



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI
INDIRIZZO PROTEZIONE DELLE COLTURE - CICLO XXI
Dipartimento di Territorio Ambiente e Sistemi Agroforestali

Marciumi secondari dell'uva e rischio micotossine
Ruolo di *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Causin

Co-Supervisore: Dr. Michele Borgo

Dottorando: Gianluca Lucchetta

DATA CONSEGNA TESI

01 febbraio 2010

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

Gianluca Lucchetta, 01 febbraio 2010

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Gianluca Lucchetta, 01 febbraio 2010

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Indice	
<i>Indice</i>	5
<i>Riassunto</i>	7
<i>Summary</i>	9
Capitolo I	11
Marciumi secondari del grappolo e micoflora associata	11
<i>Introduzione</i>	13
Muffa grigia.....	13
Marciume acido.....	14
Marciumi secondari.....	15
<i>Materiali e metodi</i>	20
Piano sperimentale e localizzazione dei vigneti sperimentali.....	20
Campionamento.....	25
Analisi micologiche.....	27
Isolamento e identificazione dei ceppi fungini.....	27
<i>Risultati</i>	29
Indagini 2006.....	29
Indagini 2007.....	38
Confronto degli isolamenti fungini nelle due annate di campionamento.....	49
Confronto tra gli isolamenti in Veneto e Toscana nelle due annate, nelle due varietà comuni (Merlot e Sangiovese).....	50
Capitolo II	51
Identificazione e caratterizzazione di isolati di <i>Alternaria</i> spp.	51
<i>Introduzione</i>	52
Identificazione delle specie di <i>Alternaria</i>	52
Produzione di micotossine.....	54
<i>Materiali e metodi</i>	56
Identificazione specifica degli isolati di <i>Alternaria</i> spp.....	56
Caratterizzazione degli isolati di <i>Alternaria</i> spp. alle diverse temperature e produzione di micotossine.....	59
<i>Risultati</i>	61
Identificazione specifica degli isolati di <i>Alternaria</i> spp.....	61
Variabilità di accrescimenti e produzione di metaboliti tra colture monoconidiali.....	65

Caratterizzazione degli isolati di <i>Alternaria</i> spp. alle diverse temperature e produzione di micotossine	70
Capitolo III.....	90
Effetto di fattori ambientali sulla crescita e sulla produzione di micotossine da parte <i>Alternaria</i> spp.	90
<i>Introduzione</i>.....	91
<i>Materiali e metodi</i>.....	95
Effetto di diversi substrati sulla crescita e sulla produzione di micotossine di <i>Alternaria</i> spp.....	95
<i>Risultati</i>.....	100
Confronto tra DRYES e RA	100
Confronto tra DRYES e succo d'uva	103
Effetto di differenti pH sulla crescita e sulla produzione di micotossine.....	105
Effetto di differenti temperature sulla crescita e sulla produzione di micotossine.....	108
Capitolo IV	111
Caratterizzazione genetica in <i>Alternaria</i> spp. mediante l'utilizzo di marcatori PCR-derivati quali RAPD.	111
<i>Introduzione</i>.....	112
Analisi del genoma mediante marcatori genetici	112
I marcatori molecolari	113
<i>Scopo del lavoro</i>.....	117
<i>Materiali e metodi</i>.....	118
Isolati fungini utilizzati	118
Estrazione del DNA in <i>Alternaria</i>	119
Analisi RAPD.....	120
Analisi dei dati.....	121
<i>Risultati e discussione</i>	123
Confronto tra i gruppi di <i>Alternaria</i> spp.	123
Similarità genetica entro e tra i gruppi	130
<i>Conclusioni</i>.....	133
<i>Bibliografia</i>.....	135

Riassunto

Negli ultimi anni è cresciuta l'attenzione che l'opinione pubblica presta alla qualità e alla sicurezza dei prodotti agroalimentari.

Nell'ambito della filiera vitivinicola ed enologica, i marciumi del grappolo sono senza dubbio tra le cause che più di frequente compromettono la qualità della produzione.

I marciumi del grappolo sono determinati da numerosi agenti patogeni: l'agente eziologico che più frequentemente causa la marcescenza degli acini è *Botrytis cinerea* Pers. (muffa grigia), mentre lieviti e batteri sono associati al marciume acido e differenti specie fungine determinano i marciumi secondari.

I marciumi secondari sono provocati da specie fungine opportunisti, debolmente o affatto patogene, appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus*. Si tratta di patogeni poco aggressivi, dotati di una capacità piuttosto contenuta di infettare la bacca e, in genere la loro diffusione è favorita dalla presenza di lesioni; pur arrecando relativamente pochi danni quantitativi, stanno destando preoccupazioni poiché negli ultimi anni è stata accertata una associazione tra alcuni di essi, in particolare *Aspergillus* e *Penicillium* e la presenza di micotossine nel vino in particolare dell'ocratossina A.

La presenza di specie fungine in grado produrre micotossine su uva e di trasmetterle anche a mosti e vino rappresenta un rischio per la salute.

L'indagine sviluppata nell'ambito del mio dottorato di ricerca ha avuto come obiettivo quello di fornire un contributo alla comprensione del ruolo del genere *Alternaria* nell'ambito dei marciumi secondari del grappolo.

Il genere *Alternaria* e in particolare *A. alternata* rappresentano contaminanti fungini diffusi in numerosi ambienti e che contaminano con le loro micotossine numerosi prodotti agricoli, in genere frutta e ortaggi, a livello dei quali producono perdite quantitative e qualitative anche considerevoli.

La presenza di *Alternaria* su uva è nota, ma scarsa attenzione è stata finora rivolta alla caratterizzazione del profilo dei metaboliti secondari prodotti dagli isolati presenti su uva.

La problematica relativa alla presenza di *Alternaria* su uva, nell'ambito della mia indagine è stata affrontata su quattro differenti livelli.

Il primo passo è stata la valutazione della micoflora del grappolo su uve di differente provenienza e appartenente a diversi vitigni, per valutare la presenza di *Alternaria* e la sua distribuzione.

Il passo successivo è stato rappresentato dalla caratterizzazione di una parte dei ceppi isolati nelle fasi di campionamento sulla base delle caratteristiche morfologiche e metaboliche, in particolare per definire la loro potenzialità tossigena, su substrato induttore, e per verificare se la crescita in

differenti condizioni di temperatura può essere di aiuto nella delimitazione delle specie o dei gruppi di specie.

In seguito, su un certo numero di isolati, è stata effettuata la valutazione dell'effetto di fattori ambientali come la composizione del substrato e la temperatura alla quale si sviluppano le colonie sulla crescita e sulla produzione di micotossine.

In particolare, è stata valutata la produzione di tossine su substrato a base di succo d'uva, oltre che di riso, per definire le effettive capacità di produzione di micotossine su uva.

La parte conclusiva è rappresentata dall'utilizzo di marcatori RAPD come strumenti per definire la similarità tra gli isolati e la presenza di gruppi di isolati coerenti con i gruppi morfologici di specie.

Come osservato da altri autori, la corrispondenza tra i gruppi delimitati sulla base di marcatori molecolari differenti e quelli definiti su base morfologica non sempre coincidono, in particolare per isolati appartenenti alla specie, o al gruppo di specie di *A. alternata* e *A. tenuissima*, mentre gli isolati del gruppo di *A. arborescens* vengono più nettamente distinti rispetto ai due gruppi precedenti.

Summary

In the last years, it's increased the attention for safe food and public health.

In the viticulture and in the wine-making industry, bunch rots are the main cause of quality production decrease, due to loss of products and mycotoxins contamination.

Bunch rots are caused mainly by *Botrytis cinerea* (grey mould), whilst yeast and bacteria species are associated to sour roto of grapes and different fungal specie are involved to the development of secondary bunch rots.

Secondary bunch rots are produced by different fungal species, slightly pathogenic and opportunistics species belonging to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus* genera; the presence of these fungal species is often associate with skin lesion of berry, and the main worry for this species is due to the production of toxic metabolites.

In the last years increasing attention about these fungal species is due to the association of species of some *Aspergillus* and *Penicillium* species with micotoxin contamination of grapes and grape-products, i.e wine, particularly for the presence of ochratoxin A.

The presence of micotoxin-producing species and its ability to relase these chemicals in must and wine is an hazardous for public health.

In my PhD research I've focused my attention to give a contribute to the knowledge of the role of *Alternaria* species in the development of secondary bunch rots.

The genus *Alternaria*, and mainly *A. alternata* fungal presence are common in many environments were they are able to contaminate with their mycotoxins many agricultural products, usually fruits and vegetables, both of which produce qualitative and quantitative losses.

The presence of *Alternaria* in grapes is known, but only few researches has been done to evaluate the characterization of the secondary metabolites profile produced by these isolates on grapes. The issue of the presence of *Alternaria* in grapes, in my inquiry was addressed to four different levels.

The first step was to evaluate the mycoflora of grapes samples from different place and belonging to different varieties, to assess the presence of *Alternaria* and its distribution. The next step was represented by the characterization of some strains isolated from grapes on the basis of morphological and metabolic characters, particularly to evaluate their potential toxigenic, on inducer substrate, and whether the growth in different temperature conditions may aid in the species or species groups identification.

Subsequently, a number of isolates was evaluated to assess the effect of environmental factors such as substrate composition and temperature on the growth and production of mycotoxins.

In particular, it was evaluated the production of toxins on grape juice, and rice, to evaluate the production of mycotoxins on grapes.

The final part is the use of RAPD molecular markers as tools to evaluate the similarity between the isolates and the presence of groups consistent with the morphological groups of species. As observed by other authors, the correspondence between groups defined on the basis of different molecular markers and those defined on a morphological basis is not always coincide, especially for isolates belonging to the species or species group, of *A. alternata* and *A. tenuissima*, whereas isolates of *A. arborescens* group are more distinct than the two previous groups.

Capitolo I

Marciumi secondari del grappolo e micoflora associata

Introduzione

Nell'ambito della filiera vitivinicola ed enologica i marciumi del grappolo sono senza dubbio tra le cause che più di frequente compromettono la qualità della produzione.

I marciumi del grappolo sono determinati da numerosi agenti patogeni: tra questi, quello che più frequentemente causa la marcescenza degli acini è *Botrytis cinerea* Pers., responsabile della malattia nota come muffa grigia, mentre lieviti e batteri sono associati al marciume acido e differenti specie fungine determinano i marciumi secondari.

Tutti i patogeni che provocano le citate malattie presentano delle caratteristiche in comune:

danno un marciume molle, ovvero determinano la perdita di consistenza dell'acino tramite la sintesi di enzimi litici in grado di attaccare le sostanze pectiche;

sono parassiti facoltativi in grado di svilupparsi su matrici diverse dalla bacca e sono spesso rinvenibili come saprofiti su substrati vegetali in via di decomposizione;

il loro insediamento sull'ospite è reso possibile o facilitato dal crearsi di soluzioni di continuità dovute a lesioni di natura biotica (insetti, tra i quali tignole dell'uva e tripidi, altri patogeni fungini, in particolare l'oidio, uccelli) e abiotica (eventi meteorici);

sono in grado di produrre dei metaboliti che compromettono la qualità delle uve (Vercesi, 2006).

Muffa grigia

La muffa grigia è causata da *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. (teleomorfo di *Botrytis cinerea* Pers.), fungo polifago ed ubiquitario; è la malattia litica più diffusa in vigneto e, oltre all'ambito viticolo, arreca notevoli danni a numerose altre colture e rappresenta il principale agente di alterazione dei prodotti ortofrutticoli in post-raccolta (Faretra, Pollastro, 2001).

B. cinerea risulta presente in ogni fase fenologica della vite in virtù della sua attitudine saprofitaria, che le consente di svilupparsi attivamente anche su altro materiale vegetale non più vivente; questo aspetto è stato evidenziato attraverso studi in vigneto, che hanno permesso di osservare la presenza di organi di diffusione del patogeno (conidi), anche quando l'ospite è privo di vegetazione.

In relazione alle fasi fenologiche, la presenza di conidi nell'aria evidenzia un primo picco in corrispondenza alla fioritura, per poi diminuire progressivamente fino all'invaiaatura; da questa fase in poi, si osservano progressivi incrementi fino al raggiungimento della massima concentrazione dei conidi nell'aria in concomitanza della vendemmia.

L'incidenza della muffa grigia in vigneto è legata a vari parametri biotici ed abiotici.

La temperatura, nei nostri climi, non sembra un fattore limitante lo sviluppo e il completamento del ciclo biologico del patogeno, mentre le precipitazioni influenzano direttamente o indirettamente la presenza nell'aria dei conidi. Studi epidemiologici confermano che vi è una colonizzazione più o meno estesa della bacca nelle fasi fenologiche precoci, ma tendono a ridurre l'importanza delle infezioni che avvengono prima dell'invasatura, in virtù della loro tendenza a decrescere nel tempo, mentre danno maggiore importanza all'inoculo che si sviluppa a partire dall'invasatura in poi.

Ciò ribadisce l'importanza del trattamento da effettuare entro la chiusura del grappolo (fase B) , in particolare se eseguito con prodotti citotropici che possono contenere le infezioni già presenti nella bacca .

A parità di altre condizioni, la colonizzazione del grappolo è favorita nei vitigni a grappolo compatto e con ridotto spessore della buccia.

La prevenzione mira all'attuazione di interventi che riducano l'eccessivo rigoglio vegetativo, l'insorgenza di lesioni e l'esposizione della bacca a prolungati periodi di bagnatura e prevedere un razionale piano di controllo delle tignole dell'uva e dell'oidio, che facilitano l'infezione tramite la formazioni di lesioni a carico dell'acino.

In presenza di piogge frequenti è, però, necessario l'intervento con prodotti ad azione antibottrica che assicurino un'adeguata protezione del grappolo (Vercesi, 2006).

Marciume acido

Si tratta di una malattia di una certa importanza in alcuni vitigni; si manifesta ad invasatura avanzata e più di frequente in prossimità della vendemmia.

La sintomatologia è caratterizzata dal pungente odore di aceto, dalla deliquescenza delle bacche, associata all'abbondante fuoriuscita di succo che cola sugli acini sottostanti conferendo una tipica lucentezza. Gli acini colpiti sono interessati dall'abbondante presenza di *Drosophila* spp. (moscerino della frutta), le cui larve agiscono lesionando le bacche e diffondendo il marciume; a seguito dell'infezione le varietà a bacca bianca assumono colore marrone chiaro, mentre le varietà a bacca nera colore violaceo.

Gli agenti eziologici sono rappresentati da varie specie di lieviti (*Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces uvi*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida* spp.) e batteri (in minor misura: *Acetobacter*); si tratta di organismi incapaci di penetrazione attiva nella bacca, per cui lo sviluppo di tale tipologia di marciume è strettamente connessa alla presenza di lesioni che si riscontra di frequente su vitigni a grappolo compatto (Bisiach et. al., 1986; Guerzoni, Marchetti, 1987; Barata et. al., 2008 a, b).

Spesso il marciume acido si sviluppa contemporaneamente o a breve distanza dalla muffa grigia, in genere inibendone lo sviluppo, e può provocare sensibili perdite quantitative nonché rischi in fermentazione e peggioramenti qualitativi dei vini (Faretra, Pollastro, 2001; Zoecklein et. al., 2001). Non è attualmente possibile una difesa diretta e il controllo di tale patologia è basato esclusivamente su misure di carattere preventivo, quali la riduzione delle cause che possono provocare lesioni alle bacche, e un efficace contenimento delle infezioni di oidio e delle infestazioni di tignole. Nelle località nelle quali il marciume acido si manifesta frequentemente, in fase di impianto di un nuovo vigneto, andrebbero evitati i vitigni a grappolo eccessivamente compatto e a buccia sottile (Bisiach et. al., 1986; Guerzoni, Marchetti 1987).

Marciumi secondari

I marciumi secondari sono sostenuti da funghi opportunisti, debolmente o non patogeni, appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus*. Si tratta di patogeni poco aggressivi, dotati di una capacità piuttosto contenuta di infettare la bacca e, in genere la loro diffusione è favorita dalla presenza di lesioni; pur arrecando relativamente pochi danni quantitativi, stanno destando preoccupazioni poiché negli ultimi anni è stata accertata una associazione tra alcuni di essi, in particolare *Aspergillus* e *Penicillium* e la presenza di micotossine nel vino (Abrunhosa et al., 2001) in particolare dell'ocratossina A (Logrieco et. al., 2003).

Le recenti e numerose direttive dell'Unione Europea e di altri Organismi internazionali (FAO, OMS) e Nazionali (Ministero della Sanità), impongono una sorveglianza non più limitata a ispezioni nei punti terminali delle filiere agro-alimentari, ma dei controlli da effettuare nel corso di tutte le fasi che costituiscono la filiera produttiva.

L'ocratossina A (OTA) è una potente nefrotossina, provvista di azione cancerogena e teratogena, immunotossica e probabilmente neurotossica e genotossica. Nel 1993 lo IARC ha incluso l'OTA nel gruppo 2B, che comprende sostanze di accertata cancerogenicità per gli animali e potenziale per l'uomo (Battilani, Pietri, 2002).

Risale al 1996 la prima indicazione di OTA nel vino e, successivamente in derivati dell'uva quali mosti concentrati, succhi d'uva, uva passa (Zimmerli, Dick, 1996; Pollastro et. al., 2005; Battilani et. al., 2006; Mateo et. al., 2007). Allo stato attuale è la micotossina maggiormente presente e pericolosa su uva e derivati e sottoposta a normativa dell'Unione Europea che ne ha fissato con il Reg. (CE) n°1881/2006 del 19/12/2006 il limite massimo tollerabile a 2,0 µg/kg nel vino, in bevande a base di succo d'uva, nei succhi e nel mosto, e a 10 µg/kg nelle uve secche.

Le specie di *Aspergillus* appartenenti alla Sezione *Nigri* (“*black aspergilli*”, o *aspergilli* neri), in particolare la specie *A. carbonarius*, sono i principali responsabili delle contaminazioni da ocratossina A nell’uva e nei suoi derivati (Cabañes et. al., 2002; Abarca et. al., 2003; Bau et. al., 2005; Bellí et. al., 2006; Perrone et. al., 2006; Tjamos et. al., 2006); la popolazione di *A. carbonarius*, in particolare, è caratterizzata da un’alta percentuale di ceppi produttori di OTA, in grado di sintetizzare quantità considerevoli di tossina in un limitato periodo di tempo (Battilani et. al., 2006).

I “*black aspergilli*” possono essere presenti sui grappoli dalle prime fasi del loro sviluppo, ma la loro presenza diventa rilevante solo tra invaiatura e raccolta.

La contaminazione da OTA è stata riscontrata fin dalle prime fasi di maturazione; la composizione della bacca influenza fortemente la produzione di OTA da parte di *A. carbonarius*, in particolare è stata osservata una correlazione positiva con l’acidità totale e negativa con la concentrazione di zuccheri riducenti (Serra, 2006).

I fattori più importanti nel determinare lo sviluppo di *aspergilli* neri, e in particolare di *A. carbonarius*, sono quelli meteorologici (Hocking et. al., 2007); in generale, è stata osservata una correlazione positiva tra temperatura e infezione della bacca da parte degli *aspergilli* neri, infatti, la contaminazione da ocratossina A e la presenza di specie di *aspergilli* neri, in particolare di *A. carbonarius*, sembrano essere maggiori nelle annate più calde e asciutte (Borgo et. al., 2008). La correlazione tra umidità relativa, precipitazioni e OTA, non è risultata sempre evidente (Bellí et. al., 2006). Ciò può dipendere dal momento in cui avvengono le piogge. Alcuni studi hanno evidenziato che negli anni in generale più freschi e piovosi si nota una presenza minore di queste specie fungine, che aumenta, come già visto, con clima caldo e secco. Se le piogge, invece, si collocano negli ultimi 20 giorni di maturazione dei grappoli (fine agosto-primi di settembre) sembrano aumentare il rischio di accumulo della tossina. Dati raccolti in Italia dal 1999 al 2005 hanno evidenziato che le uve raccolte nelle due annate caratterizzate da abbondanti piogge nel periodo di fine maturazione dei grappoli hanno mostrato livelli elevati di OTA (Battilani, Silva, 2006).

Proprio per le diversità climatiche, l’area geografica assume particolare importanza, permettendo di evidenziare un aumento della presenza della micotossina nelle uve da Nord a Sud, con elevate presenze di OTA soprattutto in Puglia. Da uno studio condotto su diversi campioni di uva raccolti in vigneti del Nord, Centro e Sud d’Italia, nel periodo 2003-2007 é emerso che *A. niger* è la specie prevalente, seguita da *A. carbonarius*, presente quasi esclusivamente nelle regioni del Sud; la presenza di *Aspergilli* neri, anche in questo caso, sembra crescere con la temperatura e diminuire con l’umidità relativa dell’aria. (Borgo et. al., 2008).

Marciumi evidenti a carico delle bacche sono raramente visibili, in vigneto, nelle regioni del Nord Italia, mentre sono più frequenti nelle regioni del Sud (Battilani e Silva, 2006). Tuttavia, anche in vigneti del Nord Italia, in annate caratterizzate da andamenti climatici particolarmente caldi e siccitosi o da situazioni favorevoli a frequenti fessurazioni della bacca, si possono verificare accumuli di OTA, più frequenti in invaiatura. In tali circostanze l'applicazione di trattamenti con anilino pirimidine o con la miscela cyprodinil+fludioxonil è stata di notevole efficacia sia nei confronti dei funghi ocratossigeni sia nella produzione di micotossina (AA. VV., 2006).

Oltre all'andamento climatico, le lesioni agli acini provocate dalle tignole giocano un ruolo importante nello sviluppo dei marciumi secondari, in particolare sulle contaminazioni delle uve da specie di *Aspergillus* e *Penicillium* (Borgo et. al., 2006). Risultati ottenuti da campioni di uva raccolti in vigneti pugliesi, hanno evidenziato come alti livelli di OTA siano associati ad alte presenze di *aspergilli* neri, in prevalenza su bacche danneggiate da tignolette (*Lobesia botrana*) (Cozzi, et. al., 2006); per quanto riguarda le caratteristiche del grappolo, in genere le uve a bacca rossa sono più contaminate di quelle a bacca bianca (Otteneder H., Majerus P., 2000; Pietri et. al., 2001; Lo Curto, 2004).

Una corretta gestione della problematica associata alla presenza di OTA prevede l'individuazione di punti critici di controllo, sia in vigneto che in cantina.

Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, con Decreto del 16 maggio 2006 (G.U. n°125 del 31/05/2006), ha stilato un codice di buone pratiche vitivinicole, con l'obiettivo di fornire gli strumenti per una corretta gestione dei possibili rischi di contaminazione da OTA nei prodotti derivati della vite. Tali raccomandazioni scaturiscono dai risultati della ricerca scientifica sull'ocratossina A e sulle cause che ne determinano la presenza sull'uva e nei prodotti derivati e sono soggette ad aggiornamenti con il progredire delle conoscenze.

Le misure di carattere preventivo sono essenzialmente effettuate in vigneto, mentre quelle di cantina hanno il valore di misure solamente correttive.

Nell'ambito della gestione del vigneto vengono definiti alcuni aspetti di ordine agronomico e fitopatologico, quali:

- individuare gli ambienti esposti a maggiore rischio di contaminazione da *Aspergillus* ed evitare l'impianto di vigneti in tali zone;
- migliorare i piani di lotta antiparassitaria finalizzati alla salvaguardia della qualità delle produzioni, che permettano un adeguato controllo degli agenti biotici in grado di arrecare danno all'integrità delle bacche (oidio, tignole dell'uva), e agli agenti di marciume, con l'obiettivo della riduzione del rischio di contaminazioni da micotossine;
- quantificare e analizzare la composizione della micoflora dell'uva;

- valutare il ruolo dei fattori eco-pedologici, climatico-varietali e tecnico-colturali, con una idonea gestione del suolo, la scelta di vitigni meno suscettibili all'attacco da parte di agenti di marciume secondario, l'attuazione di un razionale piano di concimazione, in particolare un equilibrato apporto azotato, per limitare eccessi di vigoria;
- assicurare un'adeguata qualità sanitaria delle uve in fase di maturazione, in quanto uve sane, non danneggiate ed esenti da marciumi visibili sono la premessa per una sicurezza della produzione;
- valutare attentamente la data di raccolta per ottenere un prodotto con un ottimale livello di maturazione;
- trasportare le uve raccolte in cantina in tempi brevi, soprattutto in presenza di abbondante succo;

Risulta cruciale in particolare il controllo dell'integrità delle bacche (Hocking et. al., 2007), la riduzione delle cause che producono lesioni della buccia, in particolare insetti e patogeni fungini e il monitoraggio della presenza di *aspergilli* neri, dall'invasatura alla raccolta, con l'utilizzo di fungicidi attivi anche contro queste specie fungine (Leong et. al. ,2006).

Gli interventi in cantina ed in fase di vinificazione sono mirati a:

effettuare delle analisi per la determinazione del contenuto di OTA, nei casi di situazioni ad elevato rischio di contaminazione e, in tali casi, ridurre i tempi di macerazione delle bucce, evitando comunque il riscaldamento del pigiato e le macerazioni intense e prolungate;

calibrare l'intensità della pressatura allo stato sanitario delle bacche;

utilizzare coadiuvanti e prodotti di chiarificazione contenenti carbone enologico (attenzione all'influenza del carbone sulla qualità del vino);

al termine della fermentazione è consigliato svinare quanto prima il prodotto.

La fase di pigiatura e la fase di macerazione delle bucce e del mosto rappresentano punti cruciali che possono aumentare i livelli della micotossina. Le fasi successive della lavorazione portano ad un abbattimento dei livelli dell'OTA, in particolare la fermentazione alcolica e malolattica, causano una riduzione del contaminante. L'uso di coadiuvanti contenenti carbone vegetale che agiscono principalmente per adsorbimento e le operazioni di illimpidimento portano ad una ulteriore riduzione della micotossina, che viene in parte accumulata nel sedimento, anche se le operazioni descritte possono non essere sufficienti a raggiungere un tenore di OTA inferiore a 2 µg/L, livello massimo fissato dalla vigente normativa (Battilani, Silva, 2006; Solfrizzo, 2006).

Oltre a quanto finora riferito per *A. carbonarius*, la valutazione della contaminazione fungina tra diversi vitigni coltivati in due differenti ambienti viticoli italiani, ha permesso di rilevare e quantificare la presenza anche di altri generi fungini in grado di produrre micotossine, in particolare

di organismi appartenenti al genere *Alternaria* (Lucchetta et al., 2009). Si tratta di specie in grado di arrecare danni notevoli ad altre colture e derrate, causando sia perdite quantitative, sia contaminazione da micotossine, ma il cui ruolo nell'ambito della microflora del grappolo è ancora poco noto (Duncan et. al., 1995; Logrieco, 2001; Logrieco et. al., 2002). La loro presenza nel grappolo è stata ripetutamente confermata (Magnoli et. al., 2003; Medina et. al., 2005; Bau et. al., 2005; Romero et. al., 2005; Tournas Katsoudas, 2005), ed è stato visto anche che con il progredire della maturazione vi è un incremento delle specie del genere *Aspergillus* e una riduzione di *Alternaria* e *Cladosporium* (Bau et. al., 2005).

Il confronto tra uve delle cultivar Merlot e Sangiovese raccolte in Veneto e in Toscana, ha messo in luce come, per entrambi i vitigni, i campioni raccolti in Veneto siano significativamente più contaminati da *Alternaria* spp., rispetto alle uve raccolte in Toscana (Lucchetta et al., 2009); il dato merita ulteriori approfondimenti, ma getta luce su altre problematiche di tipo sanitario a carico di specie fungine produttrici di micotossine diverse da OTA quali, appunto, quelle prodotte dalle specie del genere *Alternaria* tra le quali figurano l'alternariolo (AOH), il suo derivato alternariolo metil etere (AME), l'acido tenuazonico (TA), l'altenuene (ALT), le altertossine (ATX-I, II, III) (Logrieco et. al., 2003).

Nel considerare la qualità e la sicurezza sanitaria degli alimenti, la problematica dei marciumi secondari del grappolo e della contaminazione da micotossine di uva e derivati, vino in particolare, riveste una notevole importanza e il contributo di specie fungine micotossigene diverse da *Aspergillus* spp. lungo la filiera viti-vinicola ed enologica merita una opportuna considerazione al fine di garantire la sanità del prodotto e la tutela del consumatore.

Materiali e metodi

Piano sperimentale e localizzazione dei vigneti sperimentali

Nel corso delle annate 2006 e 2007 sono stati effettuati dei campionamenti di uve da due differenti ambienti viticoli italiani, in Veneto e in Toscana presso due aziende sperimentali del C.R.A., Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura.

Le aziende sono situate rispettivamente a Spresiano (TV), presso il C.R.A. - Centro di Ricerca per la Viticoltura, e a Pratantico (AR), presso il C.R.A. - Unità di ricerca per la Viticoltura.

Il vigneto del C.R.A. - Centro di Ricerca per la Viticoltura, sito a Spresiano (TV), è posto in località pianeggiante, ad un'altezza sul livello del mare di 56 metri. Il terreno è a scheletro prevalente, la forma d'allevamento dei vitigni è il Sylvoz con sesto d'impianto 3x1,5 metri; la gestione del suolo prevede lo sfalcio sull'interfila e il diserbo sulla fila con glifosate.

In Figura 1 e 2 è riportato l'andamento climatico, con i dati giornalieri relativi a temperature medie (°C), precipitazioni (mm), ed umidità relativa (%) nel periodo 01 luglio – 30 settembre, rispettivamente per il 2006 e per il 2007, mentre in Tabella 1 è indicato il prospetto riepilogativo per le due annate.

Il vigneto del C.R.A. - Unità di ricerca per la Viticoltura, sito a Pratantico (AR) è posto ad un'altezza sul livello del mare di 232 metri. Il terreno è franco-argilloso, la forma d'allevamento a cordone speronato con sesto d'impianto 3x1 metri; la gestione del suolo prevede lo sfalcio sull'interfila e il diserbo sulla fila con glifosate.

In Figura 3 e 4 è riportato l'andamento climatico, con i dati giornalieri relativi a temperature medie (°C), precipitazioni (mm), ed umidità relativa (%) nel periodo 01 luglio – 30 settembre, rispettivamente per il 2006 e per il 2007, mentre in Tabella 2 è indicato il prospetto riepilogativo per le due annate.

Il piano sperimentale ha preso in considerazione 5 vitigni, con diversa suscettibilità ai marciumi, nei due ambienti viticoli e su campioni di uve con differente stato sanitario.

Obiettivo del lavoro è stato il monitoraggio della micoflora del grappolo in particolare dei generi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e relativi teleomorfi, se presenti.

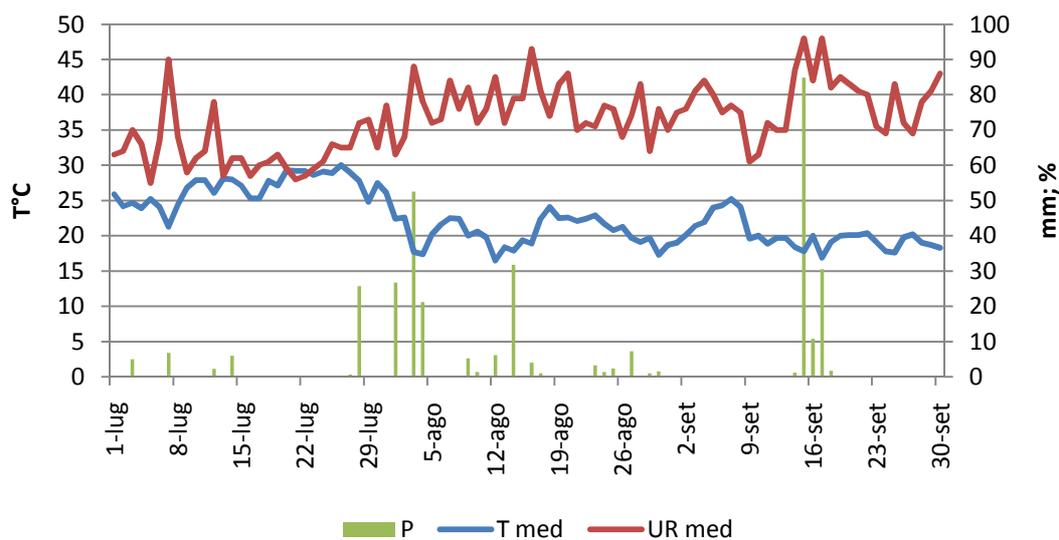


Figura 1. Veneto, Spresiano (TV). Andamento climatico nel periodo 01/07/2006 – 30/09/2006.
Dati giornalieri rilevati: temperatura media (T, °C); precipitazioni (P, mm); umidità relativa media (U.R., %).

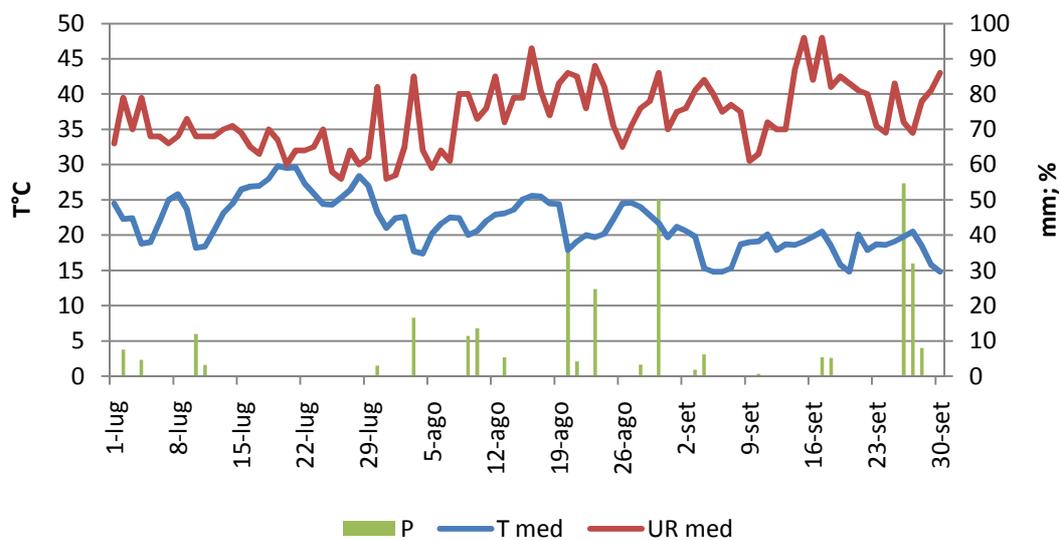


Figura 2. Veneto, Spresiano (TV).
Andamento climatico nel periodo 01/07/2007 – 30/09/2007.
Dati giornalieri rilevati: temperatura media (T, °C); precipitazioni (P, mm); umidità relativa media (U.R., %).

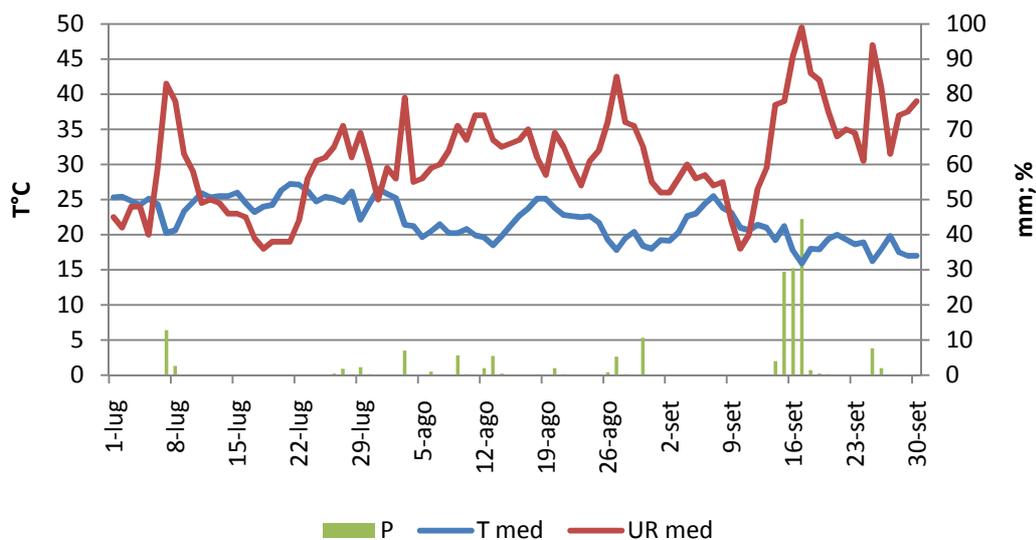


Figura 3. Toscana, Praticello (AR).

Andamento climatico nel periodo 01/07/2006 – 30/09/2006.

Dati giornalieri rilevati: temperatura media (T, °C); precipitazioni (P, mm); umidità relativa media (U.R., %).

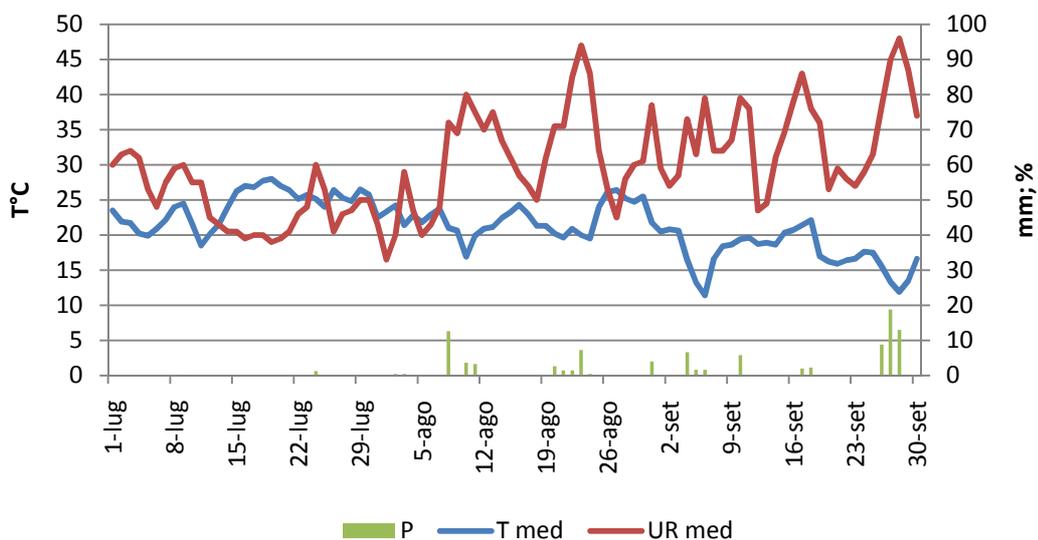


Figura 4. Toscana, Praticello (AR).

Andamento climatico nel periodo 01/07/2007 – 30/09/2007.

Dati giornalieri rilevati: temperatura media (T, °C); precipitazioni (P, mm); umidità relativa media (U.R., %).

Tabella 1. Veneto, Spresiano (TV).**Prospetto riepilogativo principali dei parametri climatici. Annate 2006 e 2007.****Periodo di rilevazione: 01/07 – 30/09.**

Parametro	T media (°C)		U.R. (%)		P (mm)	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
media	22,5	21,6	73	74	3,7	3,4
min	16,5	14,8	55	56	0,0	0,0
max	30,0	29,8	96	96	84,8	54,7
somma	2067,4	1985,5	-	-	342,8	310,9
n°eventi piovosi					27	22

Tabella 2. Toscana, Pratantico (AR).**Prospetto riepilogativo principali dei parametri climatici. Annate 2006 e 2007.****Periodo di rilevazione: 01/07 – 30/09.**

Parametro	T media (°C)		U.R. (%)		P (mm)	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
media	22,0	21,3	61	60	2,0	1,1
min	15,9	11,4	36	33	0,0	0,0
max	27,2	28,0	99	96	44,4	18,8
somma	2025,6	1958,7	-	-	181,0	99,2
n°eventi piovosi					31	23

Le temperature medie registrate nel vigneto di Spresiano (TV) sono state simili nelle due annate, sia come dato medio del periodo di rilevazione, che per le temperature medie più basse e più elevate registrate nel periodo.

Le precipitazioni sono state maggiori nel 2006, rispetto al 2007, sia come dato cumulato che come dato massimo giornaliero e come numero di eventi piovosi nel periodo.

Il dato relativo all'umidità relativa media non è stato differente tra le due annate.

Anche nel vigneto di Pratantico (AR) le temperature medie registrate nelle due annate, nel periodo di rilevazione, sono state simili, sia per il dato medio che per il dato massimo; il dato minimo è stato invece leggermente inferiore.

Le precipitazioni sono state decisamente più elevate nel 2006, con un dato cumulato nel periodo circa doppio rispetto al 2007 e con un simile rapporto anche per il dato medio e massimo giornaliero; anche il numero di eventi piovosi è stato inferiore.

Come osservato per il vigneto di Spresiano, anche qui il dato dell'umidità relativa media non è stato differente tra le due annate.

Il confronto tra le due località permette di rilevare che le temperature medie del periodo non sono state differenti, il valore più elevato della temperatura media nel 2006 è stato simile, mentre nel 2007 tale dato è stato più elevato per Spresiano.

Il dato di umidità relativa è stato più alto in Veneto, in entrambe le annate, sia come dato medio che come dato minimo registrato nel periodo; anche le precipitazioni sono state differenti, in particolare sono state più elevate in Veneto. Il dato medio, massimo e cumulato delle precipitazioni nel periodo è stato circa doppio per il Veneto, nel 2006 e circa triplo nel 2007.

Tabella 3. Prospetto dei campioni raccolti nei due vigneti sperimentali ed analizzati nell'annata 2006.

Provenienza	Vitigno	Campionamento			Stato sanitario	N° campioni
Toscana Pratantico (AR)	Merlot	Prevendemmia	I	05-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	21-set	Sano	3
	Montepulciano	Prevendemmia	I	21-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	II	02-ott	Sano	3
	Sangiovese	Prevendemmia	I	21-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	02-ott	Sano	3
n° campioni Toscana						27
Veneto Spresiano (TV)	Merlot	Prevendemmia	I	23-ago	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	04-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	13-set	Sano	3
	Negro amaro	Prevendemmia	I	06-set	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	13-set	Sano/tignolato	6
	Pinot grigio	Prevendemmia	I	07-ago	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	17-ago	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	28-ago	Sano	3
	Primitivo	Prevendemmia	I	06-set	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	13-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	20-set	Sano	3
	Sangiovese	Prevendemmia	I	18-set	Sano/tignolato	6
n° campioni Veneto						63
n° complessivo campioni						90

Tabella 4. Prospetto dei campioni di uva raccolti nei due vigneti sperimentali ed analizzati nell'annata 2007.

Provenienza	Vitigno	Campionamento			Stato sanitario	N° campioni
Toscana Pratantico (AR)	Merlot	Prevendemmia	I	05-set	Sano/tignolato	6
		Vendemmia	I	11-set	Sano	3
	Montepulciano	Prevendemmia	I	11-set	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	20-set	Sano	3
	Sangiovese	Vendemmia	I	25-set	Sano	3
		Prevendemmia	I	11-set	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	20-set	Sano	3
		Vendemmia	I	25-set	Sano	3
n° campioni Toscana						33
Veneto Spresiano (TV)	Merlot	Prevendemmia	I	06-ago	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	21-ago	Sano/tignolato	6
	Negro amaro	Prevendemmia	I	23-ago	Sano	3
		Prevendemmia	II	28-ago	Sano	3
	Pinot grigio	Prevendemmia	I	25-lug	Sano/tignolato	6
		Prevendemmia	II	01-ago	Sano/tignolato	6
	Primitivo	Prevendemmia	I	23-ago	Sano	3
		Prevendemmia	II	28-ago	Sano	3
	Sangiovese	Prevendemmia	I	28-ago	Sano	3
		Prevendemmia	II	06-set	Sano	3
n° campioni Veneto						42
n° complessivo campioni						75

Le date di raccolta variano in relazione alla precocità dei diversi vitigni e alla diversa fenologia nei due ambienti.

