



Original

Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate

Martha Elizabeth Benavidez Rozo, Andrea Patriarca, Gabriela Cabrera y Virginia E. Fernández Pinto*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de febrero de 2013

Aceptado el 3 de septiembre de 2013

On-line el 23 de septiembre de 2013

Palabras clave:

Alternaria

Metabolitos secundarios

Tomate

Mycotoxinas

R E S U M E N

Antecedentes: Muchas especies de *Alternaria* han sido estudiadas por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos como la tentoxina (TEN), algunos de los cuales tienen propiedades tóxicas. Las principales toxinas de *Alternaria* contaminantes de alimentos son el ácido tenuazónico, el alternariol (AOH), el alternariol monometil éter (AME), el altenueno y las altertoxinas I, II y III.

Objetivos: Determinar los perfiles de metabolitos secundarios característicos de cepas de *Alternaria* aisladas de tomate para su clasificación quimiotaxonómica.

Métodos: Los perfiles de metabolitos secundarios se determinaron por HPLC-MS.

Resultados: Los aislamientos de *Alternaria* obtenidos a partir de tomates con «enmohecimiento negro» pertenecen, según sus características morfológicas, a los grupos especie *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* y *Alternaria arborescens*, siendo *A. tenuissima* el más frecuentemente aislado. Se determinaron los perfiles más característicos de metabolitos secundarios de los grupos especie *A. alternata* (AOH, AME, TEN), *A. tenuissima* (AOH, AME, TEN, ácido tenuazónico) y *A. arborescens* (AOH, AME, TEN, ácido tenuazónico), siendo algunas cepas de este último grupo especie capaces de sintetizar toxinas AAL.

Conclusiones: Los perfiles de producción de metabolitos secundarios son una herramienta útil para la diferenciación de aislamientos de *Alternaria* pertenecientes a grupos especie de esporas pequeñas difícilmente identificables por sus características morfológicas.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Determination of the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato

A B S T R A C T

Keywords:

Alternaria

Secondary metabolites

Tomato

Mycotoxins

Background: Many *Alternaria* species have been studied for their ability to produce bioactive secondary metabolites, such as tentoxin (TEN), some of which have toxic properties. The main food contaminant toxins are tenuazonic acid, alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altenuene, and altertoxins I, II and III.

Aims: To determine the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato for their chemotaxonomic classification.

Methods: The profiles of secondary metabolites were determined by HPLC MS.

Results: The *Alternaria* isolates obtained from spoiled tomatoes belong, according to their morphological characteristics, to the species groups *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* and *Alternaria arborescens*, with *A. tenuissima* being the most frequent. The most frequent profiles of secondary metabolites belonging to the species groups *A. alternata* (AOH, AME, TEN), *A. tenuissima* (AOH, AME, TEN, tenuazonic acid) and *A. arborescens* (AOH, AME, TEN, tenuazonic acid) were determined, with some isolates of the latter being able to synthesize AAL toxins.

Conclusions: Secondary metabolite profiles are a useful tool for the differentiation of small spored *Alternaria* isolates not easily identifiable by their morphological characteristics.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: virginia@qo.fcen.uba.ar, virginiaferpin@gmail.com (V.E. Fernández Pinto).

