

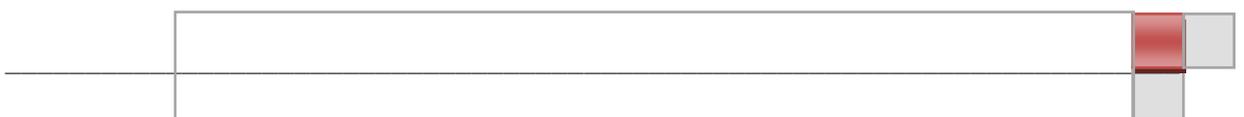


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA

Identificación y caracterización genética de cepas de
Aspergillus productoras potenciales de ocratoxina A
(OTA) en uvas y vinos de *Vitis vinífera* L. cv 'Tannat'

Virginia Paulina Ferrari Morena

Montevideo, 2014





*"...Porque después de todo he comprendido
por lo que el árbol tiene de florido
vive de lo que tiene sepultado"*

Francisco Luis Bernárdez

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis Edgardo Disegna y Eduardo Dellacassa y a la tutoría de Victoria Bonnacarrère, por compartir su conocimiento.

A Edgardo, como responsable del grupo de investigación de Vitivinicultura de INIA por apoyarme en el inicio de mi carrera profesional, la predisposición y paciencia.

A Eduardo, mi tutor académico por la confianza conferida, la dedicación y ayudarme a enfrentar el final de este trabajo con optimismo e ilusión.

A Victoria, por moldear la biología molecular a un modo práctico y sencillo para una pasante inexperta, antes de que este trabajo iniciara.

Gracias por todo lo aprendido y en ocasiones soportar algún despiste.

A la beca de Posgrado otorgada en el marco del convenio entre Facultad de Química y LATU, a la Comisión de Seguimiento y demás implicados. Al proyecto INIA - PDT S/C/OP/66/03 y a PEDECIBA por el apoyo económico y la beca para la realización de la pasantía en el exterior.

En Facultad de Química – UdelaR agradezco a todos los que hicieron posible la realización de este Posgrado, en especial a Nelly por su cálida atención y preocupación. A Gabriela y a Laura por toda su ayuda.

A INIA, por hacer posible la realización de este trabajo bajo su jurisdicción. Personal, compañeros y amigos de todas las áreas y rincones. A la sección de Fruticultura, a Alicia por las charlas y comentarios sinceros. Al compañero y subjefe Coniberti por sus amenazas nunca cumplidas y su insistencia inspiradora. A los amigos del laboratorio, a Paula y Cecilia, a Pablo y Maru por prestarme su ayuda en todo momento. A Noelia, Wilma, Beatriz, Carolina y Guillermo. A Facundo, Alejandro y Juliana por su invaluable apoyo desde lo analítico a lo moral. En Biotecnología a todos por su disposición y buen ánimo, a Alicia, Belén, Silvia y Wanda. A quienes me ayudaron en los muestreos y demás trabajos prácticos, administrativos y de mantenimiento, mil gracias.

A los productores, técnicos y empleados de cada viñedo por el apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis.

I would like to thank Prof. Wayne Wilcox, Department of Food Science and Technology, for the opportunity to work in his lab and for his help, guidance and suggestions during my internships in New York State Agricultural Experiment Station -

Cornell University. A great thanks also to Seiya and Laura in Plant Pathology Labs; to Randy, Dave and Ranya in Food Microbiology Labs for their advice, help and friendship. I really appreciate to each one of my dear friends in “The Triplex” and surroundings, to everyone who made of my stay an unforgettable experience.

A las amigas Bioquímicas quiero agradecerles su apoyo. A los amigos, vecinos y conocidos por el interés, las muestras de ánimo y cariño.

A toda la familia, cercana o lejana, natural, adoptada o política que acompañaron en mayor o en menor medida el proceso.

El trabajo y esfuerzo que ha supuesto esta tesis se lo dedico con todo el cariño a mis padres Daniel y Araceli, por el amor y apoyo incondicional, por darme alas y confianza sin dejar de acompañarme cuando, donde y como sea.

A mis soles, a Mauri y Reggina por todo y mucho más...

RESUMEN

El género *Aspergillus* tiene una importancia industrial considerable debido a la capacidad de producir enzimas y ácidos orgánicos que presentan algunas de sus especies. Sin embargo, otras especies del mismo género son capaces de producir deterioro y contaminación de ciertos sustratos alimentarios así como de sintetizar micotoxinas, entre las que se destacan por su importancia como contaminantes las aflatoxinas, fumonisinas y la ocratoxina A (OTA).

La OTA es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas en animales, y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno crónico en humanos (Grupo 2B), tras su consumo habitual. Las principales fuentes de exposición humana a la OTA son los cereales, seguidos del vino, el café y la cerveza. Su contenido máximo en estos y otros productos alimentarios está regulado principalmente por la Unión Europea.

En particular, para el caso de viñedos en los que se produzca una infección importante, las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA en uvas son *A. carbonarius* y los miembros del agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*) de la sección *Nigri*. También pueden aparecer especies uniseriadas y *A. ochraceus* de la sección *Circumdati*.

Esta situación determina que, para minimizar la presencia de especies del género *Aspergillus*, y la concomitante entrada de OTA y otras micotoxinas en la cadena alimentaria vitivinícola, es muy importante disponer de herramientas de diagnóstico rápido, para poder monitorear de forma efectiva los puntos críticos de control.

En este trabajo, se realizó un estudio sobre la biodiversidad de especies fúngicas durante las vendimias 2007-2008-2010 sobre 22 predios comerciales de la variedad Tannat en la región sur del Uruguay. Como resultado se aislaron un total de 1153 cepas identificadas inicialmente como *Aspergillus*. El reconocimiento macroscópico y microscópico de las especies de este género se realizó siguiendo claves precisas y se encontraron varios grupos y subgrupos de aislamientos de acuerdo a las características morfológicas de las colonias. El color de las colonias en PDA fue el carácter discriminatorio utilizado a priori para clasificar los aislamientos en 4 subgrupos. Se desarrollaron ensayos de PCR específicos para la caracterización y confirmación de la identificación de las principales especies de *Aspergillus* presentes en uvas (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. ochraceus*). Los cebadores utilizados en estas reacciones están

diseñados a partir de la comparación de secuencias de la región espaciadora intergénica del rADN (ITS), en diversas cepas y especies de *Aspergillus*. La identificación fenotípica y genotípica con los cebadores OCRA1/OCRA2 coincidieron en la determinación de la presencia de 8 cepas de *A. ochraceus* que representan un 0,2% de total de los aislamientos. En ninguno de los aislamientos se obtuvo producto de amplificación para los primer CAR1/CAR2 por lo que no habría presencia de cepas de *A. carbonarius* en los viñedos analizados. Sin embargo más de un 50% de los aislamientos serían ocratoxigénicos según la amplificación del cebador AoLC35-12L/AoLC35-12R. Debido a la ausencia de aislamientos *A. carbonarius* y a la baja incidencia de *A. ochraceus*, los responsables de la presencia de OTA en vinos serían las especies pertenecientes a la sección *Nigri*.

Se analizaron las características climáticas de cada viñedo en particular y la ocurrencia de otros factores sobre la presencia de las especies de *Aspergillus* y sus niveles de producción de OTA. La altura del plano de poda y la compactación de la canopia son los que mostraron mayor incidencia. Las correlaciones se comprobaron bajo condiciones experimentales y se confirmó que el microclima al que están expuesto los racimos y el vigor de las plantas son determinantes en el grado de infestación y la presencia de OTA en los vinos. Por este motivo la aplicación de prácticas de manejo en los viñedos son recomendables para reducir el riesgo de crecimiento y producción de OTA por las cepas de *Aspergillus* presentes.

Si bien en ninguno de los vinos producidos se obtuvieron valores superiores al límite de 2 µg/l de OTA, la presencia en los viñedos de cepas productoras y potencialmente productoras y las condiciones climáticas cambiantes, predisponen a aumentar el riesgo. Esta situación debe evaluarse periódicamente en un sistema de calidad por un Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

OBJETIVOS

General:

- Identificar factores biológicos y de manejo que pueden afectar la presencia de ocratoxina A (OTA) en distintos puntos de la cadena vitivinícola.

Específicos:

- Identificar y aislar las distintas especies de *Aspergillus* presentes en los viñedos evaluados
- Caracterizar genéticamente los aislamientos y evaluar su potencialidad molecular como productores de OTA
- Estudiar la biodiversidad de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* por análisis de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- Avanzar en el conocimiento de las correlaciones existentes entre la presencia de cepas potencialmente productoras de OTA en uvas y sus correspondientes valores de OTA en vinos, con los factores que establezcan un riesgo para la estimulación metabólica conducente a la formación de toxinas, tanto en el viñedo como en la vinificación.



TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. OBJETIVOS	3
III. TABLA DE CONTENIDO	5
VI. ABREVIACIONES	8
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	9
1.1_ SISTEMAS DE CALIDAD	10
1.1.1. <i>Análisis de riesgos</i>	10
1.1.2. <i>Análisis de calidad</i>	12
1.2_ MICOTOXINAS	16
1.2.1. <i>Ocratoxinas</i>	17
1.2.2. <i>Ocratoxina A</i>	17
1.2.2.1. <i>Propiedades fisicoquímicas</i>	18
1.2.2.2. <i>Estabilidad de la OTA</i>	18
1.3_ ANTECEDENTES	19
1.4_ ESTRATEGIA	20
1.5_ MÉTODOS DE ESTUDIO	21
Capítulo 2. OTA EN LA CADENA VITIVINICOLA	23
2.1_ OTA EN ALIMENTOS	23
2.2_ TOXICOLOGÍA DE LA OTA	24
2.3_ PRODUCCIÓN DE UVAS, VINOS Y OTROS DERIVADOS	26
2.3.1. <i>Producción mundial de uvas, vino y otros derivados</i>	26
2.3.2. <i>Producción uruguaya de uvas, vino y otros derivados</i>	27
2.3.2.1. <i>Extensión vitícola del Uruguay</i>	28
2.3.2.2. <i>Producción de vinos en el Uruguay</i>	30
2.4_ CONTENIDO DE OTA EN LOS PRINCIPALES PRODUCTOS ENOLÓGICOS	31
2.5_ FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR OTA	33
2.6_ REGLAMENTACIONES	34

Capítulo 3_ ESTUDIO DE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS	35
3.1_ HONGOS MICOTOXIGÉNICOS.....	35
3.2_ HONGOS PRODUCTORES DE OTA.....	36
3.3_ DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS.....	41
3.3.1. Técnicas de recuento.....	41
<i>Metodología para el recuento.....</i>	41
3.3.2. Aislamiento y condiciones de incubación.....	41
<i>Metodología para el aislamiento.....</i>	42
3.3.3. Identificación y clasificación.....	44
3.3.3.1. Identificación fenotípica.....	44
<i>Metodología para la identificación fenotípica.....</i>	46
3.3.3.2. Identificación genética.....	46
<i>Estudios genéticos en hongos.....</i>	47
<i>Metodología para la identificación genética.....</i>	50
Capítulo 4_ ESTUDIO DE LA MICOFLORA DEL VIÑEDO	55
4.1_ UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	56
4.2_ VARIEDADES.....	58
4.3_ MADURACIÓN.....	60
<i>Metodología para el muestreo en los viñedos.....</i>	61
<i>Análisis de uvas.....</i>	61
Capítulo 5_ ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ECOSISTEMA EN LA PRESENCIA DE <i>Aspergillus</i> spp.	63
5.1_ CLIMA Y CONDICIONES METEOROLÓGICAS.....	65
5.2_ MÉTODO DE CULTIVO.....	69
5.3_ MICROCLIMA.....	71
5.4_ FACTORES BIOLÓGICOS.....	73
5.5_ FACTORES QUÍMICOS.....	75
5.6_ OTROS FACTORES.....	76
<i>Metodología para el estudio de la influencia del ecosistema.....</i>	77

Capítulo 6. PRESENCIA DE OTA EN LA VINIFICACIÓN	81
6.1_ <i>PROCESO DE VINIFICACIÓN</i>	82
<i>Metodología para el estudio del proceso de vinificación</i>	84
<i>Análisis de vinos</i>	85
6.2_ <i>OTA EN VINOS Y SUBPRODUCTOS DE LA VINIFICACIÓN</i>	87
<i>Metodología para la determinación de OTA en vinos y subproductos</i>	90
Capítulo 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
7.1_ <i>DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Aspergillus spp. EN VIÑEDOS DEL URUGUAY</i>	93
7.1.1. <i>Aislamiento e identificación fenotípica</i>	93
7.1.2. <i>Identificación genética</i>	97
7.1.3. <i>Producción de OTA de los aislamientos</i>	103
7.2_ <i>PARÁMETROS QUE AFECTAN LA OCURRENCIA DE Aspergillus spp. EN UVAS Y PRESENCIA DE OTA EN VINOS</i>	105
7.2.1. <i>Clima y condiciones meteorológicas</i>	105
7.2.2. <i>Método de cultivo</i>	108
7.2.3. <i>Microclima, factores biológicos y químicos</i>	115
7.3 _ <i>PRESENCIA DE OTA EN VINOS Y SUBPRODUCTOS DE LA VINIFICACIÓN</i> ...119	
Capítulo 8. CONCLUSIONES	129
<i>ANEXO. Composición y preparación de medios</i>	131
REFERENCIAS	133

ABREVIACIONES

ACP: Análisis de Componentes Principales
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
AC: Acidez titulable
Aw: Actividad de agua
CE: Comisión Europea
CYA: Czapeck Yeast Extract Agar
DAD: Detector de Arreglo de Diodos
DF: Detector de Fluorescencia
DP: Ensayo de Distancia de Plantación
DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EU: European Union
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
FLD: Fluorimetric Detection
GC: Gas Chromatography
GRAS: Generally Regarded As Safe
h: Altura del plano de poda
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IA: InmunoAnálisis
IAC: Immuno Affinity Column
IARC: International Agency for Research on Cancer
IC: Índice de Compacidad
IGS: InterGenic Spacer
IL: Infección/es Latente/s
IR: Infrarrojo
ISO: International Standard Organization
ITS: Internal Transcribed Sequence
JEFCA: Joint Expert Committee of Food Additives
LQ: Limit of Quantification
LD: Limit of Detection
MS: Espectrometría de Masas
OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino
OMS: Organización Mundial de la Salud
OTA: Ocratoxina A
PAR: Photosynthetically Active Radiation
pb: Pares de bases nucleotídicas
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFD: Photon Flux Density
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RP: Reverse Phase
SC: Ensayo de Sistema de Conducción
SPE: Solid Phase Extraction
TLC: Thin Layer Chromatography
UE: Unión Europea
ufr: Unidades de fluorescencia relativas
UNEP: United Nations Environment Programme
UV: Ultra-Violeta
WHO: World Health Organization

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El mercado mundial de vinos en los últimos años atraviesa por un proceso de cambio estructural caracterizado por exigencias en la calidad e inocuidad de los productos, acompañado de fuertes reglamentaciones que contemplan estos aspectos. En el diseño y cumplimiento de estas normativas se han involucrado diferentes organizaciones internacionales, tales como la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y FAO-OMS (a través del Codex Alimentarius). Uruguay, como país productor de vinos, debe adaptarse a estas exigencias y normativas de calidad e inocuidad en los mercados; para diferenciarse en la oferta de productos, apuntando a un mayor valor agregado. Por otra parte, es de vital importancia a la hora de competir en los mercados externos concentrar esfuerzos en la búsqueda de productos innovadores, de alta calidad y tipicidad utilizando procesos seguros e inocuos para los productores, los consumidores y el ambiente. Ya que el vino, además de ser agradable a la vista y paladar de quién lo consume, deberá ser inocuo. Esto implica que el vino sea el resultado de procesos de producción y control en todos los eslabones de la cadena productiva-industrial atendiendo a la seguridad alimentaria; y como consecuencia al empleo de prácticas de manufactura adecuadas. En la implementación de estos sistemas de calidad han de cumplirse ciertos pasos, como el análisis de los riesgos existentes y la aplicación consecuente de uno o más análisis de calidad.

1.1_ SISTEMAS DE CALIDAD

1.1.1. Análisis de Riesgos

Es necesario establecer cuáles son los principales peligros a los que se encuentran expuestos los consumidores y que, en determinadas circunstancias, pueden llegar a ser un riesgo para su salud. Se define “riesgo” como la combinación de la probabilidad de que ocurra una exposición al peligro y la severidad del daño que este puede causar. Por tanto es necesario identificar los posibles peligros, establecer los riesgos y los mecanismos de control.

Es decir, es importante la interacción de diferentes áreas de conocimiento en la cadena productiva y constituir un programa de manejo integrado de la misma.

Identificación del peligro

El mayor y principal problema para el cumplimiento de estas exigencias es el actual desconocimiento acerca de la presencia y efectos de ciertos peligros presentes en las uvas y en consecuencia en los vinos, que si bien hoy en día no son consideradas en Uruguay, sí lo son en los mercados compradores.

Entre ellas, la presencia potencial de micotoxinas en vinos es un problema que ya ha sido reportado en países con condiciones climáticas similares a las de Uruguay, propicias al desarrollo de hongos productores de la OTA.

Caracterización del peligro

La definición de las características de un peligro incluye identificar el posible daño que provoca, el suceso o sucesos capaces de causarlo y sus efectos.

Las principales características químicas de la ocratoxina A, los criterios a la hora de establecer su toxicidad y las dosis potencialmente dañinas, la ruta por la cual llega al consumidor y la sucesión de eventos que llevan a su producción y estabilidad son hoy en día objetos de revisión.

Exposición

Siempre estamos expuestos consciente o inconscientemente a infinidad de peligros, pero esto no significa que no se puedan mitigar los daños que ellos producen. En el caso de enfermedades ocasionadas por determinados compuestos, los riesgos dependen de su grado de peligrosidad, de las cantidades y el tiempo de exposición.

Debido a la amplia distribución de los hongos que la producen, la OTA es una micotoxina de distribución mundial. Así, el hombre se encuentra cada vez más expuesto a esta micotoxina y son más los estudios en los que se detecta OTA en la población (Shephard, 2008; Kuiper-Goodman *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2012a; Berthiller *et al.*, 2013).

La OTA está presente naturalmente en un amplio espectro de productos vegetales (SCOOP, 2002), y ya en 1997 nueve países contaban con legislación específica para OTA con límites que van de 5 a 50 µg/Kg aplicados a los alimentos más contaminados, como los cereales (Van Egmond *et al.*, 1997). Actualmente no se ha establecido un límite máximo de OTA en el vino, pero de un modo provisional la O.I.V. y la Comisión Europea (EU, 2005) han establecido para los vinos obtenidos a partir de la vendimia 2005 un contenido máximo de OTA de 2 µg/L, con la posibilidad de disminuir tal límite de acuerdo con los nuevos avances en el campo tecnológico y conocimientos toxicológicos. Para la evaluación de la exposición a la toxina no sólo es necesario conocer cuál es el consumo diario de vino per cápita sino también cual es el nivel de contaminación de los mismos (Brera *et al.*, 2005; Brera *et al.*, 2008).

Evaluación del riesgo.

Debido a la toxicidad de OTA para la salud humana y animal la toxina debería estar ausente de los alimentos, o por lo menos en concentraciones por debajo de los niveles permitidos. En este sentido, el avance del conocimiento indica dos posibles caminos generales de acción (Visconti *et al.*, 2008; Bellver, 2013).

-estudiar los puntos críticos relacionados con la presencia de OTA en la cadena productiva correspondiente para analizar objetivamente su contenido.

-evaluar procesos de detoxificación debido a la persistencia de la toxina en la cadena.

En cualquier caso, es obvio que la mejor estrategia será siempre tratar de evitar la presencia de OTA en los productos terminados. Es decir avanzar en estrategias de prevención en todos los niveles de la producción (Pardo *et al.*, 2006; Alonzo *et al.*, 2008; Corzani, 2008; Dorner, 2008; Cubaiu, 2009).

1.1.2. Análisis de calidad

Para lograr la inocuidad de un alimento en una cadena productiva-industrial, de forma segura, en general se acepta que existen diferentes actividades que deben cumplirse.

La O.I.V. ha recomendado que los países productores de vinos establezcan, a través de acciones colectivas o individuales, un sistema de análisis y de estudio de los riesgos de contaminación por OTA que vayan desde el viñedo a la bodega. Es por este motivo que, a pesar de la ausencia provisoria de reglamentación, cada vez más países y compradores realizan controles sobre los contenidos de OTA de los vinos e imponen sus propios umbrales (a veces tan bajos como 0.5 µg/L) (Rousseau, 2004). Los consumidores por su lado, esperan que los cuidados se den a lo largo de toda esta cadena alimenticia, proceso a menudo descrito como “de la granja a la mesa” o específicamente “del viñedo a la copa”. Esto puede ocurrir solamente si existe un manejo integrado de todas las etapas del proceso (WHO/FAO, 2007; Somma *et al.*, 2012).

El Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) fue la metodología escogida en este estudio. Su principal utilidad es en la industria de procesamiento de alimentos (López-García *et al.*, 2008; Asefa *et al.*, 2011; García-Cela *et al.*, 2012). Promueve la implementación de controles regulares y sistemáticos para anticipar problemas de seguridad alimenticia en la comercialización nacional e internacional, manteniendo aspectos cualitativos. Es un sistema preventivo, que toma cadenas de producción de alimentos en consideración sobre peligros biológicos, químicos y/o físicos (Scudamore, 2005). Sin embargo, no había sido ampliamente utilizado en vías de producción primarias, hasta que la UE (Unión Europea) comenzó a aplicar este sistema para el control específico de las micotoxinas en los alimentos (EU, 2005; Alonzo *et al.*,

2008), basados en las recomendaciones de la FAO (FAO/WHO/UNEP, 1999; FAO, 2003)

Para el caso de la vitivinicultura existen antecedentes acerca de la definición de puntos críticos a través de todo el proceso de producción de un vino, desde la cosecha hasta la botella, por la presencia de ocratoxina A (Christaki *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2004b; Battilani, 2008; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2009). En la actualidad es la única sustancia tóxica de origen microbiológico en vinos, sobre la que existen leyes y reglamentaciones internacionales específicas.

Estos trabajos y otros (Visconti *et al.*, 2008) sugieren cuales son las etapas a considerar para controlar la contaminación con OTA. Lo que puede resumirse a través del siguiente diagrama de flujo:

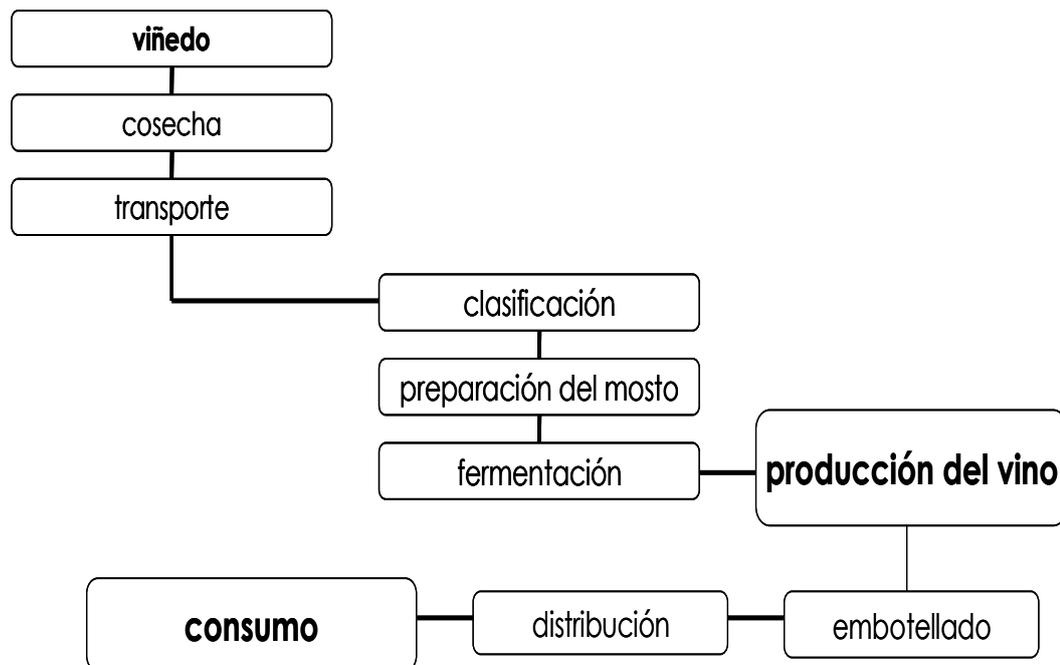


Figura 1_ Diagrama de flujo del proceso de elaboración del vino con énfasis en el control de micotoxinas.

De este se extrae el concepto de que los tres pasos más importantes de esta cadena que afectan potencialmente la seguridad del producto son:

- la producción de la uva
- la producción de vino
- su comercialización.

A su vez, estas etapas deben ser consideradas como puntos críticos de control.

La última etapa excede el cometido de este trabajo, por lo que nos centraremos en las dos primeras.

En consecuencia, para encarar los objetivos de esta tesis, es necesario establecer una descripción detallada de cada etapa y operación incluyendo la mayor cantidad de información posible de recabar acerca de la materia prima y el proceso. Además se debe tener en cuenta que en Uruguay, aunque sea un país pequeño, se dan diferentes situaciones de vitivinicultura. Es un sector en franco desarrollo tecnológico donde varían mucho los sistemas de manejo, recipientes en que se cosecha y vinifica, las condiciones de almacenamiento y los aditivos utilizados. También en las bodegas difieren las actividades realizadas durante el proceso de producción-industrialización, perfiles de temperatura/tiempo en diferentes etapas, equipos y características de diseño de la infraestructura, etc.

El análisis APPCC involucra el establecimiento de siete actividades, etapas claramente definidas o principios. Estos son:

1. Evaluar los riesgos y planteo de medidas de control. Como ya mencionara, esto consiste de varias etapas previas a la implementación de este sistema de análisis.
2. Determinar los puntos críticos de control. Los puntos críticos de control son aquellas etapas o procesos en la cadena productiva en donde es posible ejercer algún tipo de control y en los cuales es necesario especial supervisión para evitar un riesgo a la salud de los consumidores.
3. Establecer límites. Son parámetros cuantitativos dentro de los cuales los puntos críticos se pueden mantener bajo control. Dentro de estos límites se debe incluir ciertos márgenes de seguridad para actuar antes de que un suceso impredecible o predecible pueda superarlos.
4. Diseñar procesos de control. Sistemas de monitoreo que deben ser no sólo rápidos si no también precisos y exactos.

-
5. Establecer acciones correctivas. En cada punto de control crítico se debe contar con estas medidas en caso que el monitoreo revele de que se han excedido los límites críticos y se está por tanto ante la presencia potencial de un riesgo.
 6. Establecer procedimientos de verificación. Esto requiere la aplicación de ciertos métodos de análisis para corroborar que el sistema de control está siendo efectivo. Si se constata algún defecto se deben tomar acciones correctivas inmediatas como establecer otros puntos críticos de control o modificar los límites impuestos a los ya existentes.
 7. Documentación y archivo. Cada etapa en un análisis APPCC debe constar con documentación detallada del peligro, los riesgos y las condiciones en las que tiene lugar la cadena productiva. Es indispensable informar acerca de los procedimientos de control y las acciones correctivas que se hayan tomado.

1.2_ MICOTOXINAS

El término *micotoxinas*, deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente. Al igual que los antibióticos, son metabolitos secundarios de origen fúngico, compuestos no esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivos puros. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo, y a menudo se asocia su producción a las etapas de diferenciación y esporulación y/o estados de estrés del hongo (Pitt *et al.*, 2013). Por definición, además, cuando son ingeridos, inhalados o absorbidos a través de la piel causan baja en el rendimiento, enfermedad o muerte en el hombre o animales (Soriano del Castillo, 2007; Geisen *et al.*, 2009). Pero no fue hasta la década de los 70' que comenzaron los estudios acerca de sus efectos en la salud.

Las principales micotoxinas son: Aflatoxinas, Patulina, Ocratoxinas, Fumonisinias, Zearalenona (ZEA), Desoxinivalenol (DON) y toxina T-2.

En este trabajo sólo nos centraremos en las ocratoxinas por ser de interés para definir a la ocratoxina A, si bien existe extensa literatura acerca de las demás e incluso coocurrencia en uvas y vinos (Pitt *et al.*, 2009).

Aunque poseen relativo bajo peso molecular (<700 Da) abarcan una gran diversidad de estructuras químicas. La mayoría de estos compuestos se originan en la ruta policetónica, a partir de una cadena policetónica general y activación por coenzima A (SCoA) (El Khoury *et al.*, 2008; Abrunhosa *et al.*, 2011). Poseen variados modos de acción, pueden actuar sobre el metabolismo de glúcidos (ocratoxina A, citrinina, aflatoxina B1 y rubratoxina) y de los lípidos (aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina y tricotecenos), el sistema inmunitario, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, hígado, riñón y piel.

Las micotoxinas frecuentemente se forman en cultivos agropecuarios como resultado de la contaminación por crecimiento de los hongos patogénicos. Los productos mayormente contaminados en este caso son los cereales (maíz, trigo, cebada, avena y centeno), maní, pistachos, frutos secos, especias y algunas leguminosas (Smith *et al.*, 1985).

En los alimentos elaborados se conocen más de 400 micotoxinas de frecuente ocurrencia y que producen severos efectos en la salud animal y humana (Park *et al.*, 2001; Logrieco *et al.*, 2003). Puede darse por contaminación directa de frutas y vegetales o sus productos

(Bennett *et al.*, 2003), o indirectamente estar presentes en tejidos animales, leche o huevos después de la ingesta de alimentos contaminados (Yang *et al.*, 2014). Se indica también en la literatura que estas toxinas pueden encontrarse en especies botánicas (Valenta *et al.*, 1996; Valenta, 1998).

La imposibilidad de clasificar a estos compuestos en forma simple, ha llevado a considerar formas de clasificación que tienen en cuenta aspectos más refinados tales como los mecanismos moleculares o de activación biológica en los que están involucrados. De acuerdo con esto, se han clasificado a las toxinas también dependiendo su afinidad por los organelos celulares, características toxicológicas y transformaciones metabólicas en las que participan. Algunas actúan como inhibidores de la producción de energía, inhibidores de síntesis de proteínas, modificadoras de citoesqueleto, como micotoxinas estrogénicas, cancerígenas, etc. (Sewram *et al.*, 2006).

1.2.1. Ocratoxinas

Son las micotoxinas producidas principalmente por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Berthiller *et al.*, 2013). La ocratoxina A (OTA) es la más tóxica de ellas y está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Nielsen *et al.*, 2009). Existen análogos en proporción minoritaria, como la ocratoxina B en cuya estructura falta el átomo de cloro y la ocratoxina C con la fenilalanina con un grupo -etil, que las diferencia de la OTA (Geisen *et al.*, 2009).

La OTA α y OTA β son producto de hidrólisis de la ocratoxina A y B, respectivamente, y al no poseer la molécula de fenilalanina no son tóxicas (Trivedi *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1994; Moss, 1998)

1.2.2. Ocratoxina A

Se denomina según su estructura química R-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il) carbonil]-fenilalanina (CAS No. 303-47-9, Figura 2).

Su estructura se conoce al menos desde mediados de los años 60' (Van der Merwe *et al.*, 1965). Específicamente actuaría como inhibidor de la síntesis de proteínas, ya que inhibe en forma competitiva la actividad de la fenilalanil-tARN sintetasa (Ringot *et al.*, 2006).

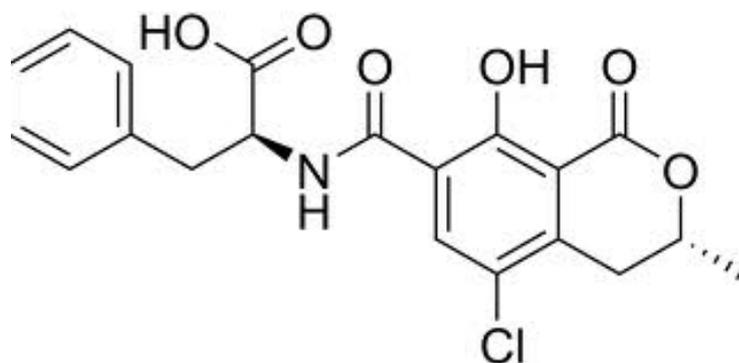


Figura 2_ Estructura de la ocratoxina A (OTA).

1.2.2.1. Propiedades fisicoquímicas de la OTA

La OTA es un ácido orgánico que tiene un pKa de 7,1 (El Khoury, 2007) y una masa molar de 403,8 g/mol. Es un compuesto cristalino incoloro de forma molecular $C_{20}H_{18}ClNO_6$. El punto de fusión cuando es cristalizada en benceno es de 94-96°C, mientras que a partir de xileno cristaliza pura y funde a 169°C. Es ópticamente activa y fluorescente bajo luz UV, pero el espectro ultravioleta varía con el pH y la polaridad del solvente. La emisión fluorescente es máxima a 467 nm en etanol 96 % y a 428 nm en etanol absoluto (Feier *et al.*, 2009). En etanol absorbe a $\lambda_{m\acute{a}x}$. 213 nm y 332 nm con valores de extinción molar de 36800 y 6400 $M^{-1}cm^{-1}$, respectivamente. Es un compuesto muy soluble en disolventes orgánicos polares, moderadamente soluble en agua y soluble en bicarbonato sódico. Muchos de los procedimientos analíticos se basan en el carácter ácido débil de la OTA, los valores de pKa están entre 4,2-4,4 para el grupo carboxi del residuo de fenilalanina y entre 7,0-7,3 para el grupo hidroxilo de la isocumarina (Valenta, 1998).

1.2.2.2. Estabilidad de la OTA

La OTA es muy estable en varios solventes orgánicos. En etanol puede ser almacenada al menos por un año y se ha reportado que soluciones de OTA en metanol a -20°C son estables por varios años (Valenta, 1998). Debe mantenerse bajo refrigeración y protegidas de la luz, ya que la fotólisis puede ocurrir al exponerse a la luz fluorescente (Cigić *et al.*, 2006).

1.3_ ANTECEDENTES

La presente tesis se incluyó en el Proyecto INIA - PDT S/C/OP/66/03, 2007-2009 denominado: “Valoración y control de los peligros y puntos críticos que afectan la calidad e inocuidad de los vinos Tannat de exportación”. Este trabajo multidisciplinario involucró la evaluación de viñedos relevantes de la industria vitivinícola del país, con marcada trayectoria tanto en el mercado nacional como internacional.

La contribución de esta tesis al proyecto se basó en mejorar el conocimiento acerca de la problemática de la presencia de OTA y proveer herramientas de medición, control y acciones preventivas, teniendo en cuenta el daño que la micotoxina produce en la salud humana. De esta manera se posiciona al país y al producto insignia “vino Tannat” en una plataforma que asegura la calidad e inocuidad de los productos comercializados.

A nivel nacional se cuenta con una comunicación FAO (Piñeiro *et al.*, 1996) en donde se llevó a cabo un programa de monitoreo de contaminación de OTA en alimentos y suplementos. En esta publicación se tuvieron en cuenta los análisis sobre muestras de distintos cereales pero no estuvo enfocado al análisis de uvas y bebidas derivadas. Con esta tesis se contribuye a ampliar y hacer pública la información acerca de los niveles de OTA obtenidos en este tipo de alimentos.

En el artículo de Chulze (2006) se reseña un sondeo realizado en Uruguay por Bettucci (comunicación personal) en las variedades Tannat y Cabernet Sauvignon en 2003/2004 en diferentes estados de maduración. De allí se extrae cuáles son las principales especies aisladas de los racimos y se utiliza este dato para corroborar los resultados en viñedos de Argentina y Brasil.

En cuanto al análisis de la presencia de OTA en alimentos existen dos trabajos llevados a cabo a nivel académico denominados: “Estudio de la presencia de ocratoxina A en vinos uruguayos” (Garmendia, 2011) y “Validación de un método analítico para la

determinación de Ocratoxina A por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)” (Martínez, 2011).

1.4_ ESTRATEGIA

Al evaluar el estado sanitario de las plantas incluidas en los experimentos como consecuencia de la infestación por determinados patógenos, se obtendrá junto a la identificación visual, una primera aproximación al grado de incidencia de posibles hongos ocratoxigénicos en los viñedos. Este valor se ve influenciado principalmente por las diversas prácticas de manejo culturales, factor que se podría convertir en una herramienta paliativa para el control químico, disminuyendo de esta forma los riesgos de la aparición de micotoxinas en vinos.

Por otra parte, el estudio a nivel genético de las cepas de *Aspergillus* aisladas de bayas muestreadas al azar, bajo condiciones controladas de laboratorio, brinda la posibilidad de reconocer aquellas especies con actividad ocratoxigénica mediante el uso de técnicas moleculares. Ello además implica disponer de una herramienta útil para la identificación rápida de cepas que conforman la población presente en cada predio y por consiguiente en Uruguay.

Finalmente se pretende obtener resultados que contribuyan al esfuerzo de investigación mundial que busca predecir los riesgos de contaminación en el vino, mediante sistemas de alerta temprano y, en lo posible, de predicción de situaciones de riesgo (Reddy *et al.*, 2010; Ravelo *et al.*, 2011). Esto significa favorecer el manejo integrado de plagas en los viñedos de forma de mitigar el efecto tóxico de algunos fungicidas sobre el ambiente, para lograr tanto un impacto ambiental menos agresivo como un manejo más racional de la economía de los viticultores en lo que tiene que ver con costos de tratamientos y resultados asociados.

1.5_ MÉTODOS DE ESTUDIO

Según veremos posteriormente, algunos de los factores que deben ser considerados en un diseño experimental como el que se plantea en este trabajo involucran necesariamente estudiar el efecto de la localización, clasificación geográfica de las zonas de cultivo de los viñedos, precipitaciones, temperatura media del aire durante el período de susceptibilidad de las bayas, número de bayas dañadas por diferentes vectores en el viñedo, presencia de *Botrytis* u otros microorganismos, aireación de las uvas, contenido en azúcar fermentable, características de la cosecha, entre otros.

Este tipo de diseño experimental requiere del cumplimiento de dos criterios básicos:

- selección y corrección de los factores en evaluación
- aplicación de herramientas estadísticas multivariadas en la interpretación de los resultados.

Un tercer factor implícito, es aquel que debe considerar la evaluación de factores en el diseño experimental seleccionado y un número estadísticamente razonable de repeticiones, que permitan disminuir los coeficientes de variación de los resultados esperados.

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos de un trabajo inicial llevado a cabo sobre muestras de las vendimias 2007, 2008 y 2010 en viñedos comerciales manejados por viticultores. Allí se determinaron datos de los viñedos cuyo efecto sobre la incidencia tanto de *Aspergillus* como la producción de OTA permanecería incambiado.

En el año 2010 además, se evaluaron pormenorizadamente los métodos de muestreo y los análisis utilizados para la determinación de OTA.

Por último en 2011 bajo un diseño experimental en bloques con cuatro repeticiones se estudió la influencia de la altura del plano de poda, la distancia de plantación y el sistema de conducción en la calidad de las uvas, la presencia de *Aspergillus* spp. y los niveles de OTA en los vinos. Se dio especial énfasis a las etapas de manejo cultural y vinificación, de manera de corroborar los resultados obtenidos en las anteriores tres cosechas.

CAPÍTULO 2

OTA EN LA CADENA VITIVINÍCOLA

2.1_ OTA EN ALIMENTOS

Las micotoxinas en general, y las ocratoxinas en particular, cobran gran importancia en la salud humana ya que pueden llegar al ser humano a través de varias cadenas alimenticias, bien por el consumo de alimentos contaminados o por el de sus productos procesados, o animales y sus subproductos después que hayan acumulado las toxinas tras su ingesta (Duarte *et al.*, 2012b; Peršič *et al.*, 2014).

La OTA ha sido estudiada y encontrada en una gran número de alimentos como granos de cereales (cebada, trigo, maíz, avena), café, cacao, maníes, frutos secos, especias, carnes y derivados (Mateo *et al.*, 2007), bebidas (vino, cerveza, jugo de uva, licores) (Fernández-Cruz *et al.*, 2010), frutas y derivados (Yang *et al.*, 2014), plantas medicinales (Yang *et al.*, 2010) entre otros (Abdulkadar *et al.*, 2004; Magan *et al.*, 2004; Rousseau, 2004; Jørgensen, 2005; Soriano del Castillo, 2007; Diana Di Mavungu *et al.*, 2009; Amézqueta *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

Trabajos de compilación de los valores de OTA encontrados en variadas muestras de alimentos han sido llevados a cabo a nivel mundial, por los estados miembros de la Unión Europea (JECFA, 2001) y un comité de expertos de FAO y WHO (IARC, 1993).



2.2_ TOXICOLOGÍA DE LA OTA

La toxicología de la ocratoxina A se ha examinado muchas veces y ha sido objeto de estudio de la IARC desde 1993 (Mantle *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007, Walker, 2005 #437). Tras el descubrimiento en nefropatologías de humanos y animales, se han llevado a cabo estudios experimentales para demostrar la participación de la OTA en estas enfermedades (Zimmerli *et al.*, 1996). Los estudios toxicológicos con animales de laboratorio mostraron que la toxina puede tener varios efectos, tales como nefrotóxicos, genotóxicos, inmunosupresores, teratogénicos, neurotóxicos y cancerígenos (Shephard, 2008). Su toxicidad es sin embargo, muy variable y depende del sexo, especie y tejido celular que afecta (Dietrich *et al.*, 2005) y como comentáramos en el capítulo 1, del grado de exposición (Mantle, 2002; Verger *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2012a). Algunos autores rehúsan hacer aseveraciones sobre estos efectos hasta no poseer más evidencia de la toxicología *in vivo* en humanos (O'Brien *et al.*, 2005).

La biotransformación de OTA no está enteramente elucidada, al presente el conocimiento acerca de su metabolismo es controversial (Ringot *et al.*, 2006). La molécula de OTA débilmente ácida debido a sus grupos fenólico y carboxilo, difundiría en su forma no ionizada a través de la membrana lipídica. El principal mecanismo de penetración en el tracto gastrointestinal, se da por esta absorción en los tramos superiores. Una vez en el torrente sanguíneo la OTA se une a la albúmina, siendo esta unión proteica, reversible (Roth *et al.*, 1988; Dai *et al.*, 2004).

Se hidroliza muchas veces, convirtiéndose en OTA α por la acción enzimática de la quimiotripsina y carboxipeptidasa A en distintos lugares. Esta transformación la efectúan principalmente microorganismos presentes en el tracto intestinal. Muchas investigaciones se han llevado a cabo en rumiantes, roedores y monos, antes que en humanos para conocer los modos de acción y eliminación de la OTA del organismo. Midiendo su niveles en orina, plasma y/o sangre, se sabe que muchas veces se elimina directamente por la orina, pasa a la leche y/o se acumula en órganos como el páncreas, riñón, hígado y bazo (Accensi, 2000; Fuchs *et al.*, 2005; Scott, 2005; Pacin *et al.*, 2008).