Campionamento

I vitigni considerati nel piano sperimentale sono Merlot, Montepulciano, Negroamaro, Pinot grigio, Primitivo e Sangiovese.

I campioni di uve sottoposti ad analisi micologiche sono stati raccolti in due fasi:

- in pre-vendemmia, con uno (Centro) o due (Nord) campionamenti; per il Centro la raccolta è stata effettuata una settimana prima della vendemmia, per il Nord, rispettivamente due ed una settimana prima della vendemmia; fa eccezione per il Nord il Sangiovese, per la quale non è stato possibile effettuare la raccolta in pre-vendemmia, per cui è stato effettuato solo il

campionamento alla vendemmia, e il Merlot, per il quale è stata effettuata una sola raccolta in prevendemmia.

– in vendemmia.

In pre-vendemmia, il campionamento è stato effettuato distinguendo tra uva sana, non interessata da danni biotici (marciumi, peronospora, oidio, lepidotteri carpofagi) o abiotici (spaccature da grandine, squilibri idrici), e uva danneggiata da lepidotteri carpofagi, quando presente (tignola o tignoletta, *Eupoecilia ambiguella* e *Lobesia botrana* a seconda dell'ambiente dei raccolta), allo scopo di valutare l'effetto sulla micoflora dei danni alla bacca da larve carpofaghe.

I campioni alla vendemmia sono composti, invece, da uva sana.

La scelta di differenziare la raccolta nelle due fasi è motivata essenzialmente dal fatto che, in genere, il danno da tignole è maggiore nelle fasi pre-vendemmiali e che il campionamento in pre-vendemmia condiziona la disponibilità, alla vendemmia, di acini danneggiati.

Per ciascun campionamento e per ciascuno dei due stati sanitari (uva integra/uva con danni da tignola), sono state raccolte 3 ripetizioni, per un totale di 6 campioni, per ciascuna raccolta pre-vendemmiale e per ciascuna varietà. Complessivamente, sono stati raccolti e sottoposti ad analisi 90 campioni di uve, ripartiti per ambiente, varietà e date di prelievo come indicato in Tabella 1, per il 2006 e 75 nel 2007.

Il campionamento, effettuato su filare, è stato di tipo sistematico: da ciascun filare oggetto della prova sono state ricavate 3 ripetizioni entro le quali sono stati raccolti casualmente, da almeno 50 grappoli e, all'interno di ciascun grappolo in maniera casuale nelle diverse posizioni dello stesso con lo scopo di ottenere un campione il più rappresentativo possibile, dei racemuli di uva per complessivi 800-1000 g.

I campioni sono stati raccolti in sacchetti puliti di materiale plastico, posti in contenitori refrigerati e portati o spediti, a seconda della provenienza presso il laboratorio di micologia del C.R.A. - Centro di Ricerca per la Viticoltura di Conegliano, dove sono state condotte le successive analisi micologiche.

Per i campioni raccolti a Spresiano, la raccolta è stata effettuata su uve asciutte, a metà mattina, e i campioni sono stati sottoposti ad analisi micologiche nella medesima giornata del campionamento.

Per i campioni provenienti da Arezzo e da Corato, i campioni sono stati raccolti in mattinata e spediti con corriere espresso, giunti a Conegliano nell'arco di 1-2 giorni e sottoposti ad analisi micologiche il giorno stesso della consegna.

Analisi micologiche

Le analisi sono state condotte con il metodo delle diluizioni seriali in piastra.

Ciascun campione è stato inizialmente sottoposto a pigiatura manuale e successivamente da ciascun campione sono stati prelevati 200 g di succo e 200 g di polpa, bucce e pedicelli, posti in beute sterili e di tale sospensione iniziale è stata allestita una diluizione iniziale 1:2 con una soluzione di peptone batteriologico sterile allo 0,1% (Bacteriological peptone, Oxoid).

I campioni così diluiti sono stati posti in agitazione su agitatore orbitale a piatto per 15' per permettere una adeguata sospensione dei propaguli fungini (conidi, spore, frammenti di micelio) presenti nel campione; al termine, da ciascun campione è stata raccolta un'aliquota di circa 50 ml della quale sono state allestite le successive diluizioni seriali decimali.

Sono state allestite 5 diluizioni seriali a fattore 10, da 1:1 ad 1:10000, utilizzando, come nella diluizione iniziale, una soluzione sterile di peptone batteriologico allo 0,1%.

Da ciascuna delle diluizioni sono state inoculate 3 aliquote da 100 µl su altrettante piastre Petri; ciascuna aliquota è stata distribuita omogeneamente, fino a completo assorbimento, su tutta la superficie del substrato con un'ansa di vetro, immersa in etanolo assoluto e sterilizzata alla fiamma. Le piastre sono state poste in sacchetti di plastica e messe ad incubare per 6-8 giorni alla temperatura di 25°C, al buio in armadi climatici.

Il mezzo di coltura impiegato è stato Dichloran Yeast extract Sucrose 18% Glycerol agar (DYSG) modificato sostituendo l'antibiotico tetraciclina con una concentrazione doppia di cloramfenicolo, senza perdita di efficacia del mezzo (Pitt, Hocking 1999); tale substrato è stato messo a punto per i funghi xerofili, ma che, per le sue caratteristiche si è dimostrato idoneo anche all'isolamento, con il metodo delle diluizioni su piastra, anche di funghi mesofili. Inoltre, per le sue caratteristiche, limita la crescita radiale delle specie fungine a rapido accrescimento radiale come *Aspergillus* ed *Alternaria*, permettendone un conteggio più agevole, senza influire significativamente sulla germinazione dei conidi, inibisce nel contempo lo sviluppo di specie a crescita particolarmente rapida, quali *Mucor* e *Rizophus...*) e di *Botrytis* (Samson et al., 2000).

Isolamento e identificazione dei ceppi fungini

Al termine del periodo di incubazione, sulla piastre inoculate è stata valutata l'entità della crescita fungina mediante il conteggio differenziale, per ciascuna diluizione, di tutti i generi fungini discriminabili. Sulla base dei conteggi effettuati è stata valutata l'entità della contaminazione

micotica per i generi *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e relativi teleomorfi, espressa in Unità Formanti Colonie per grammo di peso fresco di campione (UFC/g).

Gli isolati rappresentativi appartenenti ai generi *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e relativi teleomorfi (*Eurotium*, per il genere *Aspergillus*, *Eupenicillium* per il genere *Penicillium*), sono stati trasferiti sterilmente su substrati selettivi per la successiva identificazione.

Gli isolati appartenenti al genere *Alternaria* sono stati trasferiti su Malt Agar (MA) all'1,5%, mentre gli isolati appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, sono stati trasferiti su Czapek Yeast autolysate Agar (CYA), per facilitare una prima distinzione tra gruppi di specie.

Allo scopo di conservare gli isolati per le successive analisi e caratterizzazioni, dalle colonie ottenute in purezza, sono state prelevate sterilmente delle porzioni di micelio e substrato, poste in conservazione a -80°C in microprovette contenenti 1 ml di soluzione sterile di glicerolo al 10%.

L'identificazione a livello di specie è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche, macroscopiche e microscopiche e colturali degli isolati fungini.

Tutti gli isolati appartenenti al genere *Alternaria* sono stati identificati a livello di genere (Ellis, 1971) sulla base delle caratteristiche morfologiche macroscopiche e microscopiche.

Solo una parte di tali isolati, sottoposti a successiva caratterizzazione, sono stati sottoposti ad identificazione a livello specifico (Simmons, Roberts, 1993; Simmons, 2007).

Gli isolati appartenenti ai generi *Aspergillus* ed *Eurotium* stati inoculati su CYA, a 5°, 25°, 37°C, su Malt Extract Agar (MEA) e CY20S (Czapek Yeast extract, 20% Sucrose) a 25°C per 7 giorni, al buio (Klich, Pitt, 1988); gli isolati appartenenti ai generi *Penicillium* ed *Eupenicillium* stati inoculati su CYA, a 5°, 25°, 37°C, MEA e 25% Glycerol Nitrate agar (G25N) a 25°C, per 7 giorni al buio; limitatamente agli isolati di *Penicillium* appartenenti al subgenere *Penicillium* in aggiunta è stato effettuato l'inoculo su Creatine Sucrose Neutral (CSN) a 25°C, sempre per 7 giorni (Pitt, Hocking, 1999).

L'identificazione a livello di specie è stata effettuata considerando caratteristiche morfologiche, macroscopiche e microscopiche e colturali (diametro di crescita sui diversi substrati, colore dei conidi e del micelio, produzione di pigmenti e essudati, crescita alle diverse temperature, caratteristiche delle strutture conidiofore).

L'esame delle strutture riproduttive sessuate e asessuate è stato eseguito allestendo dei preparati in etanolo assoluto e acido lattico osservati a 400 e a 1000 ingrandimenti al microscopio ottico (Leitz Laborlux S).

Sulla base delle identificazioni specifiche, il dato iniziale dei conteggi su piastra è stato ricondotto al dato di unità formanti colonia per grammo di peso fresco (UFC/g) di ogni *taxon*, specie o genere isolato ed identificato.

L'analisi della varianza (ANOVA) e il test SNK di confronto tra le medie sono state effettuate con il programma Statistica 7.1 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

I dati originali delle UFC/g sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica, dopo aver sommato il valore 1, secondo la formula $y = \log [(UFC/g)+1]$, prima di effettuare l'analisi della varianza (Cozzi et al., 2006); tale trasformazione è stata necessaria per rendere i dati idonei al presupposto di normalità della distribuzione dei dati e di omogeneità della varianza (omeoschedasticità), senza il quale l'analisi della varianza non è attuabile.

Risultati

Le analisi micologiche effettuate nel corso degli anni 2006 e 2007 hanno permesso di valutare la composizione specifica della micoflora del grappolo per i diversi vitigni presi in esame nei due ambienti viticoli.

Per quanto riguarda il genere *Alternaria*, tutti gli isolati ottenuti, benché non identificati in questa fase a livello di specie, appartengono al gruppo di specie caratterizzate da conidi di dimensioni piccole e medie (“*small-spored Alternaria*”) (Simmons, Roberts, 1993; Simmons, 2007). L'identificazione specifica, effettuata su un certo numero di isolati, verrà discussa nel successivo capitolo.

Indagini 2006

Veneto

Le Tabelle 5-9 riportano il prospetto degli isolamenti fungini effettuati sulle cinque varietà in oggetto, espressi in UFC/g di peso fresco, mentre le Tabelle 10-12 il confronto tra uve sane e tignolate tra i cinque vitigni. In tali tabelle, a fianco al dato medio, è riportato il risultato del confronto statistico delle medie, effettuato con il test SNK su dati trasformati.

In ogni tabella è indicata l'abbreviazione del nome del vitigno, il prelievo, prevendemmiale (PV) e vendemmiale (V) e il numero dei prelievi (I°, II°), lo stato sanitario dei campioni, sano (S) o danneggiato da tignole (T), il dato medio e la deviazione standard della contaminazione espressa come UFC/g. Per ciascuna specie identificata è indicata l'abbreviazione del nome del genere (*Alt*: *Alternaria*, *A*: *Aspergillus*, *P*: *Penicillium*, *Ep*: *Eupenicilium*).

Tabella 5. Contaminazione fungina su Merlot (UFC/g).

Vitigno	ME									
	PV-I°				PV-II°				V	
	S		T		S		T		S	
Media/dev.st	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	1.111	385	311	336	800	481	-	-	289	342
<i>A. candidus</i>	4.444	3.849	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	24	37	19.778	18.261	-	-	12.667	21.939	1.578	925
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	2	4	62	67	6.667	10.975	-	-
<i>A. restrictus</i>	2.222	3.849	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. totale</i>	6.691	6.670	19.780	18.264	62	67	19.333	19.333	1.578	925
<i>P. brevicompactum</i>	2.689	4.600	12.689	20.211	2.244	2.310	14.000	14.345	3.378	3.784
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	267	353	-	-	-	-	2.222	3.849	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	5.333	9.238
<i>P. rugulosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	22.022	29.218	30.689	43.032	933	982	129.111	223.050	7.733	6.918
<i>P. totale</i>	24.978	27.744	43.378	63.204	3.178	3.087	145.333	221.281	16.444	13.525
<i>Ep.sp.</i>	-	-	-	-	22	38	-	-	-	-
<i>Totale</i>	32.780	20.864	63.469	78.791	4.062	2.834	164.667	223.685	18.311	13.764

Tabella 6. Contaminazione fungina su Negroamaro (UFC/g).

Vitigno	NE							
	PV-I°				PV-II°			
Prelievo	S		T		S		T	
Stato sanitario	S		T		S		T	
Media/dev.st	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	2.889	3.289	244	367	2.667	3.464	-	-
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	453	751	6.620	5.970	933	1.617	6.800	5.973
<i>A. niger s.l.</i>	2	4	44	76	440	762	-	-
<i>A. restrictus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. totale</i>	456	749	6.664	6.036	1.373	2.379	6.800	5.973
<i>P. brevicompactum</i>	220	381	12.600	12.311	2.420	3.635	22.440	37.730
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	667	1.155	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. rugulosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	5.109	8.225	29.267	31.029	202.200	344.521	82.000	142.028
<i>P. totale</i>	5.995	7.514	41.867	43.262	204.620	348.138	104.440	126.788
<i>Ep.sp.</i>	-	-	22	38	-	-	-	-
<i>Totale</i>	9.340	11.548	48.797	40.662	208.660	350.401	111.240	127.508

Tabella 7. Contaminazione fungina su Pinot grigio (UFC/g).

Vitigno	PI									
	PV-I°				PV-II°				V	
Prelievo	S		T		S		T		S	
Stato sanitario	S		T		S		T		S	
Media/dev.st	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	-	-	-	-	1.111	770	511	719	4.444	7.698
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6.200	6.010
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2.200	3.811
<i>A. restrictus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. totale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	8.400	3.118
<i>P. brevicompactum</i>	22	38	1.067	1.848	662	1.090	7.973	6.363	23.067	25.476
<i>P. chrysogenum</i>	67	115	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	-	-	-	2.000	3.464	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. rugulosum</i>	-	-	-	-	44	76	2.200	3.811	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	22	38	26	46	2.420	3.635	25.333	40.464
<i>P. totale</i>	89	102	1.089	1.829	732	1.212	14.593	643	48.400	38.726
<i>Ep.sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Totale</i>	89	102	1.089	1.829	1.844	1.083	15.104	1.267	61.244	29.323

Tabella 8. Contaminazione fungina su Primitivo (UFC/g).

Vitigno	PR									
	PV-I°		PV-II°						V	
Stato sanitario	S		T		S		T		S	
Media/dev.st	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.	m.	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	-	-	-	-	444	770	-	-	222	385
<i>A. candidus</i>	667	1.155	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	3.973	5.777	-	-	-	-	13.333	23.094	2.867	4.965
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-	66.667	115.470	-	-	-	-
<i>A. restrictus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. totale</i>	4.640	6.925	-	-	66.667	115.470	13.333	23.094	2.867	4.965
<i>P. brevicompactum</i>	3.336	5.772	-	-	2.667	3.055	-	-	8.667	15.011
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. rugulosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	3.733	3.384	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. totale</i>	7.069	8.568	-	-	2.667	3.055	-	-	8.667	15.011
<i>Ep.sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Totale</i>	11.709	6.705	-	-	69.778	112.784	13.333	23.094	11.756	19.787

Tabella 9. Contaminazione fungina su Sangiovese (UFC/g).

Vitigno	SA			
	PV-I°			
Stato sanitario	S		T	
Media/dev.st	m.	d.s.	m.	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	1.178	1.310	-	-
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	-	-	-	-
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-
<i>A. restrictus</i>	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	2.200	3.811	-	-
<i>A. totale</i>	2.200	3.811	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	6.820	6.273	8.667	15.011
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-
<i>P. rugulosum</i>	-	-	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	-	-
<i>P. totale</i>	6.820	6.273	8.667	15.011
<i>Ep.sp.</i>	-	-	-	-
<i>Totale</i>	10.198	3.541	8.667	15.011

Tabella 10. Primo prelievo; confronto vitigni; campioni sani e tignolati (UFC/g).

Specie	ME		NE		PI		PR		SA	
<i>Alt. spp</i>	711	a	1.567	a	0	b	0	b	589	a
<i>A. candidus</i>	2.222	a	0	a	0	a	333	a	0	a
<i>A. japonicus s.l.</i>	9.901	ab	3.537	a	0	b	1.987	ab	0	b
<i>A. niger s.l.</i>	1	a	23	a	0	a	0	a	0	a
<i>A. restrictus</i>	1.111	a	0	a	0	a	0	a	0	a
<i>A. versicolor</i>	0	a	0	a	0	a	0	a	1.100	a
<i>A .tot</i>	13.236	a	3.560	a	0	b	2.320	ab	1.100	ab
<i>P. brevicompactum</i>	7.689	a	6.410	a	544	a	1.668	a	7.743	a
<i>P. chrysogenum</i>	0	a	0	a	33	a	0	a	0	a
<i>P. citrinum</i>	133	a	333	a	0	a	0	a	0	a
<i>P. crustosum</i>	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
<i>P. rugulosum</i>	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
<i>P. Subg. Aspergilloides</i>	26.356	a	17.188	a	11	b	1.867	b	0	b
<i>P. tot</i>	34.178	a	23.931	a	589	a	3.534	a	7.743	a
<i>Ep.sp.</i>	0	a	11	a	0	a	0	a	0	a
<i>Totale</i>	48.124	a	29.068	a	589	b	5.854	b	9.432	ab

Tabella 11. Primo prelievo; confronto campioni sani e tignolati. Dato complessivo dei 5 vitigni (UFC/g).

Specie	sano		tignola	
<i>Alt. spp</i>	1.036	a	111	b
<i>A. candidus</i>	1.022	a	0	b
<i>A. japonicus s.l.</i>	890	a	5.280	a
<i>A. niger s.l.</i>	0	a	9	a
<i>A. restrictus</i>	444	a	0	a
<i>A. versicolor</i>	440	a	0	a
<i>A .tot</i>	2.797	a	5.289	a
<i>P. brevicompactum</i>	2.617	a	7.004	a
<i>P. chrysogenum</i>	13	a	0	a
<i>P. citrinum</i>	187	a	0	a
<i>P. crustosum</i>	0	a	0	a
<i>P. rugulosum</i>	0	a	0	a
<i>P. Subg. Aspergilloides</i>	6.173	a	11.996	a
<i>P. tot</i>	8.990	a	19.000	a
<i>Ep.sp.</i>	0	a	4	a
<i>Totale</i>	12.823	a	24.404	b

Tabella 12. Dato complessivo dei campionamenti, senza distinzione tra uve sane e tignolate (UFC/g).

Specie	ME		NE		PI		PR		SA	
<i>Alt. spp</i>	502	a	1.450	a	1.213	ab	133	b	589	ab
<i>A. candidus</i>	889	a	0	a	0	ab	133	a	0	a
<i>A. japonicus s.l.</i>	6.809	a	3.702	a	1.240	a	4.035	a	0	a
<i>A. niger s.l.</i>	1.346	a	122	a	440	a	13.333	a	0	a
<i>A. restrictus</i>	444	a	0	a	0	a	0	a	0	a
<i>A. versicolor</i>	0	b	0	b	0	b	0	b	1.100	a
<i>A .tot</i>	9.489	a	3.823	a	1.680	a	17.501	a	1.100	a
<i>P. brevicompactum</i>	7.000	a	9.420	a	6.558	a	2.934	a	7.743	a
<i>P. chrysogenum</i>	0	a	0	a	13	a	0	a	0	a
<i>P. citrinum</i>	498	a	167	a	400	a	0	a	0	a
<i>P. crustosum</i>	1.067	a	0	a	0	a	0	a	0	a
<i>P. rugulosum</i>	0	a	0	a	449	a	0	a	0	a
<i>P. Subg. Aspergilloides</i>	38.098	a	79.644	a	5.560	b	747	b	0	b
<i>P. tot</i>	46.662	a	89.231	a	12.981	ab	3.680	b	7.743	ab
<i>Ep.sp.</i>	4	a	6	a	0	a	0	a	0	a
<i>Totale</i>	56.658	a	94.509	a	15.874	ab	21.315	b	9.432	ab

Le specie isolate con maggiore frequenza sulle 5 varietà sono state *Alternaria* spp., *Aspergillus japonicus*, *Penicillium brevicompactum* ed il gruppo di *Penicillium* Subgenere *Aspergilloides*.

Il genere *Alternaria*, in particolare, è stato isolato su tutti i vitigni, prevalentemente su uve integre, in tutte le date di campionamento.

Aspergillus japonicus e *A. niger* sono state isolate su Negroamaro, Primitivo e Merlot, sia su uve sane che tignolate, in tutti i prelievi, mentre sono risultate presenti solo in vendemmia su Pinot Grigio. *A. candidus* è risultato poco diffuso, solo su uve sane di Primitivo e Merlot nel primo prelievo prevendemmiale.

Penicillium citrinum è stato isolato su Merlot e occasionalmente su Negroamaro e Pinot Grigio, mentre *P. rugulosum* è stato rinvenuto solo su Pinot Grigio, in prevendemmia.

Le specie *Aspergillus restrictus*, *A. versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *P. crustosum* ed il genere *Eupenicillium* sono state solo sporadicamente isolate.

Confrontando i diversi vitigni, in relazione alla presenza di ciascuna specie, si può osservare che *Alternaria* ha contaminato maggiormente Negroamaro e Merlot, mentre la minor contaminazione è stata rilevata su Primitivo; considerando assieme le cinque varietà, la presenza di *Alternaria* è stata maggiore su uve integre, non danneggiate da tignole.

Tra le specie del genere *Aspergillus*, nessuna ha mostrato di contaminare un maniera differente le cinque varietà, ad eccezione di *A. versicolor* che è stato isolato solo su Sangiovese; nessuna differenza è stata riscontrata tra uve sane e danneggiate.

Tra le specie del genere *Penicillium* solo gli isolati appartenenti al Subgenere *Aspergilloides* hanno mostrato di contaminare in maniera differente le cinque varietà di vite, in particolare la maggiore contaminazione è stata registrata su Merlot e Negroamaro, senza differenze significative tra le due, mentre le altre tre varietà hanno mostrato una contaminazione significativamente minore, senza differenze tra loro; *P. brevicompactum*, benché isolato su tutte le varietà, non ha mostrato di contaminare maggiormente nessuna varietà e lo stesso risultato è emerso per le altre specie del genere *Penicillium* isolate solo sporadicamente.

Per tutte le specie, in ogni caso, nessuna differenza è stata rilevabile tra uve sane e danneggiate.

Complessivamente, il genere *Penicillium* ha mostrato di contaminare in maniera differente le cinque varietà, con un comportamento simile a quanto osservato per il Subgenere *Aspergilloides*.

Considerando la contaminazione complessiva, le varietà maggiormente contaminate sono state Negroamaro e Merlot, mentre quella meno contaminata è stata il Primitivo; le altre hanno mostrato un comportamento intermedio; in relazione allo stato sanitario delle uve, inoltre, le uve sane hanno mostrato una maggiore presenza fungina rispetto alle uve danneggiate. Tale dato non trova riscontro in letteratura, dove i soli dati disponibili riguardano esclusivamente le specie di *Aspergillus* appartenenti alla sezione *Nigri*, la cui presenza su uve danneggiate da tignole è risultata significativamente maggiore rispetto a quella su uve sane e, parallelamente, anche la presenza di OTA è stata maggiore in uve danneggiate da larve di tignole piuttosto che su uve integre (Cozzi et al., 2006; Battilani, Silva, 2006).

Toscana

Le Tabelle 13-15 riportano il dato relativo alla contaminazione fungina media nei diversi prelievi e sulle due tipologie di campionio, per le tre varietà considerate, con l'indicazione del dato medio e della deviazione standard delle UFC/g.

Tabella 13. Contaminazione fungina su Merlot; primo e secondo prelievo; uve sane e tignolate (UFC/g).

Vitigno	Merlot					
Prelievo	I° prelievo				II° prelievo	
sano/tignolato	sano		tignolato		sano	
media/dev.st.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	267	353	444	385	444	770
<i>A. candidus</i>	220	381	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	2.442	3.613	220	381	0	0
<i>A. tot</i>	2.662	3.993	220	381	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	0	0	44	76	0	0
<i>P. chrysogenum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	0	0	867	1.501	2.200	3.811
<i>P. rugulosum</i>	487	843	0	0	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	1.329	2.244	5.333	9.238	0	0
<i>P. tot</i>	1.815	1.951	6.244	10.701	2.200	3.811
<i>Totale</i>	4.744	3.170	6.908	11.281	2.644	4.580

Tabella 14. Contaminazione fungina su Montepulciano; primo e secondo prelievo; uve sane e tignolate (UFC/g).

Vitigno	Montepulciano					
Prelievo	I° prelievo				II° prelievo	
sano/tignolato	sano		tignolato		sano	
media/dev.st.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	44	38	24.667	36.497	0	0
<i>A. candidus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	0	0	0	0	22	38
<i>A. tot</i>	0	0	0	0	22	38
<i>P. brevicompactum</i>	264	349	660	0	2.440	4.226
<i>P. chrysogenum</i>	220	381	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. rugulosum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	153	266	1.795	3.053	1.327	1.330
<i>P. tot</i>	637	39	2.455	3.053	3.767	5.421
<i>Totale</i>	682	39	27.122	34.820	3.789	5.406

Tabella 15. Contaminazione fungina su Sangiovese; primo e secondo prelievo; uve sane e tignolate (UFC/g).

Vitigno	Sangiovese					
	I° prelievo				II° prelievo	
	sano		tignolato		sano	
media/dev.st.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	0	0	0	0	44	77
<i>A. candidus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. tot</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	22.022	38.086	10.000	14.000	264	349
<i>P. chrysogenum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	220	381	22.000	38.105	0	0
<i>P. rugulosum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	22.000	38.105	28.200	19.973	200.000	346.410
<i>P. tot</i>	44.242	38.259	60.200	20.960	200.264	346.182
<i>Totale</i>	44.242	38.259	60.200	20.960	200.308	346.143

Alternaria spp. è risultata presente su Merlot e Montepulciano su uve sane e tignolate, in tutte le date di campionamento, mentre su Sangiovese è stata rilevata solo in vendemmia.

L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative nella contaminazione tra i diversi vitigni né tra le due date di campionamento, su uva sana.

Considerando solo i campioni prevendemmiali, invece, su uve sane e tignolate a confronto, la presenza di *Alternaria* è stata significativamente maggiore su Merlot e Montepulciano, rispetto a Sangiovese, sebbene non siano state rilevate differenze in funzione dell'integrità delle bacche.

Aspergillus candidus è stato presente su Merlot in entrambe le date di campionamento, su uve sane, mentre *A. niger* è risultato presente sia su uve sane che tignolate, su Merlot e Montepulciano.

La presenza di *A. niger* su uve sane e tignolate è stata significativamente maggiore su Merlot, rispetto a Montepulciano e Sangiovese; in relazione alla data di campionamento, il campionamento prevendemmiale ha presentato un valore di UFC/g per tale specie significativamente maggiore del prelievo alla vendemmia. Il confronto tra uve sane e tignolate, invece, non ha indicato differenze di contaminazione a carico di questa specie.

Nessuna delle altre specie del genere *Aspergillus* identificate ha mostrato differenze significative nella contaminazione delle tre varietà, mentre la contaminazione da parte del genere *Aspergillus* nel suo complesso si è rivelata maggiore su Merlot, analogamente a quanto osservato in precedenza per la specie *A. niger*.

Le specie di *Penicillium* maggiormente diffuse sono state *P. brevicompactum* e il gruppo di *Penicillium* Subgenere *Aspergilloides*, entrambi isolate da tutti i vitigni considerata in entrambe le date di campionamento, sia su uve sane che danneggiate. *P. citrinum* è stato isolato sia su Merlot che su Sangiovese, *P. rugulosum* solo su Merlot e *P. chrysogenum* è stato sporadicamente isolato su Merlot e Montepulciano.

Nessuna delle specie del genere *Penicillium* ha mostrato di colonizzare in maniera significativamente differente le tre varietà considerate. Le tre varietà in esame, infine, non hanno mostrato differenze significative nella contaminazione fungina complessiva.

Indagini 2007

Veneto

Le Tabelle 16-20 riportano il dato relativo della contaminazione fungina rilevate nelle diverse varietà, mentre le tabelle 21 e 22 riportano il risultato dell'analisi della varianza e del test SNK di confronto delle medie.

Tabella 16. Contaminazione fungina su Merlot; uva sana (UFC/g).

Vitigno prelievo	Merlot			
	I		II	
media/dev.st	media	dev	media	dev
<i>Alt. spp.</i>	147	92	289	77
<i>A. versicolor</i>	222	385	-	-
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	133	133
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	-	-	-	-
<i>Asp. tot</i>	222	385	133	133
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	222	385
<i>P. chrysogenum</i>	2	4	-	-
<i>P. citrinum</i>	4	8	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	-	-
<i>P. variabile</i>	-	-	-	-
<i>Pen. Tot</i>	7	7	222	385
Totale complessivo	376	287	644	555

Tabella 17. Contaminazione fungina su Negroamaro; uva sana (UFC/g).

Vitigno	Negroamaro			
	I		II	
prelievo	media	dev	media	dev
<i>Alt. spp.</i>	44	38	111	102
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	89	102	4.444	7.698
<i>Asp. tot</i>	89	102	4.444	7.698
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	378	598	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	-	-	444	770
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	22	38	5.133	8.834
<i>P. variabile</i>	-	-	-	-
<i>Pen. Tot</i>	400	577	5.578	8.472
Totale complessivo	533	636	10.133	16.175

Tabella 18. Contaminazione fungina su Pinot grigio; uva sana (UFC/g).

Vitigno	Pinot grigio			
	I		II	
prelievo	media	dev	media	dev
<i>Alt. spp.</i>	400	240	356	336
<i>A. versicolor</i>	13.333	8.327	44	77
<i>A. niger s.l.</i>	4.000	6.928	-	-
<i>A. candidus</i>	1.111	1.925	311	336
<i>A. japonicus s.l.</i>	-	-	-	-
<i>Asp. tot</i>	18.444	10.335	356	278
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	333	333	716	1.114
<i>P. chrysogenum</i>	11.556	20.015	44	38
<i>P. citrinum</i>	12.444	21.554	24	37
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	7	12
<i>P. variabile</i>	-	-	-	-
<i>Pen. Tot</i>	24.333	41.858	791	1.107
Totale complessivo	43.178	46.292	1.502	1.645

Tabella 19. Contaminazione fungina su Primitivo; uva sana (UFC/g).

Vitigno prelievo	Primitivo			
	I		II	
media/dev.st	media	dev	media	dev
<i>Alt. spp.</i>	156	102	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	-	-	-	-
<i>Asp. tot</i>	-	-	-	-
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	22	38	-	-
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	-	-
<i>P. variabile</i>	-	-	222	385
<i>Pen. Tot</i>	22	38	222	385
Totale complessivo	178	139	222	385

Tabella 20. Contaminazione fungina su Sangiovese; uva sana (UFC/g).

Vitigno prelievo	Sangiovese			
	I		II	
media/dev.st	media	dev	media	Dev
<i>Alt. spp.</i>	289	139	422	234
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-
<i>A. niger s.l.</i>	-	-	-	-
<i>A. candidus</i>	-	-	-	-
<i>A. japonicus s.l.</i>	44	77	-	-
<i>Asp. tot</i>	44	77	-	-
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	2.000	3.464
<i>P. brevicompactum</i>	444	385	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	-	-	733	570
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	-	-	-	-
<i>P. variabile</i>	-	-	-	-
<i>Pen. Tot</i>	444	385	2.733	3.453
Totale complessivo	778	559	3.156	3.480

Tabella 21. Confronto tra i cinque vitigni; uve sane, dato medio primo e secondo prelievo (UFC/g).

I° e II° prelievo	Merlot		Negroamaro		Pinot grigio		Primitivo		Sangiovese	
<i>Alt. spp.</i>	218	ab	78	ab	378	ab	78	b	356	a
<i>A. versicolor</i>	111	b	0	b	6.689	a	0	b	0	b
<i>A. niger s.l.</i>	67	a	0	a	2.000	a	0	a	0	a
<i>A. candidus</i>	0	b	0	b	711	a	0	b	0	b
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	a	2.267	a	0	a	0	a	22	a
<i>A. tot</i>	178	b	2.267	b	9.400	a	0	b	22	b
<i>P. aurantiogriseum</i>	0	a	0	a	0	a	0	a	1.000	a
<i>P. brevicompactum</i>	111	ab	189	ab	524	a	0	b	222	ab
<i>P. chrysogenum</i>	1	a	0	a	5.800	a	0	a	0	a
<i>P. citrinum</i>	2	a	222	a	6.234	a	11	a	367	a
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	0	a	2.578	a	3	a	0	a	0	a
<i>P. variabile</i>	0	a	0	a	0	a	111	a	0	a
<i>P. Tot</i>	114	a	2.989	a	12.562	a	122	a	1.589	a
Totale complessivo	510	ab	5.333	ab	22.340	a	200	b	1.967	ab

Tabella 22. Confronto tra i due prelievi; dato medio dei cinque vitigni; uve sane (UFC/g).

Prelievo	I° prelievo		II° prelievo	
<i>Alt. spp.</i>	207	a	236	A
<i>A. versicolor</i>	2.711	a	9	B
<i>A. niger s.l.</i>	800	a	27	A
<i>A. candidus</i>	222	a	62	A
<i>A. japonicus s.l.</i>	27	a	889	A
<i>A. tot</i>	3.760	a	987	A
<i>P. aurantiogriseum</i>	0	a	400	A
<i>P. brevicompactum</i>	231	a	188	A
<i>P. chrysogenum</i>	2.312	a	9	A
<i>P. citrinum</i>	2.494	a	240	A
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	4	a	1.028	A
<i>P. variabile</i>	0	a	44	a
<i>P. Tot</i>	5.041	a	1.909	a
Totale complessivo	9.008	a	3.132	a

I vitigni Pinot Grigio e Negroamaro sono stati caratterizzati dal maggior numero di specie fungine isolate; *Alternaria spp.* è risultata presente pressoché in tutti i campioni di tutti i vitigni presi in esame.

Le specie di *Aspergillus* e *Penicillium* isolate con frequenza più elevata sono state, rispettivamente, per il primo genere *A. japonicus* e *A. versicolor*, mentre il secondo *P. citrinum* e *P. brevicompactum*; scarsa è stata la presenza di specie del genere *Penicillium* appartenenti al Subgenere *Aspergilloides*.

La contaminazione da parte di *Alternaria* è stata piuttosto simile tra le cinque varietà indagate, con i valori più elevati per Sangiovese e minori per Primitivo; la contaminazione delle cinque varietà, tra i due prelievi, non è stata significativamente differente.

Aspergillus versicolor ha contaminato maggiormente il Pinot grigio, mentre sulle altre varietà la presenza di tali specie è stata significativamente minore, in particolare la specie, oltre che su Pinot grigio è stata isolata solo su Merlot. Complessivamente il primo campionamento ha mostrato valori statisticamente maggiori di contaminazione per questa specie.

La specie *A. candidus*, invece, è stata isolata solo su Pinot grigio, senza significative differenze tra le due date di campionamento.

Le specie di *Aspergillus* appartenenti alla sezione *Nigri*, *A. niger* e *A. japonicus*, non hanno mostrato differenze significative tra i vitigni, né tra le due date di campionamento; il genere *Aspergillus* nel suo complesso, tuttavia, è stato isolato con valori maggiori di UFC/g su Pinot grigio, mentre le altre varietà non hanno evidenziato differenze significative per questo genere fungino; solo su Primitivo non è stata evidenziata nessuna specie del genere.

Per il genere *Penicillium* sono state evidenziate differenze significative tra i vitigni solo per *P. brevicompactum*, presente maggiormente su Pinot grigio e assente su Primitivo; le altre varietà hanno mostrato una posizione intermedia, senza differenze tra loro; le altre specie sono state solo sporadicamente isolate, senza differenze rilevanti. Complessivamente, comunque, il genere *Penicillium* non ha mostrato di contaminare in maniera differente nessuna delle varietà in oggetto e di non essere maggiormente presente in nessuna delle due date di campionamento.

La contaminazione fungina è stata simile tra le varietà, mostrando valori significativamente inferiori solo per Primitivo.

Le Tabelle 23-26 riportano, per Merlot e Pinot grigio, il dato della contaminazione fungina a confronto tra uve sane e danneggiate da tignole.

Tabella 23. Confronto uve sane/danneggiate su Merlot e Pinot grigio (UFC/g).

Vitigno	Merlot								Pinot grigio							
prelievo	I				II				I				II			
sano/tignola	sano		tignolato		sano		tignolato		sano		tignolato		sano		tignolato	
media/dev.st.	media	dev	media	dev	media	dev	media	dev	media	dev	media	dev	media	dev	media	dev
<i>Alt. spp.</i>	147	92	2.493	4.135	289	77	1.044	500	400	240	1.178	1.310	356	336	111	77
<i>A. versicolor</i>	222	385	0	0	0	0	0	0	13.333	8.327	4.222	7.313	44	77	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	0	0	0	0	133	133	5.556	8.468	4.000	6.928	0	0	0	0	0	0
<i>A. candidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1.111	1.925	12.000	14.422	311	336	2.667	1.764
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	0	0	0	0	0	1.778	2.524	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. tot</i>	222	385	0	0	133	133	7.333	10.975	18.444	10.335	16.222	10.463	356	278	2.667	1.764
<i>Eu. repens</i>	0	0	0	0	0	0	22	38	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	0	0	0	0	222	385	3.111	5.389	333	333	402	302	716	1.114	1.778	2.524
<i>P. chrysogenum</i>	2	4	0	0	0	0	0	0	11.556	20.015	0	0	44	38	4.444	7.698
<i>P: citrinum</i>	4	8	0	0	0	0	22	38	12.444	21.554	400	693	24	37	11	19
<i>P. commune</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	44	77
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	0	0	356	336	0	0	444	770	0	0	222	385	7	12	0	0
<i>P. Tot</i>	7	7	356	336	222	385	3.578	6.139	24.333	41.858	1.024	840	791	1.107	6.278	10.159
Totale complessivo	376	287	2.849	4.413	644	555	11.978	10.102	43.178	46.292	18.424	10.933	1.502	1.645	9.056	11.314

Tabella 24. Effetto varietale; uve sane e tignolate, media dei due prelievi (UFC/g).

cv+sano/tignola	sano+tignolato			
Prelievo	I°+II°			
sano/tignola	Merlot		Pinot	
<i>Alt. spp.</i>	993	a	511	a
<i>A. versicolor</i>	56	b	4400	a
<i>A. niger s.l.</i>	1422	a	1000	a
<i>A. candidus</i>	0	b	4022	a
<i>A. japonicus s.l.</i>	444	a	0	a
<i>A. tot</i>	1922	b	9422	a
<i>Eu. repens</i>	6	a	0	a
<i>P. brevicompactum</i>	833	a	807	a
<i>P. chrysogenum</i>	1	a	4011	a
<i>P: citrinum</i>	7	a	3220	a
<i>P. commune</i>	0	a	11	a
<i>P. S.g Aspergilloides</i>	200	a	57	a
<i>P. Tot</i>	1041	b	8107	a
Totale complessivo	3962	b	18040	a

Tabella 25. Confronto tra uve sane e danneggiate; media delle due varietà; media dei due prelievi (UFC/g).

Prelievo	I°+II°			
Vitigno	Merlot+Pinot			
sano/tignola	sano		tignolato	
<i>Alt. spp.</i>	298	a	1.207	a
<i>A. versicolor</i>	3.400	a	1.056	b
<i>A. niger s.l.</i>	1.033	a	1.389	a
<i>A. candidus</i>	356	a	3.667	a
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	a	444	a
<i>A. tot</i>	4.789	a	6.556	a
<i>Eu. repens</i>	0	a	6	a
<i>P. brevicompactum</i>	318	a	1.323	a
<i>P. chrysogenum</i>	2.901	a	1.111	a
<i>P: citrinum</i>	3.118	a	108	a
<i>P. commune</i>	0	a	11	a
<i>P. S.g Aspergilloides</i>	2	a	256	a
<i>P. Tot</i>	6.338	a	2.809	a
Totale complessivo	11.425	a	10.577	a

Tabella 26. Effetto del momento di campionamento; uve sane e tignolate, media dei due vitigni.

sano/tignola	sano+tignolato			
vitigno	Merlot+Pinot			
Prelievo	I° prelievo		II° prelievo	
<i>Alt. spp.</i>	1.054	a	450	a
<i>A. versicolor</i>	4.444	a	11	b
<i>A. niger s.l.</i>	1.000	a	1.422	a
<i>A. candidus</i>	3.278	a	744	a
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	a	444	a
<i>A. tot</i>	8.722	a	2.622	a
<i>Eu. repens</i>	0	a	6	a
<i>P. brevicompactum</i>	184	a	1.457	a
<i>P. chrysogenum</i>	2.889	a	1.122	a
<i>P. citrinum</i>	3.212	a	14	a
<i>P. commune</i>	0	a	11	a
<i>P. S.g Aspergilloides</i>	144	a	113	a
<i>P. Tot</i>	6.430	a	2.717	a
Totale complessivo	16.207	a	5.795	a

Diversamente da quanto effettuato nei campionamenti del 2006, nel 2007 è stato possibile raccogliere campioni di uva danneggiata da tignole solo per Merlot e Pinot grigio, in quanto sulle altre varietà non sono stati rilevati danni da tignole.

Il confronto condotto su uve sane e danneggiate, tuttavia, non ha evidenziato differenze significative per il genere *Alternaria* tra le due tipologie di campioni (sano/danneggiato) né tra le due varietà e le due date di campionamento.

Per il genere *Aspergillus* sono state rilevate differenze significative tra i vitigni in relazione alla contaminazione complessiva, che per questo genere è stata più consistente su Pinot grigio, ma non tra le due tipologie di uva e nemmeno tra le due date di prelievo.

Solo per *A. versicolor* sono state rilevate differenze tra uve sane e danneggiate, con valori di contaminazione a carico di questa specie maggiore su uva sana; tra le due varietà, questa specie è stata isolata maggiormente su Pinot grigio in quantità maggiore a livello del primo campionamento.

Le specie della sezione *Nigri* non hanno mostrato livelli differenti di contaminazione tra le due tipologie di campioni di uva.

Nessuna differenza a livello del genere *Penicillium* è stata significativa tra uve sane e danneggiate, tuttavia sono state rilevate differenze di contaminazione tra i due vitigni, per la specie *P. brevicompactum* e complessivamente a livello di genere, con presenze maggiori su Pinot grigio;

questa varietà, inoltre, ha presentato, complessivamente, il valore più elevato di contaminazione micotica, rispetto a Merlot.

Toscana

Le Tabelle 27-29 riportano i valori medi di contaminazione fungina, relativa a ciascun gruppo tassonomico espressa in UFC/g.

