de 112 cepas de *Alternaria* clasificadas en base a las características morfológicas. Las cepas se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio AMLM y se incubaron por 14 días a 25 °C en oscuridad (Chulze y col., 1994).

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

Las toxinas se extrajeron a partir de los discos con 1,5 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) por 60 min. en un baño ultrasónico. El extracto se transfirió a un vial limpio de 1,5 ml y se evaporó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Una segunda extracción de las toxinas se realizó sobre los mismos discos ultrasónicamente por 60 min. con 1,3 ml de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico. El segundo extracto se transfirió al vial que contenía el primer extracto seco y se evaporó. Una tercera extracción de las toxinas se realizó ultrasónicamente por 60 min. con 1,5 ml de 2-propanol, el extracto fue transferido al vial que contenía los dos extractos anteriores y se evaporó a sequedad. La mezcla de los 3 extractos secos se redisolvió por ultrasonido en 1000 µl de metanol y 1000 µl de una mezcla acetonitrilo: buffer KH_2PO_4 0,027M.

III.1.5.3. Detección y cuantificación de alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia

El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector UV Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev A.06.01). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, SymmetryShield), conectada a una precolumna SecurityGuard™ (4 x 3,0 mm) con el mismo empaquetamiento de la columna.

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

Para ATe, la fase móvil consistió en dos mezclas isocráticas consecutivas de acetonitrilo: buffer KH₂PO₄ 0,027M de 25:75 v/v (solución C) y acetonitrilo: buffer KH₂PO₄ 0,027M de 50:50 v/v (solución D). La solución C a un flujo de 1,0 ml/min por 3,5 min. seguido de la solución D a un flujo de 1,0 ml/min por 16,5 min. La detección se realizó a 279 nm y el tiempo de retención promedio fue de 6,3 min. El volumen de inyección en todos los casos fue de 50 µl, trabajando en condiciones de "loop" lleno.

Se construyeron curvas de calibración con diferentes concentraciones de AOH, AME y ATe. Las toxinas fueron cuantificadas por correlación de la altura de los picos cromatográficos de los extractos de las muestras y de las curvas estándares. (Ver sección III 1.5.1).

IV. RESULTADOS

IV.1. Determinación de la micobiota contaminante de granos de amaranto

En el estudio de la micobiota asociada a granos de amaranto destinado a consumo humano se pudo observar la presencia de numerosos géneros fúngicos. Todas las muestras analizadas mostraron altos porcentajes (> 85%) de contaminación con hongos filamentosos (Figura IV 1). Cuando se discriminaron los géneros presentes, se pudo observar que *Alternaria* fue el género predominante, si bien este género se encontró en todas las muestras analizadas, los porcentajes de infección variaron entre un 40 y 83%. Otros géneros aislados fueron *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicilium* los cuales se encontraron en porcentajes < 10%, < 50% y < 20% respectivamente, en algunas de las muestras analizadas. El género *Fusarium* solo se encontró en una de las muestras de *A. hybridus* correspondiente a la 1^{ra} época de siembra (Figura IV 2).

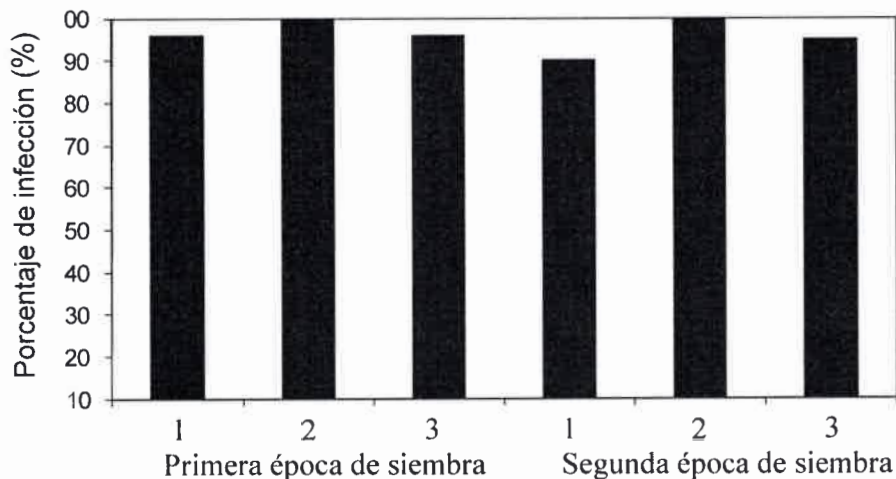


Figura IV 1: Porcentajes totales de infección con hongos filamentosos (cada barra representa el promedio de las 3 replicas). 1) *Amaranthus cruentus*, 2) *Amaranthus hypochondriacus*, 3) *Amaranthus hybridus*

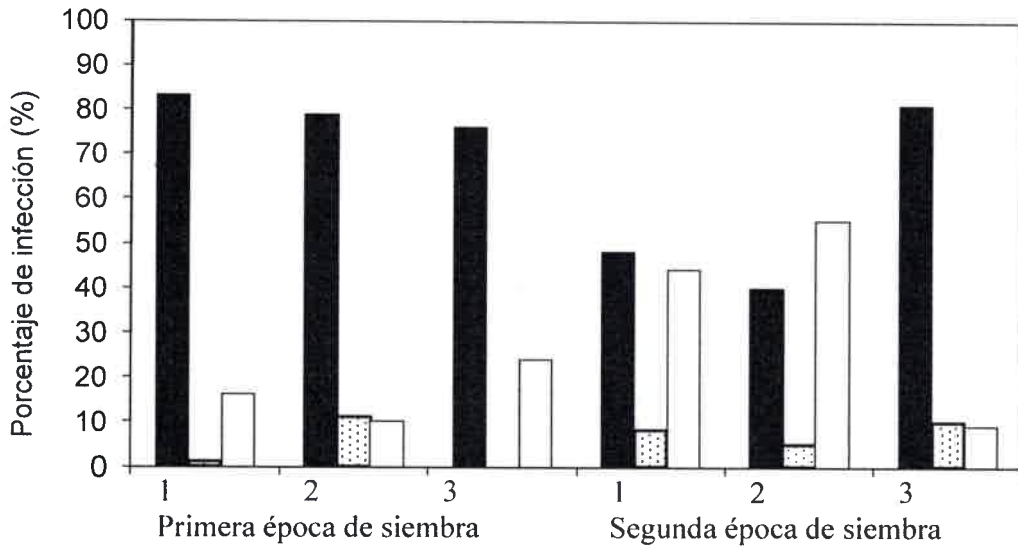


Figura IV 2: Porcentaje medio de infección con los géneros *Alternaria* ■ , *Aspergillus* ▤ y otros □ (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*), (cada barra representa el promedio de las 3 réplicas). 1) *Amaranthus cruentus*, 2) *Amaranthus hypochondriacus*, 3) *Amaranthus hybridus*

Con respecto a la variable época de siembra, se pudo observar una diferencia significativa ($P < 0,001$) (Tabla IV 1) entre ambas épocas con respecto a la contaminación con el género *Alternaria* en las tres especies de amaranto evaluadas. Tanto en *A. cruentus*, como en *A. hypochondriacus* se observó una disminución en el porcentaje de infección con *Alternaria*, mientras que en *A. hybridus* se observó un incremento en el porcentaje de infección con *Alternaria*.

Tabla IV 1. Análisis de la varianza del efecto de la especie de *Amaranthus* usada (A), época de siembra (ES) y sus interacciones sobre el porcentaje de infección con el género *Alternaria*.

