



I FUNGHI FILAMENTOSI NEI FRUTTAI: IL CASO STUDIO DELLA VALLE DEI LAGHI

In questo studio si descrivono le principali specie di funghi filamentosi isolati in due fruttai della Valle dei Laghi (Trento) durante l'appassimento dell'uva Nosiola per la produzione di Vino Santo. Le bacche, anche apparentemente sane, oltre alla botrite, ai penicilli e aspergilli, ospitano numerose specie che possono concorrere allo sviluppo dei marciumi dei grappoli. Per una gestione oculata del fruttajo è necessario non sottovalutare la loro presenza, che in favorevoli condizioni ambientali, posso causare contaminazioni significative a detrimento dell'uva.



Di
Giacomo Zapparoli
Marilinda Lorenzini
Dipartimento di Biotecnologie
Università degli Studi di Verona

INTRODUZIONE

■ L'appassimento delle uve nei fruttai per la produzione di vini passiti è un processo delicato che richiede particolare attenzione e cura da parte del viticoltore. In questa fase, infatti, le uve sono vulnerabili ad attacchi microbici responsabili dei marciumi nei grappoli e, quindi, del deperimento generale dell'uva. Nei fruttai naturali l'insorgenza e la gravità di queste infezioni sono fortemente dipendenti dall'andamento meteorologico del periodo

pre- e post-raccolta e il ricorso ad ambienti condizionati riduce molto questo rischio garantendo, tra l'altro, una maggiore standardizzazione della qualità delle uve da vinificare. Gli agenti responsabili dei marciumi dei grappoli nel fruttajo sono perlopiù funghi e, tra essi quelli filamentosi (muffe), sono i più frequenti e dannosi. *Botrytis cinerea* è quello maggiormente aggressivo capace di invadere velocemente l'uva nel fruttajo. *Penicillium* spp. e soprattutto *Aspergillus* spp. sono particolarmente micotossigeni e la loro presenza è

potenzialmente negativa anche per la salute umana. Altre muffe come *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp. sono meno invadenti delle precedenti anche se, in condizioni favorevoli, la loro attività saprofitica può concorrere assieme agli altri patogeni al deprezzamento della qualità dell'uva durante l'appassimento.

■ Le conoscenze relative alla presenza dei funghi filamentosi nei fruttai, alla loro capacità di infezione e agli effetti che possono esercitare sulle uve durante l'appassimento sono assai li-



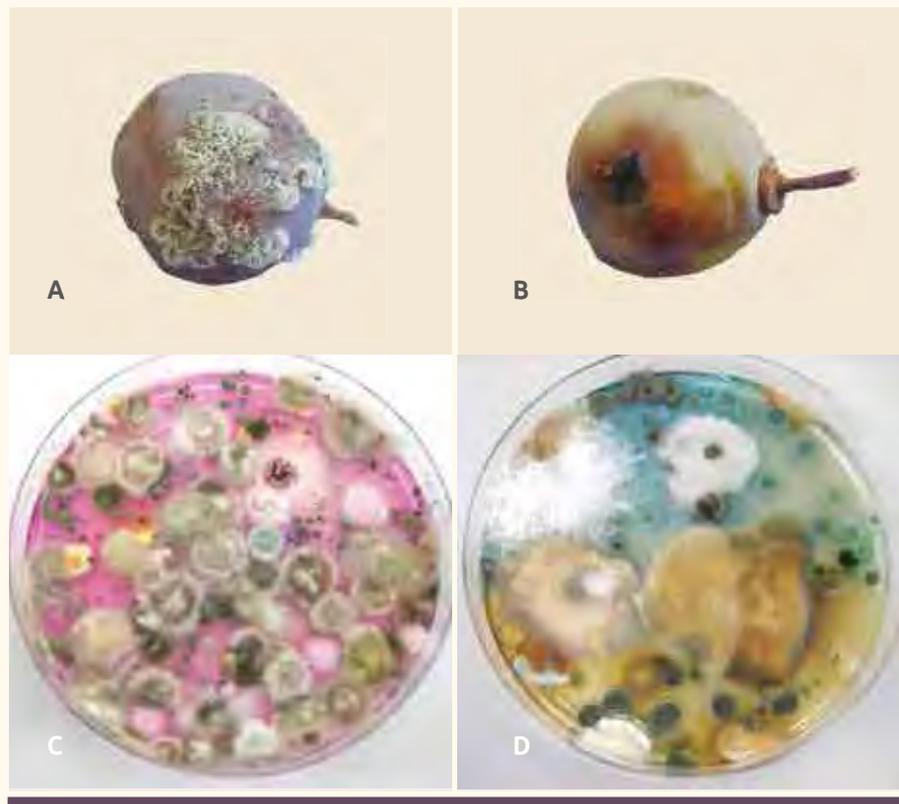
mitate. Senza considerare le specie facilmente identificabili e frequenti, come la muffa grigia e i penicilli, spesso si ignora la presenza di altre muffe e della loro capacità infettiva.