Tabella 27. Contaminazione fungina su Merlot (UFC/g).

vitigno prelievo	Merlot					
	I°prelievo				II°prelievo	
	sano		tignolato		sano	
media/dev.st	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	24	37	244	367	44	77
<i>A. versicolor</i>	222	385	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	2	4	0	0	0	0
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. tot</i>	224	383	0	0	0	0
<i>Ep. totale</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. aurantiogriseum</i>	2.244	3.830	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	400	636	5.556	8.494	0	0
<i>P. commune</i>	22	38	0	0	0	0
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. griseofulvum</i>	22	38	0	0	0	0
<i>P. janczewskii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	253	383	222	385	0	0
<i>P. Totale</i>	2.942	3.884	5.778	8.878	0	0
Totale	3.191	3.742	6.022	8.649	44	77

Tabella 28. Contaminazione fungina su Montepulciano (UFC/g).

vitigno	Montepulciano							
	I°prelievo		II°prelievo		vendemmia			
sano/tignola	sano		tignolato		sano			
media/dev.st	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	31	34	0	0	889	1.018	0	0
<i>A. versicolor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	4	4	20.222	35.026	0	0	7.711	12.954
<i>A. japonicus s.l.</i>	2	4	0	0	0	0	0	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. tot</i>	7	7	20.222	35.026	0	0	7.711	12.954
<i>Ep. totale</i>	0	0	0	0	2.222	3.849	0	0
<i>P. aurantiogriseum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	22	38	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	0	0	238	372	3.111	4.286	0	0
<i>P. commune</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	4.889	7.343	0	0
<i>P. griseofulvum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. janczewskii</i>	0	0	0	0	444	385	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	2	4	2.456	4.253	60.533	104.616	2.222	3.849
<i>P. Totale</i>	24	37	2.693	4.101	68.978	99.066	2.222	3.849
Totale	62	65	22.916	33.477	72.089	102.130	9.933	11.590

Tabella 29. Contaminazione fungina su Sangiovese (UFC/g).

vitigno	Sangiovese							
	I°prelievo		II°prelievo		vendemmia			
sano/tignola	sano		tignolato		sano			
media/dev.st	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
<i>Alt. spp.</i>	2	4	44	77	0	0	0	0
<i>A. versicolor</i>	22	38	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger s.l.</i>	2	4	13.333	23.094	0	0	0	0
<i>A. japonicus s.l.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	222	385	0	0	0	0
<i>A. tot</i>	24	37	13.556	22.904	0	0	0	0
<i>Ep. totale</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aurantiogriseum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	0	0	222	385	0	0	4.444	7.698
<i>P. citrinum</i>	156	269	2.667	4.619	9	15	4.444	7.698
<i>P. commune</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	444	770	0	0
<i>P. griseofulvum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. janczewskii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. S.g. Aspergilloides</i>	404	577	4.444	7.698	2.222	3.849	23.556	34.579
<i>P. Totale</i>	560	846	7.333	7.024	2.676	4.634	32.444	38.473
Totale	587	831	20.933	16.716	2.676	4.634	32.444	38.473

La maggiore frequenza di isolamento di specie fungine è stata osservata nei campioni prevendemmiali, rispetto a quelli vendemmiali; non sono state riscontrate differenze tra il numero di *taxa* isolati tra i diversi vitigni.

Alternaria spp. è stata isolata in tutti i campioni di ciascuna delle varietà analizzate, principalmente sui campioni raccolti in prevendemmia.

Le specie di *Aspergillus* e *Penicillium* isolate più frequentemente sono state, rispettivamente, *A. niger*, *Penicillium citrinum*, *P. glabrum* e *P. spinulosum*.

L'analisi della varianza ha evidenziato la mancanza di differenze significative di contaminazione fungina tra i tre vitigni per nessun *taxon* isolato e a livello di contaminazione micotica complessiva. Nessuna differenza, inoltre, è stata evidenziata tra i due prelievi e tra uve sane e danneggiate da tignole.

Confronto degli isolamenti fungini nelle due annate di campionamento

Veneto

Il genere *Alternaria* e la specie *P. brevicompactum* sono state isolate in entrambe le annate; molte specie sono state isolate in tutte le varietà considerate, anche se non in entrambe le annate. Al contrario, alcune specie sono risultate presenti in entrambe le annate solo in alcune varietà: *A. niger* su Merlot e Pinot grigio, *P. chrysogenum* su Pinot grigio, *P. citrinum* su Merlot e Negroamaro, le specie appartenenti al Subgenere *Aspergilloides* su Negroamaro e Pinot grigio.

La presenza di *Alternaria* tra le due annate non è stata significativamente differente in campioni di uve sane, mentre è emerso che le varietà maggiormente contaminate da *Alternaria* sono Sangiovese, Merlot e Negroamaro, con valori di contaminazione non statisticamente differenti.

Tra le specie del genere *Aspergillus*, *A. versicolor* è stato isolato maggiormente nel 2007, con presenze significativamente maggiori su Pinot grigio e senza differenze tra le altre varietà, sebbene non sia stata isolata su Primitivo e Negroamaro in entrambe le annate.

Nessuna differenza significativa è emersa, tra le due annate di campionamenti, per le altre specie di *Aspergillus*, in particolare per le specie appartenenti alla sezione *Nigri*, nelle presente indagine *A. niger* e *A. japonicus*, ne' tra i vitigni considerati.

Il gruppo di isolati del genere *Penicillium* appartenenti al subgenere *Aspergilloides* sono stati rilevati con presenze significativamente maggiori nel 2006 e tra i vitigni maggiormente su Merlot e Pinot grigio; Primitivo e Sangiovese non hanno presentato alcun isolamento di questo gruppo di specie.

Il dato complessivo di contaminazione a livello del genere *Penicillium* ha mostrato i valori più elevati nel 2006, senza significative differenze tra i vitigni.

La maggiore contaminazione nel 2006 e la mancanza di differenze significative tra i cinque vitigni è evidenziabile anche per la contaminazione micotica complessiva prodotta da tutti i taxa identificati.

Toscana

Il genere *Alternaria* e le specie del *Penicillium* appartenenti al Subgenere *Aspergilloides*, assieme ad *Aspergillus niger*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum* sono state isolate in tutte le annate, in entrambi i campionamenti (prevendemmiale e vendemmiale).

La contaminazione dei campioni di uve nelle due annate da parte di *Alternaria* non ha mostrato differenze significative, mentre la presenza tra le tre varietà, con la totale mancanza di isolamenti di tale genere fungino su Sangiovese.

Le altre specie isolate nelle due annate non hanno mostrato differenze significative tra i campioni analizzati nel 2006 e quelli del 2007, ne' per le singole specie, ne' a livello di genere, sia per *Aspergillus* che per *Penicillium*. Solo per *P. corylophilum* è stata rilevata una differenza significativa, in quanto tale specie è stata isolata solo nel 2007 e solo nel primo dei due prelievi.

Confronto tra gli isolamenti in Veneto e Toscana nelle due annate, nelle due varietà comuni (Merlot e Sangiovese)

Il confronto varietale per tra le due annate e tra Veneto e Toscana è stato possibile solo per due vitigni, Merlot e Sangiovese.

Su Merlot le specie appartenenti al genere *Alternaria* e le specie *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* sono state sempre isolate, in entrambi gli ambienti e in entrambe le annate.

P. brevicompactum e le specie di *Penicillium* appartenenti al Subgenere *Aspergilloides* sono state isolate nei due ambienti solo nell'annata 2006.

Su Sangiovese gli isolate appartenenti al genere *Alternaria* e la specie *P. brevicompactum* sono state isolate in tutti i campioni in entrambi gli ambienti nelle due annate, mentre *P. citrinum* è stato isolato in entrambi gli ambienti solo nell'annata 2007.

Capitolo II

Identificazione e caratterizzazione di isolati di *Alternaria* spp.

Introduzione

Identificazione delle specie di *Alternaria*

L'identificazione e la caratterizzazione delle specie di *Alternaria* è il risultato della valutazione di una serie di caratteristiche morfologiche e colturali, alle quali si affianca lo studio delle caratteristiche genetiche delle popolazioni, il profilo dei metaboliti secondari e, per le specie patogene, la definizione della specificità d'ospite.

Da un punto di vista morfologico, riveste una notevole importanza la caratterizzazione delle strutture riproduttive, in relazione alla morfologia dei singoli conidi (forma, dimensioni, ornamentazione, presenza o assenza di becchi) e alla loro modalità di produzione e organizzazione a livello del micelio (conidi singoli o in catene, più o meno ramificate).

I conidi di *Alternaria* possono essere sub sferoidali, ovoidi o ellissoidi, nella maggior parte dei casi con il diametro sub mediano maggiore del diametro della parte superiore dello stesso, provvisti di setti trasversali e, in genere anche longitudinali e obliqui; i conidi possono presentare caratteristiche estensioni apicali, più o meno sviluppate, o anche assenti.

Sulla base delle dimensioni dei conidi, le specie del genere *Alternaria* vengono convenzionalmente distinte in tre tipologie: specie provviste di conidi lunghi, di lunghezza superiore ai 100 μm , specie provviste di conidi medi, di lunghezza compresa tra i 50 e i 100 μm e specie provviste di conidi piccoli, di lunghezza in genere non superiore ai 50-60 μm .

La dimensione dei conidi, da sola, non è sufficiente a discriminare tra specie differenti, in quanto nell'ambito di ciascuna specie e tra una specie e l'altra esiste una certa variabilità delle dimensioni dei conidi, a volte con ampi margini di sovrapposizione, in particolare nel caso dell'identificazione di isolati in natura (Rotem, 1998).

I conidi vengono in genere prodotti in catene acropetale, variabili in lunghezza e complessità delle ramificazioni, oppure singolarmente, come conidi solitari. La produzione di conidi secondari avviene attraverso un conidioforo secondario che è morfologicamente distinto dal conidio e dai becchi; tale struttura può essere variamente sviluppata, composta da una o poche cellule o, al contrario, estremamente lunga, o ridotta ad un rigonfiamento scarsamente differenziato dalla superficie del conidio.

Le specie che portano conidi organizzati in catene, più o meno variamente ramificate, possono essere distinte in gruppi morfologici sulla base delle organizzazione tridimensionale di tali catene, in particolare presentano carattere discriminante il numero di conidi presenti nella catena, il numero e

la distribuzione delle ramificazioni della stessa, la presenza o meno di conidiofori secondari (Simmons, Roberts, 1993; Simmon, 2007).

In generale, sono identificabili sulla base dell'organizzazione tridimensionale delle catene conidiali (*pattern* di sporulazione) distinti gruppi morfologici di specie, indicati con un numero da 1 a 7 e con l'epiteto specifico della specie che meglio ne rappresenta le caratteristiche (i gruppi principali sono rappresentati dai gruppi 2-6):

1. gruppo 1: catene di aspetto delicato, con ramificazioni in genere assenti, di lunghezza da breve a moderata, composte da 5-10 conidi; nessuna specie rappresentativa;
2. gruppo 2 (*A. gaisen*-group): catene di lunghezza da breve a moderata composte al massimo da 10 conidi, di aspetto robusto, provvisti di diametro mediano maggiore rispetto ai conidi del gruppo 1; specie rappresentativa: *A. gaisen* Nagano (sin. *A. kikuchiana* Tanaka);
3. gruppo 3 (*A. arborescens*-group): catene di lunghezza da breve a moderata, di aspetto arborescente, formate da gruppi di catene compatte o lasse; il cospicuo "tronco" di questa formazione arborescente è costituito dal conidioforo primario, che si presenta da breve a talvolta molto lungo e che sorge direttamente dal substrato o da una ramificazione ifale e che sporula principalmente presso l'apice;specie rappresentativa: *A. arborescens* Simmons (sin. *A. alternata* f. sp. *lycopersici* Grogan, Kimble & Misaghi);
4. gruppo 4 (*A. alternata*-group): gruppi di catene di conidi ben ramificati, di aspetto complessivamente cespuglioso, provvisti di conidiofori primari brevi o in cospicui, se confrontati con quelli del precedente gruppo 3; specie rappresentativa: *A. alternata* (Fries) Keissler;
5. gruppo 5 (*A. tenuissima*-group): catene di lunghezza da moderata e lunga di 10-15 (-20) conidi, con ramificazioni rare o assenti, provviste di aspetto delicato e sottile, differenti dai conidi di aspetto robusto del gruppo 2; specie rappresentativa: *A. tenuissima* (Nees) Wiltshire;
6. gruppo 6 (*A. infectoria*-group): lassi gruppi di catene ramificate di conidi evidentemente collegati da conidiofori secondari di aspetto sparso e in genere allungati; specie rappresentativa: *A. infectoria* Simmons;
7. gruppi 7, 8, 9: differenti tipologie di raggruppamenti di conidi in lunghe catene, scarsamente o abbondantemente ramificate, distinguibili ma con caratteristiche che si sovrappongono a quelle degli altri gruppi. Tale raggruppamento è stato in seguito ulteriormente risolto in altri gruppi di specie, tra le quali figurano alcune di recente definizione (Simmons, Roberts, 1993; Roberts, 2005; Simmons, 2007).

L'identificazione delle specie del genere *Alternaria*, in particolare il gruppo rappresentato dalle specie ad attitudine saprofitaria o debolmente parassita, caratterizzate dalla comune presenza di conidi di piccole dimensioni, disposti in catene più o meno lunghe (“*small-spored Alternaria*”) è da lungo tempo oggetto di discussione per la definizione di caratteri sufficientemente stabili e ripetibili che permettano una circoscrizione delle specie.

La plasticità morfologica delle popolazioni di tali specie risulta, in particolare un ostacolo notevole, se associata all'utilizzo di condizioni di crescita non standardizzate e chiaramente definite.

La corretta identificazione delle specie trova nella convergenza di differenti discipline lo strumento fondamentale; l'utilizzo delle moderne metodiche di indagine genetica, la caratterizzazione del profilo dei metaboliti secondari, la specificità d'ospite, si associano ad una corretta e non ambigua identificazione su base morfologica.

La valutazione della crescita e delle caratteristiche morfologiche delle specie fungine, in condizioni standardizzate e ripetibili su diversi substrati selettivi e a diverse temperature si è dimostrata un valido strumento nell'identificazione a livello specifico di alcuni generi fungini, in particolare *Aspergillus* e *Penicillium* (Pitt, Hocking, 1999; Samson et al., 2000).

Studi condotti su alcune specie di *Alternaria* provenienti da differenti ospiti hanno permesso di discriminare specie affini sulla base di caratteristiche morfologiche, di semplice registrazione, quali colore e tessitura della colonia, diametri di crescita su piastra a differenti temperature, profilo dei metaboliti secondari e hanno ulteriormente supportato la robustezza del raggruppamento delle specie sulla base del pattern di sporulazione su PCA (Andersen et al., 2001, 2002, 2005).

Produzione di micotossine

Il genere *Alternaria* comprende funghi ubiquitari, che include sia specie patogene che saprofite, in grado di svilupparsi e di danneggiare un'ampia varietà di frutta, ortaggi e cereali. La contaminazione da *Alternaria* è responsabile di estesi danni e deterioramenti a piante e prodotti vegetali, portando a perdite economiche considerevoli ai coltivatori e all'industria alimentare.

Sono note circa 60 specie di *Alternaria*, la maggior parte delle quali produce metaboliti tossici per piante e mammiferi.

Sono note 4 differenti classi strutturali di tossine:

- derivati dibenzopironici, la più comune classe di metaboliti tossici di *Alternaria* spp., che includono alternariolo (AOH), alternariolo mono metil etere (AME) e altenuene (ALT);
- derivati perilenchinonici come le altertossine (ATX) e le stemfiliotossine (Stack e Prival, 1986);

- derivati dell'acido tetramico: acido tenuazonico (TeA), che agisce sia da micotossina che da fitotossina (Logrieco et. al., 2003);
- le tossine simili a derivati della sfingosina, attribuiti alla specie *A. alternata* f. sp. *lycopersici*.
- AOH, AME, ALT, e ATX sono tossine di particolare interesse, in quanto la loro dose letale 50 (LD50) è rispettivamente pari a 400, 400, 50 e 0,2 mg/kg di peso corporeo, per il ratto (Logrieco et. al., 2003, Zur, G., et al 2002).

La presenza di *A. alternata* e delle sue tossine, è stata evidenziata in numerosi prodotti orto-frutticoli, tra cui pomodori (Harwig, et. al., 1979; Stack, 1985, Hasan, 1996, Motta e Valente Soares, 2001), sia come prodotto fresco che derivato (salse e succhi), mele e succhi di mela (Delgado e Gomez-Cordoves, 1996; 1998), mandarini (Logrieco, et. al., 1990) e agrumi in genere (Peever et al., 1999, Kang et al., 2002), olive (Visconti, et. al., 1986), peperoni, frutti di bosco (ribes, lamponi, fragole, uva spina, more), prugne secche, meloni (Logrieco, 2001; Logrieco, et al., 2002; Scott, 2001).

Alternaria è comunemente isolata nell'ambito delle specie fungine associate ai marciumi secondari del grappolo (Medina et al., 2005; Tournas, Katsoudas, 2005, Serra et al., 2006; Valero et al., 2005, Bau et al., 2005), sebbene pochi siano i lavori nei quali venga evidenziata su uva la produzione e la presenza di micotossine di *Alternaria*.

La produzione di metaboliti secondari, in diversi generi fungini, è stata valutata su diversi substrati, come DRYES, MEA, YES, PDA (Frisvad et al., 2008), tra i quali il maggiormente impiegato è YES (Yeast Extract Sucrose), ampiamente impiegato per specie dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, ma che non trova un ampio utilizzo per la valutazione dei metaboliti prodotti dalle specie di *Alternaria*.

I substrati che sono stati maggiormente usati per la valutazione della produzione dei metaboliti secondari da parte delle specie di *Alternaria* sono principalmente due: substrati naturali come il riso autoclavato (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986) o substrati artificiali, tra i quali il più ampiamente utilizzato è DRYES (Dichloran Rose bengal Yeast Extract Sucrose) (Andersen e Frisvad, 2002; Andersen, Thrane, 1996; Andersen et al., 2001; Andersen et al., 2005; Andersen et al., 2008; Christensen et al., 2005).

Nell'ambito del presente lavoro alcuni isolati di *Alternaria* raccolti nell'ambito delle analisi micologiche effettuate nel biennio 2006-2007 sono stati identificati e caratterizzati sulla base dei diametri di crescita a differenti temperature e della produzione di micotossine.

Materiali e metodi

Identificazione specifica degli isolati di *Alternaria* spp.

Di ciascuno degli isolati identificati e caratterizzati, è stata inizialmente allestito un certo numero di colture monoconidiali, in modo da ridurre la variabilità di ciascun ceppo fungino e, al contempo, una volta identificati gli isolati, valutare la variabilità di crescita e produzione di metaboliti di ciascun isolato fungino, sulla base di un certo numero di colture monoconidiali.

Le colture monoconidiali sono state preparate a partire da colonie fungine cresciute a 25°C, al buio per 7 giorni su piastre da 90 mm contenenti PDA; su tali colonie sono stati versati 15 ml di soluzione sterile allo 0,1% di Tween 20 e allestita una sospensione conidica la cui concentrazione è stata valutata con contaglobuli Thoma. La concentrazione iniziale, in genere dell'ordine di 10⁶ conidi/ml, è stata aggiustata, con opportune diluizioni, fino ad ottenere una sospensione contenente 10³ conidi/ml; di tale sospensione sono state prelevate una decina di aliquote da 100 µl ciascuna ed inoculate in altrettante piastre da 90 mm contenenti WA (Water Agar, Samson et al., 2000) al 2%. Le aliquote sono state distribuite omogeneamente sulla superficie del substrato, fino a completo assorbimento, impiegando un'ansa di vetro precedentemente sterilizzata tramite immersione in etanolo assoluto e passaggio alla fiamma di un bunsen.

Le piastre così inoculate sono state poste in armadio climatico a 25°C, al buio, per 24 ore e in seguito osservate al microscopio ottico a 250 e 400 ingrandimenti per rilevare la presenza di conidi singoli germinanti, che sono stati rimossi sterilmente con una porzione del substrato di crescita, trasferiti in piastre da 60 mm contenenti PDA e poste a crescere per 7 giorni a 25°C al buio; di ciascun isolato fungino sono state allestite circa una ventina di colture monoconidiali. Le successive analisi sono state condotte partendo da tali colture.

L'identificazione a livello di specie di 49 isolati di *Alternaria* spp. ottenuti dalle analisi micologiche è stata effettuata sulla base della morfologia di colonia e delle strutture riproduttive inoculando gli isolati su Potato Carrot Agar (PCA) (Simmons, Roberts, 1993; Simmons, 2007) e ponendoli a crescere in condizioni standardizzate. Le piastre inoculate, del diametro di 90 mm, sono state poste in armadio climatico in un solo strato, alla temperatura di 22°C, sottoposti a luce fluorescente con un fotoperiodo di 8 ore di luce alternate a 16 ore di buio per 7 giorni. Dopo 5 giorni, da ciascuna colonia è stata rimossa sterilmente una porzione della dimensione di circa 0,5 x 2 cm dal margine in attiva crescita, perpendicolarmente al raggio della colonia e le colonie, così trattate, sono state nuovamente poste nelle condizioni sopra esposte fino allo scadere dei 7 giorni.

Al termine del periodo di incubazione le colonie sono state osservate allo steromicroscopio (microscopio entomologico Leica Wild M420) a 50 ingrandimenti per la valutazione delle strutture conidiofore e per la determinazione del gruppo di sporulazione corrispondente (Roberts et al., 2000; Simmons, Roberts, 1993; Simmons, 2007); le caratteristiche dei conidi (dimensioni, presenza/assenza di becco, colore, catenulazione) sono state valutate allestendo dei preparati ottenuti appoggiando sulla superficie delle colonie delle sottili strisce di nastro adesivo e ponendo tale preparato su un vetrino portaoggetto con una goccia di acido lattico. Le osservazioni dei preparati sono state effettuate al microscopio ottico (Zeiss Axioplan, Germany) a 400 e a 1000 ingrandimenti (Simmons, 2007).

La definizione del *pattern* di sporulazione e l'identificazione a livello specifico degli isolati è stata effettuata sulla base di Simmons e Roberts (1993) e di Simmons (2007) e attraverso il confronto con una serie di ceppi di riferimento ottenuti da differenti fonti:

- Dr. R. G. Roberts, USDA-ARS Tree Fruit Research Laboratory Wenatchee, WA;
- Dr.ssa R. Musetti, Dr.ssa R. Polizzotto, Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante Università degli Studi di Udine;
- CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands.

Tabella 30. Isolati rappresentativi utilizzati nel presente lavoro; indicazione del numero di riferimento della collezione di provenienza (con eventuale corrispondenza con altre collezioni), gruppo di sporulazione (Simmons, Roberts, 1993), ospite di provenienza, origine geografica, collezione di provenienza.

CRA-VIT	Isolato	Isolato (II)	GR.	Specie	Ospite	Origine	Fonte
91	T50C1		3	<i>A. arborescens</i> E.G.Simmons	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Tocai	Italia, (GO)	Uni. UD
92	VP13B2B2		5	<i>A. tenuissima</i> (Nees) Wiltshire	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Sangiovese	Italia, (GR)	Uni. UD
93	RGR 91.0086	EGS 38.1830	2	<i>A. gaisen</i> Nagano	<i>Pyrus pyrifolia</i> (N. L. Burm.) Nakai	Korea	RGR
94	RGR 91.0105	EGS 90.0131	1	<i>A. sp.</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i> (N. L. Burm.) Nakai	Giappone	RGR
95	RGR 91.0128	EGS 34.0390	4	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.	<i>Datura metel</i> L.	India	RGR
96	RGR 91.0166	EGS 90.0512	2	<i>A. gaisen</i> Nagano	<i>Pyrus pyrifolia</i> (N. L. Burm.) Nakai	Giappone	RGR
97	RGR 96.0017	EGS 27.193=CBS 210.86	6	<i>A. infectoria</i> E.G.Simmons	<i>Triticum aestivum</i> L.	UK	RGR
98	RGR 98.0382	EGS 38.029=CBS 106.24	5	<i>A. mali</i> Roberts	<i>Malus sylvestris</i> L.	USA	RGR
99	RGR 99.0128	EGS 39.128	3	<i>A. arborescens</i> E.G.Simmons	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	USA, CA	RGR
100	RGR 01.0102		3	<i>A. sp.</i>	<i>Prunus avium</i> L.	Danimarca	RGR
101	RGR 01.0114		5	<i>A. sp.</i>	<i>Prunus avium</i> L.	Danimarca	RGR
102	RGR 01.0149	BPI 878241=CBS 121923	6	<i>A. cerasidanica</i>	<i>Prunus avium</i> L.	Danimarca	RGR
103	RGR 01.0204	CBS 121547	"7"	<i>A. yaliinfiens</i> R.G.Roberts	<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehder "Ya Li"	Cina	RGR
ISV 6338	CBS 916.96		4	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.	<i>Arachis hypogaea</i> L.	India	CBS

Abbreviazioni impiegate per le collezioni:

RGR: R. G. Roberts, USDA-ARS Tree Fruit Research Laboratory Wenatchee, WA, USA;

EGS: E. G. Simmon;

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands;

BPI: U.S. National Fungus Collections;

Uni. UD: Dr.ssa R. Musetti, Dr.ssa R. Polizzotto, Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante Università degli Studi di Udine;

Caratterizzazione degli isolati di *Alternaria* spp. alle diverse temperature e produzione di micotossine

Variabilità di colture monoconidiali

Le colture monoconidiali sono state utilizzate per una prima valutazione, all'interno di ciascun isolato, della variabilità degli accrescimenti alle tre temperature considerate e della produzione di metaboliti di ciascun isolato fungino.

Tale valutazione è stata condotta su un campione rappresentato da 10 isolati, ripartiti equamente tra le tre specie identificate, dei quali sono state considerate 6 monoconidiali (eccetto per due isolati, 31C e 157F dei quali sono state considerate rispettivamente 4 e 5 colture monoconidiali).

Gli isolati sono stati inizialmente inoculati su PDA e posti a crescere per 7 giorni, a 25°C al buio in armadio climatico; da tali colonie sono stati prelevati sterilmente dei conidi e inoculati in tre punti su piastre Petri da 90 mm contenenti DRYES (Dichloran Rose bengal Yeast Extract Sucrose) (Samson et al., 2000).

DRYES è stato modificato secondo Andersen (comunicazione personale) con l'aggiunta di 0,05 g/l di MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/l di ZnSO₄·7H₂O e 0,005 g/l di CuSO₄·5H₂O.

Gli isolati sono stati posti a tre diverse temperature: 25, 35 e 37°C in altrettanti armadi climatici, al buio; sono state allestite 2 ripetizioni di ciascuna piastra, per la temperatura di 25 e 35°C e una ripetizione per la temperatura di 37°C. Ogni 7 giorni, per due settimane, sono stati registrati i diametri medi delle 6 colonie (25 e 35°C) e delle 3 colonie (37°C) (Pitt, Hocking, 1999) e allo scadere dei 14 giorni le colonie sono state estratte per valutare la produzione delle micotossine AOH, AME e ALT.

Il protocollo di estrazione ha seguito quello proposto da Smedgaard (1997) modificato per *Alternaria* (Andersen et al., 2005; 2002; 2001) con alcune variazioni: da ciascuna delle tre colonie cresciute su ciascuno dei tre substrati sono stati prelevati con foracolonia da 6 mm di diametro numerosi tondelli di micelio, dal centro, a metà del raggio e alla periferia della colonia, posti in microprovette da 2 ml e posti a seccare in stufa per 48 ore a 60°C (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986); al termine delle 48 ore sono stati registrati i pesi secchi e i tondelli sono stati estratti aggiungendo 1 ml di una soluzione di etil acetato-acido formico 99:1 e mantenendo gli isolati per 24 ore al buio, in agitazione su agitatore orbitale, a 25°C; dopo le 24 ore, l'estratto è stato prelevato e posto in una nuova provetta.

La produzione delle tossine è stata valutata tramite l'impiego della cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC), impiegando delle lastre in gel di silice ad alta risoluzione, *High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC, con indicatore di fluorescenza F-254, 20x10 cm (Macherey Nagel GmbH & Co Duren, Germania).

Di ciascun estratto sono stati prelevati 2 µl, posti sulle lastre HPTLC e sviluppati con una fase mobile rappresentata da una soluzione di toluene-etil acetato-acido formico (TEF) 60:30:10, fino al raggiungimento, da parte dell'eluente, di metà della lastra; al termine della corsa cromatografica le lastre sono state lasciate asciugare completamente e i metaboliti sono stati visualizzati esponendo la lastra a radiazioni UV a 365 nm emesse dal transilluminatore Bio-Rad UV Transilluminator 2000.

Le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Olympus C-4040 e sottoposte a analisi densitometrica mediante l'impiego del software Image J 1.37.

L'identità dei metaboliti rilevati su lastra e la loro quantificazione è stata effettuata per confronto con gli standard delle tre tossine (Sigma-Aldrich, Italia), dissolti in metanolo alla concentrazione di 0,01 µg/µl caricati su lastra assieme agli estratti delle colonie.

Il limite di rilevabilità della fluorescenza delle tre tossine, valutato con diluizioni seriali della soluzione impiegata nelle analisi cromatografiche, è risultato pari a 0,001 µg per ALT, 0,0005 µg per AOH e 0,0005 µg per AME; il limite teorico di rilevazione nei miceli è stato valutato pari ad 1 µg/g per ALT e 0,5 µg/g per AOH e AME.

La produzione delle tre micotossine è stata rappresentata come quantità di micotossina prodotta per unità di peso secco di micelio (µg micotossina/g micelio).

I diametri di crescita a 7 e a 14 giorni alle tre temperature per le specie considerate e il dato relativo alla produzione delle tre micotossine, sono stati trattati come variabili e sottoposte separatamente ad analisi della varianza (ANOVA) a 2 vie, considerando come fattori la specie di appartenenza (9 trattamenti) e gli isolati fungini (59 trattamenti); il confronto delle medie è stato effettuato con il test Student-Newman-Keuls (SNK), con un livello di significatività del 5% (P=0,05).

Gli isolati fungini sono stati sottoposti ad analisi multivariata mediante la tecnica della *cluster analysis*; gli isolati sono stati confrontati attraverso la costruzione della matrice delle distanze euclidee e la sequenza di agglomerazione dei gruppi, rappresentata dal dendrogramma, è stata effettuata impiegando l'algoritmo del legame completo.

Le analisi sono state condotte separatamente per il dato relativo ai diametri di crescita e per il dato relativo alla produzione dei metaboliti secondari.

Le elaborazioni statistiche sono state condotte con il programma Statistica 7.1 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Risultati

Identificazione specifica degli isolati di *Alternaria* spp.

La Tabella 31 riporta il prospetto dei 49 isolati identificati e dei 12 isolati di riferimento, con l'indicazione della provenienza, della specie e del gruppo di sporulazione corrispondente.

Il primo numero della sigla che contraddistingue l'isolato rappresenta il campione di uva di provenienza, mentre la lettera contraddistingue i diversi isolati ottenuti da ciascun campione; la tabella riporta il gruppo morfologico di appartenenza, basato sull'identificazione del pattern di sporulazione, come indicato da Simmons e Roberts (1993).

Tabella 31. Prospetto dei 49 isolati di *Alternaria* identificati a livello specifico e impiegati per le caratterizzazioni morfologiche e chimiche, con indicazione della sigla dell'isolato, del gruppo di sporulazione (Gr.), della specie, della regione e località del prelievo, il vitigno l'anno di isolamento e la fonte dei campioni (CRA-VIT: Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano, TV; CRA-VIC: Unità di Ricerca per la Viticoltura, Arezzo, AR).

Isolato	Gr.	Specie	Regione	Località	Vitigno	Anno isolamento	Fonte
5B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
20A	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
21A	4	<i>A. alternata</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2006	CRA-VIT
42E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2006	CRA-VIT
70A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
100A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2006	CRA-VIT
132C	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIT
136D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIT
148A	4	<i>A. alternata</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2006	CRA-VIT
170A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2006	CRA-VIT
174D	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2006	CRA-VIT
210A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
225C	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2006	CRA-VIT
233B	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIT
233D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIT
26C	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT

29E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
31C	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
32F	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
34D	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
35E	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
36E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
52L	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2007	CRA-VIT
121B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
121G	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
122A	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
122B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
123B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
123D	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
124A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2007	CRA-VIT
125B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2007	CRA-VIT
139C	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
141B	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
141G	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
156C	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
156G	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
157F	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
158B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
162B	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
162E	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
163I	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
173B	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
174C	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Sangiovese	2007	CRA-VIC
177D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Sangiovese	2007	CRA-VIC
180G	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
182F	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
189C	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
191B	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
191E	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC

Gli isolati identificati presentano tutti conidi di dimensioni medie e piccole (“*small spored Alternaria*”) e appartengono alle specie *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*; dei 49 isolati identificati 7 appartengono alla specie *A. alternata*, 26 ad *A. arborescens* e 16 ad *A. tenuissima*.

Risulta evidente come più della metà degli isolati (53,1%), scelti casualmente tra i diversi campioni analizzati, siano riferibili alla specie *A. arborescens* e circa un terzo (32,6%) ad *A. tenuissima*; *A. alternata* ha rappresentato circa solo un settimo (14,3%) degli isolati identificati.

La presenza del genere *Alternaria* su uva è stata ripetutamente segnalata e, in base alle frequenze di isolamento rappresenta uno dei generi fungini dominanti la composizione specifica della micoflora del grappolo, se non addirittura la specie in assoluto più frequente.

Indagini condotte su differenti vitigni nella regione di Mendoza, in Argentina su uve raccolte alla vendemmia, hanno rilevato che il genere *Alternaria*, è in assoluto il più frequente su grappolo (80% dei campioni), al quale fa seguito il genere *Aspergillus* spp. (70%), (Magnoli et al., 2003); l'elevata presenza di *Alternaria*, assieme ad *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* è stata riportata anche in Brasile (Da Rocha Rosa et al., 2002). Da uno studio effettuato su diversi campioni, raccolti dall'allegagione alla vendemmia, su diversi vitigni in tre regioni della Spagna, emerge che *Alternaria* è il genere dominante, assieme a diverse specie di lieviti e al genere *Aspergillus*, con un andamento decrescente dall'allegagione alla vendemmia, opposto a quello che si osserva per lieviti e *Aspergillus* spp. (Bellí et al., 2006)

Nonostante tali osservazioni, uno studio tassonomico approfondito a livello specifico per tale genere fungino su uva non è mai stato condotto, e la sola specie riportata finora è stata *A. alternata* (Ostrý et al., 2007). Tale specie è stata ripetutamente identificata anche su numerose colture in area mediterranea, tra le quali pomodori, olive, agrumi, cereali, girasole, colza, peperoni, meloni, sporadicamente associata ad altre specie del genere (Logrieco et al., 2003).

Tuttavia, studi recenti condotti sulla micoflora di vari tipi di frutta, tra cui mela (Kang et al., 2002; Serdani et al., 2002), diverse specie e cultivar di agrumi, pistacchi (Pryor, Michailides, 2002), noci e nocciole (Hong et al., 2006), nonché di numerosi altri prodotti agricoli di ampio consumo quali in particolare i cereali.

Su cereali, vi sono indicazioni che riportano come *A. alternata* sia la specie più frequente (Pacin et al., 2001), altre riportano essere dominanti *A. tenuissima* e *A. alternata*, alle quali si affiancano *A. longipes*, *A. arborescens*, *A. gaisen* e *A. mali* isolate con bassa frequenza (Patriarca et al., 2007) altre ancora indicano essere *A. triticina* la più frequente, assieme ad *A. alternata* su diversi tipi di cereali, in area mediterranea, con presenze occasionali di *A. tenuissima* e *A. infectoria* (Logrieco et al., 1990).

In Danimarca la specie isolata con maggiore frequenza su orzo è stata invece *A. infectoria*, in grado di contaminare più del 90% delle cariossidi, seguita da *A. tenuissima*; *A. alternata*, pur presente, non è risultata essere la specie dominante. Tale discrepanza potrebbe essere associata alla non corretta applicazione dei protocolli di identificazione morfologica degli isolati, che riflette la confusione nell'attuale tassonomia del genere *Alternaria* (Andersen et al, 1996; Andersen, Thrane, 1996).

Studi condotti su marciumi in post-raccolta su mele e agrumi, rispettivamente *dry core rot*, (DCR) e *alternaria black rot* (ABR), associati ad *Alternaria*, che in passato si supponevano associati a *A.*

alternata e *A. citri*, in realtà hanno indicato che tali deperimenti possono essere associate a numerose altre specie del genere *Alternaria*. Indagini condotte in Sud Africa, sulla base della sequenza dei geni per l'istone H3 e delle regioni ITS 1 e ITS 2 del DNA ribosomale, hanno permesso di distinguere dei raggruppamenti di specie, tra i quali troviamo *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. tenuissima* e isolati di non chiara attribuzione (Kang et al., 2002); tra i tre gruppi di specie identificate associate al marciume del torsolo su mela (*dry core rot*, DCR), in particolare, al gruppo morfologico di *A. tenuissima*.

La caratterizzazione dei gruppi di specie associati al marciume del torsolo delle mele in Sud Africa, basata su ITS 1 e 2 e sul profilo dei metaboliti secondari, ha distinto tre gruppi di specie: *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* e di questi il gruppo principale è rappresentato da *A. tenuissima* species-group (Serdani et al., 2002).

Isolati provenienti da noci e nocciole in Italia sono stati suddivisi in tre gruppi morfologici: il gruppo di *A. alternata*, il gruppo di *A. tenuissima* ed il gruppo di *A. arborescens* e gli stessi gruppi morfologici, ai quali si associa la presenza del gruppo morfologico di *A. infectoria*, sono stati individuati anche in vari tessuti di pistacchio, in frutteti californiani; tali raggruppamenti hanno dimostrato di possedere diversi livelli di patogenicità nei confronti del pistacchio, minore per il gruppo di *A. infectoria* (Pryor e Michailides 2002).

L'indicazione che questi tre gruppi morfologici di *Alternaria* spp. sono associate a malattie di noci e nocciole, ma anche di agrumi, pistacchio, mandorle e mele, come indicato da altri autori, rivela che questi gruppi morfologici sono ampiamente diffusi e occupano simili nicchie ecologiche come i tessuti di foglie, frutti o entrambi (Hong et al. 2006).

Il risultato di questa prima indagine condotta sui marciumi secondari del grappolo rappresenta la prima segnalazione della presenza di specie di *Alternaria* diverse da *A. alternata*, in particolare è la prima volta che viene indicata la presenza di *A. arborescens* e *A. tenuissima* su grappolo d'uva.

Anche nel caso dell'uva, uno studio tassonomico dettagliato sul genere *Alternaria* risulta auspicabile per una migliore comprensione del ruolo che le specie di questo genere rivestono nell'ambito dei marciumi secondari, in particolare con riferimento alle problematiche associate alla produzione e al rilascio, nell'uva e nel vino, di metaboliti tossici.

Variabilità di accrescimenti e produzione di metaboliti tra colture monoconidiali

La Tabella 32 riporta i diametri di crescita medi, a 7 giorni, di ciascuna delle monoconidiali valutate dei diversi isolati delle tre specie, mentre la Tabella 33 riporta, per gli stessi isolati e per le stesse colture monoconidiali i dati di produzione rilevati a 14 giorni di crescita.

Complessivamente sono stati considerati 4 isolati fungini della specie *A. alternata*, 3 di *A. arborescens* e 3 di *A. tenuissima*, comprensivi per ciascuna specie di un isolato di riferimento. Questi ultimi sono contraddistinti in tabella da un asterisco (*).

Tabella 32. Accrescimenti a 25, 35 e 37°C, espressi in mm.

Confronto tra colture monoconidiali di 10 isolati appartenenti alle tre specie identificate; dati medi con relativa deviazione standard e indicazione delle medie statisticamente differenti al test SNK (P=0,05). Gli isolati di riferimento sono indicati con un asterisco (*).

Specie	Isolato	Mon.	25°C - 7 giorni			35°C - 7 giorni			37°C - 7 giorni		
			media	SNK	dev.st	media	SNK	dev.st	media	SNK	dev.st
<i>A. alternata</i>	162B	1	26,8	a	1,3	29,0	a	1,0	1,7	a	2,9
		2	26,7	a	1,3	29,5	a	0,5	0,0	a	0,0
		3	25,8	ab	1,3	30,3	a	2,8	0,0	a	0,0
		4	24,4	b	0,9	30,3	a	1,6	0,0	a	0,0
		5	22,6	c	1,9	29,3	a	0,8	0,0	a	0,0
		6	20,8	d	1,2	31,5	a	1,0	1,0	a	1,7
	173B	2	22,8	b	0,9	31,0	a	0,5	4,0	a	2,6
		6	21,4	b	3,0	32,0	a	0,5	1,7	a	1,2
		7	23,2	b	1,2	31,0	a	0,5	4,0	a	2,6
		8	30,6	a	1,4	32,0	a	0,5	1,7	a	1,2
		9	31,3	a	0,7	31,8	a	1,6	1,7	a	1,2
		11	22,2	b	1,3	30,2	a	0,6	2,3	a	2,3
	191E	1	28,1	a	1,0	21,3	a	0,5	1,7	a	1,2
		2	27,9	a	0,4	20,2	a	1,5	0,0	b	0,0
		10	23,8	a	0,8	19,3	a	1,4	1,0	b	0,0
		12	28,4	a	1,2	19,8	a	1,6	1,3	b	0,6
		13	29,2	a	0,9	19,9	a	0,7	1,2	b	0,3
		16	28,8	a	1,3	19,9	a	0,7	0,3	b	0,6
	ISV 6338*	1	37,7	b	0,8	39,3	a	1,3	1,0	a	0,0
		2	37,3	b	0,9	39,7	a	0,3	1,0	a	0,0
3		35,9	c	0,4	39,5	a	0,0	1,3	a	0,6	
4		38,8	a	0,3	40,0	a	0,5	1,2	a	0,3	

		5	36,2	c	1,0	40,3	a	0,3	1,0	a	0,0
		6	35,3	c	0,5	40,3	a	0,3	1,0	a	0,0
<i>A. arborescens</i>	91*	1	33,5	a	1,1	27,3	a	0,4	3,7	a	1,2
		2	30,8	b	0,8	25,5	b	0,0	2,0	a	2,6
		3	29,2	c	0,4	27,1	a	0,9	1,3	a	2,3
		4	33,3	a	0,9	27,6	a	0,5	2,7	a	2,5
		5	29,6	b	0,6	27,4	a	0,5	0,0	a	0,0
		6	29,6	b	0,4	26,9	a	0,2	0,7	a	1,2
	156C	1	20,8	c	2,3	28,3	a	1,5	7,3	a	1,2
		2	21,8	bc	1,4	27,7	a	0,6	6,7	a	3,3
		3	22,6	bc	2,4	26,7	a	1,3	0,0	b	0,0
		4	23,9	bc	2,3	28,7	a	0,6	7,7	a	1,2
		5	24,8	b	2,8	29,0	a	0,9	5,3	a	0,6
		6	29,9	a	1,9	28,8	a	0,3	4,7	a	1,5
	177D	1	26,5	d	0,4	26,0	a	0,0	3,7	a	3,5
		2	26,9	cd	0,4	25,3	a	0,3	0,0	a	0,0
		3	27,3	c	0,3	24,8	a	0,8	1,7	a	2,9
		4	28,6	b	0,9	26,0	a	0,0	4,0	a	3,6
		5	30,3	a	0,3	25,3	a	0,6	4,0	a	3,5
		6	30,1	a	0,7	25,3	a	0,6	4,7	a	4,0
<i>A. tenuissima</i>	92*	1	37,6	a	0,4	15,2	a	0,8	0,0	a	0,0
		2	35,8	a	0,8	15,2	a	0,8	0,0	a	0,0
		3	36,6	a	1,0	15,2	a	0,8	0,0	a	0,0
		4	38,8	a	0,7	17,5	a	0,9	0,0	a	0,0
		5	36,0	a	1,1	15,0	a	0,0	0,0	a	0,0
		6	36,6	a	0,9	14,5	a	0,0	0,0	a	0,0
	157F	1	31,5	a	3,2	20,8	d	0,3	0,0	-	0,0
		3	33,5	a	2,3	26,4	b	0,5	0,0	-	0,0
		4	32,7	a	2,2	27,6	b	0,4	0,0	-	0,0
		6	34,3	a	0,8	25,0	c	1,8	0,0	-	0,0
		7	34,0	a	2,1	32,0	a	0,9	0,0	-	0,0
	31C	1	36,7	b	2,4	31,6	a	1,7	0,0	-	0,0
		2	39,3	a	1,0	30,6	a	0,6	0,0	-	0,0
		3	39,4	a	1,0	32,6	a	1,1	0,0	-	0,0
		4	38,8	a	0,3	32,1	a	2,2	0,0	-	0,0

Tabella 33. Produzione delle micotossine ALT, AOH e AME, espresse in µg di metabolita prodotto da un grammo di micelio (peso secco).

