

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Damjana MIKLIČ MILEK

**VPLIV BIOKONTROLNE AKTIVNOSTI KVASOVK NA RAST
NITASTE GLIVE *Botrytis cinerea* Pers.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**AFFECT OF YEASTS BIOCONTROL ACTIVITY ON GROWTH OF
FILAMENTOUS FUNGI *Botrytis cinerea* Pers.**

DISSERTATION THESIS

Ljubljana, 2007

Doktorska disertacija je bila opravljena v laboratorijih Katedre za biotehnologijo Oddelka za živilstvo.

Senat Univerze v Ljubljani je dne 14. februarja 2006 odobril temo doktorske disertacije in za mentorja imenoval prof. dr. Petra Rasporja.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Franc POHLEVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: Prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: Prof. dr. Ana PLEMENITAŠ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 15. maj 2007

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:
Damjana MIKLIČ MILEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
 DK UDK 579.24: 582.282.23 (043)=863
 KG kvasovke/biokontrolna aktivnost/nitaste glive/*Botrytis cinerea* Pers./interakcije med kvasovko in nitasto glivo/interakcije med kvasovkami različnih vrst/komunikacija med kvasovkami/signalne molekule
 AV MIKLIČ MILEK, Damjana, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
 SA RASPOR, Peter (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenija
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
 LI 2007
 IN VPLIV BIOKONTROLNE AKTIVNOSTI KVASOVK NA RAST NITASTE GLIVE *Botrytis cinerea* Pers.
 TD Doktorska disertacija – področje biotehnologija
 OP XIV, 133 str., 32 pregl., 35 s., 3 pril., 219 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Vpliv biokontrolne aktivnosti 607 različnih sevov/vrst kvasovk izoliranih v Sloveniji, na rast nitaste glive *B. cinerea* Pers. smo določali *in vitro* na sintetičnih trdnih gojiščih. Vrste *Aureobasidium pullulans* (41,5 %), *Metschnikowia pulcherrima* (39,1 %), *Pichia guilliermondii* (29,6 %) ter *Saccharomyces cerevisiae* (25,9 %) imajo biokontrolno aktivnost (BKA) višjo od kontrolne kvasovke *Candida oleophila* (24 %) in drugih. Izbrani sevi *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 ter *S. cerevisiae* ZIM 2180 so znotraj vrste pokazali najvišjo BKA. Na BKA vpliva sestava trdnega gojišča. Kvasovka *S. cerevisiae* je na trdnem gojišču kemijsko definiran mošt zavirala rast glive 74 %, na sintetičnem trdnem gojišču podobnem vinu pa 51 %. BKA sevov na grozdnih jagodah je pokazala, da je okuženost grozdnih jagod sorte Rebula tretiranih z iglo precej velika (62 - 74 %), pri sorti Chardonnay (13 - 34 %), medtem, ko so jagode tretirane z brizganjem okužene 13 - 24 % pri Rebuli, pri sorti Chardonnay pa 3 - 14 %. Kvasovka *S. cerevisiae* je na grozdju obeh sort zavirala rast in razvoj nitaste glive *B. cinerea*. Pomemben vpliv na BKA ima tudi celični stik. Vrste *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* v celičnem stiku z *B. cinerea* popolnoma inhibirajo njeno rast, in obratno na gojišču, kjer se že nahaja nitasta gliva, si kvasovke vrst *C. oleophila*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* izborijo prostor in hrano. Signalne molekule omogočajo komunikacijo med kolonijami kvasovk na daljavo. Prisotnost signalnih molekul med kolonijami kvasovk smo spremljali na barvnem gojišču. Okolica kolonij *A. pullulans* začne že po 24-ih urah spreminjati barvo. Tudi kvasovka *C. oleophila* spremeni okolico kolonij, vendar šele po štirih dneh inkubacije. Pri drugih vrstah kvasovk spremembe barve gojišča iz rumene v vijolično nismo opazili. Na minimalnem gojišču pa se med kolonijami različnih vrst kvasovk pojavi motna ali bistra cona. Med kolonijama kvasovk *C. oleophila* in *S. cerevisiae* smo po 28. dneh inkubacije opazili usmerjeno motno cono. V vzorcih motne ali bistre cone smo količino proteinov določili spektrofotometrično. Z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu (SDS-PAGE) smo v vzorcu usmerjene motne cone med kolonijami kvasovk *C. oleophila* in *S. cerevisiae* opazili tri proteine z ocenjeno velikostjo okoli 55 kDa, 40 kDa in 25 kDa. Za identifikacijo teh proteinov so potrebne nadaljnje preiskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC 579.24: 582.282.23 (043)=863
 CX yeasts/biocontrol activity/filamentous fungi/*Botrytis cinerea* Pers./yeast-filamentous fungi interactions/yeast-yeast interactions/yeast communication/signal molecules
 AU MIKLIČ MILEK, Damjana
 AA RASPOR, Peter (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenija
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
 PY 2007
 TI AFFECT OF YEASTS BIOCONTROL ACTIVITY ON GROWTH OF FILAMENTOUS FUNGI *Botrytis cinerea* Pers.
 DT Doctoral Dissertation
 NO XIV, 133 p., 32 tab., 35 fig., 3 ann., 219 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The biocontrol activity of 607 different strains of yeast isolates in Slovenia on *B. cinerea* Pers. were tested *in vitro* on solid synthetic medium. Species *Aureobasidium pullulans* (41.5 %), *Metschnikowia pulcherrima* (39.1 %), *Pichia guilliermondii* (29.6 %) and *Saccharomyces cerevisiae* (25.9 %) showed biocontrol activity (BCA) higher than biocontrol yeast *Candida oleophila* (24 %) and others. Selected strains *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 and *S. cerevisiae* ZIM 2180 were most effective among their own yeast species. The composition of medium has also an impact on BCA. Yeast *S. cerevisiae* showed 74 % and 51 % inhibition of *B. cinerea* Pers. growth on solid chemical defined must and wine-yeast-peptone-dextrose agar, respectively. BCA of selected strains on *semi in vivo* tests showed high degree of infected berries (*Vitis vinifera* L.) of cv. Rebula treated with a needle (62 - 74 %) and 13 - 34 % on cv. Chardonnay, respectively. While berries treated with spraying were infected 13 - 24 % and 3 - 14 % of cv. Rebula and cv. Chardonnay, respectively. Yeast *S. cerevisiae* inhibited growth of *B. cinerea* on both cultivars (*Vitis vinifera* L.). The cell-cell contact has also an effect on BCA. Growth of filamentous fungi in direct contact with yeasts, is completely inhibited by species *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii*. Vice versa, on medium already inhabited with fungi, yeast species *C. oleophila*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* find their space and food to grow. Signal molecules allow inter colony communication on distance. Presence of signal molecules was followed on solid medium with color indicator. After 24 h the surrounding of *A. pullulans* colonies changed the color. The changes of medium color around *C. oleophila* colonies were also visible, but only after 4 days of incubation. No color change from yellow to purple was observed for other yeast species. On minimal medium, turbid or clear zone, between different yeast colonies appear. Between yeast colonies of *C. oleophila* and *S. cerevisiae* directed turbid path was observed after 28 days of incubation. Quantity of proteins in samples of turbid or clear zone was measured spectrophotometrically. SDS-PAGE analysis was used for detection of proteins. In sample of director turbid zone between yeast colonies of *C. oleophila* and *S. cerevisiae* three proteins with approximate size of 55 kDa, 40 kDa and 25 kDa were found. For detailed identification of these proteins further investigation is needed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 GROZDJE	2
2.1.1 Sorta rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula)	4
2.1.2 Sorta chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay)	4
2.2 NITASTA GLIVA <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	6
2.3 NAČINI KONTROLE OKUŽBE Z NITASTO GLIVO <i>Botrytis cinerea</i>	9
2.3.1 Samoobramba rastline	9
2.3.1.1 Strukturne ovire	9
2.3.1.2 Tvorba sekundarnih antimikrobnih metabolitov	9
2.3.1.3 Proteini, povezani s patogenezo (ang. PR – pathogenesis-related proteins)	10
2.3.2 Kemična kontrola	10
2.3.3 Biokontrola	12
2.4 BOKONTROLNI MIKROORGANIZMI	16
2.4.1 Vrsta <i>Candida oleophila</i>	17
2.4.2 Vrsta <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	17
2.4.3 Kvasovke rodu <i>Pichia</i>	18
2.4.4 Črna kvasovka <i>Aureobasidium pullulans</i>	18
2.4.5 Vrsta <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.4.6 Kvasovke bazidiomicetnih rodov	19
2.5 PRIMARNA POPULACIJA KVASOVK NA GROZDJU	20
2.6 MEDSEBOJNO VPLIVANJE – INTERAKCIJE	22
2.6.1 Sistem trta-grozdje-vino	24
2.6.1.1 Medsebojno vplivanje med kvasovkami in bakterijami	24
2.6.1.2 Medsebojno vplivanje med kvasovkami in nitasto glivo	27
2.6.1.3 Medsebojno vplivanje med različnimi rodovi/vrstami/sevi kvasovk	29
2.6.1.4 Razlike med tekočim in trdnim substratom	30

