



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS A LA
INDUSTRIA



ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS
PRESENTES EN UVA PARA VINIFICAR CON
SÍNTOMAS DE PODREDUMBRE DE LA REGIÓN
VITIVINÍCOLA DE SAN RAFAEL

“TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO DE LICENCIADO EN ENOLOGÍA”

Apellido y nombre del autor: Zamora, Fabio Alberto

Apellido y Nombre del Director de Tesis: Morata, Vilma Inés

Apellido y Nombre del Codirector de Tesis: Prendes, Luciana Paola

6 de septiembre del 2022

**ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES
EN UVA PARA VINIFICAR CON SÍNTOMAS DE
PODREDUMBRE DE LA REGIÓN VITIVINÍCOLA DE
SAN RAFAEL**

Zamora Fabio Alberto

La presente tesis fue aprobada por:

| | |
|---------------------------------|-------|
| Nombre y Firma (Evaluador/a 1) | Fecha |
| Nombre y Firma (Evaluador/a 2)) | Fecha |
| Nombre y Firma (Evaluador/a 3) | Fecha |
| Director/a de Tesis | Fecha |
| Codirector/a de Tesis | Fecha |

**FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS A LA INDUSTRIA-
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO, SAN RAFAEL MENDOZA,
2022.**

AGRADECIMIENTOS

En especial quiero agradecer a mi directora y codirectora de tesis Vilma Morata de Ambrosini y Luciana Prendes por brindarme sus conocimientos y guiarme en el transcurso de esta tesis.

A la Dra. María Gabriela Merín, del laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Aplicadas, UNCuyo, por su contribución en la identificación molecular de las levaduras aisladas de uva con síntomas de podredumbre.

Al Dr. Ariel Fontana y la Ing. Susana Ferreyra, del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), por su contribución en el análisis de ATe de las muestras de uva con podredumbre.

Al Ing. Gustavo Vega, profesor de la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, UNCuyo, por poner a disposición las muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre.

A todos mis profesores de la Licenciatura en Enología por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

A Cooperativa Vitivinícola Goudge por el constante apoyo durante el transcurso de la tesis, en especial a Pablo Gimenez y a los Enólogos Fabian Sosa y Nestor Martinez.

A la Facultad de Ciencias Aplicada a la Industria por brindarme el espacio para el desarrollo de mi tesis.

A Juan Manuel Tapia, por enseñarme sus valores y ser un ejemplo de persona.

A mi familia, por el apoyo incondicional.

A Georgina Scollo, por ser mi compañera de vida.

A mis compañeros de la Facultad, Federico, Luciano, German, Carina y Sebastián.

A Marcela Villalón, por mostrarme lo linda que es la enología. Desde el cielo seguro nos acompañas en cada vendimia.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 19 |
| 3.1 Determinación de la población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael | 19 |
| 3.1.A Medios de cultivo y soluciones..... | 19 |
| 3.1.1 Muestreo | 20 |
| 3.1.2 Procesamiento, incubación y conteos microbiológicos..... | 21 |
| 3.1.3 Análisis estadístico..... | 22 |
| 3.2 Aislamiento e identificación de hongos filamentosos y levaduras a nivel de género y especie..... | 23 |
| 3.2.A Medios de cultivo y soluciones..... | 23 |
| 3.2.1 Aislamiento y almacenamiento de hongos filamentosos y levaduras | 23 |
| 3.2.2 Identificación de hongos | 24 |
| 3.2.3 Identificación de levaduras | 27 |
| 3.2.4 Reacciones de PCR..... | 27 |
| 3.2.5 Cortes con enzimas de restricción..... | 28 |
| 3.3 Evaluación de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael | 28 |
| 3.3.A Reactivos y soluciones | 28 |
| 3.3.1 Extracción de ácido tenuazonico en uvas | 29 |
| 3.3.2 Detección y cuantificación de ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV | 30 |
| 3.3.3 Análisis estadístico..... | 31 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 32 |
| 4.1 Detección y diferenciación de los microorganismos presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael | 32 |
| 4.2 Aislamiento e identificación de los hongos filamentosos y levaduras presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael..... | 35 |
| 4.3 Evaluación de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael. | 42 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 44 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Descripción | Pág. |
|---------|---|------|
| Tabla 1 | Superficie cultivada y cantidad producida (toneladas) de las principales variedades de vid de la región vitivinícola de San Rafael durante el año 2020 | 7 |
| Tabla 2 | Enfermedades de la vid presentes en el campo | 8 |
| Tabla 3 | Hongos Filamentosos que integran la podredumbre de racimos | 10 |
| Tabla 4 | Variedad y fecha de recolección de las muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre durante la vendimia 2017 | 21 |
| Tabla 5 | Clave general para identificación morfológica de hongos de deterioro | 25 |
| Tabla 6 | Población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias (UFC/mL) en muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre pertenecientes a diferentes zonas de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017. | 34 |
| Tabla 7 | Porcentaje de los diferentes géneros fúngicos en cada muestra de uva para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017. | 38 |
| Tabla 8 | Porcentaje de las diferentes especies de levaduras en cada muestra de uva para vinificar con síntomas de podredumbre obtenida de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017. | 41 |
| Tabla 9 | Cuantificación de ácido tenuazónico (ATe) en muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre de las diferentes zonas de la región vitivinícola de San Rafael, vendimia 2017. | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Descripción | Pág. |
|-----------|--|------|
| Figura 1 | La vid y el vino en el antiguo Egipto | 3 |
| Figura 2 | Diagrama del tamaño de la baya de uva y los principales compuestos en cada fase de desarrollo | 4 |
| Figura 3 | Región vitivinícola de San Rafael | 6 |
| Figura 4 | Abundancia o densidad relativa (%) de los 4 géneros fúngicos relevantes encontrados en uvas Malbec a tiempo de cosecha durante las vendimias 2011 y 2012 (en INTA Rama Caída de la DOC San Rafael) y durante la vendimia 2013 en toda la DOC San Rafael. | 13 |
| Figura 5 | Abundancia relativa (%) de cada levadura epífita o especie de levadura encontrada durante las añadas 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec de la región vitivinícola San Rafael. | 16 |
| Figura 6 | Localización espacial de las muestras de uvas de distintas variedades con síntomas de podredumbre recolectada en la región vitivinícola San Rafael, vendimia 2017. | 20 |
| Figura 7 | Esquema de la preparación de diluciones de cada muestra e inoculación en placas de Petri con los medios apropiados (DRBC, GYC, M.R.S. -20% zumo de uva) | 22 |
| Figura 8 | Representación esquemática del régimen de siembra utilizado para cultivar los aislados fúngicos y posterior identificación. | 24 |
| Figura 9 | Esquema de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ADNr de levaduras. | 27 |
| Figura 10 | Esquema de trabajo método de extracción de ácido tenuazónico de uvas basado en QuEChERS | 30 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 11 | Grupos microbianos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) presentes en los medios selectivos y/o diferenciales a partir de la siembra de 100 μ L de diluciones de las muestras | 32 |
| Figura 12 | Gráfico Biplot de los 2 primeros componentes principales de las UFC/mL de hongos filamentosos, levaduras, bacterias acéticas y lácticas. | 35 |
| Figura 13 | Microscopía óptica (400x) correspondiente a los géneros fúngicos <i>Penicillium</i> (con lactofucsina), <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Cladosporium</i> . | 37 |
| Figura 14 | Porcentaje de los géneros fúngicos presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017. | 37 |
| Figura 15 | Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación por PCR de la región génica ITS1-5.8-ITS2 de levaduras y posterior restricción mediante las enzimas <i>Cfo</i> I, <i>Hae</i> III y <i>Hinf</i> I. | 39 |
| Figura 16 | Porcentaje de las especies de levadura presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre cosecha 2017. | 40 |

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución”.

Firma del Candidato

RESUMEN

ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN UVA PARA VINIFICAR CON SÍNTOMAS DE PODREDUMBRE DE LA REGIÓN VITIVINÍCOLA DE SAN RAFAEL

En Argentina, entre las podredumbres cuya afección está centrada en el racimo y que influyen principalmente en la calidad de mostos y vinos, se ha descrito la podredumbre gris y noble, la podredumbre de los racimos y la podredumbre ácida. Los microorganismos que las provocan son primariamente, aunque no exclusivamente, fúngicos y en muchos casos complejas asociaciones de los mismos que dependen de la región vitivinícola considerada. Asimismo, algunos de los hongos filamentosos involucrados también tienen el potencial de producir micotoxinas nocivas para la salud humana. El objetivo general del presente trabajo fue estudiar los microorganismos presentes en uva para vinificar con síntomas de podredumbre en la región vitivinícola de San Rafael. Para ello se utilizaron 17 muestras de uva para vinificar (cv. Bonarda, Malbec, Cabernet S., Cereza, Syrah, Criolla y Torrontés) que presentaron síntomas de podredumbre a tiempo de cosecha durante el año 2017 y se les realizó un análisis microbiológico mediante recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL en medios diferenciales. Los hongos filamentosos aislados fueron identificados morfológicamente a nivel de género y las levaduras aisladas fueron identificadas a nivel de especie mediante la técnica PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 del gen ARNr. Asimismo, se determinó la incidencia natural de ácido tenuazónico (ATe), micotoxina producida por el género *Alternaria*, mediante la metodología de QuEChERS, seguida de cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV. Como resultado, se obtuvieron hongos filamentosos, levaduras y bacterias (acéticas y lácticas) a partir de las uvas con podredumbre. El género fúngico mayoritario resultó *Alternaria* (77,9%), seguido por *Penicillium* (10,9%), *Aspergillus* (9,9%), *Cladosporium* (1,3%), *Phoma* (0,03%) y un 0,01 % que no pudo ser identificado. Mientras que la especie de levadura *Metchnikowia pulcherrima* (27,0%) fue seguida por *Aureobasidium pullulans* (23,0%), *Zygosaccharomyces bailii* (14,2%), *Hanseniaspora uvarum* (9,9%), *Hanseniaspora viniae* (8,9%) y *Hanseniaspora guillermondii* (8,8%) y un 8,2% que no pudo ser identificado. Asimismo, se determinó que el 94% de estas muestras presentaba contaminación con ATe (10 a 1396 µg/kg) y se encontraron diferencias significativas entre las diferentes variedades de uva para vinificar, zonas muestreadas y tiempos de cosecha (LSDfisher, $p < 0.05$). Como conclusión, las uvas para vinificar con podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael muestran una alta incidencia y/o diversidad de microorganismos y representan un elevado riesgo toxicológico debido a la presencia de ATe.

Palabras Clave: uvas para vinificar con podredumbre- microorganismos- ácido tenuazónico.

ABSTRACT

STUDY OF THE MICROORGANISMS PRESENT IN WINE GRAPES WITH ROTTING SYMPTOMS FROM SAN RAFAEL WINE REGION

In Argentina, among the rots whose affection is centered on the bunch and which mainly influence the quality of musts and wines, gray and noble rot, bunch rot and acid rot have been described. The microorganisms that cause them are primarily, although not exclusively, fungal and in many cases complex associations that depend on the wine region considered. Some of the filamentous fungi involved also have the potential to produce mycotoxins harmful to human health. The general objective of this work was to study the microorganisms present in rotten wine grapes from the wine region of San Rafael. For this purpose, 17 samples of rotten wine grapes (cv. Bonarda, Malbec, Cabernet S., Cereza, Syrah, Criolla y Torrontés) were collected at harvest time during 2017 year and microbiological analysis were carried out by counting colony forming units (CFU) per mL on differential media. The isolated filamentous fungi were morphologically identified at genus level and the isolated yeasts were identified at species level by PCR-RFLP technique of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rRNA gene. The natural incidence of tenuazonic acid (TeA), mycotoxin produced by the *Alternaria* genus, was determined using the QuEChERS methodology, followed by high-efficiency liquid chromatography with UV detection. As a result, filamentous fungi, yeasts and bacteria (acetic and lactic acid) were obtained from the rotten samples. The main fungal genus was *Alternaria* (77.9%), followed by *Penicillium* (10.9%), *Aspergillus* (9.9%), *Cladosporium* (1.3%), *Phoma* (0.03%) and 0.01% that could not be identified. While the yeast species *Metchnikowia pulcherrima* (27.0%) was followed by *Aureobasidium pullulans* (23.0%), *Zygosaccharomyces bailii* (14.2%), *Hanseniaspora uvarum* (9.9%), *Hanseniaspora viniae* (8.9 %) and *Hanseniaspora guillermondii* (8.8%) and 8.2% that could not be identified. It was determined that 94% of these samples were contaminated with TeA (10 to 1396 µg/kg) and significant differences were found between different wine grape varieties, sampled areas and harvest times (LSDfisher, $p < 0.05$). In conclusion, rotten wine grapes from San Rafael wine region show a high incidence and/or diversity of microorganisms and represent a high toxicological risk due to TeA presence.

Keywords: rotten wine grapes - microorganisms- tenuazonic acid.

1. INTRODUCCIÓN

La producción comercial de vino depende casi exclusivamente de la vid europea *Vitis vinífera*, una planta vigorosa y perenne, capaz de resistir el estrés ambiental durante su crecimiento en las regiones templadas del mundo. En un contexto actual de cambio climático (clima más cálido, olas de calor, aumento de las precipitaciones y sequía) fomentar una vitivinicultura sostenible resulta un eje estratégico para la Organización Internacional de la Viña y el Vino. En particular, la Argentina se encuentra en el 7º puesto a nivel mundial entre los países productores de uva para vinificar (22.248.266 quintales) y de vino (12,5 millones de hectolitros) (INV, 2021). La actividad vitivinícola forma parte de las “economías regionales” de una notable importancia desde el punto de vista federal y estratégico. La región vitivinícola de San Rafael, ubicada al sur de la provincia de Mendoza, por su producción y calidad en los vinos se ha transformado en una de las principales de Argentina.

El incremento de las precipitaciones antes o durante la vendimia conduce a aumentos en el desarrollo de enfermedades en la vid, particularmente de aquellas que afectan su fruto que resultan las más destructivas en términos de calidad y composición del vino. En Argentina, bajo el nombre de podredumbres, se indica principalmente un tipo de sintomatología que involucra a cuatro enfermedades, cuya afección está centrada en el racimo y que influyen en la calidad de mostos y vinos. Ellas son: podredumbre gris y podredumbre noble (que tienen como agente patógeno a *Botrytis cinerea*), podredumbre de los racimos (causada por un complejo etiológico donde intervienen principalmente hongos como *B. cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Rhizopus negricans*, *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum* así como algunas levaduras y bacterias) y por último la podredumbre ácida (producida por levaduras y bacterias, fundamentalmente acéticas). Si bien todos estos organismos contribuyen al desarrollo de la sintomatología de podredumbre, los de origen fúngico (hongos filamentosos y levaduras) serían los primarios y dependerían de la región vitivinícola considerada. Actualmente, la adición de fungicidas orgánicos y/o químicos es utilizada como una herramienta de rutina para el control de organismos que atacan a la vid pudiendo también bajo ciertas condiciones propicias atacar su fruto como *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* y *Stereum necator*. No obstante, estos tratamientos pueden resultar ineficaces si son otros los agentes causales de podredumbre por lo que resulta importante su estudio en pos de desarrollar una estrategia más precisa a la hora de prevenirlos.

Por otra parte, algunos de los hongos que pueden producir podredumbres y/o ser invasores secundarios, también tienen el potencial de producir micotoxinas nocivas para la salud humana. Durante estudios previos realizados en el laboratorio de biotecnología (FCAI-UNCuyo) se determinó que el género fúngico *Alternaria* es el principal componente de la microbiota de uvas

para vinificar sanas en la región vitivinícola de San Rafael, así como que presenta una gran capacidad toxicogénica y patogénica en uva. Una de sus micotoxinas, ácido tenuazónico, fue detectada naturalmente en diferentes variedades de uva para vinificar de la misma región durante 2 años consecutivos. Siendo que la exposición de toxinas de *Alternaria* está vinculada a una gran variedad de efectos adversos para la salud humana y animal, resulta importante evaluar la incidencia de las mismas en uvas con síntomas de podredumbre.

Como **hipótesis** de trabajo se planteó que existe una población de microorganismos, especialmente de hongos filamentosos y levaduras, característica de uvas con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael y que las uvas para vinificar con síntomas de podredumbre presentan contaminación con toxinas de *Alternaria*.

El objetivo **general** del presente proyecto fue estudiar los microorganismos presentes en uva para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael con especial interés en hongos filamentosos y levaduras, así como evaluar la incidencia natural de toxinas de *Alternaria* en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre.