La formación de aductos OTA-ADN de las células de estos órganos parece ser el desencadenante de la formación de tumores por su efecto genotóxico directo (Mally *et al.*, 2005; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007; 2012) o indirecto a través de un efecto epigenético de estrés oxidativo (Schilter *et al.*, 2005; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2012).

La OTA es una sustancia nefrotóxica potente, un carcinogénico renal en ratas y ratones a nivel experimental (Castegnaro *et al.*, 2006). En la especie humana no existen estudios que demuestren de forma definitiva una causalidad directa entre la OTA y el cáncer de riñón, por lo que la OTA fue clasificada en el grupo 2B de posible carcinógeno humano por la IARC. Sin embargo, algunos autores recomendaron su inclusión en el grupo 2A de probable carcinógeno humano (Malir *et al.*, 2013).

2.3_ PRODUCCION DE UVAS, VINOS Y DERIVADOS

La uva es la fruta de plantas de vid que pertenecen a la familia *Vitaceae*. Comúnmente se utiliza para producir jugo de uvas, vinos, mermeladas, aceite de semillas y pasas o pueden comerse frescas, como las variedades denominadas “uvas de mesa” (Hornsey, 2007).

Existen cerca de 600 variedades de uvas donde solo una pequeña porción representa a las variedades de uvas de vino o “*Vitis viníferas*”. Estas han sido seleccionadas para su vinificación principalmente por su alto contenido de azúcar, que luego de la fermentación, produce vinos con un contenido de alcohol de 10% o mayor. También influye la combinación de ciertas características que incluyen color, tamaño de baya, grosor de la cáscara, acidez, rendimiento y aromas varietales.

2.3.1. Producción mundial de uvas, vinos y derivados

El último dato de la OIV del año 2011 muestra una producción mundial de uvas de 69 miles de millones de kilos. La mayor cantidad de las vides plantadas están destinadas a la producción de vinos, seguido de uvas para consumo fresco (22 millones de toneladas) y uvas pasas (1.2 millones de toneladas). No es posible determinar con exactitud la cantidad de uva que se destina a jugo o mosto, pero se estima que es un porcentaje de baja incidencia sobre el total expresado anteriormente.

Si se tiene en cuenta la superficie mundial de viñedos como estimativo de la producción mundial de vinos, a partir del año 2000 se ha notado un descenso neto en estos valores. Esto es producto de la implementación en los países de la UE de un programa de mercado que establece beneficios económicos a los productores que voluntariamente arranquen sus vides para regular así el desbalance entre la oferta y la demanda de vinos que llevaría a la sobreproducción y pérdida de competencia a nivel internacional. Sin embargo se ha visto un incremento en la plantación de vides en lo que se ha pasado a denominar países del “nuevo mundo” que incluyen muchos países del hemisferio sur, EEUU y China. En el mapa de la figura 3 se evidencia dichos cambios.

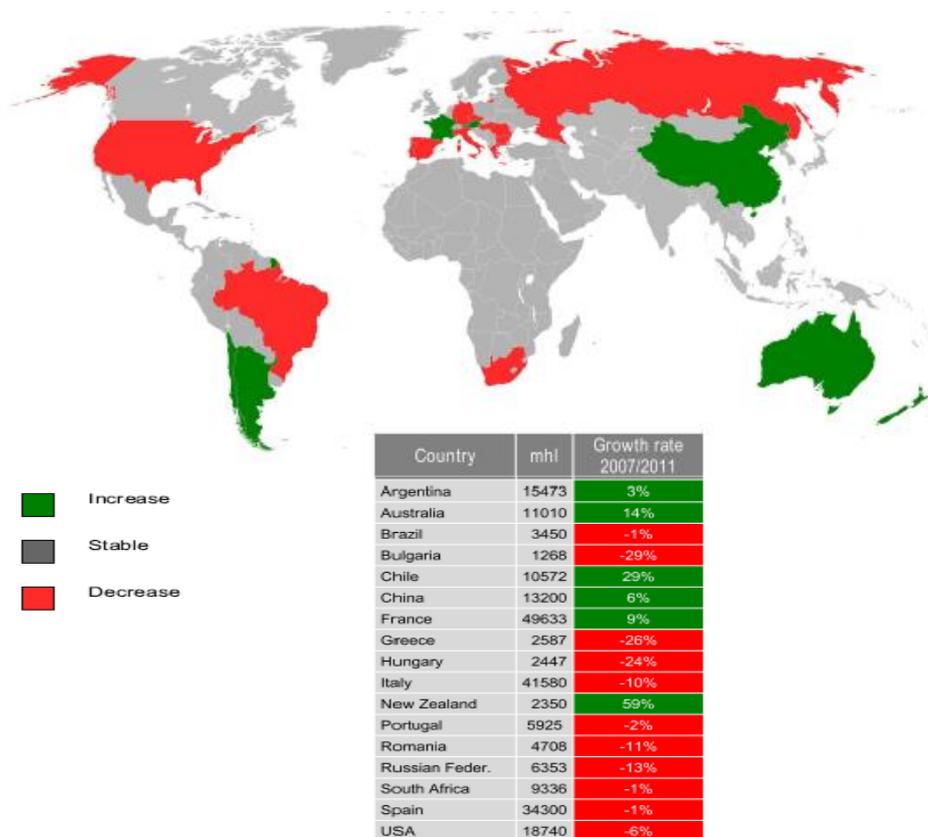


Figura 3_ Producción de vinos 2011 a nivel mundial teniendo en cuenta los mayores productores (Fuente OIV, 2012).

2.3.2. Producción uruguaya de uvas, vinos y derivados

Si bien Uruguay no se encuentra dentro de los mayores productores de uvas y vinos del mundo, en cierto aspectos interviene en el mercado mundial debido entre otros factores a su larga trayectoria en la producción de vinos, su geografía y clima favorables y la implementación de un plan nacional para la divulgación del vino Tannat como insignia del país (INAVI, 2013).

Mediante la implementación de un plan de reconversión iniciado a mediados de la década de los 70's, Uruguay pasó a poseer vides certificadas libres de virus, mejorando así la calidad de sus viñedos. Este proceso fue acompañado de unos años de receso en la producción dado que las plantas no producen uvas vinificables hasta no establecerse correctamente en el predio. A esto se le agregan factores climáticos especiales que pueden hacer decrecer la cantidad de uva producida y por ende de vino.

Pero una vez superadas estas excepciones la política nacional está enfocada a la búsqueda de técnicas que independientemente de los niveles de producción de uvas, los vinos obtenidos tengan índices de calidad remarcables para competir en el mercado internacional, que es donde va la mayoría de esos vinos y de donde se obtienen los mejores réditos económicos.

2.3.2.1. Extensión vitícola del Uruguay

Según datos de INAVI (INAVI, 2013) los porcentajes de tipificación de las vides plantadas en Uruguay son los que se muestran en el cuadro 1.

Tipificación	Kilogramos	Porcentaje
Vitis viníferas	89.479.896	94,70
Variedades de mesa	3.020.608	3,20
Frutilla, Híbridos	1.982.688	2,10
Total Nacional	94.483.192	100,00

Cuadro 1_ Producción en kilogramos y porcentaje del total de las vides plantadas según su tipificación para la cosecha 2013.

Los viñedos abarcan una superficie total de 8022 ha al 2012 estando concentrado en un 76% en el sur del país, específicamente en los departamentos de Canelones y Montevideo. Su evolución en el correr de los años se evidencia en el siguiente gráfico (Fig. 4, INAVI, 2013).

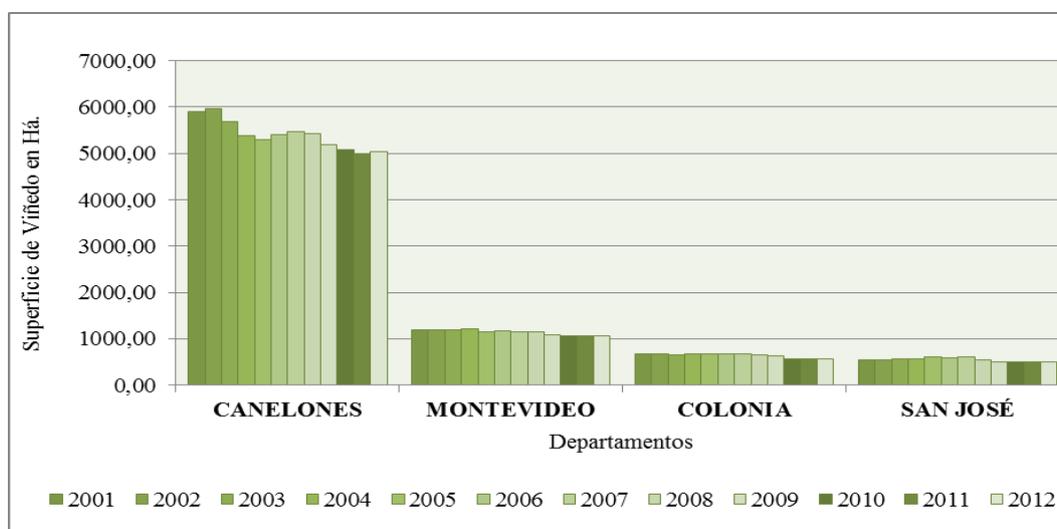


Figura 4_ Evolución de la Superficie de Viñedo sin Caminos en Hectáreas, por Departamento. Período 2001 – 2012.

Si bien se observa una leve disminución en la superficie en estas zonas y se ha incrementado la explotación de otro tipo de suelos para la implementación de viñedos, especialmente en regiones turísticas de Maldonado (datos no mostrados), la producción se mantiene estable e incluso aumenta desde el año 2000 (Fig. 5, INAVI 2013).

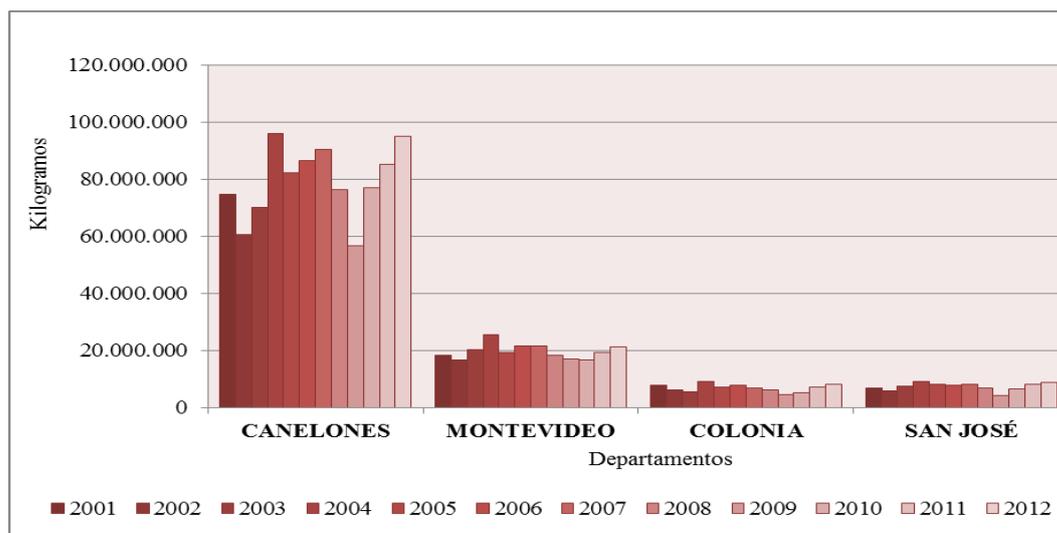


Figura 5_ Evolución de la Producción en Kilogramos, por Departamento. Período 2001 – 2012.

No todas las variedades han tenido el mismo comportamiento en cuanto al número de plantas y la producción registrada. Si se clasifican en variedades comunes y variedades finas de vino, muestran un descenso y un aumento en ambos parámetros, respectivamente. En las variedades tintas destinadas a vinos finos predomina Tannat que a su vez, ha triplicado su producción entre 2002-2012 (Figura 6, INAVI 2013).

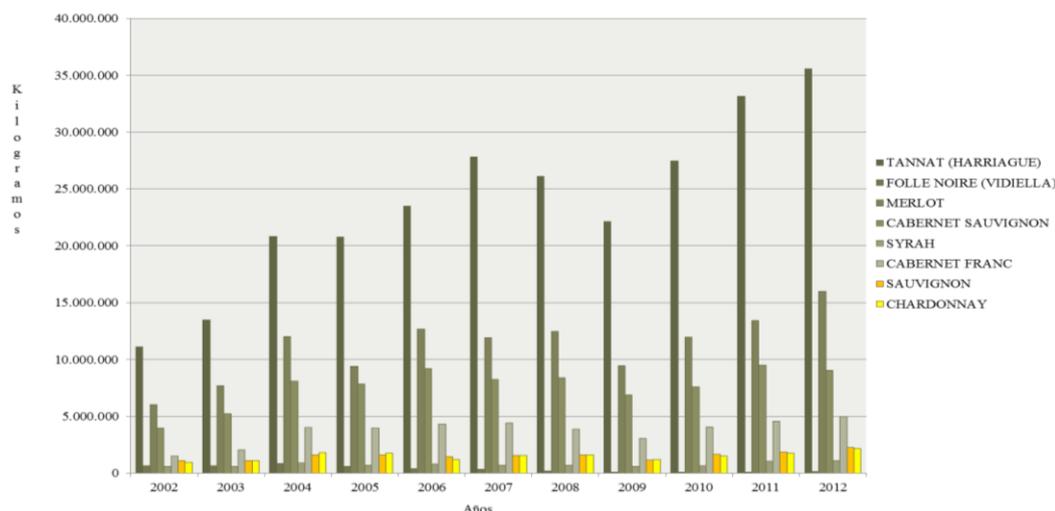


Figura 6_ Evolución de las Variedades Finas de Vino–Kilogramos de producción por variedad para el período 2002-2012.

2.3.2.2. Producción de vinos en el Uruguay

Un alto porcentaje de la producción de uvas del Uruguay, que ronda el 97% año tras año se destina a la vinificación. El porcentaje restante se utiliza en la elaboración de mostos, jugos o para el consumo en fresco. Del total de los vinos elaborados sólo el 2% - 3% es exportado (INAVI, 2013). El destino de estos vinos es principalmente Brasil, EEUU y países europeos, aunque se ha inclinado el mercado hacia la búsqueda de nuevos nichos como los países asiáticos y otros países del continente americano.

Según la localización geográfica, el clima y los suelos de Uruguay, el país produce vinos de características particulares. Según los últimos datos, la producción para la zafra 2012/2013 fue de aproximadamente 98 millones de litros y ha aumentado a través de los años siguiendo la tendencia de la producción de uvas (INAVI, 2013). De esa cifra, aproximadamente el 75% son vinos tintos y claretos elaborados con variedades tintas, especialmente como vimos anteriormente, la variedad Tannat.

2.4_ CONTENIDO DE OTA EN LOS PRINCIPALES PRODUCTOS ENOLÓGICOS

Existe menos información acerca de la ocurrencia de OTA en uvas o mostos comparado con los estudios realizados sobre vinos (Bellí *et al.*, 2006a). Battilani y otros (2006d) investigaron la presencia de OTA en algunas variedades de uvas en Europa en el marco de un proyecto regional “WINE-OCHRA-RISK_EC QLK1-2001-01761”. También estos y otros países han divulgado sus situaciones particulares (Sage *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2006a; Lasram *et al.*, 2007; Meletis *et al.*, 2007; El Khoury *et al.*, 2008; Selouane *et al.*, 2009; Lucchetta *et al.*, 2010; Ponsone *et al.*, 2010).

También se analiza en jugos de uvas (Zimmerli *et al.*, 1996; Bellí *et al.*, 2002; Delage *et al.*, 2003; Da Rocha *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2004; Terra *et al.*, 2013) por su índice de consumo a nivel mundial (Stefanaki *et al.*, 2003). Especialmente los producidos a partir de uvas tintas se ha resaltado como fuentes importantes de OTA en la dietas de niños con valores de más de 2 µg/L (Filali *et al.*, 2001; Ghafari *et al.*, 2011).

Los mayores contenidos de OTA han sido medidos en uvas pasas con más de 40 µg/Kg (MacDonald *et al.*, 1999) y diversos estudios se han llevado a cabo sobre el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de OTA en este sustrato y subproductos (Iland *et al.*, 1993; Iamanaka *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2007; Ponsone *et al.*, 2010; Covarelli *et al.*, 2012; Akdeniz *et al.*, 2013).

La OTA también ha sido reportada en vinagre, específicamente vinagre balsámico aunque a niveles bajos de 0.2 µg/L (Markaki *et al.*, 2001).

En todos los casos la mayor cantidad de estudios han dado evidencias de que los problemas relacionados con la presencia de OTA no están en las uvas de consumo en fresco y si en los productos procesados a partir de éstas, por su contribución en la ingesta diaria total, tanto en adultos como en niños (Battilani *et al.*, 2002). No hay que olvidar que la fuente del problema de la presencia de OTA en los productos terminados es el contenido de OTA en las bayas.

Por otro lado, la industria del vino genera orujo, un subproducto utilizado como suplemento alimenticio. Este residuo, de cantidad estimada de 13% del peso de las uvas, consiste en cáscaras, semillas y tallos. Este residuo sólido debe ser tratado con especial cuidado ya que los niveles residuales de micotoxinas, pueden causar un impacto adverso en

el ambiente, animales y humanos. Si es utilizado como aditivo en la preparación de los alimentos puede llegar a ser beneficioso, ya que prima el efecto antifúngico y detoxificante de los componentes antioxidantes del orujo predominantes sobre el efecto de la OTA (Alexa *et al.*, 2012).

2.5_ FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR OTA

En Europa se estima que al menos el 50% de la ingesta de OTA en la dieta proviene de los cereales y sus derivados. Después de los cereales, el vino se considera la segunda fuente de OTA (15% de la ingesta) en la dieta europea (Esteban, 2005). La presencia de OTA en vinos parece deberse exclusivamente a la colonización de las uvas por hongos ocratoxigénicos (Da Rocha *et al.*, 2002; Sage *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Magnoli *et al.*, 2003; Sage *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005a; Serra *et al.*, 2005; Leong *et al.*, 2006a; Tjamos *et al.*, 2006) al igual que en las uvas pasas (Abarca *et al.*, 2003; Stefanaki *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2005; Chulze *et al.*, 2006; Varga *et al.*, 2010; Covarelli *et al.*, 2012; Somma *et al.*, 2012; Susca *et al.*, 2013). También podría ser una fuente importante de contaminación, el café (Magnani *et al.*, 2005; La Pera *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2008).

La presencia de OTA en productos de origen animal no es considerado un problema que afecte la salud humana, principalmente porque es insignificante la alimentación animal con raciones contaminadas con OTA (Ostry *et al.*, 2013).

2.6_ REGLAMENTACIONES

Desde los años 90 se estableció un valor de ingesta tolerable semanal para OTA de 112 ng/Kg (16 ng/Kg/día) (Van Egmond *et al.*, 1997; JECFA, 2001). Una vez conocidas las propiedades tóxicas de la OTA, en la UE se estimó que el nivel aceptable de seguridad en la ingesta diaria debía estar por debajo de 5 ng/Kg. Ya desde el año 2001 se dispone de una normativa por la que se establecen los niveles máximos permitidos de OTA en los distintos alimentos, y se actualiza cada ciertos intervalos de tiempo (EU, 2005); y un reglamentación preventiva a nivel de la cadena vitivinícola (OIV, 2005).

Los hongos micotoxigénicos como veremos más adelante, especialmente *A. niger* han sido considerados no tóxicos bajo condiciones industriales, y por lo tanto es un organismo de producción segura (GRAS – Generally Recognized As Safe) según la designación de la FDA de EEUU. Junto con la especie *A. awamori*, son considerados fuente habitual de enzimas extracelulares como amilasas o lipasas, y ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y glucónico, usados como aditivos en el procesamiento de alimentos (FDA, 2014).

Sin embargo, la presencia potencial de la OTA y otras micotoxinas enfatiza la necesidad de ajustar y/o reconsiderar los procedimientos de escaneo simultáneos de múltiples clases de micotoxinas; atendiendo por ejemplo, a la revisión acerca de la seguridad de utilizar *A. niger* con propósitos biotecnológicos realizada por Schuster *et al.* (2002).

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS

3.1_ HONGOS MICOTOXIGÉNICOS

Los hongos toxigénicos, micotoxigénicos o productores de micotoxinas principalmente involucrados en la cadena alimenticia humana abarcan tres géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Davis *et al.*, 1975; Bueno *et al.*, 2011). Aunque la síntesis de toxinas puede detectarse en estos y en muchos otros hongos bajo ciertas condiciones. El tipo y cantidad de toxinas producidas depende principalmente de la cepa, las condiciones de crecimiento y de la presencia o ausencia de otros organismos. Las micotoxinas más importantes ya fueron mencionadas en el primer capítulo.

Naturalmente en las uvas aparecen especies de estos tres géneros (*Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*), a las que se suman *Botrytis* y *Alternaria* (Magnoli *et al.*, 2003).

3.2_ HONGOS PRODUCTORES DE OTA.

Los hongos que se conocen comúnmente como los precursores de la presencia de OTA en la cadena alimenticia de los humanos y los animales pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Magan *et al.*, 2005).

La OTA fue descrita originalmente como un metabolito de *A. ochraceus* (*Aspergillus* sección *Circumdati*) en experimentos de laboratorio (Van der Merwe *et al.*, 1965).

Pero la importancia real de la OTA y su ocurrencia en la naturaleza estuvieron ligadas en primera instancia a especies de *Penicillium*. Este género se divide en dos grupos mayoritarios (*P. nordicum* y *P. verrucosum*), y se sugiere que el primero puede ser el responsable de la contaminación por OTA en productos cárnicos mientras que *P. verrucosum* fue encontrado sólo en material vegetal o productos derivados (Pardo *et al.*, 2006).

Después su producción fue reportada en la sección *Nigri*, principalmente *Aspergillus carbonarius* y en menor porcentaje por los aislamientos de las especies relacionadas como *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994; Téren *et al.*, 1996; Accensi *et al.*, 2001). Los aislamientos de otros subgéneros usualmente producen solo pequeñas cantidades de OTA, o su habilidad de producirla no está confirmada por todos los autores.

En resumen, las dos principales especies fúngicas productoras de OTA son *P. verrucosum* y *A. ochraceus*, pero la tercera fuente importante, *A. carbonarius*, afectaría a las uvas junto con otras especies de la sección *Nigri*, dependiendo del ecosistema predominante.

Recientemente han sido identificadas tres nuevas especies aisladas de uvas: *A. ibericus* (Serra *et al.*, 2006a), *A. brasiliensis* (Varga *et al.*, 2007) y *A. uvarum* (Perrone *et al.*, 2008) y si bien no han demostrado ser ocratoxigénicas, no solo persiste su potencialidad productora sino que hacen más dificultoso el análisis taxonómico.

Penicillium verrucosum

Esta especie habita principalmente en cultivos de cereales en climas fríos y templados del hemisferio norte (JECFA, 2001). Son incapaces de crecer a temperaturas mayores a 30 °C lo que hace improbable su presencia en regiones cálidas y tropicales. La temperatura óptima de crecimiento es 20 °C pero difícilmente se encuentre en uvas ya que el pH óptimo de crecimiento es de 6 a 7 y valores de actividad de agua (a_w) de 0.80 (El Khoury, 2007). Otras especies del género se han encontrado en bayas de uvas pasas pero su porcentaje de producción de OTA en bajo (Torelli *et al.*, 2006).

Aspergillus ochraceus

A. ochraceus es la especie que predomina en el grupo de mismo nombre según la clasificación de Raper y Fennell (Raper *et al.*, 1965), aunque en la actualidad se incluye en la renombrada sección *Circumdati* (Gams *et al.*, 1985; Logrieco *et al.*, 2003). La presencia de *A. ochraceus* está asociada con climas cálidos y tropicales, y se encuentra frecuentemente en vegetación seca en descomposición, alimentos secos y con largos períodos de almacenamiento (nueces, pimienta, granos, etc). Es el principal responsable de la producción de OTA en cereales (Logrieco *et al.*, 2003), aunque otras especies de la misma sección parecen tener la capacidad potencial para superarlo (Gil-Serna *et al.*, 2011). *A. ochraceus* frecuentemente se encuentra en bajos niveles y raramente causa descomposición del sustrato. En uvas, su baja incidencia hace pensar que no afecta demasiado la formación final de OTA en estas (Cabañez *et al.*, 2002).

Es de fácil identificación fenotípica siguiendo las claves establecidas para este propósito (Samson *et al.*, 2007; Pitt *et al.*, 2009).

Aspergillus sección *Nigri*

Las especies de esta sección son capaces de desarrollarse a temperaturas comprendidas entre 6 °C y 47 °C con una temperatura óptima de 35 °C-37 °C (Schuster *et al.*, 2002). Ellas pueden crecer a a_w de 0.88 y resistir a valores de pH entre 1,4 y 9,8 (El Khoury, 2007). Son más frecuentes en regiones templadas como en los países del Mediterráneo y ciertas regiones de América Latina, del norte de África (Melki Ben Fredj *et al.*, 2007; Barkai-Golan *et al.*, 2008; Selouane *et al.*, 2009) y Asia (Techarat *et al.*, 2012).

Presentan colonias oscuras, a menudo negras y en varios matices grises. Han sido aisladas de una amplia variedad de sustratos, distribuidas mundialmente y son considerados hongos comunes en el almacenamiento y deterioro biológico de alimentos y otros materiales.

Unas 12 especies pertenecían en principio al “grupo de especies *A. niger*” (Raper *et al.*, 1965), hasta que fueron clasificadas dentro de la sección *Nigri* por Gams (Gams *et al.*, 1985). Este grupo se redujo luego a 6 especies: *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* y *A. tubingensis*. Como las dos últimas especies son morfológicamente difíciles de distinguir, comúnmente se denomina a ambas *A. niger* o “agregado *A. niger*” (Pitt *et al.*, 2009). Finalmente, varios análisis moleculares indican la existencia de varias especies crípticas, llegando a identificar 24 especies dentro de la sección *Nigri* (Noonim *et al.*, 2008; Perrone *et al.*, 2011; Somma *et al.*, 2012).

Dentro de estas, las principales poblaciones que prevalecen en las uvas (Varga *et al.*, 2000; Perrone *et al.*, 2007) son:

Aspergillus sección *Nigri*

- *A. japonicus*.
 - *A. japonicus*
 - *A. aculeatus*
- *A. carbonarius*
- Agregado *A. niger*
 - *A. niger*
 - *A. tubingensis*

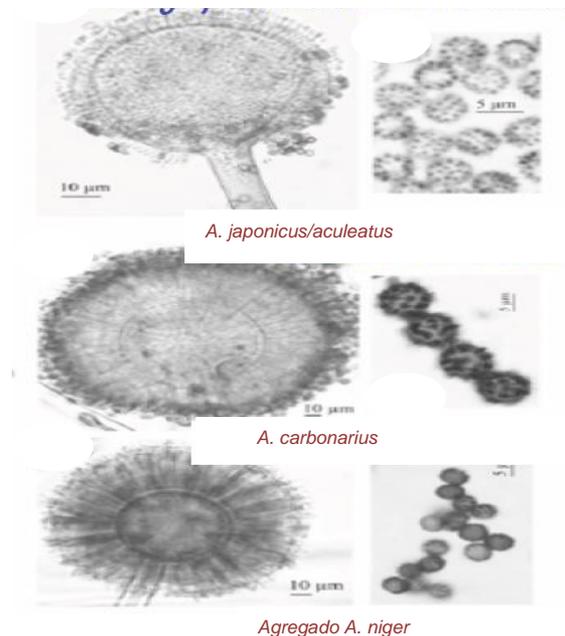


Figura 7_ Esquema de clasificación de las especies *Aspergillus* sección *Nigri* mostrando la apariencia de los conidióforos y los conidios en cada caso bajo microscopio (Samson *et al.*, 2000).

Todos ellos tienen la habilidad de causar podredumbre en las bayas conociéndose la enfermedad como “Podredumbre por *Aspergillus*” o “moho negro” (Snowdon, 1990).

A. aculeatus y *A. japonicus* son variedades de la especie *A. japonicus* que es la única uniseriada dentro de la sección *Nigri*. *A. japonicus* Saito y *A. aculeatus* Izuka son dos microorganismos clasificados como GRAS, presentan un importante interés económico ya que son utilizados frecuentemente en la fabricación de salsa de soja en Japón. Ambos puede separarse perfectamente del agregado *A. niger* y de *A. carbonarius* por la forma de su conidio (Samson *et al.*, 2000) (Figs. 7 y 8). Basados en diferentes métodos de clasificación, varios autores sugieren similitudes (Kusters-van Someren *et al.*, 1991) y diferencias (Pařenicová *et al.*, 2001) entre estos dos taxones que llevarían a suponer que son una única especie o se separan en dos especies distintas.

Los otros dos grupos (*A. carbonarius* y el agregado *A. niger*) los constituyen cepas cuyos conidios son de color negro y con conidióforos biseriados, que se observa dispuesto en capas bajo el microscopio (Figs. 7 y 8). En realidad esto se debe a la presencia de células de soporte o métulas debajo de las fiálides que son las que generan a los conidios (Figura 8).

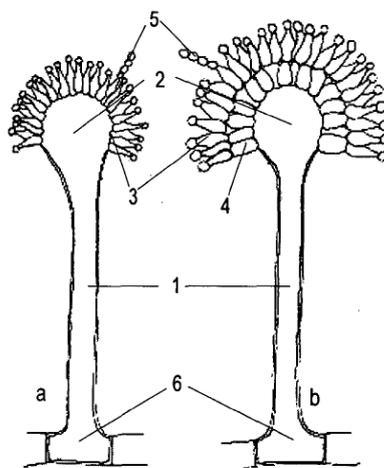


Figura 8_ Conidióforos del género *Aspergillus*. a: uniseriado; b: biseriado; 1: estipe o “parte media del conidióforo”; 2: vesícula o “ápice hinchado del conidióforo”; 3: fiálide o “célula conidiógena”; 4: métula o “célula soporte”; 5: conidio; 6: célula pie o “parte basal del conidióforo”. Adaptada de (Samson *et al.*, 2000).

En Europa y California, *Aspergillus carbonarius* es considerado como la principal fuente potencial de contaminación con OTA en uvas, pasas de uvas y vinos, seguido de las otras especies de la sección *Nigri*, como *A. niger* y *A. tubingensis* (Sage *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Esteban, 2005; Bejaoui *et al.*, 2006a; López-Mendoza *et al.*, 2009; Palumbo *et al.*, 2011).

Posiblemente *A. carbonarius* sea el miembro más distinto dentro de la sección y por eso se clasifica aparte y no aparece descrito en algunos manuales de identificación comunes (Samson *et al.*, 2004). Las cepas son fácilmente reconocidas bajo microscopio óptico ya que su conidio es mucho más grande y ornamentada que la de otros *Aspergillus* negros (Abarca *et al.*, 2004) y existen medios selectivos para su identificación (Pollastro *et al.*, 2006).

La taxonomía del resto de la sección *Nigri* es entonces la más compleja dentro del género, ya que de nuevo, la única condición para ser incluido en la clasificación es el color negro de los conidios. Si se tienen en cuenta otros datos morfológicos varía aún más el número de especies, formas o grupos (Raper *et al.*, 1965; Gams *et al.*, 1985; Kozakiewicz, 1989), y en colecciones de cultivos muchos aislamientos que eran iguales tenían nombres de especies diferentes. Para resolver este problema se realizó una revisión de la sección donde se incluyeron claves o pasos consecutivos para distinguir los taxones más comunes (Abarca *et al.*, 2004), como veremos en la sección 3.3.3.1.

En algunas especies es dificultosa la diferenciación usando métodos fenotípicos por lo que se han descrito otras técnicas para ayudar o corroborar dicha identificación. Estos estudios de biología molecular mayormente incluyen el análisis de genes específicos como del citocromo b (Yokoyama *et al.*, 2001), de los espacios transcritos internos (Pařenicová *et al.*, 2001), de la β -tubulina (de Vries *et al.*, 2005), calmodulina (Susca *et al.*, 2007a; Susca *et al.*, 2007b) o métodos de mapeo genético (Susca *et al.*, 2013). Los más recientes son métodos basados en la técnica de PCR y son capaces de discriminar a nivel de especies dentro de la sección como veremos en la sección 3.3.3.2.

En resumen, trabajos recientes han permitido identificar a los hongos del género *Aspergillus* como los principales responsables de la producción de OTA en uvas (Guzev *et al.*, 2006; Samson *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2011; Hubka *et al.*, 2012) y debido a la dificultosa identificación y clasificación fenotípica, la taxonomía de este género no está aún concluida y busca definirse con el apoyo de múltiples análisis genéticos. Un ejemplo de ello se desarrolló en Europa con el proyecto “Wine-Ochra Risk” (QLK1-CT-2001-01761) (Battilani *et al.*, 2006d).

3.3_ DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS

El muestreo es el paso más importante para obtener resultados confiables en cualquier estudio, más aún en análisis microbiológicos de alimentos en cuyo caso está en juego la salud humana. Si bien existen procedimientos en varias matrices, la regulación en uvas y vinos vivos que es insuficiente. En esta sección se describe el aislamiento, la cuantificación y la identificación de la micoflora productora de OTA, responsable de la presencia de la micotoxina en los vinos; mientras que el protocolo de muestreo en los viñedos utilizado en este estudio se describe en los capítulos 4 y 5.

3.3.1. Técnica de recuento

En hongos filamentosos como *Aspergillus* existen dos metodologías para su cuantificación dependiendo de las características del sustrato en el cual estos se encuentren. En el caso de los alimentos que se presentan en forma de partículas el plaqueo directo es un buen método si se quiere también aislarlos (Pitt *et al.*, 2009). En el caso de la uva cada partícula corresponde a una baya, que es el órgano vegetal donde se desarrolla *Aspergillus* y la mínima unidad de fraccionamiento de los racimos.

Los resultados se pueden expresar como número total de colonias y/o porcentaje de bayas infectadas. En la práctica, en la mayoría de los ensayos aparecen varios hongos

colonizando una misma baya por lo que el porcentaje de bayas infectadas no es representativo de la infección latente en las mismas.

Metodología para el recuento

En esta tesis se dan datos de cantidad total de hongos emergentes separados según los criterios de clasificación detallados más adelante y/o porcentaje de infección latente (IL) como número de hongos emergentes sobre el total de bayas.

3.3.2. Aislamiento y condiciones de incubación

La realización de un aislamiento microbiológico propiamente dicho se define como la obtención de un cultivo puro, libre de cualquier contaminante químico, físico o biológico que pueda utilizarse luego en los métodos de identificación convencionales a nivel de especie. Usualmente, en los alimentos, matrices bioquímicas complejas, crece una mezcla de diferentes especies de hongos, bacterias y levaduras (Smith *et al.*, 1985). Las técnicas de aislamiento de hongos en estos casos se pueden dividir en dos categorías principales que son directas o selectivas. En el primer caso se transfiere el hongo desde su hábitat natural a condiciones de laboratorio aptas para lograr un cultivo puro del mismo. Los métodos de aislamiento selectivos se utilizan en el caso que las especies buscadas presenten baja incidencia con respecto a los componentes totales de la micoflora presente en el sustrato. La manera de obtener un cultivo puro a partir de una muestra requiere principalmente estar seguro que se extrae precisamente el hongo que se quiere aislar según sus características.

El aislamiento de hongos es más efectivo si el sustrato natural se coloca en un ambiente húmedo por cierto período de tiempo para favorecer su crecimiento y esporulación respecto a otros microorganismos cohabitantes, que en este caso actúan como contaminantes. Esto suele llamarse cámara húmeda y las formas y tamaños dependen del sustrato en el que el microorganismo de interés se encuentra.

La desinfección de las bayas, el uso de nutrientes selectivos y temperatura y tiempo de incubación determinados están enfocados a favorecer el desarrollo de *Aspergillus* por sobre la micoflora total. La desinfección y los lavados posteriores no sólo remueven la contaminación de la superficie de polvo, sustancias químicas y/u otros sino que evitan la presencia de bacterias. Reestablecidas luego las condiciones óptimas de crecimiento

fúngico, se desarrollan solo los que estaban presentes al momento de la recolección de las muestras.

Las condiciones de incubación pueden variar según recomendaciones propias de cada región o grupo de trabajo. Puede ser de 25 °C por 5 días, a 30 °C en regiones templadas o 22 °C por 7 días en Europa con clima más frescos (Bellí, 2006). Siempre depende de las circunstancias, pero en estos estudios de relevamiento deben coincidir las temperaturas de incubación con las temperaturas a las cuales se llevan a cabo los procesos de la cadena vitivinícola en estudio.

Metodología para el aislamiento

En nuestro estudio se llevaron a cabo ambas técnicas de aislamiento (directo y selectivo), con algunas modificaciones a los significados estrictos de dichos métodos para evaluar lo que denominamos *infección emergente*.

Como veremos en el siguiente capítulo, determinados racimos fueron recolectados en los viñedos y se tomaron muestras representativas de bayas.

En este trabajo se probaron dos modelos de cámara húmeda. Por un lado un pequeño contenedor plástico con tapa, hojas de papel humedecidas con agua esterilizada en el fondo sobre los cuales, a 1 cm de altura, se colocó una maya metálica de 1 cm x 1 cm para disponer arriba un total de 24 bayas. Y una placa plástica con tapa de 12 hoyos con una profundidad de un poco más de 1 cm cada uno donde entraba una baya. Luego de una serie de pruebas variando los niveles de humedad y las temperaturas de incubación se optó por la segunda opción.

Se dispusieron 0,3 mL de medio DRBC Agar estéril en cada hoyo (Anexo 1). En cada placa fueron colocadas 12 bayas con el pedúnculo hacia arriba, previamente desinfectadas con un lavado en una solución de hipoclorito 1% por 1 min y dos lavados consecutivos de igual duración con agua destilada esterilizada en vasos de vidrio con agitación. Este procedimiento se llevó a cabo en cámara de flujo de aire para mantener el medio aséptico. Las placas se taparon y fueron incubadas a temperatura de 25 °C por 10 días con régimen de fotoperíodo de 12 horas (Figura 9).



Figura 9_ Vista de una placa con 12 bayas resultante de la incubación en las condiciones mencionadas anteriormente.

Esta metodología se llevó a cabo con 125 bayas para cada predio en el año 2007. En el año 2008 se realizó con 48 bayas total divididas en cuatro repeticiones para conocer la reproducibilidad del método de plaqueo. Por último, en 2010 se realizó por duplicado con 96 bayas colectadas independientemente y divididas en submuestras de 24, 24 y 48 bayas, para conocer la reproducibilidad del muestreo a campo y la interacción con el método de plaqueo. La cantidad de bayas evaluadas en cada año fue diferente buscando mejorar la reproducibilidad en el cultivo de los microorganismos pero conservando siempre la proporcionalidad en cuanto a la posición de las bayas extraídas de los racimos, la repetitividad y el mantenimiento de las condiciones de crecimiento microbiano.

Se realizó una inspección visual de las colonias de hongos emergidas sobre la superficie de las bayas transcurridos 7 días bajo lupa acondicionada con luz y se extrajeron muestras para realizar el relevamiento bajo microscopio óptico (Olympus BH2). Se procedió luego al aislamiento “directo” de todos aquellos hongos que según su morfología pertenecerían al género *Aspergillus*. Esto consistió en tomar una pequeña muestra de hifas o esporas con una aguja estéril y colocarla en placas de Petri con medio MA₂ fresco (Anexo 1). Preferiblemente se realizó a modo de inóculo puntual en el centro de la placa para permitir el mejor desarrollo y esporulación de la colonia fúngica.

Estas fueron incubadas a 25 °C por 7 días y repicadas en el caso de existir contaminación por otros hongos, especialmente *Penicillium*, para obtener cultivos puros. Las placas se mantuvieron en posición vertical para evitar la contaminación con las esporas que pueden caer a las tapas cuando estas son incubadas de forma invertida. Estos aislamientos correctamente rotulados fueron utilizados en ensayos de identificación fenotípica, para la

extracción de ADN y por último, para el almacenamiento en glicerol 2 % a -20 °C para conformar una colección.

En nuestro caso, sumado a las buenas prácticas de recolección y siendo este un punto clave en el sistema de control utilizado, utilizamos una temperatura de 25 °C al momento de incubar los hongos aislados.

3.3.3. *Identificación y clasificación*

Una vez que un hongo ha sido aislado, pueden requerirse cultivos adicionales para poder identificarlo.

3.3.3.1. **Identificación fenotípica**

Usualmente la identificación fúngica como vimos se realiza en base a características morfológicas de las colonias, conidio y esporas. Los hongos presentes como contaminantes en los alimentos pertenecen a tres grupos diferentes o subreinos del reino *Fungi*: *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Deuteromycota*. Estos a su vez se van dividiendo en diferentes clases, órdenes, familias y géneros sucesivamente hasta llegar a conformarse las distintas especies. En las uvas, como señalamos, aparecen los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* que pertenecen a la familia *Moniliaceae*; *Alternaria* y *Botrytis* de la familia *Dematiaceae* que conforman junto a otros hongos el orden *Moniliales* (Dugan, 2006) (Fig. 10). Los hongos de cada subreino tienen propiedades muy diferentes pero en cada uno de ellos, los géneros y las especies las comparten, lo que hace difícil muchas veces la clasificación (Pitt, 2000).

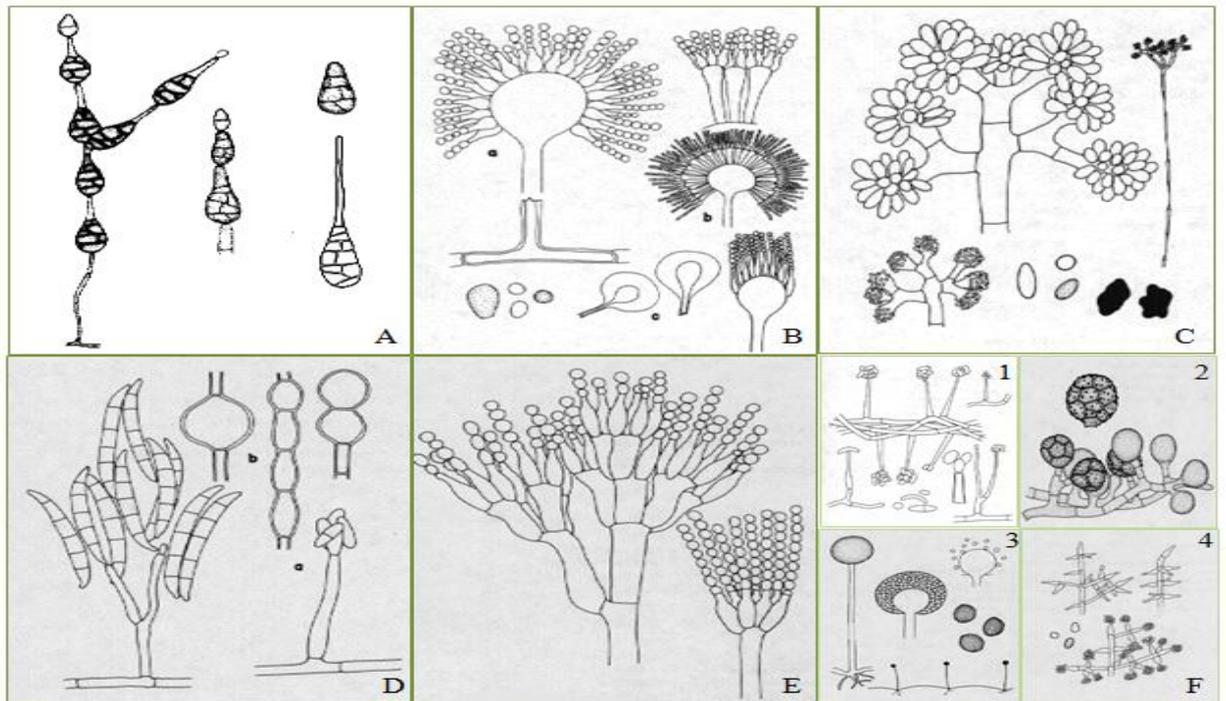


Figura 10 Hongos comunes en la microfiora presente en uvas. A_ *Alternaria*; B_ *Aspergillus*; C_ *Botrytis*; D_ *Fusarium*; E_ *Penicillium*; F1_ *Acremonium*, F2_ *Epicoccum*, F3_ *Rhizopus*, F4_ *Trichoderma*. Extraído de la página web de Mycological Research Group del St. George Campus, University of Toronto (Canadá).

