

**31TCA - MICROBIOTA Y CEPAS DE *Alternaria alternata* TOXICOGÉNICAS EN
UVAS MALBEC DE LA DOC SAN RAFAEL, ARGENTINA**

**PRENDES, L.^{a,b}; MERÍN, M.^{a,b}; ANDREONI, M.^c; RAMÍREZ, M.^{b,d}; MORATA
DE AMBROSINI, V.^{a,b}**

**^aFacultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo,
Bernardo de Irigoyen 375 (5600) San Rafael, Mendoza, Argentina**

^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

**^cInstituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Rama Caída, San Rafael,
Mendoza, Argentina**

**^dDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas
Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto,
Córdoba, Argentina**

lprenDES@fcAI.unCu.edu.ar

Resumen

Los hongos filamentosos presentes en uvas para vinificar capaces de producir micotoxinas, representan un gran riesgo para la salud del consumidor de vino y las prácticas vitivinícolas de rutina utilizadas para control durante el desarrollo del viñedo podrían afectar su ocurrencia. El género *Alternaria*, a pesar de ser uno de los más toxigénicos comúnmente encontrado en uvas, no ha recibido hasta el momento la misma atención que otros. Es por ello que fueron objetivos del presente trabajo, identificar la micobiota de uvas Malbec bajo la influencia de distintas prácticas vitivinícolas de control de rutina, identificar cepas de *Alternaria* por métodos morfológicos y moleculares y caracterizar su habilidad toxicogénica y patogénica. El género *Alternaria* resultó el componente mayoritario de la micobiota en uvas Malbec de la DOC San Rafael a tiempo de cosecha (81%) seguido por *Cladosporium* (7%) y sólo en menor porcentaje por *Penicillium* (4%) y *Aspergillus* (3%), entre otros. La aplicación de tratamientos orgánicos o no orgánicos en los viñedos no afectó significativamente la incidencia de los géneros presentes, sugiriendo la ineffectividad de dichas herramientas contra ellos. De acuerdo a los patrones de esporulación, todas las cepas de *Alternaria* aisladas pertenecieron a la especie *Alternaria alternata* y basados en el marcador genético *Alt a 1*, todas pertenecieron al grupo-especie *A. alternata*. De 34 cepas de *Alternaria* analizadas, el 97% fue capaz de producir al menos una de las 3 micotoxinas analizadas: alternariol (AOH), alternariol monometilether (AME) y Ácido tenuazóico (ATe) y el 55% co-produjo las 3, mostrando un riesgo potencial de sinergia. ATe fue la toxina producida a mayor frecuencia (97%) y niveles en un rango de 11.2 a 1941.0 ppm, seguida por AOH producida por el 71% de las cepas, en un rango de 1.8 a 437.0 ppm y AME producida por el 56% de las cepas, en un rango de 0.6 ppm a 663.4 ppm. La capacidad patogénica fue evaluada de acuerdo al tamaño de lesión ocasionado por las cepas en uvas para vinificar. El 55% de las cepas de *Alternaria* resultó muy patogénica, el 31% moderadamente patogénica y sólo el 14 % poco patogénica. En el presente trabajo se reportó una alta incidencia y prevalencia del género *Alternaria* a pesar del uso de prácticas de control de rutina vitivinícolas. Así mismo, se demostró la existencia de

un alto porcentaje de cepas toxicogénicas y patogénicas, sugiriendo un alto riesgo potencial de ocurrencia natural de las toxinas de *Alternaria* en uvas para vinificar. Es por todo lo expuesto que más estudios deben llevarse a cabo para evaluar el riesgo que implica el género *Alternaria* en la industria vitivinícola.

1. Introducción

Argentina se encuentra en el quinto puesto de los países productores de vino y el área de DOC “San Rafael” es una bien reconocida región vitivinícola localizada en el sur de la provincia de Mendoza en el oeste Argentino. Tanto en esta región, formada por terruños con cualidades ecológicas distintivas (*terroir*) aptos para la producción de vinos de calidad superior, como en Argentina, Malbec es una de las más importantes variedades de uva para vinificar.