Fuentes de variación	df ¹	MS ²	F ³
A	2	713,4	4,329
ES	1	3200,0	19,420*
A x ES	2	729,2	4,425

¹ Grados de libertad

² Cuadrado medio

³ F-Snedecor

* $P < 0,001$

IV.2. Identificación de las especies de *Alternaria*, utilizando marcadores morfológicos

Se identificaron un total de 112 aislados con características morfológicas del género *Alternaria*, aisladas de granos de amaranto. Los aislados fueron identificados por examen microscópico (50 X) a partir de los caracteres morfológicos cuando estas desarrollaron en los medios de cultivo APZ y V8. Del total de los aislados evaluados, 57 fueron identificados como *A. alternata*, 48 como *A. infectoria* y 7 como *A. graminícola*.

Los aislados de *A. alternata* desarrollados en el medio de cultivo APZ, incubados durante 7 días, mostraron una colonia de aproximadamente 4 cm de diámetro con 4 pares de anillos concéntricos de esporulación. La esporulación en la superficie de las zonas expuestas a la luz fue densa y presentó múltiples cadenas ramificadas de conidios. La esporulación sobre la superficie del medio de cultivo fue abundante pero no densa, presentando cadenas simples y ramificadas de 4-6 conidios en conidióforos cortos, mientras que en el medio V-8 la esporulación fue densa. Los patrones de esporulación característicos de *A. alternata* en los medios de cultivo APZ y V8 se observan en la figura IV 3.

Los aislados de *A. infectoria* desarrollados en los medios de cultivo APZ y V8, incubados durante 7 días, mostraron una colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro con 3-4 pares de anillos concéntricos de esporulación. En el medio de cultivo APZ la colonia mostró una serie de círculos concéntricos oscuros muy delimitados, de esporulación densa alternados con zonas de menor densidad de esporulación. El micelio fue algodonoso y de aspecto ligeramente aracnoideo. Las colonias en el medio V-8 desarrollaron un patrón similar de esporulación, pero como la producción de los conidios fue más densa la colonia mostró apariencia opaca. Los patrones de esporulación característicos de *A. infectoria* en el medio de cultivo APZ se observan en la figura IV 4.

Los aislados de *A. graminícola* desarrollados en los medios de cultivo APZ y V8, incubados durante 7 días, mostraron una colonia de aproximadamente 4-5 cm de diámetro con 3 pares de anillos concéntricos de esporulación. Las zonas expuestas a la luz en la colonia de APZ se componían de abundantes grupos pequeños de cadenas ramificadas de conidios. Las zonas no expuestas a la luz estaban compuestas de hifas hialinas simples. La capa superficial de grupos de conidios se observó como una colonia de puntos negros individuales. Las colonias en el medio V-8 desarrollaron un patrón similar de esporulación y crecimiento que en el medio APZ, salvo que la esporulación en V-8 fue más densa, y la colonia se volvió opaca. Las características de cultivo y los patrones de esporulación (pero no los conidios) de esta especie fueron similares a los de *A. infectoria*. Los patrones de esporulación característicos de *A. graminícola* en el medio de cultivo APZ se observan en la figura IV 5.

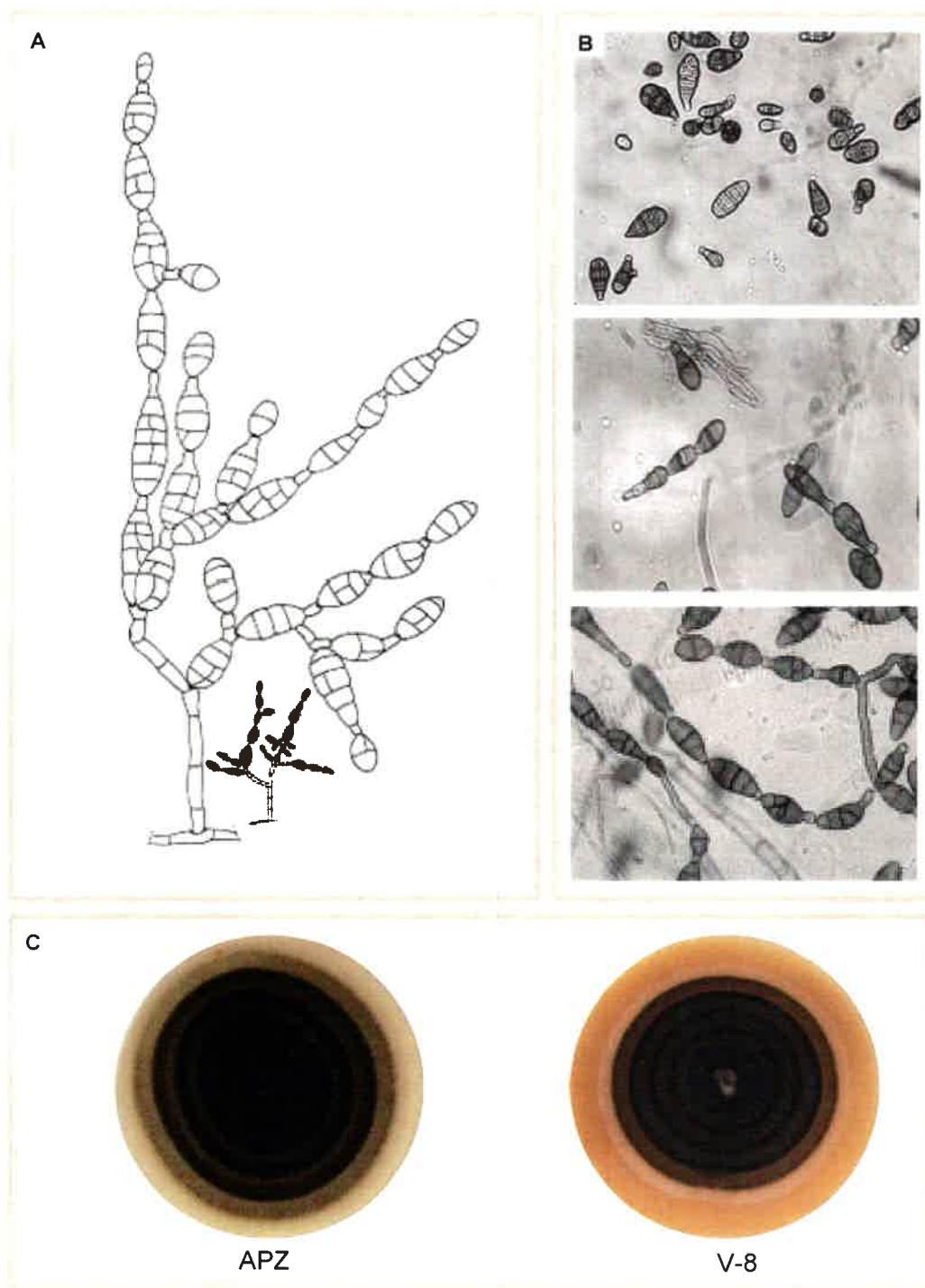


Figura IV 3. Conidios, conidióforos y patrones de esporulación de *Alternaria alternata*, en los medio de cultivo APZ (A) y microscopia 50X (B). Colonia en los medio de cultivo APZ y V-8 incubada durante 7 días a 22 °C (C).

