

Ise ocratossine A intai vins passîts furlans?

EMANUELA TORELLI & ROMANO LOCCI*

Ristret. I foncs otignûts dai raps di ue secjade, doprâts in Friûl par fâ il vin passît, a son stâts analizâts par scuvierzi la presince di potenziâi produtôrs di ocratossine A (OTA), cun cure speciâl a lis speciis dai gjenars *Penicillium* e *Aspergillus*. Di champions di cinc varietâts di ue, cjapâts sù in zonis diviersis dal Friûl, a son stadis isoladis 379 culturis di *Penicillium*, ma nissune di *Aspergillus*. Cuatri culturis, arlevadis su agâr cun most di ue e su terens sintetics licuits, a àn produsût metabolitis fluoressents in lûc UV tai cromatograms su strât sutîl (TLC). Trê di chestis, analizadis par cromatografie licuide a alte pression (HPLC) e daspò purificazion in colone di imunoafinitât, a son risultadis buinis di produci OTA. Lis culturis a son stadis classificadis, seont lis lôr carateristichis morfoculturâls e par secuenziament dal DNA ribosomâl, come *Penicillium puberulum* e *P. variable*. Nissune culture e parten a lis speciis *P. verrucosum* o *P. nordicum*.

Peraulis clâf. *Aspergillus*, foncs, micotossinis, ocratossine A, *Penicillium*, *Vitis vinifera*.

Introduzion. Dîs agns indaûr inte letérature sientifiche e je vignude fûr une note che e pandeve la presince des ocratossinis tal vin (Zimmerli e Dick 1996). Di chê volte il numar dai articui su la ue e sui prodots de vît contaminâts de micotossinis al è continuât a inressi in progression, interessant cuasi ducj i paîs dulà che lis bevandis otignudis de ue (most, vin, licôrs e v.i.) a vegnin consumadis. In Friûl il vin al è di grant interès economic e ancje par cheste reson e je stade puartade indenant une ri-

* Dipartiment di Biologie Aplicade a la Protezion des Plantis, Universitât dal Friûl, Italie.
E-mail: romano.locci@uniud.it

cercje, prime par viodi se il probleme al fos ancje in region e daspò par capî a ce nivel che al podès interessâ la industrie enologjiche locâl.

Micotossinis. Intun articul publicât su chest Gjornâl (Locci e Gobbi 2002) e je stade contade in curt la storie de contaminazion dai prodots agricui par opare des micotossinis, començant des primis testimoneançis storichis e de tremende influence che a àn vût lis micotossicosis te Ete di Mieç, in mût di dimostrâ cemût che la micotossicologjie no sedi dome une discuierte moderne. Naturalmentri tal nestri timp la cressite dal cuvierç internazionâl dai prodots agricui e la lôr conservazion in quantitâts grandononis e in condizions no simpri perfetis a àn fat inçressi i incomuts relatîfs.

Lis micotossinis a son metabolitis secundaris dai foncs che a àn efjets pericolôs sul om e su altris nemâi a sanc cjalt, e a puedin puartâ a mala tiis e pierditis economichis impuartantis. Intal articul ricuardât parsore, lis micotossinis produsudis dai foncs dai gjenars *Aspergillus* (aflatossinis) e *Fusarium* (specialmentri lis fumonisinis) a jerin stadis nomenadis come lis plui pericolosis par la salût. Di fat lis sostancis a àn efjets biologjics diferents, par vie de lôr divierse nature chimiche, e a puedin jessi mutagenichis, teratogenichis, carcinogenichis, estrogenichis, emoragjichis, imunotossichis, nefrotossichis, epatotossichis, dermatotossichis o neurotossichis. I intosseaments a son il risultât de glotide di mangjative di prodots vegjetâi contaminants, ma ancje di chei di nemâi nudrîts cun materiâl infetât (come la aflatossine M tal lat, te cjar e v.i.). I efjets su la salût a dipindin de quantitât de tossine e de tossicitât acude o croniche de stesse, dal pês e de età de persone, de presince di altris micotossinis cun azion sinergjistiche.

In ogni câs, aflatossinis e fumonisinis no son lis solis sostancis pericolosis e il numar dai metabolitis dai foncs al continue a cressi. In chest articul l'interès al è concentrât su un altri grup di micotossinis, lis ocratossinis, cun speciâl riuuart a la lôr presince te ue e tes bevandis relativis.