2.7	CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE	33
3	METODE IN MATERIALI	35
3.1	METODE	35
3.1.1	Priprava vzorcev.....	35
3.1.1.1	Določanje skupnega števila celic kvasovk in spor nitaste glive.....	35
3.1.2	Določanje vpliva biokontrolne aktivnosti <i>in vitro</i>	36
3.1.2.1	Določanje BKA <i>in vitro</i> med kvasovko in nitasto glivo na daljavo.....	36
3.1.2.1.1	Vpliv različnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovk	37
3.1.2.2	Določanje BKA <i>in vitro</i> med kvasovko in nitasto glivo v celičnem stiku	37
3.1.2.2.1	Test A – primarni nanos suspenzije kvasovk	37
3.1.2.2.2	Test B – primarni nanos suspenzije spor nitaste glive	38
3.1.2.2.3	Statistična obdelava podatkov	38
3.1.3	Določanje biokontrolne aktivnosti <i>semi in vivo</i>.....	39
3.1.4	Interakcije med kvasovkami	41
3.1.4.1	Interakcije med kvasovkami na daljavo	41
3.1.4.2	Interakcije med dvema kvasovkama v stiku.....	43
3.1.4.2.1	Določanje zimocidne aktivnosti	43
3.1.4.2.2	Določanje navzkrižne zimocidne aktivnosti.....	44
3.1.5	Identifikacija signalnih molekul.....	44
3.1.5.1	Izolacija ekstracelularnih proteinov iz trdnega medija.....	44
3.1.5.2	Določanje koncentracije proteinov	45
3.1.5.3	Koncentriranje proteinov	45
3.1.5.4	Raztapljanje proteinov	46
3.1.5.5	Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE)	46
3.1.5.6	Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu	47
3.2	MATERIALI	49
3.2.1	Testni mikroorganizmi.....	49
3.2.1.1	Nitasta gliva <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	49
3.2.1.2	Kvasovke	49
3.2.2	Splošna gojišča	50
3.2.2.1	YM (ang. yeast-malt) agar.....	50
3.2.2.2	YPDA (ang. yeast peptone dextrose agar)	50
3.2.3	Gojišča za določanje BKA	50
3.2.3.1	WYPDA (ang. wine yeast peptone dextrose agar).....	51
3.2.3.2	NYDA (ang. nutrient yeast dextrose agar)	51
3.2.3.3	KDM - kemijsko definiran mošt (ang. chemical defined must).....	51
3.2.3.4	PDA (ang. potato dextrose agar) - krompirjev glukozni agar	54
3.2.4	Gojišče za določanje interakcij med kvasovkami.....	54