■ Per una oculata gestione dell'appassimento delle uve è auspicabile una conoscenza più approfondita della tipologia di muffe presenti nei fruttai e, soprattutto, delle loro potenzialità patogene. A tale scopo il presente studio riporta i risultati di un'indagine sui funghi filamentosi isolati da uve Nosiola in appassimento in due fruttai della Valle dei Laghi (Provincia Autonoma di Trento). Il lungo periodo di appassimento naturale (minimo 4-5 mesi), previsto dal disciplinare di produzione del Vino Santo Trentino (Disciplinare di produzione dei vini a denominazione di origine controllata "Trentino", DM 30.11.2011), espone le uve a rischi di contaminazione più di quanto lo siano quelle soggette ad appassimenti più brevi e, ancor più, in ambienti condizionati. I fruttai della Valle dei Laghi, quindi, sono ideali per ottenere informazioni sulle specie più frequentemente ospitate in questi specifici ambienti, e, in secondo luogo, sulla eventuale loro correlazione con l'incidenza di marciumi che si manifestano nel corso dell'appassimento.

MATERIALI E METODI DELLA SPERIMENTAZIONE

■ I campioni di uva Nosiola sono stati prelevati da due fruttai rappresentativi della Valle dei Laghi ad inizio, metà e fine appassimento condotto in ambiente naturale (vendemmia 2011). Sono stati raccolti acini apparentemente sani e infettati, cercando di mantenere indicativamente un rapporto numerico simile al grado di contaminazione stimato nei lotti di uva. Gli acini sono stati asportati con modalità tali da ridurre le contaminazioni esterne e conservati in sacchetti sterili fino all'analisi in laboratorio. La quantificazione relativa della popolazione micotica è stata effettuata come descritto da Serra R. *et al.* (2003), piastrandoci ciascun acino direttamente su terreno WL Nutrient Agar e Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC). Da ciascuna piastra sono state prelevate colonie rappresentative di morfologie differenti e l'isolamento con successiva purificazione è stata effettuata su terreno Malt Extract Agar (MEA). La collezione degli isolati è stata mantenuta a 4°C in *slant* di MEA.

Fig. 1 - Acini di Nosiola infettati da funghi filamentosi prelevati in fruttai durante l'appassimento (A e B) e sviluppo in piastra delle muffe dopo la semina diretta dell'acino su terreno DRBC (C) e WL (D)



■ L'identificazione dei funghi è stata effettuata mediante osservazione della morfologia miceliare e cellulare allo stereomicroscopio e al microscopio ottico. In alcuni casi si è valutata la disposizione degli organi di riproduzione al microscopio a scansione (SEM). L'attribuzione del genere e della specie è stata ultimata mediante sequenziamento dell'*Internal transcribed spacer* (ITS) seguendo il protocollo descritto da Lorenzini M. *et al.* (2013).

RISULTATI E DISCUSSIONE

■ Le analisi condotte sugli acini hanno evidenziato come la bacca possa ospitare numerosi tipi di funghi. Questa diversità micotica si è osservata oltre che in bacche visivamente infettate da differenti specie di miceti, anche in quelle contaminate da un unico fungo o apparentemente sane (**Fig. 1**). L'acino può, quindi, ospitare forme quiescenti di diversi funghi saprofiti che in condizioni favorevoli

possono sviluppare e competere tra di loro nella colonizzazione dell'uva. Patogeni *post-harvest* opportunisti possono rimanere quiescenti per lungo periodo all'interno del frutto in pre-raccolta, attivarsi e iniziare uno sviluppo necrotrofico alla maturazione e senescenza. La lunghezza di questo periodo varia molto a seconda dei patogeni che infettano, degli ospiti e dello stadio di sviluppo di quest'ultimi.