Los objetivos **específicos** fueron:

- a-Determinar la población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael.
- b- Aislar e identificar hongos filamentosos y levaduras a nivel de género y especie.
- c- Evaluar la presencia de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael.

2. MARCO TEÓRICO

2.1) El vino y la importancia de la uva para vinificar

La historia del vino es paralela a la de la civilización, los historiadores creen que se remonta al Cáucaso y la Mesopotamia alrededor del año 6000 antes de Cristo. Desde allí se integró en las diversas culturas del viejo mundo. Fue recién en el siglo XVI, que los exploradores europeos lo introdujeron al continente americano. En 1530, los conquistadores españoles plantaron *Vitis vinífera* en México, Argentina, Perú y Chile. Ya en el siglo XX, la oficina internacional de la viña y el vino (OIV) en París, reportaba 8 millones de hectáreas de viñedos distribuidos en el mundo, mayormente concentrados en las zonas templadas, cada uno de ellos reflejo del *terroir*, la historia, cultura y tradición propias de la región a la que pertenecen (Pretorious, 2000). Hoy en día, el vino se ha convertido en un sinónimo de cultura y convive con nuestro estilo de vida alrededor del mundo, siendo un perfecto complemento de la gastronomía, el entretenimiento y el arte (OIV, 2016).



Figura 1. La vid y el vino en el antiguo Egipto

La producción comercial de vino depende casi exclusivamente de la vid europea *Vitis vinífera*, una planta vigorosa y perenne, capaz de resistir el estrés ambiental durante su crecimiento en las regiones templadas del mundo (Steel et al., 2013). La vid tiene requerimientos climáticos bien determinados; es una planta exigente en calor y sensible a las heladas de invierno y de primavera, no solamente para su desarrollo vegetativo, sino para la maduración de sus frutos, que precisan iluminación y temperaturas adecuadamente altas (Hidalgo, 1993). En un contexto actual de cambio climático (clima más cálido, olas de calor, aumento de las precipitaciones y sequía) fomentar una vitivinicultura sostenible resulta un eje estratégico para la Organización Internacional de la Viña y el Vino (Paterson et al., 2018; OIV, 2019). Es importante destacar el protagonismo de la uva en todo el proceso vitivinícola. Este protagonismo es evidente ya

que constituye la materia prima de todo el proceso, pero paradójicamente, le hemos prestado muy poca atención a la uva y ha sido el vino el que ha adquirido, generalmente, todo el protagonismo. Existe una máxima o axioma en enología según el cual de una uva buena puede hacerse un vino bueno o un vino malo, según las condiciones de elaboración, pero de una uva mala nunca podrá hacerse un buen vino (Martínez de Toda, 2008).

La uva es un fruto en baya; por eso se habla, indistintamente, de uva o de baya para referirnos al fruto de la vid. El desarrollo de las bayas se realiza a lo largo de dos fases principales que son el crecimiento herbáceo de la baya y la maduración, separadas por una fase muy corta que se denomina envero (Fig. 2) (Martínez de Toda, 2008).

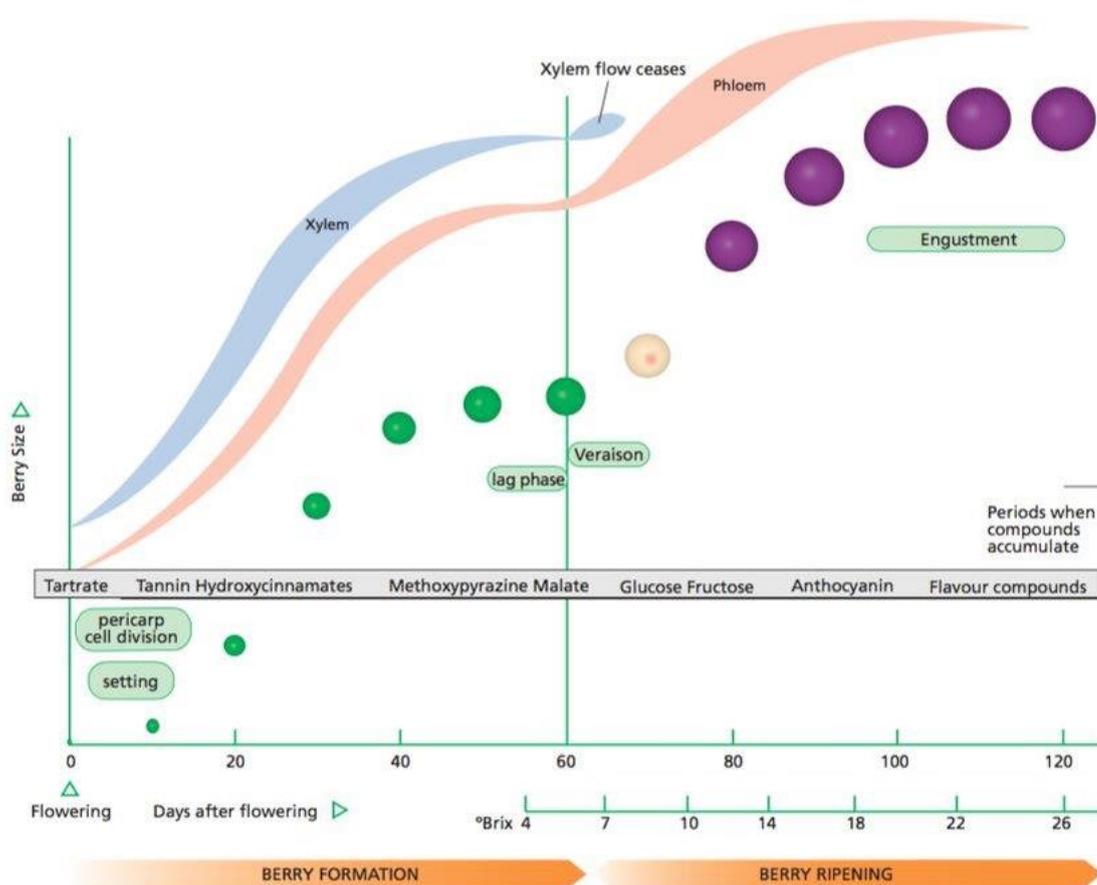


Figura 2. Diagrama del tamaño de la baya de uva y los principales compuestos en cada fase de desarrollo (Kennedy J., 2002).

El crecimiento herbáceo de la baya comienza con el crecimiento del ovario, generado por el polen durante su germinación. Desde la fecundación, el ovario se desarrolla por multiplicación celular, que se detiene a partir de la 3er semana, a partir de allí, la baya va a crecer únicamente por aumento del tamaño celular (Martínez de Toda, 2008).

Al final de la fase de desarrollo herbáceo llega un momento en que la baya, anteriormente dura y de color verde, se ablanda y se vuelve traslúcida en variedades blancas o se colorea en variedades tintas; este proceso se conoce con el nombre de “envero”. Durante la fase de desarrollo herbáceo las bayas presentan un pequeño contenido en azúcares, pero en el envero se produce un incremento brusco de dicho contenido, se lleva a cabo una movilización rápida desde las reservas acumuladas en formas de almidón en diferentes partes de la planta (Martínez de Toda, 2008). Los enólogos son conscientes de que la fruta dañada conduce a vinos de mala calidad, y su primera preocupación es obtener uvas sanas en condiciones óptimas de maduración.

2.2) La región vitivinícola de San Rafael

La Argentina se encuentra en el 7º puesto a nivel mundial entre los países productores de uva para vinificar (22.248.266 quintales) y de vino (12,5 millones de hectolitros) (INV, 2021).

La actividad vitivinícola forma parte de las “economías regionales” de una notable importancia desde el punto de vista federal y estratégico.

En nuestro país se distinguen tres regiones vitivinícolas fundamentales (INV, 2021). La región de Cuyo formada por las provincias de Mendoza y San Juan, la Región Noroeste comprendida por las provincias de Salta, Catamarca, La Rioja y el noroeste de Tucumán, y la Región Patagónica o Sur, formada por La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut. Cada una de estas regiones vitivinícolas presenta características ecológicas propias, suelo y climas diferenciales. Las vides también expresan rasgos distintivos en cada *terroir*, por lo que la implementación del sistema de indicaciones geográficas y denominación de origen controlada, permitirá resaltar la diferenciación de los vinos y un incremento en el valor agregado, al asociar su identidad con la zona de origen (Catania et al., 2007).

La región vitivinícola de San Rafael, ubicada al sur de la provincia de Mendoza, constituye un oasis irrigado por los ríos Atuel y Diamante (Fig. 3). Esta área ofrece excelentes condiciones climáticas y edáficas para el cultivo de la vid. San Rafael está delimitada en el noroeste-sudeste por el cordón serrano llamado Sierra Pintada que actúa como un regulador climático: frena los vientos fríos del Sur y le confiere a la producción agrícola, en su mayor parte vitícola, características especiales. Su temperatura, dato fundamental para el desarrollo de las vides, es moderadamente fría. Tiene baja humedad relativa, con precipitaciones menores a 280 mm al año, inviernos fríos y secos con amplitud térmica diaria elevada. Los suelos son aluviales

presentando gran proporción de calcáreo. Con frecuencia el subsuelo es pedregoso. En estas condiciones la vid vegeta sin rigor excesivo, dando moderados rendimientos con el consiguiente efecto positivo sobre la calidad. El agua de los deshielos cordilleranos asegura un riego parejo y permanente a los viñedos. Se producen vinos de excelente calidad (INV, 2016). La región vitivinícola de San Rafael comprende los distritos de Ciudad, Cañada Seca, Cuadro Benegas, Cuadro Nacional, El Cerrito, Goudge, Jaime Prats, La Llave, Las Malvinas, Las Paredes, Monte Comán, Rama Caída, Real del Padre, Villa Atuel, y Villa 25 de Mayo.

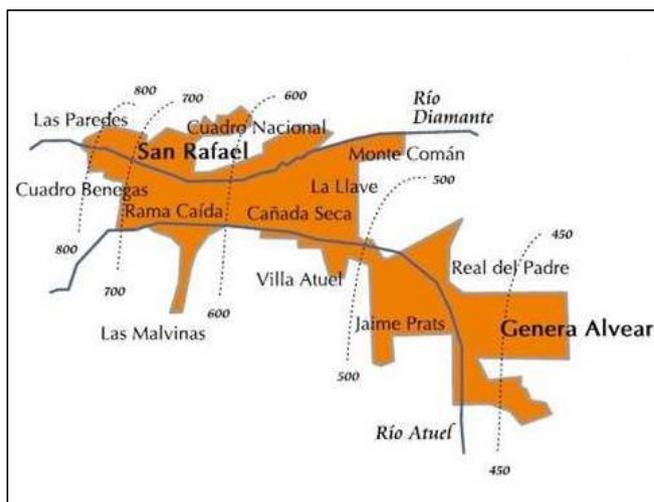


Figura 3. Región vitivinícola de San Rafael

La región vitivinícola de San Rafael, es responsable del 15% de la de la superficie vitivinícola de Mendoza, transformando esta actividad en la principal de la región (INV 2021). Según información del año 2021, esta región cuenta con 12.660 ha de uva para vinificar, obteniéndose 725.816 quintales de uva para la elaboración de vino (INV, 2021). Entre las principales variedades de vid de la región vitivinícola de San Rafael encontramos Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon y Syrah en uvas tintas, Torrontés Riojano para uvas blancas y Mezclas, Criolla y Cereza para uvas comunes. Su superficie cultivada, así como su producción pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1: Superficie cultivada y cantidad producida (toneladas) de las principales variedades de vid de la región vitivinícola de San Rafael durante el año 2020 (INV, 2021).

| Variedad | Superficie (ha) | Producción (quintales) |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|
| Malbec | 2.220 | 110.507 |
| Bonarda | 1.659 | 136.875 |
| Cabernet Sauvignon | 1.171 | 44.989 |
| Syrah | 1.115 | 67.480 |
| Criolla | 1.060 | 65.063 |
| Cereza | 961 | 68.374 |
| Torrontés Riojano | 223 | 17.112 |

2.3) Enfermedades de la vid: Podredumbres

La vid es susceptible al ataque provocado por distintos patógenos: hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus e insectos en el campo (Tabla 2) (Oriolani et al., 2012).

En un contexto actual de cambio climático (clima más cálido, olas de calor, aumento de las precipitaciones y sequía) fomentar una vitivinicultura sostenible resulta un eje estratégico para la Organización Internacional de la Viña y el Vino. El incremento de las precipitaciones antes o durante la vendimia conduce a aumentos en el desarrollo de enfermedades en la vid, particularmente de aquellas que afectan su fruto que resultan las más destructivas en términos de calidad y composición del vino (Steel et al., 2013). En Argentina, bajo el nombre de podredumbres, se indica principalmente un tipo de sintomatología que involucra a cuatro enfermedades, cuya afección está centrada en el racimo y que influyen en la calidad de mostos y vinos (Cuchi y Becerra, 2009). Ellas son: podredumbre gris y podredumbre noble, podredumbre de los racimos y por último la podredumbre ácida.

La podredumbre gris tiene como agente patógeno a *Botrytis cinerea* que afecta a todos los órganos verde de la vid pero principalmente a los racimos. Durante la floración y cuajado se presenta en las inflorescencias y en el raquis del racimo en forma de manchas marrones. En el periodo de envero y vendimia los granos aparecen podridos, con falta de turgencia, para posteriormente desarrollarse sobre su superficie un moho grisáceo, y provocando la muerte de la zona atacada por colapso de los vasos. En los racimos más compactos los daños son mayores.

Los impactos reportados en la calidad del vino son la pérdida del color rojo del vino, aromas a moho y tierra, entre otros (Steel et al., 2013).

Tabla 2: Enfermedades de la vid presentes en el campo

| NOMBRE | AGENTE CAUSAL | DAÑO |
|----------------------------|---|---|
| Agalla de corona | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens Biovar 3</i> | Tumor que obstaculiza la normal circulación de la savia. |
| Antracnosis de la Vid | <i>Sphaceloma ampelinum</i> | Debilitamiento general, disminución de la producción, pérdida cualitativa del racimo, imposibilidad de obtener estaca. |
| Oídio de la Vid | <i>Erysiphe necator Schw.</i> | Disminución importante del cuaje, caída de baya y falta de crecimiento de las mismas. Debilitamiento general. Predisposición al ataque de otros hongos. |
| Peronóspora de la vid | <i>Plasmopara viticola</i> | Filoptosis, pérdidas de racimos. Disminución de la calidad de la baya. |
| Podredumbre Gris | <i>Botrytis cinerea Pers</i> | Disminución cuali-cuantitativa de la producción. |
| Podredumbre de los racimos | <i>Botrytis cinerea Pers, Penicillium</i> spp., levaduras y bacterias | Afecta flores y semillas, alteraciones cualitativas en el aspecto enológico, producción de micotoxinas cancerígenas. |
| Podredumbre ácida | <i>Saccharomyces cerevisiae, Pichia membranifaciens.</i> Bacterias acéticas (<i>Gluconobacter</i> y <i>Acetobacter</i>) | Pérdidas de producción, mostos con elevada acidez volátil, vinos inestables. |
| Podredumbre del cuello | <i>Phytophthora spp.</i> | Disminución de la producción. Síntomas se agravan progresivamente y las plantas mueren. |
| Podredumbre negra | <i>Phoma uvicola</i> | Desecación de granos |
| Degeneración infecciosa | <i>Grapevine Fanleaf Virus, Arabis Mosaic Virus, Raspberry Ringspot Virus</i> | Amarillamiento en forma de parches de los tejidos verdes. Pérdidas del cenó peciolar, entrenudos cortos y Fascinación de pámpanos. |
| Enrollamiento | <i>Grapevine Leafroll Associated Virus</i> | Enrollamiento de la lámina foliar hacia la cara abaxial. |

Fuente: Oriolani et al., 2012

La podredumbre noble también tiene como agente patógeno a *Botrytis cinerea*. Los síntomas son los mismos que los descritos en podredumbre gris. Sin embargo, esta enfermedad se caracteriza por una sintomatología localizada en racimos maduros, donde no se producen

fructificaciones de microorganismos y se deshidratan las bayas. Los granos se deshidratan y pierden consistencia tomando un aspecto de pasa, con desarrollo de sabores dulces y añejos. En caso de que se produzca el ataque, las altas temperaturas producen una intensa transpiración de las bayas enfermas, que conduce a una concentración de azúcares solubles. Al aumentar la presión osmótica, el hongo concluye su actividad. También se modifica el tenor de ácidos orgánicos y taninos, que mejora la calidad de los vinos especiales realizados con este tipo de uvas. Estas características permiten denominar a este ataque particular como “podredumbre noble” (Cuchi y Becerra, 2009).