Las especies del género *Alternaria* están presentes con frecuencia en una amplia gama de hábitats diferentes, tales como semillas, plantas, productos agrícolas, el suelo y el aire. Las especies de *Alternaria* se asocian comúnmente con enfermedades en varias plantas¹⁷. Este género posee una amplia diversidad morfológica, lo cual ha permitido una serie de intentos de organizar a los taxones en grupos a partir de los caracteres morfológicos^{4,10,29,32,33}. Dentro del género *Alternaria*, las especies se definen generalmente por las características del conidio, incluyendo el tamaño, la tabicación, presencia y ausencia de pico y el modelo de concatenación. Teniendo en cuenta la medida del conidio se establecieron 2 grupos: el de «esporas grandes» (tamaño del conidio en un rango de [50–]60–100 µm) y el de «esporas pequeñas» (tamaño de conidio menor de 60 µm). Dentro del grupo de esporas grandes se encuentran especies como *Alternaria dauci*, *Alternaria porri* y *Alternaria allii*. Las especies de esporas pequeñas son el grupo más común en alimentos, encontrándose en dicho grupo *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata* y *Alternaria arborescens*. Particularmente, las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas son un grupo difícil de clasificar debido a sus pocos caracteres morfológicos característicos, lo que dificulta la discriminación clara entre especies⁴. Para resolver esta imposibilidad de distinción morfológica de los aislamientos se presentó un método para segregar especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas en grupos de morfoespecies (grupos especie) identificables en base a diferentes modelos de esporulación^{32,33}. Aun así es difícil caracterizar morfológicamente a las distintas especies dentro de un grupo. Una identificación correcta y precisa de estas especies es necesaria porque la especie reconocida bajo un determinado nombre representa un determinado conjunto de caracteres, como la preferencia de crecimiento en determinados sustratos, la interacción con el hospedador y la producción de metabolitos, lo que permite predecir su comportamiento^{2,5,11,26,31}. Estas especies tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, que pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de las plantas, y también ser tóxicos para el hombre y los animales^{17,18}. Entre los principales metabolitos secundarios tóxicos producidos se han reportado el ácido tenuazónico (TeA), el alternariol monometil éter (AME), las albertoxinas I, II y III, el altenueno (ALT), la curvularina (CURV) y la dehidrocurvularina (DHCURV)^{1,8,23,35}. Las micotoxinas de *Alternaria* se producen ampliamente en muchos productos alimenticios, en los que a menudo pueden presentarse junto a micotoxinas producidas por especies de hongos pertenecientes a otros géneros. El consumo de estos productos puede, por lo tanto, contribuir a un aumento en la ingestión de las micotoxinas en la dieta humana. Sin embargo, los datos sobre la presencia de toxinas de *Alternaria* en los alimentos son demasiado limitados para hacer una evaluación de la exposición a estas micotoxinas^{16,17}.

El perfil característico de los metabolitos secundarios puede ser de utilidad en la clasificación de las especies dentro del género como una herramienta adicional al uso de caracteres morfológicos que, como en el caso de algunas estructuras de reproducción, no se diferencian en las condiciones de laboratorio¹². Con el avance de las técnicas moleculares, varios estudios han examinado las relaciones taxonómicas entre las especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas usando una variedad de métodos, en un intento de establecer consensos con las distintas clasificaciones basadas en características morfológicas. Los estudios moleculares muestran que este grupo de especies posee poca resolución en su filogenia molecular²⁶. Un enfoque polifásico incluyendo la morfología, los análisis moleculares y el perfil de los metabolitos secundarios puede aportar diversos marcadores que permitan caracterizar los distintos aislamientos del género *Alternaria*³. El objetivo del presente trabajo fue determinar los perfiles de metabolitos secundarios característicos de cepas de *Alternaria* aisladas de tomate mediante HPLC-espectrometría de masas (MS), para utilizarlos en la clasificación de este género fúngico.

Materiales y métodos

Muestreo

Se recolectaron frutos de tomate afectados por «enmohecimiento negro» en las localidades de La Plata, Florencio Varela y San Pedro, de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, donde se conservaron a 4°C hasta el momento del análisis.

Cultivos de referencia

Se contó con 4 cultivos de referencia provenientes de la colección del Dr. Emmory G. Simmons, Indiana, EE. UU., para ayudar a la clasificación morfológica: *A. alternata* (EGS 34128), *A. tenuissima* (EGS 34015), *A. arborescens* (EGS 39128) y *A. infectoria* (EGS 27193). Los cultivos de referencia están disponibles en la colección del CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos. Se ensayó el perfil de metabolitos de estos 4 cultivos: *A. alternata* (alternariol [AOH], alternariol monometil éter [AME], ALT), *A. tenuissima* (TeA, AOH, AME), *A. arborescens* (TeA, AOH, AME; AAL TA); *A. infectoria* no produce ninguno de los metabolitos estudiados.

