کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۷، شمارۀ ۱،بهار و تابستان ۱۳۹۷ (۷-۱)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.226841.185

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

مجید قرایی[۱]، صمد جمالی[۲*] و سعید عباسی[۳]
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 سیب‌زمینی دکستروز آگار مورد استفاده قرار گرفتند. این مخمرها شامل: ***Pichia kudriavzevii***، ***Pichia galeiformis***، ***Galactomyces candidum***، ***Meyerozma guilliermondii***، ***Saccharomyces cerevisiae***، ***Zygoascus meyerae***، ***Pichia* sp.**، ***Candida parapsilosis***، ***Metschnikowia* sp.**، ***Candida boidinii***، ***Lecythophora* 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[1], Samad Jamali[2*] and Saeed Abbasi[3]
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*, *Meyerozma guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygoascus meyerae*, *Pichia* sp., *Candida parapsilosis*, *Metschnikowia* sp., *Candida boidinii*, *Lecythophora* 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 kudriavzevii*، *Pichia galeiformis*، *Galactomyces candidum*، *Meyerozma guilliermondii*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Zygoascus meyerae*، *Pichia* sp.، *Candida parapsilosis*، *Metschnikowia* sp.، *Candida boidinii*، *Lecythophora* sp. و *Candida catenulatea*. 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 *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت به‌شمار می‌رود و استفاده از قارچ‌کش‌ها مهم‌ترین و موثرترین راه کنترل این بیماری می‌باشد (Agrios 1988)، اما نگرانی‌هایی که در مورد بقایای قارچ‌کش در محیط زیست و افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا به قارچ‌کش‌ها وجود دارد، جستجو برای یافتن روش‌های کم زیان‌تر و ایمن‌تر مانند کنترل بیولوژیک را افزایش داده است. در میان موجودات هم‌ستیز، مخمرها به عنوان عوامل کنترل زیستی مؤثر، دارای اهمیت بسیاری هستند (Irtwange 2006). مخمرها اسپورهای آلرژی‌زا، مایکوتوکسین و یا آنتی‌بیوتیک تولید نمی‌کنند و از این‌رو کاربرد آن‌ها در کنترل بیمارگرهای گیاهی بدون خطر است (Droby and Chalutz 1994). با توجه به ویژگی‌های فوق، مخمرها به‌عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها برای به‌کارگیری در فرایند کنترل زیستی در نظر گرفته می‌شوند (Lima *et al*. 1998). در این تحقیق توانایی جدایه‌های مخمر جداسازی شده از مواد غذایی و گیاهی در استان کرمانشاه علیه عامل بیماری کپک خاکستری در شرایط آزمایشگاهی به‌روش کشت متقابل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرها

جهت جداسازی مخمرها از مواد غذایی شامل ترشیجات، خیارشور، مربا، دوغ، پنیر و بافت‌های گیاهی و خاک‌های بکر از نقاط مختلف استان کرمانشاه نمونه برداری به صورت تصادفی صورت گرفت. برای جداسازی مخمرها از نمونه‌های مواد غذایی از روش سو و یارو (Suh *et al*. 2008, Yarrow 1998) و برای نمونه‌های 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 جدایه‌های مخمر صورت گرفت. عامل بیمارگر با فاصله زمانی ۲۴ ساعت زودتر از جدایه مخمر روی محیط‌کشت عصاره‌ی 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 اندازه‌گیری میزان رشد بیمارگر و محاسبه درصد کاهش رشد میسلیوم شد و برای این منظور از فرمول $N=(a-b)/a\times100$ استفاده شد (در فرمول، N: درصد بازدارندگی جدایه مخمر، a: میزان رشد قارچ بیمارگر در تیمار شاهد بر حسب سانتی‌متر، b: میزان رشد قارچ بیمارگر در هر تیمار مخمر) (Etebarian *et al*. 2005). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 صورت پذیرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌های مخمری

استخراج و فزون‌سازی دی.ان.ای

استخراج دی.ان.ای سلول‌های مخمر با استفاده از روش حرارت‌دهی سو و همکاران (۲۰۰۸) صورت پذیرفت. فزون‌سازی ناحیه D1/D2 زیرواحد 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 فزون‌سازی با راندن محصولات واکنش زنجیره-

ای پلیمراز 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 بازدارندگی از رشد نشان دادند که ۱۴جدایه 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 (جدول۱). گونه‌های *Pichia kudriavzevii*، *P. galeiformis*، *Galactomyces candidum*، *Meyerozma guilliermondii*، *Saccharomyces cerevisiae* و *Zygoascus meyerae* از مواد غذایی و گونه‌های *Pichia* sp.، *Candida parapsilosis*، *Metschnikowia* sp. و *C. boidinii* از گیاهان و گونه‌های *Lecythophora* sp.، *M. guilliermondii* و *C. catenulatea* از خاک جداسازی شدند.