Por otra parte, la podredumbre de racimos es causada por un complejo etiológico donde intervienen principalmente hongos como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Rhizopus negricans*, *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, así como algunas levaduras y bacterias. La agresividad de cada uno de ellos dependerá de diversos factores como la madurez de las uvas, la temperatura y la humedad. Las características del desarrollo de estos hongos en el campo se encuentran en la Tabla 3. Entre los principales efectos reportados en la calidad del vino encontramos la pérdida de color del vino, aromas a moho y tierra, así como la producción de micotoxinas como ocratoxina A (algunas cepas de *A. niger* entre otras) y patulina (algunas especies de *Penicillium* spp), entre otras (Steel et al., 2013).

Actualmente, el uso de pesticidas es el método más utilizado para contrarrestar las pérdidas en cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades. Estas sustancias químicas producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de organismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico (Izzeddin y Medina, 2011). Entre ellos, la adición de fungicidas orgánicos y/o químicos es utilizada como una herramienta de rutina para el control de organismos que atacan a la vid pudiendo también bajo ciertas condiciones propicias atacar su fruto como *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, entre otros. No obstante, estos tratamientos resultan ineficaces si son otros los agentes causales de podredumbre por lo que resulta importante su estudio en pos de desarrollar una estrategia más precisa a la hora de prevenirlos.

Tabla 3: Hongos Filamentosos que integran la podredumbre de racimos

| Hongos Filamentosos | Características en campo |
|------------------------------|--|
| <i>Botrytis cinerea</i> | Hongo de evolución rápida. Las bayas adquieren una coloración marrón que se cubre con masas de micelio de color blanco-grisáceo en forma de puntos perdiendo su consistencia progresivamente. Se desarrolla en épocas lluviosas, con humedad y temperaturas altas. |
| <i>Aspergillus niger</i> | El hongo se extiende rápidamente con temperaturas cálidas y ambientes húmedos, cubriéndose las bayas de una inflorescencia blanca que termina en negra, formada por las fructificaciones del hongo. |
| <i>Penicillium</i> spp. | Hongo de evolución rápida, las bayas presentan una tinción marrón clara al principio, apareciendo luego pústulas de color blanco que evolucionan a verde azulado. La baya pierde consistencia y se rompe con facilidad. Se desarrolla en ambientes cálidos. |
| <i>Rhizopus negricans</i> | Hongo de evolución rápida, extendiéndose por toda la baya con amplio desarrollo de un micelio blanquecino acabado en puntos blancos que evolucionan a negros. El mayor desarrollo lo tiene en épocas calurosas y húmedas. |
| <i>Alternaria</i> spp. | Hongo de evolución lenta, presenta fructificaciones en la superficie con conidias periformes y formando cadenas, cuya coloración inicial suele ser verde oscuro, evolucionando a negro cuando la colonia es vieja. |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | Hongo de evolución lenta y expansión limitada, presenta colonias aterciopeladas de color gris-verdoso oscuro. Se desarrolla en ambientes húmedos y calurosos. |

Fuente: INTA (2013)

2.4) Hongos filamentosos en uva para vinificar

Los hongos son muy diferentes de cualquier otro grupo de organismos, aunque por ser inmóviles y poseer una pared celular, se clasificaron durante mucho tiempo junto con las plantas (Curtis y Barnes, 2008). En la actualidad, debido a sus características particulares, los biólogos asignan a los hongos a un reino separado. Aunque algunos hongos, incluyendo a las levaduras, son unicelulares, la mayoría de las especies están compuestas por masas de filamentos cenocíticos o multicelulares.

El reino Fungi (Hongos) incluye cuatro grupos principales (phyla) o subreinos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. Algunos autores sugieren la existencia de un quinto grupo: Deuteromycota o Fungi Imperfecti (Hongos Imperfectos), pero actualmente éste se clasifica dentro del *phylum* Ascomycota, que agrupa a todos los hongos que no tienen ciclo sexual conocido. Los criterios usados para distinguir estos grupos incluyen tanto características de su estructura básica (morfología), patrones moleculares (estudios de la secuencia de DNA) y ciertos patrones de reproducción, particularmente de reproducción sexual (Curtis y Barnes, 2008).

En lo que respecta al deterioro de alimentos, son tres los subreinos que incluyen géneros importantes: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (este último menos común) (Pitt y Hocking, 2009).

Las uvas tienen una compleja ecología microbiana incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas y efectos sobre la producción del vino (Barata et al., 2012; Rousseaux *et al.*, 2014). Como vimos en el apartado anterior (2.3), el crecimiento fúngico comienza en uvas si la temperatura y la humedad son apropiadas, produciendo numerosos efectos adversos que impactan de manera negativa en la producción y calidad del vino. Entre los más importantes podemos detallar: 1- pérdida del rendimiento en jugo, 2- prolongación del proceso de prensado debido a la naturaleza resbaladiza de las uvas infectadas, 3- alteración de la composición química del vino por la producción de ácido glucurónico, altos niveles de glicerol, oxidación de los compuestos fenólicos, 4- secreción de β -glucanos que afectan negativamente la clarificación, 5- producción off-flavours (como el ácido acético), y 6- estimulación del crecimiento de levaduras de deterioro y bacterias (Pretorius, 2000). En 1998, Fleet et al., mostraron las primeras evidencias de que los hongos producen metabolitos anti levaduras que pueden afectar a la fermentación alcohólica y maloláctica. Aunque los hongos filamentosos son incapaces de sobrevivir a concentraciones de etanol de 3%, bajo pH, SO₂ y anaerobiosis del vino, son capaces de crecer en las superficies del equipamiento de bodegas y en barricas de madera usadas para el añejamiento de vino otorgándole flavour mohoso. Entre todos estos efectos negativos es de principal preocupación la producción de micotoxinas en uva para vinificación que pueden perdurar durante el proceso hasta llegar al vino, generando un riesgo para la salud de los consumidores (Rousseaux et al., 2014).

Actualmente, se han identificado 8 géneros de hongos filamentosos, por técnicas convencionales y moleculares, que predominan entre los aislados en uvas para vinificar en distintas regiones vitivinícolas: *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Botritis* (Darriet et al., 2000; Abrunhosa et al., 2001; Da Rocha Rosa et al., 2002; Sage et al., 2002, 2004; Magnoli y et al., 2003, 2004; La Guerche y et al., 2004; 2005; 2006; 2007; Bau et al., 2005; Medina et al., 2005; Serra et al., 2005, 2006; Tournas y Katsoudas, 2005; Bellí et al., 2006; Doaré-Lebrun et al., 2006; Gomez et al., 2006; Lasram et al., 2007; Melki Ben Fredj et al., 2007; 2009; Ponsone et al., 2007; Prendes et al., 2015; Steel et al., 2007; 2013; Uyovbisere et al., 2007; Bragulat et al., 2008; Chiotta et al., 2009; Diaz et al., 2009; Kassemeyer y Berkelmann-Löhnertz, 2009; Laforgue et al., 2009; Mundy et al., 2009; Morales-Valle et al., 2010; 2011, Diguta et al., 2011; Dean et al., 2012).

En particular, durante estudios previos en las vendimias 2011, 2012 y 2013, se determinó que el género fúngico *Alternaria* es el principal componente de la microbiota de uvas para vinificar sanas, en la región vitivinícola de San Rafael (58 % en 2011, 81 % en 2012 y 2013), seguido por *Cladosporium* (22 % 2011, 19 % 2012 y 7% 2013) y alternativamente por *Aspergillus* (11% 2011 y 3% 2013) o *Penicillium* (3 % 2011 y 4 % 2013) (Prendes et al., 2015) (Fig. 4). Además, durante las diferentes vendimias analizadas se encontró un porcentaje menor (<5%) de *Drechslera* y géneros pertenecientes a los *Zygomycetes*.

Si bien diferentes organismos (hongos filamentosos, levaduras y bacterias) contribuyen al desarrollo de la sintomatología de podredumbre, numerosos trabajos apuntan a que los de origen fúngico (hongos filamentosos y levaduras) serían los primarios y dependerían de la región vitivinícola considerada (Briceño et al., 2009; Hall et al., 2019; Kakalikova et al., 2009; Navarrete et al., 2009; Nally et al., 2012; 2013; Oriolani et al., 2009; Steel et al., 2013).

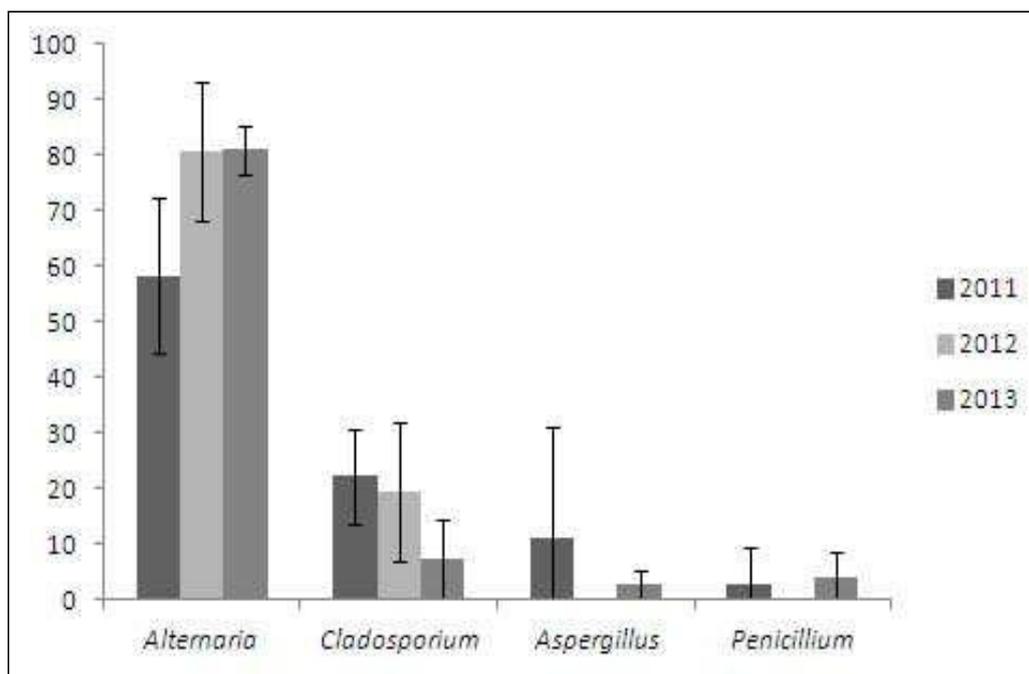


Figura 4. Abundancia o densidad relativa (%) de los 4 géneros fúngicos relevantes encontrados en uvas Malbec a tiempo de cosecha durante las vendimias 2011 y 2012 (en INTA Rama Caída de la DOC San Rafael) y durante la vendimia 2013 en toda la DOC San Rafael. Fuente: Prendes et al. (2015).

2.5) Levaduras en uva para vinificar

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión y pueden o no formar esporas. También pueden constituir sólo una etapa en el ciclo de vida de un hongo filamentoso (Kurtzman y Fell, 1998).

El primer nivel de clasificación de las levaduras se basa en aspectos de la sexualidad de las mismas, las levaduras representan los taxones Ascomycotina y Basidiomycotina (hongos perfectos) y Deuteromycotina u hongos imperfectos, sin fase sexual. Las subdivisiones taxonómicas menores (familias, subfamilias, géneros, especies y cepas) se basan en diversos criterios morfológicos, fisiológicos y genéricos, incluyendo la reproducción sexual (Kurtzman y Fell, 1998).

De los ascomicetes (filo Ascomycota) derivan los Deuteromicetes, que han perdido, o se desconoce, su reproducción sexual. Dentro de esta división se encuentran las clases Euascomycetes y Hemiascomycetes, siendo esta última la que contiene al Orden Saccharomycetales (Endomycetales) al cual pertenece el género de levadura *Saccharomyces*. Otros géneros de levadura pertenecientes a esta división asociados normalmente con viñedos,

mostos, vinos y ambientes de bodega son *Hanseniaspora/ Kloeckera*, *Dekkera/ Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* (Pretorius et al., 1999).

Por otro lado, los géneros de levadura pertenecientes a los basidiomicetes (filo Basidiomycota) que están asociados a la vinificación son *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (Pretorius et al., 1999). Tradicionalmente, la identificación clásica de especies de levaduras basada en numerosas pruebas morfológicas y fisiológicas resulta un proceso complejo que requiere demasiado tiempo (Kreger-van Rij, 1984; Barnett y col., 2000). Asimismo, esta metodología convencional puede en algunos casos conducir a resultados imprecisos (Smith, 1998). Diversos estudios moleculares demuestran incongruencias con las pruebas fisiológicas, presentando variaciones en los perfiles de fermentación y asimilación como en las características morfológicas entre cepas de una misma especie (Kurtzman y Phaff, 1987). Nuevas técnicas de identificación, principalmente basadas en las secuencias de ácidos nucleicos, son empleadas actualmente por ser más confiables y discriminantes para la caracterización de especies. Uno de los métodos moleculares más exitosos para la identificación de especies de levaduras es el basado en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen 5,8S del ARNr y las secuencias internas transcritas (ITS). Se ha demostrado que la técnica PCR-RFLP puede ser una herramienta rápida, confiable y precisa para la identificación de levaduras de diversos nichos ecológicos (Guillamon et al., 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1999). Otra técnica molecular ampliamente utilizada por su eficiencia en la asignación de especies de levaduras es la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S del ARNr (Kurtzman y Robnett, 1998).

Los granos de uva son la principal fuente de levaduras, albergando una población de entre 10^2 y 10^4 células por gramo. Estas levaduras juegan un rol importante en la calidad de la uva previa a la cosecha, así como a través del proceso de vinificación (Fleet et al., 2002). Estudios previos han indicado que los géneros *Aureobasidium* (hongo tipo-levadura), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issanchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Torulasporea* y *Zygosaccharomyces* son los más frecuentemente aislados de uva (Sabate et al., 2002; Fleet et al., 2002; Prakitchaiwattana et al., 2004; Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Chavan et al., 2009). No obstante, la principal responsable de la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*, es raramente aislada de muestras de grano de uva (Mortimer y Polsinelli, 1999).

La composición de la comunidad microbiana de la uva se encuentra influenciada por múltiples factores: variedad y grado de madurez de la uva, climatología y estado sanitario, así como el uso de productos fitosanitarios e interacciones levadura-levadura, levadura-bacteria y levadura-hongo (Barata et al., 2012; Fleet, 2003; Comitini y Ciani, 2008; Martins et al., 2012; Rementeria et al., 2003; Renouf et al., 2005). Así también cada región presenta una microbiota característica de acuerdo al área en la que se encuentran localizados los viñedos (Riberau-Gayon et al., 2000).

En particular, durante estudios previos durante las vendimias 2011, 2012 y 2013, se determinó que el 82 % del total de aislados de uvas para vinificar sanas de la región vitivinícola de San Rafael pertenecía al organismo tipo levadura *A. pullulans*, el 6,3 % a la levadura *H. uvarum*, el 5,4 % a la levadura *M. pulcherrima*, el 2,7 % a la levadura *Cryptococcus laurentii II* (*Cr. laurentii II*), el 2,7 % a la levadura *Starmerella bacillaris* (antiguamente *C. zemplinina*) y el 0,9 % a la levadura *Rhodotorula* spp. (Prendes et al., 2018) (Fig.5).

Barata y et al., (2012) en pos de explicar la gran variabilidad de levaduras halladas en uva en los diferentes estudios, propusieron ubicarlas junto con algunas bacterias ácido lácticas y ácido acéticas del mismo nicho en lo que denominaron el consorcio microbiano del vino (CMV). El CMV subsecuentemente, fue dividido en 3 grandes grupos con características fisiológicas particulares y comportamiento similar en uva, siendo el balance entre los mismos producto de la disponibilidad de nutrientes en la superficie de la uva. El primer grupo, denominado oligotrófico, compuesto por levaduras basidiomicetes oxidativas, el hongo tipo-levadura *Aureobasidium pullulans* y bacterias ácido lácticas, está caracterizado por especies favorecidas en un medioambiente pobre en nutrientes, como el de las uvas “verdaderamente sanas”. El segundo grupo, denominado copiotrófico, compuesto por levaduras ascomicetes oxidativas (algunas *Candida* spp.), apiculadas débilmente fermentativas (*Hanseniaspora* spp.), formadoras de films (*Pichia* spp) y fermentativas (*Candida zemplinina*, *Metchnikowia* spp.), se incrementaría durante la madurez de la uva, ya que depende de la liberación de algunos nutrientes inclusive en uvas visualmente intactas. El tercer grupo, denominado también copiotrófico, está compuesto por levaduras fuertemente fermentativas (*Saccharomyces* spp. *Torulaspota* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp. y *Pichia* spp.) y bacterias ácido acéticas aerobias obligadas y su proliferación se explicaría debido a una gran disponibilidad de nutrientes, resultante directo de un daño en la uva.