Los hongos filamentosos impactan negativamente en la producción, calidad sensorial y salubridad del vino de diversas maneras. Su desarrollo en uvas para vinificar implica pérdidas significativas en el rendimiento, alteración de la composición química de las uvas y defectos en el flavor y color del vino así como en la performance de las levaduras y bacterias lácticas durante la vinificación (Fleet et al., 1999). Asimismo, reviste principal preocupación la existencia de hongos toxicogénicos en uva para vinificación, por su capacidad de generar micotoxinas que pueden perdurar durante el proceso hasta llegar al vino, generando un riesgo alto para la salud de los consumidores. La aplicación de cobre y azufre (tratamiento orgánico) y/o fungicidas de la familia de los ditiocarbamatos (tratamiento no-orgánico) en el campo, durante el desarrollo del viñedo son prácticas rutinarias de control vitivinícola que logran una prevención antifúngica efectiva contra típicos causantes de pérdidas de rendimiento como *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* y *Stereum necator*, entre otros. A pesar de ello, su modo de acción parece no ser específico y podría estar actuando además sobre el resto de la micobiota presente (Cadez et al., 2010).

El género *Alternaria*, ampliamente distribuido, incluye especies saprófitas y patógenas oportunistas de plantas, que pueden afectar los granos en el campo o causar deterioro durante la cosecha o post-cosecha de frutos. Numerosas especies de *Alternaria* son conocidas productoras de micotoxinas, entre las más importantes: el derivado del ácido tetrámico: el Ácido Tenuazóico (TA) y los derivados de la dibenzopirona: el alternariol (AOH) y el alternariol monometil ether (AME). La toxicidad de TA ha sido descrita en plantas y numerosas especies animales, y ha sido asociada a un desorden hematológico denominado onyalai, una forma de trombocitopenia. AOH y AME son mutagénicos y citotóxicos para células bacterianas y de mamíferos y se sospecha que serían también carcinogénicos (Logrieco et al., 2009; Ostry, 2008). A pesar de todos sus efectos tóxicos y su documentada ocurrencia, las toxinas de *Alternaria* todavía no han recibido la misma atención que otras micotoxinas y no existe regulación al respecto (EFSA, 2011).

El género *Alternaria* forma parte de la micobiota predominante de uvas para vinificar en distintas regiones vitivinícolas del mundo (Rousseaux et al., 2014) y como patógeno oportunista puede causar podredumbre en el campo bajo condiciones propicias. Además, se ha reportado que cepas de *Alternaria alternata* fueron capaces de producir AOH y AME en uvas (Tournas and Stack, 2001), y también se ha demostrado la ocurrencia natural de AOH y AME en jugo de uva y vino (Pizzutti et al., 2014; Scott et al., 2006). Llamativamente, *Alternaria* todavía no ha sido intensamente estudiada en uvas para vinificar como un género peligroso.

2. Objetivos:

- Identificar la microbiota de uvas Malbec a tiempo de cosecha bajo la influencia de distintas prácticas de control de rutina vitivinícolas en los viñedos.
- Identificar cepas de *Alternaria* aisladas de uvas Malbec y caracterizar su potencial toxicogénico y patogénico.

3. Metodología:

Tratamientos en viñedo y muestreo:

Se realizó un experimento en viñedos Malbec de la estación experimental INTA- Rama Caída, perteneciente a la DOC San Rafael (Mendoza, Argentina) durante las vendimias 2010/2011 (2011) y 2011/2012 (2012). El experimento comprendió 3 filas de vides en las que se seleccionaron azarosamente seis bloques de 4 plantas cada uno. En 3 de ellos se aplicó un tratamiento orgánico que consistió en 3 pulverizaciones (Enero, Febrero y Marzo) con 3 g/L de oxiclورو de cobre y 3 g/L de azufre. Se tomó una muestra independiente por bloque a tiempo de cosecha. Adicionalmente, durante la vendimia 2012/2013 (2013), se muestrearon 6 viñedos Malbec representativos de la DOC San Rafael sometidos a tratamientos orgánicos y no-orgánicos. Los 6 viñedos fueron tratados con oxiclورو de cobre y azufre, como se describió previamente pero 2 de ellos (no-orgánicos) fueron pulverizados previamente con fungicidas de la familia de los ditiocarbamatos. Nuevamente una muestra independiente fue tomada de cada viñedo a tiempo de cosecha.