Aislamiento

Con el objeto de obtener cultivos puros de *Alternaria*, se tomaron con un bisturí estéril fragmentos de tejido de la zona de tomate infectada. Se colocaron sobre placas de Petri con medio dicloran-cloranfenicol-malta-agar²⁵ y fueron incubados a 25°C durante 7 días. Preparaciones hechas a partir de las colonias que mostraron características distintivas del género *Alternaria* (micelio oscuro y reverso negro) fueron observadas microscópicamente para la confirmación del género, basada en la presencia de dictiosporas. Cada una de las colonias obtenidas en las placas de aislamiento general fueron reaisladas por inoculación con ansa de pequeños trozos de micelio o esporas a placas con medio de cultivo dicloran-cloranfenicol-malta-agar e incubadas hasta su esporulación a 25°C.

Caracterización de los aislamientos

Identificación morfológica

Para la caracterización morfológica los aislamientos fueron sembrados en agar papa zanahoria²⁵ e incubados a 25°C durante 7 días en ciclos alternantes de luz-oscuridad (8–16 h). Una vez obtenidos los cultivos monospóricos²⁰ se procedió a la determinación del grupo especie al que cada aislamiento pertenecía según su modelo de esporulación^{32,33}.

Producción de metabolitos secundarios

A partir de los cultivos monospóricos de 7 días a 25°C en agar papa zanahoria se extrajeron porciones de 5 mm de diámetro que se sembraron en 7 cajas de Petri con medios inductores de la producción de metabolitos secundarios: agar dicloran-Rosa de Bengala-extracto de levadura-sacarosa, agar extracto de malta, agar sacarosa extracto de levadura, agar avena, agar papa sacarosa, agar sacarosa nitrato³ y agar tomate²⁷. Todos los medios fueron incubados a 25°C durante 14 días en oscuridad.

Extracción de los metabolitos secundarios

Se realizó siempre la extracción de 2 porciones de 5 mm de diámetro del medio de la colonia, de cada uno de los cultivos que crecían en los 7 medios inductores de la producción de metabolitos. Las 7 porciones se colocaron en un recipiente adecuado y se

Tabla 1
Metabolitos secundarios investigados en especies de *Alternaria* aisladas de tomate

Metabolito	Fórmula	Ion [M + H] ⁺
Alternariol	C14H11O5	259,0601
Alternariol monometil éter	C15H13O5	273,0758
Ácido tenuazónico	C10H16N	198,1125
Altetoxina I	C20H17O6	353,0947
Curvularina	C16H20O5	293,1311
Dehidrocurvularina	C16H18O5	291,1154
Altenueno	C15H17O6	293,1020
AAL TA	C25H47NO10	522,3273
AAL TB	C25H47NO9	506,3324
AAL TC	C25H47NO8	490,3374
AAL TD	C27H49NO10	548,3429
AAL TE	C27H49NO9	532,3480
Tentoxina	C22H30N4O4	415,2339

realizó la extracción de los metabolitos siguiendo la metodología descrita por Andersen et al. (2002)³.

Obtención de perfiles de metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas

El análisis por HPLC-MS se realizó en un equipo QTOF, de Bruker (MicroTOF-Q II®), con HPLC Agilent serie 1200® con inyector automático y detector de arreglo de diodos. Se realizaron simultáneamente la MS y MS/MS. Condiciones de MS: ESI modo positivo. Potencial del capilar: 4,5 kV; gas nebulizador: 3 bar; gas de secado: 6 l/min; temperatura: 200 °C. Condiciones de MS/MS: se empleó el modo automático de selección de iones en el cuadrupolo, y se aplicaron energías de colisión (CID) de entre 15 y 25 eV según el rango de masas en la celda de colisión. Se empleó argón como gas de colisión. El instrumento se calibró con una solución de formiato de sodio que da numerosos iones en el rango de masa registrado. Condiciones de HPLC: solvente A, HCOOH 0,1%; solvente B, MeOH 0,3 ml/min. Temperatura 30 °C, gradiente T de 0 a 15 min; A: 80, B: 20; T de 15 a 25 min; A: 0, B: 100.

La adquisición de datos y el procesamiento de los espectros se realizaron con el software Bruker Compass® DataAnalysis versión 4.0. Todas las relaciones m/z fueron obtenidas con alta precisión, lo que permitió obtener las fórmulas moleculares de los metabolitos sujetos a análisis. Los espectros de MS/MS se utilizaron para confirmar la identidad de las micotoxinas, además de la comparación de sus tiempos de retención con estándares.