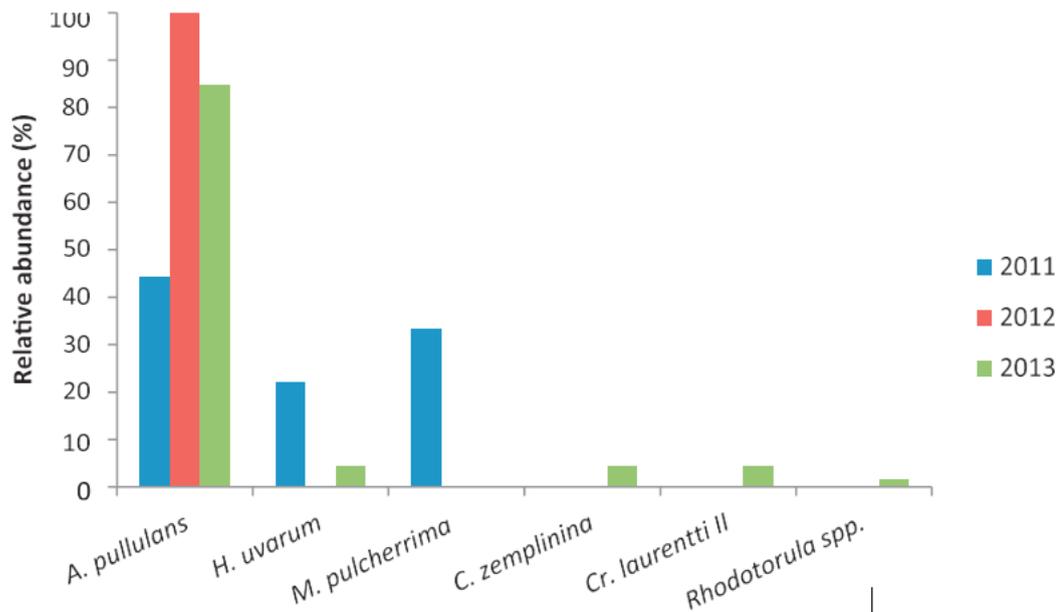


Figura 5: Abundancia relativa (%) de cada levadura epífita o especie de levadura encontrada durante las añadas 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec de la región vitivinícola de San Rafael. Fuente: Prendes et al. (2018).

El estado fitosanitario de la uva es un factor muy importante en la ecología microbiana pudiendo incrementar los conteos microbianos y la diversidad de especies (Barata et al., 2012). Las uvas dañadas, rápidamente desarrollan poblaciones de 10^6 - 10^8 UFC/g y contienen altas poblaciones de hongos filamentosos y bacterias acéticas.

La microbiota natural de uva y mosto puede servir como fuente de inóculo de levaduras deseables y/o microorganismos de deterioro. Los efectos potenciales de esta microbiota en la naturaleza de la fermentación y sobre todo en la calidad e inocuidad del producto final hacen importante contar con un conocimiento profundo acerca de los microorganismos presentes en superficie de uva para vinificar.

2.6) Micotoxinas en uva para vinificar: ácido tenuazónico

Por definición las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos producidos por hongos filamentosos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Richard, 2007). La producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el huésped, el ambiente y la especie toxicogénica; la interacción entre las partes interactuantes puede influir en la mayor o menor producción de las toxinas (Magan y

Aldred, 2007). Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002). Debido al peligro toxicológico que implican, numerosos estudios se han enfocado en la identificación de hongos potenciales productores y los factores que determinan su ocurrencia en distintos alimentos de consumo humano (Logrieco et al., 2009). En particular, algunos de los hongos que pueden producir podredumbres en uva y/o ser invasores secundarios, también tienen el potencial de producir micotoxinas nocivas para la salud humana (Steel et al., 2013).

Como vimos en el apartado anterior (2.4), durante estudios previos se determinó que el género *Alternaria*, con potencial micotoxigénico, es el principal componente de la microbiota de uvas para vinificar sanas de la región vitivinícola de San Rafael, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo (Prendes et al., 2015; Rousseaux et al., 2014). Asimismo, se determinó que el 97% de las cepas de *A. alternata* aisladas de uvas Malbec eran capaces de producir micotoxinas tales como alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), y ácido tenuazónico (ATe) y exhibían capacidad patogénica en uva (Prendes et al., 2015). Estas cepas fueron capaces de producir AOH, AME y ATe en un rango de condiciones de actividad acuosa (a_w) y temperaturas similares a aquellas presentes durante la maduración de uva en el campo en un medio simil uva (Prendes et al., 2016). En paralelo, se optimizó la metodología QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) para la extracción de ATe de uva, seguida por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a la detección UV (HPLC–UV) para la detección y cuantificación del mismo. (Fontana et al., 2016, Prendes 2016, tesis doctoral). Esto permitió detectar la producción de ATe durante ensayos de inoculación con cepas de *A. alternata* en uva y la incidencia natural de esta micotoxina en diferentes variedades de uva para vinificar.

Desde el punto de vista de la salud pública, la presencia de ATe es relevante considerando que es el compuesto más tóxico producido por *Alternaria* (Viñas et al., 1992; Scott et al., 2004). Además, se han observado cambios pre-cancerígenos generados en la mucosa del esófago de ratones alimentados con ATe a 25 mg/kg de peso corporal, por día durante 10 meses (Yekeler et al., 2001). También se ha sugerido la posible participación de ATe en la etiología de Onyalay, un desorden hematológico humano de incidencia en África, (Logrieco et al., 2003).

Durante la vendimia 2015, el 57 % de 14 muestras de uvas Malbec de la región vitivinícola de San Rafael presentaron contaminación con ATe (Fontana y col., 2016). Los niveles encontrados en las muestras de uvas sanas (13) variaron desde el límite de detección del método (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

hasta 96 ± 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que la única muestra de uvas visiblemente infectada (M14) mostró una concentración máxima de 595 ± 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En otro estudio, llevado a cabo durante la vendimia 2016, se analizaron 37 muestras de diferentes variedades de uva para vinificar tanto sanas como con podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael (Prendes et al., 2018b). El 16.2% (6/37) del total de muestras de uva para vinificar mostró contaminación por ATe con 4% (1/25) de incidencia en muestras sanas (77 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y 42% (5/12) en muestras con podredumbre (10 – 778 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Las variedades Malbec, Cabernet Sauvignon y Syrah mostraron contaminación por ATe, mientras que Bonarda, Ancellotta, Torrontés, Semillón y Chenín no. También se realizaron experimentos de inoculación en uvas para vinificar, donde dos de las tres cepas de *A. alternata* testeadas fueron capaces de producir ATe en las condiciones evaluadas y la mayor producción de se observó a 15° C y 25° C después de 24 días de incubación, sugiriendo una correlación positiva entre el desarrollo fúngico y la presencia de ATe. (Prendes et al., 2018b)

Por otra parte, numerosos trabajos informan la incidencia natural de AOH, AME y ATe en jugo de uva y vino, por lo que el consumo de los mismos podría contribuir efectivamente a un incremento en la ingestión de micotoxinas de *Alternaria* en la dieta humana (López et al.; 2016; Fan et al., 2016; Delgado et al., 1998; Lau et al., 2003; Scott et al., 2006; Broggi et al., 2013). Siendo que la exposición de toxinas de *Alternaria* está vinculada a una gran variedad de efectos adversos para la salud humana y animal y su regulación en alimentos es actualmente una preocupación (EFSA, 2011; 2016), resulta importante evaluar la incidencia de ATe, en uvas con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael.

3. METODOLOGÍA

3.1 Determinación de la población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael

3.1.A Medios de cultivo y soluciones

AGAR DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL (DRBC): glucosa 10 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g; cloranfenicol 0,1 g; dicloran 0,002 g; rosa de bengala 0,025 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y posteriormente se fraccionó en placas de Petri de 9 cm.

SOLUCIÓN STOCK DE ROSA DE BENGALA: se disolvieron 25 mg de rosa de bengala en 30 mL de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.

SOLUCIÓN STOCK DE DICLORAN: se disolvieron 200 mg de dicloran en 100 mL de etanol al 95%.

SOLUCIÓN STOCK DE CLORANFENICOL: se disolvieron 300 mg de cloranfenicol en 18 mL de etanol 95% y se llevó a 30 mL con agua destilada.

AGAR RECuento DE LEVADURA DE GLUCOSA (GYC): glucosa 50 g, extracto de levadura 10 g, carbonato de Calcio 30 g, agar 25 g, agua destilada 1000 mL, cicloheximida 100 mg (se coloca después de autoclavar el medio a temperatura 45 °C).

SOLUCIÓN STOCK DE CICLOHEXIMIDA: se disolvieron 10 g de cicloheximida en 36 mL de etanol 95% y se llevó a 60 mL con agua destilada.

MAN, ROGOSA Y SHARPE (M.R.S.)-20% ZUMO DE UVA: glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de carne 8 g, extracto de levadura 4 g, KH_2PO_4 2 g, acetato de sodio 5 g, citrato de amonio 2 g, MgSO_4 (7 H_2O) 0,2 g, MnSO_4 (4 H_2O) 0,05 g, Tween 80 1 mL, agar 12 g, zumo de uva (mosto concentrado 65%) 61 mL y se llevó a 1000 mL con agua destilada, cicloheximida 100 mg (se coloca después de autoclavar el medio a temperatura 45 °C).

3.1.1 Muestreo

Se tomaron 17 muestras de uva para vinificar de las variedades Bonarda, Malbec, Syrah, Criollas, Cereza, Cabernet Sauvignon y Torrontés Riojano pertenecientes a distintas zonas de la región vitivinícola de San Rafael (Cuadro Nacional, La Llave, Rama Caída y Cañada Seca) que presentaron síntomas de podredumbre durante la vendimia 2017 (Fig. 6). La recolección de las muestras se llevó a cabo en diferentes tiempos de cosecha (tabla 4). El área geográfica total elegida para muestrear estuvo comprendida entre las latitudes $34^{\circ} 30' 41''$ y $34^{\circ} 45' 40''$ S, longitudes $67^{\circ} 56' 14''$ y $68^{\circ} 27' 37''$ O y entre los 500 y 800 m de altitud. Las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles, se rotularon y se enviaron al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Aplicada a la Industria para su posterior procesamiento.



Fig.6: Localización espacial de las muestras de uvas de distintas variedades con síntomas de podredumbre recolectadas en la región vitivinícola San Rafael, vendimia 2017. La Llave: M1, M4, M8, M11, M10, M15, M17; Cañada Seca: M3, M6, M7, M9, M13, M16; Cuadro Nacional: M12 y M14; Rama caída: M2 y M5. **Bonarda;** **Malbec;** **Syrah;** **Criollas,** **Cereza;** **Cabernet Sauvignon;** **Torrontés Riojano.**

Tabla 4: Variedad y fecha de recolección de las muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre durante la vendimia 2017

| Muestra | Variedad | Fecha de recolección |
|----------------|-----------------|-----------------------------|
| M1 | Bonarda | 5/4/2017 |
| M2 | Bonarda | 7/4/2017 |
| M3 | Malbec | 21/4/2017 |
| M4 | Bonarda | 31/3/2017 |
| M5 | Bonarda | 21/4/2017 |
| M6 | Syrah | 15/3/2017 |
| M7 | Cereza | 22/3/2017 |
| M8 | Criolla | 3/4/2017 |
| M9 | Cabernet | 21/4/2017 |
| M10 | Bonarda | 16/3/2017 |
| M11 | Cereza | 16/3/2017 |
| M12 | Bonarda | 31/3/2017 |
| M13 | Criollas | 5/4/2017 |
| M14 | Bonarda | 31/3/2017 |
| M15 | Torrontés | 5/4/2017 |
| M16 | Bonarda | 21/4/2017 |
| M17 | Bonarda | 31/3/2017 |

3.1.2 Procesamiento, incubación y conteos microbiológicos

Se tomaron 100 g de muestra, se procesaron con 900 mL de agua peptona (0,1%) en licuadora y se realizaron diluciones seriadas por duplicado (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) (Fig. 7). Se realizó la siembra de 100 μ l de las mismas en placas de Petri con distintos medios para aislar hongos y levaduras (DRBC), bacterias acéticas (GYC) y bacterias lácticas (M.R.S. -20% zumo de uva). La licuadora fue desinfectada al comienzo, así como entre muestra y muestra, mediante su llenado con una solución de hipoclorito de sodio (1%) durante 30 min seguido de una solución de tiosulfato de sodio (0,5%) durante 30 min.

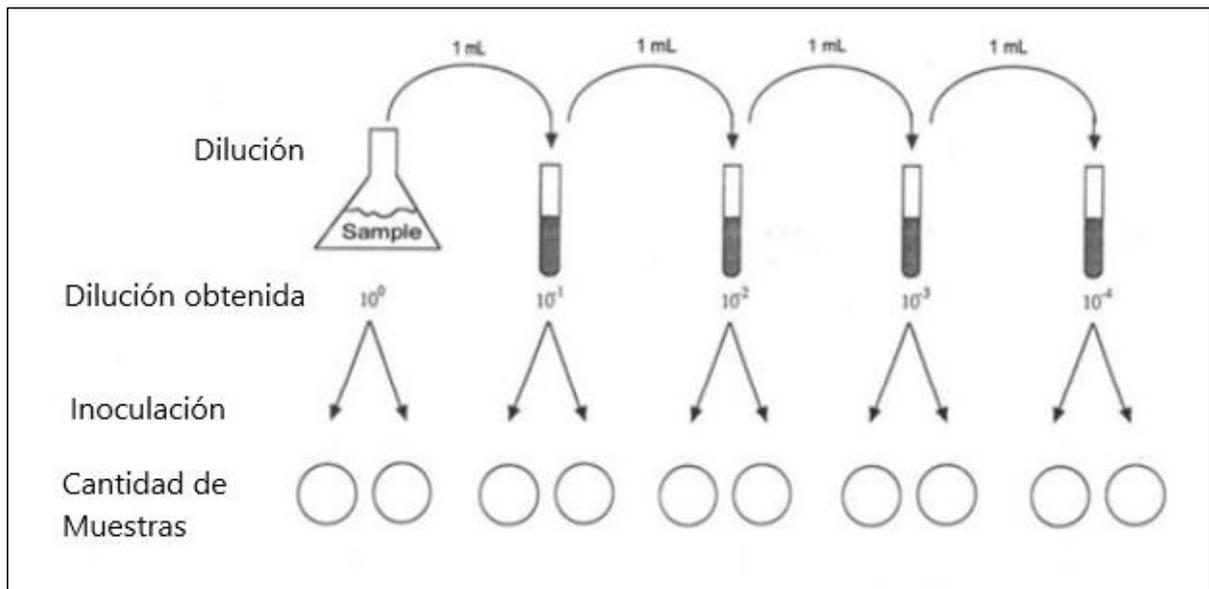


Fig.7: Esquema de la preparación de diluciones de cada muestra e inoculación en placas de Petri con los medios apropiados (DRBC, GYC, M.R.S. -20% zumo de uva)

Las placas sembradas se incubaron a 25 °C durante 4 días (GYC), 5 a 7 días (DRBC) en aerobiosis y 10 días en microaerofilia (M.R.S. -20% zumo de uva). Al finalizar el tiempo de incubación se determinó la carga microbiana de hongos filamentosos, levaduras y bacterias (mediante el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia- UFC- por mL). Las colonias fúngicas resultantes de cada muestra (hongos filamentosos y levaduras en DRBC) fueron enumeradas y agrupadas de acuerdo a los diferentes tipos morfológicos encontrados para obtener la abundancia relativa (%) de cada género-especie distinguible o densidad relativa (DR%), calculada de la siguiente manera (González et al., 1996):

$$\frac{N^{\circ} \text{ de aislados de un tipo morfológico} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de aislados}}$$

3.1.3 Análisis estadístico

Se aplicó el análisis multivariado de varianza (MANAVA), seguido de test de Hotelling – Bonferroni para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras. También se realizó el análisis de componentes principales (CPA) para simplificar las interpretaciones de los resultados y fue presentado en un gráfico de tipo biplot. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013).