Aislamiento Fúngico e Identificación morfológica:

Se seleccionaron azarosamente uvas sanas de cada muestra, fueron desinfectadas con una solución al 1% (w/v) de hipoclorito de sodio por 1 min y lavadas con agua estéril 3 veces y plaqueadas directamente en medio Dicloran-Cloranfenicol-Rosa de bengala Agar (DRBC) (Pitt and Hocking, 2009) para incubar 25 °C por 7 días.

Las colonias fúngicas resultantes fueron enumeradas y un número representativo de cada género distinguible fue azarosamente seleccionado para ser identificado según Pitt y Hocking (2009). De 53 aislados identificados de las vendimias 2011 y 2012, 38 pertenecieron al género *Alternaria* y fueron identificados a nivel de especie de acuerdo a los patrones de esporulación y la morfología de sus conidios (Simmons, 2007).

Extracción de DNA e identificación molecular:

Cada uno de las 38 aislados de *Alternaria* fue inoculado en 100 mL de medio Wikerman (glucosa 4%, extracto de malta 0.3%, extracto de levadura 0.3% y peptona 0.5%) e incubada por 3 días a 25°C en agitación. El micelio fue cosechado, secado y congelado a -20 °C para la extracción de DNA según el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (Leslie and Summerell, 2006). Para la identificación molecular se utilizó el protocolo descrito por Pavón et al. (2010), que consiste en la amplificación por PCR de las diferentes regiones del gen *Alt a 1* con set específicos de *primers* para el género *Alternaria* y para cada uno de los 4 grupo-especies posibles: *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. radicina* y *A. porri*.

Producción de micotoxinas:

Se evaluó la habilidad de 34 cepas de *Alternaria* de producir las toxinas alternariol (AOH), alternariol monometil ether (AME) y ácido tenuazóico (TA). Brevemente, se inocularon centralmente placas de medio Agar arroz-Licor de maíz con cada una de las cepas a evaluar y se incubaron a 25°C durante 14 días. El método de extracción fue basado en la extracción a micro-escala propuesta por Smedsgaard (1997) modificado en 3 pasos para adaptarlo a los metabolitos de *Alternaria* (Andersen et al., 2001). La detección y cuantificación de los mismos fue realizada por cromatografía de alta

eficiencia (HPLC), para AOH y AME a 256 nm y para ATe, a 279 nm. El límite de detección (LOD) fue 0.01 ug/g para las 3 toxinas y el límite de cuantificación (LOQ) fue establecido como 3 veces el límite de detección.

Patogenicidad:

Se evaluó la patogenicidad de 29 cepas de *Alternaria* en uvas Malbec, siguiendo la técnica de inoculación con palillos adaptada para bayas (Greco et al., 2012). Cada uva fue inoculada con 1 palillo y se utilizaron 7 uvas para cada cepa a evaluar en placas de Petri de vidrio (90 mm diámetro), se realizó un control negativo con palillos libres de crecimiento fúngico. Todas la placas se incubaron por 7 días a 25 °C con ciclo alternante luz:oscuridad (8/16) al 100% de humedad relativa. Según el tamaño de la lesión ocasionada, se definieron 3 grados de patogenicidad: poco patogénico (1, lesión que abarca menos de ¼ de la superficie de la uva), moderadamente patogénico (2, lesión que abarca más de ¼ hasta ½ de la superficie de la uva), y muy patogénicos (3, lesión que abarca más de ½ hasta toda la superficie de la uva). Cada cepa tuvo 3 replicas.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y STATGRAPHICS Plus 5.1. Los datos de abundancia relativa de los distintos géneros fúngicos, el porcentaje de uvas infectadas y la producción de micotoxinas se analizaron con ANOVA seguido por el test de LSD Fisher ($p < 0.05$ o $p < 0.01$), en algunos casos tabla de contingencias. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron usados para evaluar la relación entre las diferentes micotoxinas. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis para analizar el grado de patogenicidad ($p < 0.05$).

