



Alternaria Mikotoksinleri ve Önemi^A

Berna TUNALI¹, Yeter KÜÇÜKTOPÇU¹, Nazlı TUNALI²,
Songül ERKEN MERAL³, Seçil EKER⁴, Bayram KANSU^{5*}

Öz: *Alternaria*, dünyada yaygın olarak görülen önemli bir fungus cinsi olup Ascomycota bölümü, Dothideomycetes sınıfı, Pleosporales takımı ve Pleosporaceae familyasında yer almaktadır. *Alternaria* cinsi içerisinde, saprofitik, endofitik ve patojenik türler yer almaktadır. Patojen türler arasında ise bitki patojenleri, hasat sonrası patojenler veya insan patojenleri de bulunmaktadır. *Alternaria* spp. alternariol (AOH), alternariol monometil eter (AME), tenuazonik asit (TEA), altenuen (ALT) ve alvertoksin (AT) gibi önemli bazı mikotoksinleri üretmektedir. Mikotoksinler, insan besin zincirine çeşitli şekillerde girebilmekte, birçok farklı gıda ve hayvan yemi ürününde bulunabilmektedir. Bu mikotoksinler, insanlar, memeliler ve diğer hayvanlar tarafından ağız yoluyla alınırsa, mikotoksikoz adı verilen toksik bir tepkiye neden olabilmektedir. Birçoğunun kanserojen olduğu bilinmektedir. Diğerlerinin de cilt hassasiyetinden immün yetmezliğe kadar değişen nörotoksikolojik etkilerle birlikte karaciğer veya böbrek fonksiyonunun bozulması gibi insanlarda çeşitli farklı tepkiler ortaya çıkardığı gösterilmiştir. *Alternaria* spp., özellikle su aktivitesi (a_w), sıcaklık ve pH gibi abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Literatürdeki çalışmalara göre bazı tahıl taneleri dahil sorgum, pamuk tohumu,

^A Bu çalışma için etik kurul izni gerekmemektedir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ⁵Bayram KANSU, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 55100 İlkadım/Samsun, bayramkansu@omu.edu.tr, **OrcID:** 0000-0001-5663-0528

¹ Berna TUNALI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 55139 Atakum/Samsun, btunali@omu.edu.tr, **OrcID:** 0000-0003-2798-0777

¹ Yeter KÜÇÜKTOPÇU, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 55139 Atakum/Samsun, ybilgili46@gmail.com, **OrcID:** 0000-0002-2104-5764

² Nazlı TUNALI, Department of Psychiatry, Indiana University, USA, nazlicandemir@gmail.com, **OrcID:** 0000-0002-6293-8630

³ Songül ERKEN MERAL, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Bölümü, Tekkeköy/Samsun, songul.erken@tarimorman.gov.tr, **OrcID:** 0000-0002-2183-3269

⁴ Seçil EKER, Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Altınordu/Ordu, secileker@odu.edu.tr, **OrcID:** 0000-0002-5409-6226

domates ve soya fasulyesi gibi farklı substratlar fungusun çoğalması ve toksin üretimi ile ilişkilendirilmiştir. *Alternaria* toksinlerinin incelenmesinde ELISA, sıvı kromatografi ve PCR temelli analizler en kullanışlı yöntemler olarak görülmektedir. Bu derleme, *Alternaria* türlerinin önemini, ekolojilerini, mikotoksin üretimi ve sıcaklıklardaki etkileri ile mikotoksin analiz metodlarını içermektedir. Derleme özellikle, *Alternaria* türlerinin oluşturdukları mikotoksinler hakkında genel bir bilgi sunmak ve önemine dikkat çekmek amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Alternaria* türleri, mikotoksin, insan sağlığı, kromatografi, inceleme.

Alternaria Mycotoxins and Their Importance

Abstract: *Alternaria*, which are an important genus of fungi that are ubiquitous in the environment, belongs to the Ascomycota division, Dothideomycetes class, Pleosporales order, and Pleosporaceae family. The *Alternaria* genus includes saprophytic, endophytic, and pathogenic species, whereas the pathogenic species include plant, post-harvest, and human pathogens. *Alternaria* spp. produce some important mycotoxins such as alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), tenuazonic acid (TEA), altenuene (ALT) ve altertoxin (AT). These mycotoxins can gain access to the human food chain and exist in many different food products and forage. When ingested orally by humans, mammals, or other animals, these mycotoxins may cause mycotoxicosis, which is a toxic reaction. Many of these mycotoxins are known to be carcinogenic, while some others are shown to disrupt liver and kidney functions as well as have neurotoxicological effects ranging from skin hypersensitivity reactions to immunologic deficiency syndromes. *Alternaria* spp. can get affected by abiotic factors such as water activity (a_w), temperature, and pH. In literature, many crops including sorghum, cotton, tomato, and soya beans, have been related the conditions that result in fungi to reproducing and producing toxins. The most effective methods established for analyzing the *Alternaria* toxins are ELISA, liquid chromatography, and PCR-based methods. This review includes the importance of *Alternaria* spp., their ecologies, mycotoxin production and their effect on the homeotherms, and the methods for analyzing mycotoxins. It is specifically aimed to highlighting the importance and providing a general knowledge of producing mycotoxins that *Alternaria* spp.

Key words: *Alternaria* spp., mycotoxin, human health, chromatography, detection.

Giriş

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi fungus cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler insan ve hayvan sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadır. Mikotoksinleri üreten funguslar, rüzgâr ve hava yardımıyla taşınarak her yerde (atmosferin çeşitli katmanları gibi) bulunabilirler. Mikotoksin varlığı iklim koşullarına,

ürünün cinsine, coğrafi konuma, mevsime ve yıldan yıla farklılık gösterebilmektedir. Dünyadaki ürünlerin %25-50'nin mikotoksin/mikotoksinler (Çizelge 1.) ile bulaşma riskinin olduğu bildirilmiştir (Mannon ve Johnson, 1985; Charmley ve ark., 1995; Steyn ve Stander, 1999).

Mikotoksinlerin insanlar üzerindeki etkilerini net olarak söyleyebilmek mümkün değildir. Mikotoksinlere ait toksisite çalışmaları daha çok ördek yavruları ve fareler gibi deney hayvanları kullanılarak yapılmaktadır (Tunail, 2000). Doğadan, tarımsal ürün ya da mamül gıdalardan izole edilerek laboratuvar koşullarında geliştirilen *Alternaria* cinsine ait izolatların, sıçanlarda (Sauer ve ark., 1978), tavuk embriyosunda (Griffin ve Chu, 1983) ve insan hücrelerinde yapılan çalışmalarda (Tunail, 2000; Ostry, 2008) toksik olduğu belirlenmiştir.

Canlıların maruz kaldığı mikotoksin dozuna bağlı olarak iki farklı etki görülebilmektedir. Yüksek dozda alındıklarında akut toksik etki meydana gelir ve gıda ya da yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilmektedir. Daha düşük dozların uzun süre alınmaları sonucunda ise kronik hastalıklar görülmektedir. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi sorunlardır (Newberne ve Butler, 1969; Smith ve ark. 1995; Freire ve Rocha, 2017).

Çizelge 1. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler (Tunail, 2000)

<i>Aspergillus</i> toksinleri	<i>Penicillium</i> toksinleri	<i>Fusarium</i> toksinleri	<i>Alternaria</i> Toksinleri
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon	Alternariol
Aspertoksin	Okratoksin A	Trikotesenler	Alternariol mono-metil-eter
Sitrinin	Sitreoviridin	Deoksinivalenol	Altertoksin
Sterigmatosistin	Rubratoksin	Nivalenol	Tenuazonik asit
Okratoksin A	Rubratoksin B	Diasetoksisirpenol	Tentoksin
Patulin	Patulin	T-2 toksin	
Penisilik asit	Penisilikasit	HT-2 toksin	
	Luteosikrin	Tremortin	
	İzlanditoksin	Fusarin-C	
	Siklopiazonikasit	Fumonisin B1	
	Sitromisetin	Moniliformin	
	Rugulosin		
	Ksantomegnin		
	Emodin		

***Alternaria* Türlerinin Oluşturduğu Mikotoksinler ve Memeliler Üzerindeki Etkileri**

Bitkilerde fungal kontaminasyonla ilgili iki bin yılı aşkın bir zamana ait kayıtların varlığına rağmen insanlarda mikotoksinlerden kaynaklanan rahatsızlıklar konusunda 1990'lı yıllara kadar bir kayıt bulunmamaktadır. Halk sağlığı açısından ilk kez 1993-1994 yıllarında hastalarda görülen akut solunum rahatsızlıklarının araştırılmasıyla birlikte mikotoksin konusu gündeme gelmiştir (Dearborn ve ark., 1995). Günümüzde mikotoksinler özellikle

gelişmekte olan ülkelerde en önemli besin bulaşanlarından biri olarak düşünülmekte ve mikotoksinlerin risk değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar dünya çapında giderek önem kazanmaktadır (Wang ve ark., 2018).