3.2 Aislamiento e identificación de hongos filamentosos y levaduras a nivel de género y especie.

3.2.A Medios de cultivo y soluciones

AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA): extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada 1000 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 5,6.

AGAR GLICEROL NITRATO 25% (G25N): K₂HPO₄ 0,75 g, Czapek concentrado 7,5 mL, extracto de levadura 3,7 g, glicerol 250 g, agar 12 g, agua destilada 750 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 7,0.

CZAPEK CONCENTRADO: NaNO₃ 30 g; KCl 5 g; MgSO₄ (7 H₂O) 5 g; FeSO₄ (7 H₂O) 0,1 g; agua destilada 100 mL.

AGAR CZAPEK EXTRACTO DE LEVADURA AGAR (CYA): K₂HPO₄ 1 g, Czapek concentrado 10 mL, solución de trazas de metales 1 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 30 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZAS: CuSO₄ (5H₂O) 0,5 g; ZnSO₄ (7H₂O) 1 g; agua destilada 100 mL.

CALDO DEXTROSA, PEPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA (YPD): glucosa 20g, peptona 20g, extracto de levadura 10 g, agua 1000 mL. Para la preparación del medio sólido se adicionaron 20g de agar por cada 1000 mL de caldo YPD, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3.2.1 Aislamiento y almacenamiento de hongos filamentosos y levaduras

Una vez determinada la carga microbiana (UFC/mL) de los distintos tipos morfológicos de hongos filamentosos y levaduras obtenidos en 3.1, se realizaron 4 aislamientos de cada uno. Para ello, se tomó un trozo de la colonia con un ansa estéril y se sembró en una nueva placa de Petri con medio de cultivo propicio para el crecimiento, MEA para hongos filamentosos y YPD agar para levaduras. El sembrado se realizó por inoculación central en el caso de hongos filamentosos y a través de un estriado en el caso de levaduras, obteniendo de esta manera colonias bien separadas y puras. Para el guardado de cepas, los hongos se sembraron en placa

con medio CYA y se incubaron a 25 °C en estufa por 7 días. Al finalizar la incubación, se tomó material fúngico con ansa en esterilidad y se colocó en un microtubo de 1,5 mL de capacidad con 1mL de YPD líquido con 30 % de glicerol. Para el guardado de levaduras, las mismas se sembraron en 5 mL de YPD líquido y se incubaron a 28 °C en baño termostatzado por 48hs, luego se centrifugaron a 3500 r.p.m. y se re suspendieron en 1mL de YPD líquido con 30% de glicerol. Todas las cepas se conservaron en freezer a -20 °C.

3.2.2 Identificación de hongos

Para la identificación a nivel de género de los hongos filamentosos aislados se siguieron las claves taxonómicas de acuerdo a la guía descrita por Pitt y Hocking (2009) como se detalla a continuación. Cada aislamiento fue cultivado durante 7 días en los medios de cultivo MEA y G25N a 25 °C, y en CYA a 5, 25 y 37 °C. En la figura 8 se observa una representación esquemática del régimen de siembra empleado para 2 aislados fúngicos.

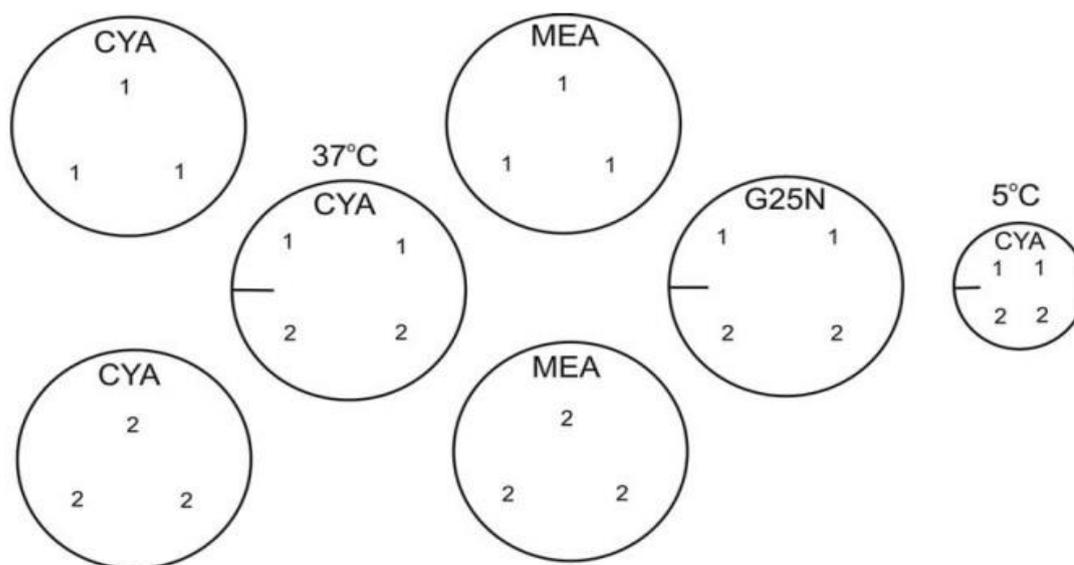


Fig. 8: Representación esquemática del régimen de siembra utilizado para cultivar los aislados fúngicos y posterior identificación.

Después de 7 días de incubación, se tuvieron en cuenta caracteres macroscópicos tales como: diámetro, color y textura de las colonias y caracteres microscópicos como: estructuras de reproducción, conidióforos, tipos de conidios, cuerpos de fructificación, entre otras y se procedió a verificar los ítems de la clave general de identificación descrita por Pitt y Hocking (2009) detallada en la tabla 5. A posteriori, se procedió a las claves específicas de cada una de las agrupaciones indicadas por la clave general (hongos xerofílicos, *Aspergillus* y sus telomorfos, *Penicillium* y géneros relacionados y hongos miceláneos) para determinar el género fúngico de cada aislado.

Tabla 5: Clave general para identificación morfológica de hongos de deterioro

| | |
|--|---|
| <p>1 Sin crecimiento en ningún medio estándar en 7 días. Crecimiento en uno o más medios estándar.</p> | <p>Capítulo 9 – “Hongos xerofílicos” -2-</p> |
| <p>2 (1) Colonias de levaduras, reconocibles en aislamiento o en cultivo, es decir, colonias blandas, que no superen los 10 mm de diámetro en cualquier medio estándar. Crecimiento filamentoso, superior a 10 mm de diámetro en uno o más medios estándares.</p> | <p>Capítulo 10 – “Levaduras” -3-</p> |
| <p>3 (2) Crecimiento en CYA y/o MEA más rápido que en G25N. Crecimiento en G25N más rápido que en CYA y MEA.</p> | <p>-4- Capítulo 9 – “Hongos xerofílicos”</p> |
| <p>4 (3) Hifas frecuentemente y notoriamente tabicadas. Hifas que carecen de tabiques o raramente tabicadas.</p> | <p>-5- Capítulo 6 – “Zygomycetos”</p> |
| <p>5 (4) No hay esporas maduras presentes en 7 días. Esporas maduras presentes en 7 días.</p> | <p>-6- -9-</p> |
| <p>6 (5) Estructuras fructíferas inmaduras de algún tipo presentes. Sin estructuras de fructificación (o esporas) detectables por microscopía de CYA o MEA.</p> | <p>-7- Ver la sección “Hongos misceláneos”</p> |
| <p>7 (6) Colonias y estructuras fructíferas blancas o de colores brillantes. Colonias o estructuras fructíferas oscuras.</p> | <p>-8- Continuar con la incubación; cuando las esporas maduran, consulte la sección sobre "Hongos misceláneos"</p> |

| | |
|--|--|
| <p>8 (7) Colonias y estructuras fructíferas blancas Colonias o estructuras fructíferas de colores brillantes.</p> | <p>Capítulo 8 – “<i>Aspergillus</i> y sus teleomorfos” Capítulo 7 – “<i>Penicillium</i> y géneros relacionados”</p> |
| <p>9 (8) Esporas (conidios) de menos de 10 µm de largo, nacidas en cadenas a partir de células fértiles agrupadas (fiálides), en estípites bien definidos. Esporas (conidios) de varios tamaños, que nacen solas o solitarias, o si están en cadenas no se encuentran agregadas.</p> | <p>-10- Ver la sección "Hongos misceláneos"</p> |
| <p>10 (9) Presenta fiálides o métulas y las fiálides nacen de zonas de engrosamiento más o menos esféricas ubicadas en los ápices del estípite. Las fiálides nacen en <i>penicilli</i>, es decir, de estípites sin engrosamiento con o sin métulas o ramificaciones intermedias.</p> | <p>-11- Capítulo 7 – “<i>Penicillium</i> y géneros relacionados”</p> |
| <p>11 (10) Conidios azules o verdes, fiálides producidas sucesivamente en vesículas, vesículas de menos de 10 µm de diámetro, estípites usualmente septadas. Conidios de varios colores, fiálides y /o métulas producidas simultáneamente en vesículas, vesículas de más de 10 µm de diámetro, estípites no septadas.</p> | <p>Capítulo 7 – “<i>Penicillium</i> y géneros relacionados” Capítulo 8 – “<i>Aspergillus</i> y sus teleomorfos”</p> |

Pitt y Hocking 2009

3.2.3 Identificación de levaduras

La identificación de las colonias de levadura aisladas a nivel de especie fue realizada mediante el método molecular de amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 de ADN seguido de la digestión de ese fragmento amplificado (RFLP) y análisis de los patrones obtenidos (Estevez-Zarzoso y col. 1999, Fernández-Espinar y col. 2006) con algunas modificaciones. Se sembraron cada uno de los aislados a identificar en medio YPD-agar y se incubaron a 28 °C por 48 hs. Las células de cada aislamiento de levadura se recogieron directamente desde una colonia fresca y se resuspendieron en 50 µL de agua estéril. Las suspensiones celulares se llevaron a un baño de agua a ebullición durante 5 min y seguidamente se enfriaron por inmersión en hielo durante 5 min. Luego, las células de levadura se separaron por centrifugación (11.720 rpm, 10 min a 4 °C) y los sobrenadantes resultantes se utilizaron para el ensayo de amplificación.

3.2.4 Reacciones de PCR

La región ITS1-5,8S-ITS2 de ADN (Fig. 9) se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador TC-312 (TECHNE) usando los cebadores universales ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') previamente descritos por White y col. (1990).

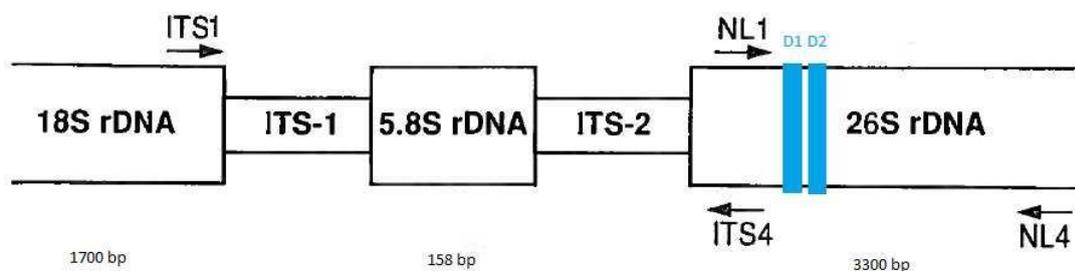


Fig. 9: Esquema de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ADNr de levaduras.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL. La mezcla de PCR contuvo 15 µL de sobrenadante conteniendo el ADN molde, 10 µL de tampón de PCR 10X, 8 µL de dNTPs (1 mM), 2 µL de cebador ITS1 (50 mM), 2 µL de cebador ITS4 (50 mM), 5 µL de MgCl₂ (50 mM), 57,5 µL de agua miliQ, 0,5 µL de enzima Taq polimerasa (5 U/µL). La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55,5 °C y 2 min 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. Para verificar la obtención de los productos amplificados y su tamaño, se

sembraron 5 µl de cada uno de ellos en geles de agarosa al 1,4 % con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en solución reguladora TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X. La separación se realizó por electroforesis a voltaje constante (100 V) y el ADN fue visualizado con un transiluminador bajo luz UV (302 nm). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (cienmarker, Byodinamics) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb.

3.2.5 Cortes con enzimas de restricción

Los productos amplificados de PCR se digirieron sin previa purificación con las endonucleasas de restricción *Cfo* I, *Hinf* I y *Hae* III, también se utilizó *Dde* I, de ser necesario, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa al 2,2 % con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en solución reguladora TAE (Tris-ácido acético- EDTA) 1X. La separación se realizó por electroforesis a voltaje constante (100 V) y el ADN fue visualizado con un transiluminador bajo luz UV (302 nm). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (cienmarker, Byodinamics) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb. Finalmente, los tamaños de los fragmentos obtenidos con cada una de las enzimas de restricción junto con el tamaño del amplificado para cada cepa, fueron cargados en la base de datos de levaduras YEAST-ID (www.yeast-od.org) para asignar especie. Se tomó como criterio, en un rango de ± 30 pb, un acierto de al menos 90 % con los fragmentos esperados.

3.3 Evaluación de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael

3.3.A Reactivos y soluciones

Preparación de la solución madre de ATe: se disolvieron 2 mg de tenuazonato de cobre (\geq 98 %, Sigma-Aldrich) en 0,5 mL de metanol y se pasó la solución a través de una columna empaquetada con la resina Dowex 50 w (intercambio iónico) de 4 cm de altura por 1 cm de diámetro, acoplada a un sistema de vacío. El acondicionamiento de la resina se realizó mediante 3 lavados consecutivos de la columna con 4 mL de metanol, se agregó a la columna la solución de tenuazonato de cobre diluido, luego el ATe se eluyó con 15 mL de metanol y se llevó a un volumen final de 25 mL. Para calcular la concentración de ATe se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = A / \sum 277 \times 1$$

Donde A, es la absorbancia medida para la solución de ATe obtenida, Σ_{277} es la absorptividad molar y l el ancho efectivo de paso del haz de luz. El Σ_{277} para ATe 12,980 L/mol* cm. La concentración de la solución madre obtenida fue 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ATe. A partir de la solución madre se construyeron las curvas de calibrado mediante diluciones secuenciales. Asimismo, a partir de esta madre se realizaron las adiciones en la matriz de uva para evaluar las figuras de mérito analítico de la metodología.

Preparación de sales anhidras: Tanto el sulfato de magnesio (MgSO_4) como el cloruro de calcio (CaCl_2) fueron colocadas en recipientes de vidrio y secadas en estufa a temperatura de 100 °C durante 1-2 días para lograr las sales anhidras. Posteriormente, se molieron utilizando un molinillo y se pesaron las cantidades necesarias para el procedimiento.

3.3.1 Extracción de ácido tenuazonico en uvas

Se utilizaron las 17 muestras de uva con síntomas de podredumbre obtenidas previamente (punto 3.1.2). Cada una de ellas fue molida completamente en licuadora y se recolectaron 3 alícuotas de 2,5 g de cada una (réplicas) en tubos de centrifuga de fondo cónico de 50 mL con los que se procedió a la extracción según el protocolo basado en QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) optimizado por Fontana y col. (2016) (Figura 10). A cada una de las réplicas de 2,5 g (en tubo de centrifuga con fondo cónico de 50 mL) se le adicionaron 2,5 mL de agua ultrapura (acidificada con 1% ácido fórmico) y 5 mL de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente por 1 min para asegurar una homogenización adecuada de la muestra y el solvente de extracción. Para la separación de fases, se agregaron 4 g de MgSO_4 anhidro y 1 g de NaCl , los tubos fueron nuevamente agitados por 1 min y centrifugados a 8000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a tubo de centrifuga fondo cónico de 15 mL de capacidad que contenían 0,25 g de CaCl_2 anhidro, y fue agitando con vórtex por 30 s y finalmente centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos. Estos últimos sobrenadantes fueron recolectados en tubos Kahn de vidrio y evaporados a sequedad (concentrador SpeedVac). Por último, los residuos se resuspendieron en 0,5 mL de fase móvil metanol: 0,1 M NaH_2PO_4 (2:1 v/v), ajustado a un pH 3,2. Se inyectaron 20 μL de la muestra en el HPLC con detector UV (HPLC-UV).

