

## بررسی اثر بیوکنترلی مخمرهای آسکومیستی جداسازی شده از منابع طبیعی بر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری (*Botrytis cinerea*) با روش کشت متقابل

مجید قرایی<sup>۱</sup>، صمد جمالی<sup>۲\*</sup> و سعید عباسی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه رازی ۲. استادیار قارچ‌شناسی دانشگاه رازی ۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه رازی (تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۴)

### چکیده

به منظور کنترل زیستی بیماری کپک خاکستری که یکی از بیمارگرهای مهم پس از برداشت به‌ویژه در میوه سیب و توت‌فرنگی است، از ۱۴ جدایه مخمر استفاده شد. جدایه‌ها از منابع طبیعی و گیاهان جداسازی شده و پس از شناسایی مولکولی، برای ارزیابی اثر بیوکنترلی علیه *Botrytis cinerea* در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به روش کشت متقابل روی محیط کشت سبب‌زمینی دکستروز آگار مورد استفاده قرار گرفتند. این مخمرها شامل: *Pichia kudriavzevii*، *Pichia galeiformis*، *Galactomyces candidum*، *Meyerozyma guilliermondii*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Zygoascus meyeriae*، *Pichia sp.*، *Candida boidinii*، *Metschnikowia sp.*، *Lecytophora sp.* و *Candida catenulatea* بودند که بیشترین تاثیر در بازدارندگی را گونه *Galactomyces candidum* با ۴۷/۸۵ درصد و کمترین تاثیر را گونه *Pichia kudriavzevii* با ۶/۵۳ درصد داشت. نتایج نشان داد که اکثر مخمرهای آسکومیستی شناسایی شده قدرت کنترل‌کنندگی این بیمارگر را با درصدهای مختلف از هفت تا ۴۸ داشتند.

واژه‌های کلیدی: مهار زیستی، شناسایی مولکولی، ناحیه D1/D2 زیرواحد بزرگ دی.ان.ای. ریبوزومی یابی.

### Effects of biocontrol activity of ascomycetes yeasts isolated from natural resources on gray mold fungus (*Botrytis cinerea*) using dual culture method

Majid Gharaei<sup>1</sup>, Samad Jamali<sup>2\*</sup> and Saeed Abbasi<sup>3</sup>

1. MS student, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran; 2. Assistant Professor of Mycology, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran; 3. Associate Professor, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: February 7, 2017- Accepted: June 25, 2017)

### ABSTRACT

The gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* is one of the most important post-harvest diseases especially in apple and strawberry. In order to biological control of *B. cinerea*, we used 14 isolates of ascomycetous yeasts obtained from natural resources and plants, as well For molecular identification of yeast isolates, genomic DNA extracted and D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rDNA gene sequenced. Nine species including *Pichia kudriavzevii*، *Pichia galeiformis*، *Galactomyces candidum*، *Meyerozyma guilliermondii*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Zygoascus meyeriae*، *Pichia sp.*، *Candida parapsilosis*، *Metschnikowia sp.*، *Candida boidinii*، *Lecytophora sp.* and *Candida catenulatea* were identified based on sequence similarity of D1/D2 domain of the LSU rDNA gene of the isolates with those in NCBI database. The dual culture method used for assay of their biocontrol activity against of *B.cinerea* on potato dextrose agar medium in a completely randomized design with tree replications. Our results showed that the highest inhibiting effect was related to *G. candidum* with 47.85 percent and the lowest effect occarad by *P. kudriavzevii* with 6.53 percent. In this study, all yeasts isolates from natural resource and plants showed considerable biocontrol activity against *B. cinerea*.