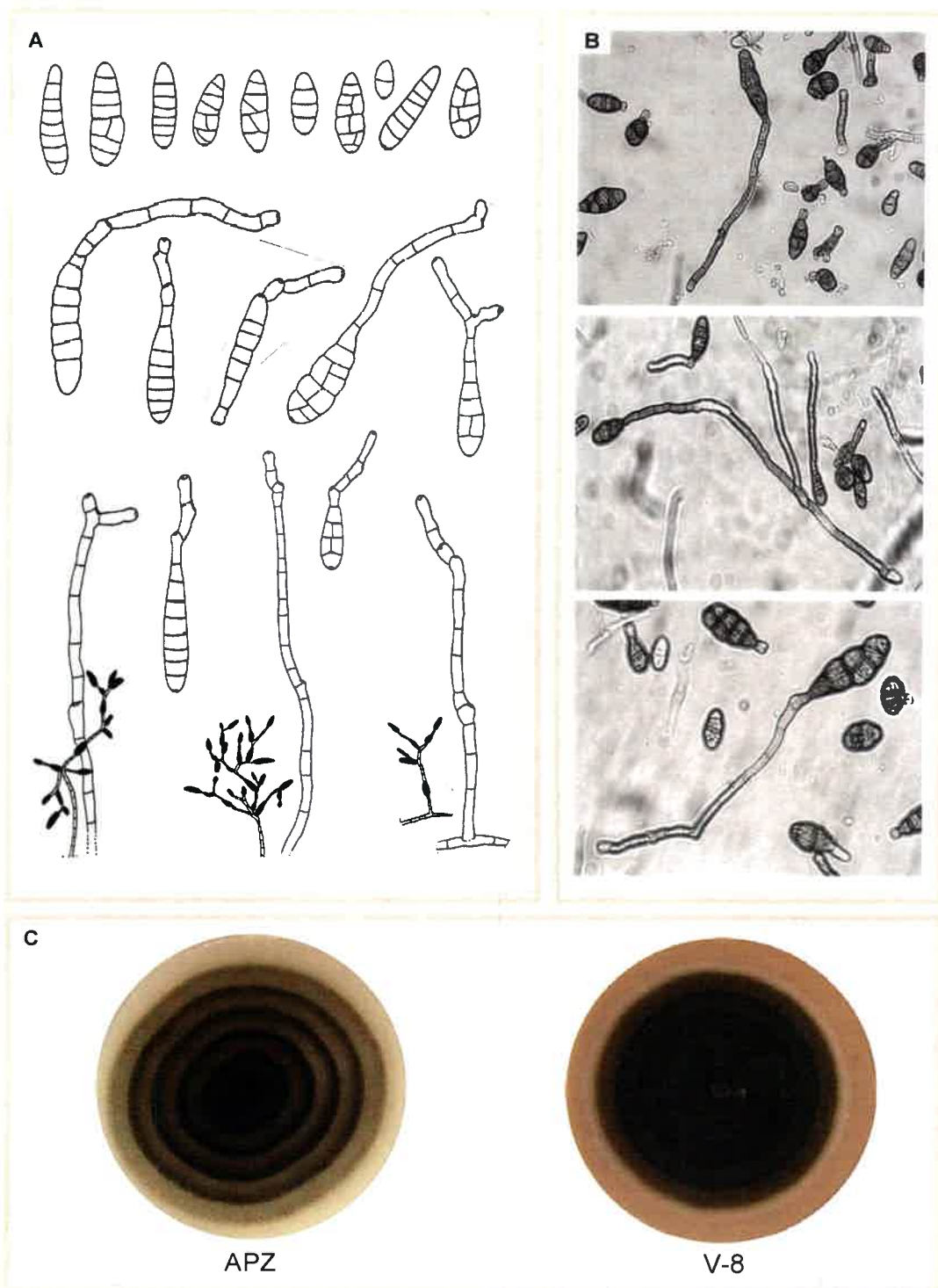


Figura IV 4. Conidios, conidióforos y patrones de esporulación de *Alternaria infectoria*, en el medio de cultivo APZ (A) y microscopia 50X (B). Colonia en los medio de cultivo APZ y V-8 incubada durante 7 días a 22 °C (C).

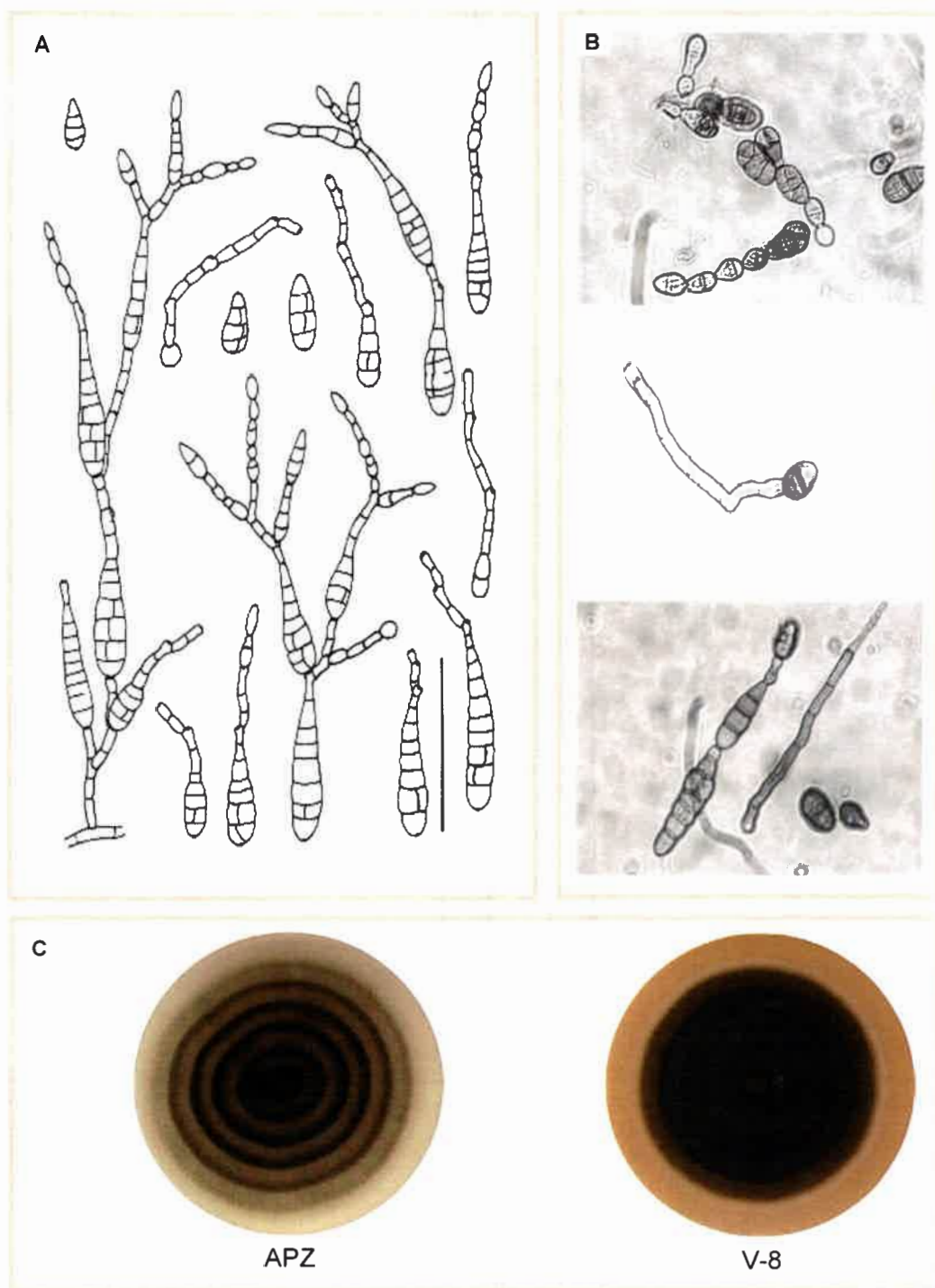


Figura IV 5. Conidios, conidióforos y patrones de esporulación de *Alternaria graminicola*, en el medio de cultivo APZ (A) y microscopia 50X (B). Colonia en los medio de cultivo APZ y V-8 incubada durante 7 días a 22 °C (C).

IV.3. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas

Las micotoxinas producidas por las cepas de *Alternaria* aisladas a partir de granos de amaranto se muestran en la tabla IV 2.

El 100% de los aislados de *Alternaria* analizados (n= 112), fueron productores de alguna de las tres micotoxinas analizadas (AOH, AME y ATe). El perfil toxicogénico más frecuentemente observado fue la coocurrencia de las 3 toxinas (Tabla 2). Alternariol fue la toxina producida en mayor concentración, seguida por ATe y AME.