3.2.4.1	Gojišče GM (ang. glycerol medium) (Palková in sod., 1997).....	54
3.2.4.2	Gojišče GM – BCP (Palková in sod., 1997).....	54
3.2.4.3	Gojišče GMan (ang. manose medium) (Vopálenská in sod., 2005).....	55
3.2.4.4	Gojišče za določanje zimocidne aktivnosti	55
3.2.5	Raztopine, reagenti.....	55
3.2.5.1	Fiziološka raztopina.....	55
3.2.5.2	Citratno-fosfatni pufer	56
3.2.5.3	Pufer za ekstrakcijo ekstracelularnih proteinov iz agarja.....	56
3.2.5.4	Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu.....	57
3.2.5.5	Raztapljanje proteinov	57
3.2.5.6	SDS-PAGE	58
3.2.5.6.1	Ločilni gel.....	58
3.2.5.6.2	Koncentracijski gel	58
3.2.5.6.3	Marker – standard.....	59
3.2.5.6.4	SDS elektroforezni pufer	60
3.2.5.6.5	Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu - barvanje s srebrom	60
3.2.6	Oprema in pribor	61
4	REZULTATI.....	63
4.1	BIOKONTROLNA AKTIVNOST (BKA) <i>IN VITRO</i>	64
4.2	VPLIV GOJIŠČA NA BIOKONTROLNO AKTIVNOST	70
4.2.1	Vpliv gojišča na BKA kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher	70
4.2.2	Vpliv gojišča na BKA kvasovke <i>Aureobasidium pullulans</i>	71
4.2.3	Vpliv gojišč na BKA kvasovke <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	72
4.2.4	Vpliv gojišča na BKA kvasovke <i>Pichia guilliermondii</i>	73
4.2.5	Vpliv gojišča na BKA kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
4.2.6	Primerjava biokontrolne aktivnosti kvasovk na različnih gojiščih	75
4.3	VPLIV KVASOVK NA RAST NITASTE GLIVE <i>SEMI IN VIVO</i>	76
4.3.1	Sorta rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula).....	76
4.3.2	Sorta chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay)	78
4.3.3	Razlike med sevi nitaste glive	80
4.4	VPLIV CELIČNEGA STIKA	83
4.4.1	Vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo.....	83
4.4.1.1	Test A – primarni nanos kvasovk	83
4.4.1.2	Test B – primarni nanos nitaste glive	86
4.4.2	Vpliv celičnega stika med kvasovko in kvasovko	91
4.5.1	Signalne molekule med kvasovkami iste vrste.....	93
4.5.2	Signalne molekule med kvasovkami različnih vrst	94
4.5.3	Količina ekstracelularnih proteinov	98
4.5.4	SDS – PAGE.....	99

5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	102
5.1	RAZPRAVA.....	102
5.1.1	Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk <i>in vitro</i>	103
5.1.2	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost.....	105
5.1.3	Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk <i>semi in vivo</i>	105
5.1.4	Vpliv celičnega stika	107
5.1.5	Signalne molekule	108
5.2	SKLEPI.....	111
6	POVZETEK (SUMMARY).....	113
6.1	POVZETEK	113
6.2	SUMMARY	115
7	VIRI	117

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Komercialni biokontrolni proizvodi (Passoth in Schnürer, 2003; Elad in Steward, 2004)	16
Preglednica 2:	Interakcije med mikroorganizmi in vpliv enega mikroorganizma na drugega (Stopar, 2006).....	22
Preglednica 3:	Prirejena Unterstenhöffer-jeva lestvica za oceno gnilobe grozdne jagode	40
Preglednica 4:	Kombinacije interakcij med kvasovkami.....	42
Preglednica 5:	Barvanje proteinov s srebrom (Yan in sod., 2000)	48
Preglednica 6:	Testirani sevi nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> Pers. shranjenih v ZIM	49
Preglednica 7:	Sestava YM trdnega gojišča.....	50
Preglednica 8:	Sestava YPDA trdnega gojišča	50
Preglednica 9:	Sestava WYPDA trdnega gojišča – modificirano po Nissen & Arneborg, 2003 z dodatkom agarja.....	51
Preglednica 10:	Sestava NYDA trdnega gojišča.....	51
Preglednica 11:	Sestava kemijsko definiranega mošta (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992).....	51
Preglednica 12:	Priprava založnih raztopin mineralov	53
Preglednica 13:	Priprava založne raztopine vitaminov	53
Preglednica 14:	Sestava GM (ang. glycerol medium) trdnega gojišča	54
Preglednica 15:	Sestava GM -BCP (ang. glycerol medium with bromcresol purple) trdnega gojišča	54
Preglednica 16:	Sestava GMan (ang. mannose medium) trdnega gojišča	55
Preglednica 17:	Sestava YEPD - MB (ang. yeast extract-peptone-dextrose agar with methylene blue) trdnega gojišča	55
Preglednica 18:	Priprava pufra za ekstrakcijo proteinov iz agarja.....	56
Preglednica 19:	Priprava vzorčnega pufra 1 (Protein electrophoresis..., 1994).....	57
Preglednica 20:	Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 10 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis..., 1994)	58
Preglednica 21:	Priprava koncentracijskega gela z debelino 1 mm z 4 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis..., 1994)	58
Preglednica 22:	Sestava 5 × SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994)	60
Preglednica 23:	Sestava 1 × SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994)	60
Preglednica 24:	Skupno število sevov različnih vrst kvasovk vključenih v raziskavo	64
Preglednica 25:	Izbrani sevi kvasovk z višjo biokontrolno aktivnostjo znotraj vrste.....	69