Como ya vimos, basados en el criterio morfológico, la diferenciación a nivel de especies es muy dificultosa y requiere considerable experiencia usando los métodos convencionales.

Por esto se han desarrollado también estudios acerca de la fisiología de estos hongos y la potencial toxicidad del conjunto de las toxinas producidas por ellos (Silva *et al.*, 2011).

Una vez en contacto con la pulpa o el jugo de uva, estos hongos inician la producción de las micotoxinas tales como fumonisinas y la propia OTA (Logrieco *et al.*, 2009). En este sentido, se ha utilizado la clasificación en base al patrón de toxinas o metabolitos específicos que unos u otros hongos son capaces de sintetizar (Geiser *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2009; Meijer *et al.*, 2011). Aun así, estos estudios fisiológicos no representan un método apto para casos como los desarrollados en esta tesis, ya que estos perfiles son muy dependientes de condiciones controladas de laboratorio. No se corresponderían así a las variables que afectan a los viñedos, donde se generan condiciones y microclimas únicos.

Metodología para la identificación fenotípica.

En base a la vistas en el microscopio óptico (Nikon 0.90) con aumentos variables y al esquema de la figura 10, se clasificaron, repicaron y/o descartaron los aislamientos obtenidos.

Se inició un plan consecutivo de identificación de una selección representativa de aislamientos de acuerdo a la incubación en medios de cultivo específicos. Se realizaron según las recomendaciones, cultivos monospóricos puros en MA₂ (Anexo 1) de 7 días y se repicaron por triplicado en medio CYA e incubaron a 25 y 37 °C de manera de corroborar la identificación fenotípica siguiendo las claves descriptas por Samson *et al.* (2007) y Pitt *et al.* (2009).

Controles de *A. fumigatus* (3.45), *A. niger* (3.39), *A. carbonarius* (3.36) y *A. ochraceus* (3.66) (cedidos por el Dr. A. J. Ramos Girona del Grupo de Micología Aplicada, Universidad de Lleida, España) fueron repicados y mantenidos en las mismas condiciones que los aislamientos de 2007 y 2008, y utilizados como control en todos los casos.

El método utilizado para la extracción de OTA de los aislamientos obtenidos se basó en el trabajo de Bragulat *et al.* (2001). Es un método de detección simple y limpio, basado en la técnica de HPLC. En la metodología se obtienen trozos del medio de cultivo (YES Agar) con cultivos puros de los hongos y se realiza un extracto para la cuantificación de la OTA producida por cada aislamiento. Después de 7 días de incubación a 25 °C se toman 3 discos del agar (5 mm de diámetro) de las zonas interna, media y externa de cada colonia. La muestra removida se coloca en tubos Eppendorf de 3 mL y se pesa. Se le agrega 1 ml de metanol y se agita por 5 segundos (Vortex-Genie2TM, Scientific Industries). Después de 1 hora, los extractos se agitan nuevamente, se filtran (0,2 µm, Lubitech) y se almacena a 4 °C hasta el análisis por HPLC como se detalla en el capítulo 6.

3.3.3.2. Identificación genética

En los últimos 10 años se ha incursionado en métodos de biología molecular, utilizando principalmente métodos basados en PCR como herramienta útil para identificar, clasificar y cuantificar la presencia de hongos ocratoxigénicos (Esteban, 2005; Bouras *et al.*, 2007; Bufflier *et al.*, 2007; Juhász *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2007; De Valk *et al.*, 2008; Sartori *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2011).

Particularmente estos métodos se utilizan para la identificación específica de una especie o múltiples especies productoras de micotoxinas o para la cuantificación de especies por PCR semicuantitativa o cuantitativa en tiempo real (PCR Real Time) (Mulé *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007; Selma *et al.*, 2008; Gil-Serna *et al.*, 2009; Selma *et al.*, 2009; Machida *et al.*, 2010). Los ensayos de PCR son rápidos, sensibles y específicos, y representan una buena herramienta para la detección temprana de algunas de las principales especies de *Aspergillus* tóxicas, y para la prevención de la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria (Settanni *et al.*, 2007; Abed, 2008; Niessen, 2008; Dachoupan *et al.*, 2009; González-Salgado *et al.*, 2009; González-Salgado, 2010; Oliveri *et al.*, 2011; Hayat *et al.*, 2012; Luque *et al.*, 2013).

Se han realizado también análisis más específicos para conocer el genoma de *Aspergillus* spp. (McGuire *et al.*, 2008) y de proteómica acerca de la producción de la OTA por *A. carbonarius* bajo diferentes condiciones para determinar los genes y factores transcripcionales involucrados (Lunardi *et al.*, 2009; Crespo-Sempere *et al.*, 2011; Gallo *et al.*, 2012; Crespo-Sempere *et al.*, 2013).

Estudios genéticos en hongos

Para la detección y la realización de estudios genotípicos de las especies de *Aspergillus* presentes en diversos sustratos, se usan varios métodos moleculares. Dentro de los genomas, las secuencias más utilizadas para la comparación inter-especie se encuentran en el ADN que codifica para ARN ribosomales (Fig. 11), ya sea ARNr nucleares o ARNr mitocondriales (Juhász *et al.*, 2004).

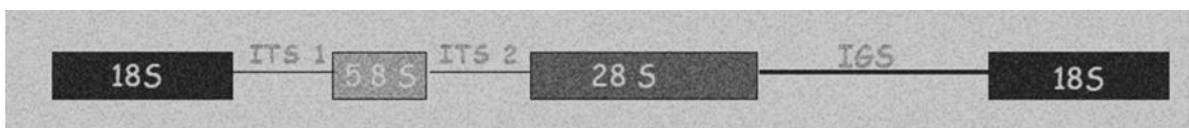


Figura 11_ Esquema de un gen de ADN que codifica para ARN ribosomal.

Estas secuencias de ADN contienen regiones conservadas y regiones variables, por lo que su evolución permite estudiar la evolución del genoma de los microorganismos. Los genes ribosómicos (ADNr) que codifican para los ARNr están organizados en tándem, y están separados por espacios intergénicos no transcritos (IGS de las siglas en inglés: InterGenic Sequence). Además dentro de cada gen hay ciertas secuencias denominadas ITS

(de las siglas en inglés: Internal Transcribed Spacer) que si bien son transcriptas no forman parte del ribosoma ya que son eliminadas en el proceso de maduración del ARNr. Estas últimas se localizan entre los genes de ARNr 18S y 28S, y dado su alta conservación y variabilidad, constituyen una herramienta de particular importancia para discriminar especies relacionadas dentro del mismo género. Aproximadamente 100 copias de estas regiones se encuentran repetidas por genoma, lo que las hace muy sensible a la hora de realizar estudios filogenéticos en hongos (Henrion *et al.*, 1994; Pelegrinelli *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2008; Palencia *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2011).

PCR con cebadores no específicos y RFLP

La eficacia de todos los ADN genómicos aislados fue testeada realizando una amplificación de control por PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

Los cebadores ITS1/ITS4: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'/5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3', son complementarios a las regiones ITS localizadas entre los genes del ARNr 18S y 28S como se menciona anteriormente. No poseen especificidad por una especie en particular, y se utilizan para corroborar la presencia de ADN fúngico, principalmente del género *Aspergillus* en los extractos.

En la técnica molecular simple y rápida de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se utiliza el producto de amplificación de alguna región conservada y se realiza una restricción posterior con endonucleasas. En hongos comúnmente se utiliza las regiones ITS y la endonucleasa *RsaI* (Gardes *et al.*, 1996; Accensi *et al.*, 1999; Martínez-Culebras *et al.*, 2007; Bisbal *et al.*, 2009; Diguta *et al.*, 2011; Spadaro *et al.*, 2012). Las regiones polimórficas en su secuencia pueden tener o no el sitio específico de corte por la enzima, por lo que pueden ser digeridas o quedar intactas, variando así su longitud. Estas diferencias en el tamaño de los fragmentos pueden reconocerse según la migración diferencial en geles de agarosa. Dentro del agregado *A. niger* se obtienen dos grupos denominados N y T dependiendo si existe digestión o no, respectivamente. Algunos autores (Bau *et al.*, 2006b) afirman que los aislamientos clasificados como N son capaces de sintetizar OTA, mientras que los del grupo T son incapaces de hacerlo al menos a niveles detectables según el método de cuantificación utilizado.

Estos métodos requieren no solo el aislamiento de los hongos, sino una buena extracción de ADN en cantidad y calidad para realizar la amplificación (Gardes *et al.*, 1996). Estas limitaciones hacen que sea difícil de usar para el diagnóstico rutinario de detección de hongos en matrices complejas como son los alimentos.

PCR con cebadores específicos

En base a estas secuencias ITS se han diseñado también cebadores específicos para la identificación de *Aspergillus*. Se han caracterizado diferentes especies presentes en viñedos de distintos países (Accensi *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2000) y se han discriminado especies productoras de OTA dentro de la sección *Nigri* (Bau *et al.*, 2005b; González-Salgado *et al.*, 2005; Patiño *et al.*, 2005).

En esta tesis los ensayos de PCR especie-específicos se llevaron a cabo usando cebadores determinados para el reconocimiento de *Aspergillus ochraceus* (OCRA1/OCRA2) y *A. carbonarius* (CAR1/CAR2) diseñados en base al alineamiento de las secuencias ITS descritas anteriormente en bases genómicas (Patiño *et al.*, 2005). Sus secuencias son: OCRA1/OCRA2-

5'CTTCCTTAGGGGTGGCACAGC3'/5'GTTGCTTTTCAGCGTCGGCC3' y
CAR1/CAR2-5'GCATCTCTGCCCTCGG3'/5'GGTTGGAGTTGTCGGCAG3'.

Otros cebadores se han diseñado en base a la secuencia nucleotídica de los genes cuyos productos transcripcionales participan en la ruta biosintéticas de la OTA en este género de hongo (Susca *et al.*, 2007a; Susca *et al.*, 2007b; Spadaro *et al.*, 2011). En nuestro análisis se utilizaron los cebadores denominados AoLC35-12L/AoLC35-12R sintetizados a partir de la secuencia del gen de la principal enzima involucrada en la síntesis de OTA y citrinina (Dao *et al.*, 2005). Su secuencia detallada es 5'GCCAGACCATCGACACTGCATGCTC5'/5'CGACTGGCGTTCCAGACCATGAGC C'3.

AFLP

Otra aproximación utilizada es la de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), una técnica que permite la caracterización genética de una población basada en la existencia de sitios de restricción diferentes que conducen a la generación de

fragmentos de ADN de diferente tamaño. Para la realización de esta técnica es necesario la digestión del ADN fúngico con enzimas de restricción y la ligación de adaptadores que permiten la amplificación de dichos fragmentos por PCR. Estos son fragmentos de oligonucleótidos que específicamente reconocen los extremos producidos por la restricción enzimática y se unen a ellos. Luego, una reacción de PCR preselectiva se lleva a cabo para aumentar la cantidad de ADN a analizar, y por último, utilizando la complementariedad de cebadores seleccionados específicamente se desarrollan reacciones de PCR selectivas. Diferentes individuos presentan patrones de fragmentos diferentes que permiten caracterizar la variabilidad genética de una población (Gargouri *et al.*, 2006), incluídas las de estos hongos (Perrone *et al.*, 2006b; Botton *et al.*, 2008). El AFLP representa un método altamente discriminatorio a nivel intraespecífico y poderoso para la diferenciación de cepas de fúngicas (Schmidt *et al.*, 2004; Duarte-Escalante *et al.*, 2009).

Este ensayo, al igual que RFLP, necesita sin embargo el aislamiento del hongo y la extracción de su ADN en grandes cantidades (El Khoury, 2007). Como se mencionó anteriormente, estas limitaciones restringen su uso con fines de diagnóstico rutinario, para la detección de hongos en matrices alimenticias.

Metodología para la identificación genética

Para los estudios genéticos se seleccionaron aislamientos en proporción a la cantidad de aislamientos totales en cada viñedo para las cosechas 2007 y 2008, de acuerdo a la capacidad de análisis.

Extracción del ADN_ Las esporas obtenidas de los cultivos monospóricos de los *Aspergillus* aislados fueron inoculadas en condiciones asépticas en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio Sabouraud líquido (Anexo 1) y luego incubados en oscuridad por 7 días con agitación a 150 rpm y 28 °C. El micelio obtenido se separó del medio líquido por filtración con gasa y se colocó durante 24 h a -20 °C previo a su liofilización. El producto liofilizado se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C en tubos Eppendorf por triplicado, para generar un banco de micelios y utilizar en la extracción posterior.

El ADN de todos estos aislamientos se obtuvo utilizando el Kit de Purificación de ADN Genómico (Fermentas, K0512) y se resuspendió finalmente en agua MilliQ (Millipore

Intertech, U.S.A.) estéril. La eficiencia de este método de extracción se corroboró por espectrofotometría (NanoDrop 800) y electroforesis en geles de agarosa 0,9% (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR con cebadores no específicos y RFLP_ La reacción de PCR con los cebadores ITS1/ITS4 se aplicó a la totalidad de los aislamientos y se realizó en un Termociclador (Corbett CG1-96) siguiendo el programa de amplificación descrito por Henry *et al.* (2000). Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa 2% con tinción de bromuro de etidio revelada bajo luz UV (Sambrook *et al.*, 1989) y fueron utilizados para el ensayo de RFLP posterior.

Los productos de PCR fueron digeridos durante 16 horas a 37 °C con la endonucleasa *RsaI* (Fermentas). El análisis de RFLP se realizó cargando los productos de la reacción de digestión en un gel de agarosa 2%, teñido luego con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras fueron clasificadas según los perfiles obtenidos de los productos de la digestión como pertenecientes al grupo N o al grupo T (Bau *et al.*, 2006b).

PCR con cebadores específicos_ Las reacciones de PCR con cebadores específicos (sintetizados por Alpha DNA, Montreal, CA) se aplicaron a la totalidad de los aislamientos y se realizaron en un Termociclador (Corbett CG1-96) siguiendo el programa de amplificación descrito por Patiño *et al.* (2005) o Dao *et al.* (2005). Los productos de amplificación de cada una de las reacciones se separaron e identificaron según su peso molecular aproximado en geles de electroforesis de agarosa 2% con buffer TBE 0.5X con tinción de bromuro de etidio revelada bajo luz UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los tamaños de los productos de PCR obtenidos fueron de aproximadamente 400 pb para OCRA1/OCRA2, 420 pb para CAR1/CAR2 (Patiño *et al.*, 2005) y 520 pb para AoLC35-12L/AoLC35-12R (Dao *et al.*, 2005). Las muestras fueron clasificadas como positivas (+) o negativas (-) ante la presencia o ausencia respectivamente, del producto de amplificación para cada cebador.

AFLP_ Las reacciones de AFLP se llevaron a cabo en una muestra representativa del total de los individuos, agregando todos los potenciales productores de OTA según los resultados de la amplificación con el cebador AoLC35. Se realizaron de acuerdo a Vos *et al.* (1995) utilizando el Kit AFLP Microbial Fingerprinting (PE Applied Biosystem, Foster

City, CA). Este protocolo fue adaptado con algunas modificaciones. El ADN genómico (500 ng) fue digerido con 10 U *EcoRI* (Fermentas Life Science) y 10 U *MseI* (Fermentas Life Science) durante 2 h a 37 °C. La reacción de doble digestión se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl en Tango™ Buffer (Fermentas Life Science) que contiene 33 mM Tris-acetato (pH 7.9), 10 mM Acetato de magnesio, 66 mM Acetato de potasio y 0.1 mg/ml de BSA. Una reacción de inactivación se llevó a cabo al finalizar, manteniendo los tubos a 65 °C por 20 min. Los adaptadores *EcoRI* y *MseI* (1 µl de cada uno), fueron ligados al ADN digerido (aprox. 20 ng) con 0,35 U de ligasa T4 (Fermentas Life Science) en 10 µl de volumen de reacción utilizando Buffer T4. La ligación se incubó toda la noche a 16 °C. Después de la ligación se preparó una dilución 1/10 de las muestras.

La reacción de amplificación preselectiva se llevó a cabo adicionando 1 µl de Primer Mix (PE Applied Biosystem, Foster City, CA) y 15 µl de AFLP Core Mix (PE Applied Biosystem, Foster City, CA) a 4 µl del ADN digerido-ligado. El Primer Mix contiene cebadores *EcoRI* y *MseI* complementarios a las secuencias adaptadores con una base adicional 3' A y C, respectivamente. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf CG1-96 siguiendo los parámetros: 1 ciclo de 2 min a 72 °C, 20 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, 2 min a 72 °C y 4 °C hasta finalizar. Después de la PCR, las muestras fueron diluidas 1/10.

El ADN amplificado y diluido fue utilizado como molde para las reacciones de amplificación selectiva. En cada reacción se utilizaron 1.5 µl del producto de la amplificación preselectiva diluido, mezclados con los cebadores selectivos en un volumen final de 10 µl. Se probaron cuatro combinaciones separadas de cebadores para las amplificaciones selectivas **S1:** *EcoRI*-AT y *MseI*-CG; **S2:** *EcoRI*-G y *MseI*-CT; **S3:** *EcoRI*-AC y *MseI*-CA y **S4:** *EcoRI*-AC y *MseI*-CC (Applied Biosystem, Foster City, CA) de acuerdo a los trabajos de Perrone *et al.* (2006a; Perrone *et al.*, 2006b). Sólo los cebadores complementarios a los adaptadores *EcoRI* se encontraban marcados con fluorescencia. Las condiciones de ciclado de estas reacciones PCR son las descritas en el protocolo de AFLP Microbial Fingerprinting (PE Applied Biosystem, Foster City, CA).

Los productos amplificados selectivamente se separaron por electroforesis capilar usando el módulo FAM-NED-JOE según el fluorocromo utilizado. Los productos de la amplificación selectiva (2 µl) fueron mezclados con 8 µl de Hi-Di™ formamida (PE Applied Biosystem, Foster City, CA) y analizadas un secuenciador automático 3730xl DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Los resultados fueron analizados en el software Peak Scanner™ v. 1.0 (Applied Biosystem) para medir el tamaño en pares de bases y cuantificar los fragmentos individuales en cada muestra, de acuerdo a la posición relativa y el área de cada pico en los electroferogramas. El programa Genographer (PE Biosystem) se utilizó para corroborar el patrón de bandas producidas a partir de la representación de cada uno de los fragmentos. Fueron seleccionadas las bandas polimórficas que se clasificaron como presentes (1) o ausentes (0) en cada uno de los aislamientos. Aquellos picos o bandas no uniformes y/o de intensidad débil no fueron tomados en cuenta para los análisis genéticos.

Análisis estadísticos_ Los datos del estudio genético fueron analizados usando varias herramientas estadísticas. En el caso específico de AFLP con el programa Infogen (Balzarini *et al.*, 2004) se determinó por el Análisis de Componentes Principales la variabilidad genética existente entre los aislamientos de *Aspergillus* seleccionados para los análisis genéticos. Se llevó a cabo también un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) que considera los datos como varianza molecular haploide y no como datos de frecuencia de aparición de un marcador molecular (Excoffier *et al.*, 1992). Este análisis es útil para obtener una primera aproximación a la variación genética (multivariada de datos binarios) y conocer la influencia de ciertos factores de clasificación sobre esa variación (categorización de los datos) (Balzarini *et al.*, 2010). En este último caso se divide la variación genética total en tres niveles jerárquicos específicos: entre cada uno de los aislamientos, entre aislamientos de diferentes especies y entre aislamientos de diferentes localizaciones. Los niveles de significancia estadística se calcularon por la utilización de 2000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992).



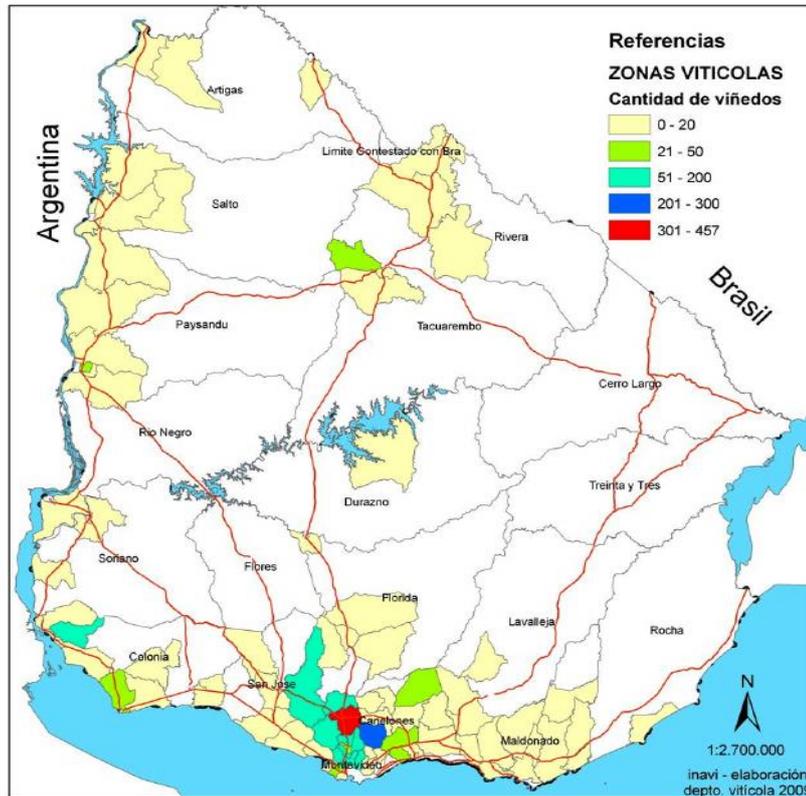
CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA MICOFLORA DEL VIÑEDO

La habilidad de muchos organismos de atacar los viñedos depende en gran parte de sus versátiles requerimientos ambientales. Por esto, un amplio y diverso grupo de levaduras y hongos crecen, se desarrollan naturalmente en las plantas de vid, principalmente en las uvas (Barata *et al.*, 2012). Utilizando diseños de muestreo simples se llegan a reconocer unas cien especies diferentes. Se puede entonces identificar la micoflora existente en las uvas, teniendo en cuenta su evolución durante la maduración de las bayas, encontrar las especies ocratoxigénicas presentes y analizar su capacidad de producir OTA, como veremos a continuación.

4.1_ UBICACIÓN GEOGRÁFICA

En el Uruguay existe un registro de la distribución de las zonas vitivinícolas de acuerdo a donde se han establecido los viñedos (Mapa 1).

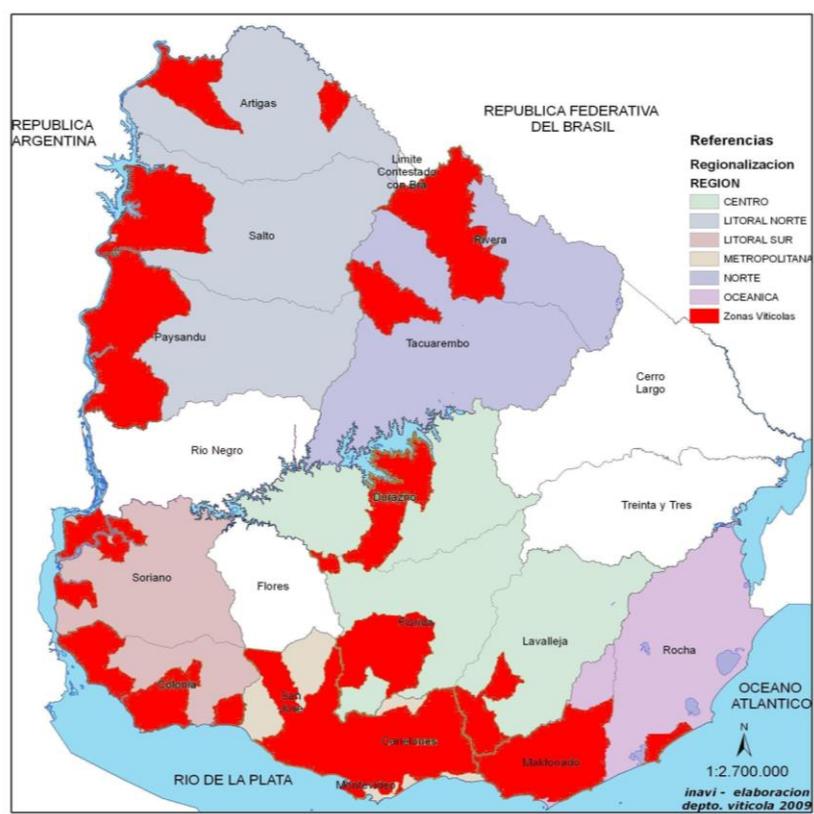


Mapa 1_ Mapa de zonas vitivinícolas del Uruguay de acuerdo al número de viñedos existentes a 2009. (INAVI, 2009).

Cada zona equivale al agrupamiento de viñedos por cantidad, aunque se busca obtener la georreferenciación de cada uno para la aplicación de una nueva forma de trazabilidad para la caracterización del vino desde la viña, según los datos de INAVI (INAVI, 2013).

De acuerdo a la bibliografía, las diferencias significativas en la presencia y distribución de *Aspergillus* spp. en distintas regiones de origen de las uvas, se deben principalmente a la ecología y ambiente del viñedo (Serra *et al.*, 2006b; Lasram *et al.*, 2012). Por lo tanto las condiciones meteorológicas son las determinantes de tales diferencias (Chiotta *et al.*, 2009), concretamente el mesoclima.

De acuerdo al mesoclima existente en nuestro país, se da una regionalización algo arbitraria. El Uruguay aparece así dividido en seis zonas (Mapa 2).



Mapa 2_ Zonas vitivinícolas y regionalización según el mesoclima del Uruguay. (INAVI, 2009)

4.2_ VARIEDADES

La presencia de estos hongos es mayor en variedades de uva tintas que en variedades de uvas blancas (Battilani *et al.*, 2004a). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de OTA en vinos producidos a partir de uvas tintas de diferentes variedades cultivadas en iguales condiciones (Rácz *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta el cuadro 2 (INAVI, 2013) la producción en Uruguay de las variedades tintas prevalece por sobre la de las variedades blancas.

Tipo de Uva	Kilogramos	Porcentaje
Tintas	114.032.027	80,48
Blancas	27.663.045	19,52
Total Nacional	141.695.072	100,00

Cuadro 2_ Producción de uvas en kilogramos y porcentajes relativos de acuerdo al tipo de variedad.

Como se ve en la figura 12 dentro de las variedades de mayor producción en Uruguay, las destinadas a vinos tintos son Tannat, Moscatel de Hamburgo, Merlot, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc (INAVI, 2013).

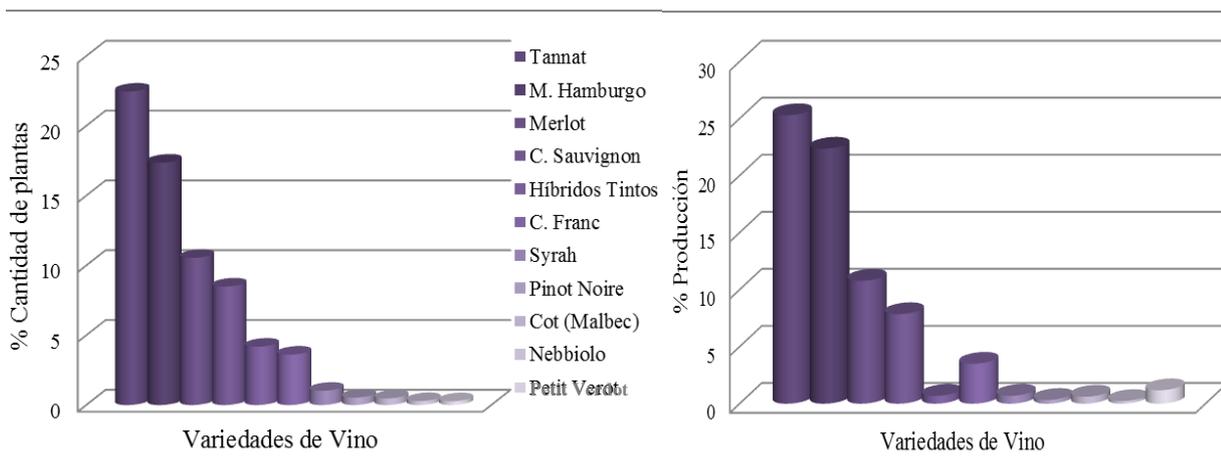


Figura 12 (izq)_ Porcentaje de plantas por variedad con respecto al total de vides declaradas a nivel nacional destinadas a la producción de vinos tintos. **(der)_** Porcentaje de producción en kilogramos por variedad con respecto al total de uva producida a nivel nacional destinada a la elaboración de vinos tintos.

Si bien estas variedades son usadas para producir vinos, sólo pocas uvas se distinguen por ser adecuadas para la producción de vinos finos. Tanto así que en estas

mismas estadísticas nacionales se diferencian las “variedades comunes” de las “variedades finas de vino” y en estas últimas prevalece Tannat tanto por producción como por la metodología aplicada para optimizar las técnicas culturales y de vinificación para aprovechar al máximo su potencial.

La variedad Tannat se ha impuesto como la cepa insignia del Uruguay, correspondiendo con lo que se denomina una designación de origen, que representa al país en el exterior. De acuerdo a los datos de exportación, este rubro implica un importante ingreso de divisas al país.

A pesar del amplio conocimiento acerca de la ocurrencia de OTA en diferentes tipos de vinos, no hay demasiada información en la presencia de OTA en las diferentes variedades de uvas (Jiang *et al.*, 2013b). Se han encontrado mayores niveles en vinos rosados que en vinos blancos (Bellí *et al.*, 2002) y por eso se ha propuesto que las variedades tintas poseen mayores contenidos de la toxina. Sin embargo, variedades tintas y blancas mostraron resistencia variable a la infección por *Aspergillus* y otras enfermedades fúngicas, por lo que su presencia y la potencial producción de OTA no pueden correlacionarse directamente (Battilani *et al.*, 2004a). La diferencia parece estar poco relacionada con la estructura de los racimos o de las bayas y más bien ligada a factores ambientales o implicados en los procesos de vinificación diferenciales como veremos en secciones posteriores de esta tesis.

4.3_ MADURACIÓN

Según la interacción de los hongos con el ambiente, estos pueden colonizar las bayas en el período de precosecha, en la cosecha o durante la manipulación de la cosecha y/o almacenamiento. Esto depende además del área donde ocurre la infección, que puede ser en el campo y/o en los lugares de almacenamiento. Una vez cosechada la uva, la vinificación es inmediata según las buenas prácticas de manufacturación, por lo que no es importante el tiempo de almacenamiento. Como la calidad es la premisa de estas bodegas, la infección por *Aspergillus* no se llevaría a cabo en el almacenamiento. Su presencia en las uvas depende entonces de la colonización de las uvas en el campo, y esta se ve potenciada si las bayas presentan un deterioro avanzado ya sea por factores físicos, químicos o biológicos como veremos en el capítulo 5.

Se ha demostrado que el nivel de contaminación por *Aspergillus* en el viñedo aumenta desde envero a cosecha y de acuerdo a la producción de OTA *in vitro* de estas cepas, la concentración de OTA en uvas correlaciona directamente (Bau *et al.*, 2006a); acentuándose en el caso de las uvas que se cosechan sobremaduras (Gómez *et al.*, 2006). La frecuencia de aparición de estos hongos aumenta junto con el desarrollo de la uva, haciéndose máxima en la madurez (Battilani *et al.*, 2003). Sin embargo, si se analizan uvas contaminadas por *A. carbonarius* en diferentes estados de madurez, los niveles de OTA decrecen desde cuajado a cosecha (Serra *et al.*, 2006c).

Metodología para el muestreo en los viñedos y análisis de las uvas

Se seleccionaron 24 predios que se distribuyen en la zona vitivinícola más importante del Uruguay (Mapa 1). Dos de estos predios pertenecen a la Estación Experimental INIA W. Ferreira Aldunate y los restantes a 16 bodegas, de las cuales 11 son avaladas por INAVI como bodegas exportadoras. En todos los casos se estaba siguiendo un criterio común de manejo de acuerdo a las buenas prácticas culturales. Los experimentos se llevaron a cabo en la zona sur de Uruguay (latitud aproximada 34° Sur). Todos los viñedos evaluados en este trabajo de tesis se encuentran en la misma región: región metropolitana; de acuerdo a los valores de latitud y longitud de los mismos (datos no mostrados).

Se seleccionó la variedad *Vitis vinifera* cv. Tannat, por la importancia en la viticultura nacional de los vinos tintos producidos a partir de ésta, como detalláramos anteriormente.

El muestreo de racimos se realizó el día previo a las cosechas correspondientes a las vendimias 2007-2011, en cada predio, de acuerdo al protocolo desarrollado por Iland *et al.* (1993).

Los datos de relevamiento del manejo integral de estos predios fueron incluidos en tablas siguiendo un mismo patrón. Se diseñó y completó la información y registros que se establecen para la definición y manejo de puntos críticos considerados en esta cadena productiva.

Análisis de uvas

En todos los casos, las muestras de uvas de interés para esta tesis, una vez obtenidas, se dividieron en dos fracciones, una para utilizarse en el análisis de contaminación y la otra fue almacenada en freezer (-20 °C) para su uso posterior. En el momento de la molienda se determinó en el mosto la concentración de sólidos solubles (SS) usando un refractómetro manual (Atago N1); el pH con pH-metro (Horiba - F13) y la acidez titulable (TA) por titulación (NaOH 0,1 N) y expresando los valores como gramos de H₂SO₄ (g/L). La concentración de los ácidos málico y tartárico se midió por HPLC (Boido, 2002).

Las 200 bayas tomadas por predio previo a la molienda se destinaron a análisis de antocianos totales, extraíbles, fenoles totales, compuestos glicosidados y compuestos

aromáticos libres y ligados. En los extractos obtenidos a partir de las uvas fueron analizados antocianos totales, antocianos extraíbles y fenoles totales de acuerdo a Glories (1984). El contenido de potasio se determinó por fotometría de llama (OIV, 2011), compuestos glicosilados (Phenolic-free GG) de acuerdo a Zoecklein *et al.* (1999) y compuestos aromáticos libres y ligados (Norisoprenoides y C6) según Boido (2003).

CAPÍTULO 5

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ECOSISTEMA EN LA PRESENCIA DE Aspergillus spp.

En el curso de la evolución, los hongos se han diversificado para explorar una amplia variedad de hábitats. Diferentes especies requieren diferentes condiciones para su óptimo crecimiento. El metabolismo microbiano se ve significativamente influenciado por el ambiente físico y químico.

Los hongos ocratoxigénicos solo pueden establecerse una vez que el cultivo ha sido infectado por otros organismos patogénicos o si presenta daños físicos o fisiológicos. Su capacidad de prosperar depende en gran medida de las condiciones ambientales y el microclima que se establece en cada viñedo en particular (Blesa *et al.*, 2006; Clouvel *et al.*, 2008).

Siguiendo su ciclo de vida, *Aspergillus spp.* presentes en el suelo y la materia orgánica, colonizan a la uva muy tempranamente, a menudo antes del envero. El estado de las bayas, principalmente la presencia de lesiones como roturas por prácticas de manejo, rajaduras por exceso de agua, daños de pájaros o insectos, influye positivamente en su capacidad de colonización y producción de OTA (Logrieco *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2013a). Asimismo, se ha demostrado *in vitro*, que el hongo es capaz de penetrar en bayas sanas (Battilani *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2006d). La OIV agrega además que la presencia y difusión de estos hongos en los viñedos están influenciadas por factores medioambientales y climáticos como: condiciones de humectación nocturna de la uva y nivel de aireación de los racimos.

Los viñedos necesitan de condiciones climatológicas precisas para prosperar. La viticultura uruguaya se caracteriza por ser de clima templado con suelos en secano, quizás demasiado dependientes de los períodos de lluvias por no poseer riego en muchos de los casos.

El período de verano debe ser lo suficientemente largo para asegurar una buena maduración de las bayas, al igual que los inviernos para permitir el descanso de las vides.

Otros requerimientos incluyen cierta cantidad de luz diaria recibida, índices de temperatura mínimos y máximos, y niveles de agua disponibles en el suelo. Pero en general, las vides crecen bien en climas templados situados entre las latitudes 30° y 50° norte y sur (Accensi, 2000) y muestran variaciones anuales en rendimiento y calidad que corresponden directamente a diferentes niveles de contaminación fúngica.

Aun así conservan su potencialidad de manejo dando a los viticultores herramientas que le permiten homogeneizar la calidad de las cosechas, primer punto crítico de control en la cadena.

5.1_ CLIMA Y CONDICIONES METEOROLÓGICAS

Las condiciones meteorológicas son las que muestran el rol protagónico en la contaminación con OTA de las uvas y en la incidencia de los *Aspergillus* en las bayas (Battilani *et al.*, 2006a; Battilani *et al.*, 2006b; Battilani *et al.*, 2006c). Altas temperaturas desde envero hasta la cosecha son un factor de riesgo que incrementa la contaminación (Bellí *et al.*, 2006a; Visconti *et al.*, 2008). En climas cálidos la incidencia de *Aspergillus* de la sección *Nigri* en los viñedos es mayor que en los ambientes templados. Esto puede explicarse por la relativamente alta temperatura de crecimiento óptima de estos comparada con la de otros hongos filamentosos que crecen en las uvas (Leong *et al.*, 2006b; Valero *et al.*, 2006). Un reflejo de este patrón de distribución es que la mayoría de los trabajos de investigación en los viñedos europeos han sido llevados a cabo en regiones cálidas (Serra *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Tjamos *et al.*, 2006; Lasram *et al.*, 2012) y poco se conoce acerca de las poblaciones fúngicas en aquellas zonas productoras más frías (Mikušová *et al.*, 2010).

Además, algunos autores (Battilani *et al.*, 2006a; Visconti *et al.*, 2008) afirman en base a análisis geostáticos que la incidencia de los hongos pertenecientes a la sección *Nigri* en viñedos de países mediterráneos muestra un gradiente norte-sur. La misma tendencia se observa en los mapas de temperatura y lluvia obtenidos para el mes previo a cosecha. La incidencia de *A. carbonarius* es más alta en uvas de las regiones mediterráneas del sur mientras que *A. tubingensis* y *A. niger* están más dispersos en los países pertenecientes a esas zonas europeas (Perrone *et al.*, 2007; Lucchetta *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta la situación de las mayores zonas vitícolas y las condiciones climáticas globales existen estudios geostáticos que han evaluados el riesgo de acumulación de OTA en las uvas asociado a la combinación de la temperatura media (°C) y la suma de las lluvias (mm) durante agosto y febrero, dependiendo si es en el hemisferio norte o sur, respectivamente (Barkai-Golan *et al.*, 2008). Cómo puede observarse en el mapa de la figura 13 Uruguay presentaría riesgo bajo o nulo. Aunque los valores de las lluvias acumuladas previas a cosecha en la mayoría de los años, no pueden extrapolarse en la tabla adjunta.

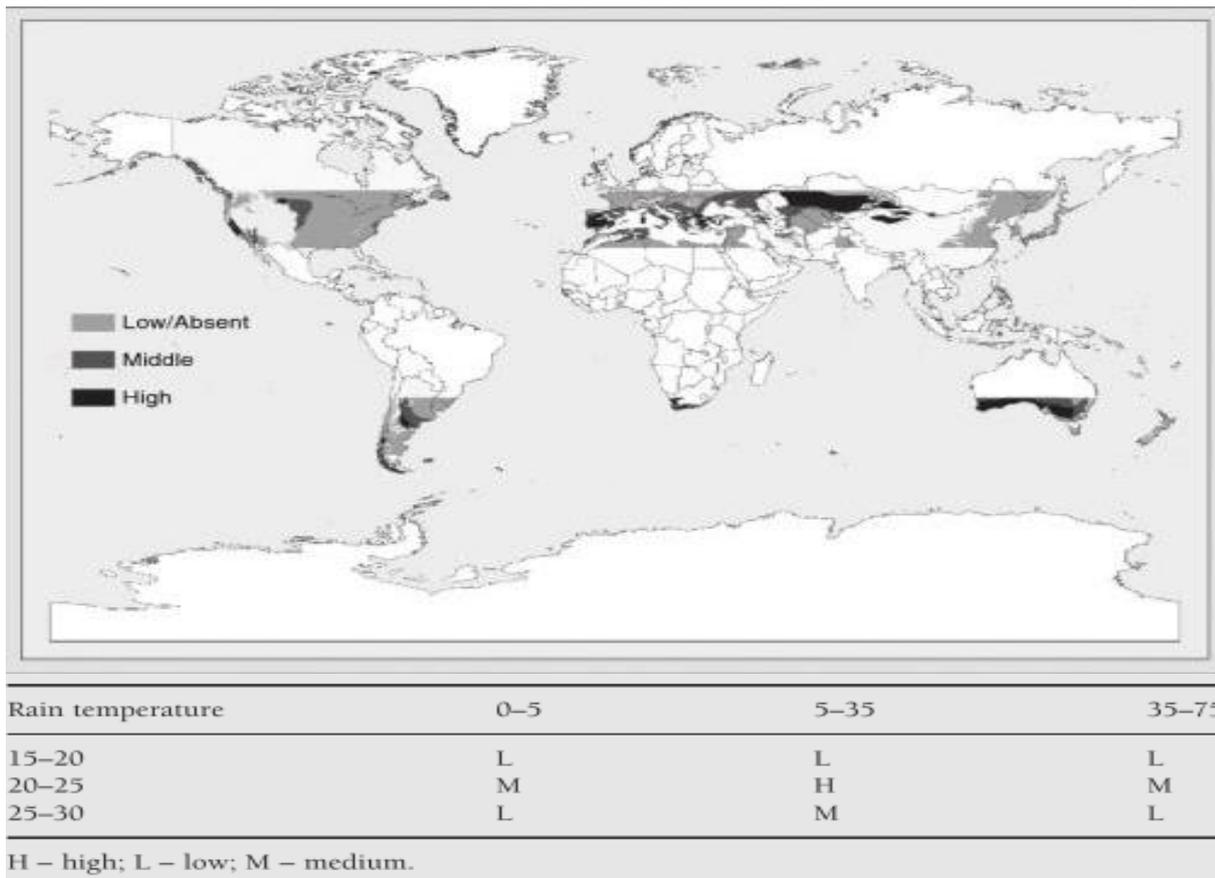


Figura 13_ Mapa de predicción del riesgo de ocratoxina A en áreas vitícolas a escala global y tabla adjunta. El riesgo fue determinado estadísticamente utilizando la combinación de la temperatura media (°C) y la suma de las lluvias (mm) durante agosto y febrero en el hemisferio norte y sur, respectivamente. Extraído de Barkai-Golan (Carlile *et al.*, 1996; Barkai-Golan *et al.*, 2008).