IDENTIFICAZIONE DEI FUNGHI FILAMENTOSI

■ L'identificazione degli isolati, eseguita su base morfologica e molecolare, ha permesso l'attribuzione di 15 differenti generi fungini la cui frequenza, suddivisa in base al fruttai di origine, è mostrata in **Fig. 2**. ■ Complessivamente la distribuzione di questi funghi è risultata simile nei due fruttai. I miceti più frequenti sono stati *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Cladosporium* (**Fig. 3**) con



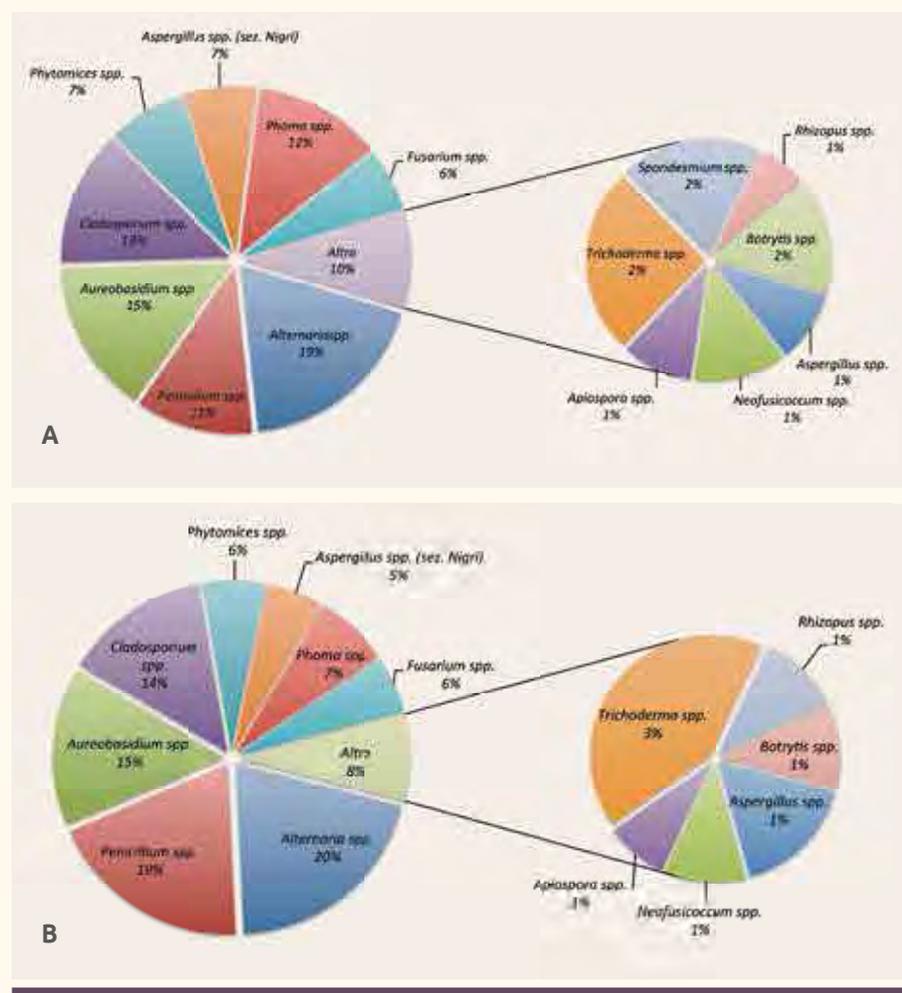
percentuali comprese tra 11 e 20%. Altri miceti come *Phoma*, *Aspergillus* (sez. Nigri), *Fusarium* e *Phytomyces* (Fig. 3) sono stati riscontrati con frequenza tra 5 e 12%. I generi *Trichoderma*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Botryosphaeria*, *Apiospora* e *Sporidesmium* (Fig. 3) sono stati identificati in percentuali inferiori al 3%. Alcuni di questi generi fungini sono stati descritti in un precedente studio condotto su uva Garganega appassita utilizzata per la produzione di Recioto di Soave (Lorenzini M. *et al.*, 2013). Pochissimi isolati, il cui numero è risultato trascurabile, che hanno mostrato una morfologia non riconducibile ai generi sopra menzionati, non sono stati considerati in questa ricerca. ■ Ulteriori analisi molecolari condotte su isolati rappresentativi hanno consentito di effettuare una identificazione anche a livello di

specie (Tab. 1). *Penicillium* è il genere che presenta un maggior numero di specie (7) seguito da *Fusarium* e *Aspergillus* (4) e *Cladosporium* e *Phoma* (3), mentre i rimanenti generi sono rappresentati da due o un'unica specie. Queste identificazioni si possono considerare indicative poiché sono state effettuate sulla base del risultato di allineamento della sequenza ITS dell'isolato con quelle presenti in banca dati (NCBI). In diversi casi la sequenza del fungo analizzato ha mostrato una similarità pari al 99-100% con due specie a dimostrare che questo tipo d'indagine non è precisa. È noto che la tassonomia dei funghi filamentosi è estremamente complessa e oggetto di continue revisioni ed aggiornamenti da parte della *International Commission on the Taxonomy of Fungi* (ICTF). Per avere una maggiore attendi-