Ocratossine A. La ocratossine A (OTA), un metabolite secundari des speciis di *Aspergillus* e di *Penicillium*, e continue a riclamâ une vore di interès par vie dai incomuts che e cause te salût dal om e di altris nemâi (Abarca et al. 1998). Il metabolite (Figure 1) al mostre efjets nefrotossics,

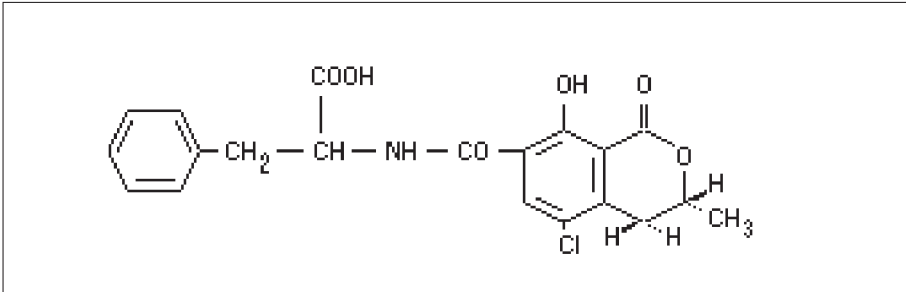


Figure 1. Ocratossine A (OTA).

ma ancje teratogjenics e carcinogjenics. Al è stat associât cun la nefropatie endemichhe dai paîs balcanics (*Balkan Endemic Nephropathy*) e cun tumôrs dal sisteme urinari. La Agenzie Internazionâl dal Cancar e à classificât la OTA intal grup 2B, come carcinogjenic par l'om. La tossine e je ancje immunosuppressive, stant l'efiet di inibizion de sintesi des proteinis che a contegnin fenilalanine e ancje di altris enzimis (Mantle 2002).

La OTA e je produsude di foncs come *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *Penicillium verrucosum* (Abrunhosa et al. 2001). Chestis speciis si diferenzin pe lôr divierse temperadure di cressite.

Lis speciis di *Penicillium* che a produsin OTA a cressin ben intun ambit grant di temperaduris (4-31 °C) (Zimmerli e Dick 1996), e par tant a predominin in regions temperadis come l'Europe dal nord e il Canada (Larsen et al. 2001). *P. verrucosum* al è il produtôr principâl di OTA in chestis condizions.

Di chê altre bande, lis speciis di *Aspergillus* a àn bisugne di temperaduris un pôc plui altis (12-39 °C) (Zimmerli e Dick 1996) e a son plui bondantis in regions plui cjaldis e tropicâls (Larsen et al. 2001). *A. ochraceus* al cres a 8-37 °C, e al prodûs dentri di chest ambit di temperaduris. *A. carbonarius* al cres di cirche 10 a 40 °C, ancje se si sa pôc su lis condizions che a favorissin la produzion de tossine.

Ricercjis fatis a partî dal 1970 a àn provât la presince di OTA intune vore di prodots come gruessam, caffè, speziis, bire, cacao, frutam sec e cjar. Pôc timp indaûr e je stade cjatade ancje intal lat.

Stant la sô grande difusion in tancj prodots, il risultât al è une continue esposizion dal om ae OTA, specialmenti in Europe, là che o cjatìn la plui grande frecuence e i livei plui alts tal gruessam. La Union Euro-

peane e à stabilît regulis sui cuantitatîfs di OTA di no superâ te mangjative dal om e dai nemâi a rivuart di une schirie di prodots agricui.

OTA te vigne e tai prodots enologjics. Come che o vin ricuardât parsore, daspò dal prin rapuart di Zimmerli e Dick (1996) su la presince de OTA tal most di ue e tal vin, une vore di altris ricercjîs a son stadi fatis tai ultins agns [che si viodi a chest rivuart, Torelli et al. (2002, 2006) e Varga e Kozakiewicz (2006)].