No obstante, el cambio climático y el subsecuente aumento de temperatura en los climas templados es probable que afecte la distribución de los hongos micotoxigénicos llevando incluso al establecimiento de *Aspergillus* en regiones en las cuales aún no se ha encontrado (Russell *et al.*, 2010; Magan *et al.*, 2011; Paterson *et al.*, 2011).

Para mejorar la evaluación y prepararse para contener los futuros riesgos de contaminación por OTA, la distribución de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y su potencialidad como productores de OTA y otras micotoxinas se ha de seguir estudiando en detalle bajo estas condiciones (Storari *et al.*, 2012). El mismo autor afirma que esto es particularmente importante en aquellas zonas donde las condiciones meteorológicas pueden cambiar aunque la incidencia de *Aspergillus* sea baja. La información colectada acerca de la presencia de las especies pertenecientes a la sección *Nigri*, la composición por especie de las poblaciones y la potencialidad toxigénica a nivel genético pueden ser utilizados como línea de base para prever el riesgo de contaminación por micotoxinas en esas regiones y

desarrollar herramientas efectivas para la detección temprana de los patógenos en el campo.

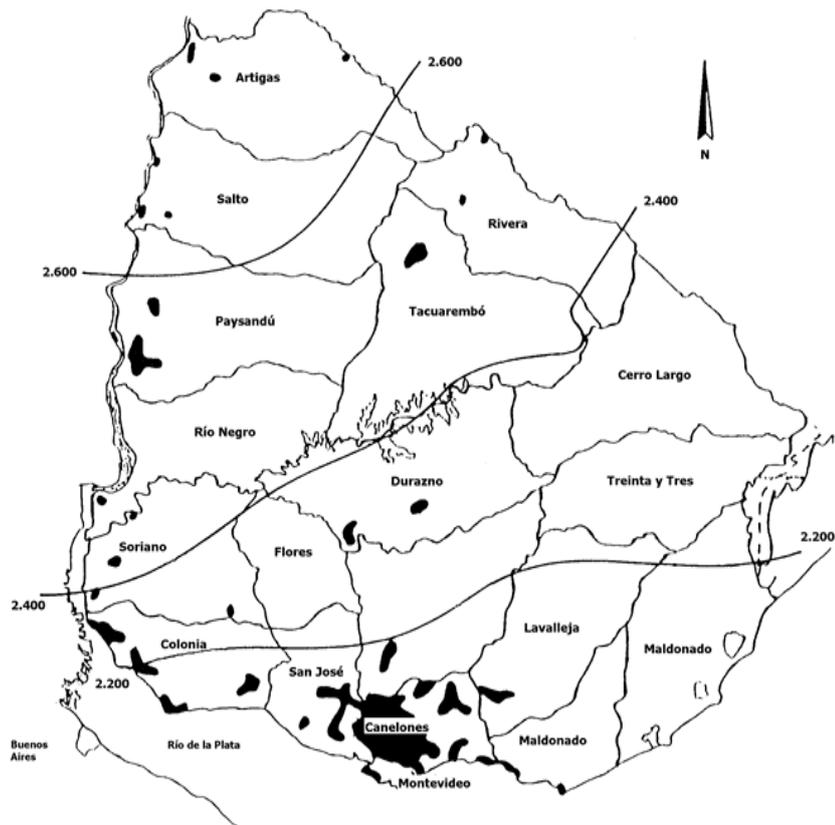
Inclusive la ocurrencia de lluvias antes de la cosecha es una causa común de daño de las bayas, y la severidad de la contaminación con *Aspergillus* es a menudo mayor en esta situación (Varga *et al.*, 2008). Nuestras condiciones climáticas similares a las de los países con clima mediterráneo que poseen alta incidencia de hongos ocratoxigénicos, es decir con veranos lluviosos, unido a suelos con alta retención hídrica y escaso drenaje, hacen suponer que Uruguay está en una zona de alto riesgo para la aparición de los mismos.

Por otra parte, análisis realizados sobre ensayos conducidos por INIA (Disegna y Coniberti, 2004–2006, datos no publicados) han revelado la aparición de *Aspergillus* spp. en uvas Tannat, cuya severidad de ataque se correlaciona a las condiciones climáticas y sobre todo al microclima al que están expuestos los racimos.

El clima manifiesta su influencia a través de varios elementos: insolación, temperatura, precipitación, etc.; sin embargo, esta influencia parece quedar mejor descrita con los denominados índices bioclimáticos que se obtienen a partir de datos climáticos, y ponen en evidencia aspectos particulares ligados a la fisiología de la vid. La estimación de estos recursos climáticos constituye, por lo tanto, el primer nivel de aproximación para definir la potencialidad de un ambiente o zona vitícola para el establecimiento de viñedos con producción de uvas de buena calidad.

Un repaso de las áreas vitivinícolas del mundo deducidas por esta aproximación, parece confirmar que existe una correlación entre clima y calidad. Sin embargo, experimentalmente existen problemas para contrastar esta hipótesis, debido a la dificultad de conseguir uniformidad y repetición. Puede ser porque en la comparación entre las diferentes áreas están involucrados aspectos geográficos y tipos de suelos distintos, y/o el papel que juegan las prácticas vitícolas y de manejo no se toman en cuenta (Fernández, 2006).

Por ejemplo, el índice térmico de Huglin se calcula con la integral del promedio entre las temperaturas máximas y media, deducidos 10 °C, entre los meses de setiembre y marzo para el hemisferio sur (período de maduración de la vid) (Hidalgo, 1992). En el caso de Uruguay el mapa resultante indica la existencia de tres zonas potencialmente diferentes para la producción de vinos de calidad (Mapa 3).



Mapa 3_ Mapa del Uruguay representando los límites de posibilidades de máxima calidad de acuerdo al Índice Térmico de Huglin con los viñedos implantados que aparecen como zonas en oscuro (Hidalgo, 1992).

Nuevamente, los predios analizados en este trabajo de tesis se encuentran en la misma zona vitivinícola en lo que refiere a las variables climáticas que se tienen en cuenta para el cálculo del Índice de Huglin.

5.2_ MÉTODO DE CULTIVO

Se entiende por *sistema de cultivo* la distribución de las plantas de vides en los predios y su disposición en el sistema de empalizada y alambrado empleado. Los viñedos se dividen en filas que pueden estar a diferentes distancias unas de otras dependiendo principalmente de la maquinaria a utilizarse en el laboreo del mismo. A su vez puede variar la distancia entre plantas en una misma fila y la altura de la planta. El marco de plantación circunscribe la distancia en metros entre plantas por la distancia en metro entre filas. En todos los casos la altura de la planta se establece durante la poda y es a partir del lugar donde los brotes crecen y del cual se posicionan los racimos. Suele denominarse también altura del plano de poda.

La disposición de las plantas según las estructuras de sostén utilizadas, se denomina *sistema de conducción*. Principalmente con estos sistemas se condiciona también la altura del tronco, además de la dirección de los brazos, los elementos de poda y la exposición del follaje a la luz solar. Los más utilizados son la Espaldera (Doble Guyot o VSP) y la Lira (Doble Espaldero en V con postes inclinados).

El sistema de conducción en espaldera ha mostrado mayor incidencia de contaminación por OTA, máxime si los racimos se encuentran cercanos al suelo (plano de poda bajo), la fuente principal de inóculo de *Aspergillus*. Por lo tanto, debe tomarse en cuenta el sistema de cultivo como un factor más que afecta la ocurrencia de OTA en las uvas (Visconti *et al.*, 2008).

Por otro lado, en cada predio se establecen *sistemas de manejo*, dependiendo de las prácticas mecánicas y/o manuales que se realizan tanto al suelo como a las vides. Se busca la mejora en la calidad de las uvas alterando las condiciones de la canopia (brotes, hojas y frutos) y el estatus general de las plantas. En este aspecto, sólo se ha reportado que el suelo y el rastrojo son las fuentes primarias de inóculo de esporas de *Aspergillus* (Leong *et al.*, 2006a), y que es recomendable dejar constante la composición del suelo y practicar el mínimo laboreo, en particular, en el período comprendido entre envero y cosecha (Meyvaci *et al.*, 2012; Somma *et al.*, 2012).

Según la bibliografía los factores culturales no tendrían efecto sobre el contenido de OTA en las bayas (Battilani *et al.*, 2002) como si afectan las variables organolépticas de las uvas (Disegna *et al.*, 2005). Vimos recomendable entonces, bajo estas circunstancias

evaluar la incidencia de contaminación fúngica, especialmente de *Aspergillus spp.* y *Botrytis cinerea* para comprobar una u otra tendencia.

Los hongos micotoxigénicos pueden establecerse bien bajo ciertas condiciones ambientales, sin embargo, su presencia no significa directamente la síntesis de OTA. De hecho, las condiciones en las que los hongos producen las micotoxinas son muy específicas e independientes de los requerimientos del desarrollo fúngico (Bellí *et al.*, 2002). No obstante, la ausencia visible de hongos no significa que no haya OTA (la micotoxina permanece por largo tiempo) y/o se pudo incurrir en una subestimación de la micoflora (Frisvad *et al.*, 2008).

Es incierto aún como la habilidad ocratoxigénica expresada en condiciones naturales a veces no se produce bajo condiciones de laboratorio. No se conoce si esto refleja una inhabilidad intrínseca de actividad de la ruta biosintética *in vitro* o un artefacto que se forma en los cultivos puros (Mantle, 2002; Medina *et al.*, 2005).

Los factores principales que influyen en el crecimiento y producción de toxinas de *Aspergillus* en uvas son temperatura, humedad y pH; interrelacionados bajo el concepto de microclima (Khalesi *et al.*, 2011; Šošo *et al.*, 2012). Además de estos factores ambientales, los factores biológicos y químicos juegan un rol también importante. Bajo ciertas circunstancias estos efectos son aditivos y bajo otras, algunas interacciones llevan a efectos combinados que se magnifican o restringen en comparación si se aplican individualmente (Bellí, 2006).

5.3_ MICROCLIMA

En condiciones experimentales, la temperatura y la humedad muestran un efecto significativo sobre el crecimiento y la producción de OTA en cepas de *Aspergillus* aisladas de uvas (Bellí *et al.*, 2004; Tassou *et al.*, 2007; Astoreca *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2010; Serratos *et al.*, 2010). Las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos pueden ser diferentes a las condiciones óptimas para la producción de OTA (Mitchell *et al.*, 2004). Frecuentemente, el factor humedad influye más que la temperatura en el crecimiento, pero la producción de OTA no se altera significativamente bajo distintos niveles de temperatura y humedad (Meletis *et al.*, 2007). Así fue reportado por Pardo *et al.* (2006) que encontraron un máximo de crecimiento de *A. ochraceus* en bayas a valores de humedad relativa altos. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C a baja humedad relativa, pero no hay diferencias significativas de crecimiento entre 20 °C y 30 °C cuando la humedad es muy alta.

Si solo se analiza el factor temperatura, los hongos son capaces de crecer bajo el amplio rango de temperaturas normalmente experimentado en los ambientes donde viven. Este amplio rango va desde 10 a 35 °C, con pocas especies capaces de vivir por encima o debajo. Generalmente, la temperatura óptima para la síntesis de micotoxinas está por debajo de la temperatura óptima de crecimiento. Además, el perfil de micotoxinas producidas en una misma especie también está relacionada con los niveles de temperatura donde se desarrollan (Esteban *et al.*, 2004).

Por consiguiente, la temperatura puede ser una de las maneras de prever la producción de micotoxinas en alimentos, sobre todo en aquellos que son sometidos a períodos de almacenamiento.

Los requerimientos de humedad de los hongos de los alimentos son relativamente bajos. Muchas especies crecen con a_w de 0.85 hasta 0.6 que es considerado como el límite para el crecimiento celular, sin embargo las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium* pueden sobrevivir a niveles más bajos por varios años (Carlile *et al.*, 1996). La producción de OTA por el Agregado *A. niger* puede darse en un amplio rango de a_w (0.90-0.99) en condiciones de laboratorio, lo que explicaría la contribución de estas especies a la contaminación de los sustratos donde crecen (Esteban *et al.*, 2006).

Según Bellí (2005) el control de la humedad es el mayor y más económico medio de controlar el ambiente para prevenir el crecimiento de hongos y la producción de toxinas,

pero al igual que en el caso de la temperatura en los viñedos el control no puede ser directo. Esto nos lleva de nuevo a la implementación de ciertas prácticas de manejo culturales de manera de modificar positivamente el microclima al que están expuestas las bayas de modo paliativo.

El pH o concentración de hidrogeniones en el medio de cultivo puede afectar el crecimiento del hongo de manera directa por su acción sobre las paredes celulares o indirectamente por su efecto en la disponibilidad de nutrientes. Pero el propio metabolismo fúngico altera el pH del sustrato durante su desarrollo (Vinck *et al.*, 2005) y en general, existe poca literatura acerca de los parámetros que se ven afectados con el pH. Todos los hongos crecen en un amplio rango de medios desde ácidos a básicos, las especies de *Aspergillus* son más tolerantes a pH alcalinos mientras que las especies de *Penicillium* parecen ser más tolerantes a pH ácidos (Wheeler *et al.*, 1991).

La luz a la que está expuesto el hongo durante su desarrollo puede influir positivamente o negativamente. Comúnmente se reduce la tasa de crecimiento con la exposición directa a la luz, medida como tasa de colonización de la superficie de agar. Hay veces que se debe a la destrucción fotoquímica del propio sustrato y otras a un efecto directo sobre el metabolismo fúngico (Schmidt-Heydt *et al.*, 2011). En condiciones de campo podría estimularse la producción de OTA de *A. carbonarius* a mayor exposición de acuerdo a lo reportados en estudios *in vitro* de la influencia del fotoperíodo en el crecimiento y desarrollo del mismo (Bellí *et al.*, 2006c; Oueslati *et al.*, 2010).

Los hongos como *Aspergillus* tienen también altos requerimientos de oxígeno y es por esto que suele crecer en la superficie del sustrato que coloniza. Pero no tiene por qué ser obtenido en su totalidad del ambiente, sino que pueden obtenerlo del sustrato. Es por esto que puede existir una subestimación de la micoflora, y por ende de la producción de la ocratoxina, en el caso de infecciones endógenas en las bayas (Pitt *et al.*, 2009).

5.4_ FACTORES BIOLÓGICOS

La microflora presente en los viñedos es un factor biológico que afecta tanto el crecimiento como la producción de OTA por *Aspergillus*. La presencia simultánea de diferentes microorganismos, ya sean bacterias u otros hongos y levaduras, no sólo limita el espacio para el crecimiento sino que implica la síntesis de diferentes compuestos que crean un microambiente característico (Dalié *et al.*, 2010; Magan *et al.*, 2010). Sin embargo, especies de *Aspergillus* perteneciente a la sección *Nigri* han sido reportadas como el género dominante entre los microorganismos presentes en las uvas, como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Candida* y algunas especies de *Penicillium* (Valero *et al.*, 2007). En Uruguay, poco se sabe de su interacción con *Botrytis*, por ejemplo, el mayor problema sanitario de las uvas. También se desconoce el efecto de la aplicación de otros microorganismos antagonistas utilizados como control biológico en los viñedos y de la enfermedad denominada “podredumbre ácida” que se define sólo como la resultante de la acción de un grupo de hongos, levaduras y bacterias.

Si se toma en cuenta un mismo viñedo, se ha notado que bayas dañadas son tres veces más susceptible a infecciones fúngicas que bayas intactas, y es mayor si ya se había detectado una incidencia de la enfermedad relevante (Battilani *et al.*, 2004a). Este daño va desde microfisuras producidas por exceso de agua y/o debilitamiento de las cáscaras en las bayas a daños físicos severos por granizo, insectos u animales, pájaros principalmente. Estos vectores son capaces de introducir las esporas de estos hongos en las bayas por las lesiones que ellos mismos producen. En los cultivos agrícolas los insectos especialmente contribuyen de diferentes maneras a la infección: transportando el inóculo inicial, dispersándolo en el cultivo, diseminando las esporas en el propio alimento y/o facilitando la colonización por los daños causados (Payne, 1998). Entonces, el ataque de insectos predispone el ataque de hongos y la resultante producción de micotoxinas en diferentes niveles según el período en que se desarrolle (Cozzi *et al.*, 2006; 2009). En los viñedos Tannat uruguayos consideramos que previo a cosecha, dentro de este grupo de factores tiene relevante importancia la presencia de “Chanchito Blanco” (*Planococcus ficus*, insecto que se disemina por las hormigas) según la bibliografía (Chiotta *et al.*, 2010); y de lagartas en hojas y racimos (*Argyrotaenia sphaleropa*, *Bonagota cranaodes*, *Eulia salubricola* y *Cryptoblabes gnidiella*). La presencia de pájaros se da en uvas ya maduras, acortando la

ventana de acción, se cuenta con métodos de control y es más fácil el reconocimiento y descarte de los racimos afectados por ellos, por lo que no lo consideramos un factor preocupante.

El agua y el viento son otros vectores que favorecen la diseminación de las esporas a través del cultivo. Los niveles de conidios en el aire y/o esporas en el suelo varían según las condiciones climáticas año tras año. Pero pueden variar además en cada por la adición de ciertos agrotóxicos, aplicación de abonos o fertilizantes, cultivos próximos contaminados, etc.

La fuente principal de inóculo es el suelo, bajo la forma de micelio, conidios o esclerocios (dependiendo del hongo) y desde allí se afecta al cultivo por medio del viento y/o salpicado (Horn, 2003). En un estudio sobre aflatoxinas, los niveles de conidios en el aire eran mayores en campos irrigados que en aquellos no irrigados (Jones *et al.*, 1981). Se han encontrado mayores poblaciones fúngicas en el suelo durante los meses de verano, y los hongos micotoxigénicos se encuentran frecuentemente en los residuos del cultivo u alrededores en descomposición (Bellí, 2006).

5.5_ FACTORES QUÍMICOS

También algunos factores químicos influyen en el metabolismo de los hongos. Como organismos heteromorfos, requieren compuestos orgánicos tanto para la síntesis de biomasa como para producir la energía necesaria para llevar a cabo esas reacciones del metabolismo primario (Smith *et al.*, 1985). La disponibilidad y tipo de nutrientes, especialmente las fuentes de carbono y nitrógeno, pueden afectar tanto la producción de micotoxinas como la diferenciación morfológica (Medina *et al.*, 2008). Otros nutrientes como las sales azufre, fósforo, magnesio y potasio y elementos traza como hierro cobre, zinc y manganeso se requieren para rutas más específicas, como por ejemplo, como cofactores de enzimas que pueden actuar en el metabolismo secundario. Igualmente, en el caso de hongos filamentosos como *Aspergillus* su crecimiento se ve influenciado más por la consistencia del sustrato que por su composición (Varga *et al.*, 2008). Para acceder al oxígeno lo mejor es un sustrato sólido, donde los hongos toleran mejor diversos niveles de agua y humedad.

También existen compuestos denominados agentes antifúngicos, que inciden en el crecimiento y el metabolismo de los hongos. Pueden producirse naturalmente en las fermentaciones microbianas o ser fungicidas sintéticos que se aplican en los viñedos para el control y/o prevención de enfermedades en las plantas. La correcta utilización de los fungicidas debe disminuir la micoflora y llevar a la disminución en la cantidad de micotoxinas producidas (Favilla *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2009; Techarat *et al.*, 2012). Pero es posible que el pesticida disminuya la síntesis de micotoxinas sin afectar el crecimiento del hongo (Bellí *et al.*, 2006b; 2007) y peor aún, aumente la producción de OTA (Medina *et al.*, 2007b). Ello hace necesario, cada vez más, realizar estudios sobre uvas con grados de infestación variables al aplicarle diferentes manejos fitosanitarios, controlando la producción de micotoxinas (Abrunhosa *et al.*, 2007). Si se han realizado estudios sobre la influencia de distintos fungicidas (Lo Curto *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2006b; Serey *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2007) que apuntan al control de la contaminación por *Botrytis* y *Aspergillus* en conjunto para evitar la ocurrencia de ambos y obtener así uvas de calidad. Últimamente se han incluido tratamientos orgánicos o de control biológico (compuestos principalmente por mezclas de hongos y/o levaduras) pero su eficacia e interacción se siguen experimentando (Tripathi *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2007a; De Felice *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2011; De Curtis *et al.*, 2012). El número de aplicaciones

y los químicos activos utilizados, no tendrían una clara relación con el contenido de OTA en las bayas (Bellí *et al.*, 2002).

5.6_ OTROS FACTORES

Por último, no todas las razas o especies del género *Aspergillus* son capaces de producir micotoxinas y los niveles de producción son muy variables. No hay que olvidar que la producción de micotoxinas además de verse influenciada por el ambiente fisicoquímico donde crece el hongo, depende del genotipo de organismo (García *et al.*, 2011). Y este es uno de los determinantes estudiados en esta tesis. La producción de una micotoxina en particular, depende de la cepa y no sólo de la especie. Sin embargo, la biosíntesis de OTA por las especies ocratoxigénicas de *Aspergillus* está determinada por las condiciones medioambientales más que por la habilidad innata de cada cepa de producir OTA; ya que se ha reportado que algunos aislamientos sintetizan OTA esporádicamente o no lo hacen durante el cultivo en laboratorio (Varga *et al.*, 1996). Si un aislamiento no produce OTA bajo condiciones de laboratorio, no justifica ninguna conclusión general sobre su potencial producción en el viñedo. Por el pronto, la producción de OTA por *Aspergillus* es inestable y variable dentro del género si se lo compara con *Penicillium* (Mühlencoert *et al.*, 2004).

Metodología de estudio de la influencia del ecosistema

Los datos meteorológicos fueron recabados en la Estación Experimental de INIA “Wilson Ferreira Aldunate” de acuerdo al registro diario de las variables: temperatura máxima, humedad relativa y precipitaciones diarias. También fueron obtenidos los registros de cada uno de los predios, tomados por los encargados de campo y/o productores para la correcta sistematización de los datos. Cada predio se georreferenció para conocer exactamente sus coordenadas y construir un mapa con sus ubicaciones.

Un acercamiento general a las variables ambientales se realizó en cada predio o parcela. Sensores de humedad y temperatura (iButton® Hygrochron, DS1923) fueron colocados en el mismo nivel de plantas marcadas en las parcelas evaluadas y los datos fueron recabados para el posterior análisis. Se buscaron los valores medios, mínimo y máximo; se calculó el índice de horas con temperaturas mayores a 25 °C, la sumatoria de las temperaturas medias en períodos de 30, 60 y 90 días previos a cosecha (-30, -60 y -90 días, respectivamente) y los grados días (Temperatura basal 10 °C).

En esta tesis la totalidad de los predios externos a la Estación Experimental evaluados son conducidos en Espaldera, variando el plano de poda y el marco de plantación como se observa en la Tabla anexo 1. Los viñedos de Tannat de más de 10 años de edad, están injertados sobre portainjerto SO₄, conducidos en espaldera (VSP) y en filas orientadas norte-sur, en la mayoría de los casos. Fueron seleccionados durante el año 2006-2007 sobre la base de tipo de suelo, vigor, uniformidad y cumplimiento de los estándares analizados anteriormente. Durante la estación de crecimiento, los brotes se mantuvieron en posición vertical. Cada temporada la “carga de fruta” se ajustó mediante raleo de racimos manteniendo aproximadamente un racimo por brote, de acuerdo al manejo aplicado por los productores. Igualmente se realizaron tareas de deschuponado (eliminación de brotes estériles, así como de brotes que no se encuentren en yemas “verdaderas”) y “rognage” (corte de los ápices de los brotes, principalmente que exceden por su longitud la altura del último alambre o sobresalen de los alambres laterales) para controlar el crecimiento vegetativo de las vides.

Para la cosecha 2011 se evaluaron diferentes sistemas de cultivo de acuerdo a la densidad de plantación y su incidencia sobre la presencia de hongos ocratoxigénicos. Se evaluó el viñedo experimental DP, de Tannat sobre SO₄ con 7 años de edad al inicio del

experimento, conducido en espaldera alta (VSP) en filas orientadas norte-sur. Las plantas fueron podadas a 12-14 yemas por metro lineal y las 8 combinaciones posibles de distribución espacial de las plantas se detalla en la cuadro 3. Para evitar el efecto de sobreproducción y conseguir índices de madurez comparables, se ajustó la relación área foliar/carga de las parcelas individuales a más de 1.8 m²/Kg mediante raleo.

	1	2	3	4	5	6	7	8
AL	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
EF	3,3	3,3	3,3	3,3	2,5	2,5	2,5	2,5
EP	1,5	0,8	1,5	0,8	1,5	0,8	1,5	0,8

Cuadro 3_ Combinaciones de distribución espacial de las plantas evaluadas en el ensayo experimental D5 según la altura del plano de poda (AL), la distancia entrefilas (EF) y la distancia entreplantas (EP).

En la misma cosecha se compararon además los diferentes sistemas de conducción en el viñedo experimental A2, de Tannat injertado sobre SO₄, de 12 años de edad al inicio del experimento, plantado en filas orientadas norte-sur y distanciadas a 1,0 metros entre plantas. En las plantas conducidas en espaldera, se ajustó el número de yemas durante la poda invernal a 6-7 pitones de dos yemas por planta. La altura del cordón unilateral es de 0,9 m, y el último alambre de conducción está situado a 1,9 m por encima del suelo. El marco de plantación es de 1,0 x 2,8 m. En las plantas conducidas en lira, se ajustó el número de yemas durante la poda invernal a 12-14 pitones de dos yemas por planta. La altura del cordón bilateral es de 0,9 m, y el último alambre de conducción está situado a 1,0 m de distancia del cordón. La distancia entre los dos cordones paralelos de la misma planta es 0,8 m, mientras que la distancia entre el último alambre de ambas caras de la lira es de 1,2 m. El marco de plantación es de 1,0 x 3,5 m para la lira. Ambos sistemas de conducción se disponen en cuatro bloques dispuestos de forma aleatoria en suelos de diferentes tipologías.

En muestras de suelos de todos los predios fueron analizadas variables descriptivas como textura, estructura, densidad, pH, carbono orgánico, iones, acidez y porcentaje de saturación. En los viñedos se determinaron variables tales como: densidad de plantación, producción de uva por planta, área foliar, índice de compactidad de la canopia (Área foliar expuesta/Área foliar total), peso de poda, largo y peso promedio de los brotes. El rendimiento total y el número de racimos por planta, se determinó para cada parcela. El

peso promedio de racimos se calculó a partir de estos datos. El número de racimos afectados por factores biológicos se registró y su incidencia y severidad se estimó. También se estudiaron datos de la canopia: PAR (Photosynthetically Active Radiation) y los porcentajes de N, P, K, Ca y Mg. Las mediciones de PAR se realizaron con un ceptómetro (AccuPAR L80; Dispositivos Decagon, Pullman, WA) \pm 2 horas de mediodía solar en días despejados. La radiación incidente se midió colocando el ceptómetro orientado hacia arriba, a la altura del cordón fuera de la canopia (ambiente). El porcentaje de la radiación recibida por los racimos %PFD (% Photon Flux Density), se estimó como el promedio de tres lecturas tomadas en la zona de los racimos, donde el ceptómetro se dispuso paralelo y a 15 cm por encima del cordón: uno con la cara del sensor de ángulo de 45 ° hacia el este, un segundo en posición vertical, y el tercero en ángulo de 45 ° hacia el oeste. Las lecturas se tomaron por repetición (Meyers *et al.*, 2008). Los análisis de elementos minerales en hojas y pecíolos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Tejidos de INIA Las Brujas por métodos estándares.

A partir de las tablas producto del relevamiento de cada viñedo se extrajeron los datos de las aplicaciones sanitarias realizadas, contando con fechas y número de aplicaciones, y los productos utilizados. Estos últimos fueron clasificados luego según el principio activo y el rango de acción (FRAC, 2011).

Para conocer el manejo cultural, las actividades de raleo, deshojado y/o rognage reportadas en cada caso, se constataron y analizaron en cada predio periódicamente.

Los porcentajes de infección por la microflora existente en las muestras, de las diferentes especies de *Aspergillus*, la ocurrencia de aislamientos productores de OTA con cualquiera de los factores que los afectaría, fueron analizados por el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008). La significancia de las correlaciones se evaluaron usando el coeficiente de Pearson ($p < 0.05$). Se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP) para el estudio conjunto de variables ligadas y Análisis de la Varianza de acuerdo a la metodología de Tukey.



CAPÍTULO 6

PRESENCIA DE OTA EN LA VINIFICACIÓN

Particularmente, la presencia de OTA en vinos de diferentes tipos, orígenes y designaciones ha sido reportado alrededor del mundo desde la década de los 90' (Zimmerli *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1999; Festas *et al.*, 2000; Filali *et al.*, 2001; Da Rocha *et al.*, 2002; Lopez de Cerain *et al.*, 2002; Shephard *et al.*, 2003; Soufleros *et al.*, 2003; Stefanaki *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2004; Brera *et al.*, 2005).

Algunos de estos estudios puntualizan que las concentraciones mayores de OTA se encuentran en vinos dulces respecto a otros con niveles menores de azúcar, y frecuentemente son más altas en promedio en vinos tintos (Zimmerli *et al.*, 1996; Stefanaki *et al.*, 2003; Burdaspal *et al.*, 2007).

En todas estas investigaciones se ha evaluado la importancia de la OTA en los vinos, pero se puede apreciar que si bien esta toxina está presente en todo tipo de vino generalmente se encuentra con mayor frecuencia y en altas concentraciones en vinos tintos (Zimmerli *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1999; Filali *et al.*, 2001), lo que concuerda con la frecuencia de aparición de los hongos en los viñedos de variedades tintas (Battilani *et al.*, 2004b). Sin embargo Stefanaki *et al.* (2003) demostraron que la concentración de OTA en vinos tintos secos no era significativamente diferente a la encontrada en vinos blancos y rosados.

6.1 PROCESO DE VINIFICACIÓN

Los altos niveles de OTA en los vinos tintos sobre los blancos es interpretado también como una consecuencia directa de las diferencias existentes en el procesamiento de ambos tipos de vinos (Abrunhosa *et al.*, 2005). Mientras que las uvas blancas se estrujan y prensan rápidamente una vez que son cosechadas, las uvas tintas son molidas y, las cáscaras y el jugo pueden estar en contacto varios días (frecuentemente más de 10).

En análisis realizados en toda Europa en 1996 se encontraron niveles de hasta 10 µg/L de OTA en algunos vinos. Si bien la fuerte presencia de hongos ocratoxigénicos se da en uvas del sur de Europa, no hay correlación directa entre los niveles de OTA encontrados en los vinos de esa región (Abrunhosa *et al.*, 2005). Por lo tanto, no necesariamente una alta presencia de hongos productores de OTA en los viñedos, cause presencia de la micotoxina en los vinos. Conclusión

Se concluye entonces que en los métodos de vinificación hay factores críticos de control que se deben revisar para evitar la potencial presencia de OTA en los vinos sea cual fuere el estado inicial de las uvas.

Se desconoce aún el efecto de los diferentes métodos de vinificación en la ocurrencia de la OTA en el vino. Si se comparan los dos tipos de vinificación de uvas tintas para dar vinos rosados o tintos se ha observado que después de un día de fermentación alcohólica, disminuye el contenido de OTA en el primer tipo y aumenta respecto al contenido inicial del mosto, en la maceración de tintos (Lasram *et al.*, 2008). Se establece también que la mayor cantidad de OTA presente en las bayas queda retenida en el orujo prensado (Solfrizzo *et al.*, 2010), y que los altos niveles de esta en los vinos tintos se relacionan también directamente con el mayor tiempo de maceración durante este tipo de vinificación (Gambutì *et al.*, 2005). Entonces en el transcurso de la fermentación de vinos tintos los niveles de OTA aumentarían hasta la ocurrencia de la fermentación maloláctica (Abrunhosa *et al.*, 2005; Ponsone *et al.*, 2009). En ese momento el nivel de OTA disminuye, probablemente como consecuencia de su adsorción en la superficie de las levaduras o por su interacción con los metabolitos producidos por las levaduras (Bejaoui *et*

al., 2006b; Cecchini *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007). En conclusión, durante el proceso de fermentación con maceración se darían dos efectos competitivos. Al principio, el incremento de la concentración de alcohol en los mostos parcialmente fermentados incrementa la extracción de OTA de la cáscara y la pulpa en la fase líquida. Sin embargo, en las etapas finales el incremento en la biomasa de las levaduras que puede unirse a la OTA, reduciría el contenido de esta en el vino (Lasram *et al.*, 2008). Esta conclusión la confirman los mismos autores por el análisis de OTA en los diferentes partes de las bayas, que demostró que la cáscara contiene aproximadamente el 66% de la OTA de las uvas. La adsorción de OTA probablemente se lleve a cabo en las paredes celulares de las levaduras, por medio de manoproteínas y β -glucanos, no obstante las levaduras absorberían la OTA diferencialmente dependiendo si es un mosto blanco o tinto (Cecchini *et al.*, 2006).

Estos estudios demuestran además que la disminución de la OTA durante la fermentación alcohólica y maloláctica, es resultado de un mecanismo de adsorción y no de degradación de la toxina (Bejaoui *et al.*, 2006b; Cecchini *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007; Meca *et al.*, 2010).

Un prensado intensivo del orujo luego de la fermentación incrementa la concentración de OTA en vinos tintos, aproximadamente en cuatro veces más respecto a vinos obtenidos por métodos tradicionales con filtrado y leve prensado o sin él (Abrunhosa *et al.*, 2005).

Análisis de vinos caseros revelan que la sanidad de la bodega es un factor clave en la contaminación de OTA en los mismos. Vinos de bodegas altamente contaminadas muestran altas concentraciones de OTA (Gambutí *et al.*, 2005). Estos resultados enfatizan la importancia de los procesos de sanitización durante la producción del vino.

Como se mencionara en el Capítulo 1, lo mejor es evitar el riesgo de contaminación de los vinos, pero igualmente existen métodos para reducirlo durante el proceso de vinificación.

Para reducir la OTA en vinos, es importante entonces evitar la maceración del mosto con las cáscaras en el caso de que sea alto el riesgo de OTA en las uvas cosechadas. De modo gradual se puede variar el tiempo de maceración y adaptar el prensado dependiendo del estatus sanitario de las uvas. En el caso de altas tasas de contaminación pueden utilizarse prensados a bajas presiones y rápidos, y se debe evitar el uso de enzimas pectolíticas durante la maceración o el trasiego. Son preferibles clarificaciones rápidas por filtración de los mostos, centrifugación o flotación (Corzani, 2008).

Se sabe también que el lavado de la uva pueden disminuir el contenido de OTA en el vino obtenido (Delage *et al.*, 2003; Ratola *et al.*, 2005).

Muchos otros métodos físicos, químicos y biológicos para remover micotoxinas de los alimentos se han propuesto, pero pocos tienen aplicación práctica. La mejor solución para este propósito sería considerar la detoxificación por biodegradación, la única posibilidad de remover las micotoxinas sin usar productos nocivos y sin pérdidas significativas en el valor nutritivo o el sabor de los alimentos. En los vinos los métodos más estudiados utilizan adyuvantes químicos (Castellari *et al.*, 2001; Gambuti *et al.*, 2005; Savino *et al.*, 2007; Olivares-Marín *et al.*, 2009; Quintela *et al.*, 2012; 2013). Sin embargo, estos estudios muestran bajo efecto de estos adyuvantes en la remoción de la OTA, a las dosis comúnmente utilizados para la clarificación de los vinos. El carbono activado es el que muestra ser más efectivo pero a dosis relativamente altas que causan daños severos en la calidad organoléptica de los vinos. Es que el uso de agentes clarificantes en el caso de vinos tintos de carácter, como Tannat, no tiene más que efectos negativos. Por ejemplo, disminuyen el contenido de antocianos, alterando el color y hasta algunas características organolépticas y aromáticas peculiares y particulares de este tipo de vino (Maury *et al.*, 2003). Métodos microbianos o enzimáticos pueden ser en un futuro utilizados como una solución tecnológica atractiva, pero su aplicabilidad y evaluación experimental aún es evaluada (Abrunhosa *et al.*, 2005; Cecchini *et al.*, 2006; Grazioli *et al.*, 2006; Ponsone *et al.*, 2009; Meca *et al.*, 2010).

Por último, la microfiltración a 0,45 μm es otro tratamiento recomendado para la descontaminación de vinos por OTA (Gambuti *et al.*, 2005).

Metodología para el estudio del proceso de vinificación

En Uruguay existen antecedentes de grupos que han analizado la presencia de esta micotoxina para casos particulares, pero al año 2013 solo ha sido reportada en el proyecto PDT SC_OP_66_03 (2007-2009), del que este trabajo forma parte. Como los niveles obtenidos no exceden los permitidos, no realizamos investigaciones exhaustivas del proceso de vinificación aunque se determinaron los niveles de OTA presentes en los intermediarios del proceso de elaboración para constatar los efectos de cada uno de los procedimientos aplicados.

Los experimentos de vinificación se llevaron a cabo en la tercera cosecha, empleando los procedimientos tecnológicos que son comunes en la producción de vinos Tannat en el Uruguay. Los ensayos comenzaron con la molienda de muestras obtenidas en cada uno de los viñedos como se detallara en el Capítulo 4, después de ser almacenadas a 5 °C por un período de entre 24 a 48 h. La totalidad de la muestra, aproximadamente 15 Kg, se pasó a través de una moledora que aparta los raquis de los racimos y produce a partir de las bayas, una mezcla denominada mosto. Este está compuesto de líquido o jugo y una fase sólida u orujo (cáscaras y semillas). El mosto se colocó en un recipiente apto para llevar a cabo la fermentación y se tomaron muestras para análisis químicos inmediatos a la molienda y posteriores de niveles de OTA (Muestra M). Se le añadieron 40 mg/Kg de anhídrido sulfuroso y posteriormente se inocularon con 25 g/hl de una levadura comercial seleccionada – *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa VR5, OENOBRANDS, France) y se mantuvo un ambiente climatizado entre 26 °C y 30 °C para favorecer la fermentación. Después de 10 días de maceración se procedió al prensado y toma de muestras. Para esto, se colaron los macerados con un embudo con filtro de 1mm. La fase líquida se colocó en damajuanas de vidrio de 10 L y el remanente se colocó en una prensa manual donde se separan nuevamente una fase líquida y una fase sólida del mosto. Se tomaron dos muestras del jugo obtenido del prensado, uno correspondiente a la fase inicial (Muestra J1) y otro a la final (Muestra J2), donde es necesaria la aplicación máxima de fuerza para la extracción. También se obtuvo una muestra representativa de la fase sólida u orujo (Muestra O) remanente en la prensa. El resto fue descartado. El jugo del prensado se agregó en las correspondientes damajuanas, que se taparon para mantener el medio anaerobio. A partir del quinto día se corroboró la evolución de la fermentación maloláctica. Una vez finalizada se realizó el agregado de metabisulfito para ajustar el SO₂ libre a 30 ppm. Por último se trasegaron los vinos, y este método natural fue el único proceso de clarificación que se utilizó. Se separa así el vino de los pequeños restos o “borra” que precipitan por su peso al fondo del recipiente. Los vinos obtenidos en botellas de menor capacidad se almacenaron a temperatura de 4 °C para dar tiempo de estabilización en frío de los mismos. Su degustación se llevó a cabo 7-10 meses después.

Análisis de vinos

Los análisis químicos de los mostos (SS, TA, pH, y ácidos orgánicos) se detallan en el capítulo 4.

La evolución de la fermentación maloláctica se siguió por TLC (Boido *et al.*, 1999).

Muestras de 125 ml de los vinos elaborados se extrajeron para su análisis previo a la degustación y una botella de cada vino se conservó para el posterior análisis. El porcentaje de alcohol o grado alcohólico (GA), la acidez titulable (AC) y el pH fueron medidos por métodos estándares (OIV, 2011). Antocianos (ANT) e índice de polifenoles totales (IPT) se determinaron por absorbancia a 520 nm y 280 nm, respectivamente (Glories, 1984).

Para la degustación contamos con un panel sensorial de 10 especialistas, con entrenamiento para reconocer un grupo de descriptores definidos para el trabajo. Las muestras de vino se evaluaron en duplicado por cada uno de los integrantes del panel con un diseño de bloques completo balanceado. Los vinos se presentaron en cabinas individuales, en copas normalizadas de aprox. 200 ml identificadas con números aleatorios de 2 dígitos, con 60 ml de muestra a 20 ± 1 °C.

6.2_ OTA EN VINOS Y SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN.

Las etapas en el proceso de detección de las micotoxinas son generalmente: muestreo, extracción, limpieza, purificación/concentración, detección y confirmación de resultados (Festas *et al.*, 2000; Miraglia *et al.*, 2000).

Las micotoxinas están distribuidas de forma particular en cada producto natural. Habitualmente, se encuentran en altas concentraciones en los sitios donde el hongo toxigénico invadió al sustrato. Cuando se analizan grandes cantidades o parcelas en productos agrícolas como las uvas o los vinos, se debe tener cuidado de lograr que las muestras finales a analizar sean representativas del total, viñedo o bodega, respectivamente.

La extracción es el paso más problemático y en el que se pueden dar pérdidas o errores en el extracto que dificultan la cuantificación, debido a que la ocurrencia natural de las micotoxinas es a concentraciones extremadamente bajas. Por esto, la realización de enriquecimientos de la matriz con el analito de interés, está aceptado como un requerimiento en el proceso de validación del método cuantitativo (Skarkova *et al.*, 2013), como veremos más adelante.