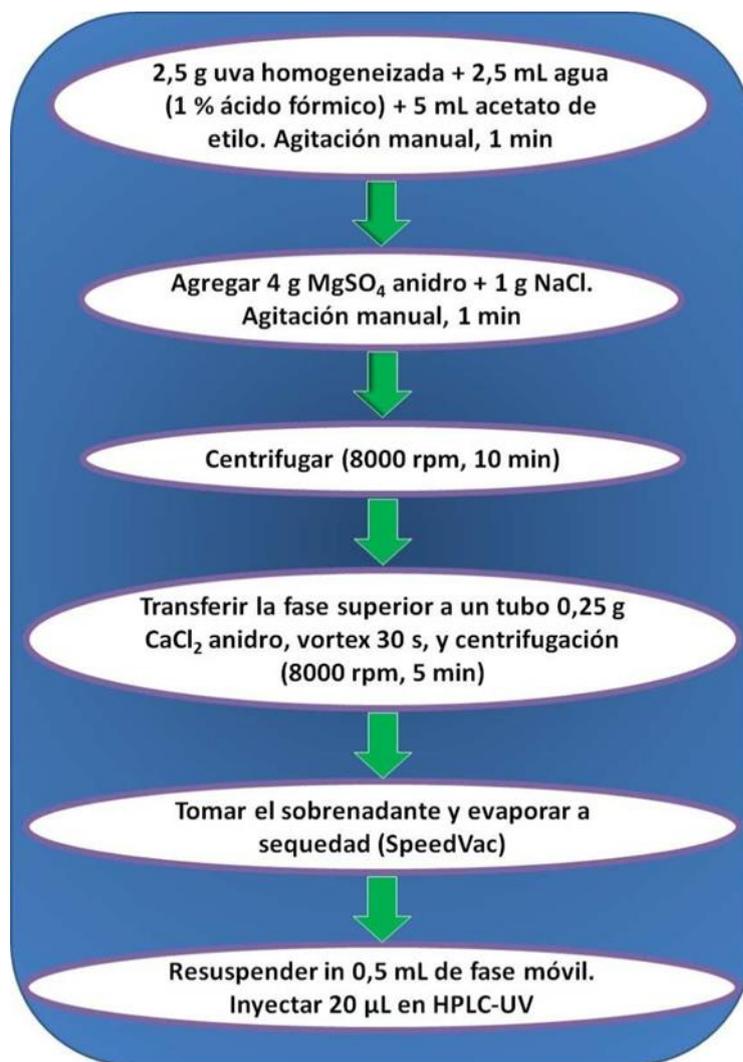


Fig. 10: Esquema de trabajo método de extracción de ácido tenuazónico de uvas basado en QuEChERS

3.3.2 Detección y cuantificación de ácido tenuazónico por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV

El ácido tenuazónico fue determinado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de longitud de onda múltiple (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Alemania). El instrumento de HPLC modelo “DionexUltimate 3000” consistió en una unidad desgasificadora al vacío, un inyector automático, una bomba cuaternaria, un horno cromatográfico y un detector modelo Dionex MWD-3000 (RS). Este último posee una celda de flujo analítico que opera a una velocidad de recolección de datos de 5 Hz, un ancho de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 1.000 s. La longitud de onda de trabajo para ATe fue de 279 nm y se utilizó el software Chromeleon 7.1

para controlar los parámetros del sistema de HPLC-MWD, la adquisición y el procesamiento de los datos.

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo con una columna Kinetex XB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m) Phenomenex (Torrance, CA, USA) utilizando el método previamente reportado por Shephard y col. (1991) con algunas modificaciones. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: 0,1 M NaH₂PO₄ (2:1 v/v) esta mezcla se ajustó a pH 3,2 mediante la adición de ácido fosfórico. Las muestras fueron analizadas usando un método isocrático a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min durante un tiempo de corrida total de 4 min. La temperatura de la columna fue de 30 °C y el volumen de la inyección de 20 μ L.

La identificación y cuantificación de ATe en muestras de uva se basó en la comparación de los tiempos de retención (t_R) y los valores de absorbancia de los picos detectados en las muestras con aquellos obtenidos por la inyección de estándares puros del analito. Además, las muestras fueron adicionadas con concentraciones conocidas de ATe, en pos de verificar la identificación selectiva del analito y la ausencia de interferencias al tiempo de retención del mismo. Las muestras fueron cuantificadas usando calibración en matriz.

3.3.3 Análisis estadístico

Los datos de producción de ácido tenuazónico en uva con los distintos tratamientos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de LSD-Fisher para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los mismos.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Detección y diferenciación de los microorganismos presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael

Se pudieron detectar y diferenciar distintos microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) presentes en las muestras de uva con síntoma de podredumbre empleando medios selectivos y/o diferenciales y diferentes condiciones de cultivo (figura 11). El crecimiento en medio GYC (25 °C durante 4 días en aerobiosis) permitió distinguir bacterias acéticas dado a la formación un halo clarificador alrededor de la colonia. En el medio de cultivo MRS (25 °C durante 10 días en microaerofilia) se pudo observar el crecimiento de bacterias potencialmente lácticas, y en el medio de cultivo DRBC (25 °C 5 a 7 días en aerobiosis) el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos.

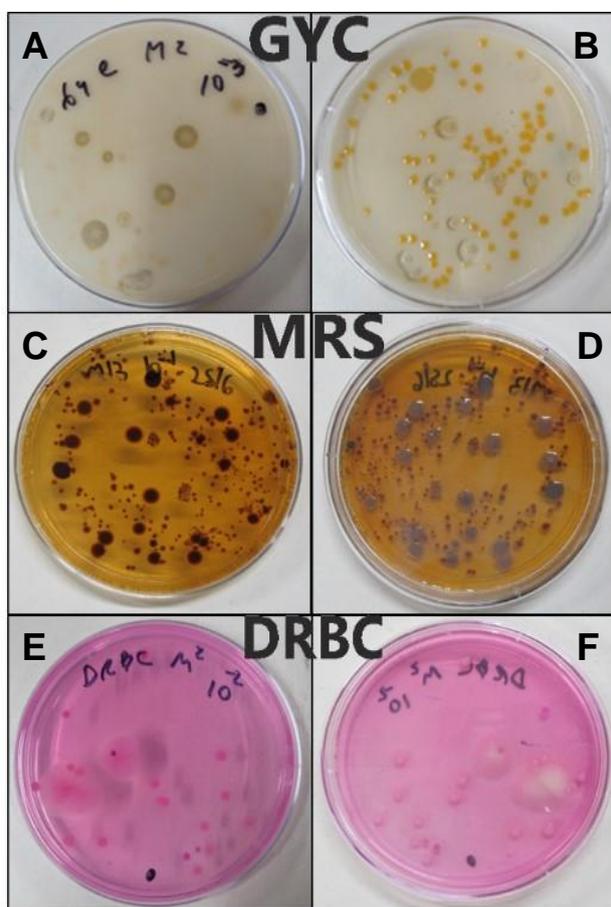


Figura 11: Grupos microbianos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) presentes en los medios selectivos y/o diferenciales a partir de la siembra de 100 μ L de diluciones de las muestras. Muestra 2 diluciones 10^{-3} en medio GYC: A) reverso, B) anverso. Muestra 13 dilución 10^{-1} en medio MRS: C) reverso, D) anverso. Muestra 2 dilución 10^{-2} en medio DRBC: E) reverso, F) anverso.

Asimismo, la tabla 6 muestra los resultados obtenidos a partir del recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en placa de los microorganismos crecidos en los diferentes medios a partir de las muestras con podredumbre. Podemos observar que la muestra 3 (M3: Malbec, Cañada Seca), que presentó la mayor población de hongos filamentosos, presentó también una gran población de levaduras y de bacterias acéticas. Mientras que la muestra 6 (M6: Syrah, Cañada Seca), con la mayor población de bacterias potencialmente lácticas, presentó también una alta población de los demás microorganismos. Por otra parte, tanto la muestra 9 (M9: Cabernet, Cañada Seca) como la muestra 17 (M17: Bonarda, La Llave) presentaron una gran población de bacterias potencialmente lácticas y acéticas acompañadas por una gran población de levaduras. Respecto al resto de las muestras, se pueden agrupar similarmente por presentar poblaciones bajas de todos los grupos microbianos analizados, sugiriendo un bajo nivel de podredumbre en las mismas. Cabe aclarar que aquellas muestras donde los recuentos de bacterias acéticas se presentan en rangos son debido a la presencia de aglomerados de colonias.

Los resultados obtenidos en Tabla 6 también pueden observarse gráficamente mediante el análisis de componentes principales (Fig. 12), que representa de manera simplificada la agrupación de las muestras con podredumbre según la carga microbiana de los diferentes microorganismos evaluados. Los dos primeros componentes principales fueron capaces de explicar el 74,8% de la variación total (CP1: 49,2% y CP2: 25,6%). La variable dependiente levadura se relacionó casi exclusiva y positivamente con el componente CP1, mientras que las otras 3 variables si bien se relacionan mayormente de manera positiva con este componente, también se relacionan con el componente CP2 positiva (bacterias acéticas y bacterias lácticas) y negativamente (hongos). Al relacionar las muestras con las poblaciones podemos observar que las muestras M6, M17 y M9 se correlaciona positivamente con bacterias lácticas, mientras que las muestras M1 y M7 se vinculan con las bacterias acéticas. La muestra M3 se correlaciona positivamente con hongos.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas (MANAVA, Hotelling Bonferroni, $p > 0.05$) entre las poblaciones de hongos, levaduras, bacterias acéticas ni de bacterias potencialmente lácticas obtenidas a partir de muestras con podredumbre de la variedad Bonarda pertenecientes a las diferentes zonas de la región vitivinícola de San Rafael muestreadas (La Llave; Cañada Seca; Cuadro Nacional; Rama Caída). Esto podría sugerir que la localización de las podredumbres en las diferentes zonas muestreadas no sería un factor de variabilidad.

Tabla 6: Población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias (UFC/mL)^a en muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre pertenecientes a diferentes zonas de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017.

| Muestra | Variedad | Ubicación | Hongos filamentosos ^b | Levaduras ^b | Bacterias acéticas ^c | Bacterias lácticas ^d |
|---------|-------------|-----------------|----------------------------------|------------------------|---|---------------------------------|
| M1 | Bonarda | La Llave | 2,00 x 10 ⁵ | 5,50 x 10 ⁴ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 8,00 x 10 ³ |
| M2 | Bonarda | Rama Caída | 5,50 x 10 ² | 1,80 x 10 ⁴ | 8,00 x 10 ⁴ | 5,90 x 10 ⁴ |
| M3 | Malbec | Cañada Seca | 1,25 x 10 ⁶ | 2,95 x 10 ⁵ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 5,40 x 10 ⁴ |
| M4 | Bonarda | La Llave | ND | ND | 2,60 x 10 ⁵ | 3,80 x 10 ⁵ |
| M5 | Bonarda | Rama Caída | 1,55 x 10 ⁵ | 1,75 x 10 ⁵ | 4,50 x 10 ⁴ | 7,31 x 10 ⁴ |
| M6 | Syrah | Cañada Seca | 5,45 x 10 ⁵ | 3,10 x 10 ⁵ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 1,68 x 10 ⁶ |
| M7 | Cereza | Cañada Seca | 1,00 x 10 ² | 1,76 x 10 ⁵ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 1,72 x 10 ⁴ |
| M8 | Mezcla | La Llave | 7,50 x 10 ² | ND | 4,20 x 10 ⁵ | 9,90 x 10 ⁵ |
| M9 | Cabernet S. | Cañada Seca | 8,00 x 10 ⁴ | 3,40 x 10 ⁵ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 7,05 x 10 ⁴ |
| M10 | Bonarda | La Llave | 1,00x10 ² | 1,80 x 10 ⁴ | 1,55 x 10 ⁴ | 2,47 x 10 ⁴ |
| M11 | Cereza | La Llave | 6,50x 10 ² | 1,45 x 10 ⁴ | 3,00 x10 ⁵ - 3,00 x10 ⁶ | 5,00 x 10 ² |
| M12 | Bonarda | Cuadro Nacional | 1,00 x 10 ² | 3,80 x 10 ⁴ | 5,50 x 10 ⁴ | 4,05 x 10 ³ |
| M13 | Criolla | Cañada Seca | 1,50 x 10 ⁴ | 1,75 x 10 ⁴ | 1,75 x 10 ⁴ | 2,29 x 10 ⁴ |
| M14 | Bonarda | Cuadro Nacional | ND | 7,51 x 10 ⁴ | 7,20 x 10 ⁴ | 5,8 x 10 ⁴ |
| M15 | Torrontés | La Llave | ND | 6,75 x 10 ⁴ | 2,00 x 10 ⁵ | 1,68 x 10 ⁵ |
| M16 | Bonarda | Cañada Seca | ND | 3,00 x 10 ³ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 1,30 x 10 ⁴ |
| M17 | Bonarda | La Llave | 4,00 x 10 ⁵ | 1,85 x 10 ⁵ | 3,00 x 10 ⁵ - 3,00 x 10 ⁶ | 6,35 x 10 ⁵ |

^aPromedio de las UFC/mL obtenidas en las diluciones correspondientes de cada grupo microbiano.

^bIncubación a 25 °C 5 días en DRBC.

^cIncubación 4 días a 25 °C en GYC.

^dIncubación 11 días a 25 °C en MRS (microaerofilia).

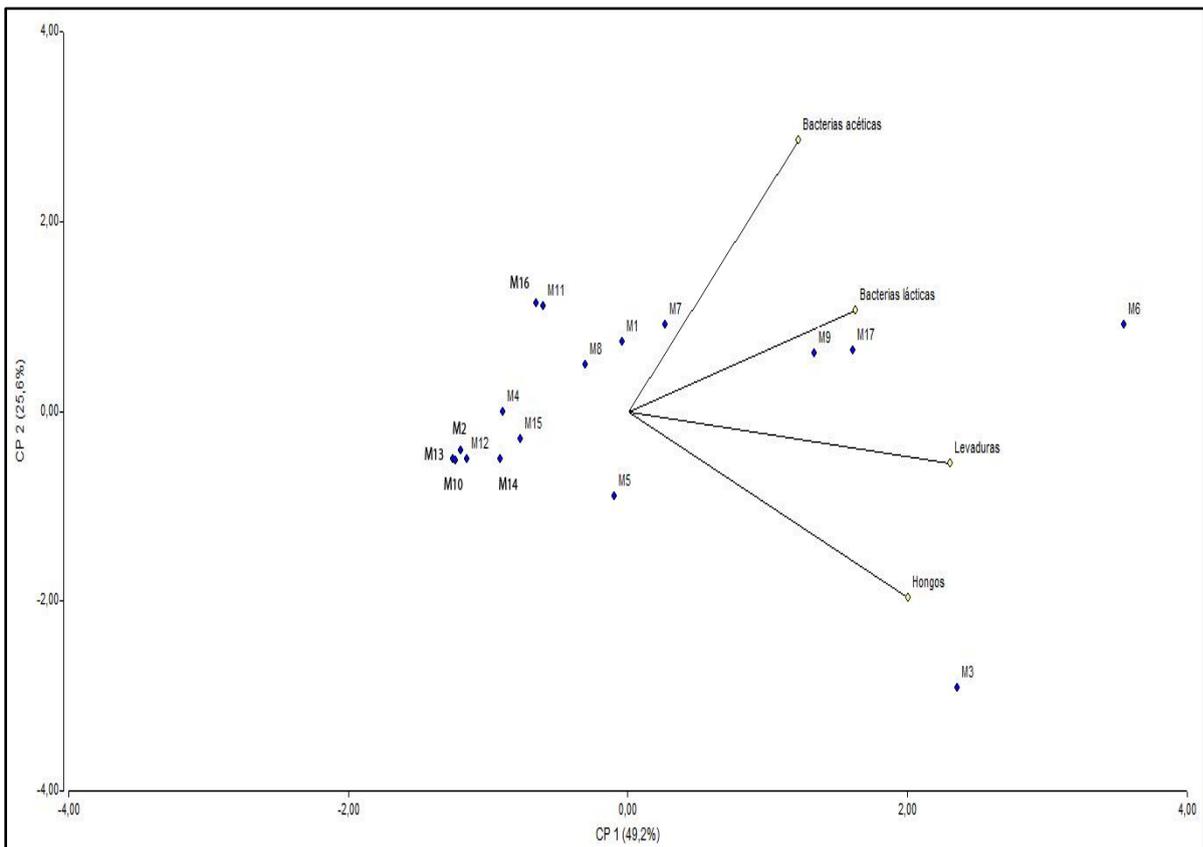


Figura 12: Gráfico Biplot de los 2 primeros componentes principales de las UFC/mL de hongos filamentosos, levaduras, bacterias acéticas y lácticas.

4.2 Aislamiento e identificación de los hongos filamentosos y levaduras presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael

La identificación a nivel de género de los hongos filamentosos aislados (Pitt y Hocking, 2009) permitió distinguir principalmente la presencia de *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* (figura 13).