I risultâts si puedin struçjâ in maniere schematiche cul fat che la tossine no ven produsude tal vin, la sô presince e je la consequence di une contaminazion dal materiâl di partence (ue e most), la cuantitât de OTA e dipint une vore dal clime e de divignince gjeografiche de ue, des praticis dopradis inte coltivazion de vît e dai metodis usâts par fâ il vin.

Il prin fat al ven confermât de presince de OTA inte ue e intal most. Par di plui la incessite dal fonc e ven inibide dal alcul e des condizions anaerobichis de fermentazion (Zimmerli e Dick 1996). Naturalmentri e je pussibil une contaminazion a partî dai contignidôrs (tanks di fermentazion, botis, barîi e v.i.) netâts no masse ben. Lis analisis de ue e dal most a dimostrin une relazion strente tra il puest gjeografic de coltivazion de vît e la presince de OTA. Il fat al è in relazion cu la contaminazion dal prodot in timp di racuelte, un moment critic de coltivazion, cuant che a vegnin a mancjâ lis difesis naturâls e la ue e ven facilmentri tacade ancje di fonc saprotrofigs (come speciis di *Aspergillus* e di *Penicillium*). Lis praticis dopradis in agriculture e i trataments cuntri lis malatiis a contribuissin inte stesse direzion (Otteneder e Majerus 2000). Par finî, i livêi diferents de OTA intai vins blancs, rosât e neris a dipendin cence fal ancje da lis diviersis tecnicis dopradis te vinificazion, là che tai vins neris la plui lungje presince dai raps inte fermentazion e favorîs il trasferiment de tossine tal vin (Majerus et al. 2000).

I vins in cumierç cuntune alte contaminazion a puedin fâ innessi il livel cuotidian di consum de OTA, specialmentri in pâis dulà che si bêt une vore di vin. Il *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* al stime che il 15% de OTA tal om al sedi dovût al consum di vin.

Sperimentazion. Un passât al ven otignût par fermentazion di ue che e ven lassade a suîa par 90-120 dîs in casselis di len, di plastiche o di fier

daspò de racuelte. La pierdite di aghe e rive ator dal 35%, cuntune incressite dai zucars (25-40%). Vie pal secjament la ue e ven facilmentri colonizade di foncs, come *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp. (Tachis 1988). Tignint iniment lis implicazions pe salût e la impuartance de produzion dal vin in Friûl, o vin testade la ue destinate a la produzion di vins passîts tai Cuei Orientâi. La finalitât de ricercje e jere chê di meti in evidence la pussibil presince di foncs produtôrs potenziâi di OTA inte ue destinade a la produzion di vin passât.

Materiâi e metodis

Campionament. Un centenâr di raps di ue (*Vitis vinifera*) des varietâts Picolit, Verduç, Riesling Renan, Ribuele nere e Refosc a son stâts cjapâts sù a câs da lis casselis di len vie pal secjament. I raps a jerin stâts conservâts tai locâi par alc come 20-25 dîs daspò de racuelte (Setembar-Otubar) di 8 aziendis, a Cividât, Nimis e Prepot, inte zone DOC dai Cuei Orientâi dal Friûl, Italie (Tabele 1). I ambients di conservazion no jerin scjaldâts artificialmentri e la temperature di fûr e jere ator dai 18 °C in Setembar e dai 14 °C in Otubar.

Tabele 1. Varietât de ue, vins relatîfs e divignince de ue.

<i>Varietât de ue</i>	<i>Gjenar di vin</i>	<i>Divignince</i>
Picolit	Blanc	Cividât, Nimis, Prepot
Refosc	Neri	Nimis
Ribuele nere	Neri	Cividât, Nimis
Riesling renan	Blanc	Cividât
Verduç	Blanc	Cividât, Nimis

I raps a son stâts incubâts in cjamare umide a 25 °C par 7 e fintremai a 14 dîs, fin a la formazion di coloniis di foncs. Dutis lis coloniis a son stadis trasferidis su piastris di *potato dextrose agar* (PDA).

Condizions di culture. Ducj i foncs a son stâts purificâts su piastris di PDA. Lis culturis a son stadis arlevadis su PDA e conservadis sul stes teren a 4 °C su PDA e su *Difco white quartz sand* a 25 °C. Dôs culturis di riferiment (*Aspergillus niger*, CBS 101697 e *Penicillium verrucosum*, CBS 323.92), che a produsin OTA, a son stadis dopradis come ‘controls’.