Alternaria, tanımlaması yapılmış 300 farklı tür ile birçok değişik konukçu bitkiye özelleşme sağlayan ve saprofitik, endofitik ya da patojenik yaşam formları ile konukçuya spesifik olan ve olmayan toksinlere sahip çok önemli bir toksigenik fungus cinsidir (Thomma, 2003; Dang ve ark., 2015; Lee ve ark. 2015; Meena ve ark. 2016). Bu geniş tür dağılımı ile orantılı olarak *Alternaria* türleri tarafından ürettiği tespit edilen 70'den fazla sekonder metabolit tespit edilmekle birlikte, bunlardan çok az sayıdaki toksin günümüzde kimyasal olarak karakterize edilebilmiştir (Barkai-Golan, 2008; Dall'Asta ve ark. 2014). Toksisiteleri bakımından önemli etkiye sahip olan ve en sık tespit edilen *Alternaria* toksinleri, alternariol (AOH), alternariol monometil eter (AME), altertoksinler (ATXs; I, II ve III), altenuene (ALT), tenuazonik asit (TEA), tentoksin (TEN) ve *A. alternata* f. sp. *lycopersici* toksinleridir (AALs) (EFSA, 2011). *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., hem geniş bir biyolojik etkinlik (patojen, saprofit vs.) ve konukçu dağılımı hem de mikotoksin üretimi ve çeşitliliği bakımından en önemli ve yaygın *Alternaria* türüdür. Bunun dışında *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *A. brassicae* (Berk.) Sacc., *A. capsici-annui* Svulescu&Sandu, *A. citri* Ellis&N. Pierce, *A. kikuchiana* S. Tanaka, *A. japonica* Yoshii, *A. longipes* (Ellis&Everh.) E.W. Mason, *A. porri* (Ellis) Cif., *A. radicina* Meier, Drechsler&E.D. Eddy ve *A. tomato* (Cooke) L.R. Jones diğer önemli toksigenik türlerdir (Bottalico ve Logrieco, 1998; Logrieco ve ark., 2003; Barkai-Golan, 2008; Pinto ve Patriarca, 2017). *Alternaria* toksin ya da toksinlerinin, hangi tür düzeyinde üretildiği ya da üretilmediği ile ilgili olarak farklı çevresel ve ekofizyolojik koşullar ve konukçu/substrat profilleri ön plana çıkmakla birlikte (bknz: Mikotoksin üretiminin ekolojisi), *Alternaria* spp.'nin morfolojik özellikleri bu konuda yardımcı bir araç haline gelmiştir. Simmons (1992) ile Pryor ve Gilbertson (2000) tarafından büyük (60-100µm) ve küçük (>60 µm) konidi büyüklüğüne sahip *Alternaria* spp.'nin gruplandırması, toksin çeşitlerinin tür düzeyindeki ayrımını kolaylaştırmıştır (Barkai-Golan ve Paster, 2008; Pinto ve Patriarca, 2017; Kaya ve Zorba, 2021).

Bazı *Alternaria* türleri tahıllar, yağlı tohumlular, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bilinen siyah nokta/benek, kahverengi leke, *Alternaria* lekesi, yaprak lekesi ve gövde kanseri şeklinde isimlendirilen birçok bitki hastalığının etmenleridir. Patojenik türlerin oluşturduğu bu hastalıklar ve ürettikleri toksinler, hücrelerde mitokondriler, kloroplastlar, plazma membranları, golgi kompleksi, çekirdek vb. gibi hücre metabolizmasında önemli rolü olan yapıları büyük ölçüde etkilemektedirler (Karabulut ve Değirmenci, 2002; Tsuge ve ark. 2013). Özellikle hasat edilmiş tarımsal ürünlerden buğday, arpa, ayçiçeği, soya fasülyesi tohumları ve bunlardan elde edilen hayvan yemleri ile domates, üzüm, çilek, elma ve turunçgil meyveleri hem belirtilen hastalıkların hem de yaygın *Alternaria* toksinlerinin yüksek konsantrasyonlarının tespit edildiği bildirilen ürünlerdir (Logrieco ve ark. 2003; Mujahid ve ark., 2020; Chen ve ark. 2021). Ayrıca bu tarımsal ürünlerden elde edilen işlenmiş gıda ürünlerinin de (Un, şarap, ketçap, ayçiçek yağı vs.) yaygın *Alternaria* toksinlerine sahip olduğu çoğu kez rapor edilmiştir (Logrieco ve ark. 2009; EFSA, 2011; Chen ve ark. 2021). Bazı raporlarda özellikle bebek ve çocukların yukarıda belirtilen riskli gıdalar ile beslenmelerine dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Zhao ve ark. 2015). Yaygın olarak üretilen tarımsal ürünler ve bunlardan elde edilen hayvan yemleri ve insan gıdalarının besin zincirindeki yeri ve önemi göz önüne alındığında, *Alternaria* toksinlerinin önemli bir risk grubunu

oluşturduğu, insan ve toplum sağlığı açısından takip edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Günümüzde *Alternaria* toksinlerini içeren tarımsal ürün ya da gıda maddeleri ile ilgili halihazırda bir düzenleme olmamakla birlikte, Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) 2011 yılında *Alternaria* türlerinin ürettiği toksinler ve gıda güvenliği konusunda üye ülkelerden detaylı çalışmalar talep etmiş ve bu rapora göre *Alternaria* toksinlerinin genellikle tahıllarda, domates, ayçiçeği, meyveler, bira ve şarap gibi içeceklerde bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca bazı *Alternaria* toksinleri için toksikolojik etki eşiği (threshold of toxicological concern, TTC) değerleri belirlenmiş ve buna göre AOH ve AME için günlük 2.5 ng kg⁻¹ olarak hesaplanan TTC değeri, TEA ve TEN için günlük 1500 ng kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir (EFSA, 2011; Arcella ve ark. 2016). Ayrıca Almanya'nın Bavyera eyaletinin sağlık ve gıda güvenliği kurumu, sorgum ve darı içerikli bebek gıdalarında TEA için 500µg kg⁻¹ bir limit değeri ile sınırlandırma yapıldığını bildirmiştir (Rychlik ve ark. 2016). Mikotoksinler genellikle direkt beslenme yoluyla insan vücuduna girebilmektedir. Ancak bu durum bazen solunum veya temas yoluyla da olabilmektedir. Canlılarda meydana gelen sağlık sorunları bu mikotoksinlerin akut, kronik, kanserojenik veya mutajenik (mutasyona neden olan) etkilerinden dolayı oluşabildiği bildirilmiştir (AlMatar ve ark., 2016). Tüm mikotoksinlerde olduğu gibi *Alternaria* toksinleri için de yaşam alanı ve tüketilen gıda ürünlerindeki *Alternaria* spp.'nin varlığı ile yaygın *Alternaria* toksinlerinin bulaşıklık durumu sağlık problemlerinin ortaya çıkışı ve hastalık süreçlerinin ilerleyişi açısından belirleyici iki önemli noktayı oluşturmaktadır.

Kanada'da yapılan bir çalışmada mekanik havalandırma bulunan ofislerde hava kaynaklı *Alternaria* alerjenleri tanımlanmış, ofiste çalışanların yarısının işle alakalı solunum problemleri yaşadığı rapor edilmiştir. Tüm çalışanlar *Alternaria* alerjenleri için testten geçirilmiş ve sonuç olarak solunum problemleri yaşadığı rapor edilen hastaların test sonuçlarının pozitif olduğu bildirilmiştir (Menzies ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada ise *Alternaria* sporlarıyla doğal temasın astım hastalığını tetiklediği gözlemlenmiştir. Orta düzeyde astım hastalığı olan yedi kişi, *Alternaria* sporlarına bronşiyal olarak maruz bırakılmış ve anında astım belirtilerinin ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Licorish ve ark., 1985). Ülkemizde *Alternaria*'nın yaygınlığı ile ilgili yürütülen bir çalışmada ise Tatlıdil ve ark. (2001), Burdur atmosferinde bulunan en yaygın fungal sporların *Cladosporium* ve *Alternaria* cinslerine ait olduğunu ve Burdur atmosferinde yıl boyunca cm² başına 2064'ü *Cladosporium* sp.'ne, 353'ü *Alternaria* sp.'ne ait olan toplam 2417 adet spor saptandığını bildirmiştir. Gürcan ve ark., (2009) immün sistemi sağlam bir konukçuda çok nadir bildirilen *A. alternata* ile oluşan bir deri enfeksiyonu olayını bildirmiştir. Hastanın farklı iki günde alınan deri örneklerinin mikroskopik incelemesinde çok sayıda *Alternaria* sporları ve hifleri olduğu, hazırlanan fungus kültürlerindeki izolatların *A. alternata* olarak tanımlandığı ve bu vakanın ülkemizde immün sistemi sağlam bir konukçuda saptanan ilk alternaryoz durumu olduğu rapor etmiştir. Araştırmacılar ayrıca saprofit olarak bilinen bu fungusların her zaman, her konukçuda enfeksiyon potansiyelinin olduğunu bildirmiştir. Rivoire ve ark. (2001), düzenli sigara içmeyen ve solunum rahatsızlığı olmayan 26 yaşında erkek bir bireyde iş yerinde doğal pamuk tozuna maruz kalmadan sonra akut nefes darlığı geliştiğini ve akciğerde iki taraflı inspiratuar ince raller (bilateral inspiratory fine crackles) saptandığını bildirmiştir. Bronkoalveoler lavaj yapılmış ve lavaj sıvısında *A. alternata* tespit edilirken bu nedenle gözlemlenen belirtilerin iş yerinde hava yoluyla *Alternaria* bulaşıklığına bağlı geliştiği belirtilmiştir.

Alternaria toksinlerinin sıcakkanlılar üzerindeki etki şekilleri farklı şekillerde isimlendirilmekle birlikte, yapılan in vitro deneyler, canlı doku organ ya da sistemlerdeki sonuçları ya da doğal vakalardan elde edilen bulgular ile kanıtlanmaktadır. Buna göre yaygın *Alternaria* toksinlerinden AOH ve AME'nin akut toksisitelerinin fazla yüksek olmamasına rağmen mutajenik etkilerinin daha fazla olduğu (Lehmann ve ark. 2005; Bensassi ve ark. 2012), ATXs'in hem akut toksisite, hem de mutasyon riski taşıdığı (Boutin ve ark. 1989; Fleck ve ark. 2016; Aichinger ve ark. 2018), TEA'nin ise mutasyon özelliği olmamasına rağmen köpekler, tavşan ve civecivlerde toksik etki gösterdiği, farelerde yemek borusu kanseri (özefagus) ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Davis ve ark. 1977; Griffin ve ark. 1983, EFSA, 2011).