Alternaria alternata produjo las concentraciones medias más altas de las 3 micotoxinas en estudio, produciendo los niveles máximos de AOH y AME (3890 y 2200 µg/g respectivamente) del total de los aislados. Asimismo, *A. alternata* produjo niveles máximos de ATe comparables a los de *A. infectoria*, aunque la producción media de *A. alternata* fue mayor. Con respecto a la coproducción de micotoxinas, 55 aislados resultaron positivos para el perfil toxicogénico AOH-AME- ATe y 2 para AOH-AME (Tabla IV 3).

Alternaria infectoria produjo los niveles máximos de ATe (3200 µg/g), y niveles medios de AOH (398 µg/g) y ATe (400 µg/g) importantes. La distribución del perfil toxicogénico fue: 44 aislados fueron productores de AOH- AME- ATe y 1 de AOH-AME (Tabla IV 2).

Otros aislados identificados como *A. graminícola*, aunque fueron aisladas en baja frecuencia y pertenecientes al grupo especie *A. infectoria* también produjeron niveles importantes de toxinas. Todos los aislados *A. graminícola* produjeron las 3 micotoxinas analizadas.

Alternaria graminicola produjo niveles máximos de AOH inferiores a los niveles máximos producidos por *A. infectoria*. La producción de AME por esta especie fue menor a la producida por *A. infectoria*.

Tabla IV 2: Micotoxinas producidas por especies de *Alternaria* en el medio de cultivo AALM.

Especies	N° de cepas positivas/ N° total de cepas por especie	Producción de micotoxinas			
		Micotoxinas	N° de cepas positivas	\bar{X}^1	Rango ($\mu\text{g/g}$)
<i>A. alternata</i>	57/ 57	AOH	55	520	0,4- 3890
		AME	57	223	0,8- 2200
		ATe	55	821	3- 2846
<i>A. infectoria</i>	48/48	AOH	48	402	0,5- 2500
		AME	48	117	0,6- 762
		ATe	47	400	3- 3200
<i>A. graminicola</i>	7/7	AOH	7	346	27- 855
		AME	7	64	3- 159
		ATe	7	270	87- 494

¹ Concentración media de micotoxina obtenida por cepas productoras

Tabla IV 3: Frecuencia de perfiles toxicogénicos de especies de *Alternaria* aisladas de granos de amaranto

Especie	N° de cepas positivas/ N° total de cepas por especie	Perfil toxicogénico	Frecuencia
<i>A. alternata</i>	55/ 57	AOH- AME- ATe	96 %
	2/ 57	AOH- AME	4 %
<i>A. infectoria</i>	47/ 48	AOH- AME- ATe	98 %
	1/ 48	AOH- AME	2 %
<i>A. graminicola</i>	7/ 7	AOH- AME- ATe	100%

V. DISCUSIÓN

V.1. Determinación de la micobiota contaminante de granos de amaranto

Existe poca información a nivel mundial sobre los hongos asociados al cultivo y semillas de amaranto. Durante el presente estudio se pudo demostrar que la micobiota predominante asociada a granos de amaranto está compuesta principalmente por 2 géneros: *Alternaria* y *Aspergillus*. Si bien los porcentajes de infección totales fueron siempre altos (>85%), independientemente de la época de siembra, se observaron diferencias en los porcentajes de infección con *Alternaria* sp. para esta variable. Tanto en *A. cruentus* como en *A. hypochondriacus*, el porcentaje de infección con *Alternaria* spp. disminuyó en la segunda época de siembra.

En estudios previos realizados en Argentina han demostrado la presencia de numerosos géneros fúngicos en diferentes especies de amaranto. Bresler y col. (1995) estudiaron la micobiota potencialmente productora de micotoxinas presentes en 10 muestras de dos especies de amaranto (*A. mantegazzianus* y *A. cruentus*) y observaron que los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* fueron los predominantes. Por otro lado, Noelthing y col. (2004) analizaron la micobiota de dos especies de amaranto (*A. hypochondriacus* y *A. cruentus*) y observaron un total de 14 géneros fúngicos, destacándose *Alternaria* por su mayor frecuencia de aislamiento.

La presencia de *Alternaria* como el género fúngico aislado con mayor frecuencia en nuestro país coincide con lo reportado tanto en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* en otros países como Canadá, Sudáfrica y México (Weaver y Mc Williams, 1980; Bartolini y Hampton 1989, Moreno Velázquez y col., 2005). Cabe señalar, que dicho género está asociado a enfermedades pre-emergencia y post-emergencia temprana como el "damping off" y enfermedades post-emergentes como el tizón foliar. Algunas especies de *Alternaria* han sido asociadas con pudriciones de semillas, reducción en la emergencia de las plántulas en campo y por consecuencia la reducción del rendimiento del cultivo (Agawal y Sinclair, 1987; Neegard 1979; Bernal-Muñoz y col., 2000).

Es notable destacar la baja prevalencia, en el presente estudio, del género *Fusarium* el cual solo fue aislado a partir de una muestra de *A. hybridus* en el presente estudio, considerando que en estudios previos realizados en nuestro país por Bresler y col. (1991) se ha detectado contaminación con zearalenona.

Otra consecuencia de la contaminación con hongos de granos de amaranto es la posible contaminación de las mismas con micotoxinas debido a las implicancias para la salud, considerando que este producto es destinado exclusivamente para consumo humano directo.

La contaminación de los granos de amaranto con especies de *Alternaria*, permite predecir la posibilidad de aparición de micotoxinas en dicho sustrato. La sola presencia de estas especies no implica la contaminación natural con micotoxinas, pero sí un potencial riesgo de contaminación en condiciones favorables de producción de micotoxinas y del potencial genético de las cepas. Es por ello, que decidimos identificar a nivel de especie, los individuos pertenecientes al género *Alternaria* como así también determinar su potencial toxicogénico.

V.2. Identificación de las especies de *Alternaria* aisladas, utilizando marcadores morfológicos

La identificación correcta de las especies de *Alternaria* es importante por su ubicuidad y el rol que desempeñan en la naturaleza, como saprófitos, patógenos y micotoxicogénicos, que afectan negativamente en los ecosistemas. Los sistemas de clasificación artificiales basados en los caracteres de diferenciación, por ejemplo, los perfiles de producción de metabolitos y los patrones de esporulación obtenidos bajo condiciones estandarizadas, son importantes en la taxonomía del género. La identificación de muchas especies de *Alternaria* es particularmente difícil debido a la variación, la plasticidad de la colonia y de las características micro-morfológicas (Andersen y col., 2001).

La identificación en base a marcadores morfológicos de las cepas de *Alternaria* aisladas de granos de amaranto demostró que *A. alternata* y *A.*

infectoria fueron las especies prevalentes. Otras especies pertenecientes al grupo especie *A. infectoria* como *A. graminícola* también fue aislada.

Los miembros del grupo especie *A. infectoria* (identificados en base a marcadores morfológicos), son genéticamente distintos y filogenéticamente distantes de otros grupos especies como *A. brassicicola* y *A. alternata*. El grupo especie *A. infectoria* incluye al menos 10 especies conocidas (Andersen y col., 2009). Morfológicamente, el grupo especie *A. infectoria* difiere de otros grupos especies de *Alternaria* en el patrón tridimensional de esporulación (Simmons y Roberts, 1993). La característica de este grupo especie es la producción de conidios pequeños, en cadenas ramificadas con largos conidióforos secundarios entre los conidios (Simmons, 2007).

Estos resultados confirman que utilizando una metodología de identificación morfológica con parámetros como temperaturas y ciclos de luz estandarizados se puede llegar a identificar a nivel de especie de manera inequívoca. De todos modos siempre es preferible la utilización de más de una metodología (aproximación polifásica) para la identificación a nivel de especie.