Confronto tra colture monoconidiali di 10 isolati appartenenti alle tre specie identificate; dati medi con relativa deviazione standard e indicazione delle medie statisticamente differenti al test SNK (P=0,05).

Specie	Isolato	Mon.	ALT			AOH			AME		
			media	SNK	dev.st	media	SNK	dev.st	media	SNK	dev.st
<i>A. alternata</i>	162B	1	-	c	-	1,33	ab	0,87	1,52	a	0,76
		2	0,38	b	0,15	1,30	ab	0,23	0,17	b	0,21
		3	0,61	a	0,24	2,23	a	0,56	0,48	b	0,69
		4	-	c	-	0,94	b	0,65	0,42	b	0,38
		5	-	c	-	0,20	c	0,40	-	b	-
		6	-	c	-	-	c	-	-	b	-
	173B	2	-	-	-	1,77	a	1,18	1,25	a	0,59
		6	-	-	-	-	a	-	-	a	-
		7	-	-	-	0,05	a	0,06	-	a	-
		8	-	-	-	0,60	a	0,57	-	a	-
		9	-	-	-	4,55	a	5,34	5,75	a	5,76
		11	-	-	-	0,20	a	0,41	0,05	a	0,06
	191E	1	-	a	-	3,19	a	3,73	2,11	a	1,47
		2	-	a	-	0,05	a	0,09	-	b	-
		10	0,01	a	0,02	-	a	-	-	b	-
		12	-	a	-	1,39	a	2,68	0,76	b	1,00
		13	0,02	a	0,05	-	a	-	-	b	-
		16	0,03	a	0,06	-	a	-	-	b	-
	ISV 6338*	1	-	a	-	2,05	b	1,67	1,99	a	2,27
		2	0,14	a	0,23	6,33	ab	2,89	2,72	a	1,90
		3	0,57	a	0,49	10,24	a	3,06	5,75	a	2,80
		4	1,09	a	0,77	10,99	a	2,77	5,96	a	3,54
		5	0,67	a	0,67	10,53	a	5,90	6,14	a	4,50
		6	0,60	a	0,38	12,07	a	2,16	6,91	a	1,85
<i>A. arborescens</i>	91*	1	2,07	a	1,52	25,95	a	10,64	18,42	a	9,41
		2	2,32	a	0,88	25,15	a	7,61	9,79	a	1,81
		3	1,58	a	1,72	24,69	a	16,98	18,46	a	18,79
		4	2,96	a	0,18	29,07	a	4,61	16,00	a	1,98
		5	-	b	-	1,78	b	0,66	0,85	b	0,29
		6	3,04	a	0,55	33,97	a	11,88	17,67	a	8,63
	156C	1	-	-	-	18,29	bc	10,97	14,19	a	4,55
		2	-	-	-	15,16	c	10,06	9,64	a	2,38
		3	-	-	-	40,32	abc	15,80	15,37	a	5,15

		4	-	-	-	23,38	abc	7,22	7,97	a	0,82
		5	-	-	-	110,06	a	96,03	20,57	a	17,44
		6	-	-	-	63,12	ab	35,07	27,98	a	22,97
	177D	1	8,97	a	5,11	110,88	a	24,56	52,41	a	27,87
		2	8,21	a	4,02	118,27	a	35,89	43,25	a	25,05
		3	17,87	a	5,39	126,72	a	13,57	50,06	a	7,42
		4	13,93	a	5,88	136,54	a	15,87	87,24	a	16,20
		5	17,11	a	19,74	125,26	a	31,49	77,40	a	52,82
6	17,95	a	10,87	130,09	a	24,03	73,76	a	35,59		
<i>A. tenuissima</i>	92*	1	-	b	-	1,02	a	0,22	0,31	ab	0,22
		2	-	b	-	0,81	a	0,18	0,22	ab	0,06
		3	-	b	-	1,26	a	0,59	0,55	a	0,25
		4	-	b	-	0,97	a	0,50	0,51	a	0,24
		5	0,01	b	0,01	0,54	a	0,15	0,04	b	0,05
		6	0,07	a	0,04	0,79	a	0,29	0,45	ab	0,31
	157F	1	-	a	-	0,89	a	0,41	0,26	a	0,17
		3	0,40	a	0,46	5,20	a	4,66	5,48	a	4,75
		4	0,29	a	0,37	4,34	a	3,03	4,98	a	3,10
		6	0,20	a	0,40	4,14	a	4,18	3,48	a	4,55
		7	0,02	a	0,02	1,94	a	1,12	2,50	a	1,42
	31C	1	4,18	a	5,73	107,44	a	41,44	100,05	a	20,71
		2	1,92	a	0,80	25,27	b	10,38	19,01	b	4,47
		3	5,50	a	3,91	92,26	a	47,51	46,90	ab	30,81
		4	2,88	a	1,22	64,59	a	36,78	56,55	ab	32,95

Gli isolati hanno mostrato differenti comportamenti e livello di colture monoconidiali, non influenzato dalla specie di appartenenza; per la specie *A. alternata* sono stati considerati gli isolati 162B, 173B, 191E e l'isolato di riferimento ISV 6338 (CBS 916.96), per *A. arborescens* l'isolato di riferimento 91 (T50C1, Università di Udine) e gli isolati 156C e 177D e per *A. tenuissima* l'isolato di riferimento 92 (VP13B2B2, Università di Udine) e gli isolati 157F e 31C.

Di ciascun isolato sono state considerate sei diverse colture monoconidiali, eccetto per 157F e 31C per i quali sono state utilizzate, rispettivamente 5 e 4 monoconidiali; ciascun ceppo monoconidiale è stato contraddistinto da un numero.

L'isolato 162B ha mostrato crescite diverse a 25°C, con le prime tre monoconidiali a crescita maggiore, e le altre significativamente più piccole e differenti tra loro, mentre non sono state rilevate differenze a 35 e a 37°C.

La produzione di ALT è stata rilevata in quantità molto limitate e solo nelle monoconidiali 2 e 3, le prime quattro monoconidiali sono state le maggiori produttrici di AOH, mentre la prima ha prodotto le quantità più elevate di AME.

Per l'isolato 173B la crescita maggiore a 25°C è stata registrata per colture 8 e 9, mentre le altre non hanno mostrato significative differenze; non è stata registrata produzione di ALT, mentre per le altre micotossine, non sono state rilevate delle differenze.

L'isolato 191E non ha mostrato differenze di crescita a 25 e a 35°C, mentre la prima monoconidiale è cresciuta più delle altre a 37°C; tale coltura ha anche prodotto la maggiore quantità di AME, mentre per le altre tossine non sono state osservate differenze.

L'isolato di riferimento ISV 6338 ha mostrato la presenza di tre gruppi di isolati, con crescita differente a 25°C, con la coltura 4 a crescita maggiore, seguita dalle colture 1, 2 e con le colture 3, 5, e 6 che hanno raggiunto i diametri minori delle sei monoconidiali; nessuna differenza è stata apprezzabile a 35 e a 37°C, ne' complessivamente per la produzione di micotossine.

L'isolato 91, riferimento di *A. arborescens*, ha mostrato tre gruppi di crescita a 25°C, con le colture 1 e 4 a crescita maggiore, le colture 2, 5, 6 intermedie e la 3 minore; a 35°C la coltura 2 è cresciuta significativamente meno, mentre a 37°C le differenze non sono state significative. La monoconidiale 5 è stata l'unica che ha prodotto tutte e tre le micotossine in quantità significativamente minore delle altre colture.

Anche 156C ha mostrato tre gruppi di crescita a 25°C, con la coltura 6 caratterizzata da maggiore crescita, le colture 2 e 5 di crescita intermedia e la 1 minore; nessuna differenza è stata osservata a 35°C e nessuna crescita è stata registrabile a 37°C. Nessuna delle colture ha prodotto ALT, la coltura 5 è stata la maggiore produttrice di AOH, mentre la 2 la meno produttrice, mentre non sono state osservate differenze per AME.

Le monoconidiali 5 e 6 di 177D sono state caratterizzate dalla maggiore crescita a 25°C, mentre le altre monoconidiali hanno mostrato differenze di crescita significative, l'una dall'altra decrescenti nell'ordine 4, 3, 2, 1; nessuna differenza è stata osservata a 35 e a 37°C e nemmeno nessuna differenza di produzione delle tre micotossine.

L'isolato 92, riferimento di *A. tenuissima*, non ha mostrato alcuna differenza di crescita alle tre temperature; la monoconidiale 6 ha registrato la maggiore produzione di ALT, non sono state evidenziate differenze per AOH e per AME le monoconidiali hanno mostrato solo lievi differenze.

L'isolato 157F non ha presentato differenze di crescita a 25°C, la colonia maggiore a 35°C è stata la 6, seguita da 2 e 3, tra loro senza differenze, e da 5 e 1, con crescita differente mentre nessuna colonia è cresciuta a 37°C; non sono state rilevate differenze di produzione per nessuna delle tre tossine.

Per 31C, la monoconidiale 1 è cresciuta meno delle altre a 25°C, a 35°C non sono riscontrabili differenze e nessuna colonia è cresciuta a 37°C; la produzione di ALT non ha mostrato differenze, AOH è stato prodotto maggiormente dalla monoconidiale 2, mentre la produzione di AME è stata simile tra le quattro colture.

Caratterizzazione degli isolati di *Alternaria* spp. alle diverse temperature e produzione di micotossine

Diametri di crescita

La tabella 34 riporta i diametri medi di crescita, in millimetri, di 47 isolati ottenuti da uva e di 12 ceppi di riferimento distinti per specie. Sono riportati il diametro medio (“med.”) con relativa deviazione standard (d.s.) delle 6 ripetizioni per la temperatura di 25 e 35°C e di 3 ripetizioni per la temperatura di 37°C; per ciascun isolato è indicata la specie di appartenenza.

L’indicazione “Rif.” contraddistingue gli isolati di riferimento per la specie, indicati con le prime due lettere dell’epiteto specifico. Per ogni isolato, l’anno d’isolamento e il gruppo morfologico di appartenenza sono indicati in Tabella 34.

Tabella 34. Crescita alle temperature di 25, 35, 37°C dei 59 isolati considerati (47 isolati da uva e 12 ceppi di riferimento). Dato medio in mm con relativa deviazione standard.

Isolato	Specie	Rif.	25°C				35°C				37°C			
			7 giorni		14 giorni		7 giorni		14 giorni		7 giorni		14 giorni	
			med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.
21A	<i>A. alternata</i>	-	32,0	0,0	46,7	1,8	44,3	1,3	54,8	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
132C	<i>A. alternata</i>	-	33,6	0,2	50,0	2,5	9,0	0,0	37,0	3,5	2,0	1,0	2,2	1,3
148A	<i>A. alternata</i>	-	34,8	1,0	40,3	3,4	28,3	0,6	42,5	1,8	0,7	1,2	0,7	1,2
162B	<i>A. alternata</i>	-	26,8	1,3	42,7	1,6	29,0	1,0	43,0	0,9	1,7	2,9	2,0	3,5
173B	<i>A. alternata</i>	-	22,8	0,9	38,6	3,0	31,0	0,5	45,2	0,8	4,0	2,6	10,0	8,7
189C	<i>A. alternata</i>	-	28,2	0,4	42,1	0,6	21,0	0,0	36,0	0,0	0,8	1,4	1,0	1,7
191E	<i>A. alternata</i>	-	28,1	1,0	43,5	1,4	21,3	0,5	30,7	0,5	1,7	1,2	2,3	0,6
95	<i>A. alternata</i>	AL	35,8	0,8	54,6	2,1	40,3	1,3	52,8	1,0	1,5	0,5	1,7	0,6
ISV6338	<i>A. alternata</i>	AL	37,7	0,8	48,8	7,1	39,3	1,3	53,7	2,3	1,0	0,0	1,0	0,0
5B	<i>A. arborescens</i>	-	29,9	0,4	46,8	3,5	30,8	0,3	49,2	2,3	2,3	0,6	3,0	0,9
29E	<i>A. arborescens</i>	-	34,3	0,7	46,7	8,3	33,8	0,7	49,3	1,8	1,0	0,0	5,0	0,0
32F	<i>A. arborescens</i>	-	33,0	0,6	52,7	1,0	29,7	0,3	43,0	0,0	0,0	0,0	9,3	2,1
34D	<i>A. arborescens</i>	-	31,8	0,5	50,6	1,1	29,3	0,3	46,7	2,0	5,5	1,3	24,7	0,6

36E	<i>A. arborescens</i>	-	32,0	0,6	48,4	1,0	30,0	0,9	46,8	0,6	4,0	1,7	19,7	1,5
42E	<i>A. arborescens</i>	-	33,0	0,5	51,2	0,8	27,2	0,3	39,3	0,3	0,0	0,0	4,7	8,1
52L	<i>A. arborescens</i>	-	25,3	0,4	42,8	3,5	22,7	0,8	37,3	2,1	6,7	0,6	12,0	0,0
70A	<i>A. arborescens</i>	-	28,5	0,8	44,0	1,2	27,7	0,8	42,2	0,8	2,7	0,6	3,2	0,3
100A	<i>A. arborescens</i>	-	32,8	0,8	47,8	1,4	28,0	0,0	39,5	0,5	0,7	1,2	6,7	11,5
121B	<i>A. arborescens</i>	-	31,3	0,8	48,2	1,7	15,8	0,8	30,0	1,1	3,5	0,0	14,5	0,0
122B	<i>A. arborescens</i>	-	26,5	0,6	48,2	0,6	28,2	1,0	44,0	0,5	0,0	0,0	11,0	0,0
123B	<i>A. arborescens</i>	-	26,2	0,4	46,0	5,1	25,3	1,7	33,8	1,7	2,7	0,6	21,7	0,6
125B	<i>A. arborescens</i>	-	30,6	5,5	48,4	4,1	28,2	0,3	48,7	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
136D	<i>A. arborescens</i>	-	29,1	0,8	44,7	1,8	24,3	0,6	39,2	1,6	3,3	1,5	9,7	1,5
141G	<i>A. arborescens</i>	-	26,8	4,1	49,3	1,5	28,8	1,4	44,8	0,9	1,0	0,0	5,0	0,0
156C	<i>A. arborescens</i>	-	20,8	2,3	35,5	3,1	28,3	1,5	43,8	0,8	7,3	1,2	9,7	0,6
158B	<i>A. arborescens</i>	-	30,3	0,8	45,8	1,1	29,5	0,0	45,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
162E	<i>A. arborescens</i>	-	29,0	0,5	47,2	0,9	23,7	0,8	38,7	0,8	2,0	0,0	2,2	0,3
163I	<i>A. arborescens</i>	-	32,9	2,5	46,4	3,5	15,0	0,0	26,0	0,0	0,3	0,6	1,3	0,6
170A	<i>A. arborescens</i>	-	35,1	0,9	51,0	1,4	29,5	0,5	43,0	0,0	1,0	0,0	13,0	0,0
177D	<i>A. arborescens</i>	-	26,5	0,4	44,3	1,7	26,0	0,0	41,2	1,0	3,7	3,5	8,3	7,4
210A	<i>A. arborescens</i>	-	34,6	0,5	52,7	0,8	28,7	0,3	43,7	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
225C	<i>A. arborescens</i>	-	28,2	2,0	52,2	1,5	20,3	0,6	45,5	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
233D	<i>A. arborescens</i>	-	29,8	0,5	33,3	0,7	31,7	1,4	44,7	1,6	4,3	2,9	12,0	8,7
91	<i>A. arborescens</i>	AR	33,5	1,1	48,7	1,3	27,3	0,4	38,5	2,9	3,7	1,2	12,3	1,2
99	<i>A. arborescens</i>	AR	34,6	1,1	49,8	0,9	26,0	0,0	29,2	0,6	1,7	1,2	1,7	1,2
102	<i>A. cerasidanica</i>	CE	26,5	2,5	31,6	3,9	7,5	0,0	12,7	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
93	<i>A. gaisen</i>	GA	36,1	1,0	53,8	1,4	33,3	0,3	44,5	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0
96	<i>A. gaisen</i>	GA	36,3	0,7	49,6	1,3	22,3	1,5	40,7	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0
97	<i>A. infectoria</i>	IN	36,8	0,7	51,3	2,4	2,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
98	<i>A. mali</i>	MA	39,4	1,8	54,3	1,4	39,0	0,5	42,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
94	<i>A. sp. gr.1</i>	gr.1	40,6	1,0	52,3	1,4	27,3	0,6	42,3	0,8	2,7	0,6	2,7	0,6
101	<i>A. sp. gr.5</i>	gr.5	35,4	1,9	54,8	1,2	21,0	1,0	34,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
20A	<i>A. tenuissima</i>	-	35,6	0,9	42,4	4,7	37,0	0,5	51,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
26C	<i>A. tenuissima</i>	-	27,8	1,5	41,3	2,4	25,8	0,3	39,4	1,1	0,3	0,6	0,5	0,9
31C	<i>A. tenuissima</i>	-	36,7	2,4	47,2	4,9	31,6	1,7	45,8	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
35E	<i>A. tenuissima</i>	-	28,4	1,0	40,4	0,8	26,7	1,2	38,8	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
121G	<i>A. tenuissima</i>	-	27,7	0,9	41,3	2,1	26,6	0,7	41,3	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0
122A	<i>A. tenuissima</i>	-	26,8	0,5	47,9	1,0	31,2	0,8	46,8	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
139C	<i>A. tenuissima</i>	-	23,8	5,0	37,0	5,5	21,3	5,5	40,8	6,1	0,0	0,0	0,0	0,0
141B	<i>A. tenuissima</i>	-	26,6	0,4	44,7	3,3	31,1	0,5	45,8	0,5	2,0	1,7	21,3	18,6
156G	<i>A. tenuissima</i>	-	34,6	0,8	52,1	0,6	31,7	1,3	51,8	1,4	0,5	0,9	1,0	1,0
157F	<i>A. tenuissima</i>	-	31,5	3,2	42,6	3,9	20,8	0,3	23,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
174C	<i>A. tenuissima</i>	-	27,6	1,2	47,8	0,4	29,3	1,6	44,9	1,4	6,3	5,8	10,0	10,4
174D	<i>A. tenuissima</i>	-	34,8	1,0	48,3	1,3	34,7	1,4	48,2	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
180G	<i>A. tenuissima</i>	-	27,5	0,6	45,7	1,4	29,3	0,6	43,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
182F	<i>A. tenuissima</i>	-	38,7	1,4	56,8	0,8	33,8	2,7	52,3	1,4	6,3	5,8	10,0	10,4

191B	<i>A. tenuissima</i>	-	34,3	1,4	48,3	0,8	6,0	0,0	6,3	0,6	3,0	0,0	5,3	4,0
233B	<i>A. tenuissima</i>	-	29,7	1,1	38,9	2,1	13,3	2,9	20,3	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0
92	<i>A. tenuissima</i>	TE	37,6	0,4	44,7	1,3	15,2	0,8	19,3	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0

La Tabella 35 riporta il prospetto riepilogativo a livello di specie con l'indicazione del diametro medio, massimo e minimo osservato negli isolati di ciascuna, mentre in Tabella 36 è indicato per ciascuna specie, il numero di isolati caratterizzati i diametri medi di crescita registrati alle tre temperature e nei due momenti di rilevazione e il risultato dell'analisi della varianza e del Test SNK di confronto delle medie; a lettera uguale corrispondono medie non significativamente differenti (P=0,05).

**Tabella 35. Crescita alle temperature di 25, 35, 37°C; prospetto riepilogativo delle specie indagate con dato medio, minimo (“min”), massimo (“max”) e deviazione standard (“dev.st”).
Dati in mm.**

Gr.	Specie / isolati	Dato	25°C		35°C		37°C	
			7 giorni	14 giorni	7 giorni	14 giorni	7 giorni	14 giorni
4	<i>A. alternata</i> (9)	media	31,3	45,8	28,4	42,3	1,3	2,6
		dev.st	4,5	5,7	10,0	8,5	1,7	4,3
		min	21,5	35,5	9,0	30,0	0,0	0,0
		max	38,5	58,0	45,5	57,5	6,0	16,0
3	<i>A. arborescens</i> (26)	media	30,1	46,9	26,3	40,5	2,3	8,2
		dev.st	3,8	5,2	5,1	6,9	2,3	7,4
		min	18,5	31,5	15,0	26,0	0,0	0,0
		max	36,0	55,0	34,5	51,5	8,0	25,0
5	<i>A. tenuissima</i> (17)	media	31,1	45,1	26,6	39,7	1,1	2,8
		dev.st	4,8	5,4	7,5	12,1	2,7	7,5
		min	17,0	30,0	6,0	6,0	0,0	0,0
		max	40,0	58,0	37,5	54,5	13,0	34,0
1	<i>A. spp.</i> (1)	media	40,6	52,3	27,3	42,3	2,7	2,7
		dev.st	1,0	1,4	0,6	0,8	0,6	0,6
		min	39,0	50,0	27,0	41,5	2,0	2,0
		max	42,0	53,5	28,0	43,0	3,0	3,0
2	<i>A. gaisen</i> (2)	media	36,2	51,7	27,8	42,6	0,5	0,5
		dev.st	0,8	2,5	6,1	2,3	0,5	0,5
		min	35,0	47,5	21,0	40,0	0,0	0,0
		max	38,0	56,0	33,5	45,5	1,0	1,0
5	<i>A. mali</i> (1)	media	39,4	54,3	39,0	42,3	0,0	0,0
		dev.st	1,8	1,4	0,5	0,3	0,0	0,0

		min	37,0	52,5	38,5	42,0	0,0	0,0
		max	42,0	56,5	39,5	42,5	0,0	0,0
5	<i>A. spp. (1)</i>	media	35,4	54,8	21,0	34,2	0,0	0,0
		dev.st	1,9	1,2	1,0	0,6	0,0	0,0
		min	33,0	53,0	20,0	33,5	0,0	0,0
		max	37,0	56,5	22,0	34,5	0,0	0,0
6	<i>A. cerasidanica (1)</i>	media	26,5	31,6	7,5	12,7	0,0	0,0
		dev.st	2,5	3,9	0,0	1,4	0,0	0,0
		min	22,0	27,0	7,5	11,0	0,0	0,0
		max	29,0	37,5	7,5	13,5	0,0	0,0
6	<i>A. infectoria (1)</i>	media	36,8	51,3	2,0	5,0	0,0	0,0
		dev.st	0,7	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0
		min	36,0	48,5	2,0	5,0	0,0	0,0
		max	38,0	55,0	2,0	5,0	0,0	0,0
Totale		media	31,3	46,5	26,3	39,7	1,6	4,8
		dev.st	4,6	5,9	7,8	10,4	2,3	7,2
		min	17,0	27,0	2,0	5,0	0,0	0,0
		max	42,0	58,0	45,5	57,5	13,0	34,0

Tabella 36. Crescita alle temperature di 25, 35, 37°C; prospetto riepilogativo delle specie indagate con dato medio, di crescita alle tre temperature. Risultato dell'analisi della varianza e test SNK di confronto delle medie.

Gruppo	Specie	N° isolati	25°C		35°C		37°C	
			7 gg	14 gg	7 gg	14 gg	7 gg	14 gg
4	<i>A. alternata</i>	9	31,3 b	45,8 cd	28,4 ab	42,3 a	1,3 a	2,6 a
3	<i>A. arborescens</i>	26	30,1 b	46,9 bc	26,3 b	40,5 a	2,3 a	8,2 a
5	<i>A. tenuissima</i>	17	31,1 b	45,1 d	26,6 b	39,7 a	1,1 a	2,8 a
1	<i>A. sp.</i>	1	40,6 a	52,3 ab	27,3 ab	42,3 a	2,7 a	2,7 a
2	<i>A. gaisen</i>	2	36,2 a	51,7 ab	27,8 ab	42,6 a	0,5 a	0,5 a
5	<i>A. mali</i>	1	39,4 a	54,3 a	39,0 a	42,3 a	0,0 a	0,0 a
5	<i>A. sp.</i>	1	35,4 a	54,8 a	21,0 b	34,2 a	0,0 a	0,0 a
6	<i>A. cerasidanica</i>	1	26,5 c	31,6 e	7,5 c	12,7 b	0,0 a	0,0 a
6	<i>A. infectoria</i>	1	36,8 a	51,3 ab	2,0 c	5,0 b	0,0 a	0,0 a

Tutti gli isolati hanno mostrato di crescere sia a 25 che a 35°C, sebbene in maniera differente; la crescita a 25°C è stata significativamente maggiore rispetto a quella osservata a 35°C, mentre a crescita a 37°C è stata molto ridotta o assente in alcuni isolati.

Considerando complessivamente gli isolati, la crescita a 25°C è stata mediamente pari a 31 mm, compresa tra i 17 e i 42 mm, a 7 giorni, mentre a 14 giorni è stata in media pari a 46,5 mm e

compresa tra i 27 e i 58 mm; la crescita a 35°C, a 7 giorni è stata mediamente di 26,3 mm, compresa tra 2 e 45,5 mm, mentre a 14 giorni è stata mediamente di 39,7 mm, compresa tra 5 e 57,5 mm.

La crescita a 37°C è stata in media pari a 1,6 mm, dopo 7 giorni, con isolati che non sono cresciuti e altri che hanno raggiunto un diametro massimo di 13 mm; a 14 giorni la crescita ha raggiunto, in media, i 4,8 mm, con isolati che sono cresciuti al massimo fino a 34 mm.

L'analisi della varianza applicata alla crescita a 25°C dei 59 isolati, benché abbia rilevato differenze tra gli isolati, non ha permesso di distinguere nettamente gli isolati, ma piuttosto di definire una successione di valori di crescita dal diametro massimo osservato (40,6 mm, isolato 29E, *A. arborescens*) al diametro minimo (20,65, isolato 96, *A. gaisen*) (differenza minima significativa al 5% pari a 1,8 mm).

I 9 isolati di *A. alternata* sono cresciuti in media 31,3 mm (22,8-37,7 mm) a 7 giorni e 45,8 mm (38,6-48,8 mm) a 14 giorni; la crescita a 35°C è stata pari a 28,4 mm a 7 giorni (21,3-39,3 mm) e 42,3 mm (30,7-53,7 mm) a 14 giorni. A 37°C, dopo 7 giorni, le colonie hanno raggiunto in media i 2,7 mm e i 6,2 mm dopo 14 giorni.

I 26 isolati di *A. arborescens* hanno raggiunto in media 30,13 mm (20,8-40,6 mm) a 7 giorni e 46,8 mm (33,3-52,3) a 14 giorni; la crescita a 35°C è stata pari a 26,3 mm (9-44,3 mm) a 7 giorni e a 40,5 mm (25-54,8 mm) a 14 giorni. A 37°C, dopo 7 giorni, le colonie hanno raggiunto in media 1,3 mm e i 2,5 mm dopo 14 giorni.

I 17 isolati di *A. tenuissima* hanno raggiunto in media 31,15 mm (15,0-38,7 mm) a 7 giorni e 45,1 mm (21-56,8 mm) a 14 giorni; la crescita a 35°C è stata pari a 26,6 mm (13,3-33,8 mm) a 7 giorni e a 39,71 mm (19,3-53 mm) a 14 giorni. A 37°C, dopo 7 giorni, le colonie hanno raggiunto in media i 2,3 mm e gli 8,3 mm dopo 14 giorni.

I 2 isolati di *A. gaisen* hanno raggiunto in media 36,21 mm a 7 giorni e 51,7 a 14 giorni; la crescita a 35°C è stata pari a 27,8 mm a 7 giorni e di 42,58 a 14 giorni. A 37°C, dopo 7 giorni, le colonie hanno raggiunto in media gli 0,5 mm, e non hanno mostrato ulteriore crescita a 14 giorni.

I 2 isolati appartenenti al gruppo di *A. infectoria*, *A. cerasidanica* e *A. infectoria*, hanno raggiunto, dopo 7 giorni a 25°C il diametro rispettivamente di 26 e 25 mm, e di 48 mm dopo 14 giorni. A 37°C, entrambe le specie non hanno mostrato alcuna crescita.

La discriminazione sulla base della crescita a 25 e a 37°C per gli isolati appartenenti alle specie *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* non è stata possibile, in quanto le tre specie non hanno mostrato significative differenze di crescita a tali temperature; a 25°C le tre specie hanno raggiunto diametri di crescita significativamente inferiori alle specie *A. gaisen*, *A. mali* e *A. infectoria*, sebbene per tali specie siano disponibili solo due o un isolato di riferimento. La specie *A.*

cerasidanica, appartenente al gruppo di specie di *A. infectoria*, ha presentato la crescita ridotta, a 25°C, sia a 7 che a 14 giorni, che dopo 7 giorni di crescita a 35°C.

Come risulta evidente dalla Tabella, gli isolati di riferimento appartenenti al gruppo 5 (*A. mali* e *A. spp.*) hanno mostrato una crescita differente rispetto ai ceppi di *A. tenuissima* isolati da uva, sebbene il dato vada considerato con cautela, dato il numero limitato di isolati (un solo isolato per *A. mali* e per *A. spp.* appartenente al gruppo 5).

I due isolati appartenenti al gruppo di *A. infectoria*, hanno mostrato crescite diverse a 25°C, come già osservato, ma raggiunto diametri non statisticamente differenti a 35°C, dopo 7 giorni, con un accrescimento per entrambi inferiore a tutte le altre specie.

Alla temperatura di 37°C, sebbene alcuni specie non abbiano mostrato alcuna crescita visibile, le differenze tra le specie non sono state significative.

Gli accrescimenti di *A. alternaria* e *A. gaisen* sono stati differenti da quelli rilevati da altri autori, in particolare la crescita a 25°C dei tre ceppi di riferimento di *A. alternata*, riportati in letteratura, risulta maggiore rispetto a quanto osservato in questa indagine. Inoltre, in media, i 9 isolati di *A. alternata* considerati nella presente indagine, hanno mostrato di crescere a 37°C, seppure in maniera estremamente ridotta, contrariamente a quanto riportato in letteratura (Andersen et al, 2001; 2005); tali differenze sono probabilmente da imputare al numero di isolati considerati nelle due indagini, alla differente provenienza degli stessi e alla variabilità intrinseca delle specie.

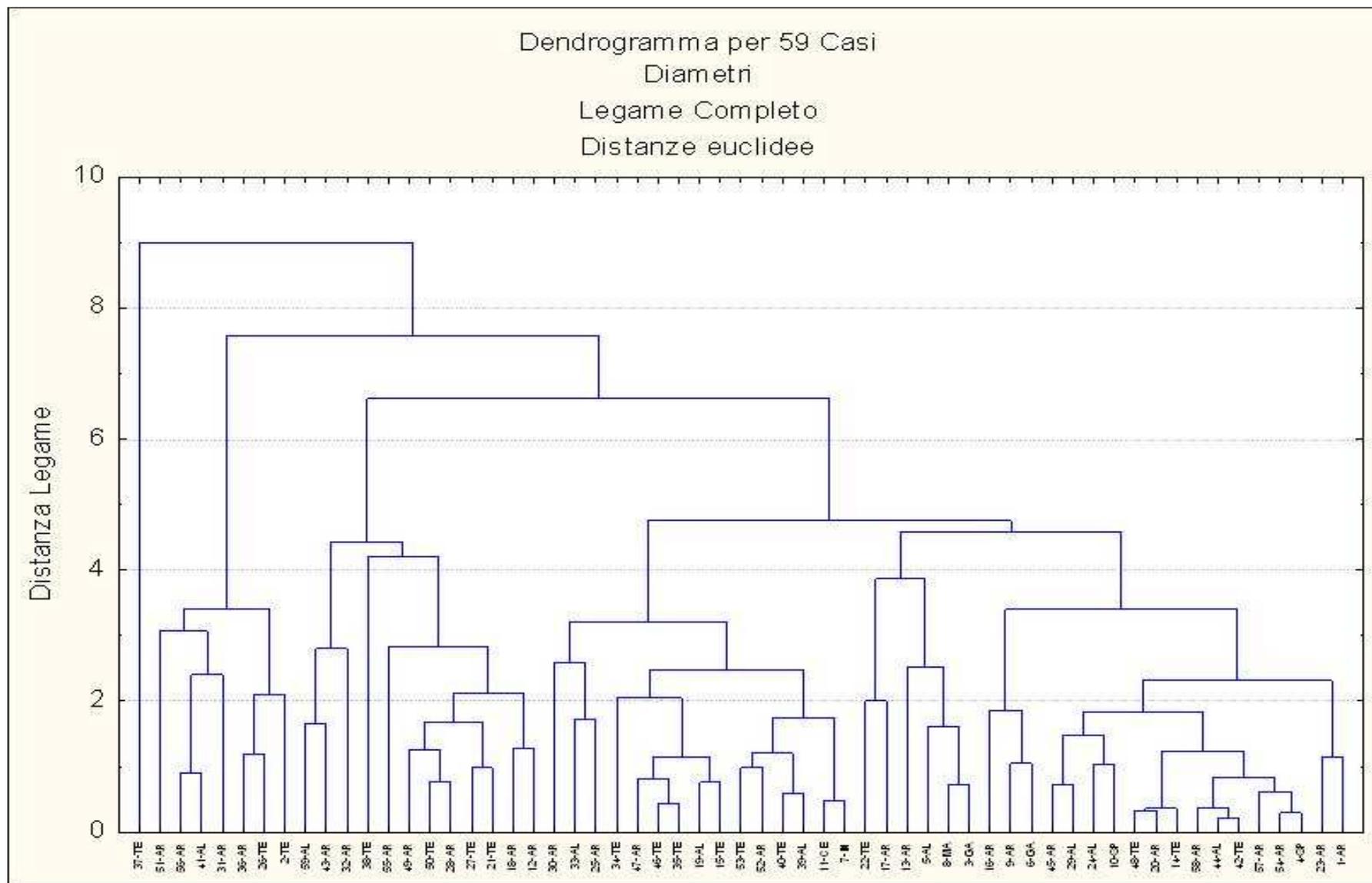


Figura 5. Dendrogramma dei diametri alle tre temperature per i 59 isolati di *Alternaria*.

Tabella 37. Prospetto riepilogativo dei gruppi evidenziati nel dendrogramma di figura 5, con l'indicazione dei diametri medi di crescita registrati per gli isolati di ciascun gruppo.

N° cluster	Num-Specie	Specie	Isolato	25°C 7 gg	25°C 14 gg	35°C 7 gg	35°C 14 gg	37°C 7 gg	37°C 14 gg
1	37-TE	TE	180G	15,0	21,0	26,0	53,0	0,0	0,0
2	51-AR	AR	32F	33,6	50,0	9,0	37,0	2,0	2,2
	56-AR	AR	52L	28,2	42,1	21,0	36,0	0,8	1,0
	41-AL	AL	191E	28,1	43,5	21,3	30,7	1,7	2,3
	31-AR	AR	163I	34,6	49,8	26,0	29,2	1,7	1,5
	36-AR	AR	177D	31,0	44,3	13,0	25,0	0,0	0,3
	26-TE	TE	156G	29,7	38,9	13,3	20,3	0,0	0,0
	2-TE	TE	92	37,6	44,7	15,2	19,3	0,0	0,0
	media			29,7	41,8	18,1	31,3	0,8	0,9
	min			15,0	21,0	9,0	19,3	0,0	0,0
max			37,6	50,0	26,0	53,0	2,0	2,3	
3	59-AL	AL	ISV6338	37,7	48,8	39,3	53,7	1,0	1,0
	43-AR	AR	210A	32,0	46,7	44,3	54,8	0,0	0,0
	32-AR	AR	170A	35,6	42,4	37,0	51,3	0,0	13,0
	38-TE	TE	182F	38,7	56,8	33,8	52,3	6,3	10,0
	55-AR	AR	42E	40,6	52,3	27,3	42,3	2,7	2,7
	49-AR	AR	29E	34,3	46,7	33,8	49,3	1,0	5,0
	50-TE	TE	31C	36,7	47,2	31,6	45,8	0,0	0,0
	28-AR	AR	158B	34,8	48,3	34,7	48,2	0,0	0,0
	27-TE	TE	157F	35,1	51,0	29,5	43,0	0,0	0,0
	21-TE	TE	139C	36,1	53,8	33,3	44,5	1,0	1,0
	18-AR	AR	125B	30,6	48,4	28,2	48,7	0,0	0,0
	12-AR	AR	100A	29,9	46,8	30,8	49,2	2,3	3,0
	media			34,8	49,3	31,1	46,4	0,9	1,5
	min			29,9	46,7	27,3	42,3	0,0	0,0
max			40,6	53,8	34,7	49,3	2,7	5,0	
4	30-AR	AR	162E	29,8	33,3	31,7	44,7	4,3	12,0
	33-AL	AL	173B	22,8	38,6	31,0	45,2	4,0	10,0
	25-AR	AR	156C	20,8	35,5	28,3	43,8	7,3	9,7
	34-TE	TE	174C	27,6	47,8	29,3	44,9	6,3	10,0
	47-AR	AR	233D	30,1	42,9	25,3	41,3	4,7	10,0
	46-TE	TE	233B	30,3	40,5	25,3	39,5	4,0	9,7
	35-TE	TE	174D	28,6	39,3	26,0	39,5	4,0	9,7
	19-AL	AL	132C	26,5	44,3	26,0	41,2	3,7	8,3
	15-TE	TE	122A	29,1	44,7	24,3	39,2	3,3	9,7
	53-TE	TE	35E	30,3	40,7	25,0	39,0	5,0	14,0
	52-AR	AR	34D	30,3	35,9	24,7	39,0	6,0	12,3
	11-CE	CE	102	26,0	42,8	23,0	40,5	6,7	12,0
	40-TE	TE	191B	27,3	37,4	23,7	38,7	5,3	13,7
	39-AL	AL	189C	26,4	39,3	22,0	37,2	6,0	13,7
	7-IN	IN	97	25,3	42,8	22,7	37,3	6,7	12,0
	media			27,6	41,0	23,9	39,0	5,3	12,0

	min			25,3	35,9	22,0	37,2	3,3	8,3
	max			30,3	44,7	26,0	41,2	6,7	14,0
5	22-TE	TE	141B	26,6	44,7	31,1	45,8	2,0	21,3
	17-AR	AR	123B	26,2	46,0	25,3	33,8	2,7	21,7
	13-AR	AR	121B	31,3	48,2	15,8	30,0	3,5	14,5
	5-AL	AL	95	30,8	43,8	25,5	34,3	2,0	8,3
	8-MA	MA	98	33,3	48,6	27,6	37,8	2,7	9,0
	3-GA	GA	93	33,5	48,7	27,3	38,5	3,7	12,3
	media			29,7	45,1	25,1	37,3	3,3	13,7
	min			25,3	35,9	15,8	30,0	2,0	8,3
max			33,5	48,7	31,1	45,8	6,7	21,7	
6	16-AR	AR	122B	34,8	40,3	28,3	42,5	0,7	0,7
	9-AR	AR	99	29,6	33,3	27,4	37,9	0,0	0,0
	6-GA	GA	96	29,2	35,0	27,1	38,4	1,3	4,7
	media			31,1	41,9	26,2	38,5	2,5	8,8
	min			25,3	33,3	15,8	30,0	0,0	0,0
max			34,8	48,7	31,1	45,8	6,7	21,7	
7	45-AR	AR	225C	28,5	44,0	27,7	42,2	2,7	3,2
	29-AL	AL	162B	26,8	42,7	29,0	43,0	1,7	2,0
	24-AL	AL	148A	27,3	39,8	24,8	39,7	1,7	4,0
	10-SP	SP	101	29,6	40,6	26,9	39,4	0,7	8,0
	media			29,1	40,7	26,1	39,6	2,2	6,5
	min			25,3	33,3	15,8	30,0	0,0	0,0
max			34,8	48,7	31,1	45,8	6,7	21,7	
8	48-TE	TE	26C	27,8	41,3	25,8	39,4	0,3	0,5
	20-AR	AR	136D	26,9	42,2	25,3	40,0	0,0	0,0
	14-TE	TE	121G	27,7	41,3	26,6	41,3	0,0	0,0
	58-AR	AR	70A	30,3	42,7	30,2	42,3	0,0	0,0
	44-AL	AL	21A	30,5	44,6	29,7	41,7	0,0	0,0
	42-TE	TE	20A	29,9	44,5	30,7	41,8	0,0	0,0
	57-AR	AR	5B	27,7	42,4	29,3	41,3	0,0	0,0
	54-AR	AR	36E	27,5	45,7	29,3	43,0	0,0	0,0
	4-SP	SP	94	28,4	45,3	30,5	42,7	0,0	0,0
	media			28,6	43,6	28,9	41,8	0,0	0,0
	min			26,9	41,3	25,3	40,0	0,0	0,0
max			30,5	45,7	30,7	43,0	0,0	0,0	
9	23-AR	AR	141G	26,8	49,3	28,8	44,8	1,0	5,0
	1-AR	AR	91	26,5	48,2	28,2	44,0	0,0	11,0
	media			27,9	45,2	28,9	42,6	0,1	2,0
	min			26,5	41,3	25,3	40,0	0,0	0,0
	max			30,5	49,3	30,7	44,8	1,0	11,0

Il risultato dell'analisi dei *cluster* condotta sui 59 casi rappresentati dagli isolati in oggetto è rappresentata graficamente dal dendrogramma di Figura 5, mentre la Tabella 37 riporta il prospetto riepilogativo dei gruppi evidenziati nel dendrogramma, con l'indicazione dei diametri medi di crescita registrati per gli isolati di ciascun gruppo; uno sguardo d'insieme del dendrogramma ha permesso di

rilevare che non vi sono dei gruppi specie-specifici, ma che gli isolati appartenenti ai 6 gruppi morfologici e alle 9 specie si distribuiscono apparentemente casualmente tra i diversi *cluster*, sebbene siano riconoscibili delle tendenze, in particolare associate alla differente crescita a 25°C, alla crescita o meno a 37°C e al rapporto tra l'accrescimento a 25 e quello a 35°C.

L'isolato 180G di *A. tenuissima* si colloca come *outgroup* (1) alla base del dendrogramma, in relazione alla mancata crescita a 37°C associata al rapporto in assoluto più basso tra la crescita a 25°C e la crescita a 35°C, tra tutti gli isolati considerati.