Liu ve ark. (1991) ve (1992) tarafından yapılan çalışmalarda Çin'in Linxian Bölgesinde yetiştirilen ve tüketilen tahıllarda *A. alternata*'nın izole edildiğini ve bu türün toksinleri olan AOH ve AME mikotoksinlerinin yemek borusu kanseriyle yüksek düzeyde ilişkili olduğunu bildirmiştir. Diğer bir *Alternaria* mutajenik ve genotoksik mikotoksini olan ATX-II'nin delphinidin isimli bir antosiyanin bileşeni ile arasındaki ilişki araştırılmış ve delphinidin ve diğer antosiyanin bileşenlerinin *Alternaria* mikotoksinlerinin genotoksik etkisinden mideyi koruyabileceği belirtilmiştir (Aichinger ve ark., 2018). Alternariol mikotoksininin konsantrasyona bağlı olarak "Chinese hamster V79" isimli farede yürütülen çalışmada, bu toksinin hipoksantin guanin fosforibozil transferaz ve timidin kinaz enzimleri üzerinde mutajenik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Brugger ve ark., 2006). Schrader ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise nitrozilasyonun mutajenik etkisi, önemli *Alternaria* metabolitleri ile birlikte *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 izolatları kullanılarak araştırılmış ve *Alternaria* sp.'nin *S. typhimurium* ile birlikte olan majör mutajenik aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan AOH'nun DNA zincirinde kopmalara sebep olduğu, sitotoksik ve genotoksik etkisi ortaya konulmuştur (Solhaug ve ark. 2012). Alternariol yanında AME'nin de insan kanser hücrelerinde (HT49 ve A431 hücreleri) DNA sarmalında kırılmaların oranını artırdığı rapor edilmiş, bu toksin AOH topoizomeras I ve II aktivitesinin inhibitörü olarak karakterize edilmiştir (Fehr ve ark., 2009; Dellafiora ve ark., 2015). Pero ve ark. (1973), *Alternaria* toksinlerinin farklı dozlarının farelere gebelik döneminde verilmesi sonucunda AOH ve AME'nin (25 mg kg⁻¹ her birinden), birlikte verildiği 9-12 günlük gebe farelerde ölü fetüs sayısında artış olduğu tespit edilirken, 100 mg kg⁻¹ dozunda AOH'a maruz bırakılanlarda malforme fetüs oranının arttığı tespit edilmiştir. Ancak, 50 mg kg⁻¹ dozunda AME'e maruz bırakılan gebe farelerde herhangi bir etki gözlemlenmediği, bu da iki toksininin birlikte sinerjistik etki gösterdiğinin bir kanıtı olarak bildirilmiştir. AOH'nin endokrin sistem üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada Frizzell ve ark. (2013), AOH'nin zayıf bir östrojen mikotoksini olduğunu in vitro çalışmalar sonucu ortaya koymakla birlikte AOH'ın ayrıca steroidogenez olayına etki ettiğini bildirilmiştir. Dellafiora ve ark. (2018) ise AME, ATX-II, AOH-4-OH ve AME-4-OH'nin xenoöstrojenik (östrojeni taklit eden yabancı maddeler) potansiyeli ve gıdalarla birlikte günlük alınan xenoöstrojen miktarının kronik etkisinin olduğunu rapor etmiştir. *Alternaria* toksinlerinin bu etkileri dışında Çin ve diğer Asya ülkelerinde endemik bir osteoarthritis hastalığı olarak bilinen Kashin-Beck hastalığı (KBD) üzerine yapılan bir çalışmada, hastalığın nedeninin tam olarak ortaya konulamamasına rağmen 2001 yılında arpa tanelerinde bulunan *Alternaria* sp.'nin oluşturduğu sekonder metabolitler ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Haubruge ve ark., 2001).

Mikotoksin Üretiminin Ekolojisi

Alternaria türlerinin yaşadığı belirli çevresel koşullarda mikotoksinleri üretilmediği tespit edilirken, yaygın *A. alternata* gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine yapılan çalışmalar genellikle buğday taneleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Magan ve ark., 1984). *Alternaria alternata* tarafından buğday tanesi üzerindeki gelişim profilleri ve üç farklı *Alternaria* toksini AME, AOH ve TeA'nin üretiminde, a_w (Su aktivitesi) \times sıcaklığın belirleyici olduğu bildirilmiştir (Sanchis ve Magan, 2004).

Mikotoksin üretimi, fungus gelişimine göre sıcaklık ve a_w koşulları açısından biraz daha sınırlı koşullarda gerçekleşmektedir. Oviedo ve ark. (2010, 2011), *Alternaria alternata* izolatlarının soya fasulyesinde AOH ve AME üretimi ile ilgili yürüttükleri çalışmada, AOH için optimum şartların izolatlara göre değişmekle birlikte, genel olarak 15°C ile 25°C'de ve 0.98 a_w civarında olduğunu, minimum su aktivitesinin 0.92 a_w civarında iken sıcaklık aralığının da 15-30°C olduğu tespit edilmiştir. AME için ise *A. alternata*'nın iki izolatında minimum 0.96 a_w ile tüm sıcaklık aralığında (15~30°C) gelişme meydana geldiği, optimum değerlerin ise 30°C ve 0.98 a_w civarında olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın >30°C olduğu durumlarda ise AOH üretilirken, AME üretilmediği tespit edilmiştir. Soya fasulyesi ortamında geliştirilen *A. alternata* izolatları için ayrıca TeA üretimi ile ilgili profiller geliştirilmiş, TeA üretimi için optimum konsantrasyonların 25~30°C'de ve 0.98 a_w 'de olduğu bildirilmiştir (Oviedo ve ark., 2009). Başka bir çalışmada ise Arjantin'den alınan buğday örneklerinde *A. tenuissima* izolatlarının ATX-II toksininin üretimi bakımından benzer bir gelişim gösterdiği, optimal üretimin 14 günlük inkübasyonda 25-30°C ile 0.98 a_w ve 21 günlük inkübasyonda 30°C ile 0.95 a_w değerlerinde gerçekleşirken, özellikle yüksek sıcaklık koşullarında bile ($\geq 30^\circ\text{C}$) mikotoksin üretiminin olduğu tespit edilmiştir (Patriarca ve ark., 2014).

Mikotoksin üretiminde konukçu farklılığı da önemli olabilmektedir. Örneğin, Magan ve Baxter (1994), sorgumdan izole edilen *A. alternata*'dan üretilen TeA için farklı gelişim özelliklerinin olduğunu bildirmiş ve TeA için 28 günlük büyüme periyotları boyunca 0.99-0.93 a_w aralığında üretimin gerçekleştiğini, 0.93 a_w 'de bile toksin biyosentezinin 28 gün sonra gerçekleşebildiğini ve sonuçta optimal a_w seviyelerindeki (<0.95 a_w) üretim değerlerine ulaştığını bildirilmiştir.

Pose ve ark. (2010), tarafından TeA için domates içeren besi ortamında *A. alternata* izolatlarının AOH ve AME üretim profilleri incelenmiştir. Araştırmacılar, TeA birikimi için optimum koşulların 28 günlük inkübasyondan sonra 0.982 a_w ve 21°C olduğunu ve u mikotoksinin 0,982 ve 0,954 a_w 'de ve 15-35°C aralığında üretilmediğini bildirilmiştir. En düşük TeA üretiminin, 28 günlük inkübasyondan sonra 0.982 a_w 'de ve 6°C'de tespit edilirken, Daha düşük a_w değerlerinde (0.922), TeA üretiminin 21°C'de 21 günlük inkübasyondan sonra da yüksek konsantrasyon değerlerine ulaşabildiği, 35°C'de 28 gün sonra bile düşük düzeylerde de olsa bu toksinin üretilmediği bildirilmiştir. Optimum AOH üretim 21°C ve 0.954 a_w 'de 28 gün sonra gerçekleşmiştir. Buna bağlı olarak, AOH sentezi için tüm a_w aralığında (0.922~0.982), 21°C'nin en uygun koşullar olduğu ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, AME'nin maksimum konsantrasyonun 0.954 a_w ve 35°C'de meydana geldiği belirlenirken, ayrıca 21°C'de de yüksek miktarlarda üretildiği bulunmuştur.

Genel olarak, mikotoksin üretiminin *Alternaria* türlerine ait izolatların gelişim özellikleri ve hızlarına oranla daha değişken miktarlarda olduğu görülmekle birlikte (Magan ve Baxter, 1994; Oviedo ve ark., 2009; Patriarca ve ark., 2014), ana kültür koleksiyonundan gelişim sağlamak yerine sürekli olarak alt kültür yapmanın (petri kültürlerinden transferlerle gelişim) genellikle zengin yapay ortamlardaki *Alternaria* izolatlarının AME, ATE, ALT, TeaA üretme yeteneğini kaybedebileceği bildirilmiştir (Magan ve Aldred, 2007).

Alternaria Toksinlerinin Biyosentezi

Pek çok *Alternaria* toksini insan ve memeli organizmalarda hücrel gelişimi engelleyen başta patojenik etkileri yanında mutajenik, östrojenik, genotoksik ve klastojenik etkiler de göstermekte ve böylece canlı dokularda önemli gelişim sorunlarının oluşumuna yol açabilmektedir (Vlata ve ark. 2005; Vlata ve ark. 2006; Meena ve Samal, 2019). *Alternaria* spp., patojenisitenin değişik evrelerinde birçok farklı ikincil metabolit üretebilmekte ve bunlar konukçuya özelleşmiş (Host-specific toxins, HSTs) ve özelleşmemiş toksinler olarak tanımlanmaktadır (non-HSTs) (Friesen ve ark., 2008; Berestetskly, 2008). Patojenik *Alternaria* türleri tarafından 70'den fazla toksin rapor edilmekle birlikte bunlardan 20 HSTs ve 30 nHSTs olarak karakterize edilmiş toksinlerdir (Yoder, 1980; Nishimura ve Kohmoto, 1983; Markham, 2001; Thomma, 2003; Howlett, 2006; Akinmitsu ve ark., 2013; Andersen ve ark. 2015; Lee ve ark. 2015). Her iki toksin grubunun da *Alternaria* türlerinin özellikle bitki patojenisitesi bakımından bir "virülenslik faktörü" olduğu kabul edilmektedir (Andrew ve ark. 2009). Bu nedenle bu toksinlerin üretiminden sorumlu olan gen ve gen lokusları hem *Alternaria* cinsinin evrimsel sürecinin değerlendirilmesinde, hem de oluşabilecek kayıp ve zararların önüne geçmede önemli bir araç olarak kullanılabilir.