Aunque muchos de los compuestos que interfieren en la detección son parcialmente removidos durante la secuencia de extracción, normalmente se realiza un paso de limpieza de la matriz. Los sistemas que comúnmente se utilizan para la limpieza involucran el particionado con solvente y/o columnas cromatográficas con distintos adsorbentes. La partición líquido-líquido comúnmente utiliza bicarbonato de sodio y las columnas de extracción son de fase sólida o SPE de sus siglas en inglés (Valenta, 1998), pero a veces el efecto de limpieza no es aplicable por la complejidad de las matrices. Las columnas de SPE de gel de sílice fueron las primeras en utilizarse y obtuvieron resultados satisfactorios en términos de recuperación y sensibilidad (Ospital *et al.*, 1998). No obstante, muchas tecnologías para la separación de analitos en matrices complejas se están desarrollando, por ejemplo, un método de SPE de “huella molecular” (Maier *et al.*, 2004), biosensores (Bazin *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2013) y electroforesis capilar con detección de fluorescencia con automatismos (Chen *et al.*, 2014). Todos sirven para el análisis de

micotoxinas como la OTA, pero no están suficientemente evaluados hasta el momento. Se buscan ventajas principalmente en comparación a las columnas de inmunoafinidad o IACs (de las siglas en inglés). Los anticuerpos monoclonales o policlonales de la fase sólida de estos cartuchos se unen específicamente al analito de interés. Fueron desarrolladas como sustitutos del tradicional método de extracción con solventes (Sharman *et al.*, 1992) y permiten un proceso de limpieza aún más específico (Scott *et al.*, 1997). Una vez que la OTA se une al anticuerpo las interferencias de la matriz pueden removerse completamente. Además, las IACs dan una performance óptima en términos de precisión y exactitud dentro de un amplio rango de concentraciones y también reducen el uso de solventes nocivos (Visconti *et al.*, 1999).

Hoy en día diferentes tipos de columnas de inmunoafinidad están disponibles para el análisis de OTA específicamente: OchraTest (Vicom, USA), Ochraprep (Rhone-Diagnostic Technologies, UK), RIDA Ochratoxin (R-Biopharm, Germany) y OchraStarTM Immunoaffinity Columns (Romer Labs Diagnostic GmbH, Austria). Se han comparado procedimientos de limpieza en vinos con IACs directos o con extracciones previas con solventes y todos producen resultados comparables de límite de detección y cuantificación para OTA (Castellari *et al.*, 2000). El tiempo de análisis se reduce si se compara con el procedimiento inicial en el que la OTA se extrae con cloroformo. Si se compara la performance de las columnas de IA y SPE, las primeras brindan porcentajes de recuperación mayores respecto a las de SPE C18 o columnas de polímero entrelazado (Siantar *et al.*, 2003). La desventaja de las de inmunoafinidad es que no se pueden reutilizar según las recomendaciones de los fabricantes.

Luego se ha desarrollado un método de extracción basado en la utilización de polietilenglicol que es relativamente simple, rápido y no requiere de solventes orgánicos (Sáez *et al.*, 2004), mientras que González-Peñas *et al.* (2004) llevaron a cabo el método a escala de microextracción que sugiere ser una alternativa más económica que el uso de IACs.

Para la separación analítica de las micotoxinas comúnmente se utilizan métodos como TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) (Krska *et al.*, 2008). En la mayoría de los trabajos, las técnicas de detección han estado acopladas a las

técnicas de inmutofafnidad para simplificar la extracción y mejorar la recuperación de la micotoxina, una medida especialmente útil en muestras de alimentos (Magan *et al.*, 2004). La detección y cuantificación de OTA puede llevarse a cabo por HPLC en fase reversa convencional o ELISA, obteniendo diferentes resultados y límites de detección dependiendo de la complejidad de la muestra. Las separaciones cromatográficas se realizaron inicialmente usando columnas de fase reversa RP-C18 y eluciones isocráticas con diluciones de acetonitrilo acidificado (Valenta, 1998), mientras que la detección era por fluorescencia (Ospital *et al.*, 1998). Después, se desarrolló un método de HPLC automatizado para la determinación de OTA en vinos (Brera *et al.*, 2003), mientras que Dall'Asta *et al.* (2004) llevaron a cabo una técnica simplificada de HPLC-RP que puede ser aplicada directamente en muestras de vinos sin lavados ni extracción previos. Si se comparan los diferentes métodos analíticos de determinación de OTA en vinos, la extracción con SPE combinada con HPLC con espectrometría de masa en tándem (HPLC-MS-MS) en la detección y el lavado con IACs combinado con HPLC con detección de fluorescencia ofrecen buenos resultados (Leitner *et al.*, 2002). El análisis del isotopo estable obtenido de la OTA por HPLC-MS-MS, no es una técnica económica pero da una precisión excelente (Shephard *et al.*, 2003). También se ha probado la eficiencia del método de cuantificación de OTA en vinos utilizando un detector de arreglo de diodos, midiendo la absorbancia de la muestra separada por HPLC a 333 nm (Soleas *et al.*, 2001). Las técnicas comercialmente disponibles permiten también realizar ensayos de ELISA, y su disposición en kits permite analizar en tándem el contenido de micotoxinas en general o particular. En este caso, se ha reportado que análisis de ELISA en muestras de vino de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes dan como resultado concentraciones sorprendentemente altas de OTA (Flajs *et al.*, 2009). Tiempo atrás se habían mencionado problemas en el análisis de OTA en vinos tintos, principalmente atribuidos a la presencia de muchas antocianinas y otros pigmentos que interfieren en la unión de la OTA con el anticuerpo, dando resultados falsos positivos (Visconti *et al.*, 1999). Y finalmente cuando se realiza una extracción previa con IAC, la concentración de OTA en las mismas muestras se reduce en un 90% aproximadamente; debido a que con el proceso previo de limpieza se eliminan las sustancias interferentes, aunque se incrementa sustancialmente el costo del análisis (Flajs *et al.*, 2009). La combinación de IACs y la detección por ELISA son efectivas y cumplen con la medición del nivel máximo permitido de 2 µg/L establecido por la Unión Europea. En un estudio inter-laboratorios, el método de ELISA fue usado satisfactoriamente para determinar el contenido de OTA en vinos encontrando cantidades

comparables a los obtenidos con el uso de HPLC (Da Rocha *et al.*, 2002). Actualmente, el método recomendado para la determinación de OTA en vinos y cervezas usa IACs para la limpieza de la muestra después de diluirlas con una solución acuosa de polietilenglicol y NaHCO₃ y los extractos son analizados por HPLC con detección por fluorescencia (Visconti *et al.*, 1999; OIV, 2011). Pero de todos modos se siguen mejorando las técnicas cromatográficas y los métodos inmunoquímicos para realizar rápidos escaneos de la presencia de OTA en productos alimenticios (Barthelmebs *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

Metodología para la determinación de OTA en vinos y subproductos de vinificación

En esta tesis la medición de los niveles de OTA en los vinos elaborados por los productores en la primer y segunda cosechas se realizó siguiendo el protocolo establecido por OIV para ocratoxina A denominado OENO 16/2001, de acuerdo a la normativa correspondiente -MAE-AS315-10-OCHRAT- (OIV, 2011). En los vinos de la tercer cosecha elaborados en las microvinificaciones llevadas a cabo en la Estación Experimental, así como en los productos intermedios, se determinó el contenido de OTA por un método basado en columnas SPE C18 (método SPE). El mismo fue evaluado y estandarizado en ocasión de un intercambio académico con Food Research Laboratory - University of Cornell, New York, USA. En este caso, la consigna fue adaptar la técnica al instrumental, presupuesto y personal disponible a tales efectos, para lograr la máxima precisión al menor costo posible. El factor tiempo de análisis también es importante dado la cantidad de muestras a ser evaluadas en este estudio, que incluye una amplia prospección nacional de la presencia de OTA en los subproductos y vinos. Abarca un gran número de muestras y repeticiones estadísticamente previstas, para poder rendir datos fidedignos de la situación dada su importancia no solo a nivel sanitario principalmente sino económico también.

Específicamente, la técnica para la determinación de OTA en vinos utilizando columnas de inmunoafinidad consistió en la dilución (1:1) de los vinos en una solución de 1% PEG y 5% NaHCO₃. Una vez mezcladas las soluciones se filtraron en filtro Whatman GF/A y se procedió a la purificación utilizando una columna de inmunoafinidad (OchraStarTM, Romer Labs.® Diagnostic GmbH, Tulln Austria) adosada a un sistema de vacío. Una vez agregada la solución filtrada (10 ml), se lavó con 5 ml de una solución 2,5% de NaCl y 0,5% NaHCO₃ y 5 ml de H₂O a una velocidad de 1 gota por segundo. La OTA se eluyó con 2 ml de metanol. El eluido se secó a 50 °C bajo corriente de nitrógeno y

se resuspendió inmediatamente en 250 µl de fase móvil de HPLC (acetonitrilo:agua:ácido acético glacial, 99:99:2, v/v/v). Las muestras se conservaron a 4 °C hasta el análisis por HPLC. El volumen de inyección fue de 100 µl y las condiciones se detallan más adelante.

En el caso de la determinación de OTA con columnas de SPE C18 se utilizaron columnas Sep-Pak Vac[®] 500 mg/3ml de Waters (Milford, MA, USA). Se procedió a un lavado previo de las mismas con 5 ml de metanol seguido de 5 ml de agua. Las muestras de vinos y jugos (5 ml) fueron mezcladas con 5 ml de agua y esta dilución fue pre-concentrada en las columnas dispuestas en un set de vacío para 12 muestras (Lubitech, Technologies Limited) bajo presión reducida con un flujo de 1 gota/segundo. Se realizaron lavados sucesivos con 2 ml de agua y 2 ml de una solución metanol-agua 60:40, v/v. La extracción se realizó con 2 ml de una solución metanol:ácido acético (99,5:0,5 v/v). Los extractos se secaron a 50 °C bajo corriente de nitrógeno y resuspendieron en 500 µl de una solución acetonitrilo:agua:ácido acético glacial (99:99:2 v/v/v). El volumen de inyección fue de 50 µl y las condiciones de inyección se detallan luego.

Para la extracción de OTA a partir de los orujos el paso previo de purificación implicó la comparación de dos métodos.

Método R_ El primero consistió en la maceración durante 30' con agitación de una mezcla de 5 g de muestra fresca y 25 ml de solución metanol/agua (70:30, v/v), según Ribeiro y Alves (2008) con algunas modificaciones. Luego se separó la fase líquida y se filtró por una membrana de PTFE de 0.45 µm (MillexTM) previo al análisis por HPLC. El volumen de inyección fue de 50 µl y las condiciones de inyección se detallan luego.

Método S_ El segundo método incluyó el secado previo del orujo en estufa a 50 °C por 48 horas, en base al trabajo de Solfrizzo *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Una vez transcurrido ese período se molió la muestra por 1 min en un mixer (Philips HR1363) y se tomaron 5 g en tubo Falcon de 50 ml. Se le agregaron luego 25 ml de una solución acetonitrilo/agua (60:40, v/v) y se mezcló por una hora en un agitador (Miki Siesakusho, Japan). Después de la centrifugación a 7000 rpm por 1 min, 5ml de los extractos fueron diluidos con 5 ml de agua. La OTA de los 10 ml del extracto diluido fue concentrada por pasaje por las columnas Sep-Pak Vac[®] Waters (Milford, MA, USA) utilizando el método

descrito antes para la determinación de OTA en vinos. El volumen de inyección fue de 20 μl y las condiciones de inyección se detallan luego.

En todas las cuantificaciones se realizaron curvas de calibración de 8 puntos en el rango de concentración de 0,1 $\mu\text{g/l}$ a 50 $\mu\text{g/l}$ a partir del estándar de OTA en metanol y en cada oportunidad que se requirió. Se determinaron los límites de detección y límite de cuantificación de acuerdo a una relación señal ruido de 3 a 1 (Bliesner, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008).

En los ensayos de porcentaje de recuperación las muestras fueron enriquecidas con una solución stock de OTA 50 $\mu\text{g/l}$ de manera de que la concentración final a detectar fuese 2 $\mu\text{g/ml}$ (límite máximo permitido según legislación).

El estándar de OTA se obtuvo de Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA), tanto el metanol como el acetonitrilo fueron grado HPLC, así como el ácido acético glacial (J. Baker). Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua deionizada obtenida con un sistema de purificación Millipore Milli-Q (Bedford, MA, USA).

Todas las muestras fueron refiltradas a través de un filtro de membrana de 0,2 μm de nylon (Axiva) antes de la inyección por duplicado del volumen mencionado anteriormente en cada caso. El análisis de HPLC se llevó a cabo en un sistema equipado un desgasificador de vacío SpectraSYSTEMS SCM1000 (Thermo Finnigan), una bomba multisolvente WatersTM 600 Controller (Millipore), un inyector automático WatersTM 717plus Autosampler (Millipore), un detector de arreglo de diodos WatersTM 996 Photodiode Array Detector (Millipore) y un detector de fluorescencia RF-10A XL Fluorescence Detector (Shimadzu) conectado en serie. Se usó una columna Rigel C18 150 mm x 4 mm (Stellar Phases Inc.) con una precolumna Security Guard C18 4 mm (Phenomenex). La fase móvil isocrática 1 ml/min, estuvo compuesta por una solución acetonitrilo/agua/ácido acético (99:99:2, v/v/v). Durante la corrida la temperatura de la columna fue de 40 °C y la detección se llevó a cabo a 330 nm y 460 nm como longitudes de excitación y emisión, respectivamente y a una $\lambda_{\text{máx.}}$ de absorción de 257 nm (máximo determinado por el detector PDA).

Los datos fueron procesados con un Software Empower Pro (Waters Corporation) y Chromatography Data System N2000 (Baseline Chromtech Research Centre).

Análisis estadísticos

El estudio de las posibles correlaciones entre los niveles de OTA detectados en la vinificación con los factores de riesgo y la presencia de microorganismos potencialmente formadores de OTA se realizó utilizando en el paquete estadístico Infostat, el análisis multivariado (ACP) y de correlación de Pearson con $p \leq 0.05$ (Di Rienzo *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados en la distribución y características de la microflora; la presencia de *Aspergillus* spp. y la producción de OTA. En los viñedos se analizaron que factores tienen mayor efecto sobre la incidencia de hongos potencialmente ocratoxigénicos, se validaron en predios experimentales y se analizaron las concentraciones de OTA detectadas en los respectivos vinos y/o subproductos de la vinificación. Se establecieron los parámetros que afectan las etapas más importantes en la cadena de producción-industrialización vitícola para la implementación de un posible APPCC.

7.1_ DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus* spp. EN VIÑEDOS DEL URUGUAY

7.1.1. Aislamiento e identificación fenotípica

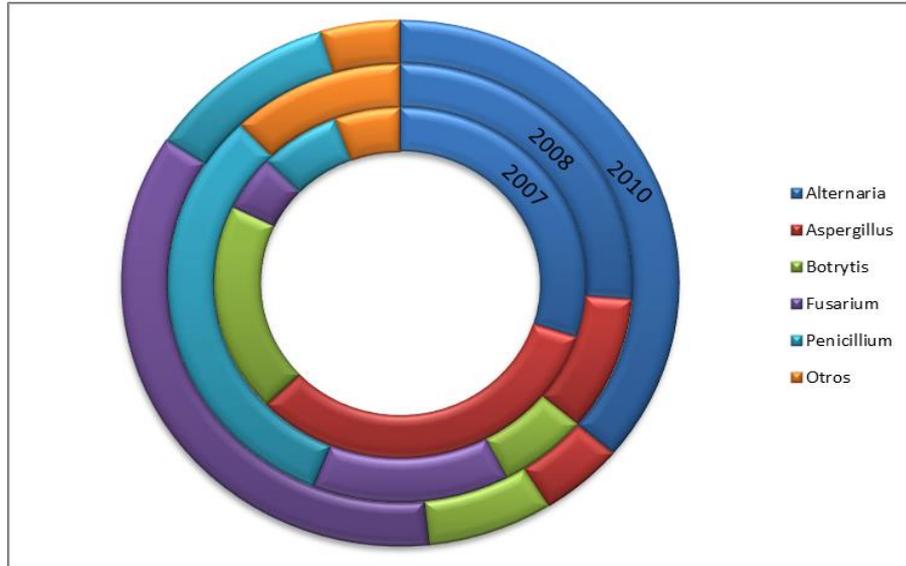
La contaminación fúngica fue mayor en la temporada 2006/2007 que en las temporadas siguientes. Los géneros mayoritariamente encontrados fueron: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Epicoccum*; y en menor medida: *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Trichoderma*. Ello coincide con los reportes de las poblaciones más frecuentes en bayas maduras próximas a cosecha (Da Rocha *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2003; Bellí *et al.*, 2006a).

Los resultados de la infección emergente expresados en porcentajes relativos de aparición de las distintas especies y cepas en las bayas muestreadas de los viñedos participantes se muestran en el Gráfico 1.

En términos porcentuales, la cantidad de cepas pertenecientes al género *Aspergillus* y *Botrytis* emergentes en la vendimia 2007 fue mayor que en la de 2008 y 2010. *Alternaria*

mantuvo la misma tendencia que los dos primeros, mientras que *Fusarium* y *Penicillium* mostraron un incremento notorio en los dos últimos años.

Gráfico 1_ Porcentajes de los hongos encontrados según su género para los años 2007, 2008 y 2010.

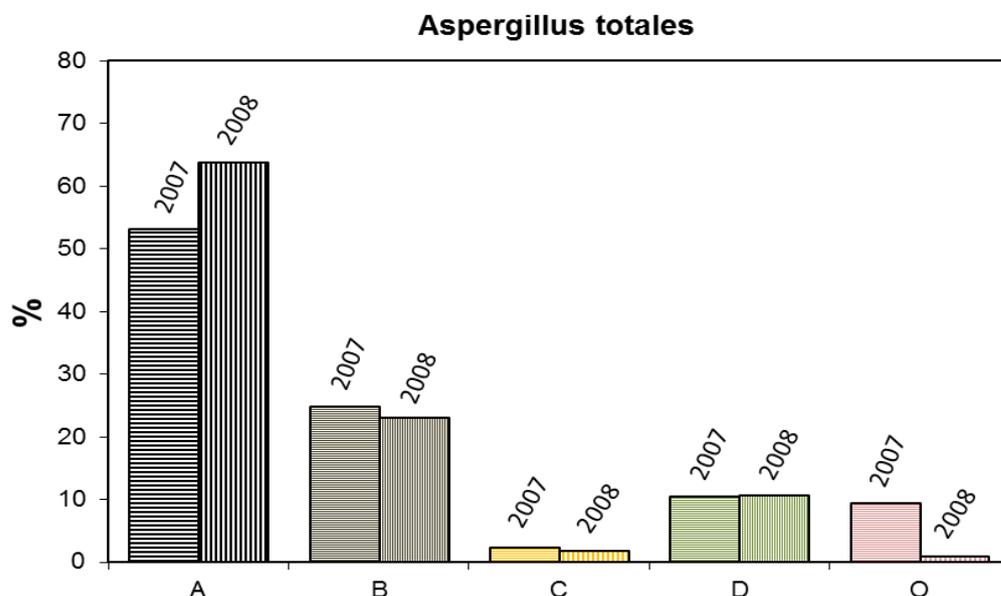


En la cosecha 2007 un total de 793 aislamientos fueron identificados como pertenecientes al género *Aspergillus*. En 2008 se colectaron 113 aislamientos y en la cosecha 2010 hubo 247. Realizando la estandarización de los datos según el número de bayas evaluadas se calcularon los porcentajes relativos de aparición de aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus* para cada viñedo en estudio, en las tres cosechas (Tabla 1).

Tabla 1_ Porcentaje relativo de aparición de cepas pertenecientes al género *Aspergillus* según la evaluación fenotípica para las tres cosechas evaluadas en los 22 predios.

Año/Viñedo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2007	5	25	23	23	18	29	47	73	6	90	8	9	13	-	8	22	58	3	42	30	7	6
2008	4	29	2	6	4	2	9	15	2	8	23	6	4	13	8	6	29	6	17	17	8	0
2010	2	-	-	15	9	40	3	3	-	15	1	-	-	-	5	2	-	0	3	25	0	1

Los aislamientos que consideramos pertenecientes al género *Aspergillus* se



agruparon también según su aspecto visual. Las variaciones en porcentaje de aparición de cada grupo se detallan en el gráfico 2.

Gráfico 2_ Porcentaje de incidencia de los diferentes grupos fenotípicos de *Aspergillus* en bayas recolectadas en las vendimias 2007 y 2008.

Los aislamientos con conidios de color negro (Grupos A y B) variaron tanto en el tamaño de los conidios, como en la forma y tonalidad; así como en el tamaño, la forma, la densidad y la apariencia de las colonias en el medio de aislamiento PDA (concéntricas, micelio aéreo extendido o limitado en el centro) (Dachoupakan *et al.*, 2009). Las diferencias más remarcables entre los grupos fueron el tono y apariencia de sus conidios. Mientras que los del grupo A eran de color negro oscuro, grandes y distinguibles a simple vista, las colonias del grupo B colonizaron la totalidad de las placas y mostraban una apariencia polvorienta, y sus conidios eran de color gris oscuro-amarronado.

En el estudio del crecimiento de los aislamientos de estos grupos (A y B) en CYA siguiendo las claves descriptas por Pitt *et al.* (2009) se obtuvieron colonias con diámetros que fueron desde 7 mm a 85 mm cultivadas a 37 °C. Para un mismo aislamiento, los datos de los diámetros de las colonias tuvieron valores de desviación estándar de hasta 0.41. El 46% de las muestras cultivadas tendrían diámetros de colonia inferior o igual a 40 mm y el restante 54% diámetros mayores. Por lo tanto pertenecerían a la especie *A. carbonarius* y

al agregado *Niger* (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. ibericus* y/u otro), respectivamente. Esto no concuerda con lo evidenciado en el gráfico 2, aunque de acuerdo a estudios sobre la cinética de crecimiento, la aplicación de esta herramienta no es suficiente por si sola para diferenciar especies tan cercanas (Sobrero *et al.*, 2013).

Los aislamientos de color amarillo-ocre (Grupo C) fueron fácilmente distinguibles en las bayas y en las placas de PDA, generando colonias de color característico y pequeñas en comparación con los pertenecientes a los demás grupos.

El grupo D lo constituyeron cepas de *Aspergillus* formadores de colonias de color verde en medio PDA. Estas cepas se distinguieron desde su aparición en las bayas de otros hongos del mismo color como *Penicillium* spp.. No obstante, ante la duda se procedió siempre al reconocimiento bajo microscopio de los conidios.

Por último, el grupo O, incluyó otros aislamientos frecuentemente uniseriados cuyas colonias eran de color beige, presentando a veces, halos de color amarillo intenso, amarillo claro, naranja pálido y marrón. Fueron encontrados sólo en las uvas de algunos productores, coincidiendo con predios que presentaban mayor contaminación fúngica (datos no mostrados).

En la cosecha 2010 los hongos emergidos de las bayas de cada predio fueron cuantificados, y los pertenecientes al género *Aspergillus* fueron aislados y almacenados en las condiciones establecidas para la colección, sin realizarse su clasificación fenotípica de acuerdo a las claves. En cualquier caso, de acuerdo a la información disponible, fue posible afirmar que para este período no se encontraron cepas de *A. ochraceus*.

7.1.2. Identificación genética

PCR con cebadores no específicos y RFLP

Las reacciones de RFLP para determinar la pertenencia a los grupos N o T de los aislamientos (Bau *et al.*, 2006b) se llevaron a cabo en la cosecha 2007. Se evaluaron las cepas control; donde aparecen los productos de amplificación con los cebadores ITS1/ITS4 y un patrón de bandas diferente en las cepas de *A. carbonarius*, ya que ocurre la restricción con la enzima *RsaI*. No se observó restricción en las cepas control de *A. carbonarius* ni en ninguno de los 41 aislamientos analizados. No se establece ninguna correlación con la identificación fenotípica ni con la producción de OTA en el medio de cultivo de los aislamientos. Este resultado está de acuerdo con lo que se ha enunciado en algunos trabajos acerca de la eficacia de este método a la hora de clasificar las diferentes cepas. La restricción de una sola enzima no es suficiente para establecer un patrón válido de diferenciación (Bisbal *et al.*, 2009; Diguta *et al.*, 2011).

PCR con cebadores específicos

En la Tabla 2 se resumen los resultados de las reacciones de PCR con los tres cebadores específicos utilizados para la identificación genética de los 190 aislamientos de *Aspergillus* aislados de las bayas en las vendimia 2007 (77) y 2008 (113).

Las repeticiones de las cepas control dieron los resultados esperados tras la amplificación de los cebadores, tal como puede observarse en la Figura 14. Se considera resultado positivo (+) cuando aparece el fragmento amplificado y negativo (-) cuando no se observa el mismo en los geles correspondientes de los productos de amplificación para cada uno de los cebadores evaluados.

Figura 14_ Geles de agarosa 2 % de los productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos OCRA1/OCRA2 (A); CAR1/CAR2 (B) y AoLC35-12L/AoLC35-12R (C) para las cepas control: AN_*A. niger*; AF_*A. fumigatus*; AC_*A. carbonarius* y AO_*A. ochraceus* con repeticiones. PM_ Marcador de peso molecular en pb.

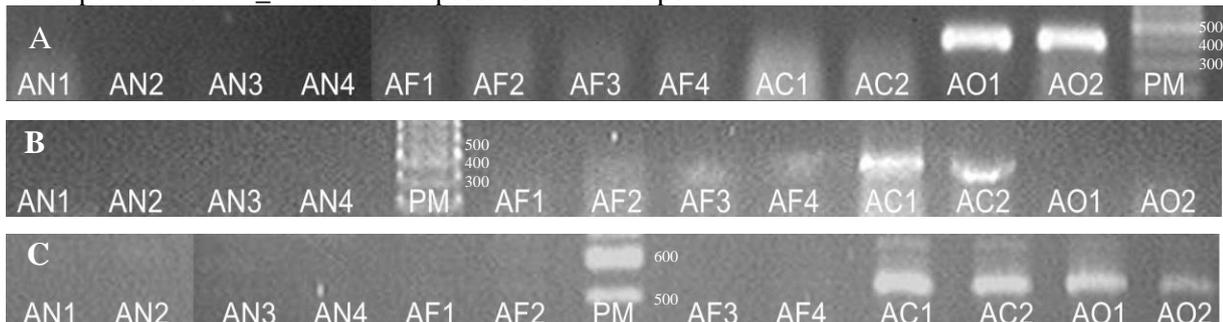


Tabla 2_ Resultado de las reacciones de PCR con los cebadores específicos para la identificación de los aislamientos de *Aspergillus* obtenidos indicados como número de viñedo-código/año. O:

Aislamiento	O	C	AoL	Aislamiento	O	C	AoL	Aislamiento	O	C	AoL	Aislamiento
P01-25/07	+	-	+	P06-52/07	-	-	+	P10-29/07	-	-	-	P14-31/07
P01-14/08	-	-	+	P06-52/07	-	-	+	P10-48/07	-	-	-	P14-41/07
P01-24/08	-	-	-	P06-86/07	-	-	+	P10-57/07	-	-	-	P14-61/07
P02-15/07	-	-	+	P07-09/07	-	-	+	P10-83/07	-	-	-	P15-79/07
P02-16/07	-	-	+	P07-21/07	-	-	-	P10-92/07	-	-	-	P15-13/07
P02-66/07	-	-	+	P07-23/07	-	-	+	P10-13/08	-	-	+	P15-21/07
P02-69/07	-	-	-	P07-66/07	-	-	+	P10-21/08	-	-	+	P15-23/07
P02-11/08	-	-	+	P07-79/07	-	-	-	P10-23/08	-	-	+	P15-41/07
P02-12/08	-	-	-	P07-12/08	-	-	+	P10-33/08	-	-	+	P16-28/07
P02-13/08	-	-	+	P07-12/08	-	-	+	P11-11/08	-	-	+	P16-32/07
P02-14/08	-	-	+	P07-13/08	-	-	+	P11-13/08	-	-	+	P16-47/07
P02-21/08	-	-	+	P07-13/08	-	-	+	P11-14/08	-	-	+	P16-72/07
P02-23/08	-	-	+	P07-14/08	-	-	+	P11-21/08	-	-	+	P16-13/07
P02-24/08	-	-	+	P07-14/08	-	-	+	P11-23/08	-	-	+	P16-23/07
P02-31/08	-	-	+	P07-14/08	-	-	-	P11-31/08	-	-	-	P16-33/07
P02-33/08	-	-	+	P07-23/08	-	-	+	P11-32/08	-	-	+	P17-18/07
P02-34/08	-	-	+	P07-24/08	-	-	-	P11-33/08	-	-	+	P17-25/07
P02-41/08	-	-	-	P07-24/08	-	-	-	P11-43/08	-	-	-	P17-33/07
P02-43/08	-	-	+	P07-32/08	-	-	-	P11-53/08	-	-	-	P17-80/07
P02-51/08	-	-	+	P08-05/07	-	-	+	P11-63/08	-	-	-	P17-95/07
P02-61/08	-	-	-	P08-12/07	-	-	+	P12-29/07	-	-	+	P17-11/07
P03-20/07	-	-	+	P08-26/07	-	-	+	P12-72/07	-	-	+	P17-12/07
P03-27/07	-	-	+	P08-37/07	-	-	+	P12-77/07	-	-	-	P17-13/07
P03-30/07	-	-	-	P08-46/07	-	-	+	P12-86/07	-	-	+	P17-21/07
P03-42/07	-	-	+	P08-52/07	-	-	+	P12-87/07	-	-	-	P17-22/07
P03-45/07	-	-	+	P08-71/07	-	-	+	P12-11/08	-	-	-	P17-23/07
P03-48/07	-	-	-	P08-78/07	-	-	+	P12-14/08	-	-	+	P17-31/07
P03-85/07	-	-	+	P08-82/07	-	-	-	P12-21/08	-	-	-	P17-33/07
P03-11/08	-	-	+	P08-83/07	+	-	+	P13-43/07	-	-	+	P17-41/07
P03-21A/08	-	-	-	P08-12/08	-	-	-	P13-61/07	+	-	+	P17-43/07
P03-21B/08	-	-	-	P08-13/08	-	-	-	P13-62/07	-	-	-	P17-51/07
P03-21C/08	-	-	-	P08-14/08	-	-	+	P13-70/07	-	-	+	P17-53/07
P04-12/08	-	-	-	P08-22/08	-	-	+	P13-71/07	-	-	-	P17-61/07
P04-51/08	-	-	-	P08-24/08	-	-	-	P13-12/08	-	-	+	P17-63/07
P05-11/08	-	-	+	P08-34/08	-	-	-	P13-13/08	-	-	+	P18-11/07
P05-12/08	-	-	-	P09-12/08	-	-	+	P14-11/08	+	-	+	P18-12/07
P05-13/08	-	-	+	P10-15/07	-	-	-	P14-12/08	-	-	-	P18-13/07
P06-41/07	-	-	-	P10-21/07	-	-	+	P14-21/08	+	-	+	P19-05/07

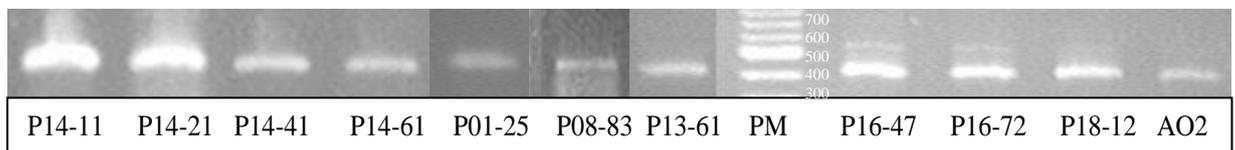
OCRA; C: CAR y AoL: AoLC35.

Los productos de amplificación del cebador OCRA1/OCRA2 se aprecian solo en las muestras control de *A. ochraceus* (14_A), los del cebador CAR1/CAR2 en *A. carbonarius* (14_B) y en ambas especies se aprecia amplificación del cebador AoLC35-12L/AoLC35-12R (14_C)

El reconocimiento de los aislamientos pertenecientes a *A. ochraceus* y *A. carbonarius* resultó directamente de la amplificación de los cebadores OCRA y CAR, respectivamente.

A su vez, la caracterización molecular permitió corroborar la correcta identificación fenotípica de todos los aislamientos de *A. ochraceus*, que representan el 2% y 4% del total de *Aspergillus* spp. aislados en 2007 y 2008, respectivamente. En el siguiente gel (Figura 15) se observa la presencia del producto de amplificación para los cebadores OCRA1/OCRA2 en los 10 aislamientos positivos para esta reacción.

Figura 15_ Geles de agarosa 2% de los productos de la amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos OCRA1/OCRA2 de los aislamientos considerados fenotípicamente como *Aspergillus ochraceus*. En todos los casos controles positivos (AO2) y negativos fueron incluidos (datos no mostrados). PM_ Marcador de peso molecular en pb.



Ninguno de los aislamientos analizados se identificó genéticamente como cepa de *A. carbonarius*, ya que no se obtuvieron productos de amplificación para los cebadores CAR. Esta afirmación se sustenta en los resultados positivos obtenidos en las cepas control de *A. carbonarius* y las repeticiones realizadas.

Para la identificación dentro de la sección *Nigri* se determinó que es necesario el análisis conjunto de las reacciones con los cebadores CAR y AoLC35. Por lo tanto, de la conjunción de los tres cebadores fue posible establecer a que especie/s correspondería cada aislamiento (Tabla 3).

De los 190 aislamientos totales, 107 amplificaron con el cebador AoLC35 y en 83 muestras no se obtuvo producto de amplificación. Según las últimas publicaciones y especies identificadas, no se puede caracterizar estos aislamientos utilizando esta metodología; pudiendo corresponder a *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. ibericus*, *A. brasiliensis* y/o *A. uvarum*, ya que dentro de cada especie se encuentran individuos productores y no productores de OTA.

La posibilidad de que el ADN en la muestra no se haya amplificado se corroboró con los resultados de la reacción con los cebadores ITS.

Tabla 3_ Resultado de las reacciones de PCR con los cebadores OCRA, CAR y AoLC35, y la/s posible/s especie/s a la que pertenecerían los aislamientos.

OCRA	CAR	AoLC35	Especie
-	-	+	del Agregado <i>A. niger</i> productor de OTA
-	-	-	del Agregado <i>A. niger</i> NO productor de OTA
+	-	+	<i>A. ochraceus</i>
-	+	+	<i>A. carbonarius</i>

Cuando son evaluados en su totalidad, los porcentajes según la identificación genética descripta anteriormente son:

<i>Porcentaje de especies aisladas de uvas Tannat en Uruguay (%)</i>	
50.5	<i>del Agregado A. niger productor de OTA</i>
43.7	<i>del Agregado A. niger NO productor de OTA</i>
5.8	<i>A. ochraceus</i>
0	<i>A. carbonarius</i>

La mayoría de los *Aspergillus* encontrados en este estudio pertenecen al Agregado *niger*, coincidiendo con lo evaluado por Chulze *et al.* (2006) en base a los datos de Da

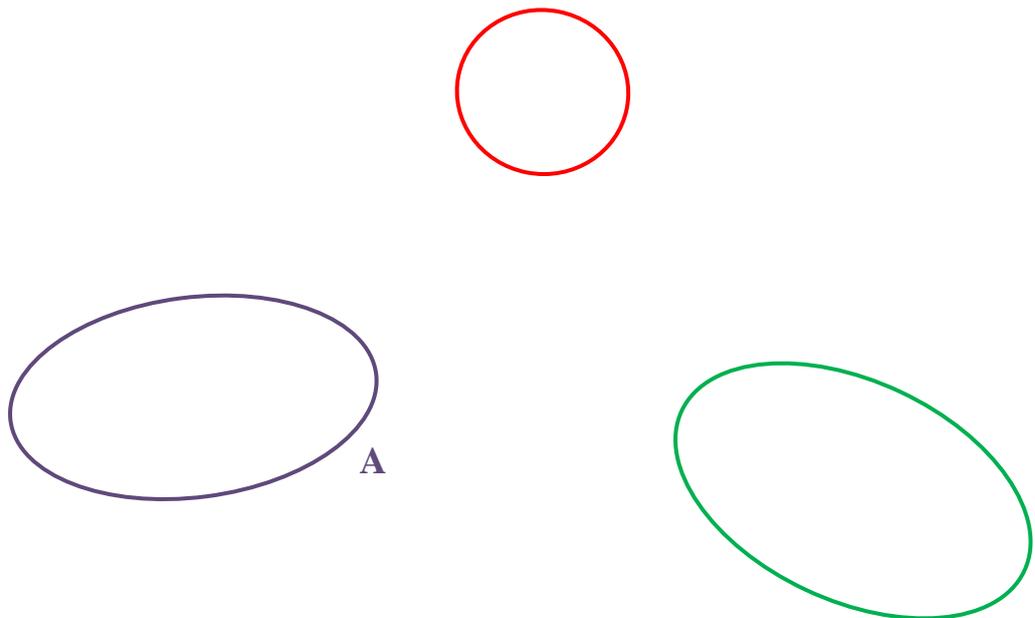
Rocha *et al.* (2002) y Magnoli *et al.* (2003) en viñedos argentinos y brasileños, atendiendo que pertenecen a zonas climáticas similares.

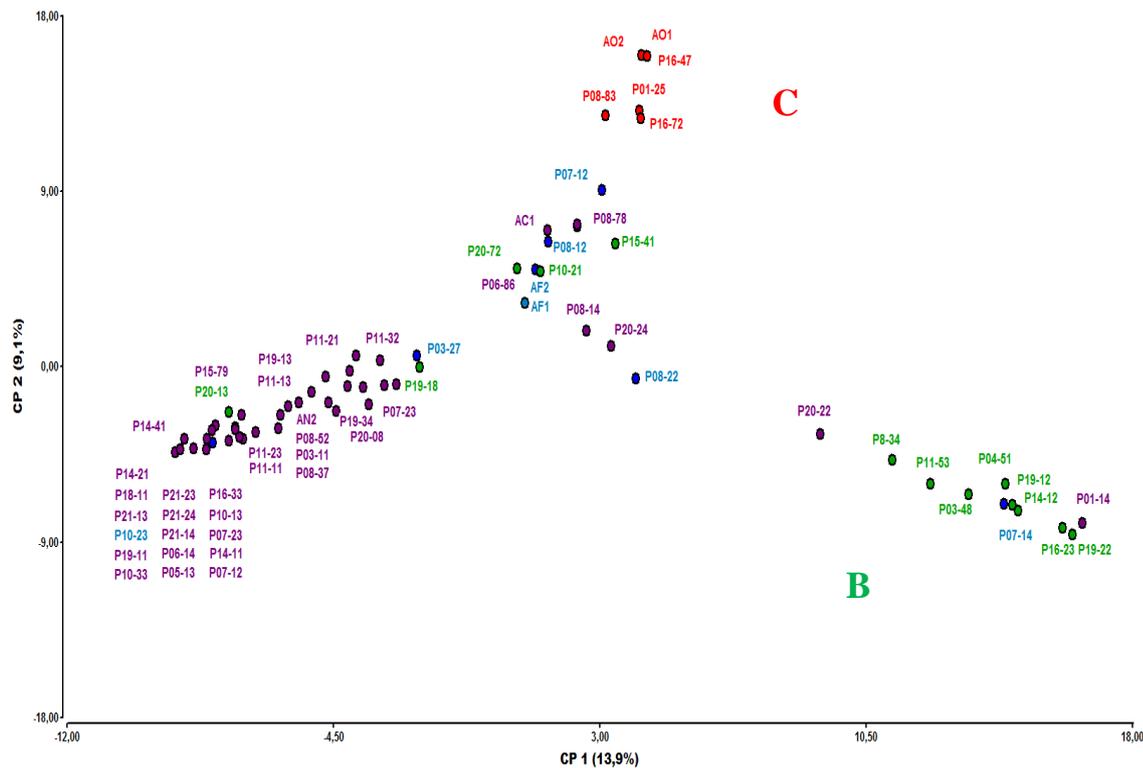
AFLP

En el ensayo de AFLP, luego de analizar la uniformidad de los electroferogramas y el resultado en las muestras blanco para conocer el comportamiento de la línea de base, se optó por considerar los picos comprendidos entre 100 pb y 400 pb, con una intensidad mayor a 80 ufr (unidades fluorescentes relativas).

En las cuatro reacciones selectivas de AFLP ensayadas aparecen 649 locus polimórficos. Para cada selectiva el número de picos polimórficos fue de, S1: 128, S2: 166, S3: 182 y S4: 173. En las selectivas S1 y S3 es donde se encuentran mayores niveles de variabilidad y reproducibilidad, y son los analizados conjuntamente en el ACP realizado para clasificar los aislamientos (Gráfico 3).

Gráfico 3 Análisis de componentes principales de los resultados de AFLP de las cepas control AC_A. *carbonarius*; AF_A. *fumigatus*; AN_A. *niger* y AO_A. *ochraceus*; y de los aislamientos seleccionados para el análisis identificados como número de viñedo-código del aislamiento.





En el PCA se observan tres grupos bien diferenciados de aislamientos. Aquellos que por su fenotipo fueron clasificados como pertenecientes al agregado *A. niger*, segregaron en dos grupos principales, grupo A y grupo B (parte inferior del gráfico). Se detectó una alta correlación entre esos grupos y el potencial de producción de OTA que tienen esos aislamientos según los resultados obtenidos con el cebador AoLC35 (color violeta: positivo; color verde: negativo). En su mayoría los aislamientos pertenecientes al grupo A serían capaces de producir OTA (31 de 33), mientras que los pertenecientes al grupo B no tienen esa capacidad potencial (8 de 11). La cepa control de *A. niger* (AN2) quedó incluida dentro del grupo A.

Un tercer grupo, grupo C, está conformado por aquellos aislamientos y estándares, reconocidos fenotípicamente como *A. ochraceus*, productores de OTA (6/6).

Por último, algunos aislamientos no segregaron junto a ninguno de los tres grupos mencionados anteriormente, y sus patrones de AFLP se asemejan a los de los controles de *A. carbonarius* (AC1) y *A. fumigatus* (AF1 y AF2). Se incluyó el color celeste para aquellos aislamientos que pese a su análisis muestran características peculiares, principalmente en su crecimiento en placa. Según su fenotipo corresponden a los aislamientos que mostraban mayor variabilidad en los ensayos de crecimiento en medios selectivos y producción de OTA. Además, transcurridos los períodos de incubación

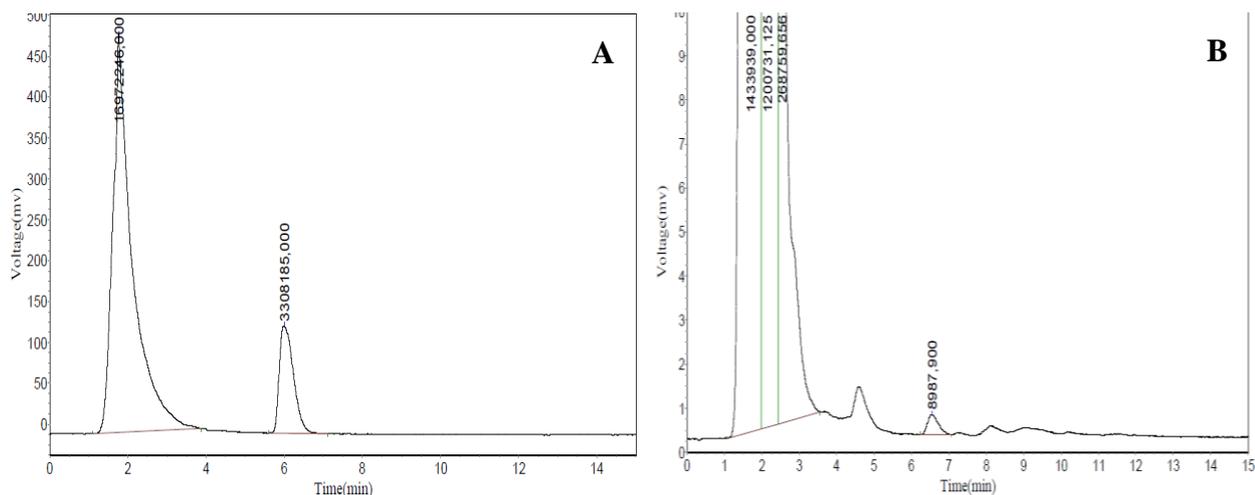
establecidos en las claves para identificación fenotípica, presentaban halos de crecimiento diferenciales o micelios heterogéneos que hacen pensar que si bien son pertenecientes al género *Aspergillus*, no son de la especie predominante (*A. niger*) o la presencia de contaminantes como pueden ser otros hongos o virus pudieron alterar la evaluación fenotípica (Samson *et al.*, 2007). Se puede también haber incurrido en errores de clasificación propios de la metodología empleada.