La sequenza di agglomerazione distingue, in successione un gruppo (2) di isolati caratterizzati dall'accrescimento complessivamente minore a 25 e a 35°C e che hanno mostrato solo la formazione di microcolonie a 37°C; successivamente possiamo distinguere 2 gruppi, il primo (3) che raggruppa i 12 isolati che hanno raggiunto i maggiori diametri di crescita a 25°C (in media pari a 35 mm a 7 giorni a 25°C) e a 35°C e che sono caratterizzati da crescite a 37°C in media attorno ai 3 mm, ed un gruppo principale (gruppi 4-8), che comprende 39 isolati, che rappresentano complessivamente circa due terzi degli isolati considerati.

Tale gruppo di 39 isolati al suo interno si presenta piuttosto eterogeneo, sia da un punto di vista degli accrescimenti, che da un punto di vista tassonomico, in quanto contiene, oltre agli isolati fungini appartenenti alle specie *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* ottenuti dalle analisi micologiche su uve anche tutti gli isolati rappresentativi delle specie considerate.

Il primo sottogruppo (4) definito dal processo di agglomerazione è formato da 15 isolati caratterizzati da crescite intermedie, in media pari a 27 mm a 7 giorni a 25°C e che hanno raggiunto i maggiori diametri di crescita a 37°C; al loro interno, tuttavia, troviamo i due isolati appartenenti al gruppo di specie di *A. infectoria* che sono cresciuti significativamente meno a 35°C e che non hanno prodotto colonie a 37°C.

Il secondo sottogruppo (5-8), formato da 24 isolati tra i quali troviamo anche i due isolati di *A. gaisen*, presenta al suo interno un raggruppamento (5) di 6 isolati che presentano notevoli similitudini con quelli presenti nel precedente gruppo, contraddistinti da diametri medi a 25°C pari a 30 mm, a 7 giorni e crescite a 37°C in media attorno ai 3 mm.

Il rimanente gruppo di 18 isolati (6-8) presenta complessivamente una maggiore omogeneità al suo interno e contiene il gruppo dei 9 isolati (sottogruppo del gruppo 7) che non hanno prodotto alcuna crescita a 37°C e che complessivamente sembra essere il gruppo più omogeneo, con una crescita media a 25°C, a 7 giorni, pari 28 mm.

Il gruppo 6 presenta solo 3 isolati con crescite medie a 25°C a 7 giorni attorno ai 31 mm, mentre il gruppo che chiude la sequenza di agglomerazione, a fianco del gruppo 7 (8) è formato da due isolati

di *A. arborescens* con la crescita a 25°C pari a circa 27 mm, mediamente tra le più basse, e la formazione di microcolonie a 37°C.

Produzione di micotossine

La tabella 38 riporta i dati relativi alla produzione di ALT, AOH e AME da parte degli isolati delle diverse specie espressi come quantità di tossina prodotta per unità di peso secco di micelio ($\mu\text{g/g}$), rappresentati dal dato medio di 4 ripetizioni con relativa deviazione standard, mentre la Tabella 39 riporta il prospetto riepilogativo della produzione di micotossine a livello di specie.

Per ciascun isolato è indicato l'anno d'isolamento, la specie e il gruppo morfologico di appartenenza e il dato di produzione. L'indicazione "Rif." contraddistingue gli isolati di riferimento per la specie, indicati con le prime due lettere dell'epiteto specifico (AL: ALternata; AR: ARborescens; CE: CERasidanica; GA: GAisen; IN: INFectoria; MA: Mali; TE: Tenuissima).

Tabella 38. Produzione di ALT, AOH e AME espressa in μg di tossina prodotti da un grammo micelio (peso secco). Dato medio di 4 ripetizioni con deviazione standard.

isolato	Anno isolamento	Specie	Rif.	GR.	ALT		AOH		AME	
					media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
21A	2006	<i>A. alternata</i>	-	4	-	-	12,40	8,15	14,25	10,93
132C	2006	<i>A. alternata</i>	-	4	8,54	4,08	184,83	52,33	73,41	26,63
148A	2006	<i>A. alternata</i>	-	4	1,00	0,42	28,59	17,76	56,68	29,28
162B	2007	<i>A. alternata</i>	-	4	-	-	1,33	0,87	1,52	0,76
173B	2007	<i>A. alternata</i>	-	4	-	-	1,77	1,18	1,25	0,59
189C	2007	<i>A. alternata</i>	-	4	-	-	1,82	1,37	0,51	0,41
191E	2007	<i>A. alternata</i>	-	4	-	-	3,19	3,73	2,11	1,47
95	-	<i>A. alternata</i>	AL	4	18,15	7,24	43,43	11,65	63,48	36,69
ISV6338	-	<i>A. alternata</i>	AL	4	-	-	2,05	1,67	1,99	2,27
5B	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	6,48	1,74	171,16	12,74	70,14	16,07
29E	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	0,60	1,21	72,55	21,34	30,94	8,72
32F	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	25,60	6,00	48,39	15,20
34D	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	29,42	14,32	59,58	22,01
36E	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	2,82	2,13	177,38	58,38	88,32	17,59
42E	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	6,06	1,60	2,18	0,40
52L	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	3,55	3,46	275,21	44,87	60,70	27,27
70A	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	1,43	1,22	35,83	13,41	37,93	24,80
100A	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	3,70	2,21	58,65	24,01	52,18	24,40
121B	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	90,52	12,15	19,28	9,96
122B	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	64,30	22,71	39,07	8,40
123B	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	30,87	6,75	2,07	2,64
125B	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	12,02	13,29	12,92	17,90	31,42	30,81

136D	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	0,48	0,96	115,43	76,64	64,24	60,31
141G	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	16,56	1,73	357,01	14,50	388,50	15,30
156C	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	18,01	9,25	14,19	4,55
158B	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	7,87	4,20	292,32	83,00	246,71	20,78
162E	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	1,47	2,80	20,33	17,67	8,87	3,76
163I	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	28,94	8,61	27,18	10,86
170A	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	4,30	2,54	257,19	38,54	50,11	13,94
177D	2007	<i>A. arborescens</i>	-	3	8,97	5,11	110,88	24,56	52,41	27,87
210A	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	9,90	1,55	0,81	1,62
225C	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	-	-	7,74	2,33	-	-
233D	2006	<i>A. arborescens</i>	-	3	14,04	4,97	211,77	51,72	186,81	41,24
91	-	<i>A. arborescens</i>	AR	3	2,07	1,52	25,95	10,64	18,42	9,41
99	-	<i>A. arborescens</i>	AR	3	1,34	1,39	50,65	37,13	29,00	11,76
102	-	<i>A. cerasidanica</i>	CE	6	-	-	-	-	-	-
93	-	<i>A. gaisen</i>	GA	2	-	-	8,86	6,48	28,65	11,89
96	-	<i>A. gaisen</i>	GA	2	-	-	7,05	5,32	20,54	11,21
97	-	<i>A. infectoria</i>	IN	6	-	-	-	-	-	-
98	-	<i>A. mali</i>	MA	5	-	-	2,44	1,40	1,15	0,32
94	-	<i>A. sp. gr.1</i>	gr1	1	15,20	12,72	116,58	83,87	108,19	79,44
101	-	<i>A. sp. gr.5</i>	gr5	5	-	-	20,92	3,94	11,13	1,34
20A	2006	<i>A. tenuissima</i>	-	5	1,30	1,10	140,63	68,91	113,46	55,38
26C	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	115,68	44,85	148,57	52,67
31C	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	4,18	5,73	107,44	41,44	100,05	20,71
35E	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	37,38	21,26	23,73	8,73
121G	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	5,77	1,44	3,47	1,12
122A	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	16,93	19,79	32,83	6,82
139C	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	26,86	17,27	4,36	5,10
141B	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	0,51	0,69	21,42	11,00	31,54	22,05
156G	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	11,58	1,70	6,83	3,38
157F	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	0,89	0,41	0,26	0,17
174D	2006	<i>A. tenuissima</i>	-	5	2,57	1,57	42,02	12,89	29,49	9,13
174C	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	41,74	6,19	20,19	5,75
180G	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	200,22	73,01	208,70	85,47
182F	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	25,37	9,36	3,65	5,01
191B	2007	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	4,82	5,59	5,17	1,24
233B	2006	<i>A. tenuissima</i>	-	5	-	-	151,49	56,74	144,32	33,16
92	-	<i>A. tenuissima</i>	TE	5	-	-	1,02	0,22	0,31	0,22

Tabella 39. Produzione di ALT, AOH e AME; dato medio, minimo, massimo e deviazione standard espressi in μg di tossina prodotti da un grammo micelio (peso secco). Dato relativo a ciascuna specie e dato complessivo.

Specie	GR.	Parametro	ALT		AOH		AME	
			$\mu\text{g/g}$	SNK	$\mu\text{g/g}$	SNK	$\mu\text{g/g}$	SNK
<i>A. alternata</i>	4	media	3,87	b	31,70	a	25,99	B
		dev.st	7,38		57,86		35,10	
		min	-		-		-	
		max	27,83		241,21		116,89	
<i>A. arborescens</i>	3	media	3,21	b	100,84	a	66,68	B
		dev.st	5,01		104,19		88,38	
		min	-		-		-	
		max	21,42		403,31		403,83	
<i>A. tenuissima</i>	5	media	0,50	b	53,99	a	49,05	B
		dev.st	1,72		64,23		65,42	
		min	-		-		-	
		max	12,13		283,34		294,11	
<i>A. cerasidanica</i>	6	media	-	-	-	-	-	-
		dev.st	-		-		-	
<i>A. gaisen</i>	2	media	-	b	7,96	a	24,60	B
		dev.st	-		5,73		11,80	
<i>A. infectoria</i>	6	media	-	-	-	-	-	-
		dev.st	-		-		-	
<i>A. mali</i>	5	media	-	b	2,44	a	1,15	B
		dev.st	-		1,40		0,32	
<i>A. sp. gr.1</i>	1	media	22,81	a	170,08	a	159,10	A
		dev.st	6,20		16,64		12,35	
<i>A. sp. gr.5</i>	5	media	-	b	20,92	a	11,13	B
		dev.st	-		3,94		1,34	
Totale		media	2,52		67,90		50,96	
		dev.st	5,43		88,05		73,35	
		min	-		-		-	
		max	30,12		403,31		403,83	

La produzione delle tre micotossine considerate è stata quantitativamente variabile sia a livello interspecifico che a livello intraspecifico, con quantità variabili anche tra le diverse colonie dello stesso isolato.

La produzione media degli isolati è stata rispettivamente pari a 2,52 µg/g di ALT, 67,90 µg/g di AOH e 50,96 µg/g di AME, con una dato variabile dalla non produzione alla produzione massima di 30,12 µg/g di ALT, 403,31 µg/g di AOH e 403,83 µg/g di AME.

Gli isolati delle tre specie *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* hanno presentato una frequenza differente di isolati ipoproduttori di ALT (produzione inferiore ad 1µg/g): gli isolati ipoproduttori della prima specie sono stati il 77% (7/9), della seconda il 46% (12/26) e della terza l'82% (14/17), suggerendo quindi che *A. arborescens* presenti una maggior frequenza di ceppi produttori di ALT rispetto alle altre due specie.

Il valore più elevato di produzione è stato riscontrato per le prime due specie, rispettivamente pari a 27,8 e 21,4 µg/g, mentre *A. tenuissima* ha prodotto al massimo circa metà di quanto prodotto dalle precedenti (12,1 µg/g).

L'analisi della varianza effettuata sui dati di produzione dei 59 isolati considerati, ripartiti nelle 9 specie (compresi i due isolati indicati come *Alternaria* sp., appartenenti ai gruppi 1 e 5) ha evidenziato l'effetto significativo esercitato sia dal fattore "isolato" che dal fattore "specie".

Considerando i diversi isolati sono distinguibili livelli di produzione variabili, senza tuttavia la definizione di gruppi nettamente distinti, in quanto il valore della differenza minima significativa (LSD) in virtù della variabilità osservata, ha circoscritto gruppi di isolati con ampi margini di sovrapposizione.

Il dato relativo alla produzione di micotossine in relazione alle diverse specie ha nettamente differenziato, sulla base della produzione di ALT, l'isolato rappresentativo del gruppo 1 (isolato 94), che ha prodotto in media 22,8 µg della micotossina per g di micelio; complessivamente le altre specie non hanno mostrato differenze significative, con valori in media che variano dai 3,8 di *A. alternata* ai 3,2 di *A. arborescens*, fino alla produzione media inferiore ad 1µg/g per *A. tenuissima*; per *A. infectoria*, *A. mali*, *A. cerasidanica* e *A. gaisen* non è stata rilevata alcuna produzione.

La produzione di AOH non ha mostrato significative differenze tra le specie, sebbene sia nuovamente l'isolato rappresentativo del gruppo 1 quello maggiormente produttore (170,1 µg/g), seguito dagli isolati di *A. arborescens* (100,8 µg/g), *A. tenuissima* (52,6 µg/g) e *A. alternata* (31,7 µg/g); gli isolati di *A. mali* e *A. gaisen* hanno prodotto meno di 10 µg/g, mentre *A. infectoria* e *A. cerasidanica* non hanno fatto registrare nessuna produzione rilevabile di micotossina (dato indicato con un asterisco, "*").

Studi chemotassonomici condotti su diversi isolati appartenenti al gruppo morfologico di *A. infectoria*, al quale appartengono *A. infectoria* e *A. cerasidanica*, non hanno mai evidenziato la produzione di ALT, AOH, AME, ma di metaboliti caratteristici di indubbia importanza come marcatori chemotassonomici, quali α-pirone, 4Z-infetopirone, infetopirone, novae-zelandina A e B che

presentano strutture simili a note fitotossine e potrebbero essere a loro volta delle fitotossine, ai quali si affiancano altri metaboliti dei quali non è ancora stata chiarita la struttura chimica e le caratteristiche tossicologiche (Andersen et al., 2001; Andersen et al. 2002; Andersen et al., 2005; Andersen, Thrane, 1996; Christensen et al., 2005; Ostefeld Larsen et al., 2003; Serdani et al., 2002).

Il dato relativo alla produzione di AME segue il medesimo andamento osservato per AOH, sebbene in questo caso la differenza tra l'isolato maggiormente produttore (94, ceppo di riferimento per il gruppo 1, con una produzione di 159,1 µg/g) e gli altri sia statisticamente significativa; come per AOH, le tre specie maggiormente produttrici, che seguono l'isolato 94 sono *A. arborescens* (66,67 µg/g), *A. tenuissima* (50,1 µg/g) e *A. alternata* (26,0 µg/g).

In accordo con la letteratura più recente, è stata confermata la produzione di ALT, AOH e AME da parte di *A. arborescens*, in particolare la produzione da parte di quasi tutti gli isolati di AOH e AME, e di un piccolo gruppo di isolati che produce anche ALT (Andersen et al., 2002).

L'analisi la produzione di AOH e AME ha mostrato un andamento parallelo, con un dato che si accorda con quanto riportato in letteratura: l'analisi di regressione effettuata secondo il modello lineare, ottenuta considerando come variabile indipendente la concentrazione di AOH e come variabile dipendente la concentrazione di AME, è risultata molto significativa ($R^2=0,712$; $P=0,005$); l'equazione relativa interpolante i dati è stata $y=3,22+0,70x$.

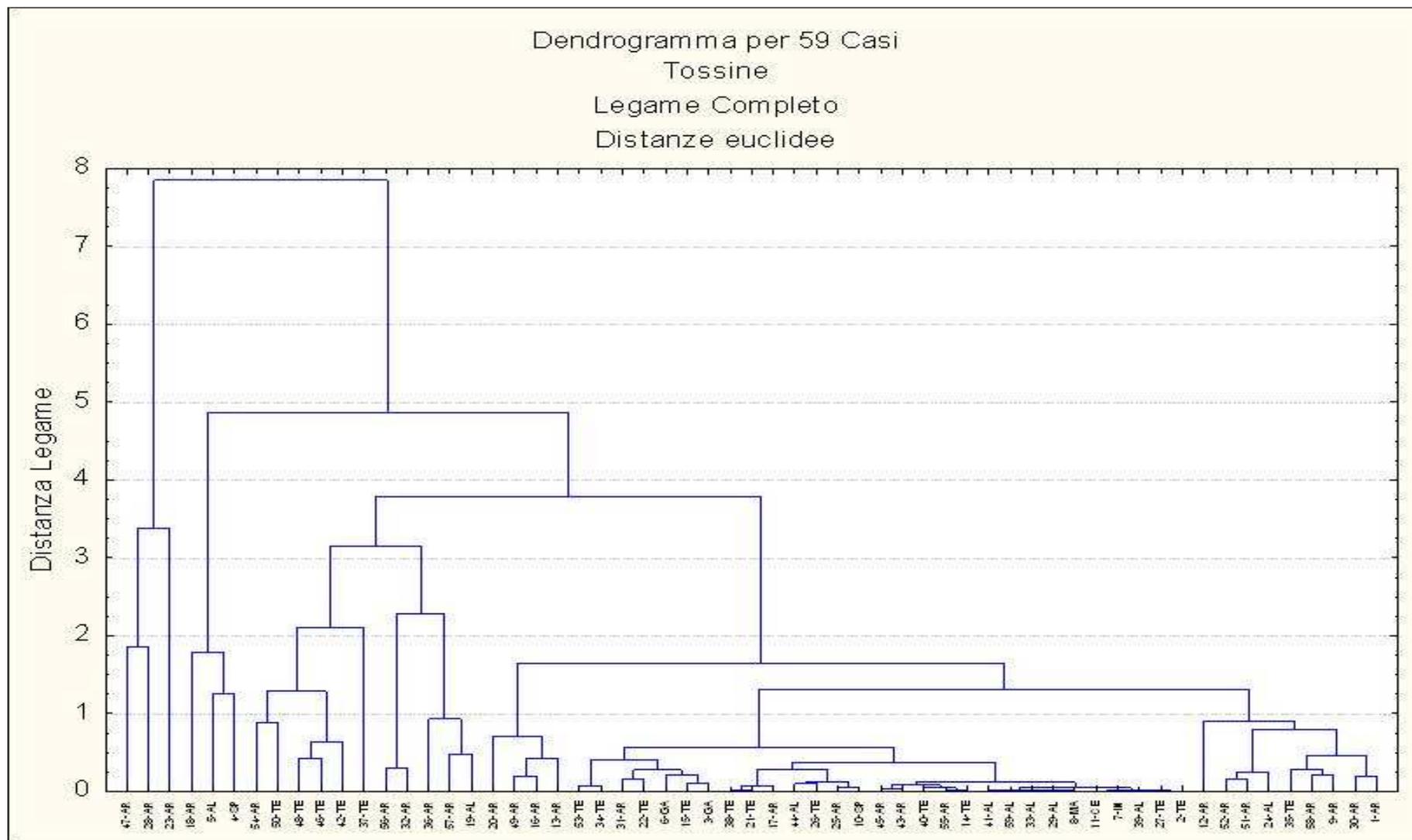


Figura 6. Dendrogramma relativo alla produzione di micotossine ALT, AOH, AME per i 59 isolati di *Alternaria*.

Tabella 40. Prospetto riepilogativo dei gruppi evidenziati nel dendrograma di figura 6, con l'indicazione delle produzioni medie, minime e massime delle tra micotossine.

N° cluster	Num-Specie	Specie	Isolato	ALT	AOH	AME
1	47-AR	AR	233D	14,04	211,77	186,81
	28-AR	AR	158B	7,87	292,32	246,71
	23-AR	AR	141G	16,56	357,01	388,50
	media			12,82	287,03	274,01
	min			7,87	211,77	186,81
	max			16,56	357,01	388,50
2	18-AR	AR	125B	12,02	12,92	31,42
	5-AL	AL	95	18,15	43,43	63,48
	4-SP	SP	94	15,20	116,58	108,19
	media			15,13	57,65	67,70
	min			12,02	12,92	31,42
	max			18,15	116,58	108,19
3	54-AR	AR	36E	2,82	177,38	88,32
	50-TE	TE	31C	4,18	107,44	100,05
	48-TE	TE	26C	-	115,68	148,57
	46-TE	TE	233B	-	151,49	144,32
	42-TE	TE	20A	1,30	140,63	113,46
	37-TE	TE	180G	-	200,22	208,70
	56-AR	AR	52L	3,55	275,21	60,70
	32-AR	AR	170A	4,30	257,19	50,11
	36-AR	AR	177D	8,97	110,88	52,41
	57-AR	AR	5B	6,48	171,16	70,14
	19-AL	AL	132C	8,54	184,83	73,41
	media			9,34	132,48	89,45
	min			-	12,92	31,42
	max			18,15	275,21	208,70
4	20-AR	AR	136D	0,48	115,43	64,24
	49-AR	AR	29E	0,60	72,55	30,94
	16-AR	AR	122B	-	64,30	39,07
	13-AR	AR	121B	-	90,52	19,28
	media			0,54	85,70	38,38
	min			-	64,30	19,28
	max			0,60	115,43	64,24
5	53-TE	TE	35E	-	37,38	23,73
	34-TE	TE	174C	-	41,74	20,19
	31-AR	AR	163I	-	28,94	27,18
	22-TE	TE	141B	0,51	21,42	31,54

	6-GA	GA	96	-	7,05	20,54
	15-TE	TE	122A	-	16,93	32,83
	3-GA	GA	93	-	8,86	28,65
	media			0,51	23,19	26,38
	min			-	7,05	20,19
	max			0,51	41,74	32,83
6	38-TE	TE	182F	-	25,37	3,65
	21-TE	TE	139C	-	26,86	4,36
	17-AR	AR	123B	-	30,87	2,07
	44-AL	AL	21A	-	12,40	14,25
	26-TE	TE	156G	-	11,58	6,83
	25-AR	AR	156C	-	18,01	14,19
	10-SP	SP	101	-	20,92	11,13
	media			-	20,86	8,07
	min			-	11,58	2,07
max			-	30,87	14,25	
7	45-AR	AR	225C	-	7,74	-
	43-AR	AR	210A	-	9,90	0,81
	40-TE	TE	191B	-	4,82	5,17
	55-AR	AR	42E	-	6,06	2,18
	14-TE	TE	121G	-	5,77	3,47
	41-AL	AL	191E	-	3,19	2,11
	59-AL	AL	ISV6338	-	2,05	1,99
	33-AL	AL	173B	-	1,77	1,25
	29-AL	AL	162B	-	1,33	1,52
	8-MA	MA	98	-	2,44	1,15
	11-CE	CE	102	-	-	-
	7-IN	IN	97	-	-	-
	39-AL	AL	189C	-	1,82	0,51
	27-TE	TE	157F	-	0,89	0,26
	2-TE	TE	92	-	1,02	0,31
	media			-	3,75	1,73
min			-	-	-	
max			-	9,90	5,17	
8	12-AR	AR	100A	3,70	58,65	52,18
	52-AR	AR	34D	-	29,42	59,58
	51-AR	AR	32F	-	25,60	48,39
	24-AL	AL	148A	1,00	28,59	56,68
	35-TE	TE	174D	2,57	42,02	29,49
	58-AR	AR	70A	1,43	35,83	37,93
	9-AR	AR	99	1,34	50,65	29,00
	30-AR	AR	162E	1,47	20,33	8,87
	1-AR	AR	91	2,07	25,95	18,42

media	1,94	35,23	37,84
min	-	20,33	8,87
max	3,70	58,65	59,58

Il risultato ottenuto sulla base dell'analisi della varianza è stato ulteriormente supportato ed indagato alla luce dell'analisi dei *cluster*, condotta sui 59 casi rappresentati dagli isolati in oggetto è rappresentata graficamente dal dendrogramma di Figura 6, mentre la Tabella 40 riporta il prospetto riepilogativo dei gruppi evidenziati; uno sguardo d'insieme del dendrogramma ha permesso di rilevare esistono dei gruppi specie-specifici, ai quali se ne affiancano altri nei quali gli isolati delle diverse specie sono mescolati.

Sono individuabili 8 gruppi, composti da un numero differente di isolati; il gruppo 1 si distacca nettamente da tutti in quanto è formato dai 3 isolati di *A. arborescens* in assoluto maggiormente produttori di AOH e AME (mediamente prodotti in egual misura) e, assieme al gruppo 2, il maggiore produttore di ALT; tale dato è indicato chiaramente anche dall'analisi della varianza.

Il gruppo 2, come indicato, è il maggiore produttore di ALT e contiene l'isolato 94, rappresentativo del gruppo di sporulazione 1, che dall'analisi della varianza è risultato il maggiore produttore di ALT; la produzione delle altre micotossine è in media pari ad un quinto rispetto a quella del gruppo 1.

Il gruppo 3 presenta al suo interno due gruppi quasi monospecifici, uno di *A. tenuissima* e uno di *A. arborescens*; tale gruppo, complessivamente, produce circa metà della produzione di ALT del gruppo 1 e 2 e rispetto al gruppo 1 circa metà della produzione di AOH ed un terzo di AME. Il sottogruppo di *A. tenuissima* raccoglie gli isolati maggiormente produttori di AOH e AME di questa specie, mentre il sottogruppo di *A. arborescens* ha prodotto circa metà dell'AME prodotto dal precedente sottogruppo e una quantità lievemente superiore di AOH.

L'insieme dei gruppi 4-8 rappresenta un gruppo fortemente omogeneo al suo interno, ben distanziato dai gruppi precedenti, che contiene i 42 isolati che complessivamente hanno mostrato la minor produzione delle tre micotossine, in particolare di ALT. Come già osservato, la produzione di micotossine nei principali gruppi tassonomici di *Alternaria* identificati su uva presenta una certa variabilità, in particolare la presenza di ceppi poco produttori di ALT, AOH e AME risulta distribuita casualmente tra le tre specie identificate (*A. arborescens*, *A. tenuissima* e *A. alternata*).

In questo vasto raggruppamento, comunque, sono evidenziabili dei gruppi con caratteristiche ben definibili.

Il gruppo 4 è monospecifico, formato solo da isolati di *A. arborescens*, presenta quantità ridotte di ALT e moderate delle altre micotossine, in particolare la produzione di AOH e AME sono rispettivamente circa un terzo ed un decimo di quelle osservate per il gruppo 1.

- Il gruppo 5, formato da 7 isolati, è composto quasi totalmente da *A. tenuissima* e contiene i due riferimenti per *A. gaisen*; la produzione di ALT è al limite della rilevabilità e la produzione di AOH e AME si aggirano attorno ai 25µg/g.
- Il gruppo 6 produce in media, rispettivamente 20 e 8 µg/g di AOH e AME; non è stata rilevabile la produzione di ALT.
- Il gruppo 7 è, tra tutti i gruppi dell'insieme 4-8, nell'ambito della produzione di micotossine è in assoluto il più omogeneo, e contiene gli isolati con la minor produzione dei tre metaboliti: ALT non è stato rilevato, mentre AOH e AME sono in media pari a 3,2 e 1,4 µg/g.
- Tale omogeneità di produzione, non è associata ad una omogeneità tassonomica dei 15 isolati che compongono il cluster, infatti un terzo di essi appartengono ad *A. alternata* e ad *A. tenuissima*, ma troviamo anche 3 isolati di *A. arborescens* e gli isolati di riferimento per *A. mali*, *A. cerasidanica* e *A. infectoria*. Tale dato trova riscontro con quanto riportato in letteratura, è nota infatti per gli isolati patogeni per il melo la presenza di isolati produttori e non produttori delle tre micotossine in oggetto, mentre per gli isolati appartenenti al gruppo morfologico di *A. infectoria*, al quale appartengono le altre due specie non è mai stata rilevata la produzione di ALT, AOH, AME, ma di una serie di metaboliti caratteristici di rilevante significato come marcatori chemotassonomici (Andersen et al., 1996; Andersen, Thrane, 1996, Andersen et al., 2002).
- Il gruppo 8, infine, è fortemente rappresentato da isolati di *A. arborescens* (66%, 6 isolati su 9) e presenta modeste produzioni di AOH e AME, di poco inferiori ai 40 µg/g, e una produzione di ALT attorno ad 1 µg/g.

Capitolo III

Effetto di fattori ambientali sulla crescita e sulla produzione di micotossine da parte *Alternaria* spp.

Introduzione

Numerosi fattori ambientali influenzano la crescita e il metabolismo fungino, in particolare la produzione di metaboliti secondari; tra questi T, pH, a_w , composizione del substrato, presenza di inibitori.

Studi condotti hanno evidenziato che fattori quali temperatura, pH e il contenuto di zuccheri semplici nei substrati di crescita influenzano la crescita e la produzione di metaboliti tossici, in particolare la massima produzione di biomassa in tre specie di *Alternaria*, tra le quali anche *A. alternata*, è stata osservata alla temperatura di 25°C e a pH 8, mentre la produzione di metaboliti tossici nei confronti di *Bacillus megaterium* è incrementata a 15°C. Il contenuto di zuccheri semplici, quali glucosio, saccarosio e fruttosio, a contenuti superiori rispettivamente a 9% (glucosio e saccarosio) e 6% (fruttosio), stimola la produzione di biomassa ma sembra ridurre la produzione di metaboliti tossici (Özcelik e Özcelik, 1990).

Vi sono indicazioni che la produzione di tossine in *Alternaria* è incrementata a temperature prossime a 25°C (King e Shade, 1984), sebbene sia noto che la produzione di AOH e AME avviene già a partire da 5°C (Magan et al., 1984).

Il pH riveste una certa importanza nel determinare la crescita fungina: studi effettuati su substrati contenenti gradienti di pH ottenuti con tampone citrato-fosfato hanno indicato che *Alternaria alternata* presenta una velocità di crescita costante nell'intervallo di pH 7,1-3,3, mostrando un lieve incremento a pH 4,3 e una lieve riduzione a pH 3,3 (quest'ultimo dato associato alla ridotta quota di conidi germinati) (Sacks et al., 1986); altre specie fungine hanno mostrato velocità di crescita relativamente indipendenti dal gradiente di pH o, al contrario, maggiori o minori a diversi valori di pH.

Studi relativi alla crescita miceliare effettuati sulla specie *A. citri* su substrati a base di succhi di agrume, a vari livelli di pH, hanno evidenziato un incremento della crescita in piastra all'aumentare del pH nell'intervallo tra 2 e 6. Il risultato sembra avere ripercussioni sulla diversa incidenza del marciume nero degli agrumi in post-raccolta, in relazione al diverso pH della frutta al momento della raccolta (Farooqi et al., 1985).

I parametri morfologici e di crescita di *A. alternata* sono influenzati dalla composizione del substrato e da fattori ambientali, quali umidità relativa e pressione osmotica; in particolare tali fattori sono in grado di modificare la morfologia e le dimensioni dei conidi e le condizioni di crescita della specie, mentre fattori come la tensione di ossigeno e di anidride carbonica e il pH, nell'intervallo tra 4 e 8 non hanno mostrato di produrre effetti sulla dimensione e sulla morfologia conidica. Tali risultati

sono a sostegno della necessità di condizioni di crescita *in vitro* standardizzate per una corretta identificazione della specie (Misaghi et al., 1978).

Generi differenti presentano diverse risposte ai fattori ambientali; dal confronto tra 10 specie di *Alternaria* e 18 specie di *Penicillium* è emerso infatti che *Alternaria* cresce meglio a valori di temperatura e pH più elevati di *Penicillium*. Per entrambi i generi fungini è evidenziata la forte interazione tra attività dell'acqua, temperatura e pH nei confronti del tasso di crescita (Andersen, Frisvad, 2002).

Studi effettuati sulla specie *A. helianthi* (Hansf.) Tubaki hanno appurato che la specie presenta un optimum di crescita compreso tra i 25 e i 30°C e un optimum di reazione del substrato (pH) compreso tra 6,5 e 7 (incremento da pH 3,5 fino all'optimum di 6,5-7). I dati sono espressi come peso secco di micelio su PDB (Prathibha et al., 2008).

La specie *A. tenuissima* è in grado di crescere su cereali, e le condizioni ottimali di degradazione, rappresentate dalla maggiore produzione di proteasi extracellulari su diversi cereali (miglio, pennisetum vulgare, mais di Giunea, sorghum vulgare e riso, oryza sativa) vengono raggiunte a pH 6,8 ed alla temperatura di 30-35°C (Fopohunda e Olajuyigbe, 2006).

La produzione di micotossine da parte di *Alternaria* è fortemente influenzata dalle caratteristiche del substrato di crescita, in particolare la maggiore produzione di micotossine su substrati a base di cereali e in particolare di riso, da parte di *Alternaria*, è stata riportata (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986).

L'utilizzo di differenti substrati permette una più completa valutazione del profilo di metaboliti secondari fungini che una specie può potenzialmente produrre e tale approccio è fondamentale nell'ambito di indagini tassonomiche tra differenti gruppi di specie, per i quali la produzione di metaboliti secondari rappresenta una preziosa fonte di marcatori discriminanti.

Nel caso delle specie di *Alternaria*, studi condotti impiegando diversi substrati, quali DRYES, AKL (alkaloid formation agar), MEA (Malt Extract Agar), NS (Nitrite Sucrose agar), OA (Oat meal Agar), PCA (Potato Carrot Agar), PSA (Potato Sucrose Agar), SYES (Sigma Yeast Extract Sucrose agar) e V8-juice, permettono una più completa valutazione della produzione di metaboliti secondari (Andersen, Thrane, 1996; Andersen et al., 2001; 2002; 2005), tuttavia, il ricorso a numerosi substrati nelle analisi di *screening* o di *routine*, in particolare se condotto su numerosi isolati, è lungo e laborioso. Per tale motivo, in genere, il substrato maggiormente usato per la caratterizzazione del profilo dei metaboliti secondari è DRYES.

Studi su differenti substrati sono importanti per comprendere quali siano le condizioni di produzione di metaboliti tossici, al fine di prevederne e quindi limitarne la formazione in matrici alimentari. La

presenza di specie fungine su differenti derrate e prodotti alimentari considerata per il suo potenziale rischio per la salute umana.

In ambito viticolo, in particolare, diversi studi hanno permesso di appurare che *Alternaria* è presente su uva e che le sue tossine sono rilevabili sia su uva che su mosti e vino: la presenza di AOH e AME è stata ripetutamente rilevata su vino e su uve in vari paesi tra i quali il Canada (Abramson et al., 2007). Da uno studio effettuato su 66 campioni di vini rossi e bianchi provenienti da varie regioni del Canada, dall'Italia, dall'America Meridionale e dagli USA, da uve canadesi e statunitensi e da succo di mirtillo è emerso che la contaminazione da AOH e AME è limitata; per quanto riguarda i derivati dell'uva, indipendentemente dalla loro provenienza, succhi e vini e vini prodotti da uve rosse sono maggiormente contaminati da AOH e AME, rispetto a succhi e vino prodotti da uve bianche. Vini bianchi, succhi d'uva bianca e succhi di mirtillo sono stati solo scarsamente contaminati (concentrazioni $\leq 1,5$ ng/ml) (Scott et al., 2006).

Tali studi, tuttavia, in area mediterranea sono piuttosto scarsi; è nota la presenza di *A. alternata* come componente della micoflora del grappolo ma relativamente poche indagini sono state condotte per valutare quali siano ad essa le altre specie presenti, mentre su numerosi fruttiferi e su cereali è stato appurato che ad *A. alternata* si affiancano altre specie quali *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*. La valutazione, inoltre, della produzione delle tossine di *Alternaria* su uva e su vino, è poco documentata, in particolare nei paesi mediterranei, dove in ambito viticolo ed enologico le maggior preoccupazioni derivano dalla potenziale presenza di isolati fungini appartenenti alla Sezione *Nigri* del genere *Aspergillus* e, in particolare alla presenza di *A. carbonarius*, il principale responsabile della produzione di OTA su uva e del suo trasferimento al vino.

Mentre è nota la produzione di micotossine di *Alternaria* quali TeA, AOH, AME, ALT e ATX su substrati quali DRYES, la produzione su substrati a base di uva non è nota, pur rappresentando un aspetto importante per la valutazione dell'effettivo rischio associato alla presenza delle specie di *Alternaria* su uva, in quanto non è noto se la matrice uva, rispetto a DRYES, che determini una maggiore o minore produzione di metaboliti.

Per tali motivi, è stata valutata la produzione di ALT, AOH e AME, inoculando gli isolati di *Alternaria* su substrato liquido a base di succo d'uva, e confrontando la produzione di metaboliti rispetto a DRYES.

Altri fattori ambientali quali la temperatura alla quale avviene la crescita influenzano la produzione di tossine di *Alternaria*; la produzione di micotossine già a partire da 5°C e fino alla temperatura di 30°C è stata evidenziata su ceppi *A. alternata* isolati da cereali: tutti e tre i metaboliti sono stati prodotti a 5°C in presenza di valori di a_w pari 0,98 e 0,95 e a 30°C con 0,98 e 0,90 a_w . (Magan et al., 1984); parametri ambientali come temperatura, pH, attività dell'acqua (a_w), illuminazione di diversa

lunghezza d'onda o la presenza di differenti composti dell'azoto o di inibitori della biosintesi degli acidi grassi influenzano fortemente la produzione delle micotossine da parte di *A. alternata* e di altre vie metaboliche della specie (Magan et al., 1984; Orvehed et al., 1988; Häggblom, Unestam, 1979; Söderhäll et al., 1978; Hiltunen, Söderhäll, 1992).

La massima produzione di ALT, AOH e AME per *A. alternata* è stata osservata alla temperatura di 25°C, con un valore di a_w di 0,98 su substrato a base di frumento agarizzato e su cariossidi di frumento: in tali condizioni *A. alternata* su substrato a base di estratto di frumento agarizzato, produce 807 µg di AOH, 603 µg di AME e 169 µg di AE, per ml in trenta giorni; la produzione di tutte e tre le micotossine a 0,95 a_w invece è risultata inferiore del 40% rispetto a tali quantità e limitate quantità di tossine sono state prodotte a un' a_w di 0,90. Variazioni di temperatura e l'attività dell'acqua hanno prodotto differenze della produzione di tossine sul substrato: a 15°C e 0,98 a_w si è ottenuto un massimo di 52 µgr di AOH e di 25 µgr di AME per ml dopo quindici e trenta giorni rispettivamente, mentre la produzione di ALT continua ad aumentare e raggiunge i 57 µgr/ml dopo quaranta giorni. A 15°C e con 0,95 di a_w la produzione era di 62, 10 e 5 µg/ml dopo quaranta giorni. (Magan et al., 1984).

Anche studi condotti su altre specie fungine produttrici di micotossine, quale *Aspergillus carbonarius*, hanno evidenziato che l'attività dell'acqua e la temperatura di crescita influenzano la produzione di OTA (Bellí et al., 2004) e che il valore ottimale per la crescita sembra corrispondere con l'optimum per la produzione di OTA, mentre l'optimum termico per la crescita risulta superiore rispetto a quello per la produzione della micotossina, indicando che le condizioni ottimali di crescita e produzione di metaboliti secondari sono differenti (Bellí et al., 2005; Mitchell et al., 2004; Esteban et al., 2006). La crescita, per tale specie, a differenza di *Alternaria*, è maggiore a temperature di 35-37°C rispetto a 20°C, mentre i dati esposti nella presente indagine per *Alternaria* indicano un massimo di crescita di 25°C.

Materiali e metodi

Effetto di diversi substrati sulla crescita e sulla produzione di micotossine di *Alternaria* spp.

Confronto tra DRYES e RA

La valutazione della produzione di micotossine da parte di isolati di *Alternaria* su diversi substrati è stato condotta su 18 isolati appartenenti alle specie *A. alternata* (1 isolato), *A. arborescens* (10 isolati), *A. tenuissima* (7 isolati), di diversa provenienza e isolati da diversi vitigni per valutare la capacità di produzione su due diversi substrati micologici.

La Tabella 41 riporta il prospetto degli isolati fungini impiegati, con l'indicazione specie di appartenenza, dell'anno di isolamento e della provenienza dei campioni di uva dai quali sono stati isolati precedentemente.

Tabella 41. Isolati fungini considerati per la prova di confronto tra DRYES e RA.

Isolato	Specie	Anno isolamento	Provenienza	Vitigno
189C	<i>A. alternata</i>	2007	Toscana	Montepulciano
29E	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Pinot G.
32F	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Pinot G.
121B	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Primitivo
122B	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Primitivo
123B	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Primitivo
123D	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Primitivo
124A	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Negroamaro
141G	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Sangiovese
158B	<i>A. arborescens</i>	2007	Veneto	Sangiovese
162E	<i>A. arborescens</i>	2007	Toscana	Merlot
31C	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Pinot G.
121G	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Primitivo
122A	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Primitivo
139C	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Sangiovese
141B	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Sangiovese

156G	<i>A. tenuissima</i>	2007	Veneto	Sangiovese
191B	<i>A. tenuissima</i>	2007	Toscana	Montepulciano

I substrati utilizzati sono stati DRYES, modificato come indicato in precedenza e RA (Rice Agar) (Samson et al., 2000). RA è stato utilizzato in sostituzione del riso autoclavato (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986) per poter utilizzare lo stesso protocollo di estrazione impiegato per le colture cresciute su DRYES.

Gli isolati sono stati inizialmente inoculati su PDA e posti a crescere per 7 giorni, a 25°C al buio in armadio climatico; da tali colonie sono stati prelevati sterilmente dei conidi e inoculati in tre punti su piastre Petri da 90 mm contenenti DRYES e RA; per ciascun substrato sono state allestite tre ripetizioni. Le piastre così inoculate sono state poste in armadio climatico, al buio, alla temperatura di 25°C e la valutazione della produzione di AOH, AME e ALT è stata effettuata dopo 14 giorni di crescita.

Il protocollo di estrazione è stato il medesimo descritto in precedenza.

Il confronto tra la produzione di micotossine sui due isolati è stato condotto su base statistica con l'analisi della varianza (ANOVA) a 2 vie, considerando come fattori i substrati (2 trattamenti) e gli isolati fungini (18 trattamenti); il confronto delle medie è stato effettuato con il test Student-Newman-Keuls (SNK), con un livello di significatività del 5% (P=0,05). Le analisi sono state condotte con il programma Statistica 7.1 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Confronto tra DRYES e succo d'uva

La Tabella 42 riporta il prospetto dei 40 isolati considerati nella prova di confronto tra i due substrati DRYES e succo d'uva Boschera; per ciascun isolato è indicato il gruppo di sporulazione e la specie di appartenenza, la provenienza dei campioni di uva dai quali sono stati isolati i ceppi e l'anno di isolamento. Gli isolati 91 e 92, indicati con un asterisco (“*”) sono i due isolati di riferimento per le specie *A. arborescens* e *A. tenuissima*, come già indicato in precedenza.

Tabella 42. Isolati fungini considerati per la prova di confronto tra DRYES e succo d'uva Boschera.

Isolato	gruppo	Specie	Regione	Località	Vitigno	Anno isolamento	fonte
21A	4	<i>A. alternata</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2006	CRA-VIT
132C	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIC
148A	4	<i>A. alternata</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2006	CRA-VIT
173B	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
189C	4	<i>A. alternata</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC

5B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
42E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2006	CRA-VIT
70A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
100A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2006	CRA-VIT
136D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIC
170A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2006	CRA-VIT
210A	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
225C	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2006	CRA-VIC
233D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIC
29E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
34D	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
36E	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
52L	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Merlot	2007	CRA-VIT
121B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
122B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
123B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
125B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2007	CRA-VIT
156C	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
158B	3	<i>A. arborescens</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
162E	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2007	CRA-VIC
177D	3	<i>A. arborescens</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Sangiovese	2007	CRA-VIC
91*	3	<i>A. arborescens</i>	Friuli-V. G.	Villanova (GO)	Tocai	2006	Univ. UD
20A	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2006	CRA-VIT
174D	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Negroamaro	2006	CRA-VIT
233B	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Merlot	2006	CRA-VIC
35E	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Pinot grigio	2007	CRA-VIT
122A	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Primitivo	2007	CRA-VIT
141B	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
156G	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
157F	5	<i>A. tenuissima</i>	Veneto	Spresiano (TV)	Sangiovese	2007	CRA-VIT
174C	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Sangiovese	2007	CRA-VIC
180G	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
182F	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
191B	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Pratantico (AR)	Montepulciano	2007	CRA-VIC
92*	5	<i>A. tenuissima</i>	Toscana	Grosseto (GR)	Sangiovese	2002	Univ. UD

L'effetto della crescita su uva sulla produzione di micotossine è stato valutato inoculando gli isolati di *Alternaria* su substrato liquido a base di succo d'uva e confrontando la produzione di ALT, AOH e AME rispetto a DRYES.