Günümüzde *Alternaria* toksinlerinin biyosentezinden sorumlu genler tanımlanmış ve bu genlerin iki temel karakteristik özelliği tespit edilmiştir. Bunlar ya toksin üretiminden sorumlu büyük bir gen kümesinin (kluster) parçaları ya da toksinin biyosentezinden sorumlu olan kluster yapısının içinde konumlanmış küçük boyuttaki kromozomlar olarak tanımlanmıştır (Akamatsu ve ark. 1997;1999; Tsuge ve ark. 2013). Hatta ve ark. (2002), funguslarda HST genlerini içeren bir takım küçük kromozomlar ile transpozon benzeri dizileri koşulsuz fazla (artık) kromozomlar (CDCs) olarak tanımlamış ve özellikle küçük sporlu bazı *Alternaria* türlerinde bunların varlığını bildirmiştir. Moleküler çalışmalar özellikle HSTs biyosentez genlerinin <2Mb'da daha küçük tekli bir küçük kromozom üzerinde bulunduğunu ortaya koymuştur. CDCs üzerinde yer alan ve toksin üretimini kontrol eden bazı HST genlerine örnek olarak, elmadan elde edilen AM-toksin, çilekteki AF-toksin, Japon armudundaki AK-toksin, mandalinalardaki ACT-toksin ve domatesteki AAL-toksin verilmektedir (Hu ve ark. 2012). *Alternaria* türlerinde markör tabanlı teşhis yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, AAL-toksinin biyosentez genlerinden *Alt1* ve bir PKS (Polyketide Synthase) geni olan *AaMSAS* genlerini taşıyan CDCs tespit edilmiştir. Bu CDCs'lerin fonksiyonelliğini tespit etmeye yönelik çalışmalarda, çoğunlukla transkripsiyon faktör, patojenisite ile ilişkili genler, PKS genleri, NRPS (non-Ribosomal Peptide Synthase) genleri ve P450 taşıyıcı genleri ile ilişkili olan fonksiyonel domainlerin varlığı tespit edilmiştir (Yamagishi ve ark. 2006; Hu ve ark. 2012; Hou ve ark. 2016).

Alternaria Mikotoksinlerini İnceleme Metodları

Düşük moleküler ağırlığa sahip ve içinde buldukları substrat ortamında oransal olarak nispeten az miktarda bulunmakla birlikte çok yüksek toksik etkiler gösteren mikotoksinlerin analizi, gıda güvenliği ve sağlık risklerinin önüne geçilmesinde kritik bir noktayı oluşturmaktadır. Diğer birçok mikotoksinde olduğu gibi farklı biyokimyasal ve fizikokimyasal özelliklere sahip *Alternaria* toksinlerinin analizinde de kullanılacak yöntemin, yüksek hassasiyette tespit yapabilme, uygulanabilirliği kolay ve hızlı bir şekilde sonuç verebilir nitelikte olması gereklidir (Ostry, 2008; Man ve ark. 2017; Chen ve ark. 2021). Bu amaçla , ince tabaka kromatografisi (TLC) (Muller ve Lepom, 1992), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) (Matysik ve Giryn, 1996), gaz kromatografisi (GC) (Harvan ve Pero, 1974) ve ultraviyole (UV) tespiti ile sıvı kromatografisi (LC) (Stack ve ark. 1985) gibi analitik yöntemler yanında tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile gaz-kütle (GC-MS/MS) (Scott ve ark. 1997) ya da sıvı-kütle (LC veya HPLC-MS/MS) (Warth ve ark., 2012) şeklindeki kromatografi ile spektrometrik bütünleşik yöntemlerin kullanıldığı gelişmiş analiz yöntemleri de uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle tandem kütle spektrometrisinin farklı safhalarında kullanılan iyonizasyon teknikleri (Elektron İyonizasyonu-EI; Elektron Sprey İyonizasyonu-ESI; Matriks ile Desteklenen Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-MALDI) ve iyonizasyon zamanının ölçümüne dayalı (Time of Flight-TOF) hassas, seçici ve eş zamanlı olarak çok sayıdaki farklı kimyasal özellikli toksinin aynı ya da farklı matriksler üzerinden (gıda, yem vs.) tespitine imkan sağlayan bütünleşik analiz sistemlerinin *Alternaria* toksinlerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanıldığına dair çok sayıda kayıt literatürde yer almaktadır (Noser ve ark. 2011; Sivagnanam ve ark. 2017; Zhang ve ark., 2019; Zhao ve ark. 2022) Ayrıca bazı toksinler için özel olarak geliştirilen immüno-kimyasal ya da immüno-assay (ELISA) yöntemler de (Rahman ve ark. 2019) *Alternaria* mikotoksinlerinin analizinde başvurulan yöntemlerdir.

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Çeşitli alanlarda basit ve hızlı niteliksel analiz yöntemi olarak TLC kullanılmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda *Alternaria* mikotoksinlerinin belirlenmesi için de başvurulan genel bir yöntem olma özelliğine sahiptir. Prensip olarak TLC, hareketli bir tabaka üzerindeki bir ya da birkaç çözücü madde yardımıyla analiz edilecek karışım içerisindeki madde/maddelerin kapilar katmanlara ayrışmasının sağlandığı ve bu ayrışan maddelerin nitelik ve nicelik yönüyle ölçülebildiği bir yöntemdir (Izmailov ve Shraiber, 1938).

Hasan (1995), TLC-UV ile domateslerden *Alternaria* mikotoksinlerini (AOH, AME, TeA, ATX-I ve ATX-II) tespit etmek için bir çözücü sistemi olarak kloroform / aseton (97: 3, v: v) kullanmıştır. Sonuçta, çürümüş domateslerdeki ana mikotoksinlerin AOH, AME ve TeA olduğunu belirlenmiştir. AOH, AME ve TeA'nın tespit limitlerini (LOD) sırasıyla 100, 100 ve 700 µg kg⁻¹ olduğu bildirilmiştir.

Fàbrega ve ark. (2002) *A. alternata* IMI 354942'nin kültürlerinde TLC-UV ile AOH, AME, ALT, ATX-I ve TEN saptamışlardır. AOH, AME, ALT, ATX-I ve TEN LOD'larını sırasıyla 250, 125, 250, 250 ve 500 µg L⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.

Skarkova ve ark. (2005) ve Ostry ve ark. (2007) yaptıkları çalışmalarda buğday, kolza tohumu, mercimek ve şarapta AOH, AME, ALT ve TeA'nın basit ve doğru bir şekilde düzlemsel kromatografi yöntemi (dansitometrik okumalı HPLC) ile tespit edilebileceğini belirtmişlerdir. *Alternaria* mikotoksinlerinin tespiti ve ölçümü için kullanılan TLC ve HPLC'nin analitik yöntemleri Çizelge 2.'de listelenmiştir.

İnce Katman Kromatografisi (TLC), kullanım kolaylığı, maliyet ve daha az solvent tüketilmesi gibi bazı avantajlarından dolayı hala vazgeçilmez bir analitik araçtır.

Çizelge 2. *Alternaria* mikotoksinlerinin tespitinde kullanılan TLC ve HPLC yöntemleri

Mikotoksin	Örnek	Yöntem	LOD	Kaynak
AOH	Domates	TLC-UV	100 µg kg ⁻¹	Hasan (1995)
AME			100 µg kg ⁻¹	
TeA			700 µg kg ⁻¹	
AOH	<i>Alternaria alternata</i> IMI 354942 kültürü	TLC-UV	250 µg L ⁻¹	Fabrega ve ark. (2002)
AME			125 µg L ⁻¹	
ALT			250 µg L ⁻¹	
ATX-I			250 µg L ⁻¹	
TEN			500 µg L ⁻¹	
TeA	Ayçiçeği tohumu	TLC	200 µg kg ⁻¹	Chulze ve ark. (1995)
AOH	Ahududu, domates	HPLC	60 µg kg ⁻¹	Matysik ve Giryn (1996)
AME	Buğday ve yulaf	dansitometre		
AOH	Mercimek	HPLC	---	Ostry ve ark. (2007)
AME			15 µg kg ⁻¹	
ALT			15 µg kg ⁻¹	
TeA			75 µg kg ⁻¹	

Gaz Kromatografisi (GC)

Alternaria mikotoksinlerinin saptanmasında farklı tespit tekniklerine bağlı olarak GC kullanılmaktadır. GC, özellikle de GC-MS, sadece yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda analiz edilecek belirli kimyasal özellikteki maddeleri de ayrı ayrı tespit edebilmektedir. Bu yöntem polar olmayan ve yarı-polar, uçucu ve yarı-uçucu bileşiklerin saptanması için uygundur, ancak çoğu *Alternaria* mikotoksinleri küçük, uçucu olmayan ve polar moleküllerdir (Turner ve ark. 2009; Köppen ve ark. 2010). Dolayısıyla uçucu olmayan mikotoksinlerinin GC ya da GC-MS analizinden önce türetilmesi gerekmektedir (Scott, 1995).

Harvan ve Pero (1974) bir asetil trimetilsilan, trimetilsilan ve piridin (6: 2: 9, v: v: v) karışımı kullanarak TeA'yı türetmiş ve TeA'yı bir alev iyonizasyon detektörü (FID) ile GC kullanarak saptamışlardır. Wojciechowska ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada biri *A. alternata* enfeksiyonuna karşı dirençli diğeri ise hassas olan iki farklı domates genotipini hedeflenmemiş kapsamlı iki boyutlu gaz kromatografisi kütle

spektrometresi (GC × GC-MS) ile analiz etmişlerdir. In vitro analizde, klorojenik asit, *A. alternata*'nın gelişiminin ilk günlerinde alternariol biyosentezini azaltmıştır. Alternariol biyosentezinde anahtar bir gen olan alternariol poliketid sentaz geninin ekspresyon analizi, aynı zamanda büyümenin ilk aşamalarında ekspresyonunda geçici bir azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak kromatografik analizle, klorojenik asidin zamanla bozulduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda klorojenik asidin domateslerin *A. alternata* tarafından kolonizasyonunu konsantrasyona bağlı bir şekilde azalttığını, ancak bu azalmanın kısmen alternariol ilavesiyle karşılandığını belirtmişlerdir.