Resultados

Caracterización morfológica

De un total de 32 muestras analizadas se obtuvieron 70 aislamientos del género *Alternaria* a partir de frutos de tomate naturalmente infectados. De acuerdo con las características morfológicas se determinaron un total de 48/70 (69%) aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. tenuissima*, 17/70 (24%) pertenecientes al grupo especie *A. arborescens* y 5/70 (7%) aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. alternata*.

Perfiles de producción de metabolitos secundarios

Se determinó la presencia o ausencia de los metabolitos que se detallan en la tabla 1 para cada uno de los aislamientos. Se obtuvieron los cromatogramas por HPLC-MS de los diferentes extractos que contenían los compuestos sintetizados por cada uno de los aislamientos estudiados. En la figura 1 se muestran los perfiles de producción de metabolitos secundarios de los aislamientos autóctonos de *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens*. El 60% de los aislamientos fue capaz de sintetizar alguno de los metabolitos estudiados, y en la mayoría de los casos varios de ellos de forma simultánea. AME fue producido por el 44% de los aislamientos, AOH

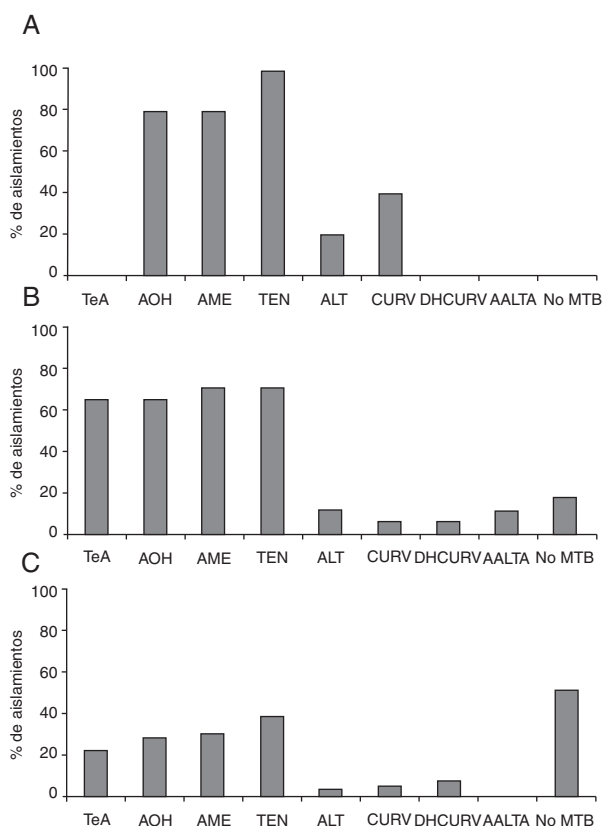


Figura 1. Perfiles de producción de metabolitos secundarios de los aislamientos pertenecientes a los grupos especie: A) *A. alternata*; B) *A. arborescens*; C) *A. tenuissima*. AAL TA: toxinas AAL-A; ALT: altenueno; AME: alternariol monometil éter; AOH: alternariol; CURV: curvularina; DHCURV: dehidrocurvularina; No MTB: no produce ningún metabolito; TeA: ácido tenuazónico; TEN: tentoxina.