**Key words:** Biological control, Molecular identification, D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rDNA gene

\* Corresponding author E-mail: jamali454@yahoo.com

## تازه های تحقیق

در این تحقیق از مواد طبیعی مخمرهای مفیدی جداسازی و شناسایی شدند که عبارتند از: *Pichia galactomyces*, *Pichia galeiformis kudriavzevii*, *Meyerozyma guilliermondii candidum*, *Zygoascus meyeriae*, *Saccharomyces cerevisiae Metschnikowia*, *Candida parapsilosis*, *Pichia sp.*, *Lecytophora sp.*, *Candida boidinii* sp. و *Candida catenulata*. تاثیر مخمرهای شناسایی شده مذکور در اثر بیوکنترلی قارچ عامل کپک خاکستری مورد ارزیابی قرار گرفت که تمام جدایه ها در کنترل این بیمارگر موثر بودند. بیشترین تاثیر در بازدارندگی را گونه *G. candidum* و کمترین تاثیر را گونه *P. kudriavzevii* (۶/۵۳ درصد) داشت.

## مقدمه

بیماری کپک خاکستری با عامل قارچی Pers.: Fr. *Botrytis cinerea* یکی از مهم ترین بیماری های پس از برداشت به شمار می رود و استفاده از قارچ کش ها مهم ترین و موثرترین راه کنترل این بیماری می باشد (Agrios 1988)، اما نگرانی هایی که در مورد بقایای قارچ کش در محیط زیست و افزایش مقاومت عوامل بیماری زا به قارچ کش ها وجود دارد، جستجو برای یافتن روش های کم زیان تر و ایمن تر مانند کنترل بیولوژیک را افزایش داده است. در میان موجودات هم بستیز، مخمرها به عنوان عوامل کنترل زیستی مؤثر، دارای اهمیت بسیاری هستند (Irtwange 2006). مخمرها اسپورهای آلرژیک، مایکوتوکسین و یا آنتی بیوتیک تولید نمی کنند و از این رو کاربرد آنها در کنترل بیمارگرهای گیاهی بدون خطر است (Droby and Chalutz 1994). با توجه به ویژگی های فوق، مخمرها به عنوان یکی از بهترین گزینه ها برای به کارگیری در فرایند کنترل زیستی در نظر گرفته می شوند (Lima et al. 1998). در این تحقیق توانایی جدایه های مخمر جداسازی شده از مواد غذایی و گیاهی در استان کرمانشاه علیه عامل بیماری کپک خاکستری در شرایط آزمایشگاهی به روش کشت متقابل مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

### جداسازی مخمرها

جهت جداسازی مخمرها از مواد غذایی شامل ترشیجات، خیارشور، مربا، دوغ، پنیر و بافت های گیاهی و خاک های بکر از نقاط مختلف استان کرمانشاه نمونه برداری به صورت تصادفی صورت گرفت. برای جداسازی مخمرها از نمونه های مواد غذایی از روش سو و یارو (Suh et al. 2008, Yarrow 1998) و برای نمونه های خاک نیز از سری رقت استفاده شد (Suh et al. 2008).

### تهیه مایه بیمارگر و آزمون کنترل زیستی

مایه بیمارگر *B. cinerea* که بیماریزایی آن اثبات شده بود از کلکسیون بخش گیاهپزشکی دانشگاه رازی تهیه شد. آزمون کنترل زیستی در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش کشت متقابل عامل بیمارگر و جدایه های مخمر صورت گرفت. عامل بیمارگر با فاصله زمانی ۲۴ ساعت زودتر از جدایه مخمر روی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت داده شد. هر یک از تیمارهای مخمر دارای سه تکرار بودند. زمانی که رشد تیمار شاهد به محدوده خط کشت مشخص شده رسید، اقدام به اندازه گیری میزان رشد بیمارگر و محاسبه درصد کاهش رشد میسلیم شد و برای این منظور از فرمول  $N=(a-b)/a \times 100$  استفاده شد (در فرمول، N: درصد بازدارندگی جدایه مخمر، a: میزان رشد قارچ بیمارگر در تیمار شاهد بر حسب سانتی متر، b: میزان رشد قارچ بیمارگر در هر تیمار مخمر) (Etebarian et al. 2005). تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9.1 صورت پذیرفت.