bilità ed eventuale conferma dell'attribuzione a livello di specie oltre al sequenziamento dell'ITS sono necessarie ulteriori e approfondite analisi filogenetiche e morfologiche. Non è raro imbattersi in casi, come quello dell'isolato *Botrytis* sp. B83 descritto di seguito, nei quali nemmeno queste analisi sono sufficienti ad attribuire una corretta collocazione tassonomica del fungo in esame. Per lo scopo prefissato, in questo lavoro abbiamo ritenuto sufficiente fornire i dati del solo allineamento delle sequenze ITS trascurando gli esiti di altre indagini da noi condotte su alcuni dei funghi isolati dai due fruttai della Valle dei Laghi.

■ *Penicillium* e *Aspergillus* sono due generi fungini comunemente riscontrati in uve fresche (Rousseaux S. *et al.*, 2014) e in appassimento utilizzate per la produzione di vini speciali, compre-

Fig. 2 - Frequenza (%) dei generi di funghi filamentosi identificati nel fruttai A e B durante l'appassimento

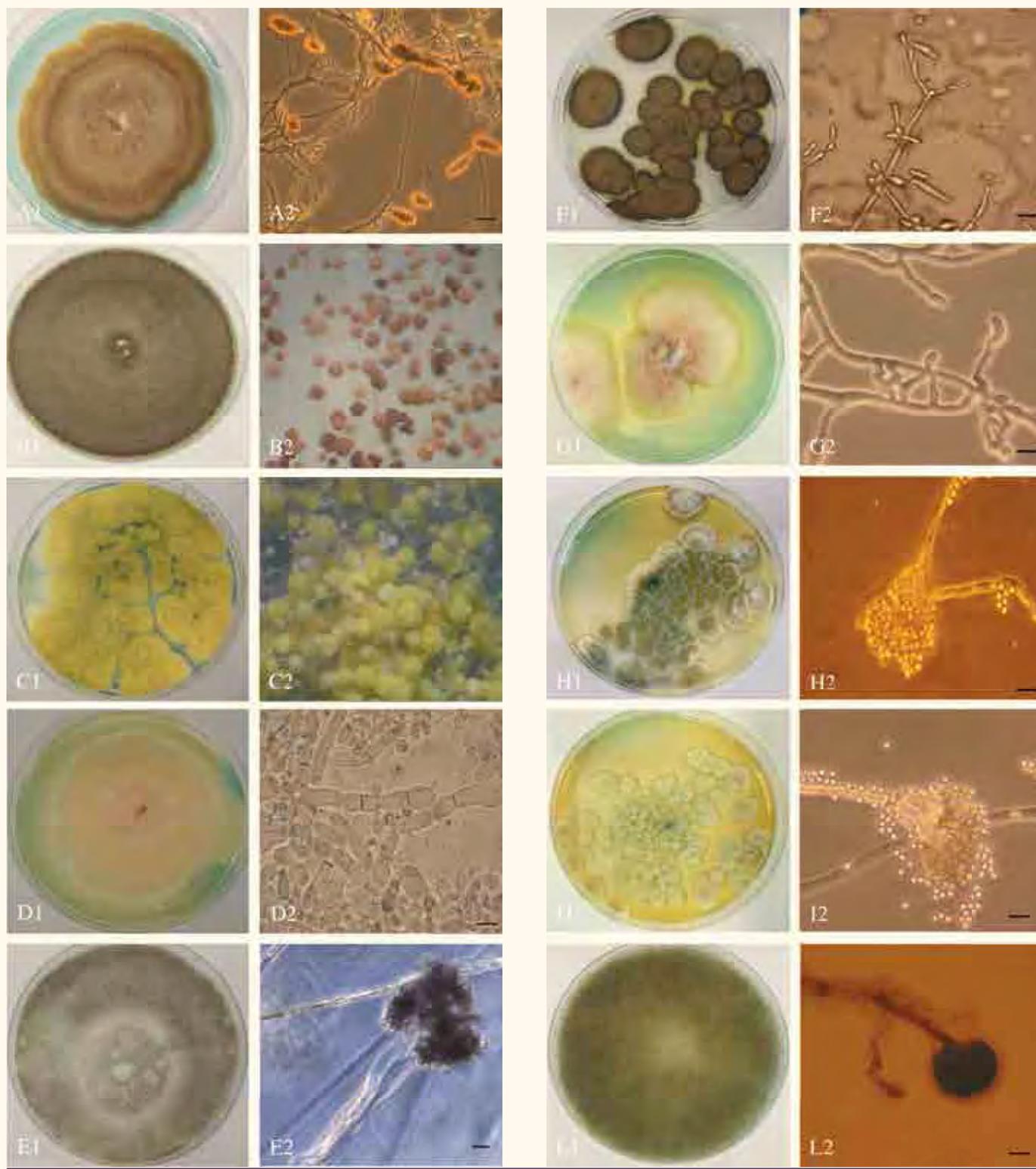


Tab. 1 - Specie di funghi filamentosi identificate

| Generi | Specie |
|----------------------|---|
| <i>Alternaria</i> | <i>alternaria / tenuissima arborescens</i> |
| <i>Apiospora</i> | <i>setosa</i> |
| <i>Aspergillus</i> | <i>carbonarius / niger flavus / oryzae fumigatus ochraceus</i> |
| <i>Aureobasidium</i> | <i>pullulans</i> |
| <i>Botrytis</i> | <i>cinerea</i> |
| <i>Cladosporium</i> | <i>cladosporioides fulvum sphaerospermum</i> |
| <i>Fusarium</i> | <i>chlamydosporium incartarum subglutinam verticilloides</i> |
| <i>Neofusicoccum</i> | <i>parvum</i> |
| <i>Penicillium</i> | <i>aurantiigriseum brevicompactum commune crustosum expansum glabrum oxalicum</i> |
| <i>Phoma</i> | <i>herbarum medicaginis globerata</i> |
| <i>Phytomyces</i> | <i>chartarum</i> |
| <i>Rhizopus</i> | <i>oryzae stolonifer</i> |
| <i>Sporidesmium</i> | <i>tengii</i> |