Preglednica 26: Rast treh različnih sevov nitaste glive <i>B. cinerea</i> (F58, F61, F63) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk	85
Preglednica 27: Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih sevov nitaste glive <i>B. cinerea</i> in njihovih koncentracij v primerjavi z rastjo na trdnem gojišču brez primarnega nanosa nitaste glive	88
Preglednica 28: Zimocidna aktivnost kvasovk pri pH vrednostih 3,0, 4,0 in 5,0	91
Preglednica 29: Navzkrižna zimocidna aktivnost kvasovk pri pH vrednosti 4,5	91
Preglednica 30: Pojav (+) bistre oz. motne cone okoli kolonij kvasovk iste vrste na GM mediju ter sprememba barve GM-BCP medija	93
Preglednica 31: Pojav (+) bistre oz. motne cone okoli kolonij kvasovk različnih vrst na GM mediju ter sprememba barve GM-BCP medija.....	95
Preglednica 32: Masa proteinov (μg) v okolici kolonij določenih z mikro proceduro po Bradfordu	98

KAZALO SLIK

Slika 1:	Pojavnost okužbe z glivo <i>B. cinerea</i> na delih grozdja (Holz in sod., 2003)	3
Slika 2:	Sorta grozdja (a) rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula) in (b) chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay) (Turković, 1952).....	5
Slika 3:	Predlagan življenjski in bolezenski cikel glive <i>Botrytis cinerea</i> v vinogradu (Elmer in Michailides, 2004).....	7
Slika 4:	Načrt poteka poskusa.....	34
Slika 5:	Določanje biokontrolne aktivnosti in vitro.....	36
Slika 6:	Shema poskusa določanja BKA semi in vivo.....	40
Slika 7:	Shema inokulacije izbranih sevov kvasovk na določenih razdaljah a) mono inokulacija; b) mešana inokulacija	43
Slika 8:	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih vrst kvasovk na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i>	65
Slika 9:	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste <i>Aureobasidium pullulans</i> na rast nitaste glive	66
Slika 10:	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i> na rast nitaste glive	67
Slika 11:	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov rodu <i>Pichia</i> na rast nitaste glive	67
Slika 12:	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na rast nitaste glive	68
Slika 13:	Izbrani sevi kvasovk z višjo biokontrolno aktivnostjo – BKA (%) od kontrolne kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher.....	69
Slika 14:	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih sintetičnih gojiščih.....	70
Slika 15:	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste <i>Aureobasidium pullulans</i> na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih sintetičnih gojiščih	71
Slika 16:	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i> na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih sintetičnih gojiščih.....	72
Slika 17:	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste <i>Pichia guilliermondii</i> na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih sintetičnih gojiščih	73
Slika 18:	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih sintetičnih gojiščih	74
Slika 19:	Biokontrolna aktivnost (%) različnih vrst kvasovk na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> na različnih trdnih gojiščih; (a) 7. dan in (b) 30. dan inkubacije	75
Slika 20:	Okuženost grozdnih jagod (%) sorte rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula) pri nanašanju <i>B. cinerea</i> in kvasovk z injekcijsko iglo.....	77

Slika 21: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula) ob nanašanju <i>B. cinerea</i> in kvasovk s pršilko.....	77
Slika 22: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay) pri nanašanju <i>B. cinerea</i> in kvasovk z injekcijsko iglo	79
Slika 23: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay) ob nanašanju <i>B. cinerea</i> in kvasovk s pršilko.....	79
Slika 24: Okuženost grozdnih jagod (%), ki jo povzroča posamezen sev nitaste glive <i>B. cinerea</i> (F58, F61 in F63), ter posamezna vrsta kvasovk nanosenih na grozdne jagode a) z iglo; b) z brizgo ob času 0 h in 24 h.....	81
Slika 25: Okuženost grozdnih jagod (a) sorte rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula) in (b) sorte chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay) pri nanosu kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher in glive <i>Botrytis cinerea</i> z injekcijsko iglo na začetku eksperimenta (skupina A).....	82
Slika 26: Rast seva nitaste glive <i>B. cinerea</i> F61 po 30 dneh skupne inkubacije na plošči brez primarnega nanosa kvasovke (AK - kontrola) ter na plošči s primarnim nanosom kvasovke.....	84
Slika 27: Rast kvasovk na površini trdnega gojišča z ali brez primarnega nanosa enega od sevov nitaste glive <i>B. cinerea</i> po 30 dneh.....	90
Slika 28: Prisotnost pojava bistre (svetla puščica) in motne (temna puščica) cone okoli posameznih kolonij kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher.....	94
Slika 29: Sprememba barve trdnega gojišča GM-BCP v okolici kolonij po (zgoraj) 24 urah inkubacije in (spodaj) po 168 h inkubacije pri kvasovkah.....	94
Slika 30: Pojav bistre in/ali motne cone med kolonijami kvasovk.....	96
Slika 31: Sprememba barve gojišča GM-BCP okoli kolonij (zgoraj) 24 h inkubacije in (spodaj) po 144h inkubacije.	96
Slika 32: Sprememba barve gojišča GM-BCP okoli kolonij kvasovk (zgoraj) po 24 h inkubacije in (spodaj) po 144 h inkubacije.....	97
Slika 33: Barva gojišča GM-BCP okoli kolonij kvasovk po 144 h inkubacije.	98
Slika 34: SDS – PAGE analiza ekstracelularnih proteinov.	100
Slika 35: SDS – PAGE analiza ekstracelularnih proteinov.	101