Descripción morfológica *Alternaria*: Conidios expulsados de los ápices de conidióforos indistinguibles en forma de conidióforos cortos e irregularmente ramificados. Cadenas de hasta 10 unidades, y luego septando ambas lateral y longitudinalmente, con hasta seis transversales y de dos a tres tabiques longitudinales u oblicuos, generalmente de forma clavada o piriforme en general, ahusándose hacia los ápices, formando un pico corto, en cultivo generalmente 20–40 8–12 mm, con paredes lisas a conspicuamente rugosas.

Descripción morfológica *Penicillium*: el conidióforo que presenta en forma de pincel. Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada, la fiálide. El conidióforo está unido al micelio mediante el estipe. Entre ésta y las fiálides pueden aparecer

diferentes células. Estas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. Aparte del de las fiálides, los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente, tres, a lo largo del conidióforo. La célula de soporte de la fiálide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama, en las especies que las presentan. Estas ramas parten del estipe, aunque pueden partir, a su vez, de otras ramas

Descripción morfológica de *Cladosporium*: presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena.

Descripción morfológica de *Aspergillus*: producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas.

Como podemos observar en la figura 14, el género fúngico mayoritario presente en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael, resultó *Alternaria* (77,84%), seguido por *Penicillium* (10,94%), *Aspergillus* (9,87%), *Cladosporium* (1,33%) y *Phoma* (0,03%), con un 0,01 % del total que no pudo ser identificado por este método.

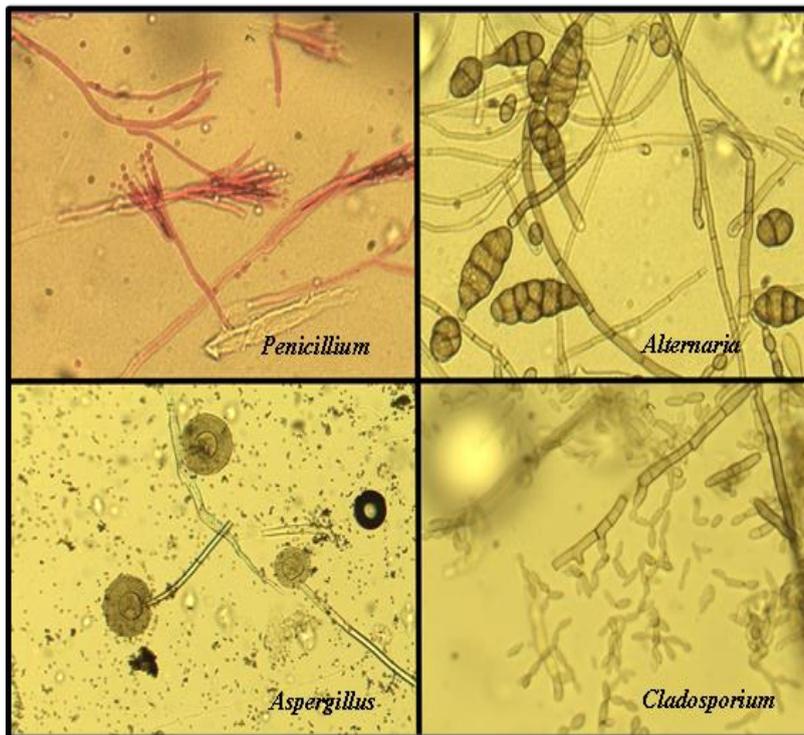


Figura 13: Microscopía óptica (400x) correspondiente a los géneros fúngicos *Penicillium* (con lactofucsina), *Alternaria*, *Aspergillus* y *Cladosporium*.

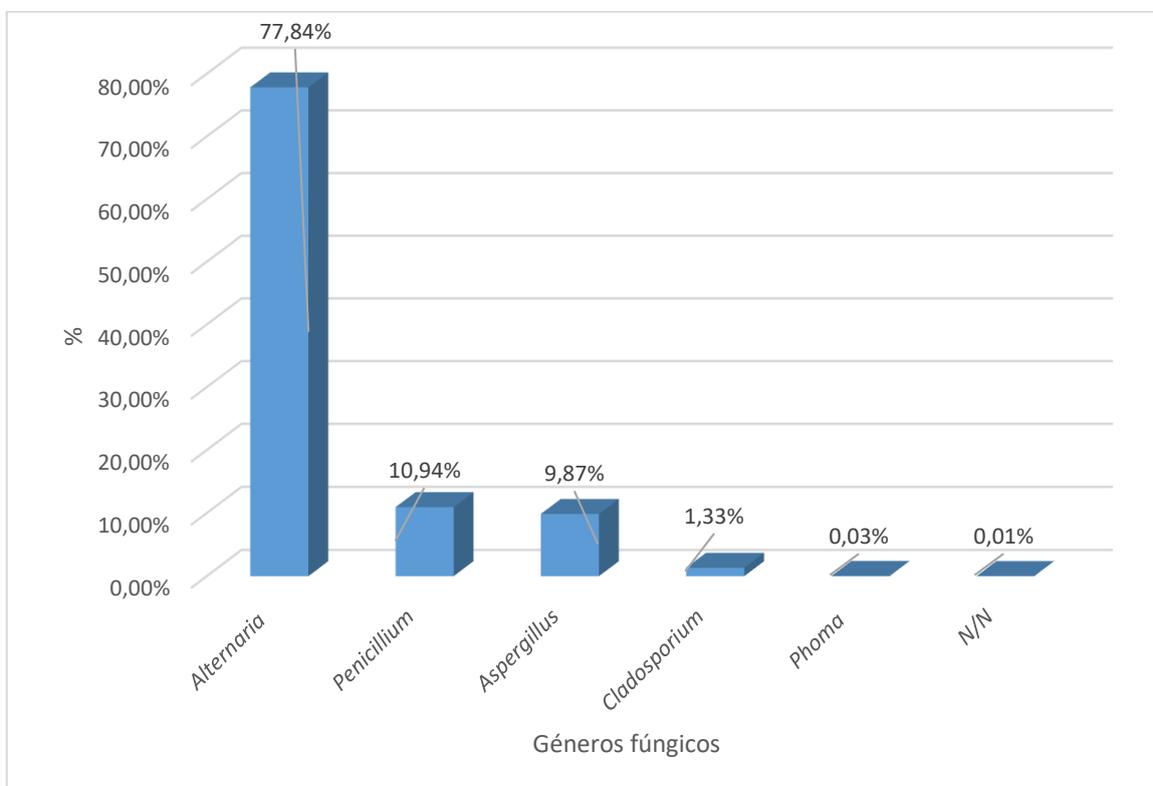


Figura 14: Porcentaje de los géneros fúngicos presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017.

Asimismo, en la tabla 7 se puede observar que las muestras M7 y M17 fueron las únicas que no presentaron contaminación con *Alternaria*, siendo mayoritario *Aspergillus* en M7 y *Aspergillus* y *Penicillium* en M17. Mientras que la carga fúngica presente en las muestras M6 como en M8 no pudo ser recuperada (datos no mostrados).

Estos resultados resultan similares a los obtenidos en uva Malbec sana de la región vitivinícola de San Rafael durante las vendimias 2011, 2012 y 2013, en lo que respecta al género mayoritario *Alternaria* (80%), salvo que este fue seguido por *Cladosporium* (7%) y con una incidencia menor de *Penicillium* (4%) y *Aspergillus* (3%) (Prendes et al., 2015).

Tabla 7: Porcentaje de los diferentes géneros fúngicos en cada muestra de uva para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017.

| Géneros | muestras | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------|------|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------|
| | M1 | M2 | M3 | M5 | M7 | M9 | M10 | M11 | M12 | M13 | M17 |
| <i>Alternaria</i> | 95,5 | 81,8 | 98,9 | 82,2 | 0,0 | 93,8 | 100,0 | 76,9 | 100,0 | 33,3 | 0,0 |
| <i>Penicillium</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,8 | 0,0 | 6,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 33,3 | 50,0 |
| <i>Aspergillus</i> | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 33,3 | 50,0 |
| <i>Cladosporium</i> | 3,9 | 18,2 | 1,1 | 3,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 23,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Phoma</i> | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| NN | 0,0 | 27,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Por otro lado, las levaduras aisladas pudieron ser identificadas a nivel género y especie mediante el método molecular de amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 de ADN seguido de la digestión (RFLP) (Esteve-Zarzoso y col. 1999, Fernández-Espinar y col. 2006) y análisis de los patrones obtenidos (YEAST-ID). En la figura 15 podemos observar el perfil obtenido en gel de agarosa (2%) para las especies de levadura *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Hanseniaspora viniae*.

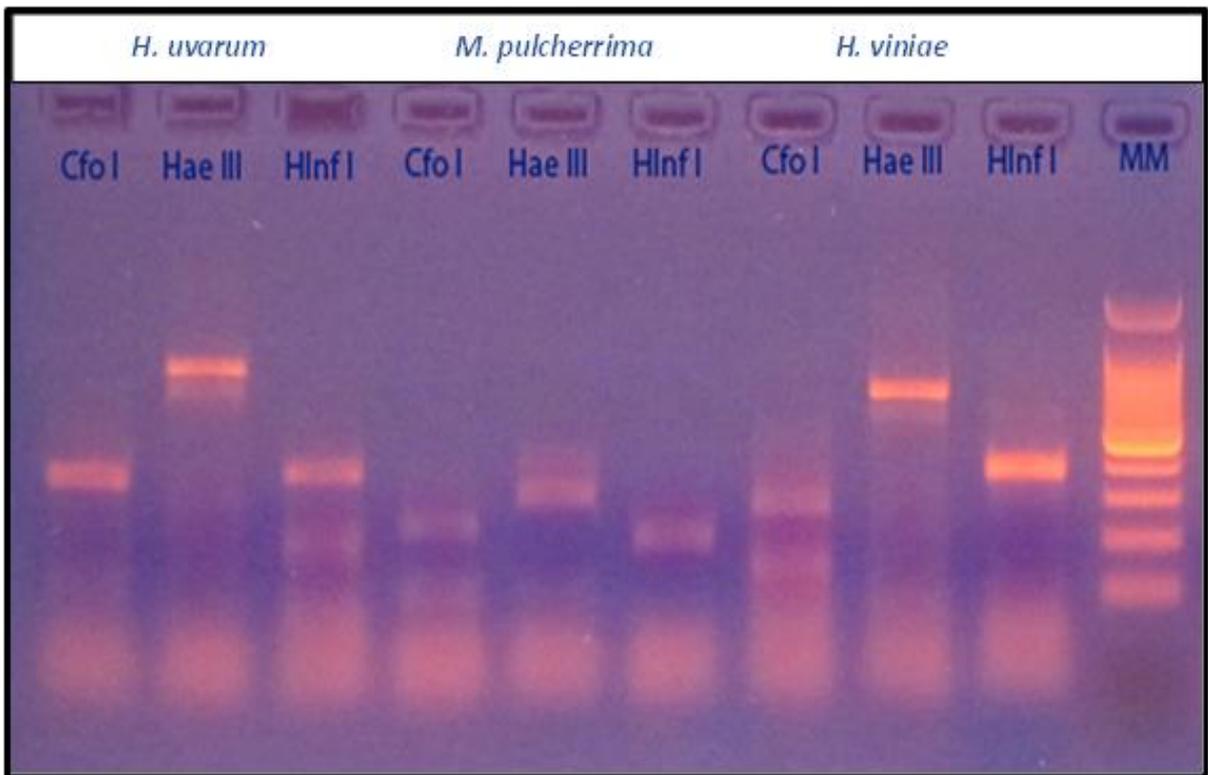


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación por PCR de la región génica ITS1-5.8-ITS2 de levaduras y posterior restricción mediante las enzimas *Cfo I*, *Hae III* y *Hinf I*. MM: marcador de peso molecular de escala 100 bp (de abajo a arriba: 100, 200, 300, 400, 500, etc, pares de bases).

Como podemos observar en la figura 16, *Metchnikowia pulcherrima* fue la levadura de mayor incidencia (27,0%), seguida por *Aureobasidium pullulans* (23,0%), *Zygosaccharomyces bailii* (14,2%) *Hanseniaspora uvarum* (9,9%), *Hanseniaspora viniae* (8,9%), *Hanseniaspora guillermondii* (8,8%). El 8,2% de las levaduras no pudieron ser recuperadas y por lo tanto tampoco identificadas. Asimismo, la tabla 8 muestra la variabilidad de especies obtenidas según cada muestra en particular. Se puede observar que las muestras M2, M3, M5 y M13 fueron las que presentaron mayor contaminación con *M. pulcherrima*. Además, la M1, M9 y M11 fueron las que mayor porcentaje de *A. pullulans* presentaron. La muestra M7 presentó una alta contaminación de *Z. bailii*, así como las muestras M6 y M16.

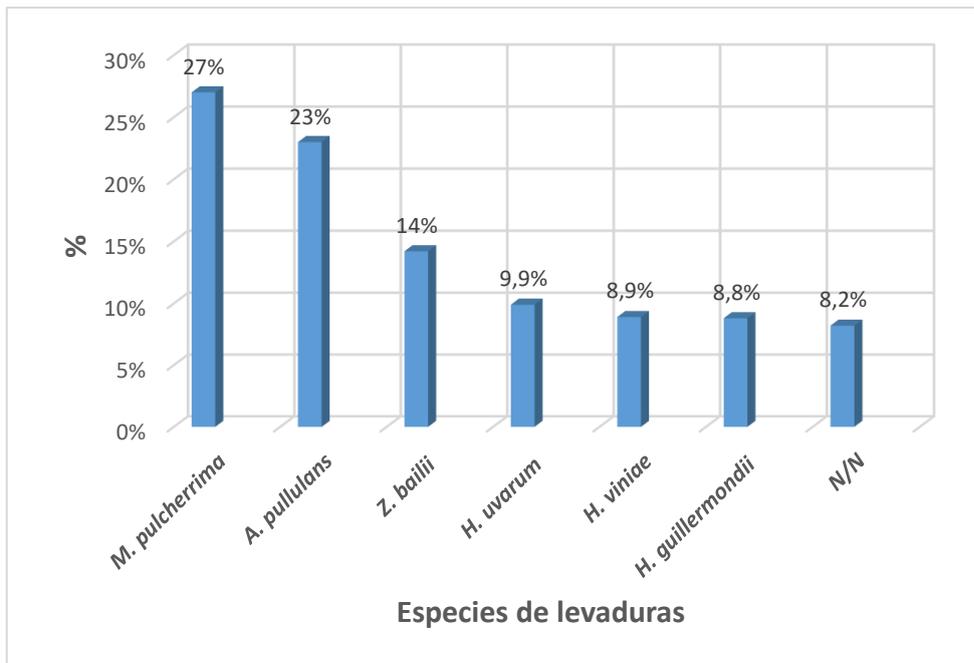


Figura 16: Porcentaje de las especies de levadura presentes en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre cosecha 2017

Estos resultados muestran diferencias con respecto a lo obtenido previamente en uva Malbec sana de la región vitivinícola de San Rafael durante las vendimias 2011, 2012 y 2013. Allí se determinó que el 82 % del total de aislados pertenecía al organismo tipo levadura *A. pullulans*, el 6,3 % a la levadura *H. uvarum*, el 5,4 % a la levadura *M. pulcherrima*, el 2,7 % a la levadura *Cryptococcus laurentii II* (*Cr. laurentii II*), el 2,7 % a la levadura *Starmerella bacillaris* (antiguamente *C. zemplinina*) y el 0,9 % a la levadura *Rhodotorula spp.* (Prendes et al., 2018). Especialmente, la incidencia de la levadura *Metchnikowia pulcherrima* aumentó considerablemente en uva con síntomas de podredumbre, quedando mayoritaria, mientras que algunas especies aparecieron sólo en uva sana (*Cr. laurentii II*, *S. bacillaris* y *Rhodotorula spp*) y otras sólo en uvas con síntomas de podredumbre en proporciones importantes (*Z. bailii*, *H. viniae* y *H. guillermondii*).