Al evaluar la variabilidad genética de los aislamientos de acuerdo al origen geográfico de los viñedos analizados, no se encontró a nivel significativamente estadístico diferencias genotípicas entre distintas procedencias. No se detectó en este trabajo una posible segregación de la variabilidad genética medida por AFLP de acuerdo a la región donde fueron aislados las especies de *Aspergillus*, lo que concuerda con la regionalización nacional de los viñedos (Hidalgo, 1992).

7.1.3. Producción de OTA de los aislamientos

Las curvas de calibración dieron lineales para concentraciones de 0.1 a 25.0 µg/ml de soluciones de OTA estándar ($r^2 = 1.0$) medidas por HPLC con el detector de fluorescencia (DF). Con esta alta correlación y la confirmación por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD), los valores de LQ y LD son de 1.0 y 0.1 µg de OTA/g de medio de cultivo con una relación señal: ruido S/N de 3:1. En la Figura 16 se ejemplifican estos resultados con los cromatogramas obtenidos para una placa utilizada en la calibración con 36 µg de OTA/g de medio de cultivo y para una muestra que se encuentra próximo al límite de detección, con un tiempo de retención en las muestras de 6,7 min (RSD = 1 %).

Figura 16 Cromatogramas en HPLC de una muestra de calibración para la determinación de OTA en medio de cultivo YES (A) y de un aislamiento de *Aspergillus* productor de OTA en placa del mismo medio de cultivo (B).



La producción de OTA promedio de las cepas control de *A. fumigatus*, *A. ochraceus*,

A. niger y *A. carbonarius* fue de no detectable, 1545.9, 469.0 y 2286.8 µg de OTA/g de medio, respectivamente; según los resultados evaluados por HPLC con DF.

Cuando las muestras fueron analizadas con el DAD los valores promedios mostraron una alta correlación (>90%) con los obtenidos por DF. Igualmente, por la presencia de interferencias esta metodología se utilizó sólo para la confirmación de la identificación de OTA según su absorción a 254 nm (Soleas *et al.*, 2001), junto con los datos extraídos de la

inclusión de patrones internos (concentraciones conocidas del estándar de OTA) en aquellas muestras positivas para la presencia de OTA.

En los aislamientos la producción de OTA fue variable, encontrándose valores de hasta 854.3 µg de OTA/g de medio.

Los aislamientos en donde la producción de OTA fue mayor, con un promedio de 594.3 µg de OTA/g de medio, correspondieron a los identificados fenotípica y genéticamente (por PCR con cebadores específicos) como pertenecientes a la especie *A. ochraceus*.

En la mayoría (60 %) de los aislamientos identificados genéticamente como pertenecientes al agregado *A. niger* no productores de OTA no se detectó la presencia de OTA en el medio de cultivo; y en los que si se detectó (40%), la concentración no superó los 0.5 µg de OTA/g de medio.

En los aislamientos pertenecientes al agregado *A. niger* productores de OTA según la clasificación genética (por PCR con cebadores específicos), el promedio de producción fue de 3.2 µg OTA/g de medio, y si bien en algunos casos (25%) no se detectó producción de OTA se alcanzaron valores de 24.4 de µg OTA/g de medio.

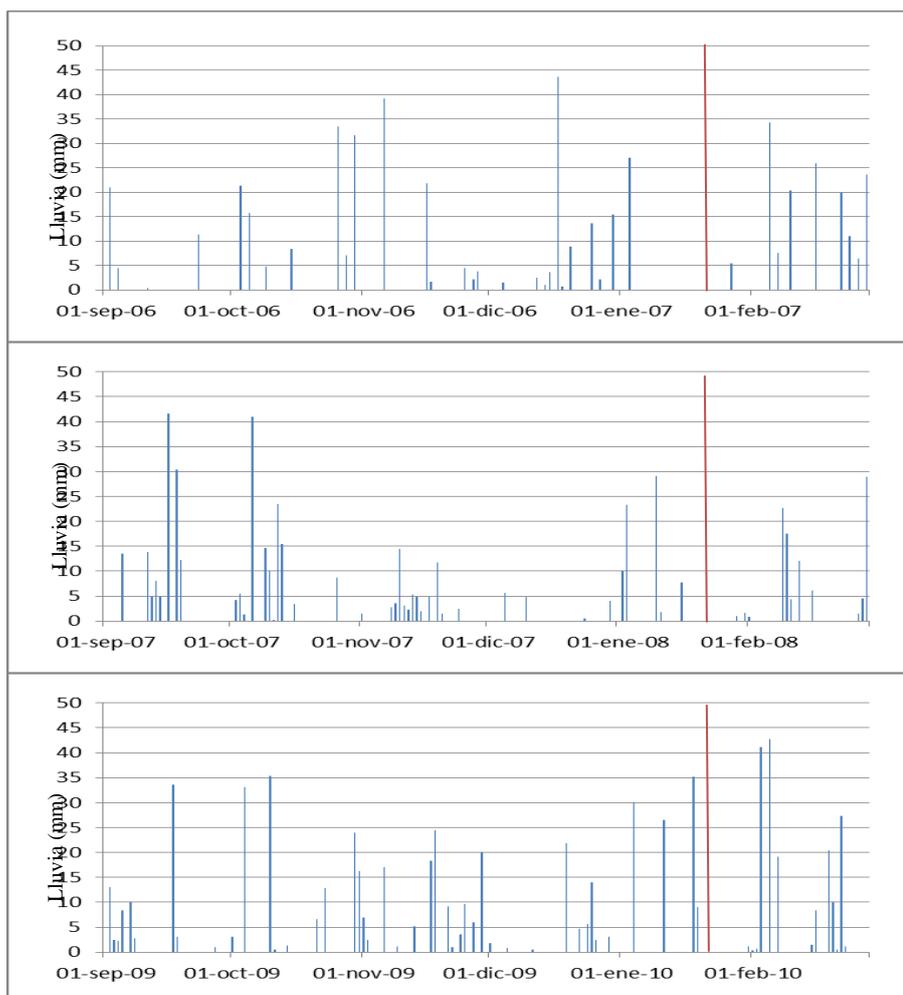
De los aislamientos identificados fenotípicamente como pertenecientes a la sección *A. niger* la máxima producción fue de 24.4 µg OTA/g de medio, pero ninguno alcanzó las concentraciones producidas por las cepas de *A. carbonarius* utilizadas como control.

7.2_PARÁMETROS QUE AFECTAN LA OCURRENCIA DE *Aspergillus* spp. EN UVAS Y PRESENCIA DE OTA EN VINOS

7.2.1. Clima y condiciones meteorológicas

Como se ha indicado, en los viñedos los factores climáticos tales como la ocurrencia conjunta de lluvias y altas temperaturas serían los determinantes de la contaminación fúngica. Los registros de precipitaciones diarias tomadas en la estación meteorológica de INIA, para el semestre setiembre-marzo de cada período se muestran en el Gráfico 4.

Gráfico 4_ Precipitaciones diarias expresadas en mm para el semestre setiembre-marzo de los años 2006/2007, 2007/2008 y 2009/2010 tomados en la estación meteorológica experimental INIA. La línea roja indica aprox. la fecha de envero de las uvas.



Como puede apreciarse a partir del envero (mediados de enero) período en que las bayas son más susceptibles al ataque de *Aspergillus* (Battilani *et al.*, 2004a), las lluvias fueron más dispersas y/o frecuentes en 2007 que en los dos años posteriores.

Si los datos son analizados en los períodos previos de 30, 60 y 90 días como la suma de las temperaturas diarias medias en °C y suma de las lluvias en mm (Tabla 4) según Battilani *et al.* (2006c) varía la interpretación de los resultados. Se observa una disminución de las lluvias ocurridas en 2007, 2008 y 2010 a 30 días de la cosecha, aunque estos datos no tienen relación con la frecuencia de ocurrencia de las lluvias. La mayor contaminación fúngica presente en 2007 podría explicarse por el fenómeno de las lluvias más que por la suma de las temperaturas medias

Tabla 4_ Suma de los grados días (Suma T, suma de las temperaturas diarias medias en °C) y de las lluvias (Suma Ll, suma de las lluvias diarias en mm) en los períodos comprendidos entre los 30, 60 y 90 días previos a las cosechas de los años 2007, 2008 y 2010 para la estación meteorológica experimental INIA.

Período	2006-2007		2007-2008		2009-2010	
	Suma T	Suma Ll	Suma T	Suma Ll	Suma T	Suma Ll
- 30 días	630	194	655	120	623	80
- 60 días	1303	261	1320	176	1345	230
- 90 días	1999	377	1980	244	2010	338

Si se comparan los registros de temperaturas y lluvias entre los viñedos se observan variaciones en un mismo día y entre diferentes días; sin embargo las sumas de las temperaturas medias diarias al igual que la suma de las lluvias para cada uno de los predios no difieren significativamente entre ellos ni con los obtenidos de la base meteorológica de la Estación Experimental “Wilson Ferreira Aldunate”.

La mayor correlación de 0.97 con un *p-valor* de 0,16 se da entre los valores de infección por *Aspergillus* y la suma de las lluvias 30 días previos a la cosecha. La misma tendencia se da con *Botrytis* (0.92, *p*=0,20). Los valores de sumas de temperaturas diarias medias muestran muy bajas correlaciones con ambas contaminaciones para el mismo período (-0.21 y -0.36, respectivamente). Tampoco se encontraron relaciones de

significancia entre los grados de infecciones latentes con los datos de temperatura (media, máxima y mínima), humedad (media, máxima y mínima) y grados días correspondientes. En base a estos resultados podemos concluir que no se alcanzaron las condiciones prósperas para el crecimiento de cepas de *A. carbonarius*, principalmente porque en ninguna de las temporadas evaluadas se mantuvieron valores de temperatura y humedad óptimos durante períodos prolongados. Durante el período en que las bayas son susceptibles, las temperaturas diarias promedio fueron de 23 ° C. Se ha establecido que 21 °C es el límite inferior debajo del cual el crecimiento de los hongos y la producción de OTA no resultan en concentraciones de OTA en vinos críticas (Clouvel *et al.*, 2008). Pero estos valores de temperaturas diarias promedio en los viñedos correspondieron a temperaturas mínimas diarias promedio debajo de 15 °C, condiciones que *in vitro* impiden el desarrollo de estos hongos. Las condiciones meteorológicas observadas son más consistentes con las condiciones óptimas de crecimiento de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (Chiotta *et al.*, 2013).

El análisis de varianza, adicionando las coordenadas geográficas a los datos climáticos no detectó diferencias estadísticamente significativas de una regionalización, probablemente porque todos los viñedos en estudio están localizados en la zona sur (INAVI, 2009) y/o en el mismo nivel de potencialidad para el cultivo de uvas de calidad en el país (Hidalgo, 1992). En el ACP de las infecciones por *Aspergillus* respecto a las variables meteorológicas estudiadas se segregó solamente una condición climática extrema, debido a los valores de temperatura mínima que se dieron en el viñedo 17 durante el mes previo a la cosecha. Cabe resaltar que al igual que los registros obtenidos para las parcelas evaluadas en la Estación Experimental, este viñedo fue cosechado un mes más tarde que el promedio de los viñedos participantes, por lo que los valores respecto al resto cambian significativamente. Pero es válida igualmente, la búsqueda de una correlación con el grado de infección latente en ese predio.

Estos resultados serían extrapolables a la situación del Uruguay. Es un país pequeño y carente de unidades geomorfológicas de gran extensión que creen condiciones climáticas diferentes. Ya se han encontrado incluso diferentes opiniones acerca de la regionalización de los viñedos de toda Europa tras el análisis estadístico minucioso de los datos (Remiro, 2011).

7.2.2. Método de cultivo

En los viñedos particulares

Para conocer la influencia del ecosistema en la presencia de hongos ocratoxigénicos se obtuvieron y analizaron los datos de la Tabla 5, que muestra el resumen de las medias de los resultados de productividad más importantes de los 22 predios comerciales y las infecciones latentes para 2007, 2008 y 2010, según los diferentes sistemas de manejo llevados a cabo.

Tabla 5 Para cada viñedo (1-22) se detalla: Marco de plantación; h: Altura del plano de poda en cm; Pl/ha: Cantidad de plantas por hectárea; AF/pl: Área foliar por planta en m²; IC: Índice de compacidad; Pr: Peso promedio de cada racimo en g; N°r: Número de racimos promedio por planta; Kg/pl: Carga, el peso de la uva en cada planta en Kg; AF/Kg: Cociente entre el área foliar y la carga en cada planta (m²/Kg); PAR: Radiación fotosintéticamente activa; PFD: % de luz incidente; N: Nitrógeno foliar en %; IL: Infección latente en los años 2007, 2008 y 2010, respectivamente.

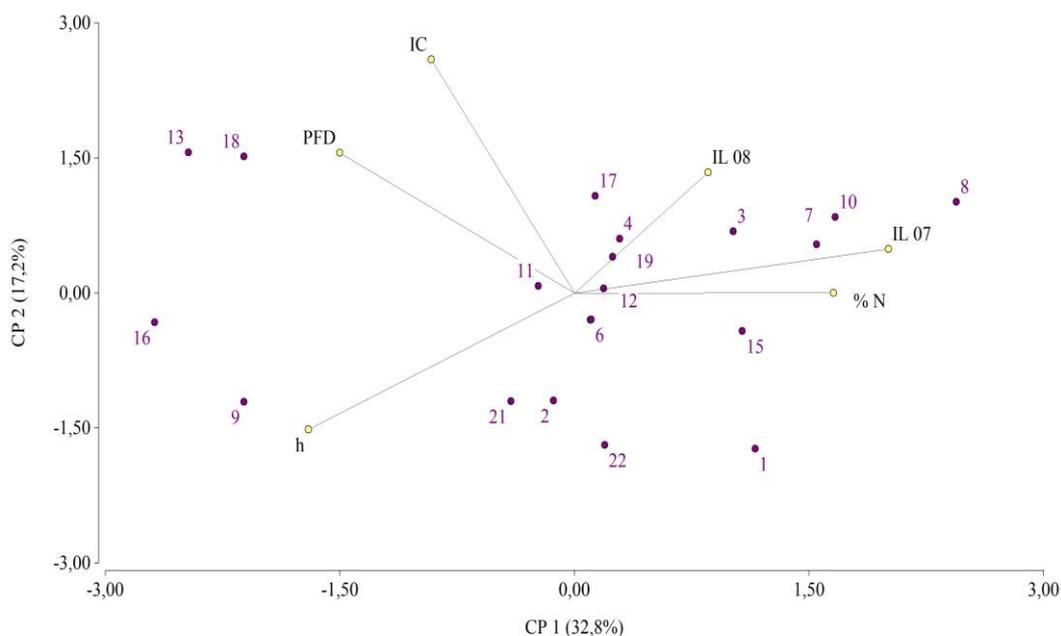
	Marco	h	Pl/ha	AF/pl	IC	Pr	N°r	Kg/pl	AF/Kg	PAR	%PFD	N	IL07	IL08	IL10
1	1x2.5	90	4000	8.06	0.27	383	20	8.04	1.00	1431	3.9	2.72	119	54	64
2	1x2.5	100	4000	7.17	0.32	364	28	11.20	0.64	2236	5.3	1.28	103	146	-
3	1.5x3	50	2222	6.22	0.60	396	20	7.89	0.79	1940	10.6	2.50	108	40	-
4	1x2.5	90	4000	6.17	0.50	367	7	2.49	2.48	2114	23.0	2.30	108	183	11
5	1x2.5	90	4000	5.53	0.54	357	8	2.84	1.95	2140	7.9	2.45	98	94	10
6	1x2.5	90	4000	7.33	0.42	388	9	3.64	2.01	2064	20.5	2.25	105	117	83
7	1x2.5	50	4000	6.99	0.51	329	9	2.79	2.50	2046	8.2	2.72	107	92	48
8	1.25x2.5	50	3200	6.98	0.36	416	16	6.39	1.09	1856	18.3	2.48	133	198	77
9	1.1x2.5	100	3636	8.80	0.44	390	21	8.56	1.03	1972	16.6	-	96	23	-
10	1.2x2.5	50	3333	7.53	0.52	394	22	9.73	0.77	1966	15.9	1.32	164	48	9
11	1.10x2.5	90	3636	6.82	0.42	468	22	8.68	0.79	1608	17.8	1.38	99	190	79
12	1x3.5	60	2857	4.66	0.36	364	14	5.10	0.91	1765	22.3	1.38	101	100	-
13	1.2x3.3	90	2525	5.79	0.63	320	21	6.95	0.83	1840	68.0	1.49	96	58	-
14	1x3.3	90	3030	9.00	0.47	561	-	-	-	1359	8.1	-	-	198	-
15	1,20x2.5	70	3333	8.57	0.42	464	24	11.84	0.72	2280	3.2	2.42	103	102	54
16	1.1x2.5	90	3636	5.08	0.47	382	18	7.03	0.72	1100	39.0	1.31	53	42	10
17	1x2.5	80	4000	3.50	0.72	388	14	5.55	0.63	2045	3.2	1.24	118	146	-

18	1x2.5	90	4000	3.02	0.92	388	12	4.70	0.64	1298	18.1	1.23	75	92	43
19	1.1x3.3	100	2841	7.55	0.70	386	14	4.95	1.52	1860	7.7	2.55	119	108	15
20	1x2.5	50	4000	4.45	0.41	341	11	3.64	1.22	-	-	2.59	117	148	23
21	1x2.5	90	4000	5.48	0.49	422	12	4.64	1.18	1900	3.5	2.29	85	21	7
22	1x2.5	90	4000	6.81	0.30	405	12	4.67	1.46	2189	8.3	1.81	116	21	49

La densidad de plantación (cantidad de plantas por hectárea) de acuerdo al marco de plantación al igual que la altura del plano de poda, son valores fijos; pero el desarrollo de determinadas prácticas de manejo (deshoje, desbrote, despunte y raleo) hace que se modifiquen las demás variables que figuran en la Tabla 5.

En el ACP de estos datos se obtienen una representación de la interacción de las variables que significativamente muestran mejores correlaciones (Gráfico 5).

Gráfico 5_ Análisis de componentes principales de las variables h: Altura del plano de poda; IC: Índice de compacidad; PFD: % de luz incidente; %N: Porcentaje de nitrógeno en hojas; IL07 e IL08: Infección latente en los años 2007 y 2008, respectivamente; para los viñedos evaluados.



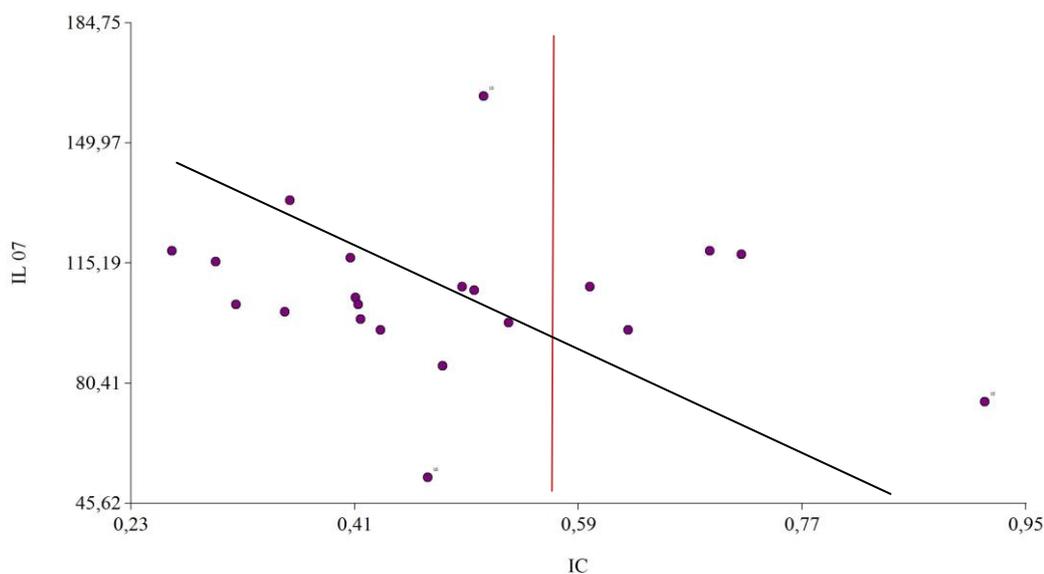
Como puede apreciarse, interaccionan inversamente la altura del plano de poda (h), el índice de compacidad de la canopia (IC) y el porcentaje de incidencia de luz a nivel de los racimos (PFD) y directamente el contenido de N como porcentaje en hojas con respecto a los valores de IL para los años 2007 y 2008. Las IL del año 2010 no se tuvieron en

cuenta dado que el número de casos a analizar en el ACP disminuía demasiado, alterando la variabilidad.

El análisis de correlación de Pearson con todos los datos agronómicos mostró un mejor ajuste con los valores de IL observados en el año 2007. Cuando además se realizó la regresión lineal de los datos de IL para el 2007 con h, el coeficiente de correlación fue -0.48 ($p \leq 0.05$). Los viñedos 8, 10, 16 y 18 fueron los que se apartaron más de la línea de tendencia (datos no mostrados), ya que los dos primeros representaban los casos extremos de máxima infección a altura de plano de poda más bajos (0.5 m) mientras que los dos últimos la mínima infección a alturas de plano de poda más altas (0.9 m).

El comportamiento inversamente proporcional que también se observó con el IC (Gráfico 6) y PFD (datos no mostrados) puede explicarse por la eventual aplicación de prácticas de manejo culturales particulares, ya que opuesto a lo que sucede con la altura del plano de poda que queda fija, éstas pueden modificar los valores de ambas variables, como ya mencionáramos.

Gráfico 6_ Análisis de regresión para las variables IC: Índice de compacidad e IL07: Infección latente en la cosecha 2007. Se representa la línea de tendencia (datos estadísticos no significativos) y el valor promedio óptimo de IC = 0,55.



Se considera que aquellas uvas producidas bajo manejos de canopia que den un adecuado balance del área foliar en función de la carga (AF/Kg) y un índice de

compacidad (AF expuesta/AF total) mayor a 0,55 tienen un metabolismo apropiado para la síntesis de glúcidos, antocianos y demás compuestos necesarios para considerarse frutos de calidad enológica (Kliewer *et al.*, 2005). Estas bayas pueden desarrollar una cascada de metabolitos secundarios, muchos de ellos de defensa ante el ataque de microorganismos por lo que podría ser razonable pensar que se convertirán en uvas menos contaminadas y por lo tanto más inocuas (Ali *et al.*, 2010).

Por otro lado, los compuestos derivados del nitrógeno son determinantes de la presencia de diferentes bacterias y hongos en plantas y frutas. Especialmente, microorganismos epifitos colonizan diferencialmente la superficie de bayas de uvas de acuerdo a los niveles de compuestos nitrogenados (Martins *et al.*, 2012). Esto puede explicar la correlación entre los niveles de IL y nitrógeno foliar.

Si nos enfocamos sólo en los hongos cuyo ataque causa graves daños en las uvas y vemos la interacción entre la presencia de *Aspergillus* spp. y *B. cinerea* durante las cosechas evaluadas, el comportamiento es aleatorio (Tabla 6).

Tabla 6_ Valores promedios de porcentajes de incidencia de Asp_*Aspergillus* spp. y Bot_*B. cinerea* para los 22 viñedos en las tres temporadas evaluadas: 2007, 2008 y 2010.

Viñedo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Asp_07	7	32	30	30	38	24	61	96	7	117	20	11	17	-	10	28	76	4	55	40	9	7
Asp_08	4	23	2	4	6	0	6	15	2	4	23	6	2	13	6	6	29	6	10	10	0	0
Asp_10	0	-	-	4	2	8	1	0	-	3	0	-	-	-	1	0	-	0	1	7	0	0
Bot_07	38	28	13	0	0	11	6	3	19	3	14	75	6	-	20	3	13	10	23	8	42	88
Bot_08	6	6	0	4	0	6	2	27	0	0	8	0	0	33	6	2	13	17	13	2	2	0
Bot_10	8	-	-	0	0	1	0	13	-	0	8	-	-	-	3	0	-	6	2	0	0	4

Aunque se observan bajos índices de correlación ($< 0,5$) se da una tendencia positiva entre ambos y con las infecciones latentes en cada año (datos no mostrados). Si bien la interacción microbiológica de ambos por el mismo nicho afecta el crecimiento y hasta la producción de OTA por *Aspergillus* (Valero *et al.*, 2007), no se encontraron por esta metodología elementos para confirmar esta afirmación.

En el predio experimental

El análisis de los datos de las características de la canopia en relación a los factores: altura del plano de poda, espaciamiento entre plantas y su interacción (Tabla 7), mostró que la distancia entre plantas (EP) ejerce una influencia significativa en los parámetros asociados al vigor de las plantas. No ocurre lo mismo con la distancia entre filas (EF) donde las diferencias no son estadísticamente significativas

Es decir que estos factores (h y EP) influyen el crecimiento vegetativo, la compactación de la canopia y la intercepción de luz resultante a nivel de los racimos. Coincidiendo con lo reportado por diversos autores (May *et al.*, 1976; Smart *et al.*, 1990; Carbonneau, 2009; Coniberti *et al.*, 2014) menores distancias de plantación promueven canopias más vigoras -asociado a mayor densidad de raíces- y por tanto una mayor área foliar por metro de espaldera, mayores relaciones entre éste parámetro y la producción de madera por unidad de superficie lineal y brotes individuales de mayor peso y largo.

Tabla 7_ Análisis de varianza de las características de la canopia, la composición de las bayas, la contaminación por *Aspergillus* en porcentaje de bayas infectadas y contenido de OTA en los correspondientes vinos para las parcelas del predio experimental D5 en la cosecha 2011; respecto a h: Altura del alambre; EP: distancia entre plantas y la interacción de ambas. Se utilizó el método de Tukey con nivel de significación de 0.05.

Altura plano de poda	0.5		1.0		Significancia		
Densidad de plantación	0.8	1.5	0.8	1.5	h	EP	h * EP
Características de la canopia							
Peso brote (g)	57,7 ab	46,1 c	68,5 a	47,4 bc	ns	0,0001	ns
Largo brote (m)	1,40 ab	1,22 c	1,56 a	1,24 bc	ns	0,0001	ns
Poda/m (kg)	0,58 ab	0,46 b	0,69 a	0,47 b	ns	0,0001	ns
AF/m (m ²)	5,32 ab	4,51 c	6,00 a	4,61 bc	ns	0,0001	ns
IC	0,59 ab	0,63 a	0,54 b	0,63 a	ns	0,0002	0,067
PFD %	3,93 b	7,35 a	4,04 b	8,06 a	0,02	0,0290	0,070
AF/Kg (m ² /kg)	3,65	2,70	3,51	2,43	ns	0,020	ns
IR	2,9 b	3,8 ab	2,8 b	4,1 a	ns	0,002	ns
Peso del racimo (g)	162,2	172,4	176	186,1	ns	ns	ns
Peso de la baya (g)	1,25	1,28	1,33	1,32	ns	ns	ns
Fruta/m (kg)	1,61	1,75	1,81	1,95	ns	ns	ns

Altura plano de poda	0.5		1.0		Significancia		
Densidad plantación	0.8	1.5	0.8	1.5	h	EP	h * EP
Composición de la uva							
Sólidos solubles (Brix)	22,4	21,5	23,6	22,2	ns	ns	ns
Acidez (g/L)	3,82	4,06	3,74	3,69	ns	ns	ns
pH	3,61 a	3,43b	3,58 a	3,49 ab	ns	0,001	ns
Antocianos (mg/L)	1093	1191	1376	1178	ns	ns	ns
% <i>Aspergillus</i>	4,8 a	1,3 b	1,0 b	0,3 c	0,05	0,005	0,040
OTA vinos (µg/L)	0,45	0,22	0,29	0,23	ns	ns	ns

Como resultante de ese mayor vigor se observaron diferencias significativas del espaciamiento entre plantas con la compacidad de la canopia, observándose una mayor compactación (menores IC) en plantas a 0.80 m de distancia.

Como consecuencia se observó que el porcentaje de luz a nivel de los racimos es afectado significativamente y por tanto la PFD fue mayor en plantas más espaciadas. Por tanto los factores que mostraron una tendencia de interacción entre la altura y el espaciamiento entre plantas fueron el IC ($p=0,067$) y PFD ($p=0,07$).

Coincidiendo con la bibliografía, tanto la altura como el espaciamiento entre plantas (0.50 m vs 0.80 m) no afectaron significativamente la productividad expresada como fruta/m, el peso de bayas y de los racimos (Coniberti *et al.*, 2014).

Los sólidos solubles de la uva, así como la acidez y el contenido de antocianos no fueron afectados por el vigor, no encontrándose correlaciones entre estos parámetros de calidad de la uva y los diferentes indicadores de desarrollo vegetativo de la canopia. Tal

como se esperaba, el pH de la uva se vio incrementado conforme aumenta la densidad de plantación asociado a una mayor compacidad de la canopia. Ello se relacionaría fundamentalmente, tal lo reportado, a un aumento en la translocación de potasio desde las hojas hacia los racimos en canopias más densas (con mayor número de hojas a la sombra), con la consiguiente formación de bitartrato de potasio (como K^+), resultando en una suba del pH (Archer *et al.*, 1990; Coniberti *et al.*, 2012).

El resultado más impactante desde el punto de vista del objetivo principal de nuestro estudio, hace referencia a las diferencias encontradas entre el porcentaje de *Aspergillus* (expresado como infecciones latentes) y el sistema de cultivo. Si bien no se encontró efecto del grado de madurez sobre el porcentaje de infecciones latentes, los resultados mostraron diferencias significativas en el porcentaje de hongos ocratoxigénicos respecto tanto la altura del plano de poda, como al espaciamiento entre plantas y su interacción. En cuanto al contenido de OTA de los respectivos vinos, no mostraron diferencias significativas de acuerdo a estos factores, aunque se aprecia una tendencia positiva con el porcentaje de *Aspergillus* encontrados. Esto puede deberse a que en el proceso de microvinificación de este predio experimental se disminuyó el número de repeticiones analizadas, pasando de 24 parcelas evaluadas a campo a 8 vinos elaborados. Estas diferencias podrían explicarse por un lado, porque las alturas más bajas y por tanto más cercanas al suelo son más susceptibles a la infestación por salpicado por el agua de lluvia portador de esporas (Leong *et al.*, 2007) y por otro, por el microclima próspero para el desarrollo fúngico que se generaría a nivel de los racimos en canopias más densas (Leong *et al.*, 2006a; Hocking *et al.*, 2007), resultantes de la densidad de plantación. Evidentemente ambos factores se potencian, resultando en un mayor nivel de significancia de las infestaciones.

En resumen, si bien la altura del plano de poda y el marco de plantación quedan fijos una vez establecido el viñedo, deben evitarse por parte de los viticultores manejos de suelo, principalmente de la entrefila, de manera de paliar la colonización de los racimos por las esporas de *Aspergillus* spp. que estuvieran presentes allí. Pueden aplicarse manejos de suelo en la fila mediante la incorporación de pasturas (por ejemplo), que mejoren la

calidad de la uvas disminuyendo la susceptibilidad ante el ataque. Finalmente pueden instaurarse diferentes metodologías de deshojado, raleo o rognage como posibles puntos de control críticos. El manejo razonado del aporte de nitrógeno por sus efectos en el vigor y compactación de la canopia y su posible incidencia sobre la presencia de *Aspergillus* (Gráfico 5) se torna indispensable.

En los viñedos analizados en esta tesis se verificó un rango amplio de situaciones: desde predios con alturas al plano de poda de 50 cm que efectúan laboreos intensivos, hasta predios con plantas que están a 90 cm del suelo con pasturas en la fila y entrefila.

Estas prácticas de manejo no son constantes ni generalizadas, y tienen variaciones estivales y anuales, por lo que no sería analizables *sensu stricto*. La detección de estas particularidades determinaron que para la cosecha 2011 se incluyera el predio experimental de INIA, donde se encuentran presentes los sistemas de cultivo más utilizados con repeticiones espaciales.

7.2.3. Microclima, factores biológicos y químicos

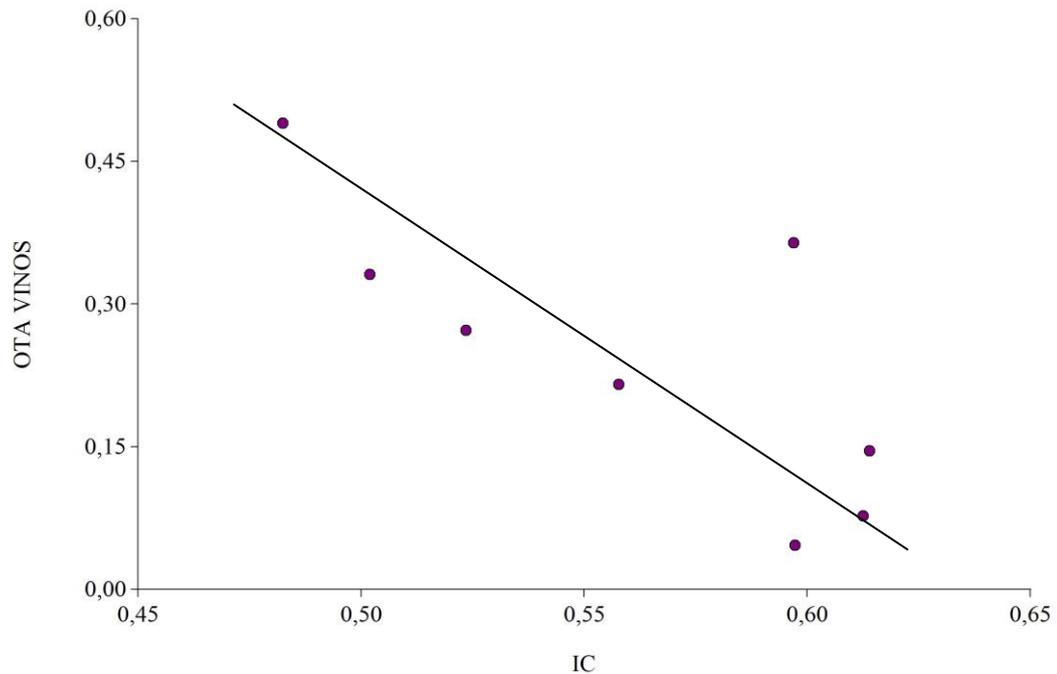
De la misma forma que lo ocurrido en el análisis de la influencia del método de cultivo, el IC (Área foliar expuesta/Área foliar total) mostró una alta correlación con el vigor de la canopia de las plantas cultivadas bajo sistemas de conducción diferentes (Tabla 8).

Tabla 8_ Análisis de varianza de las características de la canopia, la composición de las bayas, la contaminación por *Aspergillus* en porcentaje de bayas infectadas y el contenido de OTA en los vinos elaborados para las parcelas del predio experimental A2 en la cosecha 2011; respecto a: SC (Sistema de conducción) utilizado; Bloque y la interacción de ambas.

Sistema de conducción	Espaldera	Lyra	Significancia		
			SC	Bloque	SC * B1
Características de la canopia					
Peso brote (g)	51,46 a	37,08 b	0,010	0,007	ns
Largo brote (m)	1,46 a	1,18 b	0,010	0,007	ns
Poda/m (kg)	0,51 a	0,38 b	0,010	0,060	ns
AF/m (m ²)	4,89 a	3,90 b	0,009	0,006	ns
IC	0,53 b	0,59 a	0,070	0,030	ns
PFD %	13,9 b	17,1 a	0,003	0,020	0,050
AF/Kg ((m ² /kg)	3,38 a	1,87 b	0,060	ns	ns
IR	2,97	3,31	ns	ns	ns
AF/pl (m ²)	4,89 b	7,80 a	0,002	0,010	0,060
Carga/pl (kg)	1,20 b	2,43 a	0,050	ns	ns
Peso del racimo (g)	254,0	248,2	ns	ns	ns
Composición de la uva					
Sólidos solubles (Brix)	24,3	24,8	ns	ns	ns
Acidez (g/L)	4,32	4,15	ns	ns	ns
pH	3,50	3,57	ns	ns	ns
Antocianos (mg/L)	1390	1338	ns	ns	ns
% <i>Aspergillus</i>	0,52	0,65	ns	ns	ns
OTA vinos (µg/L)	0,35 a	0,14 b	0,060	ns	ns

El análisis de los datos muestra que la presencia de OTA en vinos está íntimamente relacionada al vigor de las plantas y sus parámetros asociados. En particular el IC, ligado a la poda/m y al AF/m, sería el principal elemento afectando la aparición de organismos productores de OTA. En este sentido, los factores de suelo (Bloque) y de cultivo (SC) influyeron en el vigor y por tanto en la compacidad de la canopia. En el sistema de conducción en espaldera fue donde se encontraron menores índices de compacidad (canopias más densas), así como una mayor poda/m, observándose una correlación significativa entre el primer parámetro y el contenido de OTA en vinos (r^2 0,75) (Gráfico 7).

Gráfico 7_ Análisis de regresión para las variables IC: Índice de compacidad y concentración de OTA en los vinos en $\mu\text{g/L}$.



Coincidiendo con los datos experimentales anteriores, a altas relaciones de AF/Kg no se encontraron diferencias entre las variables que afectan la composición de las uvas bajo ambos sistemas. Tal lo mencionado por Emmett (2004), el microclima a nivel de los racimos bajo diferentes sistemas de cultivo sería el responsable del desarrollo fúngico diferencial y la concomitante producción de OTA. La relación inversamente proporcional entre el porcentaje de *Aspergillus* y las producción de OTA en este predio en particular creemos que se debe al muy bajo índice de infestación, por lo que no se encontraron tampoco diferencias significativas entre los porcentajes de *Aspergillus* spp. entre uno y otro sistema de conducción.

Dentro de los factores biológicos, los insectos tienen especial incidencia sobre la contaminación por *Aspergillus* por el daño provocado a las bayas.

En nuestro estudio se evaluó el porcentaje de aparición de plagas en las uvas como las lagartas (*Argyrotaenia sphaleropa*, *Bonagota cranaodes*, *Eulia salubricola* y *Cryptoblabes gnidiella*), el homóptero *Planococcus ficus* y la “Podredumbre ácida” en los racimos analizados. La presencia de plagas, el daño provocado y los residuos de su actividad son fácilmente detectables, pero no constituyen un método de cuantificación en el contexto de los tratamientos evaluados en nuestros ensayos. Se consideraron un valor estimativo de la incidencia, y se encontró que correlacionan directamente con el grado de contaminación fúngica de las bayas. Los datos recabados para las cosechas 2007, 2008 y 2010, se detallan en la tabla 9.

Tabla 9_ Incidencia en porcentaje de racimos afectados en los viñedos evaluados por *B. cinerea*, *P. ficus*, “Podredumbre ácida” y lagartas para los años 2007, 2008 y 2010.

Viñedo	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC	% RAC
	<i>B. cinerea</i> 2007	<i>P. ficus</i> 2007	Pod. ácida 2007	Lagartas 2007	<i>B. cinerea</i> 2008	<i>P. ficus</i> 2008	<i>B. cinerea</i> 2010	<i>P. ficus</i> 2010	Pod. ácida 2010	Lagartas 2010
1	48	4	99	8	52	0	19	3	1	1
2	76	4	88	48	36	0	-	-	-	-
3	52	0	99	12	28	4	-	-	-	-
4	8	0	99	0	0	8	1	5	1	1
5	36	16	96	12	0	0	1	1	0	0
6	24	4	100	0	0	0	0	1	0	0
7	8	0	100	0	0	0	0	1	1	1
8	32	4	99	4	12	0	14	0	4	3
9	44	0	83	24	8	0	-	-	-	-
10	16	0	100	12	12	0	11	6	2	5
11	60	12	90	24	12	0	29	1	7	9
12	20	0	98	12	4	8	-	-	-	-
13	16	0	92	8	8	8	-	-	-	-
14	-	-	-	-	32	0	-	-	-	-
15	12	0	92	0	36	0	33	0	9	4
16	28	20	57	32	44	0	5	4	11	10
17	64	8	99	52	12	0	-	-	-	-
18	20	4	95	0	60	0	2	1	0	1
19	44	0	93	4	8	0	8	3	4	9
20	36	0	100	16	0	4	1	0	0	1
21	28	0	33	4	40	0	4	0	9	9
22	100	0	97	0	16	0	19	1	6	1

Existe una relación entre la incidencia de *B. cinerea* en uvas para cada cosecha y la prevalencia de otros factores biológicos que conllevan al deterioro de las bayas. Y a mayor presencia de estos factores biológicos, mayor incidencia de *Aspergillus*. Pero estos vectores se comportan de manera diferencial de acuerdo al clima, al manejo del cultivo y especialmente al manejo fitosanitario, por el sólo hecho de su naturaleza diferente (insectos, levaduras, bacterias); lo que determina que no se observen coeficientes de correlación significativamente estadísticos entre ellos.

Los pesticidas utilizados para la protección fitosanitaria tienen influencia tanto sobre el crecimiento como la producción de micotoxinas (Medina *et al.*, 2007). A fin de evaluar la posible influencia de los pesticidas sobre la ocurrencia de *Aspergillus* spp., se analizó el programa de aplicación de fitosanitarios utilizado por cada uno de los productores. Esencialmente se encontró que los fungicidas utilizados para el control de *B. cinerea*, *Uncinula necator* y *Plasmopara viticola* muchas veces no son de acción específica, y es de esperar que por el mismo mecanismo de acción afecten a otros hongos; no quedando exentas las especies de *Aspergillus* de su influencia. El principio activo más frecuente fue una Ftalamida (Captan[®], Folpan[®], Folpet[®], Merpan[®]) de acción no específica que se aplicó de igual manera (en cuanto al número de aplicaciones promedio de 14 veces) en el año 2007 y 2008. El número de aplicaciones específicas contra *B. cinerea* aumentó levemente en el año 2008 y se modificaron los productos utilizados. Los principios activos más comunes fueron Bencimidazol, Pirimidinas, Dicarboximida, Ciprodinil y Fludioxinil y en especial en el año 2008 se combinaron con productos sinérgicos como el Fosfito de Potasio. También en 2008 en 5 casos se trataron las uvas con un caldo a base de extractos vegetales y otro desarrollado para control biológico.