Nuestros resultados concuerdan en parte con los obtenidos previamente en nuestro país (Bresler y col., 1995; Noelthing y col., 2004). En ambos estudios se identificó solamente la especie *A. alternata* como contaminante de distintas especies de amaranto (*A. mantegazzianus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*). *Alternaria alternata* es en todo el mundo la especie fúngica más común asociada a granos de amaranto de todas las especies (Pusz, 2009). Esta especie fúngica contribuye a disminuir la calidad de los granos. Además en numerosos estudios se ha demostrado la patogenicidad de cepas de *A. alternata* sobre *A. cruentus* y *A. paniculatus* (Blodgett y Swart, 2002).

Durante el presente trabajo también se identificaron cepas pertenecientes al grupo *A. infectoria*, tanto *A. infectoria* como *A. graminícola*. Recientemente en Argentina, Noelting y col. (2012) han informado la presencia de *A. infectoria* como patógeno en granos de amaranto (*A. caudatus*), los cuales presentaban decoloración que afectaba el 100% de la superficie de las mismas. Es de destacar

que en el presente estudio todos los granos de amaranto evaluados para el estudio de la micobiota eran asintomáticos.

El aislamiento de *A. graminicola* de granos de amaranto aporta datos originales, ya que dicha especie no ha sido aisladas previamente de este sustrato.

En Argentina, *A. infectoria* ha sido aislada con alta frecuencia en los últimos años en trigo (Ramírez y col., 2005; Perello y col., 2008) y soja (Barros y col., 2011; Oviedo, 2012). Además, esta especie ha sido descripta como el agente causal de la punta negra del trigo en Argentina (Perello y col., 2008).

Perello y col. (2008) postularon que *A. infectoria* está teniendo relevancia y se ha incrementado significativamente su aislamiento en los últimos años, probablemente debido a los cambios en los sistemas de cultivo, principalmente conservacionistas, en las distintas zonas agroecológicas de la Argentina.

La presencia de *A. infectoria* y de las especies del grupo *A. infectoria* en los granos de amaranto en la Argentina, pone en evidencia la necesidad de entender mejor la relación de este grupo especie con el deterioro de los mismos, así como la de sus subproductos, y el riesgo de contaminación con micotoxinas.

V.3. Perfil toxicogénico de las cepas aisladas

El estudio de los perfiles de producción de las 3 micotoxinas analizadas (AOH, AME y ATe) por las cepas de *Alternaria* (112) aisladas de granos de amaranto, demostró que el 100 % de las cepas fueron capaces de producir alguno de estos metabolitos. Las cepas mostraron 2 perfiles de producción diferentes y el predominante fue el perfil AOH-AME-ATe con una frecuencia entre el 96-100%, dependiendo de la cepa analizada. La toxina producida en mayor concentración fue AOH, seguida por la producción de ATe y AME. Las máximas concentraciones de AOH y AME fueron producidas por dos cepas de *A. alternata*, mientras que la máxima concentración de ATe fue producida por una cepa de *A. infectoria*. En general, todas las cepas produjeron mayores concentraciones medias de ATe, seguidas por la producción de AOH y AME, a excepción de la especie *A. graminicola* que produjo niveles mayores medios de AOH, seguida de ATe y AME.

Los resultados demostraron que las cepas de *A. alternata* y *A. infectoria* aisladas de granos de amaranto, son capaces de producir micotoxinas en el medio AALM. En el presente estudio se utilizó este medio de cultivo debido a que ha sido descrito como el más adecuado para evaluar el perfil toxicogénico de las especies de *Alternaria*, ya que la producción de los metabolitos se produce en un período de incubación corto, además de poseer las ventajas de ser de bajo costo y simple de preparar, con bajo contenido de aceite y ausencia de pigmentos que facilita la extracción y detección de la toxinas (Chulze y col., 1994).

Los resultados de este estudio aportan los primeros datos sobre la producción de micotoxinas por las especies de *Alternaria* aisladas de granos amaranto. Por esta razón resulta difícil comparar los perfiles toxicogénicos de las cepas aisladas en el presente trabajo con otros estudios en los cuales las cepas ensayadas han sido aisladas de otros sustratos. Nuestros resultados son comparables con los obtenidos por Oviedo (2012) que estudió la producción de estos tres metabolitos, en el mismo medio de cultivo, por cepas de *A. alternata*, *A. infectoria* y *A. graminicola* aisladas de granos de soja en nuestro país. Trabajos previos realizados con cepas de *Alternaria* aisladas de trigo, demostraron que ATe fue la toxina encontrada en mayores concentraciones (Bottalico y Logrieco, 1992; Grabarkiewicz-Szczesna y Chelkowsky, 1992; Li y col., 2001; Logrieco y col., 2003; Patriarca y col., 2007). Diferente a lo observado en nuestro estudio en el cual la toxina producida en mayores niveles fue AOH, seguida por la producción de ATe y AME.

Patriarca y col. (2007) determinaron el perfil toxicogénico (en arroz molido autoclavado al 40% de humedad) de cepas de *Alternaria* aisladas de trigo en Argentina (principalmente *A. alternata* y *A. tenuissima*). Los autores observaron niveles máximos de AME, producidos por *A. alternata*, similares a los detectados en el presente estudio, aunque la máxima producción de ATe fue menor (aproximadamente 5 veces) y la de AOH mayor (aproximadamente 7 veces) entre las cepas aisladas de amaranto. Logrieco y col. (2003) informaron sobre 14 cepas de *A. alternata* aisladas de trigo de Italia, Yugoslavia, Grecia, Líbano, Egipto y Turquía, y mostraron que el 100% de las cepas eran productoras de ATe (hasta 6

µg/g), y 13/14 produjeron AOH (hasta 0,12 µg/g) y AME (0,06 µg/g). Por otra parte, Bottalico y Logrieco (1992) evaluaron la capacidad toxicogénica, de cepas de *A. alternata* y *A. triticina* aisladas de diferentes granos (trigo, cebada, arroz, avena y maíz) en países mediterráneos (Egipto, Francia, Grecia, Italia, Líbano, Portugal, Turquía y Yugoslavia). El estudio del perfil toxicogénico de las 30 cepas evaluadas (16 *A. triticina* y 14 *A. alternata*) mostró que sólo las cepas de *A. alternata* produjeron micotoxinas, el 100% de las cepas fueron capaces de producir ATe y esta fue la toxina encontrada en niveles mayores, y el 92% de las cepas produjeron AOH, AME y ALT, en concentraciones menores a las detectadas en el presente estudio. Diferentes resultados fueron observados por Li y col. (2001) quienes evaluaron la capacidad de 22 cepas de *A. alternata* aisladas de semillas de trigo de China, en arroz molido autoclavado y trigo (40% de humedad). Si bien las mayores concentraciones detectadas fueron de ATe sólo unas pocas cepas produjeron esta toxina, mientras que AOH y AME fueron producidas por todas las cepas. En Polonia, Grabarkiewicz-Szczesna y Chelkowsky (1992), demostraron que usualmente las cepas de *A. alternata* aisladas de trigo, producían AOH, AME, ATe, ALT y ATX-I. Los investigadores observaron que las cepas originarias de tomates y papas producían mayores cantidades de estas toxinas en comparación con cepas provenientes de cereales. Sin embargo, estas últimas producían mayores cantidades de ATe. También observaron que la producción de estos metabolitos es sustrato dependiente y que el arroz era el mejor sustrato para producir los 5 metabolitos.