| <i>Trichoderma</i> | <i>asperellum / harzianum viride</i> |



Fig. 3 - Morfologia del micelio su terreno WL e al microscopio delle specie più frequentemente identificate: *A. alternata* (A), *A. niger* (B), *A. flavus* (C), *A. pullulans* (D), *B. cinerea* (E), *C. cladosporioides* (F), *F. verticilloides* (G), *P. commune* (H), *P. expansum* (I) e *R. oryzae* (L). Barra 20 µm





si i passiti (Torelli E. *et al.*, 2006; Borgo M., 2006).

■ Per quanto riguarda il genere *Penicillium*, le specie identificate sono comunemente implicate nel decadimento post-raccolta della frutta. Alcune di esse sono già state descritte come contaminanti di uva fresca (Serra R. *et al.*, 2003; Borgo M., 2006; Garcia A.C. *et al.*, 2006; Serra R. *et al.*, 2006) e, nel caso di *P. brevicompactum*, *P. crustosum* e *P. glabrum*, anche di uva passa (Romero S.M. *et al.*, 2005).

■ Le specie del genere *Aspergillus* isolate dall'uva Nosiola sono anch'esse spesso ritrovate nelle uve (Serra R. *et al.*, 2003; Borgo M., 2006; Garcia A.C. *et al.*, 2006; Serra R. *et al.*, 2006). Esse includono ceppi con alte capacità di produrre micotossine, in particolare l'ocratossina A (OTA), potenzialmente responsabile di effetti nefrotossici e nefrocarcinogeni (Serra R. *et al.*, 2005). Nonostante, in generale i livelli medi di OTA nei vini passiti siano inferiori alla soglia minima stabilita dalla normativa europea (RE 123/2005), la contaminazione dei funghi tossinogeni durante l'appassimento rappresenta un potenziale rischio per la salute umana, oltre che per la qualità delle uve. Sebbene la loro incidenza sia molto variabile in funzione degli ambienti e delle annate (Borgo M., 2006) è importante assicurare un buon grado d'igiene nei fruttai per limitare la contaminazione fungina ocratossinogena e quindi anche di OTA nel vino.