Il substrato impiegato è stato ottenuto da grappoli di uva della cv. Boschera, raccolti a completa maturazione ai primi di ottobre del 2008 presso l'azienda sperimentale del CRA-VIT di Susegana, da parcelle non trattate con antibiotritico.

I grappoli sono stati lavati in acqua corrente, asciugati accuratamente con carta e sotto cappa a flusso laminare; gli acini sono stati pigiati manualmente e il succo ottenuto è stato centrifugato a 9000 rpm (centrifuga Allegra™ X-22 R, Beckman Coulter) per eliminare residui di polpa e buccia e il succo limpido così ottenuto è stato sterilizzato a vapore fluente in autoclave a valvole aperte a 110°C per

45°. Il pH del succo è stato misurato ed è risultato pari a 2,85. Il succo è stato mantenuto a 4°C fino al momento dell'impiego.

Sono stati considerati 40 isolati fungini ottenuti dalle analisi micologiche effettuate su uve raccolte nel 2006 e nel 2007 da Veneto e Toscana; l'identità e la provenienza dei 41 isolati sono indicate in Tabella 3.

Gli isolati di *Alternaria* sono stati inoculati su PDA e posti a crescere per 7 giorni, a 25°C al buio in armadio climatico. Le colture liquide sono state allestite inoculando in beute sterili da 500 ml, contenenti 100-150 ml di succo d'uva sterile, alcuni frammenti prelevati sterilmente delle colonie cresciute su PDA; le colture sono state poste ad incubare in armadio climatico a 25°C per 14 giorni al buio senza agitazione. Di ciascun isolato sono state allestite 4 ripetizioni.

Al termine del periodo di incubazione, le colture sono state centrifugate a 9000 rpm per recuperare i miceli, lavati 3 volte con acqua distillata sterile per rimuovere i residui del substrato colturale e i miceli ottenuti sono stati raccolti in microprovette da 2 ml e posti a seccare in stufa per 48 ore a 60°C (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986); al termine delle 48 ore sono stati registrati i pesi secchi e i miceli sono stati estratti per 24 ore al buio aggiungendo 1 ml di una soluzione di etil acetato-acido formico 99:1, e mantenendo le provette in agitazione su agitatore orbitale, a 25°C; dopo le 24 ore, l'estratto è stato prelevato e posto in una nuova provetta.

La produzione delle tossine è stata valutata e quantificata come già indicato per le colonie cresciute su piastra.

Effetto di differenti pH sulla crescita e sulla produzione di micotossine

L'effetto del pH sulla crescita e sulla produzione di metaboliti è stato valutato su 6 isolati fungini appartenenti alla tre specie identificate, impiegando come substrato di crescita DRYES opportunamente tamponato a differenti pH.

DRYES è stato preparato come precedentemente indicato con l'aggiunta di opportuni volumi di soluzioni sterili rispettivamente di acido citrico ($C_6H_8O_7$) 0,1 M e di fosfato dibasico di sodio (Na_2HPO_4) 0,2 M: in tal modo sono stati allestite 5 serie di piastre da 90 mm contenenti DRYES, rispettivamente a pH 4, 5, 6, 7, 8.

Di ciascuno dei 6 isolati, indicati in Tabella 45 sono state considerate 3 diverse colture monoconidiali; dalla colonie degli isolati, fatte preventivamente crescere per 7 giorni a 25°C al buio su PDA, sono stati prelevati sterilmente 30 tondelli, dal margine in attiva crescita delle colonie per mezzo di un foracolonia, e inoculati in tre punti sulla piastre contenenti DRYES ai diversi pH: complessivamente sono state inoculati 6 tondelli per ciascun pH, in numero di 3 per piastra, 2 piastre per ciascun pH.

Le piastre così inoculate sono state poste a crescere per 14 giorni al buio, a 25°C; a 7 e a 14 giorni sono stati registrati i diametri medi di ciascuna colonia di ciascuno dei 6 isolati, per ciascun pH e a 14 giorni è stata valutata la produzione di micotossine, con il protocollo già illustrato.

I dati di crescita e di produzione delle tre micotossine sono stati sottoposti ad analisi della varianza e test SNK con il programma Statistica 7.1, come nelle altre prove.

Effetto di differenti temperature sulla crescita e sulla produzione di micotossine

L'effetto di differenti temperature sulla crescita e sulla produzioni di micotossine è stato valutato su 3 isolati precedentemente analizzati per la produzione di micotossine; sono stati considerati 2 isolati appartenenti alla specie *A. arborescens*, 177D e 52L, uno fortemente produttore di ALT, AOH e AME (isolato 177D) ed uno produttore di AME e AOH (isolato 52L) e su un isolato di *A. tenuissima* (180G) produttore di AME e di AOH.

Gli isolati sono stati inizialmente inoculati su PDA e posti a crescere per 7 giorni, a 25°C al buio in armadio climatico; da tali colonie sono stati prelevati sterilmente 25 tondelli del diametro di 6 mm dal margine in attiva crescita della colonia, utilizzando un foracolonie. Ciascuno dei tondelli è stato posto al centro di altrettante piastre da 90 mm di diametro contenenti DRYES e le piastre così inoculate sono state poste in sacchetti di materiale plastico alle diverse temperature.

Tutti gli isolati sono stati posti a crescere per 14 giorni, al buio, in 5 armadi climatici alle temperature di 5, 15, 25, 35°C; a 7 e 14 giorni sono stati registrati i diametri medi di ciascuna colonia e a 14 giorni le colonie sono state utilizzate per l'estrazione e la quantificazione della produzione di ALT, AOH e AME secondo il protocollo di estrazione già esposto.

I diametri di crescita e la produzione dei tre metaboliti sono stati sottoposti ad analisi della varianza; il confronto delle medie è stato effettuato con il test SNK, con un livello di significatività del 5% ($P=0,05$). Le analisi sono state condotte con il programma Statistica 7.1 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Risultati

Confronto tra DRYES e RA

La tabella 43 riporta la produzione delle tre micotossine, ALT, AME e AOH da parte dei 18 isolati a confronto su DRYES e RA espressa in µg di tossina prodotti per grammo di peso secco di micelio.

Tabella 43. Confronto DRYES/RA. Produzione di ALT, AOH, AME da parte dei 18 isolati appartenenti alle tre specie a confronto. Dati medi e deviazione standard, espressi in µg /g.

Isolato	Specie	ALT				AOH				AME			
		DRYES		RA		DRYES		RA		DRYES		RA	
		media	d.s	media	d.s	media	d.s	media	d.s	Media	d.s	media	d.s
189C	AL	-	-	-	-	3,26	1,60	4,55	2,64	-	-	-	-
29E	AR	1,16	0,00	2,07	0,48	102,45	35,12	33,34	8,87	36,75	9,70	20,59	6,11
32F	AR	0,91	1,29	-	-	71,93	26,66	11,95	4,17	14,37	5,85	9,08	2,82
121B	AR	-	-	-	-	71,17	31,79	23,96	3,48	34,51	10,64	15,52	0,98
122B	AR	-	-	-	-	6,24	1,85	26,54	13,05	9,33	2,94	23,81	11,53
123B	AR	-	-	1,79	0,29	7,52	3,21	58,10	12,48	5,15	2,99	26,39	6,10
123D	AR	0,03	0,05	2,16	0,23	-	-	18,49	8,92	40,81	13,45	74,40	13,10
124A	AR	11,93	4,37	-	-	119,51	53,26	48,91	16,28	120,54	59,71	48,58	10,93
141G	AR	2,64	0,81	1,04	0,07	156,04	69,05	70,99	24,94	66,45	20,14	61,48	19,91
158B	AR	-	-	9,34	4,52	6,81	6,74	191,10	92,69	4,05	3,65	134,80	68,96
162E	AR	0,45	0,77	17,65	12,85	13,31	4,80	98,31	32,88	5,48	3,43	65,21	20,03
31C	TE	-	-	2,23	0,96	3,71	1,10	160,68	60,49	5,97	0,22	40,33	18,49
121G	TE	-	-	10,45	3,32	3,22	2,35	187,96	83,32	10,23	5,09	78,42	29,94
122A	TE	0,07	0,10	-	-	4,69	3,85	9,92	2,67	9,30	5,37	17,76	4,91
139C	TE	-	-	-	-	2,30	2,57	4,07	1,51	3,69	2,71	12,22	0,55
141B	TE	-	-	-	-	6,92	4,98	44,98	8,22	5,29	1,94	80,46	0,35
156G	TE	0,08	0,14	1,46	1,32	20,99	9,03	29,69	7,33	11,22	8,38	23,32	7,93
191B	TE	-	-	-	-	2,87	2,01	18,98	11,64	-	-	0,21	0,36

La produzione da parte dei diversi isolati è stata differente, in particolare esistono ceppi fortemente produttori e ceppi ipoproductori o con produzione inferiore al limite di rilevabilità dell'analisi; tale comportamento è stato rilevabile su entrambi i substrati.

Dal confronto tra i due substrati emerge che la produzione delle tre micotossine indagate è stata significativamente maggiore su RA rispetto a DRYES (P=0,05); tale risultato conferma quanto riportato in letteratura, che indica i substrati a base di riso come i più idonei alla valutazione della produzione di micotossine di *Alternaria* spp.

La produzione di ALT è stata in media pari a 0,96 su DRYES e 2,68 su RA, con circa lo stesso numero di isolati con produzione inferiore al limite di rilevabilità (10 isolati su DRYES, 9 su RA); la concentrazione massima rilevata è stata pari a 11,93 µg/g su DRYES e 17,63 su µg/g RA.

La produzione di AOH è stata in media pari a 33,50 su DRYES e 57,92 su RA, con solo un isolato indicato come non produttore su DRYES, mentre lo stesso su RA aveva prodotto in media 4,07 µg/g; la produzione è stata nell'intervallo compreso tra 2,30 e 156,04 µg/g su DRYES e tra 4,70 e 191,10 µg/g su RA.

La produzione di AME è stata in media pari 21,29 e 40,70 µg/g, rispettivamente su DRYES e RA, con 2 isolati non produttori su DRYES ed uno su RA. La produzione, tra i diversi isolati, è stata compresa tra 3,69 e 120,54 µg/g su DRYES e tra 9,08 e 134,80 su RA.

Come precedentemente indicato, anche sui due substrati considerati, la produzione di AOH e AME ha mostrato un andamento parallelo, con un dato che si accorda con quanto riportato in letteratura; l'analisi di regressione effettuata secondo il modello lineare, ottenuta considerando come variabile indipendente la concentrazione di AOH e come variabile dipendente la concentrazione di AME, è risultata molto significativa ($R^2=0,619$; $F=126,728$; $P=0.000$); l'equazione relativa è stata $y=8,13+0,48x$.

La maggiore produzione di micotossine su substrati a base di cereali e in particolare di riso, rispetto ad altri substrati, da parte di *Alternaria*, è stata riportata anche da altri autori (Logrieco et al., 1990; 1990a; Visconti et al., 1986), e i risultati ottenuti sono in accordo con essi, sebbene non sia mai stato condotto un confronto tra RA e DRYES.

Da quanto evidenziato, il ricorso a substrati a base di riso, nella presente indagine il substrato RA, è senz'altro di indubbia utilità, in particolare nei casi di isolati che si dimostrino scarsamente produttori o con produzione non rilevabile di micotossine su DRYES.

L'utilizzo di differenti substrati permette una più completa valutazione del profilo di metaboliti secondari fungini che una specie può potenzialmente produrre e tale approccio è fondamentale nell'ambito di indagini tassonomiche tra differenti gruppi di specie, per i quali la produzione di metaboliti secondari rappresenta una preziosa fonte di marcatori discriminanti.

Nel caso delle specie di *Alternaria*, studi condotti impiegando diversi substrati, quali DRYES, AKL (alkaloid formation agar), MEA (Malt Extract Agar), NS (Nitrite Sucrose agar), OA (Oat meal Agar), PCA (Potato Carrot Agar), PSA (Potato Sucrose Agar), SYES (Sigma Yeast Extract Sucrose agar) e V8-juice, permettono una più completa valutazione della produzione di metaboliti secondari (Andersen, Thrane, 1996; Andersen et al., 2001; 2002; 2005), tuttavia, il ricorso a numerosi substrati nelle analisi di *screening* o di *routine*, in particolare se condotto su numerosi isolati, è lungo e laborioso.

In tali casi, l'utilizzo di un unico substrato relativamente di facile preparazione, le cui caratteristiche presentino limitata variabilità dei suoi componenti, a differenza di quanto può avvenire per substrati che contengano componenti naturali (le cui caratteristiche possono non sempre essere omogenee, in diverse preparazioni) e che consenta la produzione dei metaboliti caratteristici della specie, ha fatto in modo che DRYES sia diventato il substrato d'elezione per la valutazione della produzione di metaboliti secondari delle specie di *Alternaria*. Tale substrato, inoltre, è risultato utile anche per la valutazione delle caratteristiche morfologiche della colonia, in particolare il colore del micelio, che

su tale substrato sembra rivestire un significativo valore diagnostico, almeno per alcuni gruppi di specie: tale substrato, in particolare permette la chiara distinzione, in base alla colorazione del micelio, tra il gruppo di specie morfologiche di *A. infectoria* rispetto ai gruppi di specie di *A. arborescens*, *A. alternata* e *A. tenuissima* (Andersen et al., 2002).

Confronto tra DRYES e succo d'uva

La Tabella 44 riporta, per ciascun isolato, la quantità media dei tre metaboliti prodotta, a confronto tra i due substrati; il dato è espresso in microgrammi di micotossina prodotti da un grammo di peso secco di micelio. In tabella è anche riportato la percentuale di ceppi produttori sui due substrati, il dato massimo (“max”) e medio (“media”) di produzione, il risultato del test SNK di confronto delle medie, indicato con le lettere “a” e “b” e il rapporto tra produzione media DRYES e succo d'uva.

Tabella 44. Confronto DRYES/succo d'uva. Produzione di ALT, AOH, AME da parte dei 18 isolati appartenenti alle tre specie a confronto. Dati medi espressi in µg/g.

Isolato	Specie	metabolita prodotto (µg/g)					
		ALT		AOH		AME	
		DRYES	UVA	DRYES	UVA	DRYES	UVA
21A	<i>A. alternata</i>	-	-	12,40	-	14,25	-
132C	<i>A. alternata</i>	8,54	-	184,83	-	73,41	-
148A	<i>A. alternata</i>	1,00	-	28,59	-	56,68	-
173B	<i>A. alternata</i>	-	-	1,77	7,49	1,25	21,18
189C	<i>A. alternata</i>	-	-	1,82	-	0,51	-
5B	<i>A. arborescens</i>	6,48	-	171,16	-	70,14	-
42E	<i>A. arborescens</i>	-	-	6,06	-	2,18	-
70A	<i>A. arborescens</i>	1,43	-	35,83	-	37,93	-
100A	<i>A. arborescens</i>	3,70	-	58,65	-	52,18	-
136D	<i>A. arborescens</i>	0,48	-	115,43	-	64,24	-
170A	<i>A. arborescens</i>	4,30	-	257,19	-	50,11	-
210A	<i>A. arborescens</i>	-	-	9,90	-	0,81	-
225C	<i>A. arborescens</i>	-	-	7,74	-	-	-
233D	<i>A. arborescens</i>	14,04	-	211,77	-	186,81	-
29E	<i>A. arborescens</i>	0,60	1,20	72,55	32,35	30,94	21,47
34D	<i>A. arborescens</i>	-	-	29,42	-	59,58	-
36E	<i>A. arborescens</i>	2,82	-	177,38	1,36	88,32	-
52L	<i>A. arborescens</i>	21,19	-	169,69	0,61	69,12	0,56
121B	<i>A. arborescens</i>	0,51	1,10	116,04	26,77	93,42	6,00
122B	<i>A. arborescens</i>	-	-	64,30	-	39,07	-
123B	<i>A. arborescens</i>	-	-	37,60	1,28	3,89	1,03

125B	<i>A. arborescens</i>	12,02	-	12,92	-	31,42	-
156C	<i>A. arborescens</i>	-	-	29,00	7,88	15,37	2,81
158B	<i>A. arborescens</i>	7,87	-	292,32	10,24	246,71	9,51
162E	<i>A. arborescens</i>	1,47	-	20,33	-	8,87	-
177D	<i>A. arborescens</i>	8,97	-	110,88	27,04	52,41	25,60
91	<i>A. arborescens</i>	2,07	-	25,95	2,53	18,42	3,45
20A	<i>A. tenuissima</i>	1,30	-	140,63	-	113,46	-
174D	<i>A. tenuissima</i>	2,57	-	42,02	5,62	29,49	0,78
233B	<i>A. tenuissima</i>	-	-	151,49	7,46	144,32	8,05
35E	<i>A. tenuissima</i>	-	-	37,38	28,04	23,73	1,78
122A	<i>A. tenuissima</i>	-	1,16	16,93	13,40	32,83	8,58
141B	<i>A. tenuissima</i>	1,15	5,06	29,16	20,02	67,55	13,55
156G	<i>A. tenuissima</i>	-	-	11,58	5,33	6,83	4,02
157F	<i>A. tenuissima</i>	-	-	0,89	-	0,26	-
174C	<i>A. tenuissima</i>	-	-	31,66	10,01	16,85	1,82
180G	<i>A. tenuissima</i>	-	-	200,22	-	208,70	-
182F	<i>A. tenuissima</i>	-	-	25,37	2,17	3,65	0,97
191B	<i>A. tenuissima</i>	-	-	4,82	8,88	5,17	10,71
92	<i>A. tenuissima</i>	-	-	0,81	1,19	0,22	0,04
% ceppi produttori		100	10	100	50	98	48
max		21,19	5,06	292,32	32,35	246,71	25,60
media		5,12	2,13	73,86	10,98	51,82	7,47
media		5,12	2,13	73,86	10,98	51,82	7,47
Test SNK		a	b	a	b	a	b
media (D/U)		2,41		6,72		6,94	

Dal confronto emerge che la produzione delle tre micotossine è significativamente differente sui due substrati: l'analisi della varianza con confronto delle medie con il test SNK ha riportato una differenza molto significativa, con una produzione più elevata di tutte e tre le micotossine su DRYES, rispetto alla produzione su succo d'uva ($P=0,05$).

Considerando la frequenza degli isolati che hanno prodotto ALT in quantità rilevabili, è stata pari al 52,5% su DRYES (21 isolati su 40), mentre su succo d'uva è stata nettamente inferiore e pari al 10% (4/40).

Tale dato per AOH è stato pari rispettivamente al 100% per DRYES, con tutti gli isolati che hanno mostrato di produrre quantità rilevabili di micotossina, e pari al 52,5% per il succo d'uva (21/40); la produzione di AME ha fornito un risultato analogo, con il 97,5% di isolati produttori (39/40) su DRYES e solo il 47,5% di isolati produttori su succo d'uva (19/40).

Oltre alla frequenza di isolati produttori, anche la massima produzione di micotossina nei due substrati è stata molto diversa, con una produzione, negli isolati maggiormente produttori, di ALT su DRYES superiore di 4 volte quella sul succo d'uva (21,19 contro 5,06 $\mu\text{g/g}$) e di AOH e AME su DRYES superiore di 10 volte quella su succo d'uva (292,32 contro 32,35 $\mu\text{g/g}$ di AOH; 246,71

contro 25,60 µg /g di AME); il dato medio di produzione, su DRYES rispetto al succo d'uva rilevato dai ceppi produttori su entrambi i substrati è stato pari a più del doppio (2,4) per ALT e pari a quasi 7 volte per AOH e per AME (6,7 e 6,9).

Tale risultato indica che gli isolati di *Alternaria* valutati in questa indagine mostrano livelli di produzione di micotossine nettamente inferiori su uva rispetto al substrato induttore DRYES e quindi rappresentano una prima indicazione che la matrice uva probabilmente non rappresenta il substrato ideale alla produzione di metaboliti tossici da parte di tale genere fungino.

Tuttavia, il dato va ulteriormente indagato su un numero maggiore di isolati, provenienti da altri ambienti e su altri substrati a base di uva: non è noto infatti quale sia il comportamento delle specie di *Alternaria* rilevate su uve provenienti da vitigni diversi.

Effetto di differenti pH sulla crescita e sulla produzione di micotossine

La Tabella 45 riporta i dati di crescita e di produzione di micotossine da parte dei 6 isolati in oggetto, mentre la Tabella 46 riporta il dato relativo a livello di specie; di ciascun isolato è indicata le specie di appartenenza, il dato medio delle tre monoconidiali in relazione alla crescita e alla produzione di ALT, AOH, AME nelle 5 condizioni di pH, con relativa deviazione standard; a fianco di ciascuna media è indicato il risultato del confronto delle medie con il test SNK. La produzione di micotossine è espressa in µg/g di micelio, mentre la crescita è espressa in mm.

Tabella 45. Crescita a 7 giorni a pH 4, 5, 6, 7, 8 per sei isolati di *Alternaria*.

Isolato	Specie	GR.	pH	Diametri 7 giorni		ALT		AOH		AME	
				med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.	med.	d.s.
191E	AL	4	4	10,8d	0,6	-	-	2,30b	1,07	1,08ab	0,96
	AL	4	5	15,1c	0,9	-	-	0,66b	0,16	0,31b	0,12
	AL	4	6	18,4b	0,6	-	-	5,75a	2,12	2,14a	0,85
	AL	4	7	21,7a	0,5	-	-	1,40b	0,63	0,64b	0,32
	AL	4	8	22,9a	0,8	-	-	5,63a	2,08	2,21a	0,85
ISV 6338	AL	4	4	22,8a	0,6	-	-	1,26a	0,32	0,15a	0,13
	AL	4	5	21,9a	0,5	-	-	1,70a	0,48	0,59a	0,30
	AL	4	6	22,9a	0,6	-	-	1,36a	1,07	0,34a	0,51
	AL	4	7	22,8a	0,5	-	-	0,67a	0,29	0,07a	0,08
	AL	4	8	23,1a	1,1	-	-	1,51a	0,36	0,42a	0,18
52L	AR	3	4	2,3d	0,1	0,27a	0,54	10,99a	8,28	7,66a	8,02
	AR	3	5	2,4c	0,1	-a	-	6,65a	2,46	3,09a	1,10

	AR	3	6	2,4b	0,1	-a	-	6,12a	1,67	2,92a	0,77
	AR	3	7	2,6a	0,1	-a	-	4,36a	1,49	1,39a	0,94
	AR	3	8	2,5a	0,1	-a	-	4,64a	1,21	1,43a	0,76
125B	AR	3	4	19,4a	0,8	-	-	1,00a	0,38	0,17ab	0,17
	AR	3	5	21,3ab	2,5	-	-	0,85a	0,23	0,02b	0,04
	AR	3	6	23,9b	0,7	-	-	1,05a	0,52	0,11ab	0,19
	AR	3	7	24,1b	0,5	-	-	1,06a	0,21	0,31a	0,09
	AR	3	8	24,3b	0,4	-	-	1,10a	0,42	0,34a	0,14
177D	AR	3	4	1,9d	0,2	9,63a	10,08	539,27a	175,53	388,66a	91,83
	AR	3	5	2,3c	0,1	-b	-	49,18b	67,40	26,43b	21,59
	AR	3	6	2,4b	0,1	-b	-	8,00b	10,11	4,36b	5,03
	AR	3	7	2,5a	0,1	-b	-	7,23b	9,73	2,46b	4,15
	AR	3	8	2,6a	0,1	-b	-	7,88b	10,82	4,15b	5,98
180G	TE	5	4	1,1e	0,1	-	-	62,91b	44,24	57,46a	35,85
	TE	5	5	1,9d	0,2	-	-	96,84a	62,15	24,71a	28,97
	TE	5	6	2,7c	0,2	-	-	9,83b	18,40	0,25b	0,51
	TE	5	7	3,0b	0,1	-	-	2,41b	4,82	-b	-
	TE	5	8	3,2a	0,1	-	-	-b	-	-b	-

Tabella 46. Crescita a 7 giorni a pH 4, 5, 6, 7, 8 per le tre specie.

Specie	GR.	pH	Diametro 7 giorni		ALT		AOH		AME	
			med.	SNK	ALT	SNK	AOH	SNK	AME	SNK
AL	4	4	16,8	b	0,00	-	1,78	b	0,62	b
	4	5	18,5	b	0,00	-	1,18	b	0,45	b
	4	6	20,7	b	0,00	-	3,56	a	1,24	a
	4	7	22,3	a	0,00	-	1,04	b	0,35	b
	4	8	23,0	a	0,00	-	3,57	a	1,31	a
	3	4	20,6	b	5,54	a	203,98	a	135,54	a
AR	3	5	22,4	b	0,00	b	47,91	b	16,55	b
	3	6	23,8	b	0,00	b	9,51	c	4,19	b
	3	7	25,0	a	0,00	b	8,34	c	2,86	b
	3	8	25,2	a	0,00	b	9,34	c	4,44	b
TE	5	4	10,5	e	0,00	-	37,23	b	34,58	a
	5	5	18,8	d	0,00	-	72,24	a	35,36	a
	5	6	27,1	c	0,00	-	29,19	b	12,08	b
	5	7	30,4	b	0,00	-	20,77	b	10,45	b
	5	8	31,9	a	0,00	-	19,36	b	8,72	b

Il dato di crescita a 7 giorni ha dato risultati diversi tra i diversi isolati e ai diversi pH.

Gli isolati di *A. alternata*, ISV 6338 e 191E hanno mostrato complessivamente accrescimenti direttamente proporzionali all'incremento del pH del substrato, sebbene con comportamenti diversi; 191E ha mostrato crescite significativamente diverse ai 5 pH, con un progressivo incremento del diametro di crescita da pH 4 a pH 8, mentre ISV 6338 è cresciuto maggiormente a pH 5 e non ha mostrato a livello degli altri pH delle differenze significative.

Gli isolati di *A. arborescens*, 52L, 125B, 177D hanno mostrato lo stesso comportamento in relazione ai diversi pH, solo con lievi differenze per 125B: gli isolati 52L e 177D hanno mostrato crescite progressivamente maggiori all'aumentare del pH del mezzo, raggiungendo i diametri maggiori a pH 7 e 8 e con crescite progressivamente minori da 6 a 4, con differenze tra un pH e l'altro; un simile andamento è stato osservato anche per 125B, che ha mostrato crescite significativamente maggiori a pH elevati, nell'intervallo da 6 a 8, senza differenze tra i tre pH, e crescite differenti e progressivamente minori a pH 5 e 4.

L'isolato 180G di *A. tenuissima* ha mostrato una crescita simile, ai differenti pH, a quanto osservato per i precedenti isolati, raggiungendo il diametro maggiore a pH 8 e mostrando crescite progressivamente decrescenti al passaggio verso valori di pH minori, con differenze significative tra i diversi pH.

Considerando il fattore "isolato", senza distinzione tra le specie, è risultato evidente che la crescita è fortemente influenzata dal pH e che è riconoscibile un andamento crescente dello sviluppo delle colonie all'aumentare del valore di pH da 4 a 8, con differenze significative tra i 5 valori di pH.

Prendendo in esame il fattore "specie", invece, il comportamento è stato significativamente non differente per i pH da 8 a 6, ai quali è stata rilevata la crescita maggiore e significativamente minore a pH 4; a pH 5 è osservabile un comportamento intermedio tra i due gruppi a maggiore e minore crescita.

Tali risultati sono stati ottenuti benché tra le tre specie e tra i sei isolati siano state rilevate, considerando assieme i dati dei diversi pH, crescite statisticamente diverse, con una crescita progressivamente minore passando da *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*, con l'ultima specie che ha mostrato i minori accrescimenti ed evidenziando come esistano tre raggruppamenti degli isolati, indipendenti dalle specie, con ISV 6338 e 125B a crescita maggiore, 191E a crescita intermedia e 180G, assieme a 177D accomunati dalla minor crescita rilevata.

L'isolato 177D ha mostrato di produrre la maggiore quantità rilevata delle tre micotossine ed è stato l'unico a produrre quantità rilevabili di ALT è significativamente maggiore a pH 4, mentre a pH superiori non è stata rilevabile alcuna produzione in nessuno degli isolati e senza differenze tra le specie.

AOH e AME sono stati prodotti in tutte le condizioni di pH, ma solo a pH 4 la produzione è stata significativamente rilevante, mentre a pH superiori è stata molto contenuta e senza significative differenze tra i diversi pH. Non sono state apprezzabili significative differenze tra le specie, in particolare per la produzione di AME, mentre complessivamente gli isolati che hanno prodotto le maggiori quantità dei due metaboliti sono stati 177D, seguito da 180G, con differenze significative tra loro e nei confronti degli altri 4 isolati meno produttori.

Mentre la capacità di crescita e di produzione di micotossine, in un ampio intervallo di pH e a basse ed alte temperature, è stata documentata per specie fungine produttrici di micotossine diverse da *Alternaria*, quale ad esempio *A. carbonarius* (Esteban et al., 2005) e per altre specie del genere *Aspergillus* produttrici di OTA (Palacios-Cabrera et al., 2005), la produzione di micotossine da parte di specie di *Alternaria*, da quanto emerso dalla mia indagine, può avvenire in intervalli di pH e temperatura relativamente ristretti, indicando in aggiunta che specie diverse presentano differenti condizioni ottimali di produzioni di metaboliti secondari.

Effetto di differenti temperature sulla crescita e sulla produzione di micotossine

La Tabella 47 riporta per i tre isolati i diametri medi registrati a 7 giorni di crescita alle quattro temperature valutate, con relativa deviazione standard e con il risultato dell'analisi della varianza e del confronto delle medie effettuato con il test SNK e i dati di produzione delle tre micotossine ALT, AOH, AME. I diametri sono espressi in mm, mentre la produzione di tossine è espressa come quantità di metabolita prodotto per unità di peso secco di micelio ($\mu\text{g/g}$).

Tabella 47. Crescita delle colonie e produzione ALT, AOH, AME a diverse temperature.

Isolato	Specie	T°C	Diametro 7 gg			ALT			AOH			AME		
			med.	SNK	d.s.	med.	SNK	d.s.	med.	SNK	d.s.	med.	SNK	d.s.
52L	AR	5	4,7	d	0,5	-	c	-	-	b	-	-	d	-
		15	13,0	c	0,7	17,42	a	7,82	109,03	a	49,85	78,87	a	32,83
		25	35,2	a	1,5	11,28	b	10,61	133,86	a	68,40	62,85	b	26,67
		35	19,9	b	1,0	1,19	c	0,67	26,98	b	18,16	24,47	c	22,35
177D	AR	5	3,9	d	0,6	2,97	c	2,00	56,93	bc	15,87	60,95	a	15,35
		15	13,1	c	0,9	26,18	b	6,94	95,01	b	74,80	98,13	ab	56,94
		25	32,3	a	2,2	46,45	a	19,82	161,59	a	77,76	147,44	a	71,49
		35	22,2	b	1,1	0,43	c	0,45	12,19	c	10,29	9,81	c	9,21

180G	TE	5	3,4	d	1,5	0,36	b	0,58	13,62	c	17,33	5,20	d	8,70
		15	8,9	c	1,4	9,18	a	3,37	94,39	a	34,50	114,99	a	19,22
		25	26,6	a	2,9	0,59	b	0,93	67,58	b	37,92	78,47	b	38,54
		35	18,8	b	2,4	0,20	b	0,29	22,11	c	6,36	32,66	c	13,12

Tutti gli isolati hanno mostrato di crescere a tutte le temperature, con differenze significative tra di esse; la crescita massima per tutti gli isolati è stata registrata a 25°C, seguita dagli accrescimenti a 35, 15 e 5°C: a 25°C il diametro massimo raggiunto è stato pari a 35,2 mm per 52L, 32,3 mm per 177D e 26,6 mm per 180G.

Benché gli isolati abbiano raggiunto dimensioni diverse tra loro, l'andamento di crescita tra le diverse temperature è stato identico.

La produzione di micotossine è stata rilevata già a partire dalla temperatura di 5°C, eccetto che per l'isolato 52L per il quale nessuna delle tre micotossine è stata prodotta a 5°C.

La massima produzione di ALT, AOH e AME è stata rilevata a 15 e a 25°C senza differenze significative tra le due temperature, mentre alla temperatura di 35°C la produzione delle micotossine è stata significativamente minore rispetto alle temperature di 15 e 25°C;

La produzione a 35°C è stata significativamente inferiore rispetto a tutte le altre temperature di crescita, in particolare per l'isolato 177D.

La produzione di micotossine, confrontata con la crescita delle colonie, permette di affermare che l'optimum di crescita osservato sembra corrispondere con quello di produzione delle micotossine, in quanto la curva di crescita raggiunge il suo valore massimo a 25°C e il picco di produzione di ALT, AOH e AME si osserva a 15-25°C.

Sebbene esistano dati relativi alla produzione di metaboliti secondari e in particolare di micotossine da parte di *A. alternata* in diverse condizioni di temperatura, nessuna indicazione dell'effetto di diverse temperature è disponibile per *A. arborescens* e *A. tenuissima*.

Questa è la prima volta che viene valutata la produzione di ALT, AOH e AME a diverse temperature di crescita in isolati di queste specie e, in aggiunta, isolate da uva, e che viene evidenziato che esistono delle condizioni ottimali di temperatura per la crescita e per la produzione di micotossine e che l'optimum di crescita non coincide con quello di produzione di queste ultime.

La produzione di micotossine già a partire da 5°C e fino alla temperatura di 30°C è stata in precedenza evidenziato su ceppi *A. alternata* isolati da cereali: tutti e tre i metaboliti sono stati prodotti a 5°C in presenza di valori di a_w pari 0,98 e 0,95 e a 30°C con 0,98 e 0,90 a_w . (Magan et al., 1984); parametri ambientali come temperatura, pH, attività dell'acqua (a_w), illuminazione di diversa lunghezza d'onda o la presenza di differenti composti dell'azoto o di inibitori della biosintesi degli acidi grassi

influenzano fortemente la produzione delle micotossine da parte di *A. alternata* e di altre vie metaboliche della specie (Magan et al., 1984; Orvehed et al., 1988; Häggblom, Unestam, 1979; Söderhäll et al., 1978; Hiltunen, Söderhäll, 1992).

La massima produzione di ALT, AOH e AME per *A. alternata* è stata osservata alla temperatura di 25°C, con un valore di a_w di 0,98 su substrato a base di frumento agarizzato e su cariossidi di frumento: in tali condizioni *A. alternata* su substrato a base di estratto di frumento agarizzato, produce 807 µg di AOH, 603 µg di AME e 169 µg di AE, per ml in trenta giorni; la produzione di tutte e tre le micotossine a 0,95 a_w invece è risultata inferiore del 40% rispetto a tali quantità e limitate quantità di tossine sono state prodotte a un' a_w di 0,90. Variazioni di temperatura e l'attività dell'acqua hanno prodotto differenze della produzione di tossine sul substrato: a 15°C e 0,98 a_w si è ottenuto un massimo di 52 µgr di AOH e di 25 µgr di AME per ml dopo quindici e trenta giorni rispettivamente, mentre la produzione di ALT continua ad aumentare e raggiunge i 57 µgr/ml dopo quaranta giorni. A 15°C e con 0,95 di a_w la produzione era di 62, 10 e 5 µg/ml dopo quaranta giorni. (Magan et al., 1984).

Nessuna indagine prima di adesso ha evidenziato che *A. arborescens* e *A. tenuissima* sono in grado di produrre ALT, AOH e AME anche a 5°C e che tale produzione aumenta con la temperatura fino a 15-25°C per poi ridurre drasticamente a 35°C.

Anche studi condotti su altre specie fungine produttrici di micotossine, quale *Aspergillus carbonarius*, hanno evidenziato che l'attività dell'acqua e la temperatura di crescita influenza la produzione di OTA (Bellí et al., 2004) e che il valore ottimale per la crescita sembra corrispondere con l'optimum per la produzione di OTA, mentre l'optimum termico per la crescita risulta superiore rispetto a quello per la produzione della micotossina, indicando che le condizioni ottimali di crescita e produzione di metaboliti secondari sono differenti (Bellí et al., 2005; Mitchell et al., 2004; Esteban et al., 2006). La crescita, per tale specie, a differenza di *Alternaria*, è maggiore a temperature di 35-37°C rispetto a 20°C, mentre i dati esposti nella presente indagine per *Alternaria* indicano un massimo di crescita di 25°C.

Mentre la capacità di crescita e di produzione di micotossine, in un ampio intervallo di pH e a basse ed alte temperature, è stata documentata per *A. carbonarius* (Esteban et al., 2005), la produzione di micotossine da parte di specie di *Alternaria*, da quanto emerso dalla mia indagine, sembra avvenire in intervalli di pH e temperatura relativamente ristretti, indicando in aggiunta che specie diverse presentano differenti condizioni ottimali per la crescita e la produzione di metaboliti secondari.

Capitolo IV

Caratterizzazione genetica in *Alternaria* spp. mediante l'uso di marcatori PCR-derivati quali RAPD.

Introduzione

Il complesso *Alternaria* spp. risulta in natura estremamente polimorfico per la maggior parte dei caratteri morfologici generalmente utilizzati a fini tassonomici. Questi caratteri presentano talora un valore diagnostico per l'identificazione delle specie e delle varietà o gruppi, anche per la grande influenza che l'ambiente può manifestare in tal senso: genotipi simili adattatisi ad organismi ospiti differenti e quindi presenti in climi diversi, mostrano, spesso, differenze nei caratteri morfologici di riferimento, come aspetto della colonia su differenti substrati, morfologia e caratteristiche delle strutture conidio fori. Da queste considerazioni nasce la necessità di ricorrere, per la corretta classificazione tassonomica dei materiali, anche a caratteri più stabili basati sull'impiego di tecniche di analisi molecolari, capaci di esplorare la variazione direttamente a livello della molecola responsabile dell'informazione genetica, il DNA.

La caratterizzazione genetica mediante marcatori molecolari dovrebbe, infatti, consentire non solo una rapida ed affidabile classificazione tassonomica, ma anche la possibilità di studiare i modelli di introgressione tra i *pool* genici originari e la struttura genetica delle popolazioni naturali.

Un sistema di riferimento molecolare a supporto delle caratteristiche tassonomiche distintive può risultare pertanto molto utile sia per la conduzione di indagini filogenetiche, sia per l'inquadramento sistematico delle singole specie del genere.

La valutazione della diversità genetica in termini quantitativi e di distribuzione è di fondamentale importanza per *Alternaria*, così come per tutte le specie fungine, poiché condiziona la capacità adattativa delle popolazioni alle mutevoli condizioni ambientali e degli organismi ospiti. Studi a livello genetico nel genere *Alternaria* sono ancora limitati e spesso in contraddizione tra loro e riguardano solamente alcune specie.

Analisi del genoma mediante marcatori genetici

Esistono varie tipologie di marcatori genetici, da quelli che si basano sui caratteri morfologici, a quelli di tipo biochimico, fino ai più moderni marcatori di tipo molecolare. I marcatori molecolari costituiscono strumenti d'indagine estremamente efficaci ed affidabili che stanno trovando larga applicazione nella genetica di popolazione vegetali, animali, etc... Utili in questo contesto, sono invece risultati i marcatori morfo-fisiologici ma il loro utilizzo rimane non privo di controindicazioni poiché le analisi non sempre generalizzabili, a causa dell'elevata influenza che l'ambiente può esercitare sulla loro manifestazione e considerando che le specie sono per la

maggiorparte saprofite. La costituzione genetica di una popolazione è invece la conseguenza della capacità intrinseca della specie, nel suo complesso, di variare rispondendo alla pressione ambientale differenziandosi in varietà di pool genici.

I marcatori molecolari

I marcatori molecolari sono sequenze di DNA generalmente non riferibili all'attività di specifici geni, come invece avviene per i marcatori isoenzimatici. La loro utilizzazione si basa sulla rilevazione, direttamente a livello della sequenza nucleotidica del DNA, di differenze, dette polimorfismi, dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, sostituzioni nucleotidiche, etc... Come nel caso degli isoenzimi, anche con i marcatori molecolari i polimorfismi possono essere visualizzati mediante tecniche elettroforetiche ed impiegati per risolvere questioni riguardanti l'entità e la struttura genetica di singole popolazioni, e per confrontare la ripartizione della variazione genetica tra più popolazioni.

I vantaggi dei marcatori molecolari sono numerosi: essi infatti non subiscono interferenze da parte dell'ambiente (trattandosi di analisi a livello della molecola del DNA) e coprono qualsiasi parte del genoma (trascritta e non, quindi anche introni e regioni di regolazione) permettendo così di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili. Inoltre essi non presentano effetti epistatici o pleiotropici ed in molti casi possono avere espressione co-dominante, cioè consentono di distinguere l'eterozigote dall'omozigote e, a differenza dei sistemi enzimatici, consentono di saggiare un numero molto elevato di *loci* genomici. I marcatori molecolari attualmente disponibili sono diversi e costituiscono strumenti molecolari d'indagine estremamente efficaci ed affidabili, che trovano larga applicazione sia nella ricerca genetica di base che in quella applicata. Alcuni tipi di marcatori, come RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* - numero variabile di sequenze ripetute o Minisatelliti) sono basati sul procedimento di ibridazione tipo "Southern" (*Southern Blot Hybridization*). Altri, come RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - DNA polimorfico amplificato a caso) o AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction* - reazione a catena della polimerasi arbitrariamente innescata), SSR (*Simple Sequence Repeats* - semplici sequenze ripetute, noti più semplicemente come microsattelliti), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats* - Inter-microsattelliti) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione amplificati) sono basati sulla PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reazione a catena della polimerasi). Un marcatore molecolare può essere definito come quel *locus* genomico, rilevabile con

probe (=sonde) o *primer* (=sequenze di innesco) specifici, che in virtù della sua presenza contraddistingue in modo caratteristico il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3': esso costituisce un marcatore genetico che può essere descritto come un frammento di DNA genomico compreso tra due regioni oligonucleotidiche note (di 6-30 pb). Le sequenze laterali sono infatti quelle riconosciute dagli enzimi di restrizione, nel caso di RFLP e VNTR, oppure dagli inneschi della DNA polimerasi, nel caso di RAPD, SSR e ISSR, oppure, negli AFLP, da entrambi. La sequenza centrale del marcatore, invece, è totalmente o parzialmente nota e coincide con la sequenza della sonda, nel caso di RFLP e VNTR, o con la sequenza ripetuta, nel caso di SSR, mentre è ignota nel caso di RAPD, ISSR e AFLP. Tra i marcatori molecolari un ruolo preponderante per la loro efficienza informativa è occupato da RAPD (Williams *et al.*, 1990), ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994) e AFLP (Vos *et al.*, 1995). Lo sviluppo di questi marcatori è avvenuto in seguito alla scoperta della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) ed è per questo motivo che sono detti marcatori molecolari PCR-derivati. Per quanto riguarda l'*Alternaria* ssp oggetto del presente lavoro, in letteratura è possibile trovare studi condotti a livello molecolare su alcune specie, che hanno portato a risultati differenti, se confrontati con l'approccio morfologico e la definizione di morfospécie.