4. Resultados:

El relevamiento de la flora fúngica del INTA Rama caída perteneciente a la DOC San Rafael durante las vendimias 2011 y 2012 y de toda la DOC San Rafael durante la vendimia 2013, reveló la presencia de 4 géneros fúngicos relevantes a tiempo de cosecha en uvas Malbec. Entre ellos, *Alternaria* spp. fue predominante en términos de abundancia relativa (58% en 2011, 81% en 2012 y 2013) seguido por *Cladosporium* (22% 2011, 19% 2012 y 7% 2013) y alternativamente por *Aspergillus* (11% 2011 y 3% 2013) o *Penicillium* (3% 2011 y 4% 2013) (Fig. 1). Además, durante las diferentes vendimias analizadas se encontró un porcentaje menor (<5%) de *Drechslera* y géneros pertenecientes a los Zygomycetes.

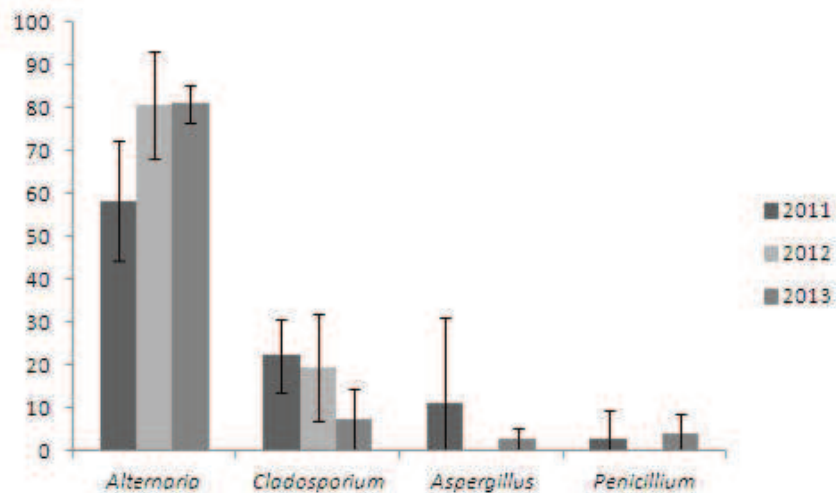


FIGURA 1. Abundancia relativa (%) de los 4 géneros fúngicos relevantes encontrados en uvas Malbec a tiempo de cosecha en INTA Rama Caída de la DOC San Rafael durante las vendimias 2011 y 2012 y en toda la DOC San Rafael durante la vendimia 2013.

En concordancia con estos resultados, *Alternaria* fue el género más frecuentemente aislado ($p < 0.01$) en términos de uvas infectadas durante la vendimia 2013 (Tabla 1). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la abundancia relativa o el porcentaje de uvas infectadas (2013) de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* o *Penicillium* entre la aplicación o no del tratamiento orgánico (oxicloruro de cobre y azufre) durante las vendimias 2011 y 2012 o entre los viñedos sometidos a tratamiento orgánico o no orgánico en la vendimia 2013.

TABLA 1. Porcentaje de uvas Malbec grape de la DOC San Rafael infectadas con géneros fúngicos en medio DRBC durante la vendimia 2013.

| Género Fúngico | N° of bayas infectadas ($n = 90$) | |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------|
| | Rango (%)* | Promedio (%)† |
| <i>Alternaria</i> | 94.4-100 | 96.4 ^a |
| <i>Cladosporium</i> | 0-26.4 | 12.2 ^b |
| <i>Penicillium</i> | 0-16.0 | 4.6 ^b |
| <i>Aspergillus</i> | 0-10.1 | 2.7 ^b |

* Porcentaje máximo y mínimo de uvas para vinificación infectadas.

† Promedio de porcentaje de uvas infectadas.

^{a,b} Los valores con superíndices diferentes difieren significativamente ($p < 0.05$) de acuerdo al test de LSD-Fisher.