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Seznam testiranih sevov (Σ : 608) kvasovk izoliranih iz sistema trta/grozdje/moš/vino in shranjenih v Zbirko industrijskih mikroorganizmov, (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana), njihova biokontrolna aktivnost - BKA (%) na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na trdnem gojišču NYDA po 7. in 30. dneh inkubacije.
- Priloga A1: Biokontrolna aktivnost nekaterih sevov/vrst kvasovk posneto z optičnim čitalcem po 30 dneh inkubacije na trdnem gojišču NYDA.
- Priloga B: Statistična analiza rezultatov biokontrolne aktivnosti med kvasovkami in nitasto glivo v celičnem stiku – test A
- Priloga B1: Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36).
- Priloga B2: Vpliv seva nitaste glive v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=60).
- Priloga B3: Vpliv vrste gojišča v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in nitaste glive, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).
- Priloga B4: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).
- Priloga B5: Vpliv časa inokulacije v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokulata (N=3).
- Priloga B6: Vpliv časa odčitavanja v poskusu A na rast v odvisnosti od gojišča, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=15).
- Priloga B7: Vpliv vrste seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36).
- Priloga B8: Vpliv vrste seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=60).
- Priloga B9: Vpliv vrste gojišča v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=3).
- Priloga B10: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).
- Priloga B11: Vpliv časa inokulacije v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=2).
- Priloga B12: Vpliv časa odčitavanja v poskusu B na rast v odvisnosti od gojišča, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=15).
- Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje mase skupnih proteinov (mikro assay) po Bradfordu.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAK	biokontrolna aktivnost
CO	kvasovka vrste <i>Candida oleophila</i>
AP	kvasovkam podobna gliva <i>Aureobasidium pullulans</i>
MP	kvasovka vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PG	kvasovka vrste <i>Pichia guilliermondii</i>
SC	kvasovka vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BC	nitasta gliva <i>Botrytis cinerea</i>
ZIM	Zbirka Industrijskim Mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
C	sorta grozdja chardonnay (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay)
R	sorta grozdja rebula (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rebula)
PDA	krompirjev dekstrozni agar
NYDA	hranilni kvasni dekstrozni agar
YPDA	kvasni pepton dekstrozni agar
YM	kvasno - sladni agar
WYPDA	vinski kvasni pepton dekstrozni agar
KDM	kemijsko definiran mošt z dodatkom agarja
GM	minimalno gojišče z glicerolom
GM-BCP	GM z dodatkom barvila bromkrezol vijolično
GMan	minimalno gojišče z manozo
YEPD-MB	kvasni pepton dekstrozni agar z dodatkom barvila metilen modro

1 UVOD

V ekosistemu trta-grozdje-mošť-vino kvasovke, nitaste glive in bakterije že tisočletja sobivajo. Gliva *Botrytis cinerea* Pers. je fitopatogena nitasta gliva, ki lahko živi kot saprofit, in jo najdemo povsod v naravi. Okužuje skoraj vse vrste rastlin in na njih različna rastlinska tkiva. Gliva *Botrytis cinerea* Pers. in glive različnih rodov povzročajo bolezni grozdja in vinske trte, tvorijo mikotoksine in s tem spreminjajo biokemijske lastnosti grozdja. Veliko gospodarsko škodo povzročajo glive že v vinogradu, saj je zaradi okužbe grozdja pridelek manjši, hkrati pa je prizadeta tudi kakovost grozdja in posledično vina.

Kvasovke, prisotne na grozdju, prehajajo v mošt, kjer imajo vodilno vlogo pri fermentaciji mošta v vino. Poleg kvasovk različnih rodov *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* ter *Metschnikowia*, ki so prisotne na zrelem grozdju, je občasno prisotna tudi kvasovka *Aureobasidium pullulans*. Različna sestava populacije kvasovk in gliv na grozdni jagodi ter kasneje v moštu je odvisna od trgatve (letnika) in tudi od drugih dejavnikov, kot so geografska lokacija, podnebne razmere, starost vinske trte, sorta grozdja, zrelost grozdja ob trgatvi, mehanske poškodbe grozdja ter vrste in čas uporabe fungicidov.

Hiter razvoj odpornosti gliv na fungicide in vedno večji pritisk potrošnikov, da se zmanjša uporaba fitofarmaceutskih pripravkov, vodita v razvoj novih strategij kontrole rasti gliv na grozdju. Te zajemajo predvsem uporabo kvasovk z biokontrolno aktivnostjo. Uporaba kvasovk kot biokontrolnih organizmov ima precejšnjo prednost v primerjavi s kemično kontrolo, saj manj oz. sploh ne obremenjujejo okolja. Njihov način delovanja je bolj kompleksen, zato je možnost pojava rezistence odpornosti manjša, hkrati pa je njihova uporaba sprejemljiva tudi za ekološke kmetije.

Rast na trdni podlagi (kot je grozdje) zahteva od kvasovk prilagoditve. Pomembna razlika med tekočim in trdnim substratom je v dostopnosti hranil, saj niso vse celice znotraj ene kolonije na trdnem substratu enako oddaljene od hranil. Ni znano, ali posamezne celice tvorijo in izločajo kakšne snovi, ki sodelujejo pri organizaciji kolonije, ali obstaja kakšna hierarhija med številnimi celicami v eni koloniji in ali oz. kako celice komunicirajo med seboj znotraj kolonije. V zadnjem času je več raziskav usmerjenih h komunikacijam med kolonijami na daljavo in iskanju signalnih molekul. Kako (če sploh) med sabo na daljavo komunicirajo kvasovke različnih vrst ali z drugimi mikroorganizmi npr. z nitasto glivo, ni znano.