por el 41%, TeA por el 31%, tentoxina (TEN) por el 51%, ALT por el 7%, CURV por el 9%, DHCURV por el 7% y AAL TA por el 3%. Comparando los perfiles de producción para cada uno de los grupos especie aislados, se observó que de los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. tenuissima* (fig. 1 C), un 23% produjeron TeA, un 29% produjeron AOH, un 31% produjeron AME, un 40% produjeron TEN, un 4% produjeron ALT, un 6% produjeron CURV, un 8% produjeron DHCURV, y solo un aislamiento (2%) produjo altetoxina I. Ningún aislamiento produjo AAL TA. Del total de aislamientos de este grupo especie, el 52% no produjeron ninguno de los metabolitos investigados. El grupo especie *A. alternata* (fig. 1 A) presentó solo 5 aislamientos y un perfil distinto de producción de metabolitos secundarios. Todos los aislamientos resultaron productores de al menos un metabolito, produciendo el 80% de los aislamientos AOH y AME, el 100% TEN, el 20% ALT, el 40% CURV y no observándose la producción de TeA, DHCURV ni AAL TA. Los aislamientos del grupo especie *A. arborescens* (fig. 1 B) presentaron un perfil similar a los pertenecientes al grupo especie *A. alternata* en cuanto a la proporción de aislamientos productores de AOH y AME, que resultó en 65 y 71%, respectivamente. Por otro lado, en este grupo especie se detectó una mucho mayor proporción de aislamientos productores de TeA (65%) que entre los aislamientos del grupo especie *A. tenuissima*. En cuanto a la producción de TEN, los aislamientos de este grupo presentaron un comportamiento intermedio entre los de los 2 grupos anteriores (71%). Los metabolitos producidos en proporciones minoritarias fueron ALT (12%), CURV y DHCURV (6%). Las toxinas AAL solo fueron producidas por aislamientos de *A. arborescens*, aunque en muy baja proporción (12%). El 17,6% de los aislamientos de este grupo no produjeron ninguno de los metabolitos estudiados.

Tabla 2
Perfiles de producción de metabolitos secundarios

	A. tenuissima				A. alternata			A. arborescens	
Ácido tenuazónico	+	—	+	+	—	—	—	+	+
Alternariol	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Alternariol monometil éter	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Tentoxina	+	+	—	+	+	+	+	+	+
Curvularina	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Altenueno	—	—	—	—	—	—	+	—	—
AAL TA	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Porcentaje de aislamientos	17	10	2	2	20	40	20	41	12

Producción simultánea de metabolitos secundarios

El 17% de los aislamientos de *A. tenuissima* produjo simultáneamente los 4 metabolitos secundarios, TeA, AOH, AME y TEN, siendo este el perfil más frecuente. El 10% coprodujo AOH, AME y TEN, y el 2% coprodujo TeA, AOH y AME o TeA y TEN. El 80% de los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. alternata* coprodujeron AOH, AME y TEN, siendo este el perfil característico. Dentro del mismo se distinguieron 3 subgrupos de aislamientos: los productores de AOH, AME y TEN solamente (20%), los que además de los 3 metabolitos principales produjeron CURV (40%), y los que coprodujeron los 3 metabolitos junto con ALT (20,0%). Este grupo especie fue el único donde no se detectó la producción de TeA y donde todos los aislamientos resultaron productores de al menos un metabolito. Los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. arborescens* presentaron un perfil similar al de los de *A. tenuissima* en cuanto a la coproducción de TeA, AOH, AME y TEN, siendo este también el perfil predominante en este grupo, con un total de 41% de los aislamientos que producen simultáneamente los 4 metabolitos. Sin embargo, es importante señalar que en este grupo se halló un número mucho más elevado de cepas productoras que en el grupo especie *A. tenuissima*. La producción simultánea de TeA, AOH, AME, TEN y AAL TA por el 12% de los aislamientos parece ser un perfil determinante de este grupo especie, ya que las toxinas AAL son producidas exclusivamente por miembros de este grupo. No se pudo determinar un perfil de grupo especie para utilizar como herramienta en la identificación, aunque sí pudieron observarse patrones de coproducción (tabla 2).

Discusión

Existen opiniones que difieren fundamentalmente respecto a la utilidad de los caracteres morfológicos para la clasificación de especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas. Un grupo de investigadores sostiene que los aislamientos cuyas dimensiones conidiales caen dentro de aquellas publicadas para *A. alternata*¹⁰ deben ser clasificados dentro de esta especie, afirmando que dichos aislamientos son morfológicamente indistinguibles de *A. alternata*. El sistema de nombrar aislamientos que producen toxinas específicas de huésped como patotipos de *A. alternata* considera que tales aislamientos son morfológicamente indistinguibles de esta especie^{22,30}. Para resolver esta imposibilidad de distinción morfológica de los aislamientos, se presentó un método para segregar especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas en grupos de morfoespecies (grupos especie) identificables en base a diferentes modelos de esporulación^{32,33}. En el presente trabajo se clasificaron 70 aislamientos obtenidos a partir de frutos de tomate afectados por enmohecimiento negro, dentro de los grupos especie descritos, a fin de determinar cuáles son las morfoespecies de *Alternaria* asociadas a esta enfermedad en nuestro país. Según sus características morfológicas, los 70 aislamientos de *Alternaria* fueron agrupados dentro de los grupos especie *A. tenuissima*, *A. alternata* y *A. arborescens*. Se determinó que el 69% de los aislamientos obtenidos a partir de lesiones típicas de enmohecimiento negro pertenecían al grupo especie *A. tenuissima*, siendo este el