### شناسایی مولکولی جدایه های مخمری

#### استخراج و فزون سازی دی.ان.ای

استخراج دی.ان.ای سلول های مخمر با استفاده از روش حرارت دهی سو و همکاران (۲۰۰۸) صورت پذیرفت. فزون سازی ناحیه D1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای NL4 با توالی (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3 و NL1 با توالی (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) (O'Donnell 1993) صورت پذیرفت (Fell et al. 2000). موفقیت فزون سازی با راندن محصولات واکنش زنجیره-

بازدارندگی از رشد نشان دادند که ۱۴ جدایه با بازدارندگی بیش از پنج درصد جهت تعیین توالی انتخاب گردیدند.

ناحیه تکثیری D1/D2 زیرواحد بزرگ ریبوزومی برای مخمرهای جداسازی شده از مواد غذایی و گیاهان با استفاده از آغازگرهای NL-1 و NL-4 تکثیر شد که طول این ناحیه در حدود ۶۰۰-۵۰۰ جفت باز بود. در این بررسی نه گونه متعلق به هشت جنس مخمری با روش مولکولی شناسایی شد که تمام جدایه‌ها پس از شناسایی در بانک ژن ثبت و شماره دسترسی آن‌ها اخذ شد (جدول ۱). گونه‌های *P. Pichia kudriavzevii*، *Meyerozyma galeiformis*، *Galactomyces candidum*، *Saccharomyces cerevisiae*، *guilliermondii* و *Zygoascus meyeriae* از مواد غذایی و گونه‌های *Pichia*، *Candida parapsilosis* sp.، *Metschnikowia* sp. و *C. C. boidinii* از گیاهان و گونه‌های *M. Lecythophora* sp. و گونه‌های *C. catenulatea* و *guilliermondii* از خاک جداسازی شدند.

ای پلیمرز روی ژل آگاروز یک درصد به مدت یک ساعت در ۸۰ وات تعیین گردید. تعیین ترادف در جهت رفت صورت گرفت و ترادف‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Bankit به بانک ژن ارسال و شماره دسترسی اخذ گردید. برای تایید شناسایی، آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.06 صورت گرفت.

### نتایج و بحث

در این مطالعه تعداد کل جدایه‌های مخمر جداسازی شده، ۱۰۲ عدد بود که ۳۱ جدایه آن‌ها بازیدیومیستی و ۷۱ جدایه آسکومیستی بودند. جداسازی مخمرها از سه گروه مواد غذایی، اندام‌های گیاهی و خاک صورت گرفت. از مواد غذایی ۳۹ جدایه، از اندام‌های گیاهی ۳۵ جدایه و از خاک ۲۸ جدایه مخمر جداسازی گردید. مخمرهای آسکومیستی و بازیدیومیستی با استفاده از آزمون رنگ-آمیزی با دیازینیوم بلو بی از هم تفکیک شدند. در آزمون روی محیط کشت، ۲۵ جدایه مخمر خاصیت

جدول ۱. لیست گونه‌های مخمر شناسایی شده در این پژوهش به همراه شماره دسترسی به توالی D1/D2 در بانک ژن

Table 1. List of identified yeast species in this study and their accession numbers