Los resultados del presente trabajo aportan información sobre la producción de micotoxinas por *A. infectoria* y miembros de este grupo especie. A la fecha existen pocos datos disponibles sobre el perfil toxicogénico de especies de *Alternaria* diferentes de *A. alternata* (Bruce y col., 1984; Bottalico y Logrieco, 1992; Patriarca y col., 2007; Andersen y col., 2009; Oviedo 2012; Ramirez y col., 2013). De acuerdo con lo postulado por Andersen y col. (2009), el grupo especie *A. infectoria* es químicamente muy diferente de otras especies de *Alternaria*, produciendo metabolitos que no se encuentran en otros grupos especies. Hasta la fecha no se había demostrado que los taxones en el grupo especie *A. infectoria*

sean productores de AOH y ATe, micotoxinas que son comunes en algunas especies de *Alternaria* de esporas pequeñas. Esta afirmación es cuestionable si se tiene en cuenta lo observado por Bruce y col. (1984) quienes evaluaron la capacidad de producir AOH, AME y ATe, por 3 cepas de *Pleospora infectoria* aisladas de muestras de trigo en EE.UU, 2 de las cepas fueron capaces de producir toxinas, una de ellas las tres micotoxinas analizadas, y la otra ATe, en arroz molido esterilizado en autoclave. *Alternaria infectoria* fue conocida comúnmente como el estado perfecto de *Pleospora infectoria* hasta que Simmons (1986) la describió con el nombre binomial de *A. infectoria*. Además, demostró que su teleomorfo no pertenecía al género *Pleospora*, y que ha sido aceptado como un nuevo género, *Lewia* Barr & Simmons (Simmons, 1986). La razón que podría explicar la no producción de micotoxinas por *A. infectoria* y miembros de su grupo especie, podría ser la diferencia en los medios de cultivos utilizados por los investigadores para evaluar la capacidad toxicogénica (DRYES, DG18, APG + DN). En general puede observarse que la producción de estos metabolitos es dependiente del sustrato y que el arroz molido promovería una mayor producción de los metabolitos de las especies de *Alternaria* (Grabarkiewicz-Szczesna y Chelkowsky, 1992; Torres y col., 1998; Li y col., 2001; Solfrizzo y col., 2005).

De acuerdo a nuestros resultados existiría un riesgo potencial de contaminación de granos de amaranto con micotoxinas producidas por *Alternaria*.

Desde el punto de vista de la salud pública humana, la toxicidad de las toxinas de *Alternaria* es relevante considerando los diferentes mecanismos de acción y la diversidad de especies afectadas. Durante los últimos cinco años, numerosos estudios se han ocupado de estudiar la toxicidad de AOH y AME.

Ambas micotoxinas han sido reportadas como genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Ostry, 2008; Logrieco y col., 2009). Recientemente Tiemann y col. (2009) han demostrado que AOH y AME afectan negativamente la síntesis de progesterona en las células de la granulosa porcina *in vitro*. Por esta razón la exposición a AOH o AME puede llegar a afectar el desempeño reproductivo al interferir con el desarrollo folicular en el cerdo y posiblemente en otras especies de mamíferos.

En base a los datos de incidencia natural y a la toxicidad demostrada en los distintos sistemas biológicos, es necesario evaluar el riesgo toxicológico que representan dichas toxinas en las cadenas alimentarias.

En Argentina, existe solo un estudio sobre la presencia natural de micotoxinas en granos de amaranto. Se ha encontrado zearalenona en dos muestras de *A. cruentus* (Bresler y col, 1991). Por otra parte Bresler y col. (1998) han demostrado en un estudio *in vitro* que los granos de amaranto no serían un buen sustrato para la producción de aflatoxinas. Sin embargo, la presencia de micotoxinas producidas por *Alternaria* no debe subestimarse, ya que pueden co-ocurrir con otras micotoxinas, cuya toxicidad ha sido ampliamente demostrada y tener un efecto sinérgico.

La alta frecuencia de contaminación con especies de *Alternaria* potencialmente toxicogénicas reportadas en el presente trabajo, muestran la necesidad de llevar a cabo más estudios sobre la contaminación natural, el efecto del almacenamiento, procesamiento y los métodos de prevención. Teniendo en cuenta que en Argentina el cultivo de amaranto se considera como una producción con alto potencial y de interés estratégico, debido principalmente sus cualidades nutricionales y a su capacidad de adaptarse a diversas condiciones hídrica y edáficas. Además, su uso directo o en la fabricación de alimentos destinados al consumo humano, debería considerarse el riesgo de la población a la exposición continua a las micotoxinas producidas por especies de *Alternaria* y se deberían establecer, en un futuro mediato, regulaciones respecto a los niveles máximos permitidos.

Recientemente las toxinas producidas por *Alternaria* han recibido mayor atención, tanto en programas de investigación como en análisis de riesgo, si bien hasta el momento no existen límites ni regulaciones sobre las mismas. En el año 2011 la Comisión Europea le solicitó a la European Food Safety Authority (EFSA) que examinara los reportes sobre la presencia de las toxinas de *Alternaria* en alimentos destinados al consumo humano y animal. El panel de expertos usó el umbral de preocupación toxicológica como criterio para evaluar el nivel relativo de preocupación en la exposición alimentaria de los seres humanos a estas

micotoxinas. Para toxinas de *Alternaria*, AOH y AME que son consideradas genotóxicas se estima que la exposición alimentaria crónica excede el umbral de preocupación toxicológica, indicando la necesidad de contar con datos de toxicidad adicionales (EFSA 2011).

VI. CONCLUSIONES

1. La microbiota asociada a granos de amaranto estuvo compuesta principalmente por 2 géneros: *Alternaria* y *Aspergillus*, siendo el primer género siempre el presente en mayores porcentajes. No se observaron diferencias en los porcentajes de infección totales entre las dos épocas de siembra analizadas.
2. Hubo una disminución en los porcentajes de infección con especies de *Alternaria* tanto en *A. cruentus* como *A. hypochondriacus* en la segunda época de siembra.
3. Diferentes especies de *Alternaria* colonizan los granos. *A. alternata* y *A. infectoria* son las especies prevalentes.
4. El uso de marcadores morfológicos permitió identificar todas las especies aisladas, especialmente las incluidas en el grupo especie *A. infectoria*. Se observó por primera vez el aislamiento de una especie del grupo especie *A. infectoria* (*A. graminícola*) en granos de amaranto en Argentina. Dichas especies aún no han sido aisladas de este sustrato en otros países.
5. Las diferentes especies aisladas produjeron alguna de las tres micotoxinas evaluadas (AOH, AME y ATe) en el medio agar arroz licor de maíz. Encontramos variaciones intra-específicas e inter-específicas en los perfiles

toxicogénicos. El perfil más abundante fue la coproducción de las tres micotoxinas evaluadas.

6. La producción de micotoxinas especies dentro del grupo especie *A. infectoria* (*A. infectoria* y *A. graminícola*) aporta información original sobre el perfil toxicogénico de las mismas.
7. La información obtenida es relevante por la importancia del amaranto, debido principalmente a sus cualidades nutricionales y por los efectos toxicológicos de las micotoxinas producidas por *Alternaria* en los distintos sistemas biológicos.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas H.K., Tanaka T., Shier W.T. (1995) Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* toxin (AAL-toxin) and fumonisin in plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry*, **40**: 1681-1689.
- Abramson D., Delaquis P., Smith D. (2007). Assessment of ochratoxin A and tenuazonic acid in Canadian ice-wines. *Mycotoxin Research*, **23**: 147-151.
- Agarwal A., Garg G.K., Devi S., Mishra D.P., Singh U.S. (1997). Ultrastructural changes in Brassica leaves caused by *Alternaria brassicae* and destruxin B. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **6**: 25-28.
- Agarwal V. K., Sinclair, J. B. (1987). Principles of seed pathology. CRC Press Inc. Boca Raton, Fla.
- Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., Van den Ende B.G., Hoog S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, **46**: 642-656.
- Andersen B., Kroger E., Roberts R.G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, **105**: 291-182.
- Andersen B., Krøger E., Roberts R.G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species groups. *Mycological Research*, **106**: 170-182.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA) (2005). Rendimiento por quintal de diferentes cereales. Quinto Informe de labores Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- Asplin F.D., Carnaghan R.B.A. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, **73**: 1215-1219.
- Azcarate M.P., Patriarca A., Terminiello L., Fernández Pinto V. (2008). *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection*, **71**: 1262-1265.