principal agente asociado a la enfermedad. El grupo especie *A. arborescens* fue el segundo agente causal en orden de importancia, con el 24% de los aislamientos. A diferencia de lo reportado en otros estudios, del grupo especie *A. alternata* solo se encontró un 7% de aislamientos. En un estudio llevado a cabo en Apulia (Italia) durante el verano de 1985 se reportó a *A. alternata* como la principal especie fúngica contaminante de tomates afectados por enmohecimiento negro en campo y una menor incidencia de *A. tenuissima*⁷. En otro estudio sobre un total de 228 frutos de tomate obtenidos de plantas de procesamiento de tomate de California, que presentaron lesiones características de enmohecimiento negro, *A. alternata* era también el principal agente causal de esta enfermedad¹⁹. Otros autores mencionan que los aislamientos de *A. arborescens* son también capaces de producir enmohecimiento negro sobre frutos de tomate maduros³⁴. Resulta, además, importante destacar que la coinfección por más de un grupo especie de *Alternaria* ha sido observada en el presente trabajo. La contaminación simultánea con diferentes especies de *Alternaria* fue observada en 14 de un total de 32 muestras. *A. tenuissima* y *A. arborescens* fueron aisladas conjuntamente de 9 muestras, *A. alternata* y *A. tenuissima* de 3 muestras y *A. alternata* y *A. arborescens* de una muestra. La presencia de las 3 especies se encontró solamente en una muestra.

Esto resulta importante desde el punto de vista toxicológico, considerando la posibilidad de producción de diferentes metabolitos secundarios por parte de las cepas y teniendo en cuenta que tales metabolitos pueden coexistir y tener efectos sinérgicos. Diferentes tipos de métodos moleculares han sido empleados para segregar o clasificar especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas, pero los resultados de estos estudios han sido variables. Los mismos incluyeron análisis RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) combinado con análisis de «clusters»^{9,24,29}, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)⁶, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)^{13,15} y secuenciación de genes con análisis de clusters o parsimonia^{13,14,26,28,34,36}. Un total de 260 aislamientos de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas obtenidos a partir de diferentes tipos de frutas fueron sujetos a un análisis de RAPD-PCR, concluyéndose que *A. alternata*, *Alternaria gaisen*, *Alternaria longipes* y otros taxa saprofitos productores de esporas pequeñas son reconocibles como taxa distintos morfológicamente, evidenciando que el sistema de nombrar taxa de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas como «patotipos» no confiere valor predictivo relativo a caracteres morfológicos observables y genéticos, y debería ser abandonado²⁹. En otro estudio³⁴, de acuerdo con los resultados obtenidos a partir del análisis de AFLPs empleando el ADN genómico total y 3 diferentes primers, no fue posible segregar claramente los diferentes aislamientos de *Alternaria* obtenidos a partir de frutos de tomate afectados por enmohecimiento negro pertenecientes a los grupos especie *A. alternata* y *A. tenuissima*, si bien se han podido agrupar aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. arborescens* en un cluster y al grupo especie *A. infectoria* en otro. La caracterización de las especies de *Alternaria* basada en el análisis morfológico y molecular es importante para una correcta identificación, pero generalmente no es suficiente para diferenciar entre grupos de especies afines.