A partir de la información generada en este trabajo, creemos altamente probable que los fungicidas utilizados afectan no solo el recuento fúngico en cada predio, como es de esperar, sino también los resultados sobre la incidencia de *Aspergillus* y las correlaciones que se pueden inferir como por ejemplos en la Tabla 6. Es importante destacar que creemos relevante el trabajo de los viticultores para maximizar la eficiencia a la hora de realizar los tratamientos fitosanitarios de los viñedos, ya sea por cuestiones ambientales, como económicas. Sin embargo, no es claro el criterio utilizado en el manejo

de las aplicaciones ya que no son consistentes tanto en el número como en los momentos. Por lo general, se utilizan demasiados productos de amplio espectro, y los específicos no se aplican en un número mínimo de veces, ni en el momento adecuado.

7.3_ PRESENCIA DE OTA EN VINOS Y SUBPRODUCTOS DE LA VINIFICACIÓN

Los análisis químicos de las uvas, mostos y vinos producidos por las propias bodegas participantes en este estudio se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10_ Datos químicos de las uvas, mostos y vinos para los 22 viñedos comerciales en las cosechas 2007 y 2008 (V_AÑO). AF/Kg. Cociente entre el área foliar y la uva producida por parcela (m²/Kg) ANT. Antocianos totales (mg/Kg-mg/L); IPT. Índice de Polifenoles Totales; Precursores aromáticos (NorI. Norisoprenoides, Ter. Terpenos y C6 en µg/L); BotL. Porcentaje de infección emergente de *Botrytis* spp. en las bayas evaluadas; BotV. Porcentaje de incidencia de *B. cinerea* en el viñedo; AspL. Porcentaje de infección emergente de *Aspergillus* spp. en las bayas evaluadas; AC. Acidez expresada en g de H₂SO₄/L; pH; SS. Sólidos solubles en ° Brix; Tar. Concentración de ácido tartárico (g/L); Mál. Concentración de ácido málico (g/L); GA. Grado alcohólico en % de alcohol; OTA; Concentración de ocratoxina A (ng/L).

V_AÑO	UVAS								MOSTOS					VINOS						
	AF/Kg	ANT	IPT	Nor	Ter	C6	BotL	BotV	AspL	AC	pH	SS	Tar	Mál	AC	pH	GA	ANT	IPT	OTA
1_07	1,00	1594	55	1516	308	101	48	-	5	6,2	3,2	22	4,8	4,1	3,6	3,7	11,4	220	59,4	1,0
1_08		1145	124	3080	311	102	6	52	4	5,8	3,3	19	3,7	3,3	3,8	3,9	12,8	150	65	1,2
2_07	0,64	1451	41	3369	248	86	76	-	25	6,3	2,8	20	6,2	3,4	4,4	3,7	10,5	221	71,6	nd
2_08		1239	53	2316	280	101	6	36	29	5,9	3,4	19	3,6	3,6	3,7	4,0	8,5	221	67	6,7
3_07	0,79	1530	59	1423	176	102	52	-	23	5,9	2,8	17	7,0	2,8	4,1	3,5	-	248	47,3	64,5
3_08		1495	64	1565	260	61	0	28	2	5,3	3,2	18	4,4	2,1	3,9	3,5	10,9	146	42	3,0
4_07	2,48	2396	67	984	242	107	8	-	23	4,4	3,3	25	3,2	2,8	3,9	3,8	13,6	560	62,9	nd
4_08		2809	93	798	238	133	4	0	6	4,7	3,4	26	3,4	1,9	3,8	3,5	12,8	877	71	1,5
5_07	1,95	1930	59	1644	311	105	36	-	18	5,4	3,3	25	3,6	2,7	4,0	3,8	14,0	571	62,9	nd
5_08		2385	43	2057	407	213	0	0	4	4,3	3,4	25	3,6	2,2	3,7	3,6	13,7	749	73	2,4
6_07	2,01	1762	60	2130	403	142	24	-	29	4,9	3,4	26	4,2	3,3	4,0	3,8	13,8	472	67,1	nd
6_08		1768	81	1152	228	178	6	0	2	4,5	3,4	25	3,3	2,2	3,8	3,5	14,0	713	64	nd
7_07	2,50	2415	79	426	181	94	8	-	47	5,0	3,5	25	3,6	3,2	3,6	4,0	11,2	441	66,9	nd
7_08		2490	95	1669	180	121	2	0	9	4,8	3,4	25	3,4	2,6	3,5	3,7	14,3	874	86	1,4
8_07	1,09	2177	81	1349	725	138	32	-	73	4,8	3,1	22	5,2	3,0	4,6	3,5	14,0	200	54,5	7,4
8_08		2186	25	1684	277	81	27	12	15	6,0	3,3	20	3,8	2,7	4,6	3,3	12,5	364	56	1,4
9_07	1,03	992	63	2061	273	95	44	-	6	7,3	2,7	17	5,6	4,3	-	-	-	-	-	-
9_08		1626	47	2027	318	132	0	8	2	6,0	3,3	20	3,8	4,5	4,7	3,3	10,5	112	27	1,4
10_07	0,77	1993	51	2285	416	80	16	-	90	6,2	3,0	22	4,6	3,5	6,2	3,6	11,4	197	56,9	14,9
10_08		1421	50	1442	309	83	0	12	8	6,0	3,2	20	4,4	3,2	3,3	3,7	10,9	449	66	nd
11_07	0,79	1472	55	506	201	100	60	-	8	6,4	3,2	20	3,8	3,5	3,9	3,7	11,8	124	62,5	nd
11_08		1430	94	1141	291	78	6	12	23	6,0	3,3	19	4,2	3,2	3,3	3,7	10,9	449	66	nd
12_07	0,91	1339	66	964	412	81	20	-	9	-	-	-	-	-	3,3	3,8	15,3	334	75,0	21,5
12_08		2011	76	1373	212	60	0	4	6	4,8	3,3	23	4,1	2,1	3,4	3,8	15,3	515	95	nd
13_07	0,83	1713	68	1417	333	111	16	-	13	4,7	3,3	25	5,4	3,0	3,5	3,8	-	404	84,6	13,9
13_08		2266	65	1627	1149	95	0	8	4	4,9	3,2	22	3,7	1,8	4,6	3,7	12,9	827	95	1,6
14_07	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14_08		2056	67	1769	374	51	31	32	13	4,9	3,4	22	4,0	2,4	3,1	3,9	13,3	519	85	1,0
15_07	0,72	1708	53	1876	380	108	12	-	8	6,2	3,3	23	5,6	4,1	3,3	3,6	12,6	239	46,0	7,6
15_08		1577	42	1175	292	123	6	36	8	5,7	3,3	21	4,3	3,1	3,5	3,6	11,2	521	59	1,4
16_07	0,72	1920	45	1956	373	85	28	-	22	6,2	3,1	20	5,2	3,8	3,2	3,5	11,7	141	46,9	nd
16_08		1904	89	2010	317	111	2	44	6	5,6	3,3	20	4,1	2,6	3,3	3,5	9,7	249	32	3,4
17_07	0,63	1524	49	-	-	-	64	-	58	7,1	2,9	17	4,0	4,6	3,2	3,8	11,4	350	44,7	10,7
17_08		1734	57	2779	306	64	10	12	29	6,1	3,3	20	3,8	4,1	4,0	3,6	10,3	328	44	1,2

Continúa en siguiente página.

18_07	0,64	1957	66	400	215	104	20	-	3	5,5	3,2	23	5,0	3,0	-	-	-	-	-	-
18_08		2051	75	1954	308	92	15	60	6	5,0	3,5	23	3,2	2,8	5,5	2,8	13,2	789	94	6,1
19_07	1,52	2459	58	360	215	123	44	-	42	6,1	3,3	20	4,4	3,9	4,0	3,6	11,7	492	74,9	18,4
19_08		2400	69	190	194	89	10	8	17	5,4	3,3	23	3,8	2,4	3,7	3,6	13,0	672	70	1,2
20_07	1,22	2237	61	1526	412	141	36	-	30	5,5	3,3	25	4,0	3,2	3,5	3,8	13,8	491	67,4	67,2
20_08		3061	94	1048	326	76	2	0	17	4,6	3,3	24	3,9	2,1	3,8	3,6	13,0	666	73	2,8
21_07	1,18	2051	75	1465	162	70	28	-	7	5,6	2,9	24	3,8	3,5	3,5	3,9	13,6	500	79,2	1,2
21_08		1311	50	2760	267	86	2	40	8	5,9	3,3	19	3,5	4,1	3,5	3,9	12,2	416	74	5,7
22_07	1,46	1342	43	6190	501	247	100	-	6	4,7	3,3	25	-	-	3,5	3,9	-	215	64,1	25,4
22_08		2210	104	2396	294	130	0	16	0	5,3	3,3	21	4,1	2,6	3,5	3,7	11,8	325	60	1,6

Los datos característicos de las uvas y de las infecciones emergentes de *B. cinerea* y *Aspergillus* spp. fueron incluidos de manera de facilitar una evaluación conjunta de los posibles puntos críticos de control en toda la cadena de producción-industrialización.

Si se considera la influencia entre el estado de madurez de la uva en el momento de la cosecha y la calidad de los respectivos vinos, los resultados obtenidos para las cosechas 2007 y 2008 indican que los determinantes de la calidad de las uvas -el principal factor interviniente es la relación existente el área foliar y la producción de uva (AF/Kg)- tienen una alta correlación con los sólidos solubles (SS, $r^2 = 0.78$) medidos en los mostos, y estos a su vez con los antocianos totales (ANT, $r^2 = 0.88$), la acidez (AC, $r^2 = -0.82$) y el pH ($r^2 = 0.73$) de los vinos (con $p \leq 0.05$ en todos los casos). Los resultados de los análisis sensoriales coinciden en destacar la potencialidad exportadora de los vinos que tienen mejores indicadores de calidad desde las uvas. Pero ninguno de estos datos químicos se correlaciona con el porcentaje de *Aspergillus* encontrados en los viñedos (*Asp L*) y/o las concentraciones de OTA en los vinos, como se ha reportado (Rousseaux *et al.*, 2014).

Lo más importante a detallar según los propios objetivos de esta tesis es el contenido de OTA en los vinos de los productores involucrados. Los valores encontrados fueron variables aunque se mantuvieron dentro de un rango muy por debajo del límite preestablecido de 2 ppb según las reglamentaciones vigentes (Tabla 11).

Debe destacarse que la metodología de cuantificación se modificó pasando del método AOAC al método desarrollado en este trabajo utilizando columnas de SPE, pero se llevó a cabo la ineludible validación de los procedimientos. Las curvas de calibración se realizaron a partir de soluciones de OTA estándar entre 0,1 y 20,0 $\mu\text{g/L}$ en metanol y el coeficiente de correlación obtenido (r^2) fue 0,999 en ambos casos. El límite de detección (LD) fue de 0,0005 μg de OTA/L de vino y el límite de cuantificación (LQ) de 0,0050 μg de OTA/L de vino por el método AOAC y LD de 0,005 μg de OTA/L de vino y LQ de 0,001 μg de OTA/L de vino para el método SPE.

Tabla 11_ Niveles de OTA en vinos expresado en ppb (μg de OTA/L) de vino determinados según AOAC Official method 2001.01 para 2007 y 2008 y según método de SPE para 2010 en muestras de los 22 viñedos (1-22). nd: no detectable.

	2007	2008	2010			2007	2008	2010
1	0,0010	0,0012	0,0008		12	0,0215	nd	-
2	nd	0,0067	-		13	0,0139	0,0016	-
3	0,0645	0,0030	-		14	-	0,0010	-
4	nd	0,0015	0,0002		15	0,0076	0,0014	0,0080
5	nd	0,0024	0,0002		16	nd	0,0034	0,0001
6	nd	nd	0,0002		17	0,0107	0,0012	-
7	nd	0,0014	0,0002		18	-	0,0061	0,0002
8	0,0074	0,0014	nd		19	0,0184	0,0012	0,0078
9	-	0,0014	-		20	0,0672	0,0028	nd
10	0,0149	nd	0,0004		21	0,0012	0,0057	0,0003
11	nd	nd	0,0016		22	0,0254	0,0016	0,0002

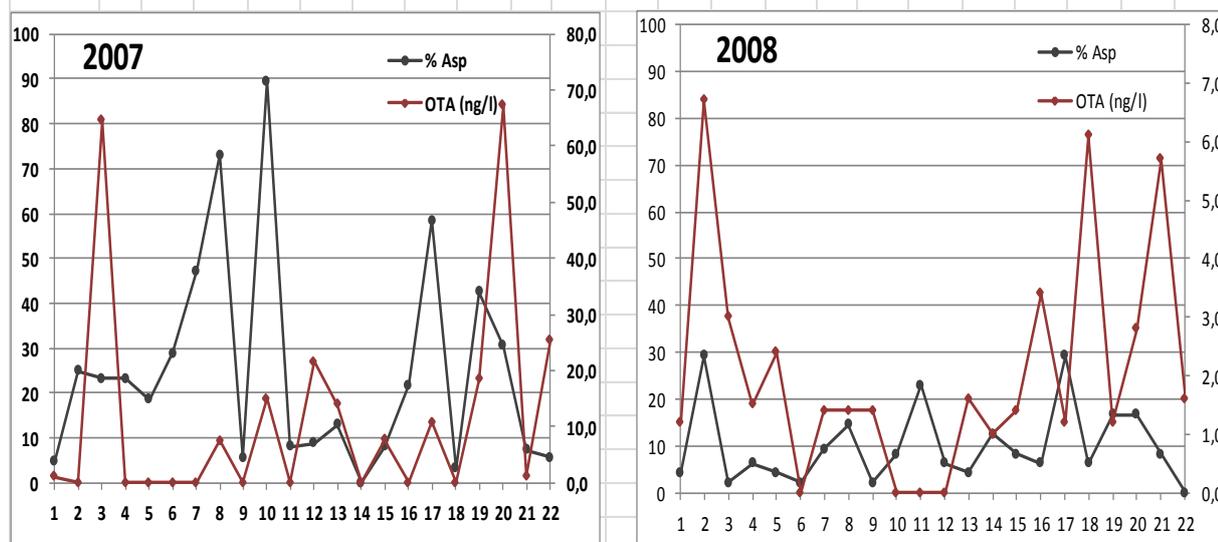
Según prácticas de gestión propias de cada bodega participante se elaboraron los vinos y muestras representativas de cada vinificación, y fueron remitidas a nuestro laboratorio siempre y cuando se considerará que cumplieran con las exigencias de calidad para un vino de exportación. Como puede observarse, en el año 2007 en tres oportunidades (Predios 9, 14 y 18) no fue posible analizar el contenido de OTA en los vinos. En estos casos, el principal causante del deterioro de los vinos, según la opinión de los enólogos responsables, fue el estado sanitario de las uvas al momento de la cosecha, que condicionó un proceso de vinificación cuyos resultados en principio impredecibles (bajo contenido de antocianos, acidez volátil, podredumbre ácida, etc), fueron negativos.

Las concentraciones de OTA detectadas están por debajo también de los valores promedio reportados en la literatura (Lopez de Cerain *et al.*, 2002; Soufleros *et al.*, 2003), aunque en cualquier caso, hay que indicar que debido sobre todo a los diferentes límites de detección de los métodos analíticos, no se pueden comparar los resultados de diferentes estudios (Remiro 2011). Estos bajos niveles se deben además a que, principalmente en los últimos años, se han impuesto prácticas de procesamiento, que obligan a mantener las instalaciones y su entorno ordenados y limpios; utilizando condiciones de trabajo más apropiadas, y el uso de contenedores, tanques y equipamiento limpios, refrigerados y contruidos en materiales adecuados para garantizar condiciones de higiene básicas en las bodegas.

Si bien el mayor contenido de OTA en vinos se asociaría a una mayor presencia de aislamientos de *Aspergillus* spp. en las uvas de cada predio, en este trabajo no se encontró una correlación significativa entre ambos parámetros (r^2 cercano a 0.20). Como se representa en el gráfico 8, altos niveles de infección latente de *Aspergillus* spp. en campo no se corresponden con altos niveles de la toxina en vino y viceversa; como mencionáramos anteriormente.

Gráfico 8_ Correlación entre el porcentaje de aislamientos de *Aspergillus* spp. para cada uno de los 22 predios comerciales (1-22) en los años 2007 y 2008 y la concentración de OTA (ng/L) en los respectivos vinos.

2007	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
% Asp	5	25	23	23	18	29	47	73	6	90	8	9	13	nm	8	22	58	3	42	30	7	6
OTA (ng/l)	1,0	nd	64,5	nd	nd	nd	nd	7,4	nm	14,9	nd	21,5	13,9	nm	7,6	nd	10,7	nm	18,4	67,2	1,2	25,4
2008	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
% Asp	4	29	2	6	4	2	9	15	2	8	23	6	4	13	8	6	29	6	17	17	8	0
OTA (ng/l)	1,2	6,7	3,0	1,5	2,4	nd	1,4	1,4	1,4	nd	nd	nd	1,6	1,0	1,4	3,4	1,2	6,1	1,2	2,8	5,7	1,6



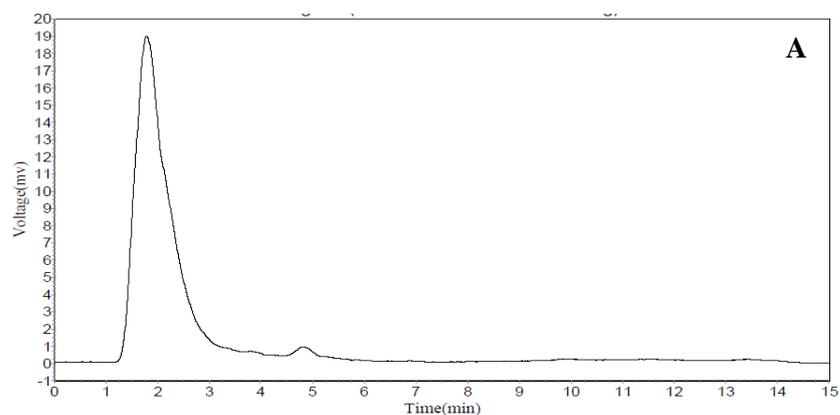
Esta situación puede ser consecuencia, como hemos expuesto anteriormente a que las distintas cepas tienen diferente potencial intrínseco de síntesis de OTA, o bien a que distintas prácticas de elaboración del vino promueven o inhiben la aparición de OTA en los vinos. En algunas bodegas, variaciones en el contenido de OTA pueden deberse a la práctica del “sangrado” en la vinificación (separación del hollejo del mosto escurriéndolo de modo que se quita parte del líquido y se retienen los sólidos) (muestras 2, 10 y 11) y a tiempos de maceración muy prolongados (muestras 19 y 20).

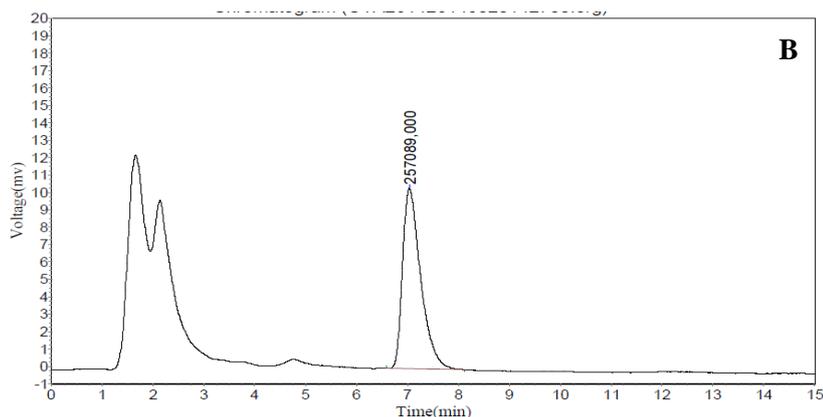
Por estos factores variables en la cosecha 2010 se decidió que la elaboración se llevara a cabo a escala de microvinificaciones en la Estación Experimental de INIA.

En el 2011 las muestras se obtuvieron de los viñedos experimentales de modo de corroborar el destino de la OTA en el proceso de vinificación, en base a que la cosecha pudo monitorearse mejor y las uvas fueron cosechadas en su máximo potencial de madurez. Por los bajos niveles de IL y OTA en vinos detectados en los años anteriores, se evaluó que las posibilidades de cuantificación eran reducidas y, en consecuencia, se optó por no evaluar las muestras de mostos (M) y jugos del prensado (J2).

En las muestras de los jugos fermentados se detectó presencia de OTA según el método SPE, pero a niveles no cuantificables. Los cromatogramas de la Figura 17 corresponden a una muestra de jugo fermentado (J1) donde se demuestra la sensibilidad del método y los análisis de inclusión de patrón interno para la confirmación de la identificación de la OTA. El detector DAD conectado en serie también permitió la caracterización espectral de los picos ante la posible presencia de OTA.

Figura 17_ Cromatogramas de una muestra de jugo fermentado (J1) generado a partir de las uvas del viñedo 18 (A) y la misma muestra a la que se le agregó estándar de OTA para obtener una concentración final de 20.2 $\mu\text{g/L}$ (B).

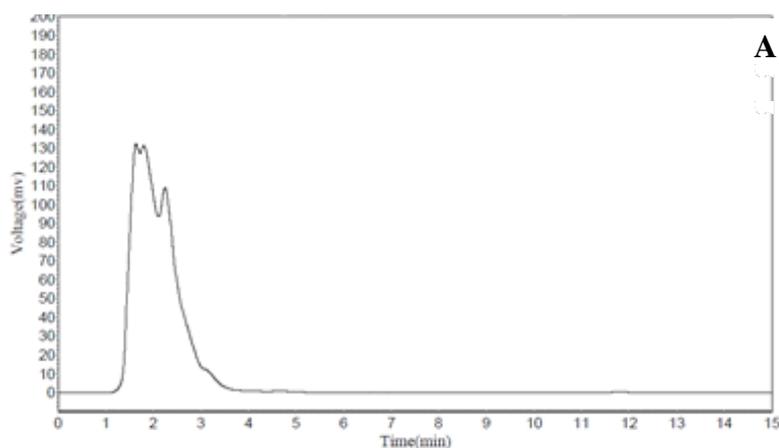


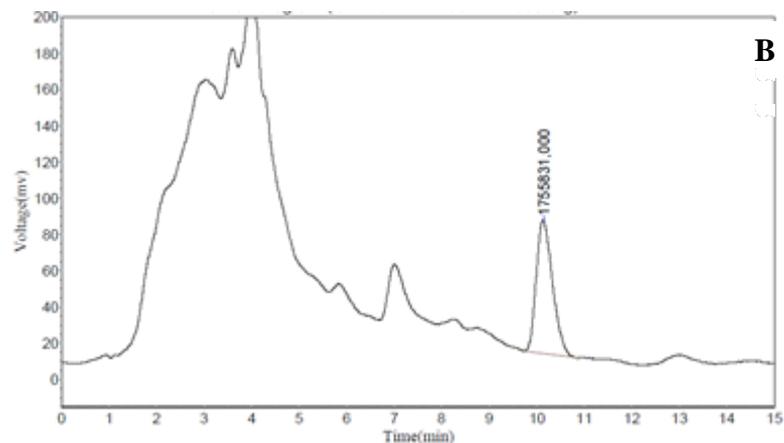


En oposición con lo ocurrido en la metodología aplicada a la cuantificación de OTA en los vinos, se aprecian diferencias notorias en la validación de los métodos para la determinación de la micotoxina en los orujos.

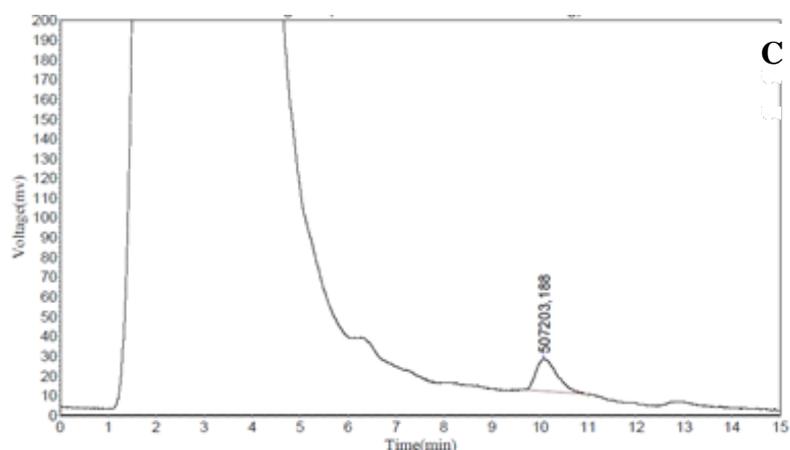
En primera instancia con la determinación de acuerdo a la técnica de Ribeiro y Alves (2008) (Método R) el coeficiente de correlación obtenido (r^2) fue 0,9998 y el límite de detección (LD) de 0,25 μg de OTA/Kg y el límite de cuantificación (LQ) de 0,50 μg de OTA/Kg. No fue posible la detección de la OTA en la mayoría de las muestras (Figura 18A). Este resultado que se opone a lo esperado ya que más del 90 % de la micotoxina en el proceso de vinificación acaba en el orujo (Solfrizzo *et al.*, 2008; Visconti *et al.*, 2008).

Figura 18_ Cromatogramas de HPLC-FD de las muestras generadas a partir de la vinificación de las uvas del viñedo experimental, parcela SC2. Muestra de orujo analizada según el método R (A); Muestra de orujo analizada según el método S (B) y Muestra del vino obtenido analizado según el método SPE (C).





Continúa en siguiente página.



En el 2010 sólo los orujos provenientes del prensado de los vinos de los viñedos 10 y 20 alcanzaron valores cuantificables de 8,4 y 23,5 μg de OTA/Kg, respectivamente. Para el año 2011 cuando se analizaron las muestras de los ensayos experimentales, se detectó OTA en 12 de 16 muestras pero a muy bajos niveles de 1,53 μg de OTA/Kg promedio (1,45 – 2,29 μg de OTA/Kg mínimo y máximo, respectivamente).

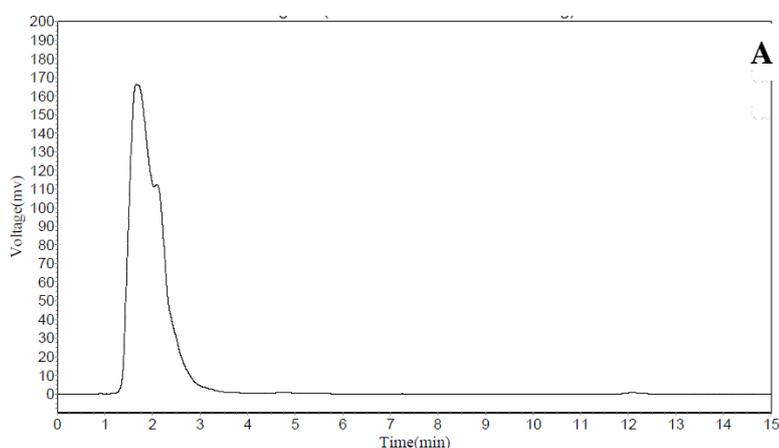
Cuando se realizó la determinación en base a Solfrizzo *et al.* (2008) (Método S) las líneas de base de los cromatogramas fueron más irregulares, pero dentro del tiempo de corrida puede apreciarse el pico correspondiente a la OTA sin interferencias próximas y se confirman por DAD (Figura 18B). El coeficiente de correlación obtenido (r^2) fue 0,995, el límite de detección (LD) de 25,0 μg /Kg peso seco y el límite de cuantificación (LQ) de 25,0 μg /Kg peso seco.

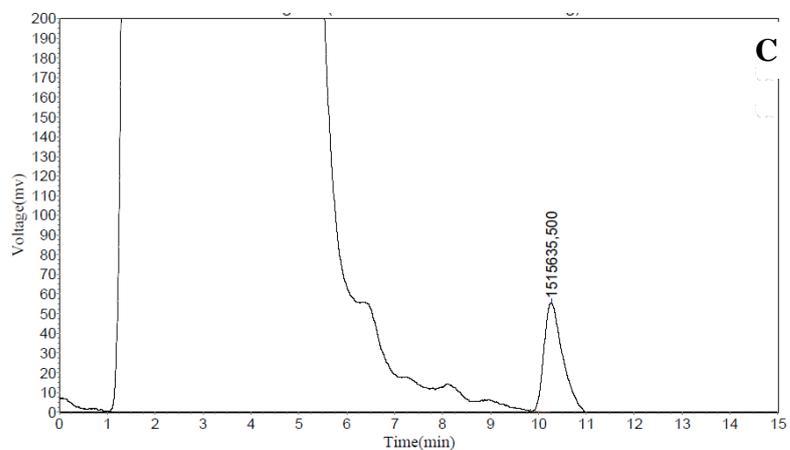
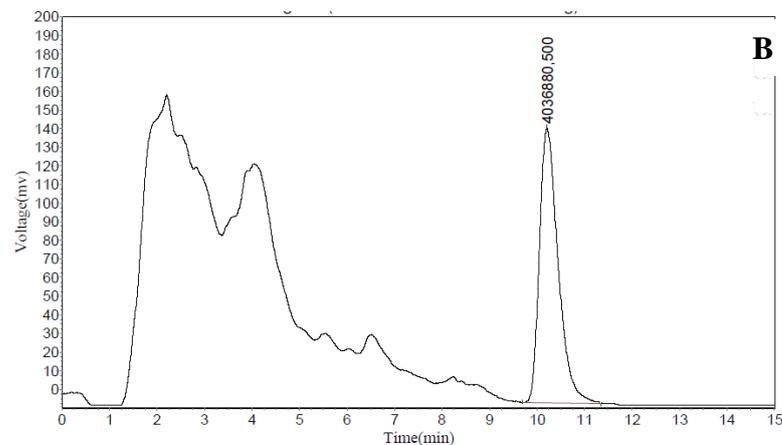
Todos los orujos producidos en 2010 y 2011 estuvieron contaminados por OTA a niveles de entre 64,3 a 253,9 y entre 317,2 a 1123,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en base a peso seco, respectivamente. Los valores promedios fueron 120,3 y 678,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en base a peso seco, en los orujos de las uvas de los viticultores y de la estación experimental, respectivamente. Según los cálculos en peso fresco los valores se triplican, dado que los porcentajes de peso seco en cada uno de los orujos van desde 32 a 39%. Estas cifras equivalen en promedio a 2 mg de OTA por kilo de orujo fresco, y la concomitante alerta sobre el descarte de este subproducto y/o su utilización como alimento animal.

En la muestra de vino de la misma parcela mostrada en la Figura 18 se detectó un pico de OTA por encima del límite de detección con el mismo tiempo de retención (C). Los resultados de linealidad para la determinación de OTA en vinos ya fueron descritos antes en este capítulo.

En la figura 19 se muestran los cromatogramas de una muestra con altos niveles de OTA en ambas matrices, orujo y vino.

Figura 19_ Cromatogramas de HPLC-FD de las muestras generadas a partir de la vinificación de las uvas del viñedo experimental, parcela DP1. Muestra de orujo analizada según el método R (A); Muestra de orujo analizada según el método S (B) y Muestra del vino obtenido analizado según el método SPE (C).





Y en la Tabla 12 se detallan las concentraciones de OTA promedios para cada uno de los orujos evaluados (según el método S) y los respectivos vinos.

Tabla 12_ Concentraciones de OTA en orujos expresadas en μg de OTA/Kg en peso seco determinadas por el método S, y en vinos expresadas en ppb (μg de OTA/L) determinadas según el método de SPE para las cosechas 2010 en muestras de los viñedos comerciales (1-22) y 2011 en los ensayos experimentales DP (Densidad de Plantación) y SC (Sistema de Conducción). nd: no detectable.

	OTA (2010)			OTA (2011)	
	Orujo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Vino ($\mu\text{g}/\text{L}$)		Orujo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Vino ($\mu\text{g}/\text{L}$)
1	91,9	0,0008	DP1	651,8	0,29
4	72,6	0,0002	DP2	606,1	0,29
5	87,9	0,0002	DP3	719,9	0,16
6	120,7	0,0002	DP4	699,2	0,18
7	218,9	0,0002	DP5	901,4	0,17
8	180,5	nd	DP6	920,5	0,29
10	122,9	0,0004	DP7	976,2	0,24
11	137,3	0,0016	DP8	893,7	0,71
15	129,5	0,0080	SC2	317,2	0,15
16	64,3	0,0001	SC4	379,7	0,27
18	107,5	0,0002	SC13	740,8	0,33

Se observó que a mayores índices de madurez de las uvas, el contenido de OTA en los orujos y/o en los vinos era mayor (datos no mostrados). Pero como se demuestra en la Tabla 12 no se encontraron relaciones entre los niveles de OTA en orujo y en vinos.

Una vez estandarizados los métodos de vinificación, la presencia de *Aspergillus* spp. en las uvas no correlacionó con los niveles de OTA en los orujos y en los vinos. Esto se debe, como mencionamos, a la baja incidencia de la infección. Puede ser necesario la puesta a punto de un método sensible para la determinación de OTA en los mostos para aquellas temporadas donde la presencia de hongos sea mayor y así aplicar adecuadamente las prácticas enológicas discutidas anteriormente. Creemos necesario además, manejar con precaución los datos de concentración de OTA de acuerdo a los métodos de cuantificación utilizados, las características de la matriz y la sensibilidad y precisión requeridos.

CAPITULO 8_

CONCLUSIONES

Según la evaluación fenotípica y genética de las cepas de *Aspergillus* spp. aisladas de las uvas de la variedad *Tannat* en viñedos del Uruguay hay presencia de hongos productores de OTA. Mayormente pertenecen a la sección *Nigri* no habiéndose detectado la presencia de *A. carbonarius*.

Pese a esto y a las condiciones climáticas predisponentes se detectaron concentraciones de OTA muy por debajo de los límites permitidos en los vinos según las reglamentaciones vigentes.

Prácticas pre-plantación, tales como la altura del plano de poda y la distancia entre plantas, afectan la presencia de estos hongos. Seguramente asociado a la cercanía al suelo, inóculo principal de las esporas y a la compactación de la canopia.

El microclima al que están expuestos los racimos y especialmente el vigor de las plantas afecta significativamente la presencia de *Aspergillus* en las uvas y los niveles de OTA en los vinos.

Prácticas de manejo razonado del viñedo en que se consideran deshojados, uso racional de la fertilización nitrogenada y de productos fitosanitarios deberían promoverse a fin de evitar la presencia de hongos ocratoxigénicos en uvas.

El estado de la uva a la entrada de la bodega debería ser un factor a considerarse para evaluar las prácticas a llevar a cabo, especialmente modificar los tiempos de maceración, a efecto de evitar o disminuir la aparición de la ocratoxina en el vino.

ANEXO_ *Composición y preparación de medios*

Malt Agar con antibióticos (MA₂)

Es el medio de cultivo recomendado para la propagación general de microorganismos que sirve para el crecimiento del género *Aspergillus*, según se enuncia en las recomendaciones de ATCC (American Type Culture Collection) (ATCC, 2013).

Mezclar 20 g de extracto de malta y 20g de agar con 1 L de agua destilada. Fundir por 10 min a 110°C en autoclave. Esterilizar por 20 min a 121°C en autoclave. Dispensar en placas bajo cámara de flujo. Almacenar en heladera.

Por cada litro de medio agregar 1 mL de solución de estreptomicina (0,2 g/mL).

Potato Dextrose Agar (PDA)

Es un medio adecuado para el cultivo de levaduras y hongos. Suministra los nutrientes necesarios para fomentar la esporulación y la producción de pigmentos. El bajo pH del medio favorece el crecimiento de los hongos, pero inhibe el crecimiento de bacterias que pueden interferir en la recuperación de los hongos de interés. Es otro medio de cultivo recomendado para la propagación del género *Aspergillus*, según se enuncia en las recomendaciones de ATCC (ATCC, 2013). Fue suministrado por BD (Sparks, Md, USA)

Se disuelven 39 g de PDA en 1 L de agua destilada y se esteriliza por 20 min a 121°C en autoclave. Se dispensa en placas bajo cámara de flujo. Almacenar en heladera.

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)

Es un medio común recomendado tanto para hongos como bacterias. Es particularmente adecuado para muestras frescas y con alta a_w , principalmente selectivo para hongos que intervienen en el deterioro de alimentos. Este medio contiene dicloran y rosa bengala para restringir el tamaño de la colonia, especialmente de *Rhizopus* spp. que

puede crecer y ocultar rápidamente los aislamientos de *Aspergillus* crecidos en placa. Fue suministrado por Oxoid Inc. (Ontario, CA)

Suspender 31.5 g en 1 L de agua destilada y calentar para disolver completamente. Agregar 10 mg de Cloranfenicol y esterilizar por 20 min a 121 °C en autoclave. Mantener a 50 °C para dispensar 0,3 mL en cada pocillo de las placas utilizadas para la incubación de las bayas. Mantener en heladera.

Sabouraud Dextrosa Modificado

Este medio es utilizado para el crecimiento de hongos filamentosos. Fue utilizado para el crecimiento de los aislamientos identificados como pertenecientes al género *Aspergillus* previo a la extracción del ADN para los ensayos genéticos. Se logró así la propagación de las hifas y la inhibición de la esporulación para evitar la producción de pigmentos que interfieren en la técnica de extracción de ADN utilizada, bajando su rendimiento y calidad.

Se mezclan 40 g de dextrosa y 20 g de peptona con 1 L de agua destilada. Se funde calentando y se dispensan 25 mL en matraces Erlenmeyer de 100 mL. Se tapan con algodón envuelto en gasa y papel aluminio, y se esterilizan por 20 min a 121°C en autoclave. Se almacena en heladera.

Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

Es un medio útil para el crecimiento de hongos y levaduras del suelo. Se utilizó para testear la habilidad de las diferentes especies aisladas de producir OTA. El Czapek Dox Broth fue suministrado por BD (Sparks, Md, USA).

Se mezclan 35 g de Czapek Dox Broth, 5 g de extracto de levadura y 15 g de agar. Se disuelven en 1 L de agua destilada y se le agrega 1 mL de solución de trazas de metales (Cu SO_{4.5}H₂O/ZnSO_{4.7}H₂O). Se funde calentando y se esteriliza en autoclave por 20 min a 121 °C. Se dispensa en placas en cámara de flujo. Se mantiene en heladera.



REFERENCIAS

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañez, F.J. (2003) *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66, 504-506.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. y Cabañez, F.J. (2004) Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 33-49.
- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañez, F.J. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2650-2652.
- Abdulkadar, A.H.W., Abdulla, A., Al-Ali, A.M., Al-Kildi, A.M. y Al-Jedah, J.H. (2004) Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15, 543-548.
- Abed, K.F. (2008) Differentiation of *Aspergillus niger* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1027-1032.
- Abrunhosa, L., Calado, T. y Venâncio, A. (2011) Incidence of fumonisin B(2) production by *Aspergillus niger* in Portuguese wine regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7514-7518.
- Abrunhosa, L., Costa, M., Areias, F., Venâncio, A. y Proença, F. (2007) Antifungal activity of a novel chromene dimer. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 787-793.
- Abrunhosa, L., Fernandes, A. y Venâncio, A. (2005) Ochratoxin A removal during the main steps of wine making 7° *Encontro de Química dos Alimentos*. ESAV - IPV / SPQ, Viseu.
- Accensi, F. (2000) Aportación al conocimiento de *Aspergillus* sección *Nigri* *Departament de Patologia i Producció Animals*. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Accensi, F., Abarca, M.L., Cano, J., Figuera, L. y Cabañez, F.J. (2001) Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 365-370.
- Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L. y Cabañez, F.J. (1999) New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180, 191-196.

-
- Akdeniz, A.S., Ozden, S. y Alpertunga, B. (2013) Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey. *Food Additives and Contaminants*, 6, 265-269.
- Alexa, E., Poiana, M.A. y Sumalan, R.M. (2012) Mycoflora and Ochratoxin A Control in Wheat Grain Using Natural Extracts obtained from Wine Industry By-Products. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 4949-4967.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H. y Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9, 357-378.
- Alonzo, E., Cafarella, N., Duplicato, G., Maugeri, A., Platania, F., Raciti, C. y Fardella, M. (2008) The prevention of ochratoxina (OTA) in the wine. *Igiene e Sanita Pubblica*, 64, 163-175.
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A. y Guiraud, J.P. (2012) OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26, 259-268.
- Archer, E. y Strauss, H.C. (1990) The effect of plant spacing on some physiological aspects of *Vitis vinífera* L. (cv. Pinot noir). *South African Journal for Enology and Viticulture*, 11, 76-87.
- Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Omer, M.K., Nesbakken, T. y Skaar, I. (2011) A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control*, 22, 831-837.
- Astoreca, A.L., Magnoli, C.E. y Dalcerro, A.M. (2010) Ecophysiology of *Aspergillus* section *Nigri* Species Potential Ochratoxin A Producers. *Toxins*, 2, 2593-2605.
- ATCC (2013) Product Sheet: *Aspergillus niger* (ATCC 16888TM). www.atcc.org.
- Atoui, A., Mathieu, F. y Lebrihi, A. (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.
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I. y Di Rienzo, J. (2010) *Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen*, Córdoba, Argentina.
- Balzarini, M. y Di Rienzo, J. (2004) *Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 243-259.
- Barkai-Golan, R. y Paster, N. (2008) *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press, San Diego, USA.

-
- Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simón, B. y Marty, J.L. (2011) Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control*, 22, 737-743.
- Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S. y Luna-Alves Lima, E.A. (2008) Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, 7, 706-717.
- Battilani, P. (2008) Prevention of ochratoxin A in grapes and wine. In Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A. (eds) *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. CAB International, pp. 245-256.
- Battilani, P., Barbano, C., Marín, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. y Magan, N. (2006a) Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S72-S82.
- Battilani, P., Barbano, C., Rossi, V., Bertuzzi, T. y Pietri, A. (2006b) Spatial distribution of ochratoxin A in vineyard and sampling design to assess must contamination. *Journal of Food Protection*, 69, 884-890.
- Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S. y Pietri, A. (2006c) Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S53-S60.
- Battilani, P., Giorni, P. y Pietri, A. (2003) Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grapes. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 715-722.
- Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T. y Pietri, A. (2004a) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1736-1740.
- Battilani, P., Magan, N. y Logrieco, A. (2006d) European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S2-S4.
- Battilani, P. y Pietri, A. (2002) Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 639-643.
- Battilani, P., Pietri, A. y Logrieco, A. (2004b) Risk assessment and management in practice: Ochratoxin in grapes and wine. In Magan, N., Olsen, M. (eds) *Mycotoxins in food: Detection and Control*. Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom, pp. 244-261.
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S. y Cabañez, F.J. (2006a) Ochratoxin a producing fungi from Spanish vineyards. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 173-179.
-

-
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S. y Cabañez, F.J. (2005a) Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 125-130.
- Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R. y Cabañez, F.J. (2006b) RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S18-S21.
- Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R. y Cabañez, F.J. (2005b) DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology*, 156, 375-381.
- Bazin, I., Andreotti, N., Ibn Hadj Hassine, A., De Waard, M., Sabatier, J.M. y Gonzalez, C. (2013) Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin: A new approach in conception of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 240-246.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. y Lebrihi, A. (2006a) Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S46-S52.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. y Lebrihi, A. (2006b) Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters*, 255, 203-208.
- Bellí, N. (2006) Ochratoxin A and ochratoxigenic moulds in grapes, must and wine. Ecophysiological Studies *Departament de Tecnologia d'Aliments*. Universitat de Lleida.
- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J. y Bragulat, M.R. (2006a) Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S40-S45.
- Bellí, N., Marín, S., Argilés, E., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2007) Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Food Protection*, 70, 157-163.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2006b) Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1021-1029.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2002) Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulations and methods of analysis. *Food Science and Technology International*, 8, 325-335.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V. y Marín, S. (2005) *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 839-844.