■ Il genere *Alternaria*, che comprende le specie *A. alternata/tenuissima* e *A. arborescens*, è stato isolato nei due fruttai con frequenza maggiore rispetto agli altri generi, come già osservato in uva Garganega appassita (Lorenzini M. *et al.*, 2013). Questi patogeni possono danneggiare nella fase di conservazione vari tipi di frutta, inclusa l'uva (Romero S.M. *et al.*, 2005). Anche questi funghi filamentosi sono micotossinogeni e allergenici, ma la loro presenza nei fruttai non è altrettanto importante per la salute umana essendo meno invasivi rispetto a *Penicillium* e *Aspergillus*. La capacità infettiva in uva fra i ceppi di *A. alternata* è assai variabile e, si è osservato sperimentalmente che alcuni di essi possono provocare danni rilevanti alle bacche nelle condizioni di appassimento (Lorenzini e Zapparoli, dati non pubblicati).

■ È stato identificato anche *Aureobasidium pullulans*, un fungo ubiquitario saprofitico che si sviluppa in vegetali freschi e alimenti in conservazione e alcuni studi ne hanno riscontrato la presenza su uva fresca e passa (Serra R. *et*

al., 2005; Romero S.M. *et al.*, 2005; Garcia A.C. *et al.*, 2006; Rousseaux S. *et al.*, 2014).

Nel corso dell'appassimento sono state isolate anche specie afferenti al genere *Phoma* (*P. herbarum*, *P. medicaginis* e *P. glomerata*), un contaminante alimentare di frutta secca, isolato anche in uva fresca (Serra R. *et al.*, 2005; Rousseaux S. *et al.*, 2014).

■ Anche il genere *Fusarium*, riconosciuto come uno dei patogeni vegetali di maggiore importanza in grado di produrre tossine, è già stato isolato da uva fresca, passa e appassita per la produzione di vini passiti (Serra R. *et al.*, 2005; Romero S.M. *et al.*, 2005; Torelli E. *et al.*, 2006; Rousseaux S. *et al.*, 2014). Sulla base dei dati ottenuti dall'allineamento delle sequenze degli isolati, è stato possibile riscontrare la presenza di *F. chlamyosporium*, *F. verticilloides*, *F. subglutinam* e *F. incarnatum*.

■ *Pithomyces chartarum*, è un fungo saprofito ubiquitario in grado di colonizzare diverse specie arboree, tuttavia pochi sono gli studi che ne documentano il suo isolamento da uva (Serra R. *et al.*, 2005; Serra R. *et al.*, 2006).

Durante questo lavoro è stato possibile isolare anche specie appartenenti al genere *Cladosporium* (*C. cladospories*, *C. sphaerospermum* e *C. fulvum*) e *Rhizopus* (*R. stolonifer* e *R. oryzae*) già annoverati come contaminanti di uva fresca e passa (Romero S.M. *et al.*, 2005; Serra R. *et al.*, 2006; Rousseaux S. *et al.*, 2014).

■ Il genere *Trichoderma*, le cui specie identificate sono *T. asperellum/harzianum* e *T. viride*, è un fungo ubiquitario del terreno e un agente deteriorante del legno ed è frequentemente menzionato tra le specie di funghi isolati da uva (Romero S.M. *et al.*, 2005; Serra R. *et al.*, 2006; Rousseaux S. *et al.*, 2014). *Trichoderma* spp. è anche considerato un potente antagonista di funghi patogeni ed è, infatti, utilizzato come agente di biocontrollo.

■ *Botrytis cinerea*, temuto patogeno capace di causare danni oltre che in pianta anche in fruttato, è stato riscontrato essere presente con bassa frequenza (circa 3%). Il grado di contaminazione in fase di appassimento è legato all'andamento stagionale e ai trattamenti antibiotritici effettuati in campo e, data la sua elevata competitività, la sua presenza condiziona in modo significativo lo sviluppo delle altre muffe determinando variazioni sostanziali della loro frequenza nel fruttato. In stagioni come l'estate e autunno 2013, caratterizzate nel nord d'Italia da precipitazioni elevate e

temperature superiori alla media stagionale, si è osservato un grado di contaminazione di muffa grigia nei fruttai naturali della Valle dei laghi, della Valpolicella e di Gambellara (dati non mostrati) assai superiore all'annata 2011, al quale si riferiscono i dati di questo lavoro. Situazioni metereologiche come queste indurrebbero un uso più frequente di antibiotritici, che a loro volta, possono favorire la selezione di ceppi resistenti.

■ Sono stati isolati, con una frequenza minima, anche patogeni appartenenti al genere *Botryosphaeria*, *Apiospora* e *Sporidesmium* essenzialmente riconducibili alla micoflora saprofitica in grado di svilupparsi su materiale vegetale in decomposizione e uva fresca. In particolare, *Botryosphaeria* spp. è un patogeno di notevole importanza agronomica dato che induce assieme ad altri patogeni cancri nel legno della vite e di altre piante agrarie e forestali (van Niekerk J.M. *et al.*, 2006).