2 PREGLED OBJAV

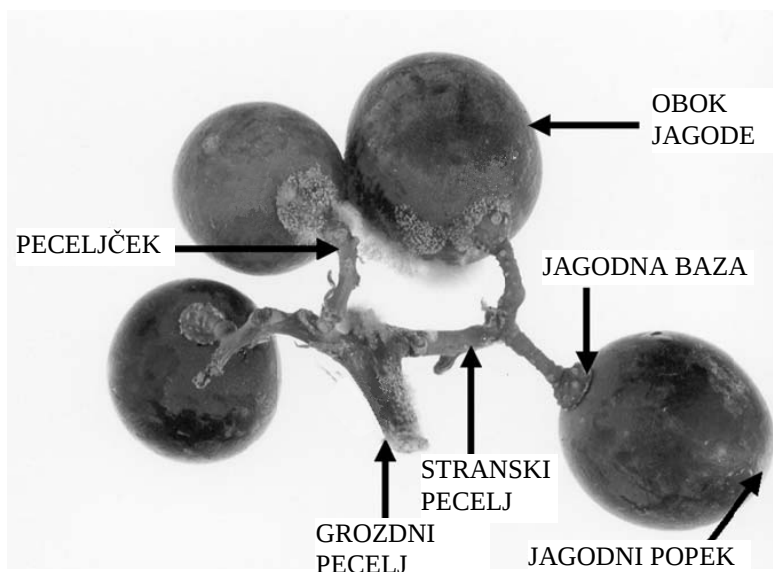
Nitaste glive rodov *Botrytis*, *Uncinula*, *Alternaria*, *Plasmopara*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Oidium* in *Cladosporium* z razvojem na trti in grozdju pred trgatvijo povzročajo okužbe, ki vplivajo na kakovost grozdja ter s tem posledično tudi na kakovost vina (Fleet, 1993; Fleet, 2003a; Tournas in Katsoudas, 2005). Okužbe, ki jih s svojim delovanjem povzročijo gliva *B. cinerea* in njej sorodne glive po svetu, povzročajo veliko gospodarsko škodo pri pridelavi grozdja in drugega sadja (jagode, jabolka, kivi ...), zelenjave (paradižnik, kumare, jajčevci, solata ...) in okrasnega cvetja (vrtnice, gerbere ...) ter pri shranjevanju in transportu kmetijskih pridelkov (Rosslenbroich in Stuebler, 2000; Elad in sod., 2004; Leroux, 2004). Na svetu je približno osem milijonov hektarjev vinogradov, ki letno proizvedejo več kot 26 milijard litrov vina (Pretorius, 2000). Okužbe z nitasto glivo *Botrytis cinerea* povzročijo približno za dve milijardi dolarjev izgub na leto. Ocenjujejo, da se je v svetovnem merilu poraba sredstev za preprečevanje in zatiranje okužb z glivo *Botrytis* v zadnjih letih povečala na od 15 do 25 milijonov dolarjev letno (Elad in sod., 2004). Zato se zadnjih 125 let s proučevanjem nitaste glive *Botrytis cinerea* ukvarjajo različne skupine raziskovalcev.

2.1 GROZDJJE

Siva plesen ali grozdna gniloba, ki jo povzroča nitasta gliva *Botrytis cinerea*, je nevarna bolezen grozdja in vinske trte (*Vitis vinifera* L.), ki zmanjša količino grozdja ob trgatvi in vpliva na kakovost vina, pridelanega iz okuženega grozdja (Ellison in sod., 1998; Vivier in Pretorius, 2002). Čeprav je bolezen že dolgo znana, so okužbe grozdja z njenimi negativnimi učinki na količino in kakovost grozdja postale pogostejše s t.i. visokoproduktivnim vinogradništvom, kjer se je zaradi boljšega poznavanja načina gnojenja in zaščite rastlin produktivnost vinske trte povečala. Trendi intenzivne pridelave grozdja s čim višjo stopnjo sladkorja ter čim kasnejšim obiranjem grozdja vodijo v pridelavo bolj sladkih vin, kar pa hkrati nudi boljše pogoje za rast glive *B. cinerea* (Rosslenbroich in Stuebler, 2000).

Sorta vinske trte je zelo pomemben dejavnik, saj so različne sorte različno odporne oz. dovzetne za okužbo z glivo *B. cinerea*. Mlikota Gabler je s sodelavci leta 2003 primerjal morfološke, anatomske in kemične lastnosti 42 različnih sort vinske trte. Ugotovil je, da je le 11 vrst bolj odpornih na okužbo z glivo *B. cinerea* in da je število listnih rež povezano z odpornostjo (več je rež, manjša je odpornost). Tudi struktura in debelina kože ter prisotnost poprha na grozdni jagodi so pomembne lastnosti pri odpornosti grozdja proti okužbi z glivo *B. cinerea*. Stik med dvema jagodama, kjer je kožica zelo tanka ali je ni, poveča dovzetnost za okužbo (Mlikota Gabler in sod., 2003; Elmer in Michailides, 2004).

Grozdje je občutljivejše na okužbo z nitasto glivo tam, kjer prihaja do iztekanja grozdnega soka (slika 1). Okužba z glivo *B. cinerea* se v 30 % začne na jagodni bazi, to je na stiku med grozdno jagodo in grozdnim peceljčkom. V 20 % se okužba pojavi na listih, glavnem peclju, njegovih stranskih vejah in peceljčku. Na listnem peclju je okužba manj prisotna (10 %), na oboku nepoškodovane grozdne jagode samo v 5 %. Na spodnjem delu grozdne jagode, to je pri jagodnem popku, se okužba z glivo *B. cinerea* skoraj nikoli ne začne (0,02 %) (Holz in sod., 2003).



Slika 1: Pojavnost okužbe z glivo *B. cinerea* na delih grozdja (Holz in sod., 2003)

Figure 1: Position of *B. cinerea* disease appearance on grape (Holz et al., 2003)

Pojav glive *B. cinerea* je povezan tudi z napadi grozdnega sukača (*Lobesia botrana*), ki povzroča poškodbe površine grozdne jagode. Prva generacija napada cvet, druga se razvija na nezrelih grozdnih jagodah in povzroča grozdno gnilobo, tretja generacija pa poškoduje zrele grozdne jagode (Elmer in Michailides, 2004).