De acuerdo a sus patrones de esporulación, los 38 aislados de *Alternaria* fueron identificados como *Alternaria alternata*. La identificación molecular de los mismos basada en el marcador *Alt a I* confirmó que todos pertenecieron al género *Alternaria* y además fueron incluidos en el grupo-especie *A. alternata*.

El 97% de las 34 cepas de *A. Alternata* fueron capaces de producir al menos 1 de las 3 micotoxinas testeadas (AOH, AME and TA) (Tabla 2).

El ácido tenuazóico fue producido por la mayoría de las cepas (97%) y a los mayores niveles (máximo de 1941.0 ppm y mínimo de 11.2 ppm). Fue seguido por AOH producido por el 71% de las cepas, con un máximo de 437.0 ppm y un mínimo de 1.8 ppm y AME producido por el 56% de las cepas, con un máximo de 663.4 ppm y un mínimo de 0.6 ppm. Entre las cepas productoras de toxinas ($n = 33$), se encontraron

diferentes perfiles: el 55% de las cepas co-produjo TA, AOH y AME, el 18% co-produjo TA y AOH y el 3% co-produjo TA y AME. Además, el 24 % de las cepas fue capaz de producir exclusivamente TA. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de cada micotoxina (TA, AOH and AME) entre cepas aisladas de bloques con tratamiento orgánico o sin tratamiento, ni tampoco entre cepas de las distintas vendimias (2011 y 2012). Se observó una correlación positiva entre la producción de AOH y AME ($r = 0.46, p = 0.006$).

De las 29 cepas de *A. alternata* evaluadas, el 55% resultó muy patogénico, el 31% moderadamente patogénico y sólo una porción menor (14%) poco patogénico (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la capacidad patogénica de las cepas aisladas de bloques con tratamiento orgánico o sin tratamiento, ni tampoco de las distintas vendimias (2011 y 2012).

TABLA 2. Caracterización de cepas de *Alternaria* aisladas durante las vendimias 2011 y 2012.

| Vendimia | Tratamiento orgánico | Especie morfológica | Grupo-especie molecular | Aislado evaluado | Producción de toxinas (ppm) | | | Grado de Patogenicidad | | | |
|--------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|--------|-------|------------------------|-------|-------|---|
| | | | | | TA | AME | AOH | | | | |
| 2011 | Tratado | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Alternaria alternata</i> | 20 | 162.1 | 153.4 | nd | 1 | | | |
| | | | | 25.1 | 1070.8 | nd | 12.2 | 2 | | | |
| | | | | 27 | 44.2 | nd | nd | 3 | | | |
| | | | | No tratado | 2 | 265.3 | 149.5 | 29.6 | 3 | | |
| | | | | | 3 | 1056.8 | 63.7 | 27.2 | - | | |
| | 4 | | | | 583.8 | 16.0 | 35.1 | 1 | | | |
| | 2012 | | | Tratado | | | 7 | 1176.8 | 0.6 | 8.6 | - |
| | | | | | | | 8 | 225.1 | nd | nd | 3 |
| | | | | | | | 15 | 1080.0 | 236.5 | 146.8 | 1 |
| | | | | | | | 18 | 136.0 | nd | 18.2 | 2 |
| No tratado | | 5.1 | 73.5 | | | | nd | nd | 3 | | |
| | 5.2 | 55.5 | 123.9 | 1.75 | 2 | | | | | | |
| | 5.3 | 798.4 | nd | nd | 2 | | | | | | |
| | 5.4 | 459.4 | nd | nd | 3 | | | | | | |
| | 5.5 | 73.6 | 663.4 | 142.8 | 2 | | | | | | |
| | 7.1 | 148.2 | 5.7 | 19.3 | 3 | | | | | | |
| | 7.2 | 282.1 | 9.9 | 107.5 | 3 | | | | | | |
| | 7.3 | 441.3 | 22.6 | 2.2 | 3 | | | | | | |
| | 7.4 | 46.0 | nd | nd | 1 | | | | | | |
| | 7.5 | 1941.1 | 10.8 | 60.4 | 3 | | | | | | |
| | 8.1 | 11.2 | nd | nd | 3 | | | | | | |
| | 8.2 | - | - | - | - | | | | | | |
| | 8.3 | 119.9 | 289.5 | 180.6 | 2 | | | | | | |
| | 8.4 | 726.5 | 6.7 | 17.1 | - | | | | | | |
| | 1.1 | 655.3 | 139.5 | 437.0 | - | | | | | | |
| 1.2 | 387.1 | 117.7 | 19.9 | 3 | | | | | | | |
| 1.3 | - | - | - | - | | | | | | | |
| 1.4 | 45.1 | nd | 12.3 | 3 | | | | | | | |
| 2.1 | 152.9 | nd | nd | 3 | | | | | | | |
| 2.2 | 594.1 | nd | 101.7 | 3 | | | | | | | |
| 2.3 | 101.9 | 34.5 | 71.3 | 3 | | | | | | | |
| 2.4 | 433.7 | 0.9 | 7.4 | 2 | | | | | | | |
| 2.5 | 1412.0 | nd | 26.9 | 2 | | | | | | | |
| 3.1 | nd | nd | nd | - | | | | | | | |
| 3.2 | - | - | - | - | | | | | | | |
| 3.3 | 594.4 | nd | 21.2 | 3 | | | | | | | |
| 3.4 | - | - | - | - | | | | | | | |
| 3.5 | 539.1 | 24.9 | 2.9 | 2 | | | | | | | |
| Promedio 2011-2012 | | | | | 481.6 | 108.9 | 62.9 | | | | |