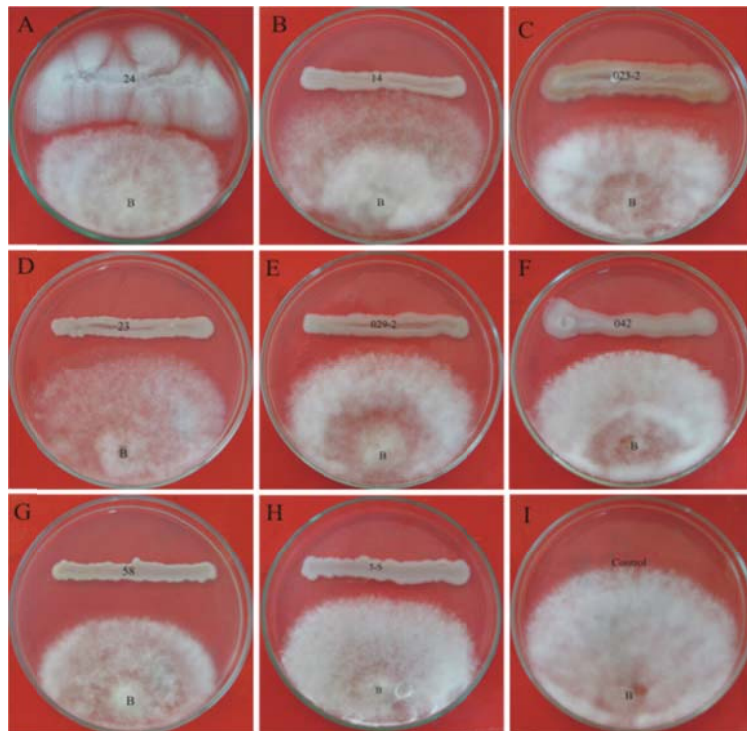
Accession number	Similarity	Source and location	Species	Code of isolate
KP324961	۹۹	Marshmallow-College of Agriculture	<i>Pichia</i> sp.	P-2
KP324965	۹۹	Marshmallow-College of Agriculture	<i>Candida parapsilosis</i>	P-5
KP324976	۹۹	Pistachio- College of Agriculture	<i>Metschnikowia</i> sp.	P-6
KP324962	۹۹	Onion-Kermanshah	<i>Candida boidinii</i>	P-10
KP324970	۹۹	Pepper pickle- Kermanshah	<i>Pichia kudriavzevii</i>	F-4
KP324975	۹۹	Collard pickle-Kermanshah	<i>Pichia galeiformis</i>	F-8
KP324958	۹۹	Water of pickle-Kermanshah	<i>Galactomyces candidum</i>	F-9
KP324978	۹۹	Sourness-Songhor	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	F-19
KP324967	۹۹	Lemon juice-Ravansar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F-20
KP336744	۹۶	Lemon juice-Kermanshah	<i>Zygoascus meyeriae</i>	F-21
KP336745	۹۹	Uucultivated soil- Sahneh	<i>Lecythophora</i> sp.	23-2
KP324971	۹۲	Uucultivated soil- Javanrood	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	29-2
KP055037	۹۸	Salas Babajani	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	36
KP324968	۹۹	Kerende gharb	<i>Candida catenulata</i>	42

تشکیل نشد (شکل ۱). محققان دریافته‌اند که مخمرهای آنتاگونیست با مکانیسم‌هایی مثل رقابت برای مواد غذایی و فضا، میکوپارازیتیسم، اشغال نیچ اکولوژیکی، القای مقاومت به عوامل بیماری‌زا در گیاه و تولید آنزیم-

### آزمون کنترل زیستی

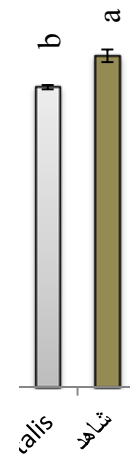
در این بررسی پنج جدایه با رشد سریع مانع از پیشروی پرگنه بیمارگر در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار شدند و در هشت جدایه هاله بازدارنده

های لیتیک سبب کنترل بیمارگرها می‌شوند ( Yao and Tian 2005 ).



شکل ۱. نتایج آزمون برهم کنش مخمرها با قارچ *B. cinerea* در تعدادی از مخمرها. (A) تیمار مخمر *Galactomyces candidum* (B) تیمار مخمر *P. galeiformis* (D) تیمار مخمر *Lecythophora* sp. (C) تیمار مخمر *Pichia kudriavzevii* (E) تیمار مخمر *Meyerozma guilliermondi* (F) تیمار مخمر *C. catenulata* (G) تیمار مخمر *Saccharomyces cerevisiae* (H) تیمار مخمر *Pichia* sp. (I) شاهد. (در تمام تشک‌های پتری حرف B جایگاه بلوک بیمارگر است).