GC / GC-MS yöntemleri mükemmel duyarlılık göstermesine rağmen, bu yöntemler *Alternaria* mikotoksinlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmamıştır. Bunun başlıca nedeni, *Alternaria* mikotoksinlerinin örnek hazırlanmasında çoğunlukla türevlendirilmesinin gerekmesidir (Man ve ark. 2017).

Sıvı Kromatografi (LC)

Sıvı kromatografisi yöntemleri, mikotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklı farklı absorban değerleri göstermesinden faydalanılarak geliştirilen ve mikotoksin analizlerinde günümüzde çok yaygın bir şekilde kullanılan analitik yöntemdir. En yaygın şekli ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ya da ultra yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (UHPLC) enstrümanlarının ultraviyole dedektörü (UVD), diod-blok dedektörü (DAD), floresan dedektörü (FLD), elektrokimyasal dedektör (ECD), buharlaştırıcı ışık dedektörü (ELSD) ve kütle spektrumu gibi klasik dedektörlerle birleştirilerek kullanılması ile uygulamada yaygınlaşmıştır (Turner ve ark. 2009; Man ve ark. 2017).

Bir UV dedektörü (LC-UV) ile birleştirilmiş LC yöntemi, çoğu organik molekül ve bazı inorganik moleküllerin ultraviyole emilim özelliklerine sahip olduğundan, *Alternaria* mikotoksinlerinin saptanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılmış olan bir çalışmada domates ve domates ürünlerindeki TeA ve AME içerikleri ters faz LC-UV ile belirlenmiş ve TeA ve AME miktarları sırasıyla 25 µg kg⁻¹ ve 3 µg kg⁻¹ olarak saptanmıştır (Stack ve ark., 1985).

Solfrizzo ve ark. (2004) havuçta ATX-I, AOH, AME ve TeA'nın tespiti için UV diyot dizisi dedektörüne (LC-UV / DAD) sahip ters fazlı LC'yi ve ön arıtma olarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, TeA, ATX-I, AME ve AOH LOD' larının sırasıyla 20, 20, 10 ve 5 µg kg⁻¹ olarak bildirilmiştir. Yapılan bir başka araştırmada, 2004 ve 2005 yıllarında Arjantin'de hasat edilen 64 buğday örneği HPLC-UV ile tespit edilmiştir. Sonuçlar, buğday örneklerinin %23'ünün AME, %6'sının AOH ve %19'unun TeA içerdiğini göstermiştir (Azcarate ve ark., 2008).

Solfrizzo ve ark. (2004) havuçlarda *A. radicina* ve *A. alternata* toksinlerinin belirlenmesi için bir LC yöntemi geliştirilmişlerdir. Toksinler, asitleştirilmiş bir su-metanoantonitril karışımı ile havuçtan ekstrakte edilmiştir. Filtrelenmiş ekstrakt 2 parçaya bölünerek, Radikalinin (RAD), ATX-I, AOH ve AME'nin analizi için bir C18 kolonunda ve TeA için bir polimerik Oasis® HLB kolonunda katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmıştır. Toksinler izokratikasetonitril-sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karışımı kullanılarak UV diyot dizisi yardımıyla

ters faz LC ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar LOD olarak RAD, TeA, ATX-I, AME ve AOH için sırasıyla 0.006, 0.02, 0.02, 0.01 ve 0.005 µg g⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Kocher (2006), yaptığı çalışmada yenilebilir yağ ve yağlı tohumlardan elde edilen yedi *Alternaria* toksininin (AOH, AME, ALT, ATX-I, TeA, tentoksin ve AAL-toksinleri TA-1 ve TA-2) tespit edilmesinde LC-MS / MS yöntemini kullanmıştır. Sonuçta AOH, AME, ALT, ATX-I, TeA, tentoksin ve TA-1 ve TA-2 için LOD değerini sırasıyla 0.07, 0.05, 0.25, 0.05, 0.86, 0.11, 0.14 ve 0.05 µg kg⁻¹ olarak belirlemiştir.

Müller ve Korn (2013) Almanya’da yürüttükleri çalışmada tahıllarda *Alternaria* mikotoksinlerinin varlığını araştırmışlardır. Bu amaçla 2001 yılından 2010 yılına kadar Brandenburg Eyaleti’nin farklı bölgelerindeki ticari çiftliklerden toplam 1064 adet yeni hasat edilmiş kışlık buğday tohumlarını materyal olarak kullanarak, HPLC yöntemi ile AOH, AME, ALT ve TeA’yı analiz etmişler ve en fazla görülen *Alternaria* mikotoksinini TeA olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak TeA’nın yeni hasat edilmiş buğday tanelerinde görülmesini öncelikli olarak ürüne ve toprak işleme yöntemine bağlamışlardır.

López ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada EFSA tarafından önerilen gıda ürünleri için *Alternaria* toksin verilerini sağlamayı amaçlamışlardır. Bu amaçla yem ve gıdalarda mikotoksinlerin belirlenmesine yönelik iki farklı LC-ESI-MS / MS multi-mikotoksin yöntemini kullanarak eş zamanlı olarak AOH, AME, TEN, ALT ve TeA’yı tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda birden daha fazla gıda ürünüde AOH, AME, TeA ve TEN bulunmuşken, hiçbir örnekte ALT saptanmamıştır. Ayçiçeği tohumu, domates sosları ve kuru incirde nispeten yüksek konsantrasyonlarda TeA bulunmuştur. Hububat, domates sosları, incir, şarap ve ayçiçeği tohumunda düzenli olarak *Alternaria* toksinleri oluştuğunu belirlemişlerdir. Çalışmanın devamında, taze elma, taze turuncgiller, taze domates ve zeytinlerde *Alternaria* toksinlerinin sadece rastlantısal olarak meydana geldiği bildirilmiştir.

Walravens ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada tahıl ve tahıl ürünlerindeki (pirinç, yulaf gevreği ve arpa) *Alternaria* toksinlerini belirlemek için UPLC-ESI+/-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon metodolojisinin optimizasyonu deneysel tasarım ile sağlanmıştır. Son ekstratlar, hem pozitif hem de negatif iyonizasyon modunda çalıştırılan anelectrospray ara birimi ile donatılmış bir Quattro Premier XE kütle spektrometresine bağlanan Waters Acquity UPLC sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma, bir Acquity UPLC HSS T3 kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan gradyanlıyasyon programı yardımıyla tek adımlı kromatografik bir çalışmada 10 adet *Alternaria* toksini eş zamanlı olarak sadece yedi dakikada belirlenmiştir. Ardından, izotopik olarak etiketlenmiş iç standartlar uygulayan yöntemi ([2H4] - alternariol monometil eter ve [13C6, 15N] -tenazonik asit) kullanılarak doğrulama yapılmıştır. Doğrulama sırasında, biyoanalitik verilerin kalitesi, ağırlıklı en küçük kareler doğrusal regresyon (WLSLR) uygulanarak gözlenen heterosordastisiteyi ortadan kaldırarak geliştirilmiştir. Sonuç olarak, piyasada bulunan 24 tane hububat bazlı gıda maddesinin analizi yapılmış ve hem pirinç hem de yulaf gevreği örneklerinde tenuazonik asit (<LOQ – 68 ± 7 µg kg⁻¹) ve pirinç örneklerinde tentoksin (<LOQ- 10.9 ± 2.0 µg kg⁻¹) varlığı belirlenmiştir.

Andersen ve ark. (2015) Arjantin’de yaptıkları çalışmada farklı substratlardan (domates, buğday, yaban mersini ve ceviz) alınan 87 *Alternaria* izolatını morfolojisine ve metabolit üretimine göre karakterize etmiştir. Kimyasal potansiyelin en iyi şekilde değerlendirilmesi için agresif derleme (doğru kütle, izotopik paternler ve

Alternaria spp.'den tarif edilen tüm bileşiklerin listeleri) yollarını kullanmışlardır. Analizler, diyet dizisi dedektörü (DAD) ve yüksek çözünürlüklü (HR) maXis 3G QTOF kütle spektrometresi (MS) ile ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) kullanılarak yapılmıştır. Kimyasal analizler, üretilen en yaygın metabolitlerin AOH ve AME olduğunu ve bunlardan sonra TEN, ALX ve TeA olduğunu göstermiştir. Geniş sporlu *Alternaria* türlerinden veya diğer fungus türlerinden izole edilen çeşitli sekonder metabolitler (dehidrokurvularin, prenosi asetik asit ve alternarienonik asit gibi) tespit edilmiştir. Domateslerden izole edilen izolatların, yaban mersini, ceviz ve buğdaydan elde edilen izolatlardan daha az miktarda metabolit ürettiği belirlenmiştir. Sonuçlar Arjantin izolatlarının en az %75'inin potansiyel mikotoksin üretebildiğini göstermiştir.

UHPLC ya da HPLC çok yüksek bir ayırıştırma yeteneğine sahip olması ve tespit hassasiyetinin oldukça düşük düzeylere kadar inebilmesi, bu yöntemin en büyük avantajıdır (Sydenham ve Shephard, 1996; Man ve ark. 2017).

ELISA

Enstrümantal analitik yöntemlerin pahalı, özel ekipman ve nitelikli personel gerektirmesi, bunun aksine enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) daha basit, hızlı ve nispeten daha ucuz olması (Goryacheva ve ark. 2007) bu yöntemin özellikle kromatografik yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda alternatif analiz aracı olmasını sağlamaktadır. Bu yöntem, mikotoksin tespiti için ticari olarak üretilen ELISA kitlerindeki, hedef molekül ya da bileşiğe özelleşmiş antijen-antikor eşleşmesi prensibine dayalıdır (Morgan, 1989). Şimdiye kadar, ELISA yöntemi *Alternaria* toksinlerinden AAL, AOH ve TeA'nın tespiti için kullanılmıştır ve gıdalarda ve hayvan yemlerindeki *Alternaria* mikotoksin oluşumunu için değerlendirilmiştir. Yüksek hassasiyet ve seçicilik ile ELISA tarafından tespit edilen ilk *Alternaria* mikotoksini AAL toksin TA'dır. Yu ve ark. (1999) saman, silaj ve karışık yemde AAL toksin TA ve diğer beş mikotoksinlerin analizi için ELISA yöntemini kullanmıştır. Gross ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada TeA'nın tespiti için süksinik anhidrit ile TeA'nın türevlendirilmesini sağlamış ve bunu KLH (keyhole Limpet Hemocyanin) ile birleştirerek elde edilen TeA asetat için ELISA duyarlılığının, TeA'ya göre daha iyi olduğunu ve elma ve domatesde TeA' üretim miktarının 25-50 µg kg⁻¹ olduğunu bildirmiştir.