Poleg grozdnega sukača lahko poškodbe grozdja povzročijo tudi drugi biološki faktorji: miši, rove in drugi mali sesalci, čebele, ose in drugi insekti, kače, ptiči, rane zaradi drugih patogenih mikroorganizmov, npr. oidija (*Uncinula necator*), ali človeka (Elmer in Michailides, 2004). Okužbo z nitasto glivo *B. cinerea* pospešijo in olajšajo tudi vremenske razmere (pozeba, toča, sunki vetra, sonce), ki povzročijo nabrekanje in pokanje jagod.

Najpomembnejši ukrepi pri zaščiti grozdja pred boleznijo so predvsem izbor, selekcija sort (sorte z zbitimi grozdi in tanko pokožico so občutljivejše); lega vinograda (bolezen je pogostejša v vinogradih z zaprto nižinsko lego); ustrezna gojitvena oblika in obremenitev trt; primerno gnojenje z dušikom (premalo dušika povzroča zaustavitev fermentacije,

preveč dušika pa je povezano s hitrejšo rastjo trte, večjim številom (debelejših) jagod na grozd, tanjšo kožico jagod); škropljenje s sredstvi, ki utrjujejo jagodno kožico (bakrovi pripravki); ustrezna agro- in ampelotehnika (redno opravljanje zelenih del, odstranjevanje listja v coni grozdja v času barvanja grozdnih jagod zaradi ugodnega vpliva svetlobe na utrjevanje jagodne kožice, vzdrževanje ustrezne listne gostote, odstranjevanje mumificiranih grozdov); ustrezna strategija varstva trte s fitofarmaceutskimi sredstvi (pravočasno škropljenje proti grozdnemu sukaču in grozdni gnilobi) (Blažič in sod., 2001; Čuš in sod., 2003).

2.1.1 Sorta rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula)

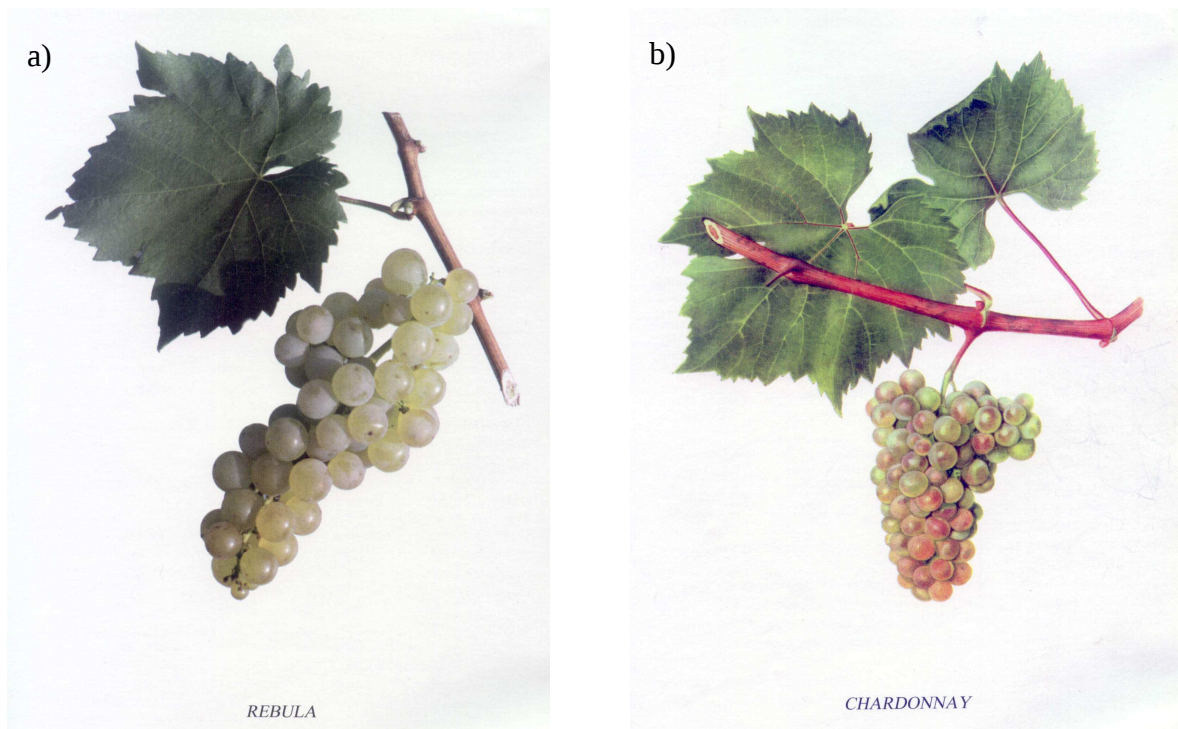
Spada v zahodnoevropsko skupino sort. Njena domovina je Italija, kjer jo zgodovinarji omenjajo že od 14. stoletja, pri nas pa jo štejemo med udomačene sorte (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Pri nas je razširjena na Vipavskem in v Goriških brdih, kjer predstavlja 25,5-odstotni delež med sortami. Spada med sorte, ki so v tem vinorodnem območju občutljivejše na grozdno gnilobo (Čuš in sod., 2003).