Fig. 2. Results of effect of some yeasts species against on *Botrytis cinerea*. *Galactomyces candidum* (A), *Pichia kudriavzevii* (B), *Lecythophora* sp. (C), *Pichia galeiformis* (D), *Meyerozma guilliermondi* (E), *C. catenulate* (F), *cerevisiae* *Saccharomyces* (G), *Pichia* sp. (H). B is a control in all Petri dishes



جدایه های

شکل ۲. گروه‌بندی میزان رشد قارچ بیمارگر در تیمار با جدایه‌های مخمری نسبت به شاهد با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد  
Fig. 2. The growth of pathogenic fungus in the treatment with yeast species compared to the control using Duncan test at 5%.

بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۹/۱۵ و ۷/۸۴ و ۱۷/۷۹ درصد برای آنها بود. گزارش های بسیاری از توانایی بیوکنترلی این گونه وجود دارد (Wilson and Wisniewski 1989).

#### جنس *Saccharomyces*

در این پژوهش یک نمونه به عنوان *S. cerevisiae* شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۲۷/۴۵ درصد بود. چند گزارش در مورد *S. cerevisiae* به عنوان آنتاگونیست قارچ *B. cinerea* در انگور وجود دارد و دو سویه *S. cerevisiae* فعالیت آنتاگونیستی با طیف گسترده در شرایط آزمایشگاهی در برابر ۱۰ پاتوژن قارچی جدا شده از خاک و میوه نشان داده اند (Nally et al. 2012).

#### جنس *Zygoascus*

در این پژوهش یک نمونه به عنوان *Z. meyeri* شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۳۶/۸۰ درصد بود. تاکنون از این جنس و گونه هیچ گزارشی مبنی بر فعالیت آنتاگونیستی وجود ندارد. این گونه توانایی تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی و توانایی تولید اتانول از این مواد را دارا می باشد (Lorliam et al. 2014).

#### جنس *Lecytophora*

در این پژوهش یک نمونه به عنوان *Lecytophora* sp. شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۳۱/۲۸ درصد بود. یکی از روش های کاهش این آلودگی ها، سم زدایی تراشه های چوب پیش از شروع فرایند تولید کاغذ است و مشخص شده که تیمار تراشه چوب ها با قارچ هایی مانند *Lecytophora* sp. باعث کاهش ۶۷ درصدی مواد سمی شده است (Wang et al. 1995).

#### جنس *Metschnikowia*

در این پژوهش یک نمونه به عنوان

بر اساس گروه بندی صورت گرفته با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد (شکل ۲) بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد در جدایه F-9 (*Galactomyces candidum*) با ۴۷/۸۵ درصد بازدارندگی است. در این مطالعه شاهد با میزان رشد ۵/۲۶ سانتی متر با بازدارندگی صفر درصد در نظر گرفته شد.

#### نمونه های شناسایی شده

##### جنس *Pichia*

در این پژوهش سه نمونه شامل *P. galeiformis*، *P. kudriavzevii* و *Pichia* sp. متعلق به این جنس بودند و میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت به ترتیب ۱۳/۷۲ و ۲۲/۰۸ و ۶/۵۳ درصد برای آنها بود. در میان مخمرهای آنتاگونیست، مخمرهای جنس *Pichia* از جمله *P. anomala*، *P. membranaefaciens*، *angusta*، *P. kudriavzevii* و *P. caribbica*، عوامل موثر کنترل زیستی پس از برداشت گزارش شده اند (Li et al. 2014).

##### جنس *Candida*

در این پژوهش سه نمونه شامل *C. parapsilosis*، *C. boidinii* و *C. catenulata* متعلق به این جنس بودند و میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت به ترتیب ۲۵/۷۶ و ۸/۴۹ و ۲۳/۳۱ درصد برای آنها بود. برخی از مخمرهای این جنس مانند *C. oleophila* به صورت تجاری جهت کنترل بیماری های پس از برداشت تولید می شوند. مخمر *C. parapsilosis* اثرات بازدارنده در مقابل تمام فوزاریموم های جدا شده از ذرت و گندم نشان داده است (Fallah et al. 2016) و علاوه بر این، اثرات آنتاگونیستی این گونه بر رشد میسلیموم و تولید آفلاتوکسین توسط گونه *Aspergillus* گزارش شده است (Niknejad et al. 2012).