Produzion, cuantificazion e conferme de OTA

Selezion preliminar. Dutis lis culturis di *Penicillium* isoladis dai campion, insieme a chês di riferiment, a son stadis inoculadis su CCA (*Cocnut Cream Agar*) e incubadis a 37 °C par 7 dîs. Il cercli di fluoressence ator des coloniis, che si viôt sot lûc UV, al è stât doprât par une prime selezion di potenziâi produtôrs di OTA.

Cromatografie in strât sutîl (TLC: Thin-layer chromatography). Lis culturis di *Penicillium* che a vevin mostrât fluoressence su CCA e chês di riferiment a son stadis arlevadis su agâr di most di ue (GJA: *Grape Juice Agar*) par 7 dîs a 25 °C (Abrunhosa et al. 2001). Par controlâ la presence di metabolitis secundariis lis coloniis a son stadis sminuçadis in 20 ml di cloroformi/metanûl (2:1), e filtradis su cjarte (Whatman, no 1001 110). Daspò la evoporazion dal solvent, 20 µl par ognidune culture a son stâts cjamâts su piastris di Silica gel 60 (20X20) cence indicadôr (Merck, Gjermanie). La TLC e je stade fate intune cjamare saturade, doprant TEF (toluene, acetât di etil e acit formic, 5:4:1). Lis maglis a son stadis visualizadis sborfant lis piastris cun p-anisaldeide (0.5%) in metanûl/acit sulfuric/acit acetic (18:1:1) (Sigma-Aldrich, SUA) e daspò un riscjaldament par 8 min. a 105 °C. Di ogni linie la magle, che e corispuindeve par colôr e valôr di R_f cun chês des culturis di riferiment e chê dal standard (un campion di OTA), e je stade gratade vie de piastre e metude in 40 µl di cloroformi/metanûl (2:1). Daspò di 15 min. il materiâl al è stât cjamât su piastris gnovis e la TLC e je stade fate come bielzà descrit prime. Il standard di riferiment al jere la Ochratoxin A (Sigma-Aldrich, SUA) doprade a une concentrazione di 1 mg/ml in cloroformi/metanûl (2:1) e mantignude a 4 °C.

Condizions otimâls. Par puartâ al massim la produzion di OTA, lis culturis che si son dimostradis positivis inte prove de TLC a son stadis arlevadis suntune schirie di terens doprâts in micologjie e cun condizions ambientâls diferentis. Il teren di culture concentrât al è stât esaminât cun lis metodologjis de TLC descritis disore.

Cromatografie di afinitât. Lis culturis di *Penicillium* cun fluoressence su CCA e positivis inte prove de TLC, a son stadis analizadis pe produzion

de OTA su 10 ml di teren MEB, inoculât cun 200 µl di une suspension di conidis (10^7 conidis/ml). I contignidôrs a son stâts incubâts par 10 dîs a 25 °C al scûr, cence sedi agjitâts e il materiâl filtrât zontratraviers cjar-te Miracloth (Calbiochem) intune siringhe di 0,45 µm (Roth). Daspò de riduzion dal volum a 6 ml par evaporazion a 40 °C, il teren licuit al è stât metût intune colone di imunoafinitât (OchraTest) e tratât daûr des istruzions dadis de dite (Vicom, Watertown, MA). Il prodot in soluzion di metanûl al ven analizât par HPLC.

Cromatografie liquide a alte pression (HPLC). Il sisteme di HPLC (Varian Analytical Instruments, SUA) al consist intun modul di campionament (volum dal campion di 20 µl), di un *detector* di fluoressence (Prostar 363) fissât a 333 nm di ecitazion e 470 nm di emission e di un secont *detector* di lûc UV (Prostar 310 UV/Vis detector). E je stade doprade une colone Nucleosil C18 (Varian Analytical Instruments, SUA, di 5 µm di dimension dal particolât) a temperadure ambient cuntune fase mobile (acetone nitril/aghe /acit acetic 57:41:2) e a une velocitât di 1 ml/min (Abarca et al. 1998). Pe calibrazion a son stadis dopradis soluzions (da 0,1 a 1,5 µg/ml) de OTA in metanûl. La produzion de OTA e je stade confermade daspò derivazion e analisi par mieç de HPLC dai esters metilics dai estrats.