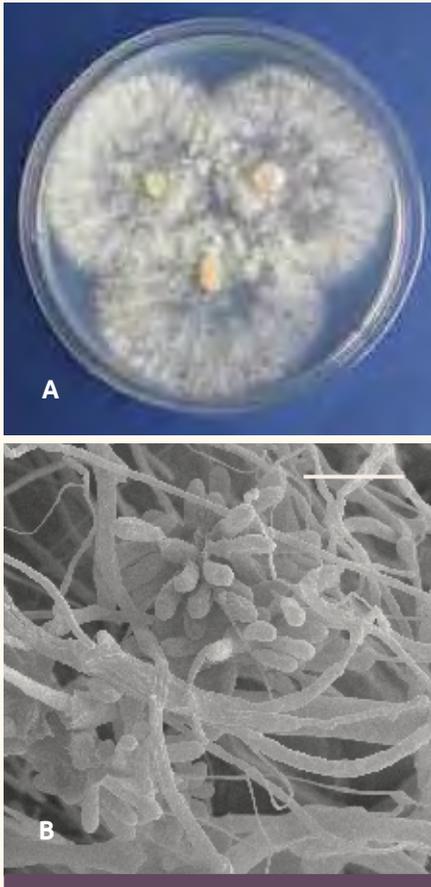
CEPPO B83: UNA NUOVA SPECIE DI BOTRYTIS?

■ Dalle analisi della popolazione di *B. cinerea*, attraverso la caratterizzazione di vari ceppi isolati dai fruttai della Valle dei Laghi, è stato individuato un isolato apparentemente simile agli altri, ma che le successive analisi morfologiche e filogenetiche hanno dimostrato essere distinto da *B. cinerea* (Lorenzini M. e Zapparoli G., 2014). Questo ceppo, siglato B83, cresce su terreno Potato Dextrose Agar (PDA) producendo un micelio fioccoso/aereo di un colore bianco-crema (Fig. 4A), diversamente dal tipico micelio grigio che caratterizza *B. cinerea*. Le strutture riproduttive (conidiofori e conidi) hanno morfologia tipica del genere *Botrytis* (Fig. 4B). Le analisi molecolari condotte mediante sequenziamento dell'ITS e PCR specie-specifica di *B. cinerea* hanno dato esito contraddittorio poiché, per la prima analisi, il ceppo B83 appartiene alla specie *B. cinerea*, mentre per la seconda no.

■ Per cercare di capire la posizione tassonomica di questo fungo è stata condotta quindi un'approfondita analisi filogenetica comparando sequenze di geni *housekeeping*, quali G3PDH, HSP60 and RPB2. Il risultato di tale indagine ha evidenziato come il ceppo B83 costituisca un *taxon* nettamente distinto da *B. cinerea* ma vicino a *Botrytis aclada*, una specie



Fig. 4 - Morfologia di *Botrytis* sp. B83 su PDA (A) e particolare dei conidiofori al SEM (B). Barra 20 µm



di botrite che infetta solo le agliacee.

Prove di patogenicità condotte su una diversa varietà di piante ornamentali, da frutto e ortaggi hanno indicato come *Botrytis* sp. B83 sia una muffa polifaga in gradi di infettare diversi generi di piante come *B. cinerea*, ma con virulenza inferiore.

■ Questo studio condotto sull'isolato B83, fornisce la prova dell'esistenza di una nuova specie di *Botrytis*; tuttavia, la mancanza di altri ceppi che possano costituire con essa una popolazione distinta non ne consente il riconoscimento ufficiale da parte della comunità scientifica, né tanto meno di formulare delle spiegazioni attendibili sui possibili meccanismi di speciazione. Purtroppo, i tentativi di isolare ceppi simili a *Botrytis* sp. B83, tramite altri campionamenti nelle annate successive effettuati negli stessi fruttai, sono falliti. Sorprendentemente tra i nuovi isolati ne è stato individuato uno che, sebbene riconosciuto come