La congruenza tra specie definite su base morfologica e specie definite su base filogenetiche, è stata valutata su isolati di *Alternaria* associati a fenomeni di deperimento di agrumi prendendo in considerazione, in differenti indagini, alcune regioni geniche, tra le quali 15 loci putativi RAPD, la sequenza parziale del gene per la endopoligalatturonasi (endoPG), della subunità ribosomiale maggiore del mitocondrio (mtLSU), del gene per la beta-tubulina, e di regioni anonime (OPA1-3 e OPA2-1). La combinazione di tutti questi dati molecolari è in generale accordo con le morfospécie descritte, sebbene il numero di morfospécie associate ecceda quelle che possono essere supportate da un concetto filogenetico di specie. Sulla base di tali osservazioni, viene ipotizzato che gli isolati di *Alternaria* associati ad agrumi rientrino tutti in una singola specie filogenetica, *A. alternata* con differenti varianti morfologiche (Peever *et al.*, 2002, 2004).

Tale risultato viene ipotizzato anche da altri autori (Akimitsu *et al.*, 2003).

A una diversa conclusione giungono altri autori, infatti studi differenti condotti su isolati di *Alternaria* provenienti da ospiti differenti (fruttiferi, tra cui meli, ciliegi e frutta a guscio, come pistacchi, noci e nocciole), basati sulla definizione di specie su base morfologica confrontati con differenti marcatori molecolari.

Sulla base di gruppi morfologici di specie ed analisi RAPD-PCR, usando DNA genomico totale e tre diversi primer, è stato condotto uno studio su duecentosessanta isolati di "*small-spored Alternaria* provenienti principalmente da frutta. Gli isolati, posti in condizioni definite, mostrarono differenti

modalità (*pattern*) di sporulazione che rispecchiarono le relazioni genetiche di parentela evidenziate dalla *cluster analysis* del profilo dei frammenti ottenuti con l'impiego della RAPD-PCR. Utilizzando marcatori RAPD, le specie o i gruppi morfologici furono risolti come distinte ramificazioni del dendrogramma: *A. gaisen* (*A. kikuchiana*, *A. alternata* patotipo del pero giapponese, gruppo 2), *A. longipes* (*A. alternata* patotipo del tabacco, gruppo 5), il gruppo di *A. tenuissima* (“*tenuissima*” group, gruppo 5), il gruppo di *A. arborescens* (“*arborescens* group, gruppo 3) e il gruppo di *A. infectoria* (“*infectoria*” group, gruppo 6).

Sulla base del primer OPR-2 è stato possibile discriminare i rappresentanti del gruppo 3 da tutti gli altri gruppi e i gruppi 4 e 5 (eccetto *A. longipes*) da tutti gli altri; è stato possibile definire dei gruppi con una chiara distinzione tra il gruppo di *A. arborescens*, di *A. gaisen*, di *A. tenuissima* e di *A. infectoria*, in particolare, gli isolati di *A. longipes*, come quelli di *A. gaisen*, risultano ben discriminati. Gli isolati rappresentativi di *A. alternata*, invece, si mescolano invece con altri di gruppi differenti, sebbene il numero di ceppi di riferimento per questa specie sia piuttosto limitato. Buona congruenza è dimostrata anche dal confronto con i dati relativi ai metaboliti secondari. L'analisi dei profili ottenuti dalla RAPD-PCR ha confermato che loro plasticità fenotipica di isolati di *Alternaria* posti a crescere e osservati in condizioni definite e riproducibili, è minimizzata e una valida distinzione tassonomica può essere condotta sulla base delle caratteristiche morfologiche. La conclusione è che *A. alternata*, *A. gaisen*, *A. longipes*, e altri *taxa* di *Alternaria* a piccole spore, saprofite e pertotrofite, sono riconoscibili come *taxa* morfologicamente distinti (Roberts et al., 2000).

Isolati di *Alternaria* ottenuti da vari tessuti di pistacchio, in California furono caratterizzati sulla base della morfologia degli apparati di sporulazione, rispetto ad isolati rappresentativi di *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, e *A. infectoria*. Le caratteristiche molecolari degli isolati furono determinate mediante analisi RAPD, mediante analisi PCR-RFLP degli spaziatori intergenici nucleari dell'rDNA (IGS), con l'uso di 5 enzimi di restrizione e mediante analisi di sequenza degli spaziatori interni trascritti (ITS) dell'rDNA.

Sulla base delle caratteristiche morfologiche, gli isolati furono distinti in gruppi di specie di *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* e *A. infectoria* dotati di diversa patogenicità nei confronti del pistacchio.

L'analisi RAPD, nella quale furono definiti 136 frammenti polimorfici e l'analisi PCR-RFLP, definirono tre principali raggruppamenti, corrispondenti al gruppo di *A. infectoria*, da un lato, quello di *A. arborescens* dall'altro e un terzo raggruppamento combinato di isolati appartenenti al gruppo morfologico di *A. alternata* e di *A. tenuissima*.

Inoltre, sulla base dell'analisi delle sequenze delle regioni ITS, gli isolati appartenenti al gruppo morfologico di *A. infectoria* (*infectoria species-group*), sono risultati essere filogeneticamente distinti dagli altri gruppi di specie. Gli isolati dei gruppi di specie di *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* invece, rappresentano un gruppo monofiletico nel quale i tre gruppi morfologici non possono essere ulteriormente risolti (Pryor e Michailides 2002). In aggiunta, l'utilizzo di marcatori RAPD è in grado di discriminare alcune specie differenti, come evidenziato da Cooke et al. (1998).

Ceppi patogeni di *Alternaria* isolati da noci e nocciole sono stati confrontati con isolati rappresentativi di *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, e *A. infectoria* utilizzando analisi morfologiche e molecolari. Sulla base delle osservazioni morfologiche del pattern di sporulazione e delle caratteristiche dei conidi, effettuate in condizioni standardizzate, gli isolati sono stati suddivisi in tre gruppi morfologici: il gruppo di *A. alternata*, il gruppo di *A. tenuissima* ed il gruppo di *A. arborescens*.

Le relazioni genetiche fra questi gruppi sono state indagate mediante marcatori AFLP, marcatori ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e sequenze del gene per l'istone H4.

L'analisi dei cluser condotta sui dati ottenuti dai marcatori AFLP, hanno posto *A. alternata* e *A. tenuissima* in un singolo cluster, mentre il gruppo di *A. arborescens* è posto in un *cluster* separato. I dati ricavati dall'ISSR confermano il raggruppamento ottenuto con gli AFLP, eccetto che per tre isolati del gruppo di *A. alternata* che vengono raggruppati nel gruppo di *A. arborescens*.

La sostituzione di base del gene H4 in posizione 77 e in posizione 143, permette di discriminare gli isolati appartenenti al gruppo di *A. arborescens* da quelli che appartengono al gruppo di *A. alternata* e di *A. tenuissima* ma non permette di discriminare, tra loro, questi due gruppi morfologici tra loro. Il risultato ottenuto dalla combinazione dei dati ottenuti dalle tre classi di marcatori, supportano la discriminazione del gruppo morfologico di *A. arborescens*, ma non permettono la distinzione del gruppo morfologico di *A. alternata* dal gruppo di *A. tenuissima*.

La definizione dei tre gruppi morfologici sopra descritti e il fatto che tali gruppi sono stati evidenziati anche in lavori su altri ospiti, indicando la loro riproducibilità morfologica. Tra i tre gruppi, comunque, solo *A. arborescens* rappresenterebbe un gruppo monofiletico. I raggruppamenti evidenziati sono coerenti con quelli ottenuti anche da altri autori, con altri marcatori molecolari, con il profilo dei metaboliti secondari, e con l'analisi RFLP di sequenze IGS (Hong et al., 2005).

L'indicazione che questi tre gruppi morfologici di *Alternaria* a piccole spore catenulate sono associati a deperimenti di noci e nocciole, ma anche di agrumi, pistacchio, mandorle e mele, come indicato da altri autori, rivela che tali gruppi morfologici sono ampiamente diffusi e occupano simili nicchie ecologiche come i tessuti di foglie, frutti o entrambi. Comunque, l'incapacità di associare patogenicità, sviluppo di sintomi, o specificità d'ospite ad uno specifico gruppo morfologico,

impedisce lo sviluppo di criteri diagnostici e la definizione di una esatta nomenclatura per questi *taxa* patogeni di *Alternaria*, nonché della piena comprensione della loro ecologia. Si tratta, secondo gli autori, probabilmente, di *taxa* al confine tra specie e popolazioni di individui.

Sulla base di tali osservazioni, viene emersa la necessità di considerare loci altamente polimorfi per una migliore risoluzione della tassonomia di *Alternaria* (Hong et al. 2006).

Marcatori AFLP sono stati ampiamente utilizzati anche per altre specie, di *Alternaria*, e sono noti lavori che hanno permesso di valutare la variabilità genica di alcune specie, tra le quali isolati di *A. tenuissima* ottenuti da diversi cereali (Gannibal et al. 2007) o di *A. solani* provenienti da diversi ospiti e località; nel caso di *A. solani*, in particolare, i marcatori AFLP hanno evidenziato un certo livello di specificità d'ospite tra patata e pomodoro e un parziale raggruppamento di isolati per provenienza geografica, sebbene l'indagine riveli un'alta variabilità intraspecifica non chiaramente spiegabile. L'utilizzo di marcatori AFLP risulta utile anche per delineare la variabilità di altre specie, non appartenenti al genere *Alternaria*, (Mostert et al., 2006) o la valutazione dell'espressione differenziale di geni regolati dello sviluppo (Bachem et al., 1996) o di geni la cui espressione differenziale sia associata alla produzione o meno di metaboliti secondari, come nel caso della produzione di OTA per la specie *Aspergillus carbonarius* (Botton et al., 2008)

Altri marcatori, di utilizzo differente, sono rappresentati dai marcatori RAMS (*Random Amplified Microsatellite*), impiegati per valutare le diversità genetiche fra gli isolati di *A. solani* in Sud Africa (Van der Waals et al. 2004) e di ceppi endofiti di *A. alternaria* in Cina (Guo et al., 2004) e i marcatori micro satelliti. Questi ultimi, identificati anche per *A. alternata*, possono essere utilizzati negli studi di parentele e genetica di popolazione tra isolati di *A. alternata* e, sulla base della loro capacità di amplificazione anche altre specie di *Alternaria*, possono essere di aiuto anche per delineare le parentele tra queste (Dihn e Hocking, 2006). In altri casi, come quelli isolati per *Alternaria brassicicola* non sono utili per confronti tra specie ma per descrivere la variabilità intraspecifica, in virtù della loro incapacità di amplificare altre specie di *Alternaria* (Avenot et al., 2005).

Scopo del lavoro

Scopo del presente lavoro è quello di mettere a punto un sistema di riferimento basato sull'impiego combinato di marcatori molecolari RAPD per lo studio della variabilità genetica in *Alternaria* cercando la possibilità di giungere alla discriminazione dei gruppi riportati in letteratura abbinata alla differenziazione morfologica.

Materiali e metodi

Isolati fungini utilizzati

La Tabella 48 riporta il prospetto dei 57 isolati impiegati nell'indagine effettuata mediante marcatori RAPD; come nei capitoli precedenti, ogni isolato è distinto sulla base di una sigla e per ognuno è indicato l'anno di isolamento, le specie di appartenenza, definita su base morfologica, la presenza di isolati di dubbia attribuzione su base morfologica e l'indicazione di isolati di riferimento per il gruppo morfologico 3 e 4. Per ulteriori dettagli sull'identità e provenienza degli isolati e degli isoalti di riferimento si rimanda a quanto indicato al capitolo 2, Tabella 30 e 31.

La colonna "atribuzione di gruppo" rappresenta il dato confermato dell'attribuzione morfologica sulla base del profilo molecolare.

Tabella 48. Prospetto dei 57 ceppi di *Alternaria* impiegati nell'indagine.

Sigla isolato	Anno Isolamento	Specie	Isolati dubbi	GR.	Colore dendro	Attribuzione di gruppo.	Rif.
26C	2007	TE		5	26C		
29E	2007	AL/AR	X	3/4	29E	3	
92_1	2006	TE		5	92_1		
121B	2007	AL/AR	X	3/4	121B	3	
141G	2007	AL/AR	X	3/4	141G	3	
174C_1	2007	TE	X	5	174C_1		
182F_1	2007	TE		5	182F_1		
21A	2006	AL		4	21A		
32F	2007	AR		3	32F		
122A	2007	TE		5	122A		
122B	2007	AR		3	122B		
123B_2	2007	AR		3	123B_2		
141B_2	2007	TE	X	5	141B_2		
158B	2007	AR		3	158B		
174D	2006	TE		5	174D		
233D	2006	AR		3	233D		
95	2009	AL		4	95		RIF4
100	2009	SP.		3	100		RIF3
101	2009	SP.		5	101		
102	2009	CE		6	102		
103	2009	YA		7	103		
93	2009	GA		2	93		
94	2009	SP.		1	94		

96	2009	GA		2	96		
97	2009	IN		6	97		
98	2009	MA		5	98		
99	2009	AR		3	99		RIF3
31C_1	2007	TE	X	5	31C_1		
121G_1	2007	TE		5	121G_1		
139C_1	2007	TE	X	5	139C_1		
163I_1	2007	AR		3	163I_1		
42E	2006	AR/AL	X	3/4	42E	3	
70A	2006	AR		3	70A		
148A	2006	TE/AL	X	4/5	148A		
210A	2006	AR		3	210A		
225C	2006	AR		3	225C		
233B	2006	TE		5	233B		
ISV6338	2006	AL		4	ISV6338		RIF4
5B	2006	AR		3	5B		
20A	2006	TE		5	20A		
100A	2006	AR		3	100A		
132C	2006	AL		4	132C		
136D	2006	AR		3	136D		
156G	2007	TE		5	156G		
162E	2007	AR		3	162E		
189C	2007	AL		4	189C		
191B	2007	TE	X	5	191B		
52L_1	2007	AR		3	52L_1		
91_1	2009	AR		3	91_1		RIF3
125B_1	2007	AR		3	125B_1		
156C_1	2007	AR		3	156C_1		
157F_7	2007	TE		5	157F_7		
162B_2	2007	AL/AR	X	3/4	162B_2	4	
173B_2	2007	AL/AR	X	3/4	173B_2	4	
177D_1	2007	AR		3	177D_1		
180G_1	2007	TE		5	180G_1		
191E_1	2007	AL/AR	X	3/4	191E_1	4	

Estrazione del DNA in *Alternaria*

L'estrazione e la purificazione del DNA genomico totale è stata effettuata partendo da colonie cresciute al buio per 7-10 giorni in substrato liquido PDB senza agitazione.

I miceli sono stati recuperati dal substrato per centrifugazione, asciugati con carta sterile e sottoposti ad estrazione del DNA.

I miceli sono stati finemente polverizzati con pestello e mortaio in azoto liquido e l'estrazione è stata effettuata utilizzando il KIT di estrazione DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) seguendo il relativo protocollo consigliato dal produttore.

Gli estratti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Analisi RAPD

La sigla RAPD è l'acronimo di *Random Amplified Polymorphic DNA*. Rispetto alla PCR convenzionale, i marcatori RAPD prevedono l'impiego di un solo *primer* 10-mer (un oligonucleotide decamerico con sequenza casuale, avente generalmente un contenuto di G+C superiore al 60% per massimizzare la specificità di appaiamento), che essendo breve è in grado di trovare molti siti complementari di appaiamento (Barcaccia, 1994; Barcaccia *et al.*, 2000c).

I prodotti di amplificazione sono poi separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio ed evidenziati con un colorante DNA-specifico come il bromuro di etidio: in questo modo è possibile rilevare e fotografare sotto luce UV un modello di bande (*banding pattern*) caratteristico dell'individuo da cui il DNA genomico è stato estratto ed ovviamente funzione della sequenza oligonucleotidica che è stata usata come innesco. I polimorfismi sono in questo caso da attribuire a differenze nelle sequenze nucleotidiche degli inneschi oppure nella dimensione del frammento compreso fra i siti di attacco degli inneschi soggetto ad amplificazione. Il più grosso svantaggio dei RAPD è quello di essere marcatori dominanti in quanto sono incapaci di distinguere i genotipi omozigoti da quelli eterozigoti. Nei marcatori RAPD, infatti, il *locus* eterozigote per il sito di attacco del *primer* produce una sola banda come il *locus* omozigote, anche se il prodotto di amplificazione è teoricamente in quantità minore (infatti il DNA-stampo dell'eterozigote è pari alla metà rispetto all'omozigote). Il polimorfismo in questo caso è di tipo "qualitativo": presenza o assenza della banda. Un altro inconveniente è legato alla possibilità di co-migrazione di frammenti di amplificazione che hanno lo stesso peso molecolare ma che racchiudono sequenze diverse: in questi casi un valido aiuto all'interpretazione dei profili elettroforetici può essere fornito dall'intensità di amplificazione. Tali marcatori, infine, presentano molto spesso problemi di riproducibilità. Data la semplicità di applicazione e la capacità di saggiare un numero elevato di *loci* genomici in tempi contenuti, i marcatori RAPD sono particolarmente utili per lo studio della variabilità genetica nelle popolazioni naturali di specie vegetali (Chong *et al.*, 1995; Triest *et al.*, 2000; Triest, 2001)

Il protocollo di amplificazione è stato effettuato secondo Roberts *et al.* (2000), modificato secondo le indicazioni della Dr.ssa Musetti e Dr. ssa Polizzotto dell'Università di Udine.

I primer considerati sono stati OPR-02, OPR-8, OPR-12, (Roberts et al, 2000) e OPA-9 ed OPA-13 (Cooke et al, 1998); tali primer sono stati scelti sulla base delle loro buone capacità di discriminare diverse specie di *Alternaria*, in particolare nell'ambito dei gruppi morfologici di *A.alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*.

L'analisi RAPD è stata condotta utilizzando 10 ng di DNA genomico in 25 µl di soluzione contenente 200 µM di dCTP, dGTP, dATP e dTTP, 400 nM di primer, 1x PCR-buffer e 0,5 U di *Taq* DNA polimerasi. Il volume finale di 25 µl è stato raggiunto con l'aggiunta di acqua bidistillata sterile.

La reazione di amplificazione ha previsto una denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 36 cicli di denaturazione per 1 minuto a 94°C, 30 secondi di appaiamento a 35°C, una polimerizzazione per 2 minuti a 72°C e una amplificazione finale a 72°C per 8 minuti.

L'elettroforesi è stata effettuata in gel di agarosio all'1% in 0,5x TBE a 100V per circa 3 ore, impiegando un marcatore di peso molecolare da 1Kb (Sibezyme, 1Kb DNA ladder); al termine della corsa elettroforetica le bande di DNA sono state visualizzate tramite esposizione a luce UV su un transilluminatore (Biorad) dopo immersione per circa 45 minuti in una soluzione di GelRED Nucleic Acid Gel Stain in soluzione acquosa al 10%.

Le immagini del profilo elettroforetico sono state acquisite con una fotocamera digitale e utilizzate per la successiva analisi dei profili.

Analisi dei dati

La prima fase di analisi ha riguardato la stesura di documenti di raccolta-dati derivanti dalle letture delle foto delle corse elettroforetiche (RAPD) segnando la presenza-assenza (1-0) delle diverse bande evidenziabili per ogni *primer* secondo una matrice binaria 1/0. Nel caso di polimorfismi dubbi si è adottata la possibilità del "dato mancante" offerta dal software NTSYS-pc2.10. I dati molecolari relativi ai 57 campioni di *Alternaria* sono stati infatti analizzati col programma *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* Versione 2.10 (Rohlf, 1993; 2000) al fine di:

- 1) costruire le matrici di similarità genetica e di distanze genetiche tra i 57 individui analizzati per quantificare le differenze tra i genotipi afferenti allo stesso gruppo evolutivo;
- 2) raggruppare i genotipi simili, indipendentemente dalle osservazioni morfologiche, per costruire un dendrogramma finale (mediante *cluster analysis con UPGMA*) in grado di evidenziare le similarità genetiche esistenti tra gli individui oggetto del presente studio

3) eseguire la definizione dei centroidi mediante analisi delle coordinate principali (PCA) soprattutto per l'attribuzione del gruppo di appartenenza agli isolati in dubbio tra due gruppi.

Ogni banda (marcatore) evidenziata nel gel d'agarosio mediante esposizione a luce UV è stata considerata come un singolo *locus* genico, con due sole forme alleliche (presenza e assenza). In particolare i RAPD sono marcatori di tipo dominante che non permettono la separazione degli omozigoti dagli eterozigoti, ma solamente uno *scoring* di tipo qualitativo, anche se spesso alcuni polimorfismi possono apparire come semi-quantitativi.

I dati molecolari sono stati utilizzati per calcolare i coefficienti di similarità genetica tra i 57 genotipi in tutte le possibili combinazioni a coppie seguendo le formule di Dice (1945), Jaccard e Simple Matching (Rohlf, 1993). In questo modo sono state costruite e confrontate le diverse matrici di similarità genetica derivanti.

L'indice di similarità genetica (GS) di Dice è stato calcolato secondo la formula $GS_{ij} = 2M_{ij} / (2M_{ij} + M_i + M_j)$ dove M_{ij} rappresenta il numero di prodotti di amplificazione comuni alla coppia di individui considerata ovvero presenti sia nell'individuo **i** che in **j**, M_i è il numero di prodotti presenti in **i** ma assenti in **j** e M_j è il numero di prodotti presenti in **j** ma assenti in **i**. Quindi un valore di $GS_{ij} = 1$ sottolinea identità genetica (=cloni) entro la coppia **i** e **j**, mentre $GS_{ij} = 0$ indica una completa diversità tra i due individui (nessun marcatore comune). Questo coefficiente secondo Jaccard vale invece $GS_{ij} = M_{ij} / (M_{ij} + M_i + M_j)$ mentre secondo Simple Matching è necessario considerare anche i marcatori assenti nei due genotipi considerati, N_{ij} , e quindi la formula sarà $GS_{ij} = (M_{ij} + N_{ij}) / (M_{ij} + M_i + M_j + N_{ij})$. Il coefficiente di Dice corrisponde al coefficiente di similarità secondo Nei & Li (1979) vista l'analogia fra le due formule: $GS_{ij} = 2M_{ij} / ((M_{ij} + M_j) + (M_{ij} + M_i))$. La media di tali coefficienti ha permesso di confrontare la similarità genetica tra ed entro i gruppi di genotipi considerati. La similarità genetica è stata ovviamente calcolata sia entro i gruppi (GS_E) che tra i gruppi (GS_T) e fra le matrici ottenute con i tre diversi coefficienti di similarità è stata calcolato il coefficiente di correlazione r . Inoltre, per ogni dendrogramma è stato calcolato il valore cofenetico per saggiarne l'attendibilità.

Risultati e discussione

Le analisi RAPD sono state in grado di fornire polimorfismi genomici riproducibili dei 57 campioni di *Alternaria* analizzati. In particolare sono stati utilizzati 5 primer RAPD che hanno prodotto un totale di 127 marcatori molecolari di cui solo 8 sono risultati monomorfici e ben 23 genotipo-specifici.

Il *primer* più efficiente nella separazione dei gruppi 3 e 4 è risultato OPA-09 che ha mostrato un marcatore di tipo codominante tra questi due gruppi. Questo ha anche permesso di attribuire ai gruppi di appartenenza i genotipi che erano rimasti dubbi tra i gruppi 3 e 4 dopo l'analisi morfologica.

In generale possiamo affermare che l'analisi RAPD non ha permesso di discriminare in maniera netta tutti i sette gruppi di *Alternaria* oggetto di studio, ma solo una parte di essi, come confermato anche in letteratura dove si sottolinea la difficoltà di discriminare con certezza i vari gruppi a livello varietale. Tali marcatori hanno però permesso di indagare la variabilità genetica in *Alternaria* e di confermare alcune affermazioni presenti in letteratura e aggiungere di ulteriori.

Confronto tra i gruppi di *Alternaria* spp.

L'analisi di raggruppamento condotta utilizzando la matrice totale dei coefficienti di similarità genetica (GS) di Dice ha portato alla definizione di un dendrogramma complessivo (Figura 7) in cui è possibile distinguere all'interno dei 57 campioni di *Alternaria* analizzati dei gruppi di individui: il gruppo più definito è quello relativo ai genotipi appartenenti al gruppo morfologico 3 rappresentato da *A. arborescens*, che vengono quasi tutti isolati nel medesimo cluster; per gli isolati appartenenti ai gruppi morfologici 1, 2 e 6 la discriminazione è netta poiché vengono posizionati al di fuori dei raggruppamenti principali; più semplice sembra la discriminazione tra il gruppo 3 e i gruppi 4 e 5 che vengono separati in due sottocluster differenti. Questo primo risultato, comunque, conferma la difficoltà dei marcatori molecolari RAPD nel discriminare in modo netto i genotipi di *Alternaria* a livello di specie, come già riportato in letteratura, poiché nei due sottogruppi principali, gruppo 3 e gruppi 4 e 5, comunque troviamo qualche individuo appartenente agli altri gruppi.

Comunque, le alte correlazioni tra le tre matrici di similarità genetica calcolate secondo tre diversi coefficienti, Dice (1945), Jaccard e Simple Matching (Rohlf, 1993), risultate superiori allo 0.96,

confermano la bontà delle analisi eseguite e quindi evidenziano la similarità tra gli isolati dei vari gruppi; in particolare molto alta è risultata la correlazione tra la matrice GS di Dice e SM con un $r=0,9901$.

Anche gli elevati valori della GS entro e tra i tre gruppi principali (3, 4 e 5) conferma l'elevata omogeneità dei materiali anche se la tecnica molecolare permette una discriminazione abbastanza efficace tra i gruppi 3, 6, 2, 1 e 7 mentre rimane poco efficiente nel differenziare i gruppi 4 e 5, tranne logicamente per il marcatore co-dominante rilevato con il primer OP-A09.

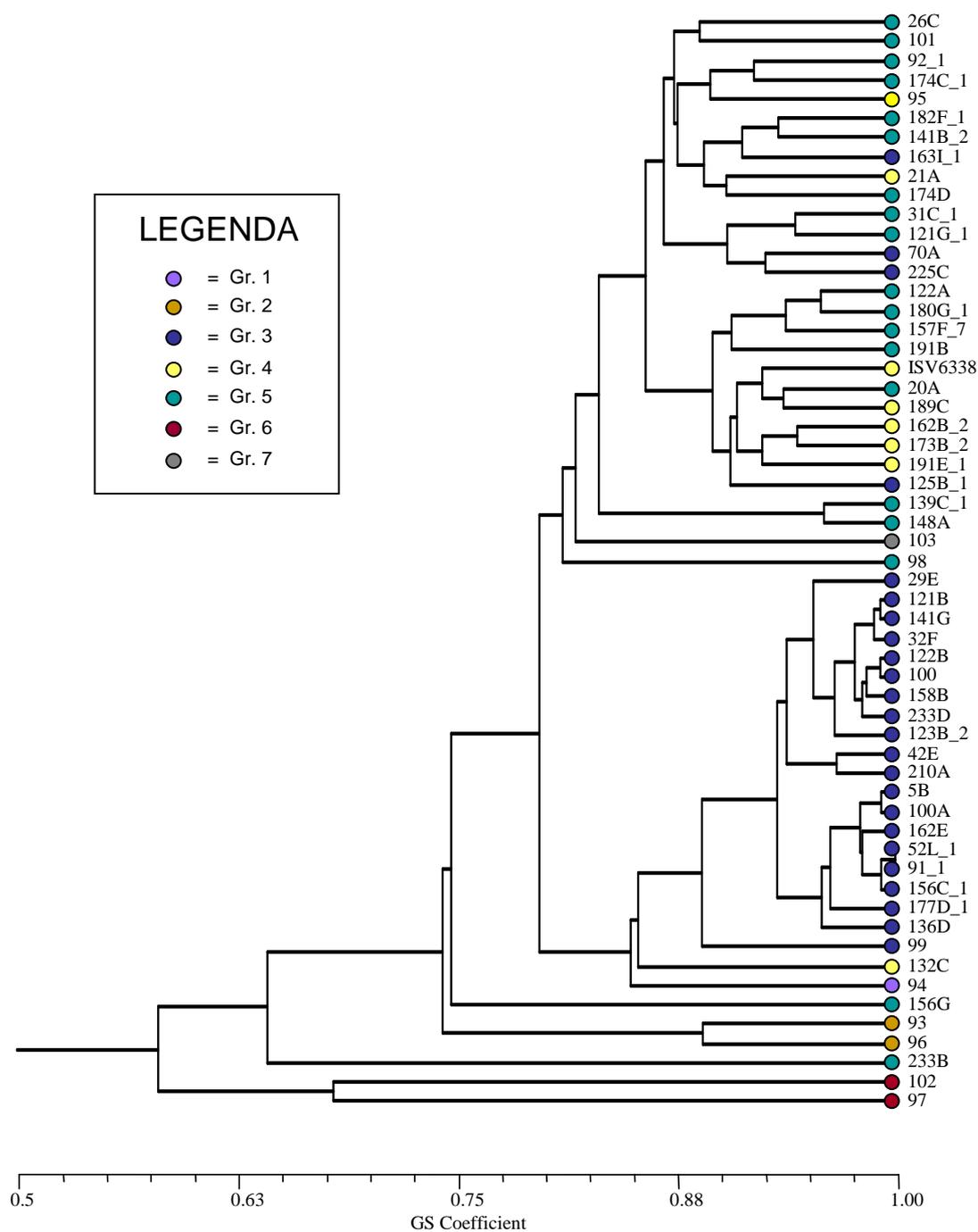


Figura 7. Dendrogramma totale (Coph. Val. = 0,9603) costruito mediante la matrice di similarità genetica calcolata secondo il coefficiente di Dice con colori diversi a seconda del gruppo di appartenenza. Si può notare che i genotipi non vengono separati nettamente rispetto al gruppo di appartenenza: solo il gruppo 3 (blu) risulta più omogeneo ed al 90% viene raggruppato in un suo sottogruppo, mentre i gruppi 4 e 5 sono meno discriminabili, mentre 2 e 6 risultano *Outgroup*.

Nella pagina seguente sono riportati due dendrogrammi totali ottenuti utilizzando due diversi coefficienti di similarità genetica, il primo secondo quello di Dice, l'altro utilizzando il coefficiente di Simple Matching con le rispettive matrici sono di 0,9547 e 0,9603, quindi ottimali.

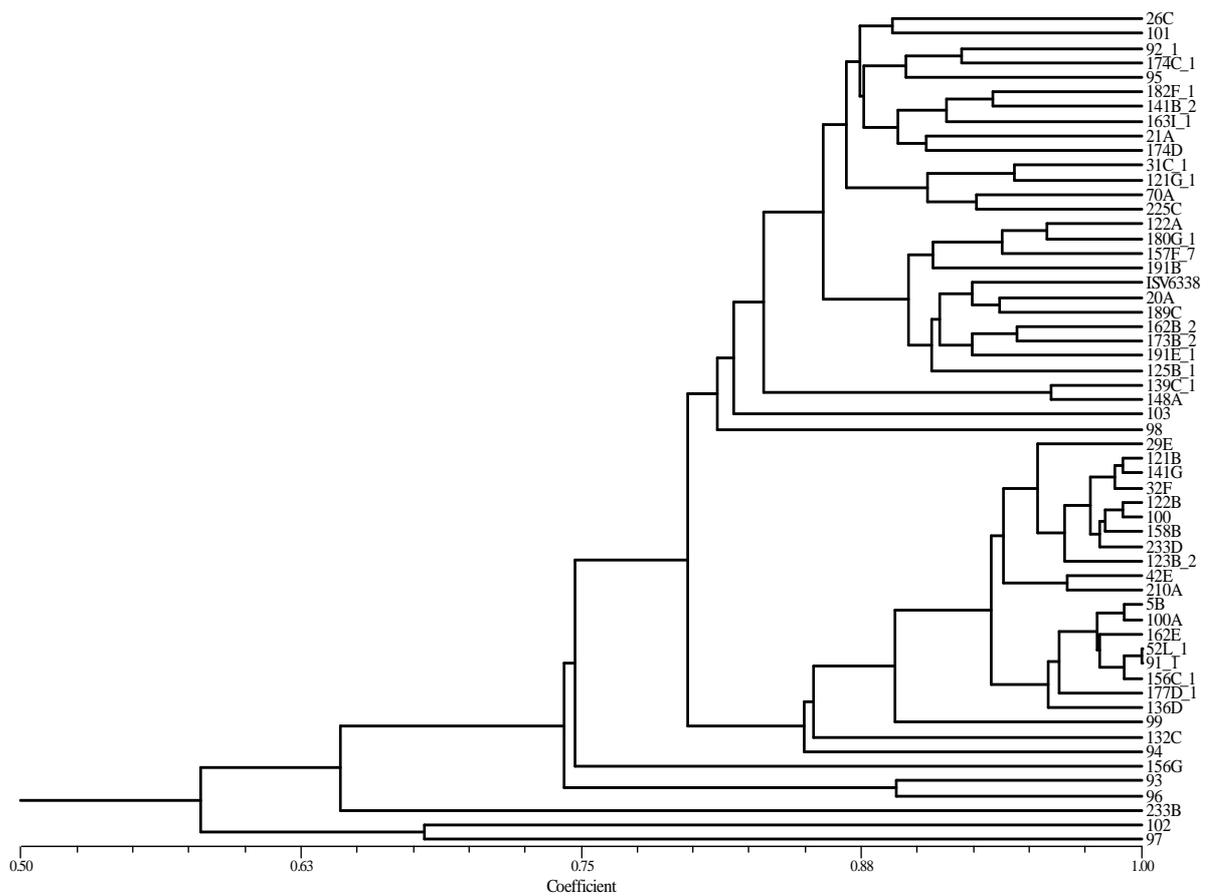
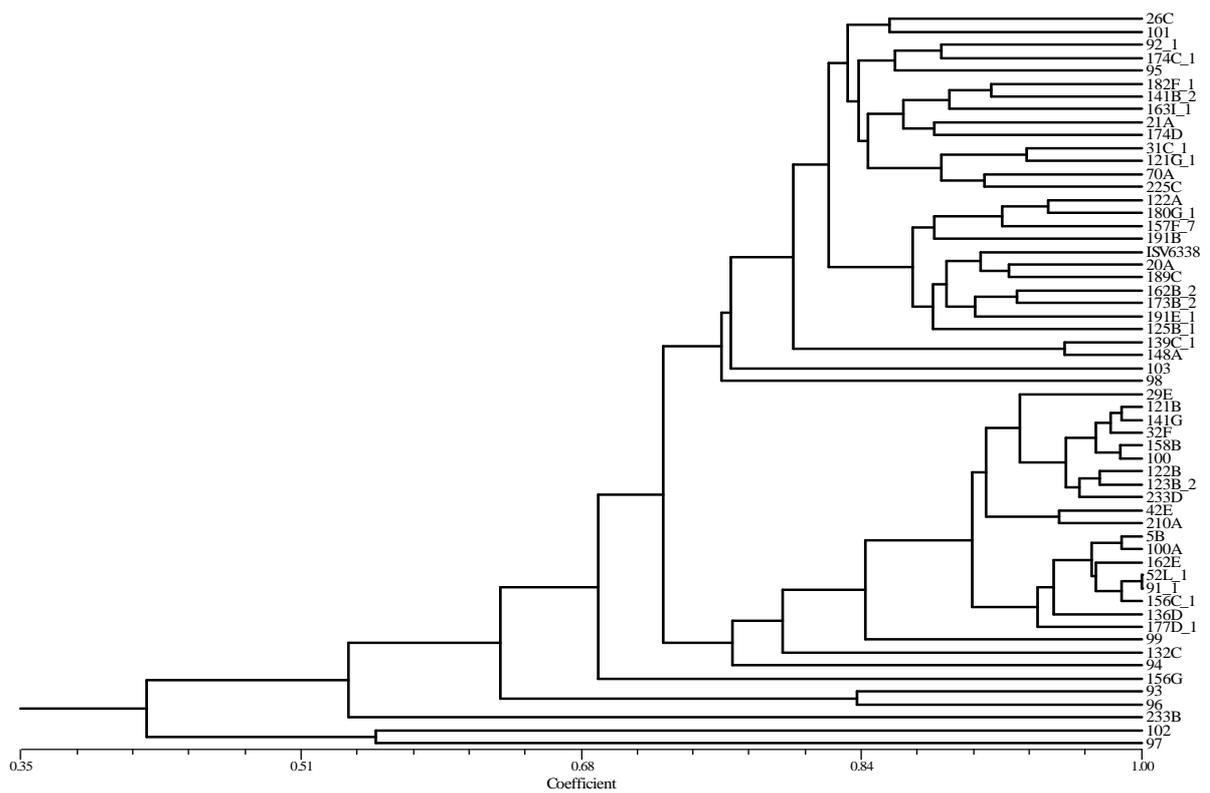


Figura 8. Confronto tra i due dendrogrammi costruiti utilizzando la similarità genetica calcolata secondo Dice e Simple Matching, che risultano perfettamente sovrapponibili.

Alla luce del dendrogramma totale, si è cercato di attribuire il corretto gruppo di appartenenza per gli isolati risultati incerti dopo l'analisi morfologica, come riportato nella tabella dei materiali, in particolare per i genotipi con caratteristiche morfologiche intermedie tra i gruppi 3 e 4. Sono state quindi comparate le analisi molecolari RAPD degli isolati incerti con quelle degli isolati di riferimento (riportati in grassetto), ovvero i genotipi 100, 99 e 91 per il gruppo 3 e i genotipi 95 e ISV6338 per il gruppo 4, definendo centroidi e dendrogramma riportati in Figura 9.

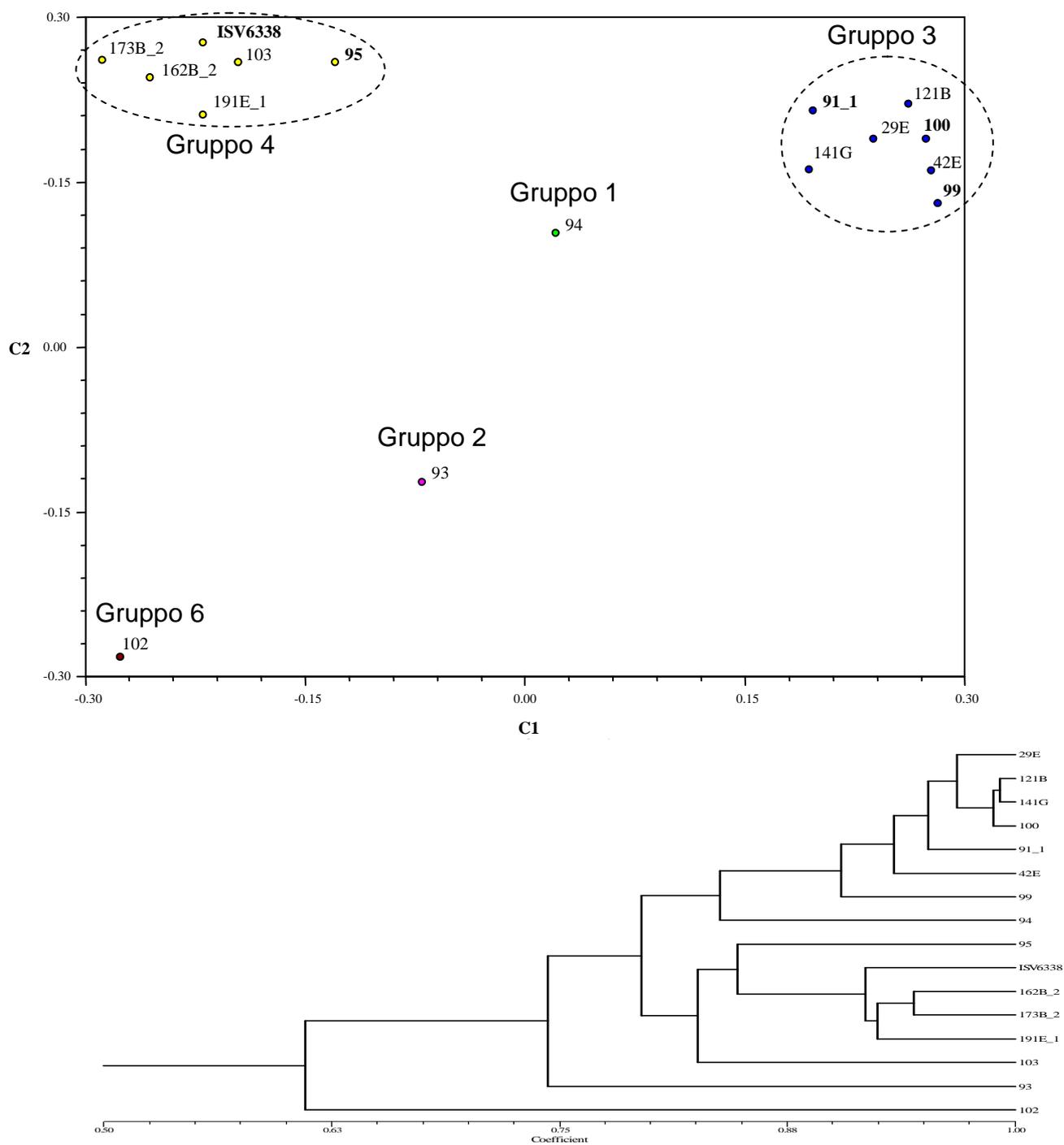


Figura 9. Centroidi e dendrogramma parziale per gli isolati con caratteristiche intermedie tra gruppo 3 e 4. Si nota che i campioni 173B, 162B, 103 e 191E risultano appartenenti al gruppo 4.

Osservando i centroidi e il dendrogramma ottenuto dalla matrice di similarità genetica calcolata secondo il coefficiente SM risulta chiaramente che:

- i genotipi 29E, 121B, 141G e 42E vengono raggruppati assieme ai genotipi di riferimento del gruppo 3, pertanto dal punto di vista molecolare posso essere attribuiti a questo gruppo;
- i genotipi 162B_2, 173B_2 e 191E_1 vengono raggruppati assieme ai genotipi di riferimento del gruppo 4, pertanto dal punto di vista molecolare posso essere attribuiti a questo gruppo;
- i tre genotipi di riferimento per il gruppo 3 presentano comunque una diversità genetica tra loro così come i due riferimenti per il gruppo 4, segno dell'eterogeneità presente all'interno di questo patogeno;
- il genotipo 94 appartenente al gruppo 1 è stato posizionato tra i due clusters 3 e 4; infatti questi tre gruppi sono discriminabili unicamente osservando la prima coordinata e non la seconda, come invece avviene per tutti i gruppi rimanenti.
- i genotipi 103, 93 e 102 appartenenti rispettivamente ai gruppi 7, 2 e 6 sono invece stati posizionati come Outgroup.

Similarità genetica entro e tra i gruppi

Utilizzando il programma NTSYS sono stati calcolati gli indici di similarità genetica entro e fra i diversi gruppi di isolati di *Alternaria*. In particolare, dalla matrice di similarità genetica calcolata secondo il coefficiente di Simple Matching sul totale dei 57 genotipi oggetto di studio, risulta che la GS_{tot} tra i 57 isolati è pari a 0,8068. questo dato conferma che vi è una differenza molecolare tra i materiali, ma è necessario capire come viene distribuita all'interno dei diversi gruppi presenti.