TA: Ácido Tenuazóico; AOH: Alternariol; AME: Alternariol monometil éter.

nd: no detectado bajo el LOQ.

-: no determinado.

5. Conclusiones:

Este estudio resulta el primero con un enfoque polifásico que caracteriza cepas de *Alternaria alternata* de uvas para vinificar, mediante identificación molecular y morfológica, habilidad toxicogénica y patogenicidad. Nuestros resultados indican una alta incidencia y prevalencia del género *Alternaria* a través de los años e inclusive a

pesar del uso rutinario de prácticas de control en los viñedos. También se encontró un elevado porcentaje de cepas de *Alternaria* toxicogénicas y patogénicas y gran producción de toxinas, especialmente de TA, sugiriendo que el género *Alternaria* podría significar un riesgo en uvas para vinificar. No obstante, se deben realizar más estudios en orden de evaluar el grado de contaminación natural de uvas para vinificar y vino con micotoxinas de *Alternaria* y desarrollar métodos estandarizados con este propósito, con el objeto de contribuir a establecer límites para estas toxinas en alimentos.

6. Bibliografía:

- Andersen, B.**, Krøger, E., Roberts, R.G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105: 291-299.
- Cadez, N.**, Zupan, J., Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research* 10: 619-630.
- 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. *EFSA J* 9(10):2407. [97 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2407. (www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- Fleet, G.H.** (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50: 101-117.
- Greco, M.**, Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Pose, G. (2012). Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology* 154: 187-191.
- Leslie, J.F.**, Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell. Profess. Ames, Iowa.
- 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.
- Ostry, V.** (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1: 175-178.
- Pavón, M.A.**, González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker *Alt a 1*. *Food Control* 21: 1745-1756.
- Pitt, J., Hocking, A.** (2009). *Fungi and Food Spoilage*. (3rd ed.). Springer, New York.
- Pizzutti, I.**, Kok, A., Scholten, J., Righi, L., Cardoso, C., Rohers, G., Da Silva, R. (2014). Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 129: 352-63.
- Rousseaux, S.**, Diguta, C.F., Radoi-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M. (2014). Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology* 38:104-121.
- Scott, P.**, Lawrence, B., Lau, B. (2006). Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research* 22: 142-147.
- Simmons, E.G. (2007). *Alternaria: an Identification Manual*. In: Samson R (ed). CBS Biodiversity serie 6. Netherlands.
- Smedsgaard, J.** (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolites production in cultures. *Journal of Chromatography A* 760: 264-270.
- Tournas, V.**, Stack, M. (2001). Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria alternata* grown on fruits at various temperatures. *Journal of Food Protection* 64: 528-532.