- Barros G., Oviedo M.S., Ramirez M.L., Chulze S. (2011). Safety aspects in soybean food and feed chains: Fungal and mycotoxins contamination. En: Soybean -Biochemistry, Chemistry and Physiology. Tzi-Bun, Ng (Ed). InTech-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. Pag. 7-20.
- Bartolini, J.S, Hampton J.G. (1989). Grain amaranth. Seed Development, yield and quality. En: Proceedings Agronomy Society NZ. Pag. 55-61.
- Becerra R. (2002) El amaranto: Nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. Boletín Biodiversitas [publicación periódica en línea]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/biodivesitas/amaranto/html>.
- Bennet J.W., Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**: 497-516.
- Bernal-Muñoz R., Rodríguez-Vallejo J., Estrada-Gómez A., Hernández-Livera, A., Gatica-Vázquez N. (2000). Micoflora asociada a la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Revista Fitotécnica Mexicana* **23**: 109-118.
- Betina V. (1989). Mycotoxins as secondary metabolites. En: Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam. Pag. 27-41.
- Blodgett J.T., Swart W.J. (2002). Infection, colonization, and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. *Plant Disease*, **86**: 1199–1205.
- Blount WP. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*, **9**: 52, 55-58, 61, 77.
- Bottalico A., Logrieco A. (1992). *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. En: *Alternaria* Biology, Plants Diseases and Metabolites. Chelowski J, Visconti A (eds.). Elsevier, pag. 67-76.
- Bottalico A., Logrieco A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Sinha KK, Bhatnagar D (eds.). Marcel Dekker, Inc, New York, USA. Pag. 65-108.
- Bräse S., Encinas A., Keck J., Nising C.F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, **109**: 3903-3990.

- Brenner D.M., Baltensperger D.D., Kulakow P.A., Lehmann J.W., Myers R.L., Slabbert M.M. Sleugh B.B. (2000). Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Reviews*, **19**: 227-285.
- Bresler, G. (1995). Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en granos de *Amaranthus*. Tesis, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Bresler G., Vaamonde G., Brizzio S. (1991). Natural occurrence of zearalenone and toxinogenic fungi in amaranth grain. *International Journal of Food Microbiology*, **13**: 75-80.
- Bresler G., Vaamonte G., Degrossi C., Fernández Pinto V. (1998). Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *International Journal of Food Microbiology*, **42**: 57-61.
- Bressani R. (1994) Composition and nutritional properties of Amaranth. En: *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-López O. (ed.), CRC Press, Boca Raton., Pág. 185-205.
- Bruce V.R., Stack M.E., Mislivec P.B. (1984). Incidence of toxic *Alternaria* species in small grains from the U.S.A. *Journal of the Food Science*, **49**: 1626-1627.
- Brugger E.M., Wagner J., Schumacher D.M., Koch K., Podlech J., Metzler M., Lehmann L. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, **164**: 221-230.
- Campbell I.M., Doerfler D.L., Bird B.A., Remaley A.T., Rosato L.M., Davis B.N. (1982). Over production of Microbial Products. Krumphanzl V, Sikyta B, Vanek Z (eds.). Academic Press, New York. Pag.141.
- Chou H.H., Wu W.S. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, **106**: 164-169.
- Chulze S., Torres A., Dalcero A., Combina M. (1994). Production of alternariol and alternariol monomethyl ether in natural substrates in comparison with semisynthetic culture medium. *Mycotoxin Research*, **10**: 79-84.
- Covas G. (1990). Amaranthos ¿El quinto gran recurso vegetal para la alimentación humana?. *Amarantos Novedades e Informaciones* N°5, pag. 1.

- Council for Agricultural Science and Technology (CAST) (2003). *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology Ames. Iowa.
- Davis N.D., Diener U.L. (1987). *Mycotoxins*. Food and Beverage Mycology. 2° edición. Beuchat LR (ed.). Van Nostrand Reinhold, New York. Pag. 517-70.
- Desjardins A.E. (2006). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. Pag. 260.
- EFSA on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2011) Scientific opinion on the risk for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *European Food Safety Authority Journal*, **9**: 2407. [97pp.] Disponible on-line: <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>.
- FAO/OMS/UNU. (1985). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una reunión consultiva conjunta de expertos. Serie de Informes Técnicos 724, OMS.
- Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko. D. (2007) Alternariol acts as topoisomerase poison. En: Gesellschaft für Mycotoxin Forschung. Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop. Stuttgart-Fellbach, Germany. Pag. 123.
- 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**: 441-451.
- Fernández-Cruz M.L, Mansilla M.L., Tadeo J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, **1**: 113-122.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2004b). *Animal Production and Health, Protein Sources for the Animal Feed Industry*. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/.../y5019e00.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2004a). *Food and Feeds in 2003*. Food and Nutrition Paper 81. FAO Organization of the United Nations, Roma.
- Fox E.M., Howlett B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, **11**: 481-487.

- Geisen R. (1998). PCR methods for the detection of mycotoxin-producing fungi. En: Applications of PCR in Mycology. Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander P. (eds.). CAB International, Wallingford, UK. Pag. 243-266.
- Gorinstein S., Pawelzik E., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Weisz M., Trakhtenberg S. (2002). Characterization of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**: 886-891.
- Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J. (1992). Metabolites produced by *Alternaria* species and their natural occurrence in Poland. En: *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Chelkowski J., Visconti A. (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pag. 363-380.
- Griffin G.F., Chu F.S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene and tenuazónico acid in the chicken embryo assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**: 1420-1422.
- Groves J.W., Skolko J. (1944). Notes on seed-borne fungi: II *Alternaria* *Canadian Journal of Research*, **22**: 217-224.
- Hägglom P., Stepinska A., Solyakov A. (2007). *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. En: Gesellschaft für Mykotoxin Forschung, Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop. Stuttgart-Fellbach, Germany. 14-16 de mayo de 2007. Pag. 35.
- Hicks J.K., Yu J.H., Keller N.P., Adams T.H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal*, **16**: 4916-4923.
- Hunziker A.T. (1991). Sinopsis de las especies silvestres de *Amaranthus* del continente americano, con especial referencia a las monoicas. En: Primer Congreso Internacional del Amarantho, Oaxtepec, Morelos, México. Pag. 22.
- Kauffman C., Weber L. (1990) Grain Amaranth. En: Advances in New Crops. Janick J., Simon J.E. (eds.). Timber Press, Portland, OR. Pag. 127-139.
- Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 937-47.

- Kocher U. (2007). Determination of 7 *Alternaria* toxins in edible oil and oilseeds by LC-MS/MS. En: Gesellschaft für Mycotoxin Forschung. Proceeding of the 29th Mycotoxin Workshop. Stuttgart-Fellbach, Germany. 14-16 de mayo de 2007. Pag. 72.
- Lacey J. (1992). Effects of environment growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata*. En: Biology, Plants Diseases and Metabolites. Chelkowski J., Visconti A. (eds.). Elsevier. Pag. 381-407.
- Lehmann L., Wagner J., Metzler M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 398-408.
- Li F., Toyazaki N., Yoshizawa T. (2001). Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather-damaged wheat. *Journal of Food Protection*, **64**: 567-571.
- Logrieco A., Bottalico A., Mulé G., Moretti A., Perrone G. (2003). Epidemiology and toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 645-667.
- Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, **2**: 129-140.
- Magan N., Aldred D. (2007). Why do fungi produce mycotoxin?. En: Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Dijksterhuis J., Samson R. (eds). CRC Press, London. Pag. 121-133.
- Marko D. (2007). Mechanisms of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins. En: Gesellschaft für Mycotoxin Forschung. Proceeding of the 29th Mycotoxin Workshop. Stuttgart-Fellbach, Germany. 14-16 de mayo de 2007. Pag. 48.
- Moreno-Velázquez, M., Yáñez-Morales M., Rojas-Martínez R.I., Zavaleta-Mejía E., Trinidad-Santos A., Arellano-Vázquez J.L. (2005). Diversidad de hongos en semilla de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **23**: 111-118.
- Moss M. (1996). Mycotoxins. *Mycological Research*, **100**: 513-523.