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

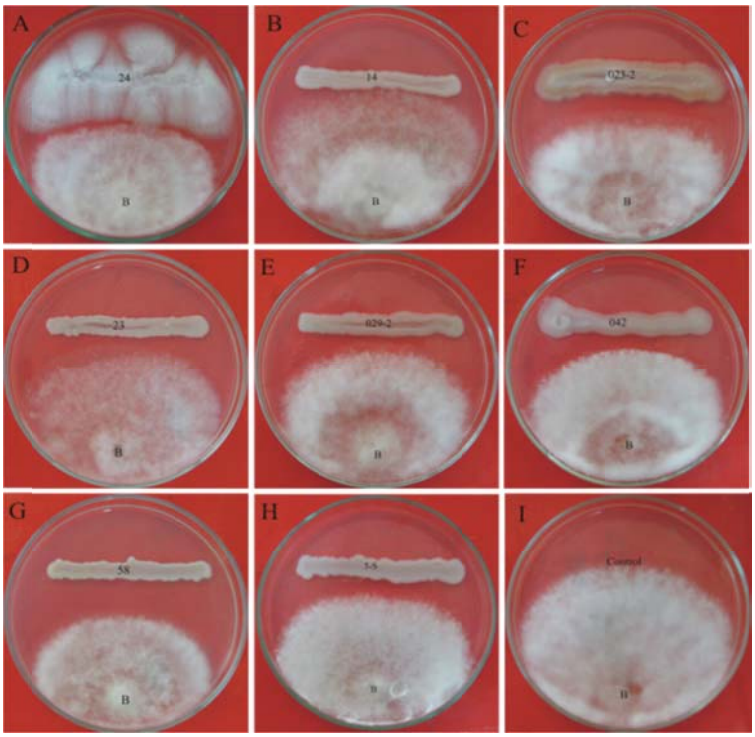
Table 1. List of identified yeast species in this study and their accession numbers

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

آزمون کنترل زیستی

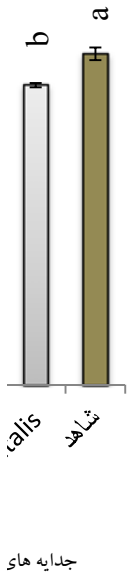
در این بررسی پنج جدایه با رشد سریع مانع از پیشروی پرگنه بیمارگر در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار شدند و در هشت جدایه هاله بازدارنده تشکیل نشد (شکل ۱). محققان دریافته‌اند که مخمرهای آنتاگونیست با مکانیسم‌هایی مثل رقابت برای مواد غذایی و فضا، میکوپارازیتیسم، اشغال نیچ اکولوژیکی، القای مقاومت به عوامل بیماری‌زا در گیاه و تولید آنزیم-

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



شکل ۱. نتایج آزمون برهم‌کنش مخمرها با قارچ *B. cinerea* در تعدادی از مخمرها. (A) تیمار مخمر *Galactomyces candidum*، (B) تیمار مخمر *Pichia kudriavzevii* ، (C) تیمار مخمر *Lecythophora* sp. ، (D) تیمار مخمر *P. galeiformis* ، (E) تیمار مخمر *Meyerozma guilliermondi*، (F) تیمار مخمر *C. catenulata*، (G) تیمار مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ، (H) تیمار مخمر *Pichia* sp. ، (I) شاهد. (در تمام تشتک‌های 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



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%.

بر اساس گروه‌بندی 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 سانتی‌متر با بازدارندگی صفر درصد در نظر گرفته شد.

نمونه‌های شناسایی شده

جنس *Pichia*

در این پژوهش سه نمونه شامل *P. galeiformis*، *Pichia* sp. و *P. kudriavzevii* متعلق به این جنس بودند و میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت به‌ترتیب ۱۳/۷۲ و ۲۲/۰۸ و ۶/۵۳ درصد برای آن‌ها بود. در میان مخمرهای آنتاگونیست ، مخمرهای جنس *Pichia* از جمله *P. angusta* ، *P. membranaefaciens* ، *P. anomala* ، *P. caribbica* و *P. kudriavzevii* به‌عنوان عوامل موثر کنترل زیستی پس از برداشت گزارش شده‌اند (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 به‌ترتیب ۲۵/۷۶ و ۸/۴۹ و ۲۳/۳۱ درصد برای آن‌ها بود. برخی از مخمرهای این جنس مانند *C. oleophila* به‌صورت تجاری جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت تولید می‌شوند. مخمر *C. parapsilosis* اثرات بازدارنده در مقابل تمام فوزاریوم‌های جدا شده از ذرت و گندم نشان داده است (Fallah *et al*. 2016) و علاوه بر این، اثرات آنتاگونیستی این گونه بر رشد میسلیوم و تولید آفلاتوکسین توسط گونه *Aspergillus* گزارش شده است (Niknejad *et al*. 2012).