Por otra parte, los perfiles de metabolitos secundarios sintetizados bajo condiciones de cultivo estandarizadas han sido utilizados con éxito para la identificación y clasificación de especies similares²¹, especialmente entre grupos especie de *Alternaria* de esporas pequeñas². Se ha informado que aislamientos pertenecientes a los grupos especie *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens* producen la mayor parte de los metabolitos conocidos. En el presente estudio, representantes de los 3 grupos produjeron AOH, AME, TEN, ALT y CURV. En el grupo especie *A. alternata* se produjeron también ALT y CURV, pero no TeA. La producción de TeA y ALT es común entre los aislamientos de los grupos especie *A. tenuissima* y *A. arborescens*, en el primero de los cuales también se produjo altertoxina 1. Los únicos metabolitos específicos del grupo especie *A. arborescens* son las toxinas AAL. Muchos aislamientos dentro de estos 3 grupos especie son capaces de producir TEN, un tetrapéptido cíclico que causa la clorosis en varias plantas sensibles⁷. En el presente trabajo el 80% de los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. alternata* coprodujeron AOH, AME y TEN. Este grupo fue el único donde no se detectó la producción de TeA y donde todos los aislamientos resultaron productores de al menos un metabolito. Estos resultados concuerdan con datos reportados en la bibliografía³, aunque los 3 aislamientos del grupo especie estudiados en dicho trabajo produjeron también ALT, y en el presente trabajo este metabolito solo fue producido por un aislamiento. Los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. arborescens* presentaron en un alto porcentaje (41%) un perfil similar al de los de *A. tenuissima* (coproducción de TeA, AOH, AME y TEN), aunque es importante señalar que presentaron, asimismo, una mayor proporción de cepas productoras. La producción simultánea de TeA, AOH, AME y AAL TA por el 12% de los aislamientos de *A. arborescens* parecería ser un perfil interesante para ser estudiado dentro de este grupo especie, ya que las toxinas AAL son producidas exclusivamente por miembros de este grupo y podrían ser utilizadas como un posible marcador quimiotaconómico. Es importante destacar que si bien se han podido determinar los perfiles de producción característicos de cada grupo especie, existe una proporción considerable de aislamientos donde los perfiles se solapan. Eso ocurre entre el 10% de los aislamientos del grupo especie de *A. tenuissima* y el 20% de los pertenecientes al grupo especie *A. alternata* que presentan idéntico perfil (AME, AOH y TEN). Se observó, además, que el 41% de los aislamientos del grupo especie *A. arborescens* fue capaz de sintetizar el mismo perfil (TeA, AOH, AME y TEN) que el 17% de los aislamientos del grupo especie *A. tenuissima*.

La tendencia más reciente para lograr la identificación precisa de las especies de *Alternaria* es un enfoque polifásico que integra 3 aspectos: las características morfológicas en medios estandarizados, el análisis molecular y los perfiles de metabolitos secundarios. La combinación de toda la información proporcionada por las diferentes perspectivas representa una poderosa herramienta para la clasificación de este género complejo²⁶. Si bien se han podido determinar los perfiles característicos de los grupos especie *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens*, existen numerosos aislamientos dentro de cada grupo que comparten perfiles donde alguna de las toxinas no es producida. Aunque dentro de los 3 grupos se encuentran aislamientos productores de las toxinas de *Alternaria* más comunes (AOH, AME y TEN), se pueden diferenciar los aislamientos de *A. alternata*, ya que no producen TeA, a diferencia de los aislamientos de los otros 2 grupos. Este sería un criterio muy importante a tener en cuenta, ya que no ha sido posible separar por métodos moleculares en diferentes clusters los grupos especie *A. alternata* y *A. tenuissima*. Los aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. arborescens* presentaron en su mayoría un perfil de producción de metabolitos secundarios similar al del grupo especie *A. tenuissima*, pero podría ser diferenciado de este por sus características morfológicas y por técnicas moleculares^{26,34}.

La producción de metabolitos secundarios por parte de aislamientos pertenecientes a grupos especie de *Alternaria* constituye una herramienta adicional al uso de caracteres morfológicos y moleculares para la identificación de las mismas, pero no constituye en sí mismo un carácter que pueda ser usado para tal fin, ya que no pudo determinarse un único perfil o patrón de producción de grupo especie.