##### جنس *Meyerozma*

در این پژوهش سه نمونه به عنوان *M. guilliermondii* شناسایی شدند که میزان

**آنالیز فیلوژنی مخمرهای آسکومیستی بر**

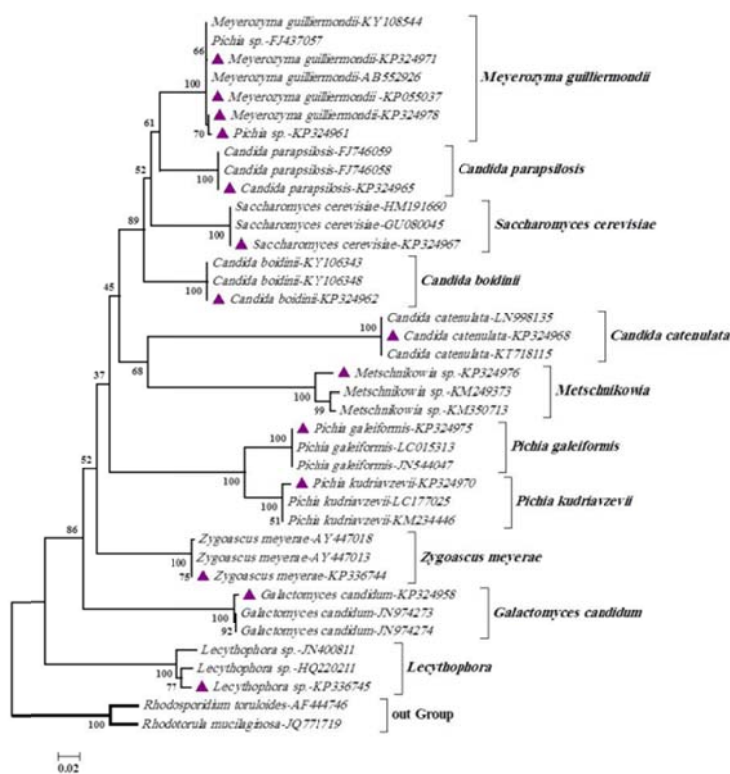
**اساس ناحیه D1/D2**

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای مخمرهای آسکومیستی شناسایی شده، نشان داد که این گونه‌ها با ارزش درست‌نمایی ۱۰۰ درصد همراه با گونه‌های به‌دست آمده از بانک ژن در یک تبار قرار می‌گیرند. گونه‌های *Rhodospordium toruloides* و *Rhodotorula mucilaginosa* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شدند (شکل ۳). توالی‌یابی ناحیه D1/D2 به‌طور کلی یک ابزار پذیرفته شده برای تعیین هویت گونه‌ها به‌ویژه برای مخمرهای وابسته به شاخه آسکومیکوتا می‌باشد ( Ramos *et al.* 2005).

*Metschnikowia* sp. شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۱۳/۷۲ درصد بود. برخی از مخمرهای این جنس مانند *M. fructicola* به‌صورت تجاری جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت تولید می‌شوند.

**جنس *Galactomyces***

در این پژوهش یک نمونه به‌عنوان *G. candidum* شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۴۷/۸۵ درصد بود. برای این گونه یک مورد توانایی کنترل بیماری‌های پس از برداشت در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Cook 2002).



شکل ۳) درخت فیلوژنیک ترسیم شده با استفاده از روش الحاق مجاور بر اساس توالی ناحیه D1/D2 زیرواحد بزرگ دی.ان.ای. ریبوزومی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6. تعداد تکرار ۱۰۰۰ بار بود و گونه *Rhodospordium toruloides* و *Rhodotorula mucilaginosa* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شدند. مثلث‌ها نشان دهنده جدایه‌های ایرانی است. مقیاس، نشان دهنده ۰.۰۲ درصد جایگزینی. شکل‌ها نمایانگر جدایه‌های ایران است.