Identificazion dai foncs. Dutis lis coloniis dai foncs isoladis dai raps e purificadis su PDA a son stadis studiadis al microscopi par sielzi dome chês che a partignivin ai gjenars *Aspergillus* e *Penicillium*. Altris studis a son stâts fats dome su lis culturis di *Penicillium* che a jerin positivis par la TLC. Undis di lôr a son stadis arlevadis su CYA, MEA e G25N e la lôr identificazion e je stade otignude doprant lis indicazioni dadis par il gjenar (Pitt 1979). Lis trê culturis che a produsevin OTA a son stadis depositadis inte Bancje Nazionâl des Culturis (NCB, National Culture Bank) de Universitât di Udin.

Isolament dal DNA dai foncs. Par rivâ a une miôr identificazion dai produtôrs di OTA, il DNA gjenomic al è stât isolât dal miceli tirât sù des piastris di agâr e metût in 250 ml di 50 mM EDTA. La lisi e je stade faite zontant 20 µl lyticase (20 U/µl) e dopo incubazion a 37 °C par 1 ore.

Il miceli al è stât centrifugât a 12000 g par 4 min. La purificazion dal DNA gjenomic e je stade fate cuntun *Wizard Genomic purification kit* (Promega Italia Srl). Daspò estrazion cun fenôl il DNA al è stât precipitât cun isopropanûl, passât in aghe e mantignût a 20 °C.

Secuenziament dal DNA. Il rDNA des culturis che a produsevin OTA al è stât amplificât par mieç de PCR doprant i *primers* NS7 e NS8 e ancje i *primers* ITS5 e ITS4 daûr des proceduris solitis. A son stadis fatis dôs reazions PCR diferentis e i DNA amplificâts a son stâts amplificâts cui metodis normâi. Lis secuencis dai nucleotidis a son stadis confrontadis cun chês dal database dal NCBI doprant l'algoritmi Blast-n.

Risultâts

Isolament. I foncs isolâts plui dispès dai raps a son speciis dal gjenar *Penicillium*. Chei altris a partegnin ai gjenars *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Botrytis*. Tresinte e setantenûf culturis dal prin gjenar a son stadis isoladis dai raps e dai grignêi di ue blancje e nere doprade par fâ il vin passât, intant che a jerin a secjâ. A no son stadis cjatadis speciis dal gjenar *Aspergillus*.

Studiant la forme dal penicil lis 379 culturis di *Penicillium* a son stadis dividudis in biverticiladis (56%), monoverticiladis (24%), biverticiladis/terverticiladis (14%), monoverticiladis cun pucis metulis (4%) e terverticiladis (2%).

Selezion e TLC. La produzion di fluoressence dai foncs micotossigenics su CCA e je stade doprade par une separazion rapide dai produtôrs di OTA. In cheste ricercje la selezion e à mostrât la presince di 34 su 379 (9%) culturis di *Penicillium* spp. cun fluoressence su CCA daspò 7 dîs di cressite. La fluoressence e jere compagne di chê mostrade de culture di riferiment *P. verrucosum*. *A. niger* al è cressût di plui e al à un cercli di fluoressence plui grant. A chest pont lis culturis positivis a son stadis analizadis par mieç de TLC. Dai trentecuatrici foncs, undis arlevâts su teren cun most di ue, a formin maglis fluoressentis e cuatri di lôr maglis companis par colôr e par valôr di R_f a chês dal OTA di riferiment e dal *A. niger* (Figure 2). Altris siet culturis a produsin invece maglis diferentis di chês de OTA e des culturis di riferiment.

La culture di riferiment *P. verrucosum* e prodûs une cuantitât di OTA tant basse di no podê jessi viodude par mieç de TLC, ancje cuant che e je arlevade su MEB, là che la cressite e je une vore scjarse. Par altri la sô produzion di OTA e je stade provade da lis analisis di immunoafinitât e di chês fluorometricis.