Elektrokimyasal Yöntem

Bu yöntem, elektro kimyasal tespit dedektörü kullanılarak analiz edilen bazı *Alternaria* toksinleri için farklı bir analiz yöntemi geliştirilerek uygulanmaktadır. Bu toksinler, grafit içeriği olmayan karbondan ve platinden oluşturulmuş elektrotlarda, elektrik akımı uygulandığında oksitlenme özelliği göstermelerinden dolayı buradaki oksitlenme düzeyinin kantitatif ölçümüne dayalı bir sistemdir. (Visconti ve ark. 1991). Şimdiye kadar *Alternaria* mikotoksin tespiti için kullanılan elektrokimyasal yöntem sadece bir kez rapor edilmiştir. Yapılmış olan bu çalışmada araştırmacılar elektrokimyasal yöntemle AOH ve AME'nin kantitatif tespiti için mantar tirozinaz ile

modifiye edilmiş bir karbon macun elektrodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan AME ve AOH'nin mantar tirozinazın substratları olduğunu belirlemiş ve AOH ve AME'nin LOD'ları sırasıyla 2.4×10^{-5} ve 1.9×10^{-5} M olarak tespit edilmiştir (Moressi ve ark., 1999).

Moleküler Yöntemler

Alternaria sporlarını ve farklı gıdalardaki özellikle domates bazlı ürünlerdeki (örn. Püreler ve domates salçası) biyokütle tespit etmek için Zur ve ark. (1999) tarafından PCR tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir. *Alternaria* spp.'nin tespiti için PCR primerleri kullanılarak gıda ürünlerinde kontaminasyon 5.8S rRNA'nın ITS1 ve ITS2'sine özgü geni, *Alternaria*'nın teşhisinde kullanılmıştır. Araştırmacılar, ticari domates meyvesi ve işlenmiş numunelerde domates soslarında ve taze hazırlanmış ürünlerde öncelikle *Alternaria* DNA'sını elde etmişlerdir. Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizm (AFLP) yöntemiyle, Arjantin çeşitlerinden toksin üretimi belirlenmiş ve domates bazlı ürünlerden ve meyvelerden *Alternaria* türleri izole edilmiş ayrıca *Alternaria* spp.'nin patojenitesi de belirlenmiştir (Somma ve ark., 2011). Oviedo ve ark. (2013) tarafından, Arjantin'de buğdaydan izole edilen *A. alternata* ve *A. infectoria* izolatları arasındaki değişkenliğin belirlenmesi için açık polimorfizm hem türler içinde hem de türler arasında AFLP metodunun kullanılabilirliğini göstermiştir. Tahıllarda ve diğer ürünlerde bu türlerin tespiti için özel primerler ve bu iki türdeki genetik çeşitliliği değerlendirmek için de AFLP metodu kullanılmıştır. Crespo-Sempere ve ark. (2013), domates bazlı ürünlerde *Alternaria* spp.'nin tespiti için kantitatif PCR (q-PCR) ile birlikte propidyum monoazid (PMA) kullanmıştır. Bu metodun gıda ürünlerinde canlı olmayan fungus hücrelerinin aksine canlı olanın tespiti için kullanışlı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, Alt4, Alt5'e Alt6 ve Alt7 primer çiftlerinin tasarlanmasına ve bunun için internal transcribed spacer region (ITS) bölgesinin kullanışlı olduğunu belirtmiştir. PMA ile ön işleme tabi tutularak mamul domates bazlı ürünlerde *Alternaria* canlı hücrelerini tespit etmek mümkün olmuştur. Domates bazlı matris, PMA toksisitesine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. Ancak bu durum canlı ve cansız hücreleri ayırt etme etkisini düşürmektedir. Neticede bu yöntemin, *Alternaria* mikotoksinleri ile kontaminasyon riskini tahmin etmek için değerli hızlı bir araç olabileceği bildirilmiştir.

Böylece *Aspergillus flavus* ile *Fusarium verticillioides* için yakın zamanda geliştirilen risk modelleri gibi bir imkân da *Alternaria* türlerinin farklı gıda üretim zincirinde mikotoksin ve kolonizasyon verileri için bir moleküler ekofizyolojik çalışmaları belki de entegre eden q-PCR kullanımı ile bu konuda da modeller geliştirilebileceği belirtilmiştir (Abdel-Hadi ve ark., 2012; Medina ve ark., 2013).

Sonuç

Alternaria spp.'nin oluşturduğu mikotoksinler ve insanlara etkisi üzerindeki çalışmalar oldukça yenidir. Bu derleme konunun önemine dikkat çekmek için ele alınmıştır. Konunun özellikle insan sağlığı açısından riskleri ele alınmış, akut ve kronik rahatsızlıklara neden olabileceği görülmüştür. *Alternaria* spp.'nin oluşturduğu

mikotoksinlerin, mutajenik, kanserojenik olabileceği ve solunum sisteminde kronik hastalıklara yol açabileceği belirlenmiştir. Ayrıca farelerde yapılan çalışmalarda ölü ve malforme fetüse yol açabildiği görülmüştür. Bu çalışmada TLC, GC ve GC-MS, LC ve LC-MS, ELISA ve elektrokimyasal yöntemler gibi *Alternaria* mikotoksinlerinin tespit yöntemleri gözden geçirilmiştir. Bunlar arasında TLC en düşük tespit hassasiyetine sahipken, GC / MS-MS ya da HPLC-MS/MS sistemleri yüksek duyarlılığa sahiptir. Ancak uçucu olmayan *Alternaria* toksinlerinin ise genellikle bir şekilde türevlenmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle, TLC ve GC / MS-MS yöntemleri LC ve HPLC-MS ile değiştirilmiştir. LC, LC-MS ve özellikle LC-MS / MS veya LC-MS, *Alternaria* mikotoksin tespiti için temel dayanak olmuşlardır. Bununla birlikte, LC ve LC-MS büyük ölçekli ekipman ve nitelikli eleman gerektirir. Bu nedenle, gıda güvenliği alanının gerçek zamanlı, hızlı veya taşınabilir algılama gereksinimini karşılayamamaktırlar. ELISA yöntemi, basitliği, minyatürizasyonu ve taşınabilirliği nedeniyle büyük ölçekli ekipmanların dezavantajlarını telafi edebilmektedir ve AOH, TeA ve AAL toksin TA'nın tespiti için kullanılmaktadır. Bu tekniklerin yanı sıra PCR temelli testlerle de hem *Alternaria* türleri hem de bu türlerin oluşturduğu bazı toksinler belirlenebilmiştir. Teknolojik gelişmelerle birlikte, özellikle MALDI-TOF gibi gelişmiş sistemlerle sadece *Alternaria* mikotoksinlerinin saptanması değil aynı zamanda türlerin teşhisine (Chowdappa ve ark. 2013) kadar giden farklı tespit tekniklerin de geliştirilebileceği ve uygulamada kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Alternaria'nın yaygın olarak görülmesi nedeniyle yapılan bazı analizlerde, çeşitli gıda ve yem maddelerinin tüketimi ile insan ve hayvanların mikotoksinler nedeniyle yüksek toksisiteye maruz kaldığı bildirilmektedir. Mikotoksin yoğunluğunun düşürülmesi, saha, nakliye, depolama ve işleme aşamalarının izlenmesi ve iyileştirilmesi ile mümkündür. İnsanların bu kirleticilere maruz kalma derecesi, ortaya çıkan mikroorganizmaların etkisi ve sonra ürettikleri metabolitlerden önemli olan mikotoksinlerin üretim sürecine dikkat edilmelidir. Azaltılması için yeterli önlemleri almak, ulusal ve uluslararası alanda dekontaminasyon programları uygulamakla mümkündür. Bu toksik bileşikler arasındaki potansiyel korelasyon ile farklı toksisite profilleri oluşabilir, bu konunun da derinlemesine çalışılması gerekmektedir.

Fungal popülasyon genetiği, mikotoksin üretimindeki rollerini aydınlatmak ve farklı ekofizyolojik faktörlere (esas olarak sıcaklık ve su aktivitesi) maruz kaldığında *Alternaria* sekonder metabolizmasını (ana veya konjuge analitler üreten) anlamak için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Sahada ve farklı proseslerde *Alternaria* mikotoksin kontaminasyonunu etkileyen faktörleri belirlemek için üretim zinciri boyunca tahmine dayalı modellerin kullanımı bu kontaminasyonun önemli ölçüde azalmasına neden olabilir. Belirli bir uluslararası düzenleme olmamasına rağmen *Alternaria* mikotoksinlerinden herhangi biri için EFSA, hayvan ve halk sağlığı için riskler hakkında gıdalarda *Alternaria* toksinlerinin varlığı ile ilgili bilimsel görüşlerini bildirmiştir (EFSA, 2011). Gıda güvenliği ile ilgili risk değerlendirmesindeki zorluklar sıklıkla niceliksel veri eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu toksinler için kabul edilecek maksimum değerler EFSA tarafından çalışılmakta ve yakın gelecekte Avrupa Birliği tarafından düzenleneceği anlaşılmaktadır (Escrivá ve ark.,2017). Bu kirleticiler çok çeşitli yiyeceklerde bulunabilir. Ürünlerin kalitesi ve tüketicilerin sağlığının korunması amacıyla ilgili kurumların ürünlerin mevcut durumu ve gelecekteki durumuna dair tespitleri yapmasına ihtiyaç vardır.

Yakın gelecekte yanıtlanması gereken kilit sorular, iklim değişikliği senaryolarının gıda ve tarım ürünlerinde fungal topluluk yapısının dinamiklerinde bir değişikliğe neden olup olmayacağı ve ekonomik etkisinin nasıl olacağı ile tarımla ilgili daha fazla soruna yol açıp açmayacağıdır.

