

Curione Alice, Crosta Lucia, Gottuso Valentina, Monte Maria, Tesi Silvia, Artale Giuseppe, Gebbia Nicola, Oliveri Francesca.

Co.Ri.Bi.A: Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura (Via G. Marinuzzi, 3 - 90129 Palermo)

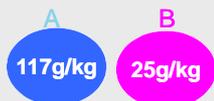
Obiettivi

- Studiare la risposta adattativa della vite agli effetti pedologici attraverso la produzione di composti polifenolici (stilbeni e flavonoli);
- Analizzare la resistenza/sensibilità della vite all'attacco del fungo ocratossigeno *Aspergillus carbonarius*;
- Determinare il contenuto di ocratossina A (OTA) lungo la filiera vitivinicola.

Materiali e Metodi

Suolo con diverso contenuto di calcare

2 tesi (A e B)



Marsala (TP)

Campionamento uva mosto e vino

Epoca del campionamento UVE	Campione	Tesi	Campione MOSTO	Tesi
Inizio Invaiaitura	1	A	7	A
	2	B	8	B
Intermedio di maturazione	3	A	Campione VINO	Tesi
	4	B		
Raccolta	5	A	9	A
	6	B	10	B



Sulle piante non clorotiche per annullare l'effetto all'esposizione alla luce, manualmente si è proceduto alla creazione di uguali livelli di esposizione dei grappoli; sono stati effettuati rilievi di caratterizzazione della chioma (metodo dei contatti o del Point Quadrat - Smart 1985)

Analisi quali-quantitativa del contenuto di stilbeni e flavonoli nell'uva e nel vino

Il contenuto di stilbeni e flavonoli è stato determinato attraverso:

- estrazione dei campioni di uva; i campioni di vino sono analizzati per iniezione diretta
- rivelazione e quantificazione mediante Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC) con Diode Array Detector (DAD) come rivelatore, alla lunghezza d'onda di 325 e 285 nm.

Valutazione del contenuto in polifenoli totali e dell'attività antiossidante nel vino

Il contenuto di polifenoli totali è stato valutato applicando il metodo di Folin-Ciocalteu, con lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 765 nm, espresso in mg/L di acido gallico.

L'attività antiossidante è stata saggiata mediante due metodi, ed espressa in mM di Trolox equivalente:

- 1) ABTS: lettura spettrofotometrica a 734 nm
- 2) DPPH: lettura spettrofotometrica a 515 nm.

Determinazione del contenuto di ocratossina A

- Il contenuto di Ocratossina A è stato determinato mediante analisi in HPLC con colonna di immunoaffinità, mediante adattamento del metodo "Automated HPLC method for the determination of ochratoxin A in samples wine" di Brera et al., 2003.
- Rivelatore: spettrofluorimetro a lunghezza d'onda 333 nm (eccitazione) e 460 nm (emissione)
- L'analisi sui campioni di uva destinata alla vinificazione è stata condotta utilizzando un omogenato ottenuto dagli acini, parte principalmente esposta all'attacco micotico.

Isolamento di *Aspergillus carbonarius*

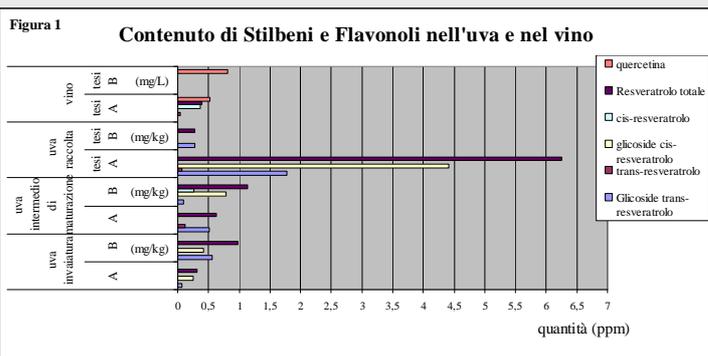
L'isolamento del micete, sia dai grappoli che dal mosto, è stata eseguita utilizzando terreni solidi agarizzati contenenti antibiotici per inibire la crescita batterica contaminante: MEA e MEA-B. Quest'ultimo contiene anche un antifungino che svolge la funzione di inibitore selettivo nei confronti della maggior parte delle altre specie appartenenti al genere *Aspergillus*, ma verso cui l'*Aspergillus carbonarius* risulta resistente.



Analisi molecolare: PCR

Le indagini molecolari hanno previsto una prima fase di estrazione del DNA sia da campioni di mosto che da piastre dove sono cresciute le colonie sospette e successiva amplificazione tramite PCR.

Risultati e discussioni



Polifenoli totali e attività antiossidante nel vino "Nero d'Avola"

CAMPIONE /TESI	POLIFENOLI TOTALI (mg/IAC. GALLICO)	ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (ABTS) Mm Trolox Eq.	ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (DPPH) Mm Trolox Eq.
(Tesi A)	2240,15	14,28	16,553
(Tesi B)	2186,80	15,01	17,035

Contenuto di ocratossina A nell'uva e nel vino

Epoca Campionamento UVE	Contenuto di OTA ng/g	Campioni
Inizio Invaiaitura	< LOQ*	1-2
Intermedio di maturazione	< LOQ*	3-4
Raccolta	0,14 ± 0,04	5
	0,06 ± 0,01	6

LOQ* = LIMITE DI QUANTIFICAZIONE = 0,05 ng/g

Campione Vinificato	Tesi	Contenuto di OTA (ng/ml)
7	A	0,28±0,08
8	B	0,29±0,04
9	A	0,12±0,02
10	B	0,16±0,01

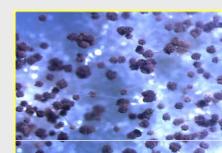
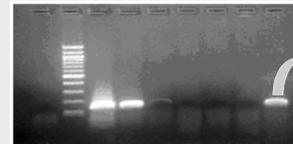


Foto allo stereomicroscopio di *A. carbonarius* isolato da mosto

Corsa elettroforetica su gel di agarosio

K- 1 2 3 4 5 6 7 K+



Banda di 141 bp *A. carbonarius*

Controllo positivo ceppo di riferimento *A. carbonarius* (NRRL67).

Riferimenti bibliografici

- (1) Grippi F. et al. Detection of polyphenolic compounds (stilbenes and flavonoids) in natural products Recent Development in Medicinal Plant Research, 2007: 393-404.
- (2) Brera C., Miraglia M., et al. 2003. Automated HPLC Method for the Determination of Ochrotoxin A in Wine Samples. J. of Liquid Chromatography & related technologies. 26, 119-133.
- (3) A. Atoui F. Mathieu, A. Lebrhi (2007) Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 115, 313-318.
- (4) S.Pollastro, R.M. De Miccolis Angelini and F. Faretra (2006). A semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*.
- (5) L.Bavaresco, S. Vezzulli, S. Civardi, M. Gatti, A. Pietri, F. Ferrari, P.Batilani (2008). Clorosi ferrica da calcare e risposta della vite all'attacco di *Aspergillus carbonarius*.