Tabla 8: Porcentaje de las diferentes especies de levaduras en cada muestra de uva para vinificar con síntomas de podredumbre obtenida de la región vitivinícola de San Rafael vendimia 2017.

| Especie | muestras | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | M1 | M2 | M3 | M5 | M6 | M7 | M9 | M10 | M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 |
| <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | 33,3 | 78,9 | 79,7 | 51,4 | 26,6 | 0,0 | 8,8 | 0,0 | 10,3 | 2,6 | 54,3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | 66,7 | 15,8 | 11,9 | 5,7 | 15,6 | 0,0 | 70,6 | 0,0 | 72,4 | 0,0 | 3,8 | 0,0 | 40,7 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 26,6 | 96,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 33,3 | 0,0 |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 0,0 | 5,3 | 6,8 | 14,3 | 7,8 | 0,0 | 17,6 | 34,7 | 0,0 | 52,6 | 36,2 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Hanseniaspora viniae</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 23,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 59,3 | 66,7 | 24,3 |
| <i>Hanseniaspora guillermondii</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,4 | 0,0 | 58,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 75,7 |
| NN | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 28,6 | 0,0 | 0,0 | 2,9 | 6,9 | 17,2 | 44,7 | 5,7 | 79,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

4.3 Evaluación de ácido tenuazónico (ATe) en uvas para vinificar con síntomas de podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael.

La frecuencia de incidencia natural de ATe fue elevada (94,12%), como podemos observar en la tabla 9, sólo la muestra 2 no presentó contaminación (límite de detección, 10 µg/kg) y la muestra 9, de variedad Cabernet Sauvignon, fue la que mayor cuantificación de ácido tenuazónico presentó (1395,68 µg/kg).

Por otra parte, el análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas en la concentración de ATe de las diferentes variedades de uva para vinificar, siendo Cabernet S. la variedad de mayor concentración (ANOVA, LSDfisher, $p < 0.05$). Asimismo, Cañada Seca resultó la ubicación con mayor concentración de ATe en sus uvas con podredumbre y las uvas que fueron recolectadas tardíamente mostraron una mayor concentración de ATe (ANOVA, LSDfisher, $p < 0.05$). No se encontró correlación entre la carga microbiana de *Alternaria* (UFC/mL) y la concentración de ATe de las muestras (Pearson, $p > 0.05$), sugiriendo la intervención de otros factores posiblemente ambientales que puedan favorecer o no la producción de ATe (Prendes y col., 2016).

Un estudio previo realizado en 14 muestras de uvas Malbec de la región vitivinícola de San Rafael durante la vendimia 2015 mostró una frecuencia de incidencia de ATe del 57%, con niveles de 10 µg/kg a 96 µg/kg para uvas sanas (13) y de 595 µg/Kg para la única muestra visiblemente infectada (M14) (Fontana et al., 2016). En otro trabajo realizado durante la vendimia 2016, el 16,2% (6/37) del total de muestras de diferentes variedades de uva para vinificar tanto sanas como con podredumbre de la región vitivinícola de San Rafael mostraron contaminación por ATe, con un 4% (1/25) de incidencia en muestras sanas (77 µg/kg) y 42% (5/12) en muestras de uva con podredumbre (10– 778 µg/kg) (Prendes et al., 2018b). Particularmente, los resultados obtenidos durante la vendimia 2017 muestran una mayor incidencia de ATe en las uvas para vinificar con síntomas de podredumbre y mayores valores máximos, representando un riesgo toxicológico.

Tabla 9: Cuantificación de ácido tenuazónico (ATe) en muestras de uva para vinificar con síntomas de podredumbre de las diferentes zonas de la región vitivinícola de San Rafael, vendimia 2017.

| Muestra | Variedad | Ubicación | Recolección^a | ATe ($\mu\text{g}/\text{kg}$)^b |
|----------------|-----------------|------------------|--------------------------------|---|
| M1 | Bonarda | La Llave | R2 | <LC |
| M2 | Bonarda | Rama Caída | R2 | N.D. |
| M3 | Malbec | Cañada Seca | R3 | 127,42 \pm 11,45 |
| M4 | Bonarda | La Llave | R2 | 249,29 \pm 0,00 |
| M5 | Bonarda | Rama Caída | R3 | <LC |
| M6 | Syrah | Cañada Seca | R1 | 76,90 \pm 0,00 |
| M7 | Cereza | Cañada Seca | R1 | <LC |
| M8 | Mezcla | La Llave | R2 | 103,47 \pm 25,00 |
| M9 | Cabernet S. | Cañada Seca | R3 | 1395,68 \pm 32,95 |
| M10 | Bonarda | La Llave | R1 | <LC |
| M11 | Cereza | La Llave | R1 | 75,61 \pm 17,68 |
| M12 | Bonarda | Cuadro Nacional | R2 | 67,27 \pm 19,36 |
| M13 | Criolla | Cañada Seca | R2 | <LC |
| M14 | Bonarda | Cuadro Nacional | R2 | <LC |
| M15 | Torrontés | La Llave | R2 | 140,14 \pm 14,10 |
| M16 | Bonarda | Cañada Seca | R3 | <LC |
| M17 | Bonarda | La Llave | R2 | <LC |

^a Tiempo de recolección R1: desde 15/03/2017; R2: desde 31/3/2017; R3 desde 21/4/2017.

^b Promedio de ácido tenuazónico y su respectiva desviación estándar.

N.D., no detectado por ser menor que el límite de detección (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

<LC, menor al límite de Cuantificación (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

5. CONCLUSIONES

-El agrupamiento de las muestras con podredumbre según la carga microbiana de los microorganismos evaluados permitió inferir distintos tipos de podredumbres presentes en la región vitivinícola de San Rafael.

-No se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de hongos, levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas obtenidas a partir de muestras con podredumbre de la variedad Bonarda pertenecientes a las diferentes zonas de la región vitivinícola San Rafael.

-*Alternaria* fue el hongo mayoritario aislado de las muestras de uva con síntomas de podredumbre, seguido en menor medida por *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*.

-*Metchnikowia pulcherrima* fue la levadura de mayor incidencia en las muestras de uva con síntomas de podredumbre, seguida por *Aureobasidium pullulans*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora viniae* y *Hanseniaspora guillermondii*.

-Se encontró una elevada frecuencia de ocurrencia natural de ATe (94%).

BIBLIOGRAFÍA

- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venâncio, A. (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 240-242.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259.
- 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.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Varrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd Edition, Univ. Press, Cambridge.
- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M. L., Ramos, A. J., Bragulat, M. R. (2006a). Mycobiota and ochratoxin A producing from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 40-45.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2006b). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape- like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23(10), 1021-1029.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabanes, F.J. (2008). Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 286-289.
- Briceño, E. X., Latorre, B. A., & Schwarze, E. B. (2009). Effect of *Cladosporium* rot on the composition and aromatic compounds of red wine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1), 119-128.
- Broggi, L., Reynoso, C., Resnik, S., Martinez, F., Drunday, V., Romero Bernal, A. (2013). Occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages from the Entre Rios Province market, Argentina. *Mycotoxin Research*, 29, 17-22.
- Catania, C. D., Avagnina, S., Uliarte, E.M., del Monte, R.F. y Tonietto, J. (2007). Caracterización climática de regiones vitivinícolas ibero-americanas. El clima vitícola de las regiones productoras de uvas para vinos de Argentina. (1ª ed.). Brasil: Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26, 801–808.

- Chiotta, M., Ponsone, M.L., Combina, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N. (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 137-141.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1055–1061.
- Comitini, F., Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, 58(3), 489-493.
- Cuchi, N. y Becerra, V. (2009). Manual de tratamientos fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego sección III: Vid.
- Curtis y Barnes (2008). *Curtis Biología*
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdieu, D. (2000). Identification and quantification of geosmin, a powerful earthy odorant contaminating wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4835-4838.
- Da Rocha Rosa, C., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., Rekson, A. D., Magnoli, C. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19, 408-414.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosach, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Delgado, T., Gómez-Cordovés C. (1998) Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 815, 93–97.
- Diaz, G.A., Torres, R., Vega, M., Latorre, B.A. (2009). Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *Food Microbiology*, 133, 195-199.
- Diguta, C.F., Vincent, B., Guilloux-Bénatier, M., Alexandre, H., Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28, 1145-1154.
- Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guérin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M. (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient

gel electrophoresis e potentialities and limit of the method. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1340-1350.

EFSA on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011). Scientific opinion on the risk for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *E.F.S.A. Journal*, 9(10): 2407. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407> (97 pp.)

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by R.F.L.P. analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 329–337.

Fan, C., Cao, X., Liu, M., Wang, W. (2016). Determination of *Alternaria* mycotoxins in wine and juice using ionic liquid modified countercurrent chromatography as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1436, 133-140.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. En: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, Signpost, Kerala, India, pp. 1– 17.

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *Food Microbiology*, 86, 11– 32.

Fontana, A. R., Prendes, L. P., Morata, V. I., & Bottini, R. (2016). High-throughput modified QuEChERS method for the determination of the mycotoxin tenuazonic acid in wine grapes. *RSC Advances*, 6(98), 95670-95679.

Gomez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S., Cabanes, F.J., (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology*, 23, 541-545.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169, 387–392.

Hall, M. E., O'Bryon, I., Wilcox, W. F., Osier, M. V., & Cadle-Davidson, L. (2019). The epiphytic microbiota of sour rot-affected grapes differs minimally from that of healthy grapes, indicating causal organisms are already present on healthy berries. *PloS one*, 14(3), e0211378.

INTA (2013). Estrategias de manejo para el control de enfermedades de vid en épocas de cosecha.

- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2021). Kg de uva elaborados por variedad y por color.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2021). Informe Anual de Superficie 2021, base de datos congelado al 31/12/21.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2016). Producción total de uva según origen del viñedo. Elaborado: Departamento de Estadísticas y Estudios de Mercado.
- Izzeddin A., N., y Medina T., L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15 (3), 8-12.
- Kakalikova, L., Jankura, E., Srobarova, A. (2009). First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 68-69.
- Kassemeyer, H.H., Berkelmann-Löhnertz, B. (2009). Fungi of grapes. En: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 61-87.
- Kennedy, J. 2002. Comprensión del desarrollo de la uva. *Práctica Bodega y Viñedo*.
- Kurtzman, C.P., Phaff, H.J. (1987). Molecular taxonomy. En: Rose A.H., Harrison A.J.S (Eds.), *The Yeasts: Biology of Yeasts*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 63-94.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds). (1998). *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4th edn. Elsevier Science, B.V., The Netherlands.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). *The Yeasts: A taxonomic Study*. 3rd edition. Elsevier Science Publications, Amsterdam, The Netherlands.
- Laforge, R., Guérin, L., Pernelle, J.J., Monet, C., Dupont, J., Bouix, M., (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Applied Microbiology*, 107, 1208-1218.
- La Guerche, S., Gracia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D., Labarère, J. (2004). Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. *Current Microbiology*, 48, 405-411.
- La Guerche, S., Chamont, S., Blancard, D., Dubourdieu, D., Darriet, P. (2005). Origin of (-)-geosmin on grapes: on the complementary action of two fungi, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 131-139.

- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9193-9200.
- La Guerche, S., De Senneville, L., Blancard, D., Darriet, P. (2007). Impact of the *Botrytis cinerea* strain and metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 331-341.
- Lau, B. P. Y., Scott, P. M., Lewis, D. A., Kanhere, S. R., Cléroux, C., Roscoe, V. A. (2003). Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *Journal of Chromatography A*, 998(1), 119-131.
- Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A., (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 376-379.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129-140.
- López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten, J. M., Mol, H. G., de Nijs, M. (2016). Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control*, 60, 196-204.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 131-139.
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., Masneuf-Pomarède, I. (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 93–100.
- Martínez de Toda (2008). Claves de la vitivinicultura de calidad, nuevas técnicas de estimación y control de la calidad de la uva en viñedo
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.
- Medina, A., Mateo, R., Laura Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F. M., Jimenez, 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, 4696-4702.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A., Mliki, A., (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 245-250.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Mliki, A. (2009). Isolation and characterization of ochratoxin A and aflatoxin B1 producing fungi infecting grapevines cultivated in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 523-527.

Morales-Valle, H., Silva, L.C., Paterson, R.R., Oliviera, J.M., Venacio, A., Lima, N., (2010). Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal « off » volatiles in grape juice. *Journal of Microbiology Methods*, 83, 48-52.

Morales-Valle, H., Silva, L.C., Paterson, R.R., Venacio, A., Lima, N. (2011). Effects of the origins of *Botrytis cinerea* on earthy aromas from grape broth media further inoculated with *Penicillium expansum*. *Food Microbiology*, 28, 1048- 1053.

Mortimer, R., Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), 199-204.

Mundy, D., C., Casonato, S.G., Manning, M.A. (2009). Incidence of fungi isolated from grape trunks in New Zealand vineyards. *The Australasian Plant Pathology Society*, New Castle City Hall NSW Australia, p. 86.

Nally, M.C., Pesce, V., M., Maturano, Y. P., Munoz, C.J., Combina, M., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64, 40–48.

Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Toro, M. E., Combina, M., Castellanos de Figueroa L. I., Vazquez, F. (2013). Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 456–462.

Navarrete, F., Abreo, E., Bettucci, L., Martínez, S., & Lupo, S. (2009). First report of *Greeneria uvicola* as cause of grapevine dead-arm dieback in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 117-119.

- Nisiotou, A. A., Nychas, G. J. E. (2007). Yeast populations residing on healthy or Botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765-2768.
- OIV (2019). Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial 2019.
- Oriolani, E. J. A., Rodriguez Romera, M. C., & Combina, M. (2009). La podredumbre ácida de los racimos de la vid en los viñedos de San Juan y Mendoza. In Simposio Internacional de Uva de Mesa y Pasa. 2. 2009 11 05-07, 5, 6 y 7 de noviembre de 2009. Pocito, San Juan. AR.
- Oriolani, E., Rodriguez Romera, M., y Combina, M. (2012). Determinación de la agresividad de las levaduras que producen la podredumbre ácida en los racimos de la vid en Mendoza y San Juan, Argentina. In Manual de Poscosecha de de Frutas. Manejo integrado de patógenos, pp. 18. Ediciones INTA.
- Paterson, R. R. M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., & Rousseaux, S. (2018). Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food research international*, 103, 478-491.
- Pitt, J., Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd ed.). New York: Springer.
- Ponsone, M. L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S. (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 131-135.
- Prakitchaiwattana, C., J., Fleet, G., H., Heard, G., M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 865-877.
- Prendes, L.P, Merín, M.G., Andreoni, M.A., Ramirez, M.L., Morata de Ambrosini, V.I. (2015). Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina. *Food Control*, 57, 122-128.
- Prendes, L. P., Zchetti, V. G. L., Pereyra, A., Morata de Ambrosini, V. I., & Ramirez, M. L. (2016). Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. *Journal of applied microbiology*, 122(2), 481-492.
- Prendes, L. P., Fontana, A. R., Merín, M. G., D' Amario Fernández, A., Bottini, R., Ramirez, M. L., & Morata de Ambrosini, V. I. (2018). Natural occurrence and production of tenuazonic acid in wine grapes in Argentina. *Food science & nutrition*, 6(3), 523-531.

- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20, 61–74.
- Raspor, P., Milek, D., M., Polanc, J., Možina, S., S., Čadež, N., (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1), 97-102.
- Rementería, A., Rodríguez, J., A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J., R., Hernando, F., L., Sevilla, M., J., (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 201-207.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (Eds) (2000) Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeast. *Handbook of Enology – The Microbiology of Wine and Vinifications*. Vol. 1, John Wiley and Sons Ltd, New York, NY, USA, pp. 1–49.
- Richard J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.
- Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoi-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M. (2014). Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104-121.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E. E. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1306-1311.
- Sage, L., Garon, D., Egle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 5764- 5768.
- Scott, P.M. (2004). Other mycotoxins. En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.). *Micotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 406-409.
- Scott, P., Lawrence, B., Lau, B. (2006). Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22, 142-147.

- Serra, R., Bragab, A., Venâncio, 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., Lourenço, A., Alipio, P., Venancio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110, 971-978.
- Sidhu, G.S. (2002). Mycotoxin genetics and gene clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 705–11.
- Smith, M.T. (1998). *Hanseniaspora* Zikes. En: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 214–220
- Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5189-5206
- Steel, C.C., Greer, L.A., Savocchia, S. (2007). Studies on *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*: two fungi associated with bunch rot of grapes in sub-tropical Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 23-29.
- Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5189-5206.
- 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.
- Tratado de Viticultura I JOSE HIDALGO TOGORES, LUIS HIDALGO FERNÁNDEZ-CANO.
- Uyovbisere, E., Alabi, O., Akpa, A., D., Chindo, P., S. (2007). Seasonality of the mycoflora on the crown disease complex of the vegetative organs of the grapevine *Vitis vinifera* var Anap-e-Shahe. *African Journal of Biotechnology*, 6, 544- 552.
- Viñas I, Bonet J, Sanchis V. (1992). Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples. *Letters on Applied Microbiology*, 14, 284-287.
- Yekeler, H., Bitmiş, K., Özçelik, N., Doymaz, M.Z., Çalta, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology*, 29(4), 492-497.