-
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2006c) Effect of photoperiod and day–night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology*, 23, 622-627.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2004) Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 72-77.
- Bellver, M.J. (2013) Evaluación del riesgo de exposición a ocratoxina A *Facultat de Farmàcia*. Universitat de València.
- Bennett, J.W. y Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G. y Stroka, J. (2013) Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 165-186.
- Bisbal, F., Gil, J.V., Ramón, D. y Martínez-Culebras, P.V. (2009) ITS-RFLP characterization of black *Aspergillus* isolates responsables for ochratoxin A contamination in cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 229, 751-757.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C. y Mañes, J. (2006) Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 473-478.
- Bliesner, D.M. (2005) Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. John Wiley & Sons, Inc.
- Boido, E. (2002) Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la fracción aromática de los vinos Tannat. *Sección Enología*. Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Boido, E., Dellacasa, E., Carrau, F. y Moyna, P. (1999) An improved means of monitoring malolactic fermentation in wines by TLC-densitometry. *Journal of Planar Chromatography*, 12, 269-271.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G. y Dellacasa, E. (2003) Aroma Composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: the Typical Red Wine from Uruguay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5408-5413.
- Botton, A., Ferrigo, D., Scopel, C., Causin, R., Bonghi, C. y Ramina, A. (2008) A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 105-115.
-

-
- Bouras, N., Mathieu, F., Coppel, Y., Strelkov, S.E. y Lebrhi, A. (2007) Occurrence of naphtho-gamma-pyrones- and ochratoxin A-producing fungi in French grapes and characterization of new naphtho-gamma-pyrone polyketide (aurasperone G) isolated from *Aspergillus niger* C-433. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8920-8927.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. y Cabañez, F.J. (2001) An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 139-144
- Brera, C., Debegnach, F., Minardi, V., Prantera, E., Pannunzi, E., Faleo, S., De Santis, B. y Miraglia, M. (2008) Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in the Italian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10611-10618.
- Brera, C., Grossi, S., De Santis, B. y Miraglia, M. (2003) Automated HPLC method for the determination of ochratoxin A in wine samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26, 119-133.
- Brera, C., Soriano, J.M., Debegnach, F. y Miraglia, M. (2005) Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal*, 79, 109-113.
- Bueno, D.J., Soria, M.C., González, H.L., Sampietro, D.A., Federico, J.F. y Silva, J.O. (2011) Fungi and mycotoxins in food. In Filip, R. (ed) *Multidisciplinary Approaches on Food Science and Nutrition for the XXI Century*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 215-243.
- Bufflier, E., Susca, A., Baud, M., Mulé, G., Brengel, K. y Logrieco, A. (2007) Detection of *Aspergillus carbonarius* and other black aspergilli from grapes by DNA OLISA™ microarray. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1138-1147.
- Burdaspal, P. y Legarda, T. (2007) Ocurrance of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Additives and Contaminants*, 24, 976-986.
- Cabañez, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minguez, S. y Pons, A. (2002) What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79, 213-215.
- Carbonneau, A. (2009) Evolution of canopy management: from history to modeling. Recent advances in grapevine canopy management. University of California, Davis. p. 27-42.
- Carlile, M.J. y Watkinson, S.C. (1996) *The Fungi*. Academic Press, England.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. y Pfohl-Leskowicz, A. (2006) Balkan endemic nephropathy: role of

ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 519-529.

Castellari, M., Fabbri, S., Fabiani, A., Amati, A. y Galassi, S. (2000) Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *Journal of Chromatography A*, 888, 129-136.

Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P. y Galassi, S. (2001) Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3917-3921.

Cecchini, F., Morassut, E., García Moruno, E. y Di Stefano, R. (2006) Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*, 23, 411-417.

Cigić, I.K., Strlič, M., Schreiber, A., Kocjančič, M. y Pihlar, B. (2006) Ochratoxin A in wine: Its determination and photostability. *Analytical Letters*, 39, 1475-1488.

Clouvel, P., Bonvarlet, L., Martínez, A., Lagouarde, P., Dieng, I. y Martín, P. (2008) Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 74-80.

Coniberti, A., Ferrari, V., Fariña, L., Carrau, F., Dellacasa, E., Boido, E. y Disegna, E. (2012) Role of canopy management in controlling high pH in Tannat grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 554-558.

Coniberti, A., Ferrari, V., Lakso, A., García Petillo, M. y Disegna, E. (2014) Interactions of under-trellis cover crops and planting density to achieve vine balance in a temperate humid climate. In: Horticulturae, A. (ed), *International ISHS Symposium on Physiological Principles and Their Application to Fruit Production*. Geneva, NY.

Corzani, C. (2008) Food safety in wine: optimization of analytical controls and evaluation of production technologies. *Faculty of Agriculture*. University of Bologna, Bologna.

Covarelli, L., Beccari, G., Marini, A. y Tosi, L. (2012) A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control*, 26, 347-356.

Cozzi, G., Haidukowsky, M., Perrone, G., Visconti, A. y Logrieco, A. (2009) Influence of *Lobesia botrana* Field Control on Black Aspergilli Rot and Ochratoxin A Contamination in Grapes. *Journal of Food Protection*, 4, 894-897.

-
- Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A. y Logrieco, A. (2006) Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S88-S92.
- Crespo-Sempere, A., Gil, J. y Martínez-Culebras, P.V. (2011) Proteome analysis of the fungus *Aspergillus carbonarius* under ochratoxin A producing conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 162-169.
- Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2013) VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 479-486.
- Cubaiu, L. (2009) Prevention and Biocontrol of ochratoxin A in wine *Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agro-Alimentari*. Università degli Studi di Sassari, Sassari.
- Chen, Y., Yang, M., Xiang, Y., Yuan, R. y Chai, Y. (2014) Binding-induced autonomous disassembly of aptamer-DNAzyme supersandwich nanostructures for sensitive electrochemiluminescence turn-on detection of ochratoxin A. *Nanoscale*, 6, 1099-1104.
- Chiotta, M.L., Ponsone, A., Combina, M., Torres, A.M. y Chulze, S.N. (2009) *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 137-141.
- Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Sosa, D.M., Combina, M. y Chulze, S.N. (2013) Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiology*, 36, 182-190.
- Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Torres, A.M., Combina, M. y Chulze, S.N. (2010) Influence of *Planococcus ficus* on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A incidence in vineyards from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 212-218.
- Christaki, T. y Tzia, C. (2002) Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*, 13, 503-517.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E. y Dalcerro, A.M. (2006) Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S5-S9.
- Da Rocha, C.A., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcerro, A.M. y Santana, D.M.N. (2004) Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21, 358-364.
- Da Rocha, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira, A., Magnoli, C.E. y Dalcerro, A.M. (2002) Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19, 408-414.

-
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martínez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. y Schorr-Galindo, S. (2009) Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 14-23.
- Dai, J., Park, G., Perry, J., Il'ichev, Y., Bow, D., Pritchard, J.B., Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. y Simon, J.D. (2004) Molecular aspects of the transport and toxicity of ochratoxin A. *Accounts of Chemical Research*, 37, 874-881.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. y Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370-380.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena, A. y Marchelli, R. (2004) Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatography A*, 1024, 275-279.
- Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi, A. (2005) Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 61-67.
- Davis, N.D., Wagenr, R.E., Dalby, D.K., Morgan-Jones, G. y Diener, U.L. (1975) Toxigenic Fungi in Food. *Applied Microbiology*, 159-161.
- De Curtis, F., De Felice, D.V., Ianiri, G., De Cicco, V. y Castoria, R. (2012) Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 17-24.
- De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A. y Castoria, R. (2008) Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, 98, 1261-1270.
- De Valk, H.A., Klaassen, C.H.W. y Meis, J.F. (2008) Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses*, 51, 463-476.
- de Vries, R.P., Frisvad, J.C., van de Vondervoort, P.J.I., Burgers, K., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. y Visser, J. (2005) *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black Aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 195-203.
- Delage, N., d'Haelingue, A., Colonna Ceccaldi, B. y Bompieux, G. (2003) Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control*, 14, 225-227.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2008) Infostat. *Grupo Infostat, FCA*, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
-

-
- Diana Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M.L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, I.J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C. y De Saeger, S. (2009) LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants*, 26, 885-895.
- Díaz, G.A., Torres, R., Vega, M. y Latorre, B.A. (2009) Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 196-199.
- Dietrich, D.R., Heussner, A.H. y O'Brien, E. (2005) Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 45-52.
- Diguta, C.F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. y Rousseaux, S. (2011) PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28, 1145-1154.
- Disegna, E., Rodríguez, P., Coniberti, A., Dellacasa, E., Boido, E., Carrau, F., Fariña, L., Medina, A. y Capra, A. (2005) Efectos del sistema de conducción en la producción y calidad enológica del cultivar 'Tannat' para las condiciones del sur de Uruguay. X Congreso Latino-Americano de Viticultura. Bento Gonçalves, Brasil.
- Dorner, A.W. (2008) Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives and Contaminants*, 25, 203-208.
- Duarte-Escalante, E., Zúniga, G., Nava, O., Córdoba, S., Refojo, N., Arenas, R., Delhaes, L. y Reyes-Montes, M.R. (2009) Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 427-433.
- Duarte, S.C., Alves, M.R., Pena, A. y Lino, C.M. (2012a) Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215, 360-367.
- Duarte, S.C., Lino, C.M. y Pena, A. (2012b) Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Veterinary Journal*, 192, 286-292.
- Dugan, F.M. (2006) *The identification of fungi an illustrated introduction with keys, glossary and guide to literature*. The American Phytopathology Society Press, Minnesota, USA.
- El Khoury, A. (2007) Champignons mycotoxinogènes et ochratoxin A (OTA) et aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et origine. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université Saint Joseph de Beyrouth.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L. y Lebrihi, A. (2008) Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2244-2250.

-
- Emmett, B. (2004) Fungal contaminants and their impact on wine quality. *Final Report to Grape and Wine Research & Development Corporation*. Cooperative Research Centre for Viticulture, pp. 1-175.
- Esteban, A. (2005) *Aspergillus* Sección *Nigri*: Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas *Department de Sanitat i d'Anatomia Animals*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañez, F.J. (2006) Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 188-195.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañez, F.J. (2004) Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology*, 115, 861-866.
- EU (2005) Regulation (EC) N 123/2005 of January 26, 2005, amending Regulation (EC) n 466/2001 regarding Ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, L25, 3-5.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.
- FAO (2003) Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación Nutrición pp. 1-136.
- FAO/WHO/UNEP (1999) Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP concept *International Conference on Mycotoxins* <http://ftp.fao.org/es/esn/food/myco8b.pdf>, pp. 8b 1-13.
- Favilla, M., Pascale, M., Ricelli, A., Evidente, A., Amalfitano, C. y Altomare, C. (2008) Inhibition of species of the *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A production in grapes by FusapyroneTM. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2248-2253.
- FDA (2014) §173.120 *Electronic Code of Federal Regulations*. GPO U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Feier, D. y Tofana, M. (2009) Ochratoxin A - Toxicological Aspects. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66, 308-312.
- Fernandes, A., Ratola, N., Cerdeira, A., Alves, A. y Venâncio, A. (2007) Changes in ochratoxin A concentration during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 92-96.
-

-
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L. y Tadeo, J.L. (2010) Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, 113-122.
- Fernández, L. (2006) La zonificación bioclimática vitícola como base para la selección de variedades de vinífera. *Geofocus*, 6, 1-32.
- Festas, I., Herbert, P., Santos, L., Cabral, M., Barros, P. y Alves, A. (2000) Ochratoxin A in some Portuguese wines: Method validation and screening in Port Wine and Vinho Verde. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 150-154.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A. y Creppy, E.E. (2001) Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*, 18, 565-568.
- Flajs, D., Domijan, A.-M., Ivic, D., Cvjetkovic, B. y Paraica, M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, 20, 590-592.
- FRAC (2011) FRAC Code List[®]: Fungicides sorted by mode of action. *Fungicide Resistance Action Committee*.
- Frisvad, J.C., Nielsen, K.F. y Samson, R.A. (2008) Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. In Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (eds) *Advances in Food Mycology*. Elsevier.
- Fuchs, R. y Peraica, M. (2005) Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 53-57.
- Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulé, G., Visconti, A. y Baker, S.E. (2012) New Insight into the Ochratoxin A Biosynthetic Pathway through Deletion of a Nonribosomal Peptide Synthetase Gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8208-8218.
- Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A. y Moio, L. (2005) Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 155-162.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I. y Samson, R.A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In Samson, R.A., Pitt, J.I. (eds) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, New York, pp. 55-61.
- García-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2012) Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard? *Food Control*, 25, 797-808.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2011) Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study

with *Aspergillus carbonarius* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 432-439.

Gardes, M. y Bruns, T. (1996) ITS-RFLP matching for identification of Fungi. In Clapp, J.P. (ed) *Methods in Molecular Biology. Species Diagnostics Protocols and Other Nucleic Acid Methods*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Gargouri, S., Hamza, S. y Hajlaoui, M.R. (2006) AFLP Analysis of the Genetic Variability and Population Structure of the Wheat Crown Rot Fungus *Fusarium pseudograminearum* in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 1, 93-104.

Garmendia, G. (2011) Estudio de la presencia de ocratoxina A en vinos uruguayos. Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Geisen, R. y Schmidt-Heydt, M. (2009) Physiological and Molecular Aspects of Ochratoxin A Biosynthesis. In Anke, T., Weber, D. (eds) *Physiology and Genetics*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg, pp. 353-376.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. y Samson, R.A. (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1-10.

Ghafari, Z., Ghahfarokhi, N.K. y Rahimi, E. (2011) Presence of Ochratoxin A in Red and White Grape Juice Commercialized in Iran. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 3, 228-230.

Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C. y Patiño, B. (2009) ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 162-167.

Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N. y González-Jaén, M.T. (2011) Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22, 343-345.

Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. *Connais. Vigne Vin*, 18, 253-271.

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

González-Peñas, E., Leache, C., Viscarret, M., Pérez de Obanos, A., Araguás, C. y López de Cerain, A. (2004) Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1025, 163-168.

-
- González-Salgado, A. (2010) Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A *Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Gil-Serna, J., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T. (2009) Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 57-66.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T. (2005) Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 353-361.
- Grazioli, B., Fumi, M.D. y Silva, A. (2006) The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: A study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S93-S96.
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S. y Lichter, A. (2006) Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S67-S71.
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J.L. y Barthelmebs, L. (2012) Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control*, 26, 401-415.
- Henrion, B., Chevalier, G. y Martin, F. (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research*, 98, 37-43.
- Henry, T., Iwen, P.C. y Hinrichs, S.H. (2000) Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1510-1515.
- Hidalgo, L. (1992) Informe: Regionalización vitícola de Uruguay. INAVI, Las Piedras, pp. 159.
- Hocking, A.D., Leong, S.-L.L., Kazi, B.A., Emmett, R.W. y Scott, E.S. (2007) Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 84-88.
- Horn, B.W. (2003) Ecology and Population Biology of Aflatoxigenic Fungi in Soil. *Journal of Toxicology*, 22, 351-379.
- Hornsey, I. (2007) The vine. In Hornsey, I. (ed) *The chemistry and biology of winemaking*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Hubka, V. y Kolarik, M. (2012) β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*, 29, 1-10.

-
- Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vicente, E. y Menezes, H.C. (2006) Fungi producing ochratoxin in dried fruits. In Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (eds) *Advances in Food Mycology*. Springer.
- IARC (1993) International Agency for Research on Cancer. Summaries & Evaluations. Ochratoxin A. In 489 (ed), <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/13-ochra.html>.
- Iland, P., Ewart, A. y Sitters, J. (1993) *Techniques for Chemical Analysis and Stability Tests of Grape Juice and Wine*. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, Australia.
- INAVI (2013) Estadísticas del sector. <http://www.inavi.com.uy>, Las Piedras, Canelones.
- INAVI (2009) Mapa Zonas Vitícolas del Uruguay. Departamento Vitícola.
- JECFA (2001) Evaluation of certain mycotoxins in food. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series 906*, pp. 1-74.
- Jiang, C., Junling, S., Qi'an, H. y Yanlin, L. (2013a) Occurrence of toxin-producing fungi in intact and rotten table and wine grapes and related influencing factors. *Food Control*, 31, 5-13.
- Jiang, C., Shi, J. y Zhu, C. (2013b) Fruit spoilage and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in the berries of different grape cultivars. *Food Control*, 30, 93-100.
- Jones, R.K., Duncan, H.S. y Hamilton, P.B. (1981) Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology*, 71, 810-816.
- Jørgensen, K. (2005) Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 26-30.
- Juhász, Á., Engi, H., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Vágvolgyi, C. y Hamari, Z. (2007) Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 209-216.
- Juhász, Á., Ládai, M., Gácsér, A., Kucsera, J., Pfeiffer, I., Kevei, F. y Hamari, Z. (2004) Mitochondrial DNA organisation of the mtDNA type 2b of *Aspergillus tubingensis* compared to the *Aspergillus niger* mtDNA type 1a. *FEMS Microbiology Letters*, 241, 119-126.
-

-
- Khalesi, M. y Khatib, N. (2011) The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 113-121.
- Kliwer, W.M. y Dokoozlian, K. (2005) Leaf Area/Crop Weight Ratios of Grapevines: Influence on Fruit Composition and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 170-181.
- Kozakiewicz, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*, 161, 1-188.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. y Crews, C. (2008) Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, 25, 152-163.
- Kuiper-Goodman, T., Hilts, C., Billiard, S.M., Kiparissis, Y., Richard, I.D.K. y Hayward, S. (2010) Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives and Contaminants*, 27, 212-240.
- Kusters-van Someren, M.A., Samson, R.A. y Visser, J. (1991) The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, 19, 21-26.
- La Pera, L., Avellone, G., Lo Turco, V., Di Bella, G., Agozzino, P. y Dugo, G. (2008) Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). *Food Additives and Contaminants*, 25, 1257-1263.
- Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V. y Ghorbel, A. (2007) Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 376-379.
- Lasram, S., Mani, A., Zaied, C., Chebil, S., Abid, S., Bacha, H., Mliki, A. y Ghorbel, A. (2008) Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1696-1703.
- Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorbel, A., Silar, P. y Chebil, S. (2012) Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. *Food Control*, 25, 75-80.
- Leitner, A., Zöllner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., Anklam, E. y Lindner, W. (2002) Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. *Analytica Chimica Acta*, 453, 33-41.
- Leong, S.-L.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W. y Scott, E.S. (2006a) Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S10-S17.

-
- Leong, S.-L.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S. (2007) *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 124-133.
- Leong, S.-L.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S. (2006b) Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 209-216.
- Lo Curto, R., Pellicanó, T., Vilasi, F., Munafó, P. y Dugo, G. (2004) Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry*, 84, 71-75.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. y 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., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A. y Ritieni, A. (2009) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives and Contaminants*, 26, 1495-1500.
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G. y Mulé, G. (2007) Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 11-16.
- Long, D.T. y Voice, T.C. (2007) Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan Endemic Nephropathy. *Croatian Medical Journal*, 48, 300-311.
- López-García, R., Augusto Mallmann, C. y Pineiro, M. (2008) Design and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. *Food Additives and Contaminants*, 25, 231-240.
- López-Mendoza, M.C., Crespo-Sempere, A. y Martínez-Culebras, P.V. (2009) Identification of *Aspergillus tubingensis* strains responsables for OTA contamination in grapes and wine based on the acyl transferase domain of a polyketide synthase gene. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2147-2152.
- Lopez de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A.M. y Bello, J. (2002) Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1058-1064.
- Lucchetta, G., Bazzo, I., Dal Cortivo, G., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M. y Angelini, E. (2010) Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on Grapes in Italy. *Toxins*, 2.
-

-
- Lunardi, L.U., Guembarovski, R.L., Hanai, L.R., Cristiano, V., Carneiro, M.L., Sartori, D. y Pelegrinelli, M.H. (2009) Identification of a splicing coactivator gene that affects the production of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 131-141.
- Luque, M.I., Córdoba, J.J., Rodríguez, A., Núñez, F. y Andrade, M.J. (2013) Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control*, 29, 270-278.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E. y Shepherd, J. (1999) Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants*, 16, 253-260.
- Machida, M. y Gomi, K. (2010) *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Magan, N. y Aldred, D. (2005) Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 10-16.
- Magan, N., Aldred, D., Hope, R. y Mitchell, D. (2010) Environmental factors and interactions with mycobiota of grain and grapes: Effects on growth, deoxynivalenol and ochratoxin production by *Fusarium culmorum* and *Aspergillus carbonarius*. *Toxins*, 2, 353-366.
- Magan, N., Medina, A. y Aldred, D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60, 150-163.
- Magan, N. y Olsen, M. (2004) *Mycotoxins in food: Detection and control*. Woodhead Publishing Cambridge, United Kingdom.
- Magnani, M., Fernandes, A., Cavenaghi, C.E., Homechim, M., Sataque Ono, E.Y., Vilas-Boas, L., Sartori, D., Furlaneto, M.C. y Pelegrinelli, M.H. (2005) Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*, 62, 45-49.
- Magnoli, C.E., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. y Dalcero, A.M. (2003) Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.
- Maier, N.M., Buttinger, G., Welhartizki, S., Gavioli, E. y Lindner, W. (2004) Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *Journal of Chromatography B*, 804, 103-111.
- Malir, F., Ostry, V. y Novotna, E. (2013) Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A (OTA) in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32, 19-33.
- Mally, A. y Dekant, W. (2005) DNA adduct formation by ochratoxin A: Review of the available evidence. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 65-74.

-
- Mantle, P. (2002) Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, 143-146.
- Mantle, P., Kulinskaya, E. y Nestler, S. (2005) Renal tumourigenesis in male rats in response to chronic dietary ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 58-64.
- Marín, S., Valero, A., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2007) Presencia de ocratoxina A (OTA) en vinos especiales europeos. La pasificación y su repercusión en el contenido de OTA en los vinos. *International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine "Microsafetywine"*, Vilafranca del Penades, Spain.
- Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F. y Dragacci, S. (2001) Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 64, 533-537.
- Martínez-Culebras, P.V. y Ramón, D. (2007) An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolated responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 147-153.
- Martínez-Rodríguez, A.J. y Carrascosa, A.V. (2009) HACCP to control microbial safety hazards during winemaking: Ochratoxin A. *Food Control*, 20, 469-475.
- Martínez, C. (2011) Validación de un método analítico para la determinación de Ocratoxina A por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) *Departamento de Toxinas Naturales, LATU. ANEP-UdelaR*.
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G. y Masneuf-Pomarède, I. (2012) Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 93-100.
- Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Patiño, B. y Jiménez, M. (2011) Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 118-126.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M., Mateo, F. y Jiménez, M. (2007) An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 79-83.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V. y Moutounet, M. (2003) Influence of Fining with Plant Proteins on Proanthocyanidin Composition of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 105-111.
-

-
- May, P., Clingeffer, P.R., Scholefield, P.B. y Brien, C.J. (1976) The response of the grape cultivar Crouchen (Australian syn. Clare Riesling) to various trellis and pruning treatments. *Australian Journal of Agricultural Research*, 27, 845-856.
- McGuire, A.M. y Galagan, J.E. (2008) Conserved secondary structures in *Aspergillus*. *PLoS ONE*, 3, e2812.
- Meca, G., Blaiotta, G. y Ritieni, A. (2010) Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21, 579-583.
- Medina, A., Jiménez, M., Mateo, R. y Magan, N. (2007a) Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2234-2239.
- Medina, A., Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, F., Mateo, R. y Jiménez, M. (2008) Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 93-99.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M. y Jiménez, M. (2005) Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4696-4702.
- Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M. y Jiménez, M. (2007b) Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 230-235.
- Meijer, M., Houbraken, J., Dalhuijsen, S., Samson, R.A. y de Vries, R.P. (2011) Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Studies in Mycology*, 69, 19-30.
- Meletis, K., Meniades-Meimaroglou, S. y Markaki, P. (2007) Determination of ochratoxin A in grapes of Greek origin by immunoaffinity and high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1275-1282.
- Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A. y Mliki, A. (2007) Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 245-250.
- Meyers, J.M. y Vander Heuvel, J.E. (2008) Enhancing the precision and spatial acuity of point quadrat analyses via calibrated exposure mapping. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 425-431.
- Meyvacı, K.B., Aksoy, U., Eltem, R., Altındışli, A., Aşkun, T. y Taşkin, E. (2012) Effect of yearly conditions and management practices on ochratoxin A production in Sultana Seedless vineyards. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1157-1167.

-
- Mikušová, P., Ritieni, A., Santini, A., Juhasová, G. y Šrobárová, A. (2010) Contamination by moulds of grapes berries in Slovakia. *Food Additives and Contaminants*, 27, 738-747.
- Miller, J.D. y Trenholm, H.L. (eds) (1994) *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*, University of Minnesota, USA.
- Miraglia, M. y Brera, C. (2000) Determination of mycotoxins in grains and related products. In Nollet, L.M.L. (ed) *Food Analysis by HPLC. Second Edition*. CRC Press.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. y Magan, N. (2004) Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 439-445.
- Moss, M.O. (1998) Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84, 62S-76S.
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapt, M.W., Vogel, R.F. y Niessen, L. (2004) Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 651-659.
- Mulé, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. y Visconti, A. (2006) Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S28-S34.
- Ng, W., Mankotia, M., Pantazopoulos, P., Neil, R.J. y Scott, P.M. (2004) Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Additives and Contaminants*, 21, 971-981.
- Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O. y Frisvad, J.C. (2009) Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1225-1242.
- Niessen, L. (2008) PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. *Advances in Food and Nutrition Research*, 54, 81-138.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2008) Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1727-1734.
- O'Brien, E. y Dietrich, D.R. (2005) Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35, 33-60.
- OIV (2012) Balance sobre la situación de la vitivinicultura mundial en 2012. <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole#secteur>.
-

-
- OIV (2011) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. International Organization of Vine and Wine, pp. Vol. 1 (1-472), Vol. 472 (471-568).
- OIV (2005) Resolución VITI-OENO 1/2005. Código de buenas prácticas vitivinícolas para limitar al máximo la presencia de ocratoxina A en los productos derivados de la viña. 1-5.
- Olivares-Marín, M., Del Prete, V., García-Moruno, E., Fernández-González, C., Macías-García, A. y Gómez-Serrano, V. (2009) The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine. *Food Control*, 20, 298-303.
- Oliveri, C. y Catara, V. (2011) Mycoflora and Biodiversity of Black Aspergilli in Vineyard Eco-Systems. In Grillo, O., Venora, G. (eds) *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*. INTECH www.intechopen.com.
- Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E.E. y Medina, B. (1998) L'Ochratoxin A dans les vins. *Revue Française D'œnologie*, 169, 16-19.
- Ostry, V., Malir, F. y Ruprich, J. (2013) Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 5, 1574-1586.
- Oueslati, S., Lasram, S., Ramos, A.J., Marín, S., Mliki, A., Sanchis, V. y Ghorbel, A. (2010) Alternating temperatures and photoperiod effects on fungal growth and Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 210-213.
- Pacin, A.M., Ciancio Bovier, E.V., Motta, E., Resnik, S.L., Villa, D. y Olsen, M. (2008) Survey of Argentinian human plasma for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 25, 635-641.
- Palencia, E.R., Klich, M.A., Glenn, A.E. y Bacon, C.W. (2009) Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *Journal of Microbiological Methods*, 79, 1-7.
- Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L., Vasquez, S.J. y Mahoney, N.E. (2011) Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins *Letters in Applied Microbiology*, 52, 330-336.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2006) Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention- a review. *Food Additives and Contaminants*, 23, 398-410.
- Pařenicová, L., Skouboe, P., Frisvad, J.C., Samson, R.A., Rossen, L., Hoor-Suykerbuyk, M. y Visser, J. (2001) Combined molecular and biochemical approach

identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 521-527.

Park, D.L., Ayala, C.E., Guzman-Pérez, S.E., López-García, R. y Trujillo, S. (2001) Microbial toxins in foods: algal, fungal, and bacterial. In Helferich, W., Winter, C.K. (eds) *Food Toxicology*. CRC Press, pp. 100-142.

Paterson, R.R.M. y N., L. (2011) Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44, 2555-2566.

Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T. y Vázquez, C. (2005) PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 207-214.

Payne, G.A. (1998) Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (eds) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc.

Pelegriñelli, M.H., Magnani, M., Vilas-Boas, L., Vissotto, P., Furlaneto, M.C., Carneiro, M.L. y Hiromi, M. (2004) Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 985-988.

Perrone, G., Mulé, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. y Logrieco, A. (2006a) Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 680-685.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2011) *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 115, 1138-1150.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. y Samson, R.A. (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53-66.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F. y Mulé, G. (2006b) AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S22-S27.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsubé, S., Tóth, B., Kozakiewicz, Z. y Samson, R.A. (2008) *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1032-1039.

-
- Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G. y Milone, S. (2014) Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Science*, 96, 203-210.
- Pfohl-Leszkowicz, A. y Manderville, R.A. (2012) An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 252-262.
- Pfohl-Leszkowicz, A. y Manderville, R.A. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 61-99.
- Piñeiro, M., Dawson, R. y Costarrica, M.L. (1996) Monitoring program for mycotoxin contamination in uruguayan food and feeds. *Natural Toxins*, 4, 242-245.
- Pitt, J.I. (2000) Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, 17-22.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009) Chapter 8 - *Aspergillus* and Related Teleomorphs *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science+Business Media.
- Pitt, J.I., Taniwaki, M.H. y Cole, M.B. (2013) Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32, 205-215.
- Pollastro, S., De Miccolis, R.M. y Faretra, F. (2006) A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Plant Pathology*, 88, 107-112.
- Ponsone, A., Chiotta, M.L., Combina, M., Torres, A., Knass, P., Dalcero, A.M. y Chulze, S.N. (2010) Natural Occurrence of Ochratoxin A in Musts, Wines and Grape Vine Fruits from Grapes Harvested in Argentina. *Toxins*, 2, 1984-1996.
- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A.M. y Chulze, S.N. (2011) Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 70-77.
- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A.M. y Chulze, S.N. (2009) Fate of ochratoxin A content in Argentinian red wine during a pilot scale vinification. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 245-250.
- Quintela, S., Villarán, M.C., López de Armentia, I. y Elejalde, E. (2013) Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control*, 30, 439-445.
- Quintela, S., Villarán, M.C., López de Armentia, I. y Elejalde, E. (2012) Ochratoxin A removal from red wine by several oenological fining agents: bentonite, egg albumin, allergen-free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1168-1174.

-
- Rácz, L., Rácz, J., Csutorás, C., Tóth, B., Óvári, M. y Zárny, G. (2010) Effect of variety of grapes on trace element and ochratoxin A contents of Hungarian red wines. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92, 609-616.
- Raper, K.B. y Fennell, D.I. (1965) *The genus Aspergillus*.
- Ratola, N., Abade, E., Simões, T., Venâncio, A. y Alves, A. (2005) Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*, 382, 405-411.
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutierrez, A.J. y Hardisson, A. (2011) La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26, 1215-1226.
- Reddy, L. y Bhoola, K. (2010) Ochratoxins-Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins*, 2, 771-779.
- Remiro, R. (2011) Incidencia y niveles de ocratoxina A y cinco análogos en vino tinto *Facultad de Farmacia*. Universidad de Navarra.
- Ribeiro, E. y Alves, A. (2008) Comparative study of screening methodologies for ochratoxin A detection in winery by-products. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1443-1450.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J. y Larondelle, Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18-46.
- Romero, S.M., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. y Vaamonde, G. (2009) Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. *Mycotoxin Research*, 25, 165-170.
- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G. y Fernández Pinto, V. (2005) Toxicogenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 43-49.
- Romero, S.M., Fernández Pinto, V., Patriarca, A. y Vaamonde, G. (2010) Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 277-281.
- Roth, A., Chakor, K., Creepy, E.E., Kane, A., Rosenthaler, R. y Dirheimer, G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, 48, 293-308.
- Rousseau, J. (2004) Ocratoxina A nei vini: Stato delle conoscenze. *Vinidea.net*, 2, 1-5.
-

-
- Rousseaux, S., Diguta, C.F., Radoï-Matei, F., Alexandre, H. y Guilloux-Bénatier, M. (2014) Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavours and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104-121.
- Russell, R., Peterson, M. y Lima, N. (2010) How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902-1914.
- Sáez, J.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R. y Jiménez, M. (2004) Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1029, 125-133.
- Sage, L., Garon, D. y Seigler-Murandi, F. (2004) Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5764-5768.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigler-Murandi, F. y Creppy, E.E. (2002) Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1306-1311.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M. y Frisvad, J.C. (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C. y Varga, J. (2007) Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59, 129-145.
- Samson, R.A. y Pitt, J.I. (2000) *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, TN.
- Sartori, D., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T. y Pelegrinelli, M.H. (2010) Chapter 10 - Molecular Diagnosis of Ochratoxigenic Fungi. In Gherbawy, Y., Voigt, K. (eds) *Molecular Identification of Fungi*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Savino, M., Limosani, P. y García-Moruno, E. (2007) Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 97-101.
- SCOOP (2002) European Commission: Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU members states, Rome, Italy.
- Scott, P.M. (2005) Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 99-107.

-
- Scott, P.M. y Trucksess, M.W. (1997) Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80, 941-949.
- Scudamore, K.A. (2005) Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 17-25.
- Schilter, B., Marin-Kuan, M., Delatour, T., Nestler, S., Mantle, P. y Cavin, C. (2005) Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 88-93.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G. y Geisen, R. (2011) Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 229-237.
- Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F. y Niessen, L. (2004) Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 899-909.
- Schuster, E., Dunn-Columan, N., Frisvad, J.C. y Van Dijck, P.W. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 426-435.
- Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. y Aznar, R. (2008) Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 126-134.
- Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V., Elizaquível, P. y Aznar, J. (2009) Simultaneous detection of the main black aspergilli responsible for ochratoxin A (OTA) contamination in grapes by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 26, 180-188.
- Selouane, A., Zouhair, S., Bouya, D., Lebrihi, A. y Bouseta, A. (2009) Natural occurrence of ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin A in Moroccan grapes. *World Applied Sciences Journal*, 7, 297-305.
- Serey, R.A., Torres, R. y Latorre, B.A. (2007) Pre- and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34, 215-224.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. y Venâncio, A. (2003) Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 63-68.
-

-
- Serra, R., Braga, A. y Venâncio, A. (2005) Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156, 515-521.
- Serra, R., Cabañez, F.J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulé, G. y Kozakiewicz, Z. (2006a) *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, 98, 295-306.
- Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P. y Venâncio, A. (2006b) Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110, 971-978.
- Serra, R., Mendça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A. y Venâncio, A. (2004) Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta*, 513, 41-47.
- Serra, R., Mendça, C. y Venâncio, A. (2006c) Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S35-S39.
- Serra, R., Mendça, C. y Venâncio, A. (2006d) Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 42-47.
- Serratos, M.P., Lopez-Toledano, A., Millan, C., Medina, M. y Merida, J. (2010) Changes of ochratoxin A in grapes inoculated with *Aspergillus carbonarius* and subjected to chamber-drying under controlled conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11907-11912.
- Settanni, L. y Corsetti, A. (2007) The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 1-22.
- Sewram, V., Shephard, G.S., van der Merwe, L. y Jacobs, T.V. (2006) Mycotoxin contamination of dietary and medicinal wild plants in the Eastern Cape province of South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5688-5893.
- Sharman, M., MacDonald, S. y Gilbert, J. (1992) Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 603, 285-289.
- Shephard, G.S. (2008) Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants*, 25, 146-151.
- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N. y Sewram, V. (2003) Quantitation of Ochratoxin A in South African Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1102-1106.
- Siantar, D.P., Halverson, C.A., Kirmiz, C., Peterson, G.F., Hill, N.R. y Dugar, S.M. (2003) Ochratoxin A in wine: Survey by antibody- and polymeric-based SPE

columns using HPLC/fluorescence detection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 170-177.

Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H., Sartori, D. y Alves, E. (2011) Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 761-773.

Skarkova, J., Ostry, V., Malir, F. y Roubal, T. (2013) Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 46, 1495-1504.

Smart, R., Dick, J., Gravett, I. y Fisher, B. (1990) Canopy management to improve grape yield and wine quality. Principles and practices. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 11, 3-17.

Smith, J.E. y Moss, M.O. (1985) *Mycotoxins, formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, New York.

Snowdon, A.L. (1990) *A color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables: General introduction and fruits*. . Wolfe Scientific, London, UK.

Sobrero, M.S., Frisón, L.N., Chiericatti, C.A., Aríngoli, E.E., Basílico, J.C. y Basílico, M.L.Z. (2013) Parámetros cinéticos como herramienta para la caracterización de aislados de *Aspergillus* sección *Nigri*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 146-156.

Soleas, G.J., Yan, J. y Goldberg, D.M. (2001) Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2733-2740.

Solfrizzo, M., Avantaggiato, G., Panzarini, G. y Visconti, A. (2010) Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 317-323.

Solfrizzo, M., Panzarini, G. y Visconti, A. (2008) Determination of ochratoxin A in grapes, dried vine fruits, and winery byproducts by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC-FLD) and immunoaffinity cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11081-11086.

Somma, S., Perrone, G. y Logrieco, A. (2012) Diversity of black *Aspergilli* and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 131-147.

Soriano del Castillo, J. (2007) *Micotoxinas en alimentos* Ediciones Díaz Santos, Madrid.

-
- Šošo, V.M., Škrinjar, M.M. y Blagojev, N.T. (2012) Influence of ecophysiological factors on the presence of ochratoxin A in dried vine fruits: A review. *Acta Periodica Technologica*, 43, 123-138.
- Soufleros, E.H., Tricard, C. y Bouloumpasi, E.C. (2003) Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 173-179.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Kartikeyan, M., Loré, A., Garibaldi, A. y Gullino, M.L. (2011) Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin A on grapevine. *Annals of Microbiology*, 61, 267-272.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Loré, A., Garibaldi, A. y Gullino, M.L. (2012) Ochratoxigenic black species of Aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. *Toxins*, 4, 42-54.
- Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatson-Dritsa, A. y Dais, P. (2003) Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Additives and Contaminants*, 20, 74-83.
- Storari, M., Broggin, G.A.L., Bigler, L., Cordano, E., Eccel, E., De Filippi, R., Gessler, C. y Pertot, I. (2012) Risk assessment of the occurrence of black aspergilli on grapes grown in an alpine region under a climate change scenario. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 631-645.
- Susca, A., Perrone, G., Cozzi, G., Stea, G., Logrieco, A. y Mulé, G. (2013) Multilocus sequence analysis of *Aspergillus* sect. *Nigri* in dried vine fruits of worldwide origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 163-168.
- Susca, A., Stea, G., Mulé, G. y Perrone, G. (2007a) Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1154-1160.
- Susca, A., Stea, G. y Perrone, G. (2007b) Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1148-1153.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P. y Magan, N. (2007) Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2267-2276.
- Techarat, S. y Dachoupan, C. (2012) Growth and Ochratoxin A production of black aspergilli isolated from Thai wine grapes. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 5, 172-182.
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. y Kevei, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134, 171-176.

-
- Terra, M.F., Prado, G., Pereira, G.E., Ematné, H.J. y Batista, L.R. (2013) Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 890-894.
- Tjamos, S.E., Antoniou, P.P. y Tjamos, E.C. (2006) *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S61-S66.
- Torelli, E., Firrao, G., Locci, R. y Gobbi, E. (2006) Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of "passito" wines. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 307-312.
- Tripathi, P. y Dubey, N.K. (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 235-245.
- Trivedi, A.B., Doi, E. y Kitabatake, N. (1992) Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 741-745.
- Valenta, H. (1998) Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, 815, 75-92.
- Valenta, H. y Goll, M. (1996) Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Additives and Contaminants*, 13, 669-676.
- Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J. y Marín, S. (2006) Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a_w . *International Journal of Food Microbiology*, 110, 160-164.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2007) Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 194-199.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2005) Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 196-201.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., de Scott, B. y Theron, J.J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112-1113.
- Van Egmond, H.O. y Dekker, W.H. (1997) World regulations for mycotoxins in 1995 - a compendium. *FAO Food and Nutrition Paper*, 64.
-

-
- Varga, J., Due, M., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2007) Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59, 89-106.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. y Samson, R.A. (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 69, 1-17.
- Varga, J., Kevei, F., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4461-4464.
- Varga, J., Kevei, F., Tóth, B., Kozakiewicz, Z. y Hoekstra, R.F. (2000) Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 593-599.
- Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B. y Bartók, T. (2010) Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 143-149.
- Varga, J. y Samson, R.A. (eds) (2008) *Aspergillus in the Genomic Era*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Verger, P.H., Counil, E., Tressou, J. y Leblanc, J.C. (2005) Some recent advances in modelling dietary exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 94-98.
- Vidal, J.C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J.R., Cubel, C. y Castillo, J.R. (2013) Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 146-158.
- Vinck, A., Terlouw, M., Pestman, W.R., Martens, E.P., Ram, A.F., van den Hondel, C.A. y Woosten, H.A. (2005) Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, 58, 693-699.
- Visconti, A. y Logrieco, A. (2007) Advances in genomics, biodiversity and rapid systems for the detection of toxigenic fungi and mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1033-1034.
- Visconti, A., Pascale, M. y Centonze, G. (1999) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, 89-101.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. y Solfrizzo, M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, 25, 193-202.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23, 4407-4414.

-
- Walker, R. y Larsen, J.C. (2005) Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 6-9.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F. y Pitt, J.I. (1991) Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 141-149.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- WHO/FAO (2007) CAC/RCP 63 Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por ocratoxina A en el vino. *Codex Alimentarius. International Food Standards*. <http://www.codexalimentarius.org>.
- Yang, C., Lates, V., Prieto-Simón, B., Marty, J.L. y Yang, X. (2013) Rapid high-throughput analysis of ochratoxin A by the self-assembly of DNAzyme-aptamer conjugates in wine. *Talanta*, 116, 520-526.
- Yang, J., Li, J., Jiang, Y., Duan, X., Qu, H., Yang, B., Chen, F. y Sivakumar, D. (2014) Natural occurrence, analysis and prevention of micotoxins in fruits and their processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 64-83.
- Yang, L., Wang, L., Pan, J., Xiang, L., Yang, M. y Logrieco, A. (2010) Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicinal plants by HPLC-FLD. *Food Additives and Contaminants*, 27, 989-997.
- Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M. y Nishimura, K. (2001) Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters*, 200, 241-246.
- Zimmerli, B. y Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655-668.
- Zoecklein, B.W., Hackney, C.H., Duncan, S.E. y Marcy, J.E. (1999) Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22, 100-107.
-