B. cinerea dall'analisi filogenetica, è risultato negativo all'amplificazione della regione ITS, fatto, a nostra conoscenza, unico ed alquanto anomalo per questa specie (Lorenzini M. and Zapparoli G., 2014).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ Questo studio ha evidenziato nei fruttai della Valle dei Laghi un elevato livello di diversità micotica sia a livello di genere sia di specie. Nonostante la frequenza dei vari generi sia soggetta a oscillazioni più o meno ampie, è emerso come oltre alla muffa grigia, penicilli, aspergilli e altri patogeni quali *Alternaria* e *Cladosporium* possano trovarsi a livelli di contaminazioni potenzialmente dannosi per la qualità delle uve. Dall'altra parte, non si può escludere che altre specie fungine, come *Rhizopus*, *Fusarium* e *Phoma*, trovate a percentuali più basse, possano anch'esse essere potenziali agenti d'infezione. Ovviamente, quanto questi patogeni siano effettivamente in grado di causare danni all'uva nei fruttai dipende dalle loro intrinseche caratteristiche di germinabilità e crescita saprofitica. Sarà compito di successivi studi valutare questi parametri e la correlazione tra la frequenza delle singole specie, il grado e la tipologia d'infezione presente nei grappoli. Particolare attenzione dovrà essere focalizzata sulla presenza di specie e ceppi micotossinogeni e la loro possibilità di produrre tossine in fruttai.

■ L'estensione di questo studio ad altre aree vitivinicole caratterizzate da situazioni meteorologiche e agronomiche-culturali differenti dalla Valle dei Laghi permetterà una raccolta dati più rappresentativa del microbiota dei fruttai. In ogni caso anche nell'ambito della stessa zona viticola la variabile meteorologica condiziona fortemente la distribuzione delle varie specie fungine. Il cambiamento climatico che negli ultimi anni sta inducendo ad un innalzamento delle temperature medie potrebbe, su base proiettiva portare ad un aumento delle contaminazioni fungine. Bregaglio S. et al. (2013) hanno ipotizzato nei prossimi 15-30 anni un incremento delle infezioni di *B. cinerea* in aree vitivinicole dell'Europa mediterranea. Nel caso specifico dei fruttai del nord Italia, sulla base delle nostre osservazioni riteniamo che qualora si verificassero, con sempre maggiore frequenza eventi meteorologici quali

aumenti delle temperature medie nei mesi autunnali, il mantenimento di una buona qualità dell'uva sarà sempre più difficoltoso e il ricorso ad ambienti termo-condizionati dovrà essere più frequente.

■ Infine, l'esempio del ceppo *Botrytis* spp. B83, descritto in questo studio, ha evidenziato come il fruttai sia un ambiente nel quale le probabilità che si possano verificare eventi di subspeciazione e di speciazione non siano trascurabili. Tali eventi, infatti, sarebbero favoriti dalla presenza di differenti ceppi e specie introdotti nel fruttai dal campo tramite l'uva o trasportati dall'aria. ■

BIBLIOGRAFIA

- Borgo M. (2006) La ricerca e la sperimentazione su vite per il controllo di funghi tossinogeni. *L'Enologo*, Dicembre, 91-96.
- Bregaglio S., Donatelli M., Confalonieri R. (2013) Fungal infection of rice, wheat, and grape in Europe in 2030-2050. *Agron. Sustain. Dev.* 33: 767-776.
- Garcia A.C., La Guerche S., Mouhamadou B., Feràndon C., Labarère J., Blancard D., Darriet F., Barroso G. (2005) A CAPS test allowing a rapid distinction of *Penicillium expansum* among fungal species collected on grape berries, inferred from the sequence and secondary structure of the mitochondrial SSU-rRNA. *Int. J. Food Microbiol.*, 111: 183-190.
- Lorenzini M., Azzolini M., Tosi E., Zapparoli G. (2013) Post-harvest grape infection of *Botrytis cinerea* and its interactions with other moulds under withering conditions to produce noble-rotten grapes. *J. Appl. Microbiol.* 114: 762-770.
- Lorenzini M. and Zapparoli G. (2014) An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Path.* In stampa.
- Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G., Fernández Pinto V. (2005) Toxicogenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.*, 104: 43-49.
- Rousseaux S., Diguta C.F., Radoi-Matei F., Alexandre H., Guilloux-Bénatier M. (2014). Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiol.* 38: 104-121
- Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venâncio A. (2003) Black Aspergillus species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 63-68.
- Serra R., Braga A., Venâncio A. (2005) Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res. Microbiol.*, 156: 515-521.
- Serra R., Lourenço A., Alípio P., Venâncio A. (2006) Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on Aspergillus and Penicillium species. *Mycol. Res.*, 110: 971-978.
- Torelli E., Firrao G., Locci R., Gobbi E. (2006) Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of "passito" wines. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 307-312.
- van Nierkerk J.M., Fourie P.H., Hallen F., Crous P.W. (2006) *Botrytisphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopath. Medit.*, 45: 43-54.