Il MEB si è mostrât il miôr teren sintetic pe produzion de OTA e lis condizions otimâls par lis cuatri culturis a son stadis un pH 5, une temperaturade di 25 °C e une durade di arlevament di 10 dîs, come confermât dal fat che e ven produsude une magle ugnule, fluoessente tal lûc UV e cul stes colôr e R_f de OTA di riferiment. La zonte di KCl no à nissun efiet su la produzion de OTA.

Cromatografie di immunoafinitât e

HPLC. Des cuatri culturis di *Penicillium* positivis inte TLC, analizadis par mieç de HPCL, daspò de purificazion su colone di immunoafinitât, dome NCB1493, 1494 e 1495, isoladis de ue di Verduç e di Picolit a àn produsût OTA. La culture 3.2.20 no à dât risultâts positîfs.

Tabele 2. Cuantitâts di OTA produsudis des culturis di *Penicillium* spp., isoladis de ue in Friûl, e de culture di riferiment di *A. niger*, determinadis par mieç de HPLC.

<i>Culture</i>	<i>OTA (µg/ml MetOH)</i>
NCB1493	0,07
NCB1494	0,30
NCB1495	0,20
CBS 101697	2,00

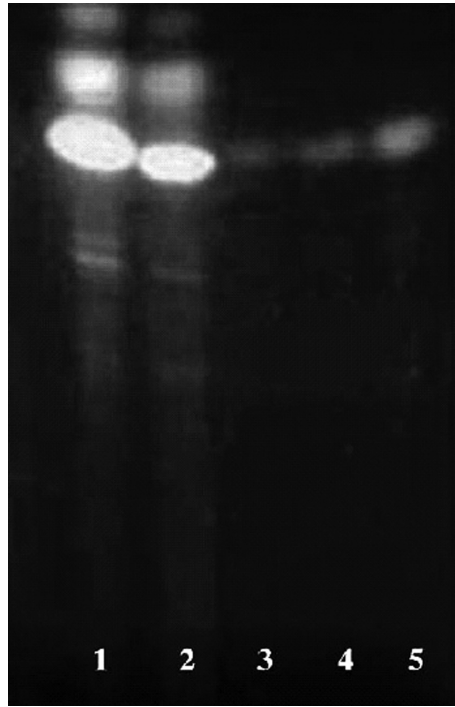


Figure 2. Maglis otignudis daspò de TLC dai estrats dai foncs arlevâts su GJA. Rie 1, soluzione standard (1 mg/ml) de OTA; Rie 2, OTA di *A. niger*; Rie 3, culture NCB1493; Rie 4, culture 3.2.20; Rie 5, culture NCB1495.

Identificazion. Lis culturis di *Penicillium* positivis inte TLC a son stadis identificadis tignint cont dai caratars de micromorfologjie, come indicât di Pitt (1979) (Tabele 3). Dutis a jerin biverticiladis e no son mai stadis cjatadis formis terverticiladis. Come morfologjie i numars 3.2.20, NCB1493 e NCB1495 a jerin dal dut compagns. Par une conferme de identificazion, a nivel di specie, lis culturis NCB1493, NCB1494 e NCB1495 a son stadis mandadis ancje al Centraalbureau voor Schimmlecultures (CBS), di Utrecht in Olande.

Tabele 3. Identificazion morfologjiche des culturis di *Penicillium* isoladis de ue, fluoressentis su CCA e positivis te TLC.

<i>Culture</i>	<i>Subgjenar</i>	<i>Sezion</i>	<i>Serie</i>
3.2.20	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Urticicola</i>
NCB1493	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Urticicola</i>
NCB1494	<i>Biverticillium</i>	<i>Simplicium</i>	<i>Islandica</i>
NCB1495	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Urticicola</i>

Par di plui, come indicât intai metodis, des culturis NCB al è stât fat ancje il secuenziament dai gjenis dai ribosomis. Lis secuencis otignudis de amplificazion dal rDNA des culturis NCB1494 e NCB1495 cun i *primers* NS8-NS7 a àn dât risultâts une vore compagns (> 99% di identitât). Cun riferiment a altris secuencis, registradis intai *databases*, la culture NCB1494 e presentave une secuencia di DNA identiche pal 97% a chê di *P. radicum* e la NCB1495 une secuencia identiche a chê di *P. radicum* e *P. rugulosum*.