- National Academy of Science (NAS) (1984). Amaranth: modern prospects for an ancient crop. National Academy of Science, Washington, DC.
- Neergard P. (1979). Seed Pathology. Vol I. The Macmillan Press Ltd. London, Pag. 839.
- Nees Von Esenbeck C. G. (1817) Das System DER Pilze and Schwamme and Atlas. Wurzburg, 2: 329.
- Nishimura S., Kohmoto K. (1983). Host-specific toxin and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology*, **21**: 87-116
- Noelting M.C., Sandoval M.C., Abbiati N.N. (2004) Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de amaranto (*Amaranthus* spp.) mediante diferentes métodos de análisis. *Revista Peruana de Biología*, **11**, 1-15.
- Noelting M.C., Molina M.C., Mónaco C.I., Sandoval M.C., Perelló A. (2012) First report of *Alternaria infectoria* on amaranth (*Amaranthus caudatus* ssp. *mantegazzianus*) in Argentina. *New Disease Report*, **25**: 11.
- Ostry V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, **1**: 175-188.
- Oviedo M.S., Barros G.G., Chulze S.N., Ramirez M.L (2012). Natural occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether on soya bean *Mycotoxin Research*, **28**: 169 – 174.
- Oviedo M.S. (2012). Ecofisiología de *Alternaria* spp. en soja. Micotoxinas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
- Pantanelli A. (2005) Prometedora resurrección del amaranto. *Revista Alimentos Argentinos* [publicación periódica en línea]. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_18/18_07_amaranto.htm.
- Patriarca A., Azcarate M.P., Terminiello L., Fernández Pinto V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *Internacional Journal of Food Microbiology*, **119**: 219-222.
- Peever T.L., Su G., Carpenter-Boggs L., Timmer L.W. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, **96**: 119-134.

- Peiretti G. (2011). Amaranto. Potencialidades de un cultivo "redescubierto". Nuevo ABC Rural disponible <http://www.nuevoabcrural.com.ar/vertest.php?id=3305>
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of World Health Organization*, **77**: 754-766.
- Perelló A.E., Moreno M.V., Sisterna M.N. (2008). *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology*, **57**: 379.
- Písaříková S., Kráčmar I., Herzig B.A. (2005) Amino acid contents and biological value of protein in various amaranth species. *Czech Journal of Animal Science*, **50**: 169–174.
- Pusz W. (2009). Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of *Amaranthus*. *Phytopathology*, **54**: 5-14
- Ramirez M.L., Reynoso M.M., Oviedo M.S; Sturm E., Chulze S.N. (2013). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology* (en prensa)
- Ramirez M.L., Sturm M.E., Oviedo M.S., Chulze S. (2005) *Alternaria* species isolated from wheat in Argentina. En: *Myco-Globe: Reducing Impact of Mycotoxins in Tropical Agriculture*. Accra Ghana, Africa.
- Richard J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology*, **119**: 3-10.
- Roberts R.G., Reymond S.T., Andersen B. (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, **104**: 151–160.
- Rotem J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press. St. Paul, Minnesota. Pag. 326.
- Saunders R.M., Becker R. (1984). *Amaranthus*: a potential food and feed resource. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, XI. Pomeranz Y. (ed.) American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. Pag. 357-396.
- Schrader T.J., Cherry W., Soper K., Langlois I., Vijay H.M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, **21**: 261-274.

- Schrader T.J., Cherry W., Soper K., Langlois I. (2006). Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity *in vitro*. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **606**: 61-71.
- Scott PM. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International (AOAC)*, **84**: 1809-1817.
- Scott P.M., Lawrence G.A., Lau B.P.Y. (2006). Analysis of wines, grapes juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, **22**: 142-147.
- Sidhu GS. (2002). Mycotoxin genetics and genes clusters. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 705-711.
- Simmons E.G. (1986). *Alternaria* themes and variations (14-16). *Mycotaxon*, **25**: 195-202.
- Simmons E.G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. En: *Alternaria: Biology, Plant Disease and Metabolites*. Chelkowski J., Visconti A. (eds.), Amsterdam: Elsevier. Pag. 1-35.
- Simmons E.G., Roberts R.G. (1993). *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon*, **48**: 109-140.
- Simmons EG. (1995). *Alternaria* themes and variations (112- 144). *Mycotaxon*, **55**:55-163.
- Simmons E.G. (2007). *Alternaria: an Identification Manual*. Samson R. (ed.). CBS Biodiversity serie 6, Utrecht, Netherlands.
- Smedsgaard J. (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, **760**: 264-270.
- Smith D., Moss M.O. (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. Wiley J., Chichester S. (eds), New York. USA. Pag. 32.
- Solfrizzo M., Girolamo A.D., Vitti C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczesna J., Szopinska D., Dorna H. (2005). Toxigenic profile of *Alternata alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants*, **22**: 302-308.

- Stepien M., Sokol-Leszczynska B., Luczak M. (2007). Mycotoxins, food products and human health. *Postepy Mikrobiologii*, **46**: 167-177.
- Steyn P.S. (1998). The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **6**: 469-478.
- Terminiello L., Patriarca A., Pose G., Fernandez Pinto V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean puree. *Mycotoxin Research*, **22**: 236-240.
- Tewari J.P. (1983). Cellular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. *Phytopathology*, **73**: 831.
- Thomma B.P.H.J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 225-236.
- Tiemann U., Tomek W., Schneider F., Müller M., Pöhland R., Vanselow J. (2009). The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect progesterone synthesis in porcine granulosa cells *in vitro*. *Toxicology Letters*, **186**: 139-145.
- Torres A., Gonzalez H.H.L., Etcheverry M., Resnik S., Chulze S. (1998). Production of alternariol and alternariol mono-metil-eter by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants*, **15**: 56-60.
- Visconti A., Sibila A. (1994). *Alternaria* toxins. En: Mycotoxins in Grain. Miller JD, Trenholm HL (eds.). Eagan Press, St. Paul, MN, USA, pag. 315-336.
- Weaver S.E., McWilliams E.L. (1980). The biology of Canadian weeds. 44. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Wats. and *A. hybridus* L. *Canadian Journal of Plant Science*, **60**: 1215-1234.
- Weber E. (1987). Amaranth Grain Production Guide 1987 Rodale Research Center Rodale Press.
- Williams J.T., Brenner D. (1995). Grain amaranths (*Amaranthus* species). En: Cereals and Pseudocereals, Williams J.T. (ed.). Chapman & Hall, London. Pag. 129-186.

- Wilson J., Otsuki T. (2001). Global trade and food safety: winners and losers in a fragmented system, Working Paper, Agriculture Land, Commodity Prices, Markets, N° 2689, World Bank.
- Wollenhaupt K., Schneider F., Tiemann U. (2008). Influence of alternariol (AOH) on regulator proteins of cap-dependent translation in porcine endometrial cells. *Toxicology Letters*, **182**: 57-62.
- Woody M.A., Chu F.S. (1992). Toxicology of *Alternaria* mycotoxins. En: *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Chełkowski J., Visconti A. (eds.). Elsevier, New York, USA. Pag. 409-434.
- Yekeler H., Bitmis K., Ozcelik N., Doymaz M.Z, Calta M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on oesophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology*, **29**: 492-497.
- Zhou B., Qiang S. (2008). Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. *African Journal of Biotechnology*, **7**: 1151-1156.

72680

~~U.N.P.C.~~
Biblioteca Central



72680