Infatti, calcolando la similarità genetica entro i singoli gruppi, si è notato la maggior eterogeneità genetica è presente nel gruppo 5 ($GS_E=0,8274$) mentre il gruppo al proprio interno geneticamente più omogeneo è quello N. 3 ($GS_E=0,8981$); i dati relativi ai gruppi rappresentati da solo 2 o meno genotipi non sono stati presi in considerazione. Considerando, invece, la similarità entro i tre diversi gruppi principali, quelli geneticamente più simili sono il gruppo 4 e 5 ($GS_T=0,8339$) mentre quelli che risultano più differenti tra loro sono i gruppi 3 e 5 ($GS_T=0,7989$). Logicamente se consideriamo anche i gruppi meno rappresentati e che nel dendrogramma sono stati posizionati come outgroup, avremo che la GS_T dei tre gruppi principali nei confronti degli altri risulta sensibilmente più bassa: per esempio la GS_T fra il gruppo 3 e gli isolati di tipologia 1, 2, 6 e 7 risulta rispettivamente pari a 0,8344, 0,7446, 0,5874 e 0,7807. Facendo lo stesso confronto per il gruppo 4 i valori saranno

rispettivamente di 0,7633, 0,7401, 0,5824 e 0,8096 mentre considerando il gruppo 5 i valori di GS_T saranno 0,7526, 0,7314, 0,5658 e 0,7954. Queste informazioni, pur su un numero minore di genotipi, ci portano a osservare che: i) l'isolato appartenente al gruppo 1 è quello più simile ai genotipi presenti nei gruppi 3 ($GS_T=0,83$) mentre si scosta di più dai gruppi 4 e 5 ($GS_T=0,76$ circa); ii) i due isolati del gruppo 2 sono invece meno simili ai tre gruppi principali con un GS_T attorno allo 0,74; iii) i due isolati del gruppo 6, posti come outgroup, sono molto diversi dai tre gruppi principali mostrando una GS_T media attorno allo 0,58; iv) l'isolato del gruppo 7 risulta abbastanza simile ai tre gruppi principali, in particolare più simile al gruppo 4.

Tabella 49. Similarità genetica (GS) calcolata ENTRO (diagonale) e TRA i tre gruppi principali secondo il coeff. Simple Matching (Rohlf, 1993):

GS entro/tra	Gr. N. 3	Gr. N. 4	Gr. N. 5
Gr. N. 3	0,8981		
Gr. N. 4	0,8254	0,8624	
Gr. N. 5	0,7989	0,8339	0,8274

Il risultato ottenuto si accorda con quanto presente in letteratura, in particolare la buona coerenza tra i gruppi morfologici di specie, definiti in condizioni standardizzate e riproducibili, e la discriminazione delle stesse sulla base dei marcatori RAPD; come evidenziato ripetutamente da numerosi autori, il gruppo di specie di *A. arborescens* è distinto nettamente da quello di *A. alternata* e *A. tenuissima*, che producono, sulla base di differenti tipologie di marcatori molecolari, un *cluster* nel quale gli isolati delle due specie morfologiche si mescolano, senza la possibilità di discriminarle ulteriormente.

Come evidenziato dall'analisi dei *cluster* condotta nella presente indagine, invece, altre specie sono nettamente distinte sulla base del profilo ottenuto dai marcatori RAPD, in particolare le specie appartenenti al gruppo di *A. infectoria* e di *A. gaisen* che si posizionano come *outgroup*, rispetto agli altri isolati considerati.

Conclusioni

Studi effettuati sulla presenza di specie fungine associate ai marciumi secondari del grappolo, in relazione alla presenza di micotossine, sono stati prevalentemente concentrati sulla presenza delle specie di *Aspergillus* appartenenti alla sezioni *Nigri*, in particolare ad *Aspergillus carbonarius*; tale specie rappresenta la principale causa dello sviluppo di ocratossina A nell'uva e nel vino.

In realtà sono numerose le specie fungine che compongono la micoflora del grappolo, e alcune di esse potrebbero rappresentare una potenziale fonte di micotossine.

L'indagine sviluppata nell'ambito di questa ricerca ha avuto come obiettivo fornire un contributo alla comprensione del ruolo del genere *Alternaria* nell'ambito dei marciumi secondari del grappolo.

Il genere *Alternaria*, e in particolare *A. alternata*, è ampiamente diffuso in numerosi ambienti e in numerosi prodotti agricoli, in genere frutta e ortaggi, con perdite quantitative e rilascio di micotossine.

La presenza di *Alternaria* su uva è nota, ma scarsa attenzione ha avuto finora la caratterizzazione del profilo dei metaboliti secondari prodotti dagli isolati presenti su uva e la caratterizzazione a livello specifico degli isolati.

Nel corso di questa indagine, la problematica relativa alla presenza di *Alternaria* su uva, è stata affrontata su quattro livelli: dapprima valutando la micoflora presente sul grappolo di uve provenienti da due ambienti viticoli differenti e su diversi vitigni; in seguito è stata effettuata l'identificazione e la caratterizzazione di alcuni dei ceppi fungini di *Alternaria* sulla base della capacità di produzione di micotossine e valutandone la crescita a differenti temperature. La fase successiva ha riguardato la valutazione dell'effetto di parametri ambientali quali la composizione del substrato e la temperatura sulla crescita e sulla produzione di micotossine. Nella fase conclusiva sono stati impiegati marcatori RAPD con lo scopo di definire la similarità genetica degli isolati e la coerenza tra la caratterizzazione morfologica e quella molecolare.

Le analisi micologiche effettuate hanno confermato la presenza del genere *Alternaria* diffuso in entrambi gli ambienti e nei diversi vitigni indagati; nella contaminazione sono state evidenziate solo lievi differenze.

L'identificazione specifica effettuata su una parte dei ceppi isolati ha permesso, per la prima volta, di evidenziare che *Alternaria alternata* non è la solo specie del genere presente su uva, ma che sono presenti almeno altre 2 specie, *A. arborescens* e *A. tenuissima*, finora mai identificate su tale matrice. Tale aspetto trova sostegno su quanto evidenziato in altri tipi di frutta e ortaggi, in particolare agrumi e frutta a guscio, nei quali sono stati frequentemente isolati gli stessi gruppi di specie evidenziati su uva dal presente lavoro.

La produzione di micotossine da parte degli isolati considerati è stata variabile in relazione alla specie di appartenenza e tra i diversi ceppi, anche in funzione delle diverse condizioni ambientali e del substrato: in particolare, nelle tre specie identificate è stata evidenziata la presenza sia di ceppi fortemente produttori che ipoproduttori o non produttori senza una associazione specie specifica.

Le micotossine prodotte in quantità maggiori sono state AOH e AME mentre ALT è stato prodotto in quantità piuttosto basse e da un numero limitato di isolati fungini.

L'effetto del substrato ha evidenziato che la produzione di micotossine è stata maggiore, nell'ordine, su substrato a base di riso, su DRYES e su succo d'uva. Mentre il dato relativo alla produzione su riso trova conferma con quanto riportato da diversi autori, la minor produzione registrata su succo d'uva rispetto a DRYES non trova riscontro in letteratura poiché lo studio di questi aspetti è ancora poco indagato, sebbene la presenza di *Alternaria* e delle sue tossine su uva sia nota.

La maggior produzione di micotossine è stata registrata a bassi valori di pH, mentre l'accrescimento delle colonie ha mostrato un comportamento opposto.

La produzione di micotossine, in ceppi fortemente produttori, è stata registrata anche in colonie cresciute alla temperatura di 5°C, sebbene la massima produzione sia stata registrata a 15 e a 25°C; la produzione di micotossine in colonie cresciute alla temperatura di 5° è già stata evidenziata in *A. alternata*, ma nella presente indagine tale risultato è stato osservato anche per *A.arborescens* e *A. tenuissima*.

Questa è la prima volta che viene rilevata la produzione di micotossine per queste specie fin dalla temperatura di 5°C.

La caratterizzazione basata sui marcatori RAPD ha permesso di distinguere il gruppo di isolati appartenenti alla specie *A.arborescens*, mentre gli isolati di *A. alternata* e *A. tenuissima* non sono stati chiaramente discriminati tra loro. Tale dato si accorda con quanto evidenziato da numerose ricerche effettuate impiegando diverse classi di marcatori molecolari.

Bibliografia

- AA. VV. 2006. Funghi tossigeni e ocratossina A nelle uve lombarde. Quaderni della ricerca, n° 57, 37 pp.
- Abarca M. L., Accensi F., Bragulat M. R., Castellá G., Cabañes F. J. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. Journal of Food Protection, 66: 504-506.
- Abramson, D., Delaquis, P., Smith, D. 2007. Assessment of ochratoxin A and tenuazonic acid in Canadian ice-wines. Mycotoxin Research, 23 (3): 147-151.
- Abrunhosa L., Paterson R. R., Kozakievic Z. Liman., Venancio A. 2001. Micotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology, 32: 240-242.
- Adachi, Y., Watanabe, H., Tanabe, K., Doke, N., Nishimura, S., Tsuge, T. 1993. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology. 59 (10): 3197-3205.
- Akamatsu, H. 2004. Molecular biological studies on the pathogenicity of *Alternaria alternata* tomato pathotype. Journal General Plant Pathology, 70: 389.
- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H., Kohmoto, K. 1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. Current Genetics, 35: 647-656.
- Akimitsu, K., Kohmoto, K., Otani, H., Nishimura, S. 1989. Host-specific effects of toxin from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. Plant Physiology, 89: 925-931.
- Akimitsu, K., Peever, T.L., Timmer, L.W. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. Molecular Plant Pathology, 4(6): 435-446.
- Andersen, B., Dongo, A., Pryor, B.M. 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani* and *A. tomatophila*. Mycological Research, 112: 241-250.
- Andersen, B., Frisvad, J.C. 2002. Characterization of *Alternaria* and *Penicillium* species from similar substrata based on growth at different temperature, pH and water activity. Systematic and Applied Microbiology, 25: 162-172.
- Andersen, B., Hansen, M. E. and Smedgaard, J. 2005. Automated and unbiased image analyses tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. Phytopathology, 95 (9): 1021-1029.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research, 105 (3): 291-299.

- 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 (2): 170-182.
- Andersen, B., Smedsgard, J., Jørring, I., Skouboe, P., Hagsholm Pedersen, L. 2006. Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 105-111.
- Andersen, B., Thrane, U. 1996. Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Research*, 12: 54-60.
- Andersen, B., Thrane, U., Svendsen, A., Rasmussen, I.A. 1996. Associated field mycobiota on malt barley. *Canadian Journal of Botany*, 74 (6): 854-858.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-group. *Mycological Research*, 106 (2): 170-182.
- Andersen, B., Thrane, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(7) 685-689.
- Avantaggiato, G., De Girolamo, A., Fanelli, C., Ricelli, A. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: metodi di decontaminazione delle derrate. *Informatore Fitopatologico*, 12: 43-49.
- Avenot, H., Dongo, A., Bataillé-Simoneau, N., Iacomi-Vasilescu, B., Hamon, B., Peltiers, D., Simoneau, P. 2005. Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 948-950.
- Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R. S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser R.G.F. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 9(5): 745-753.
- Barata A., Gonzales S., Malfeito-Ferreira M., Querol A., Loureiro V. 2008. Sour rot-damaged grapes are source of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8: 1008-1017.
- Barata A., Seborro F., Belloch C., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2008. Ascomycetous yeast species from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1182-1191.
- Barcaccia, G. 1994. Development, comparability and potential applications of RAPD markers in the genus *Medicago*. *Journal of Genetics and Breeding*, 48: 161-167.
- Barcaccia, G., Lucchin, M., Parrini, P. 2000. Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: fondamenti metodologici. *Sementi Elette*, 5: 5-15.

- Battilani P., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A. 2006. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S53-S60.
- Battilani P., Magan N., Logrieco A. 2006a. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S2-S4.
- Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N. 2006b. Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S72-S82.
- Battilani, P., Logrieco, A. 2006. Difesa della vite e funghi ocratossigeni nella filiera vitivinicola. *Informatore Fitopatologico*, 4: 26-29.
- Battilani, P., Pietri, A. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 639-643.
- Battilani, P., Pietri, A., Pascale, M. 2002. Funghi tossigeni e micotossine nella filiera viti-vinicola. *Informatore Fitopatologico*, 12: 23-27.
- Battilani, P., Silva, A. 2006. Ocratossina A nell'uva potrebbe essere un problema. *L'Informatore Agrario*, 21: 58-61.
- Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A. 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715-722.
- Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Minguéz, S., Cabañes, F. J. 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 125-130.
- Bellí N., Bau M., Marín S., Abarca M. L., Ramos A. J., Bragulat M. R. 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S40-S45.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 839-844.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 72-77.
- Berbee, M. L., Payne, B. P., Zhang, G., Roberts, R.G. 2003. Shared ITS DNA substitutions in isolates of opposite mating type reveal a recombining history for three presumed asexual species in the filamentous ascomycete genus *Alternaria*. *Mycological Research*, 107 (2): 169-182.
- Bisiach M., Minervini G., Zerbetto F. 1986. Possible integrated control of grapevine sour rot. *Vitis*, 25: 118-128.

- Borgo M., Bellotto D., Dal Cortivo G., Lucchetta G., Autiero, F., Perotti M. 2006. Impiego di antibiotritici e ruolo delle tignole dell'uva sullo sviluppo di *Aspergillus* spp. e di *Penicillium* spp. su vite. ATTI Giornate Fitopatologiche, II: 281-288.
- Borgo M., Lucchetta G., Bellotto D., Dal Cortivo G., Bazzo I., Stringher L., Angelini E. 2008. Occurrence of black aspergilli on grapes in Italy and relationship with presence of ochratoxin A in must. Journal of Plant Pathology, 90 (2, Supplement): S2.318.
- Borgo, M. 2006. Rischio ocratossine sulle produzioni vitivinicole. L'Informatore Agrario, 15: 83-86.
- Bottalico, A. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. Informatore Fitopatologico, 12: 11-16.
- Botton, A., Ferrigo, D., Scopel, C., Causin, R., Bonghi, C., Ramina, A. 2008. A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. International Journal of Food Microbiology, 127: 105-115.
- Brandwagt, B.F., Mesbah, L. A., Takken, F.L.W., Laurent, P. L., Kneppers, T.J.A., Hille, J., Nijkamp, H.J.J. 2000. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America), 97 (9): 4961-4966.
- 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.
- Burkhardt, B., Pfeiffer, E., Metzler, M. 2009. Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. Mycotoxin Research, 25: 149-157.
- Burroughs, R., Seitz, L.M., Sauer, D.B., Mohr, H. E. 1976. Effect of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology, 31 (5) 685-690.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguéz, S., Pons, A. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine?. International Journal of Food Microbiology, 79: 213-215.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3): 447-459.
- Castillo, M.D., González, H.H.L., Martínez, E.J., Pacin, A.M., Resnik, S.L. 2004. Mycoflora and potential for mycotoxin production of freshly harvested black bean from the Argentinean main production area. Mycopathologia, 158: 107-112.

- Causin, R., Scopel, C., Grendene, A., Montecchio, L. 2005. An improved method for the detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using SCAR markers. *Journal of Plant Pathology*, 87 (1): 25-35.
- Charudattan, R., Rao K.V. 1982. Bostrycin and 4-deoxybostrycin: two nonspecific phytotoxins produced by *Alternaria eichhorniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (4): 846-849.
- Chen, J., Mirocha, C. J., Xie, W., Hogge, L., Olson, D. 1992. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (12): 3928-3931.
- Chong,D.K.X.,Yeh, F.C.,Aravanopoulos, F.A., Zsuffa, L. 1995. DNA fingerprinting willows (*Salix L.*) using polymerase chain reaction with the M13 universal primer. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 10: 27-31.
- Chou, G.-H., Wu, W.-S. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance if filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106 (2): 164-169.
- Christensen, C.M.,Nelson G.H., Mirocha C.J., Bates, F. 1968. Toxicity to experimental animals of 943 isolates on fungi. *Cancer Reserch*, 28 (11): 2293-2295.
- Christensen, K.B., Van Klink, J.W., Weavers, R.T., Larsen, T.O., Andersen, B., Phipps, R.K. 2005. Novel Chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9431-9435.
- Combina, M., Dalcero, A., Varsavsky, E., Torres, A., Etcheverry, M., Rodriguez, M., Gonzales Quintana, H. 1999. Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour. *Mycotoxin Research*, 15: 33-38.
- Cooke, D.E.L., Forster, J.W, Jenkins P.D., Gareth Jones, D., Lewis, M.D. 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology*, 132: 197-209.
- Cozzi,G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A., Logrieco, A. 2006. Effect of *Lobesia botrana* damages on balck aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S88-S92.
- da Motta, S. D., Valente Soares, L. M. 2001. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Addivities and Contaminants*, 18 (7): 630-634.
- da Motta, S. Valente Soares, L. M. 2000. A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 315-320.

- Dall'Asta, C., Moseriti, A., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R. 2006. Metodi per la determinazione di micotossine negli alimenti. *Informatore Fitopatologico*, 2: 18-22.
- Dancea, Z., Baba, A., Morar, M. V., Catoi, C., Macri, A., Drochner, W., Schollenberger, M. 2004. Occurrence of fungi with mycotoxic potential in grain of Transylvania and potential hazardous effects in broiler chicken. *Mycotoxin Research*, 20: 19-23.
- Daub, M.E., Herrero, S., Chung, K.-R. 2005. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FERMS Microbiology Letters*, 252: 197-206.
- Davis, M. V., Stack, M. E. 1991. Mutagenicity of stemphytoxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1): 180-182.
- Davis, N. D., Diener, U. L., Morgan-Jones, G. 1977. Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. *Applied and Environmental Microbiology*, 34 (2): 155-157.
- de Hoog, G. S., Horré, R. 2002. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses*, 45: 259-276
- Delgado, T., Gomez-Cordoves, C. 1996. Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 731 (1-2) 109-114.
- Delgado, T., Gomez-Cordoves, C. 1998. Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *J Chromatogr A*, 815 (1) 93-97.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., Grove, G. G. 2002. Incidence, aggressiveness and *in planta* interactions of *Botrytis cinerea* and other filamentous fungi quiescent in grape berries and dormant buds in Central Washington State. *Journal of Phytopathology*, 150: 375-381.
- Dugan, F. M., Roberts, R. G. 1994. Etiology of preharvest colonization of bing cherry fruit by fungi. *Phytopathology*, 84 (10): 1031-1036.
- Duncan R.A., Stapleton J. J., Leavitt G. M. 1995. Population dynamics of epiphytic mycoflora and occurrence of bunch rots of grapes as influenced by leaf removal. *Plant Pathology*, 44: 956-965.
- Elena, K. 2006. *Alternaria* brown spot of Minneola in Greece; evaluation of citrus species susceptibility. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 259-262.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2005. Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *Journal of Food Protection*, 68 (7): 1435-1440.

- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2006. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, 23: 634-640.
- Etcheverry, M., Cavaglieri, L., Chulze, S. 1998. Microbial interaction of *Aspergillus parasiticus* and *Bacillus subtilis* with *Alternaria alternata*. Production of alternariol, alternariol methyl ether and tenuazonic acid on sunflower seeds. *Mycotoxin Research*, 14: 2-8.
- Fapohunda, S. O., Olajuyigbe, O.O. 2006. Studies on stored cereal degradation by *Alternaria tenuissima*. *Acta Botanica Mexicana*, 77: 31-40.
- Faretra, F., Pollastro, S. 2001. Muffa grigia e altri marciumi dell'uva. *Informatore Fitopatologico*, 6: 12-14.
- Farooqi, W. A., Malik, M. A., Shaukat, G. A., Ahmad, M. S. 1985. Influence of pH on the growth of *Alternaria citri* on citrus fruit juice. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 98: 214-215.
- Ferreira R. B., Monteiro S., Freitas R., Santos C. N., Chen Z., Batista L. M., Duarte J., Borges A., Texeira A. R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8 (5): 677-700.
- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112: 231-240.
- Gannibal P.B., Klemsdal, S., S., Levitin M.M. 2007. AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernerls and other hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 175-182.
- Gatenbeck, S., Hermodsson S. 1965. Enzymic synthesis of the aromatic product alternariol. *Acta Chemica Scandinavica*, 19 (1): 65-71.
- Giacomelli, L., Boggetti, H., Agnelli, H., Anunziata, J., Silber, J. J., Cattana, R. 1998. Relevant physiochemical factors in chromatographic separation of *Alternaria alternata* mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 370: 79-89.
- Gomi, K., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2003. Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Molecular Biology*, 53: 189-199.
- Griffin, G. F. e Chu, F. S. 1983. Toxicity of *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (6): 1420-1422.
- Guerzoni E., Marchetti R. 1987. Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 571-576.

- Guo, L.-D., Xu, L., Zheng, W.-H., Hyde, K.D. 2004. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Fungal Diversity*, 16: 53-65.
- Hägglom, P. 1987. De novo synthesis of alternariol in conidia *Alternaria alternata*. *Journal of General Microbiology*, 133: 3527-3529.
- Hägglom, P., Unestam, T., 1979. Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (6): 1074-1077.
- Harimoto, Y., Hatta, R., Kodama, M., Yamamoto, M., Otani, H., Tsuge, T. 2007. Expression profiles of genes encoded by the supernumerary chromosome controlling AM-toxin biosynthesis and pathogenicity in the apple pathotype of *Alternaria alternata*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 20 (12): 1463-1476.
- Harwig, J., Scott, P. M., Stoltz, D. R., Blanchfield, B. J. 1979. Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (2): 267-274.
- Hasan, H. A. 1996. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 43(2-3) 125-133.
- Hatta, R., Ito, K., Hosaki Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Tsuge, T. 2002. A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics*, 161: 59-70.
- Hatta, R., Shinjo, A., Ruswandi, S., Kitani, K., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Tsuge, T. 2006. *DNA transposon fossils present on the conditionally dispensable chromosome controlling AF-toxin biosynthesis and pathogenicity of Alternaria alternata*. *Journal General Plant Pathology*, 72: 210-219.
- Hiltunen, M., Söderhäll, K. 1992. Inhibition of polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (3): 1043-1045.
- Hocking A. D., Leong S. L., Kazi B. A., Emmett R. W., Scott E. S. 2007. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape product. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 84-88.
- Hong, S. G., Liu, D., Pryor, B. M. 2005. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. *Mycological Research*, 109 (1): 87-95.
- Hong, S. G., Robert, A., C., Lawrence, C. B., Pryor, B. M. 2005. Alt 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 119-129.

- Hong, S.G., Maccaroni, M., Figuli, P.J., Pryor, B.M., Belisario, A. 2006. Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. *Mycological Research*, 110: 1290-1300.
- Hu, D., Liu, M., Xia, X., Chen, D., Zhao F., Ge, M. 2008. Preparative isolation and purification of alternotoxin I from an *Alternaria* sp. By HSCCC. *Chromatographia*, 67 (11/12): 863-867.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M., Yamamoto, H. 2001. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *MPMI (Molecular Plant-Microbe Interaction)*, 14 (6) 749-757.
- Isshiki, A., Ohtani, K., Kyo, M., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2003. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. *Phytopathology*, 93: 768-773.
- Johnson, L. J., Johnson, R.D., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K., Kodama, M. 2001. Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Current Genetics*, 40: 65-72.
- Johnson, R. D., Johnson, L., Kohmoto, K., Otani, H., Lane, C. R., Kodama, M. 2000. A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of Alternaria blotch of apple. *Phytopathology*, 90 (9): 973-976.
- Johnson, R.D., Johnson, L., Kodama, M., Otani, H., Kohmoto, K. 2000. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *MPMI (Molecular Plant-Microbe Interaction)*, 13 (7): 742-753.
- Kaneko I., Tanaka, A., Tsuge, T. 2000. REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Molecular and General Genetics*, 263: 625-634.
- Kang, H.W., Lee, B.R., Yu, S. H. 2003. Analysis of genetic relatedness in *Alternaria* species producing host specific toxins by PCR polymorphism. *Plant Pathology Journal*, 19(5): 221-226.
- Kang, J.-C., Crous, P.W., Mchau, G.R.A., Serdani, M., Song, S.-M. 2002. Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. Associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, 106 (10): 1151-1162.
- Katsuya, S., Kaneko, I., Owaki, M., Ishikawa, K., Tsujimoto, T., Tsuge, T. 1997. Circular DNA Plasmid in the Phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*: its temperature-dependent curing and association with pathogenicity. *Genetics*, 146: 111-120.
- Kimura, N., Tsuge, T. 1993. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Journal of Bacteriology*, 175 (14): 4427-4435.

- King, A. D., Shade, J. E. 1984. *Alternaria* toxins and their importance in food. *Journal of Food Protection*, 47: 886-901.
- Kretschmer M., Kassemeyer H. H., Hahn M. 2007. Age-dependent Grey Mould Susceptibility and Tissue-specific Defence Gene Activation of Grapevine Berry Skins after Infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 155: 258-263.
- Larsen, T.O., Perry, N.B., Andersen, B. 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron Letters*, 44: 4511-4513.
- Leong S. L., Hocking A. D., Scott E. S. 2006. Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S83-S87.
- Li, F-Q., Toyazaki, N., Yoshizawa, T. 2001. Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from wheater-damaged wheat. *Journal of Food Protection*, 64 (4): 567-571.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., Guo, H. T. 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Journal of Chinese Medicine*, 105: 394-400.
- Lo Curto, R., Pellicanò, T., Vilasi, F., Munafò, P., Dugo, G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticides treatments on grapes. *Food Chemistry*, 84: 71-75.
- Logrieco, A. 2001. Aspetti della contaminazione da funghi tossigeni e micotossine nelle derrate alimentari. *Informatore Fitopatologico*, 6: 55-57.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Solfrizzo, M., Mulè, G. 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*, 82 (4): 501-505.
- Logrieco, A., Solfrizzo, M., Castoria, R. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: filiera orto-frutticola. *Informatore Fitopatologico*, 12: 28-34.
- Logrieco, A., Visconti, A., Bottalico, A. 1990. Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins. *Plant Disease*, 74 (6): 415-417.
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G., Mulè, G. 2007. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 11-16.
- Lucas, G.B., Pero, R.W., Snow, J.P., Harvan, D. 1971. Analysis of tobacco for the *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (6): 1274-1275.

- Ma, Z., Felts, D., Michailides, T.J. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77: 66-74.
- Magan, L., Cacle, G. R., Lacey, J. 1984. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (5): 1113-1117.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M. 2004. Survey of mycotoxins and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 326-331.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, Dalcero, A. 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179-184.
- Makun, H.A., Gbodi, T.A., Akanya, O.H., Salako, E.A., Ogbadu, G.H. 2007. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of biotechnology*, 6 (2): 99-108.
- Marschall, K., Bertagnoll, M. 2006. Patotipo di *Alternaria alternata* agente di maculatura lenticellare su frutti e di necrosi fogliari su melo in Alto Adige. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, II: 93-96.
- Martinez S.P., Snowdon, R., Kühnemann 2004. Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. *European Journal of Plant Pathology* 110: 399-409.
- Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T.L., Timmer, L.W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2005. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both Tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology*, 95 (3): 241-257.
- Mateo R., Medina A., Mateo E. M., Mateo F., Jiménez M. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 79-83.
- McRoberts, N., Lennard, J.H. 1996. Pathogen behaviour and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. *Plant Pathology*, 45: 742-752.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M. 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4696-4702.
- Mercado Vergnes, D., Renard, M.-E., Duveiller, E., Maraite, H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology*, 55 (4): 485-493.

- Meronuck, R. A., Steele, J. A., Mirocha, C. J., Christensen, C. M. 1972. Tenuazonic acid, a toxin produced by *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 23 (3): 613-617.
- Minguez, S., Cantus, J. M., Pons, A., Margot, P., Cabañes, F. X., Masqué, C., Accensi, F., Elorduy, X., Giralt, LL., Vilavella, M., Rico, S., Domingo, C., Blasco, M., Capdevila, J. 2004. Influence of the fungus control strategy in the vineyard on the presence of Ochratoxin A in the wine. *Bulletin O. I. V.*, 77 (885-886): 821-831.
- Misaghi, I. J., Grogan, R. G., Duniway, J. M., Kimble, A. K. 1977. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 68: 29-34.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 439-445.
- Monteiro S., Barakat M., Piçarra-Pereira M. A., Teixeira A. R., Ferreira R. B. 2003. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93 (12): 1505-1512.
- Moretti, A., Corazza, L., Balmas, V., Santori, A., Ritieni, A. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola. *Informatore Fitopatologico*, 12: 17-22.
- Morisseau, C., Ward, B.L., Gilchrist, D.G., Hammock, B.D. 1999. Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* and their relationship to medium composition and host-specific toxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6): 2388-2395.
- Mortimer, D. M., Howell, M. V., Shepherd, M. J. 1988. Investigation of toxic *Alternaria* metabolites potentially present in UK-produced foods. *International Biodeterioration*, 24: 409-415.
- Mostert, L., Abeln, E.C.A., Halleen, F., Crous, P.W. 2006. Genetic diversity among isolates of *Phaemoniella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 35: 453-460.
- Mulè, G., Minervini, F., Susca, A. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: diagnosi e kit molecolari. *Informatore Fitopatologico*, 12: 35-42.
- Muller, M., Lepom, P. 1992. The detection of *Alternaria* mycotoxins in laboratory culture. *Zentralbl Mikrobiol*, 147 (3-4): 197-206.
- Negishi, H., Suyama, K. 2002. *Alternaria* leaf spot on mealycup sage (*Salvia farinacea* Benth.) caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal General Plant Pathology*, 68: 321-325.
- Nei, M., Li, W.H. 1979. Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 76: 5269-5273.

- Ohtani, K., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2002. Sensitivity to *Alternaria alternata* toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing. PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America), 99 (4): 2439-2444.
- Ostrý, V., Škarková, J., Nedelnik, J., Ruprich, J., Moravcova, H. 2005. Occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003. Mycotoxin Research, 21 (1): 23-25.
- Ostrý, V., Škarková, J., Procházková, I., Kubátová, A., Malř, F., Ruprich J. 2007. Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. Czech Mycology, 59 (2): 241-254.
- Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M., Kohmoto, K. 1998. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 52: 285-295.
- Otteneder H., Majerus P. 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. Food Additives and Contaminants, 17 (9): 793-798.
- Overhed, M., Häggblom, P., Söderhäll, K. 1988. Nitrogen Inhibition of mycotoxin production by *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology, 54 (10): 2361-2364.
- Özcelik, S., Özcelik, N., Beuchat, L. R. 1990. Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. International Journal of Food Microbiology, 11 (3-4). 187-194.
- Özcelik, S., Özcelik N. 1990. Interacting effects of time, temperature, pH and simple sugars on biomass and toxic metabolite production by three *Alternaria* spp. Mycopathologia, 109: 171-175.
- Pacin, A. M., Boca, R. T., Gonzáles, H. H. L., Resnik, S. L., Burak, R., Broccoli, A. M., de Souza, J. C. 2002. Natural occurrence of mycotoxins and mycoflora of Argentinien popcorn. Mycotoxin Research, 18: 90-96.
- Pacin, A. M., Broggi, L. E., Resnik, S. L., Gonzáles, H. H. L. 2001. Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Rios Province, Argentina. Mycotoxin Research, 17: 31-38.
- Palacios-Cabrera, H., Hiromi Taniwaki, M., Minoru Hashimoto, J., Castle de Menezes, H. 2005. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. Brazilian Journal of Microbiology, 36: 24-28.
- Patriarca, A., Azcarante, M. P., Terminiello, L., Fernández Pinto, V. 2007. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. International Journal of Food Microbiology, 119: 219-222.

- Pattanamahakul, P, Strange, R.N. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. *Plant Pathology*, 48: 749-755.
- Peever, T.L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibañez, A., Liu, Y.-C., Timmer, L.W. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola Tangelo* and rough lemon in Florida. *Phytopathology*, 89 (10): 851-860.
- Peever, T.L., Ibañez, A., Akimitsu, K., Timmer, L.W. 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 92: 794-802.
- Peever, T.L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L.W. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96 (1): 119-134.
- Pero, R.W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D., Spalding, J.W. 1973. Toxicity of metabolites produced by the "*Alternaria*". *Environmental Health Perspectives*, 4: 87-94.
- Perrone G., Mulè G., Susca A., Battilani P., Pietri A., Logrieco A. 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 484-490.
- Pfeiffer, E., Eschbach, S., Metzler, M. 2007. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotoxin Research*, 23 (3): 152-157.
- Pfeiffer, E., Schmit, C., Burkhardt, B., Altemöller, M., Podlech, J., Metzler, M. 2009. Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether *in vitro*: chemical structures of glucuronides and activates of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mycotoxin Research*, 25: 3-10.
- Piecková, E., Wilkins, K. 2004. Airway toxicity of house dust and its fungal composition. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 67-73.
- Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, 18 (7): 647-654.
- Pollastro, S., Dongiovanni, C., De Miccolis Angelini, R. M., Abbatecola, A., Natale, P., De Guido, M. A., Faretra, F. 2005. Marciumi dell'uva e contaminazione del vino da ocratossina A. *Informatore Fitopatologico*, 4: 15-21.
- Pose, G., Ludemann, V., Segura, J., Fernández Pinto, V. 2004. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by Blackmould in Argentina. *Mycotoxin Research*, 20: 80-86.

- Pozzi, C. R., Braghini, R., Arcaro, J. R., Zorzete, P., Israel, A. L., Pozar, I. O., Denucci, S., Corrêa, B. 2005. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14): 5824-5828.
- Prathibha, V.H., Nanjegowda, D., Nagaraju, N. 2008. Effect of temperature and pH on the growth of different isolates of *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaky and Nishihara on sunflower. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 42(1): 139-142.
- Pryor, B. M. and Gilbertson R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104 (11): 1312-1321.
- Pryor, B. M. and Michailides, T. J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92 (4): 406-416.
- Pryor, B. M., Gilbertson R. L. 2002. Relationship and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. *Mycologia*, 94 (1): 49-61.
- Pulimood, T. B., Corden, J. M., Bryden, C., Sharples, L., Nasser, S., M. 2007. Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120 (3): 610-617.
- Quayyum, H.A., Dobinson, K.F., Traquair, J.A. 2005. Conidial morphology, virulence, molecular characterization, and host-parasite interactions of selected *Alternaria panax* isolates on american ginseng. *Canadian Journal of Botany*, 83: 1133-1143.
- Raistrick, H., Stickings, C.E., Thomas, R. 1953. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*. *Biochemical Journal*, 55: 421-433.
- Ramm, H., Ramm, M., Liebermann, B., Reuter, G. 1994. Studies of the biosynthesis of tentoxin by *Alternaria alternata*. *Microbiology*, 140: 3257-3266.
- Ren, P., Ahearn, D.G., Crow, S.A.Jr. 1998. Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20: 53-54.
- Reuveni M., Sheglov, D., Sheglov, N., Ben-Arie, R., Prusky, D. 2002. Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 421-427.
- Rizzolli, W., Acler, A. 2006. Efficacia di alcuni fungicidi contro l'*Alternaria* del melo (*Alternaria alternata*) ATTI Giornate Fitopatologiche, II: 97-102.
- Roberts, R. G. 2005. *Alternaria yaliinficiens* sp. nov. on Ya Li pear fruit: from interception to identification. *Plant Disease*, 89 (2): 134-145.

- 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(2): 151-160.
- Roberts, R. G., Reymond, S. T., Andersen, B. 2008. *Alternaria cerasidanica* sp. nov., isolated in Denmark from drupes of *Prunus avium*. *Mycotaxon*, IN PRESS.
- Roberts, R.G 2008. *Alternaria roseogrisea*, a new species from achenes of *Helianthus annuus* (sunflower). *Mycotaxon*, 103: 21-26.
- Robiglio, A. L., Lopez, S. E. 1995. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 24 (3): 413-417.
- Rohlf, F.J. 2000. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods. *American Journal of Physical Anthropology* 111: 463-478.
- Rohlf, F.J., 1993. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8. State Univ. Of New York., Stony Brook, NY.
- Romero, S. M., Comerio, R. M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., Fernandez Pinto, V. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 104 (1): 43-49.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. APS PRESS, 326 pp.
- Sacks, L.E., King, A. D. Jr, Schade, J. E. 1986. A note on pH gradient plates for fungal growth studies. *Journal of Applied Bacteriology*, 61: 235-238.
- Sanchez, B., Rodríguez, M., Casado, E.M., Martín, A., Córdoba, J.J. 2008. Development of an efficient fungal DNA extraction method to be used in random amplified polymorphic DNA-PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. *Journal of Food Protection*, 71(12): 2497-2503.
- Scott, P. M. 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International*, 84 (6): 1809-1817.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R. 2001. Stability of *Alternaria* toxins in fruit juice and wine. *Mycotoxin Research*, 17: 9-14.
- Scott, P. M., Lawrence, B. P., Lau, Y. 2006. Analysis of wines, grape juice and cranberry juice for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22 (2): 142-147.
- Scott, P. M., Weber, D., Kanhere, S. R. 1997. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 765: 255-263.
- Serdani, M., Kang, J.C., Andersen, B., Crous, P.W. 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106(5): 561-569.

- Serra R., Mendonça C., Venâncio A. 2006. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation *International Journal of Food Microbiology*, 111: S35-S39.
- Serra, R., Braga, A., Venancio, A. 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156: 515-521.
- Serra, R., Mendonça, C., Venâncio, A. 2006. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 42-47.
- Shephard, G. 2008. Committee on natural toxins and food allergens. *Journal of AOAC International*, 91(1): 1B-16B.
- Simmons, E. G. 1990. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, XXXVII: 79-119.
- Simmons, E. G. 1993. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, XLVIII: 91-107.
- Simmons, E. G. 1993. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, XLVIII: 109-140.
- Simmons, E. G. 1995. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, LV: 55-163.
- Simmons, E. G. 1999. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, LXX: 263-323.
- Simmons, E. G. 1999. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, LXX: 325-369.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre - Utrecht, the Netherlands 775.
- Smedsgaard, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760: 264-270.
- Smedsgaard, J., Frisvad, J.C. 1996. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 5-17.
- Söderhall, K., Svensson, E., Unestam, T. 1978. Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 36 (5): 655-657.
- Solfrizzo, M. 2006. Aspetti tossicologici e detossificazione dell'ocratossina A. *Informatore Fitopatologico*, 2: 14-17.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., van den Bulk, R. 2004. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *Journal of AOAC International*, 87 (1): 101-106.
- Solfrizzo, M., Girolamo, A. D., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., Szopińska, D., Dorna, H. 2005. Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants*, 22 (4): 302-308.

- Stack, M. E., Mislievic, P. B., Roach, J. A., Pohland A. E. 1985 Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *J Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68 (4): 640-642.
- Stack, M. E., Prival, M. J. 1986. Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites Alvertoxins I, II and III. *Applied and Environmental Microbiology*, 52 (4): 718-722.
- Stadler, M., Keller, N.P. 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research*, 112: 127-130.
- Stickings, C.E., Townsend, R. J. 1961. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct.: the biosynthesis of tenuazonic acid. *Biochemical Journal*, 78: 412-418.
- Stinosos, E. E., Bills, D. D., Osman, S. F., Siciliano, J., Ceponis, M. J., Heisler, E. G. 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 960-963.
- Szurdoki, F., Trousdale, E., Ward, B., Gee, S.J., Hammock, B.D., Gilchrist, G. 1996. Synthesis of protein conjugates and development of immunoassays for AAL toxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1796-1803.
- Tanaka, A., Tsuge, T 2001. Reporter gene analysis of AKT3-1 and AKT3-2 expression during conidial germination of the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal General Plant Pathology*, 67: 15-22.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., Fernández Pinto, V. 2006. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22 (4): 236-240.
- Theisen, S., Berger, S. 2005. Screening of epoxide hydrolase producing microorganisms for biotransformation of deoxynivalenol. *Mycotoxin Research*, 21 (1): 71-73.
- Thomas, R. 1961. The biosynthesis of alternariol and its relation to other fungal phenols. *Biochemical Journal*, 78: 748-758.
- Thomma, B. P. H. I. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4): 225-236.
- Tigano, M.S., Aljanabi, S., Marques de Mello, S.C. 2003. Genetic variability of Brazilian *Alternaria* spp. Isolates as revealed by RAPD analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 117-119.
- Tjamos S., Antoniou P. P., Tjamos E. C. 2006. *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S61-S66.

- Torres, A., Gonzales, H. H., Etcheverry, M., Resnik, S. L., Chulze, S. 1998. Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants*, 15 (1): 56-60.
- Tournas, V.H., Katsoudas, E. 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 11-17.
- Tran-Dinh, N., Hocking, A. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for *Alternaria alternata*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (2): 405-407.
- Triest, L. 2001. Hybridization in staminate and pistillate *Salix alba* and *S.fragilis* (*Salicaceae*): morphology versus RAPD. *Plant Systematics and Evolution*, 226: 143-154.
- Triest, L., De Greef, B., De Bondt, R., Van Slycken, J. 2000. RAPD of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba* – *Salix fragilis* complex. *Heredity*, 84: 555-563.
- Tsuge, T. 2003. Studies on pathogenicity genes of *Alternaria alternata*. *Journal General Plant Pathology*, 69: 418-420.
- Tsuge, T., Kobayashi, H., Nishimura, S. 1989. Organization of ribosomal RNA genes in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype, a host-selective AK-toxin-producing fungus. *Current Genetics*, 16: 267-272.
- Vail M. E., Marois J. J. 1991. Grape cluster architecture and the susceptibility of berry to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 11: 1009-1016.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation on ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 196-201.
- van der Waals, J. E., Korsten, L., Slippers, B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 88: 959-964.
- Vercesi, A. 2006. Nuove acquisizioni su botrite e altri marciumi del grappolo. *L'Informatore Agrario*, 15: 76-81.
- Vicent, A., Badal, J., Asensi, M.J., Sanz, N., Armengol, J., García-Jiménez, J. 2004. Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 245-251.
- Visconti, A., Logrieco, A., Bottalico, A. 1986. Natural occurrence of *Alternaria* micotoxins in olives - their production and possible transfer into the oil. *Food Additives and Contaminants*, 3 (4): 323-330.
- Visconti, A., Sibilia, A., Sabia, C. 1992. *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Research*, 8: 9-16.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23: 4407-4414.
- Walton, J.D. 1996. Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell*, 8: 1723-1733.
- Wan, Y., Wang, X., Huang, Y., Qiu, D., Jiang, L. 2008. Identification and characterization of cDNA sequences encoding the *HIS3* and *LEU2* genes of the fungus *Alternaria tenuissima*. *Journal of Genetics and Genomics*, 35: 251-256.
- Wang, H., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Holt, T., Gilchrist, D. G., Dickman, M.B. 1996. Fumonisin and *Alternaria alternata lycopersici* toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 93 (4): 3461-3465.
- Webley, D.J., Jackson, K.L., Mullins, J.D., Hocking, A.D., Pitt, J.I. 1997. *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 1249-1255.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 22: 6531-6535.
- Yamagishi, D., Otani, H., Kodama, M. 2006. G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *MPMI (Molecular Plant-Microbe Interaction)*, 19 (11): 1280-1288.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.
- Zimmerli B., Dick R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13: 655-668.
- Zoecklein B. W., Williams J. M., Duncan S. E. 2001. Effect of sour rot on the composition of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Small Fruits Review*, 1 (1): 63-77.
- Zur, G., Shimoni, E., Hallerman, E., Kashi, Y. 2002. Detection of *Alternaria* Fungal Contamination in Cereal Grains by a Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Journal of Food Protection*, 65 (9): 1433-1440.