Fig. 3. Neighbor joining phylogram generated in Mega 6 from the alignment of D1/D2 region of large subunit of the yeast species, using the Kimura two parameter model with complete deletion gap handling and 1,000-replication bootstrapping. The shapes refer to isolates from Iran. *Rhodospordium toruloides* is selected as out group

نمونه‌های شناسایی شده تعداد کمی (سه نمونه) در منابع به‌عنوان عوامل کنترل زیستی با توانایی بالا معرفی شده‌اند که شامل گونه‌های *S.*

**نتیجه‌گیری کلی**

این تحقیق شروعی برای جداسازی مخمرهای با توانایی کنترل زیستی در استان کرمانشاه بود و از

جهت بررسی توانایی این گونه‌ها روی میوه‌ها و  
 آزمایش‌های مزرعه‌ای استفاده شود. *P. kudriavzevii* و *M. guilliermondii, cerevisiae* پیشنهاد می‌شود تحقیق

## REFERENCES

- Agrios GN** (1988) Plant pathology. (3rd ed.). Academic Press, Inc: San Diego.
- Chan, Z. and Tian, S** (2005) Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology* 36: 215-223.
- Cook DWM** (2002) A laboratory simulation for vectoring of *Trichosporon pullulans* by conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92: 1293-1299.
- Droby S, Chalutz E** (1994) Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. In: Wilson CL, Wisniewski ME (Eds.), *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables-theory and practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 63–75.
- Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC, Sayler RJ** (2005) Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 591-598.
- Fallah B, Zaini F, Daei Ghazvini R, Kachuei R, Kordbacheh P., Safari M, Mahmoudi S** (2016) The antagonistic effects of *Candida parapsilosis* on the growth of *Fusarium* species and fumonisin production. *Current Medical Mycology* 2(1): 1-6.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A** (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1351–1371.
- Irtwange SV** (2006) Application of biological control agents in pre- and postharvest operations. *International Commission of Agricultural Engineering*: 8: 1–11.
- Li C, Zhang H, Yang Q, Komla MG, Zhang X, Zhu S** (2014) Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of *Pichia caribbica* against postharvest blue mold decay of apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 62: 7612–7621.
- Lima G, De-Curtis F, Castoria R, Dem-Cicco V** (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science Technology* 8: 257–67.
- Lorliam W, Suwanna S, Akaracharanya A, Tanasupawat S** (2014) First determination of ethanol production and xylose reductase gene of *Zygoascus meyeriae* E23. *Chiang Mai Journal of Science* 41(1): 231-236.
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Munoz CJ, Combina M, Toro ME, Figueroa CLI, Vazquez F** (2012) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* 64 40–48.
- Niknejad F, Zaini F, Faramarzi M, Amini M, Kordbacheh P, Mahmoudi M** (2012) *Candida parapsilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal of Public Health*. 41(10):72-80.
- O'Donnell k** (1993) *Fusarium* and its near relatives. In the fungal holomorph: mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, Reynolds D. R., and Taylor J.W. (eds). CAB International: Wallingford, UK 225–233.
- Ramos J, Rosa C, Carvalho E, Leoncini O, Valente P** (2005) Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant *Candida* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 89 39-44.
- Suh SO, Zhang N, Nguyen N, Gross S, Blackwell M** (2008) Lab manual for yeast study. Mycology lab Louisiana State University 37 p.
- Wang Z, Chen T, Gao Y, Breuil C, Hiratsuka Y** (1995) Biological Degradation of Resin Acids in Wood Chips by Wood-Inhabiting Fungi. *Applied And Environmental Microbiology* 61: 222-225.
- Wilson CL, Wisniewski ME** (1989) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27: 425-441.
- Yao HJ, Tian SP** (2005) Effect of biocontrol agent methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Applied Microbiology* 98: 941-950.
- Yarrow D** (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp:77-100. In: **Kurtzman C.P, Fell J. W** (eds). *The yeasts a taxonomic study* (4nd). Elsevier. Amsterdam.