جنس *Meyerozma*

در این پژوهش سه نمونه به‌عنوان *M. guilliermondii* شناسایی شدند که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۹/۱۵ و ۷/۸۴ و ۱۷/۷۹ درصد برای آن‌ها بود. گزارش‌های بسیاری از توانایی بیوکنترلی این گونه وجود دارد (Wilson and Wisniewski 1989).

جنس *Saccharomyces*

در این پژوهش یک نمونه به‌عنوان *S. cerevisiae* شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۲۷/۴۵ درصد بود. چند گزارش در مورد *S. cerevisiae* به‌عنوان 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 داده‌اند (Nally *et al*. 2012).

جنس *Zygoascus*

در این پژوهش یک نمونه به‌عنوان *Z. meyerae* 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 می‌باشد (Lorliam *et al*. 2014).

جنس *Lecythophora*

در این پژوهش یک نمونه به‌عنوان *Lecythophora* sp. شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۳۱/۲۸ درصد بود. یکی از روش‌های کاهش این آلودگی‌ها، سم‌زدایی تراشه‌های چوب پیش از شروع فرایند تولید کاغذ است و مشخص شده که تیمار تراشه چوب‌ها با قارچ‌هایی مانند *Lecythophora* sp. باعث کاهش ۶۷ درصدی مواد سمی شده است (Wang *et al*. 1995).

جنس *Metschnikowia*

در این پژوهش یک نمونه به‌عنوان

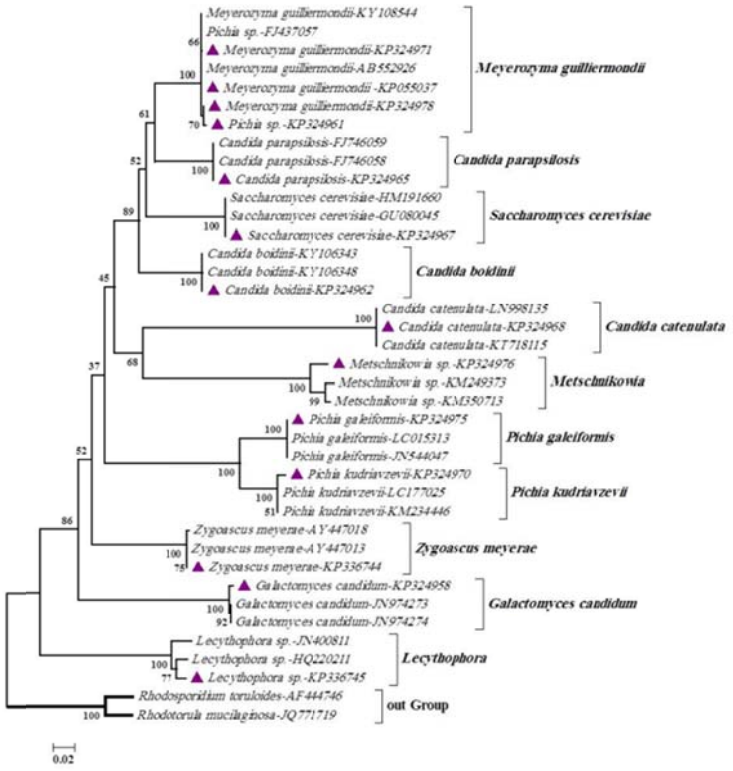
Metschnikowia sp. شناسایی گردید که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر روی محیط کشت ۱۳/۷۲ درصد بود. برخی از مخمرهای این جنس مانند *M. fructicola* به‌صورت تجاری جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت تولید می‌شوند.

جنس *Galactomyces*

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

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 *Rhodosporidium 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).



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 *Rhodosporidium 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. *Rhodosporidium toruloides* is selected as out group

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق شروعی برای جداسازی مخمرهای با توانایی کنترل زیستی در استان کرمانشاه بود و از نمونه‌های شناسایی شده تعداد کمی (سه نمونه) در منابع به عنوان عوامل کنترل زیستی با توانایی بالا معرفی شده‌اند که شامل گونه‌های *S.*

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

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 meyerae* 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.