Financiación

Este proyecto ha sido financiado por la Universidad de Buenos Aires y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Andersen B, Frisvad J. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J Agric Food Chem*. 2004;52:7507–13.
- Andersen B, Hansen ME, Smedsgaard J. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology*. 2005;95:1021–9.
- Andersen B, Kröger E, Roberts RG. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol Res*. 2002;106:170–82.
- Andrew M, Peever TL, Pryor BM. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*. 2009;101:95–109.
- Azevedo SS, Mariano RL, Michereff SJ. Survey of the intensity of black rot and *Alternaria* leaf spot of cabbage in Agreste of Pernambuco and determination of sample size for disease quantification. *Summa Phytopathol*. 2000;26:299–306.
- Bock CH, Thrall PH, Brubaker CL, Burdon JJ. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycol Res*. 2002;106:428–34.
- Bottalico A, Logrieco A. *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. En: Chelkowski J, Visconti A, editors. *Alternaria*, biology, plant disease and metabolites. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 209–232.
- Bottalico A, Logrieco A. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: Sinha KK, Bhatnagar D, editors. *Mycotoxins in agriculture and food safety*. New York: Marcel Dekker Inc; 1998. p. 65–108.
- Cooke DE, Forster JW, Jenkins PD, Jones DG, Lewis DM. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Ann Appl Biol*. 1998;132:197–209.
- Ellis MB. *Dematiaceae hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute; 1971.
- Filtenborg O, Frisvad JC, Samson RA. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. En: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O, editors. *Introduction to Food and airborne fungi*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelfcultures; 2002. p. 306–320.
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol Res*. 2008;112:231–40.
- Kusaba M, Tsuge T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:3055–62.
- Kusaba M, Tsuge T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr Genet*. 1995;28:491–8.
- Kusaba M, Tsuge T. Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria*. *Ann Phytopathol Soc Jpn*. 1997;63:463–9.
- Logrieco A, Bottalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. En: Xu X, Bailey JA, Cooke BM, editors. *Epidemiology of mycotoxin producing fungi*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 654–667.
- Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M. *Alternaria* toxins and plant diseases: An overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin J*. 2009;2:129–40.
- Mislivec PB, Bruce VR, Stack ME, Bandler R. Molds and tenuazonic acid in fresh tomatoes used for catsup production. *J Food Prot*. 1987;50:38–41.
- Morris PF, Connolly MS, St Clair DA. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycol Res*. 2000;104:286–92.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WF. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park, PA: Pennsylvania State University Press; 1983. p. 12.
- Nielsen KF, Smedsgaard J, Larsen TO, Lund F, Thrane U, Frisvad JC. Chemical identification of fungi: Metabolite profiling and metabolomics. En: Arora DK, editor.

- Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications. New York: Marcel Dekker Inc; 2004 p. 19–35.
22. Nishimura S, Sugihara M, Kohmoto K, Otani H. Two different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogen causing black spot disease of Japanese pear. J Fac Agric Tottori Univ. 1978;13:1–10.
 23. Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin J. 2008;1:175–88.
 24. Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. Mycologia. 2004;96:119–34.
 25. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic & Professional; 1977. p. 469–88.
 26. Polizzotto R, Andersen B, Martini M, Grisan S, Assante G, Musetti R. A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. J Microbiol Methods. 2012;88:162–71.
 27. Pose G, Patriarca A, Kyanko V, Pardo A, Fernández Pinto V. Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. Int J Food Microbiol. 2009;135:60–3.
 28. Pryor B, Gilbertson R. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. Mycol Res. 2000;104:1312–21.
 29. Roberts RG, Reymond ST, Andersen B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. Mycol Res. 2000;104:151–60.
 30. Rotem J. The genus *Alternaria*: Biology, epidemiology and pathogenicity. St Paul, MN: The American Phytopathological Society; 1994.
 31. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A, Krohn K. Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol Res. 2002;106:996–1004.
 32. Simmons EG. *Alternaria*. An identification manual. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2007.
 33. Simmons EG, Roberts RG. *Alternaria* themes and variations. Mycotaxon. 1993;73:109.
 34. Somma S, Pose G, Pardo P, Mulé G, Fernández Pinto V, Moretti A, et al. AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. Int J Food Microbiol. 2011;145:414–9.
 35. Terminiello L, Patriarca A, Pose G, Fernández Pinto V. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. Mycotoxin Res. 2006;22:236–40.
 36. Weir TL, Huff DR, Christ BJ, Romaine CP. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *A. alternata* from potato and tomato. Mycologia. 1998;90:813–21.