Teşekkür

Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır. Yazarlar çalışmaya ortak katkı sağlamış ve yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R. and Magan, N. 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface*, 9: 757-767.
- Aichinger, G., Puntischer, H., Beisl, J., Kütt, M-L., Warth, B. and Marko, D. 2018. Delphinidin protects colon carcinoma cells against the genotoxic effects of the mycotoxin altertoxin II. *Toxicology Letters*, 284: 136-142.
- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. 1997. AAL-toxin-deficient mutant of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology*, 87: 967-972.
- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H., and Kohmoto, K. 1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics*, 35: 647-656. doi: 10.1007/s002940050464.
- Akinmitsu, K., Tsuge, T. and Kodama, M. 2013. *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. *Journal of Gen. Plant Pathology*, 80: 109-122.
- AlMatar, M., Var, I., and Koksal, F. 2016. How Does *Alternaria alternata*-Derived Alternariol Affect Our Health? *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 13: 465-472.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Pinto, V.F. and Patriarca, A. 2015. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 196: 1-10.
- Andrew, M., Peever, T. L., and Pryor, B. M. 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101: 95-109. doi: 10.3852/08-135.
- Arcella, D., Eskola, M., Ruiz, J.A.G. 2016. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal* 14:4654.

- Azcarate, M.P., Patriarca, A., Terminiello, L. and Pinto, V.F. 2008. Alternaria toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection*, 71: 1262-1265.
- Barkai-Golan, R. 2008. Alternaria Mycotoxins: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Ed: Barkai-Golan, R., Paster, N., Elsevier Inc., San Diego, CA, USA, pp: 185-203.
- Barkai-Golan, R. and Paster, N. 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin Journal*, 1:147-159.
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Hajlaoui, M.R., Bacha, H., Lemaire, C. 2012. Cell death induced by the Alternaria mycotoxin Alternariol. *Toxicology in Vitro*, 26:915-923.
- Berestetskly, A.O. 2008. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Applied Biochemical and Microbiology*, 44: 453-465.
- Bottalico, A. and Logrieco, A. 1998. Alternaria species of economic importance: *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Ed: Sinha, K.K., Bhatnagar, D., Marcel Dekker. New York, USA, p 65-108.
- Boutin, B., Peeler, J., Twedt, R. 1989. Effects of purified altertoxins I, II, and III in the metabolic communication V79 system. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 26:75-81.
- Brugger, E-M., Wagner, J., Schumacher, D.M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. and Lehmann, L. 2006. Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 164: 221-230.
- Charmley, L.L., Trenholm, H.L., Prelusky, D.B. and Rosenberg, A. 1995. Economic losses and decontamination. *Natural Toxins*, 3: 199-203.
- Chen, A., Mao, X., Sun, Q., Wei, Z., Li, J., You, Y., Zhao, J., Jiang, G., Wu, Y., Wang, L., Li, Y. 2021. Alternaria Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69:7817-7830.
- Chowdappa, P., Lakshmi, M. J., Madhura, S. 2013. Matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of plant pathogenic Alternaria species. *Phytoparasitica*, 41: 169-179.
- Chulze, S.N., Torres, A.M., Dalcero, A.M., Etcheverry, M.G, Ramírez, M.L. and Farnochi, M.C. 1995. Alternaria mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of the toxins in oil and meal. *Journal of Food Protection*, 58: 1133-1134.
- Crespo-Sempere, A., Estiarte, N., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A.J. 2013. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable Alternaria spp. contamination in tomato products. *International Journal of Food Microbiology*, 165: 214-220.
- Dall'Asta, C., Cirlini, M., Falavigna, C. 2014. Chapter Three - Mycotoxins from Alternaria: Toxicological Implications. *Advances in Molecular Toxicology*, 8:107-121.
- Dang, H.X., Pryor, B., Peever, T. and Lawrence, C.B. 2015. The Alternaria genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus compared of saprophytes, plant pathogens, and allergic species. *BMC Genomics*, 16: 239.

- Davis, N.D., Diener, U.L., Morgan-Jones, G. 1977. Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. *Applied and Environmental Microbiology*, 34:155-157.
- Dearborn, D.G., Infeld, M.D., Smith, P., Judge, C., Horgan, T.E., Allan, T., Zimomra, J.A., Mortensen, B.K., Burkett, S.A. and Winpisingerslay, K. 1995. Acute Pulmonary Hemorrhage Hemosiderosis Among Infants-Cleveland, January-1993 November-1994. *Journal of the American Medical Association*, 273: 281-282.
- Dellafiora, L., Dall'Asta, C., Cruciani, G., Galaverna, G. and Cozzini, P. 2015. Molecular modelling approach to evaluate poisoning of topoisomerase I by alternariol derivatives. *Food Chemistry*, 189: 93-101.
- Dellafiora, L., Warth, B., Schmidt, V., Del Favero, G., Mikula, H., Fröhlich, J. and Marko, D. 2018. An integrated in silico/in vitro approach to assess the xenoestrogenic potential of *Alternaria* mycotoxins and metabolites. *Food Chemistry*, 248: 253-261.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2011. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9: 2407.
- Escriva, L., Font, G., Manyes, L., Berrada, H. 2017. Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview. *Toxins*, 9:251.
- Fabrega, A., Agut, M. and Calvo, M. 2002. Optimization of the method of detection of metabolites produced by the *Alternaria* genus: Alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, altertoxin I and tentoxin. *Journal of Food Science*, 67: 802-806.
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M.O., Boege, F., Altemöller, M. and Podlech J, Marko D. 2009. Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Molecular nutrition & Food Research*, 53: 441-451.
- Fleck, S.C., Sauter, F., Pfeiffer, E., Metzler, M., Hartwig, A., Koberle, B. 2016. DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 798-799:27-34.
- Freire, F.D.C.O. and da Rocha, M.E.B. 2017. Impact of Mycotoxins on Human Health: *Fungal Metabolites*. Ed.: Merillon, J.M., Ramawat, R.G., Springer International Publishing, Switzerland, pp: 239-255.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S. and Oliver, R. P. 2008. Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell Microbiology*, 10: 1421-1428.
- Frizzell, C., Ndossi, D., Kalayou, S., Eriksen, G.S., Verhaegen, S., Sørli, M., Elliott, C.T, Ropstad, E. and Connolly L. 2013. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of the mycotoxin alternariol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271: 64-71.
- Goryacheva, I. Y., De Saeger, S., Eremin, S. A., Van Peteghem, C. 2007. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food Additives and Contaminants*, 24(10): 1169-1183.

- Griffin, G.F. and Chu, F. 1983. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1420-1422.
- Gross, M., Curtui, V., Ackermann, Y, Latif H, and Usleber E. 2011. Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 12317-12322.
- Gürcan, Ş., Pişkin, S., Kılıç, H., Temelli, B.A. ve Yalçın, Ö. 2009. İmmün Sistemi Sağlam Bir Konakta *Alternaria alternata* ile Oluşan Deri Enfeksiyonu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43: 163-167.
- Harvan, D. and Pero, R. 1974. Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid. *Journal of Chromatography A*, 101: 222-224.
- Hasan, H. 1995. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. *Mycopathologia*, 130: 171-177.
- Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A. and Yamamoto, M. 2002. A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics*, 161: 59–70.
- Haubruege, E., Chasseur, C., Debouck, C., Begaux, F., Suetens, C., Mathieu, F., Michel, V., Gaspar, C., Rooze, M. and Hinsenkamp M. 2001. The prevalence of mycotoxins in Kashin-Beck disease. *International Orthopaedics*, 25: 159-161.
- Hou, Y., Ma, X., Wan, W., Long, N., Zhang, J., Tan, Y., Duan, S., Zeng, Y. and Dong, Y. 2016. Comparative Genomics of Pathogens Causing Brown Spot Disease of Tobacco: *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata*. *PLoS ONE*, 11: e0155258.
- Howlett, B. J. 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinion Plant Biology*, 9: 371-375.
- Hu, J., Chen, C., Peever, T., Dang, H., Lawrence, C.B. and Mitchell, T.K. 2012. Genomic characterization of the conditionally dispensable chromosome in *Alternaria arborescens* provides evidence for horizontal gene transfer. *BMC Genomics*, 13: 171.
- Izmailov, N.A. and Shraiber, M.S. 1938. A drop-chromatographic method of analysis and its applications to pharmacy. *Farmatsiya*, 3:1-3.
- Karabulut, Ö.A. ve Değirmencioğlu, T. 2002. Hayvan Yemi Olarak Kullanılan Buğday Danelerinde Toksin Oluşumuna Neden Olan Fungusların Sodyum Hidroksit Uygulanmasıyla Engellenmesi. *Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16: 129-138.
- Kaya, B. ve Zorba, N.N. 2021. *Alternaria* Genusu Üyelerinin Meyve ve Sebzeler Üzerine Etkileri. *Mantar Dergisi*, 12:223-239.
- Kocher, U. 2006. Multimethode zur Bestimmung von *Alternaria*-toxinen mittels LC-MS/MS. In: Gesellschaft für Mykotoxinforschung. Proceedings of the 28th Mycotoxin Workshop. Bydgoszcz, Poland: Gesellschaft für Mykotoxin Forschung, p92.

- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. 2010. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1595-1612.
- Lee, H.B., Patriarca, A. and Magan, H. 2015. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Microbiology*, 43: 93-106.
- Lehmann, L., Esch, H.L., Wagner, J., Rohnstock, L., Metzler, M. 2005. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicology Letters*, 158:72-86.
- Licorish, K., Novey, H.S., Kozak, P., Fairshter, R.D. and Wilson, A.F. 1985. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76: 819-825.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, Z., Shi, Z., Zhen, Y., Miao, J. and Xu, Y. 1991. Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Scientific Publications*, 105: 258-262.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y. and Guo, H. 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105: 394-400.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109:645-667.
- Logrieco, A., 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., Cayley, G.R. and Lacey, J. 1984. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 1113-1117.
- Magan, N. and Baxter, E. 1994. Relationship between environmental factors and tenuazonic acid production by *Alternaria* isolates from sorghum. In: Scudamore, K.A., editor. *Occurrence and significance of mycotoxins*. Slough: Central Science Laboratories. p 309-313.
- Magan, N. and Aldred, D. 2007. Why do fungi produce mycotoxins? In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A., editors. *Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food*. Boca Raton: Taylor and Francis. p 121-133.
- Man, Y., Liang, G., Li, A., Pan, L. 2017. Analytical Methods for the Determination of *Alternaria* Mycotoxins. *Chromatographia*, 80:9-22.
- Mannon, J. and Johnson, E. 1985. Fungi down on the farm. *New Scientist*, 105: 12-16.
- Markham, J.E. 2001. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 2(4): 229-239.
- Matysik, G. and Giryn, H. 1996. Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *Alternaria* mycotoxins. *Chromatographia*, 42: 555-558.

- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D.L., Parra, R., Geisen, R. and Magan, N. 2013. Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of the Royal Society Interface*, 10: 20130320.
- Meena, M., Zehra, A., Dubey, M.K., Aamir, M., Gupta, V.K. and Upadhyay, R.S. 2016. Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME). *Frontier Plant Science*, 7: 1408.
- Meena, M. and Samal, S. 2019. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Reports*, 6: 745-758.
- Menzies, D., Comtois, P., Pasztor, J., Nunes, F. and Hanley, J.A. 1998. Aeroallergens and work-related respiratory symptoms among office workers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101: 38-44.
- Moressi, M., Zon, A., Fernandez, H., Rivas, G. and Solis, V. 1999. Amperometric quantification of *Alternaria* mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode. *Electrochemistry Communications*, 1:472-476.
- Morgan, M. R. A. 1989. Mycotoxin immunoassays (with special reference to elisas). *Tetrahedron*, 45(8): 2237-2249.
- Mujahid, C., Marie-Claude, S., Basle, Q., Woo, P.M., Yean Ee, E.C., Mottier, P., Bessaire, T. 2020. Levels of *Alternaria* Toxins in Selected Food Commodities Including Green Coffee. *Toxins*, 12:595.
- Muller, M. and Lepom, P. 1992. The detection of *Alternaria* mycotoxins in laboratory culture. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 147:197-206.
- Müller, M.E. and Korn, U. 2013. *Alternaria* mycotoxins in wheat—a 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 34: 191-197.
- Newberne, P.M. and Butler, W.H. 1969. Acute and Chronic Effects of Aflatoxin on the Liver of Domestic and Laboratory Animals : A Review. *Cancer Research*, 29:236-250.
- Nishimura, S. and Kohmoto, K. 1983. Host-specific toxins and chemical structures form *Alternaria* species. *Annual Review Phytopathology*, 21: 87-116.
- Noser, J., Schneider, P., Rother, M., Schmutz, H. 2011. Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycological Research*, 27:265-271.
- Ostry, V., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A. and Ruprich, J. 2007. Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. *Czech Mycology*, 59: 241.
- Ostry, V. 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1: 175-188.

- Oviedo, M., Ramirez, M., Barros, G. and Chulze, S. 2009. Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1186-1192.
- Oviedo, M., Ramirez, M., Barros, G. and Chulze, S. 2010. Impact of water activity and temperature on growth and alternariol and alternariol monomethyl ether production of *Alternaria alternata* isolated from soybean. *Journal of Food Protection*, 73: 336-343.
- Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Barros, G.G. and Chulze, S.N. 2011. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 127-132.
- Oviedo, M.S., Sturm, M.E., Reynoso, M.M., Chulze, S.N. and Ramirez, M.L. 2013. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:447-455.
- Patriarca, A., Medina, A., Pinto, V.F. and Magan, N. 2014. Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal*, 7: 329-334.
- Pero, R., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. and Spalding, J. 1973. Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". *Environmental Health Perspectives*, 4: 87-94.
- Pinto, V.E.F. and Patriarca, A. 2017. *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins: *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. Ed: Moretti, A., Susca, A., New York, USA: Springer Science+Business Media LLC., pp: 13-32.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A. and Pinto, V.F. 2010. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 348-353.
- Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104:1312-1321.
- Rahman, H.U., Yue, X., Yu, Q., Xie, H., Zhang, W., Zhang, Q., Li, P. 2019. Specific antigen-based and emerging detection technologies of mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99:4869-4877.
- Rivoire, B., Attucci, S., Anthonioz, P., Carre, P., Lemarie, E. and Hazouard, E. 2001. Occupational acute lung injury due to *Alternaria alternata*: early stage of organic dust toxic syndrome requires no corticosteroids. *Intensive Care Medicine*, 27: 1236.
- Rychlik, M., Lepper, H., Weidner, C., Asam, S. 2016. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control*, 68:181-185.

- Sanchis, V. and Magan, N. 2004. Environmental profiles for growth and mycotoxin production: *Mycotoxins in food: detection and control*, Ed: Magan, N., Olsen, M., Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., pp: 174-189.
- Sauer, D.B., Seitz, L.M., Burroughs, R., Mohr, H.E., West, J.L., Milleret, R.J. and Anthony, H.D. 1978. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 1380-1383.
- Schrader, T., Cherry, W., Soper, K. and Langlois, I. 2006. Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 606: 61-71.
- Scott, P. M. 1995. Mycotoxin methodology. *Food Additives and Contaminants*, 12(3): 395-403.
- Scott, P.M., Weber, D., Kanhere, S.R. 1997. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 765:255-263.
- Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge: *Alternaria biology, plant diseases and metabolites*, Ed: Chelkowski, J. and Visconti, A., Amsterdam, Elsevier Science Publisher, pp: 1-35.
- Sivagnanam, K., Komatsu, E., Rampitsch, C., Perreault, H., Grafenhan, T. 2017. Rapid screening of *Alternaria* mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97:357-361.
- Skarkova, J., Ostry, V. and Prochazkova, I. 2005. Planar chromatographic determination of *Alternaria* toxins in selected foodstuffs. In: *Proceedings of the international symposium on planar separations, planar chromatography, milestones in instrumental TLC*. Siofok, Hungary: RIMP. p 29-31.
- Smith, J.E., Solomons, G., Lewis, C. and Anderson, J.G. 1995. Role of Mycotoxins in Human and Animal Nutrition and Health. *Natural Toxins*, 3:187-192.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. and van den Bulk, R. 2004. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *Journal of AOAC International*, 87: 101-106.
- Solhaug, A., Vines, L.L., Ivanova, L., Spilsberg, B., Holme, J.A., Pestka, J., Collins, A., Eriksen, G.S. 2012. Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 738-739:1-11.
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V.F., Moretti, A. and Logrieco, A.F. 2011. AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 414-419.
- Stack, M.E., Mislivec, P.B., Roach, J.A. and Pohland, A.E. 1985. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68: 640-642.

- Steyn, P. and Stander, M. 1999. Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins. *General and Applied Toxicology*. 2nd Edition United Kingdom: Macmillan Reference Ltd:2145-2176.
- Sydenham, E.W. and Shephard, G.S. 1996. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins; *Progress in Food Contaminant Analysis*, Ed: J. Gilbert, Norwich, UK, Blackie Academic&Professional, pp: 65-146.
- Tatlıdil, S., Bıçakçı, A., Akkaya, A. ve Malyer H. 2001. Burdur Atmosferindeki Allerjen Cladosporium sp. ve Alternaria sp. Sporları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 8: 1-3.
- Thomma, B.P. 2003. Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-236.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. and Otani, H. 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus Alternaria alternata. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 44-66.
- Tunail, N. 2000. Funguslar ve mikotoksinler. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Genişletilmiş 2: 1-50.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2): 168-180.
- Visconti, A., Sibilia, A., Palmisano, F. 1991. Selective determination of altertoxins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection with dual "in-series" electrodes. *Journal of Chromatography A*, 540: 376-382.
- Vlata, Z., Porichis, F., Tzanakakis, G., Tsatsakis, A. and Krambovitis, E. 2005. In vitro cytopathic effects of mycotoxin T-2 on human peripheral blood T lymphocytes. *Toxicological Letters*, 160(1): 60-68.
- Vlata, Z., Porichis, F., Tzanakakis, G., Tsatsakis, A. and Krambovitis, E. 2006. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicological Letters*, 165(3): 274-281.
- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L. and De Saeger, S. 2014. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated Alternaria toxins in cereal-based foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1372: 91-101.
- Wang, Y-J., Nie, J-Y., Zhen, Y., Li, Z-X., Cheng, Y. and Farooq, S. 2018. Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits. *Journal of Integrative Agriculture*, 17:1676-1690.
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., Krska, R. 2012. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:9352-9363.
- Wojciechowska, E., Weinert, C.H., Egert, B., Trierweiler, B., Schmidt-Heydt, M., Horneburg, B., Graeff-Hönniger, S., Kulling, S.E. and Geisen, R. 2014. Chlorogenic acid, a metabolite identified by untargeted

- metabolome analysis in resistant tomatoes, inhibits the colonization by *Alternaria alternata* by inhibiting alternariol biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology*, 139: 735-747.
- Yamagishi, D., Akamatsu, H., Otani, H., and Kodama, M. 2006. Pathological evaluation of host-specific AAL-toxins and fumonisin mycotoxins produced by *Alternaria* and *Fusarium* species. *Journal of General Plant Pathology*, 72: 323–326. doi: 10.1007/s10327-006-0291-y
- Yoder, O. 1980. Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 103-129.
- Yu, W., Yu, F-Y., Undersander, D.J. and Chu, F.S. 1999. Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food and Agricultural Immunology*, 11: 307-319.
- Zhang, Y., Li, H., Zhang, J., Shao, B. 2019. Determination of *Alternaria* toxins in drinking water by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:22485-22493.
- Zhao, X., Liu, D.L., Yang, Y., Zhang, L., Yang, M. 2022. Detection of seven *Alternaria* toxins in edible and medicinal herbs using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry: X*, 13:100186.
- Zur, G., Hallerman, E.M., Sharf, R., and Kashi, Y. 1999. Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Alternaria* fungal contamination in food products. *Journal of Food Protection*, 62: 1191-1197.