Fasint la analisi de region ITS1-5.8- ITS2 dal rDNAs, la secuencia de NCB1495 e je risultade identiche pal 99% a chês di *P. glabrum* (AY373915) e *P. thomii* (AY373934) e chê de NCB1494 pal 93% e pal 96% identiche a chês di *P. glabrum* e *P. thomii*. Nissune des culturis isoladis in Friûl e à presentât secuencis compagnis di chês di *P. verrucosum*.

In conclusion lis trê culturis a son stadis identificadis come *P. puberulum* (NCB 1493 e 1495) e *P. variabile* (NCB 1494).

Discussion. I risultâts di cheste ricercje a mostrin cemût che dome il 0,8% des culturis di *Penicillium* isoladis in Friûl di ue destinade a la produzion di vin passât a puedin produci OTA cuant che a vegnin arlevadis

su terens di laboratorî. Chest nol vûl dî che la ue e jere contaminade de tossine, come che al è stât provât di une ricercje indipendente (De Zan, informazion private) che e à falât di cjatâ OTA tal vin passît produsût. Par zonte no son stadis cjatadis culturis di *Aspergillus*.

Chescj risultâts a son in contrast cun chei di ricercjîs fatîs in altris regions talianis (Sage et al. 2002; Battilani et al. 2003) su ue arlevade pe produzion di vins ordenaris. A chest proposit si scugne fâ cualchi considerazion. Tant par començâ tes aziendis di dimension relativementri no grandonone, là che al è stât fat il studi, la ue pe produzion di vin passît e ven selezionade e i raps plui contaminâts di mufe a vegnin scartâts daurman.

Par zonte, cun rivuart a la presince plui grande da lis speciis di *Penicillium* su chês di *Aspergillus* inte ue racuelte in Friûl, ancje se al è in contrast cui risultâts otignûts di Battilani e colaboradôrs (2003), il fat a nol maravee plui di tant, stant che la clime in Friûl e je relativementri plui frescje, la temperadure medie in Avost-Setembar e Otubar, intal an che al è stât fat il campionament e jere rispetivementri di 23-18° e 14 °C, paragonade a chês des regions campionadis dai autôrs ricuardâts disore (tai stes mêis lis temperaduris mediis a jerin 28-24 e 19 °C in Emîlie Romagna e 30-27 e 22 °C in Pulie). La region gjeografiche di divignince e à une fuarte influence su la contaminazion de OTA, sedi tai vins ros che tai passîts. Une scjale progressive e pues jessi osservade tes regions dal mâr Adriatic, passant dal cussî clamât 'Triveneto' a la Pulie, e chest al sta a indicâ come che lis diferencis climatichis a influencin la contaminazion des mufis e la cuantitât di OTA (Pietri et al. 2001). Intal stes mût, inte contaminazion de OTA dal gruessam, lis culturis di speciis di *Penicillium* a son plui bondantis in regions climatichis temperadis, cuant che invezit chês di *Aspergillus* a àn la tindince di predominâ tes climis plui cjaldis (Zimmerli e Dick 1996). In condizions di umiditât otimâl, l'ambit (*range*) di temperadure al è di 4-31 °C par *Penicillium verrucosum* e di 12-37 °C par *Aspergillus ochraceus* (Moss 1996).

Lis culturis di *Penicillium* isoladis e che a produsin OTA no partegnin a lis speciis *P. verrucosum* o *P. nordicum*, come che al risulde des nestris analisis morfologjichis e moleculârs e come che al è confermât dal CBS. Chescj risultâts, no spietâts, a compuartin informazions gnovis su la produzion di OTA par opare di foncs che a partegnin al gjenar *Penicillium*.

In cheste ricercje al è stât dimostrât che ancje altris speciis di *Penicillium* a son buinis di produsi OTA *in vitro*.

In fin, par chel che o savìn, la uniche ricercje compagne su ue lassade a suîa su la vît o dopo la racuelte par fâ vins come il nestri passât e je chê fate in Spagne di Gomez e colaboradôrs (2006). Ancje chescj autôrs a àn cjatât che lis speciis di *Aspergillus* a jerin dominantis. Di gnûf ancje in chest câs però, cu la ecezion da la regjon di Girone, la ue e jere stade campionade in distrets cjalts e semi-arits, come chei di Cadiz e di Cordoba.