Grozd je podolgovat, srednje velik, valjaste oblike in dokaj nabit. Grozdni pecelj je kratek, pri osnovi olesenel. Jagoda je srednje debela, okroglasta, rumenkasta in pokrita z obilnim oprhom. Jagodni popek je izražen, kožica pa je debela. To je srednje bujna in srednje pozna sorta, ki rodi obilno in redno. Grozd (slika 2a) tehta od 140 do 160 gramov. Vsebnost sladkorja pri sorti rebula dosega v povprečju vrednost 170 g/l (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

2.1.2 Sorta chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay)

Sorta chardonnay je francoska sorta, izhaja iz Burgundije, kjer že od nekdaj predstavlja najpomembnejšo sorto za pridelavo vseh tipov vin tako penečih kot mirnih vin (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). V Sloveniji je sorta chardonnay ena izmed štirih sort (poleg sort laški rizling, sauvignon in beli pinot), ki so priporočene v vseh treh vinorodnih deželah in okoliših v Sloveniji (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Ta sorta zahteva sončne lege in zračna ter srednje težka tla, je srednje bujna in srednje pozna sorta, ki redno rodi. Grozd je majhen do srednje velik, cilindrične oblike, koničast, z enim ali dvema krilcema in tehta od 60 do 120 gramov (slika 2b). Jagoda je drobna, okrogla in pravilne oblike. Jagodni popek je izražen, kožica pa tanka in zelenorumenkasta. Pridelek na hektar se giblje od 3000 l (za vina vrhunske kakovosti) do 10000 l in več. Vsebnost sladkorja dosega pri tej sorti vrednosti med 172 in 196 g/l (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).



Slika 2: Sorta grozdja (a) rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula) in (b) chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) (Turković, 1952)

Figure 2: Grape cultivar (a) *Vitis vinifera* L. cv. Rebula and (b) *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay (Turković, 1952)

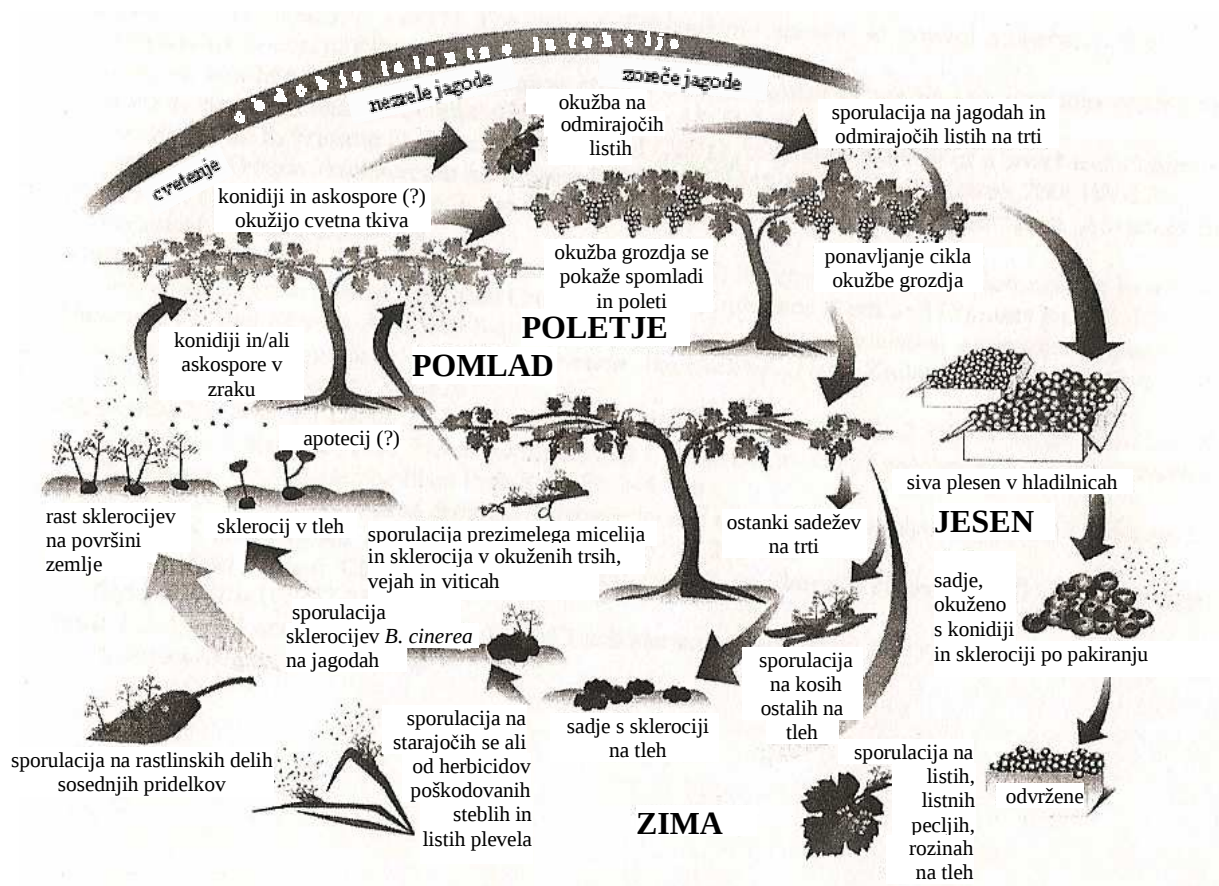
2.2 NITASTA GLIVA *Botrytis cinerea* Pers.

Botrytis je znan kot rod že od leta 1729, ko je nesporno obliko opisal Micheli (Elad in sod., 2004). Predstavnik rodu so večkrat zamenjali z oz. poimenovali kot glivo *Sclerotinia* spp. Kasneje, leta 1866, je de Bary odkril povezavo med anamorfno obliko glive *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in teleomorfno obliko *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel, leta 1954 pa je Whetzel odpravil nejasnosti med rodovi in teleomorfno obliko poimenoval *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Rod *Botrytis* sestavlja prek 20 različnih vrst, vendar vse še nimajo znanih teleomorfni oblik (Beever in Weeds, 2004; Elad in Steward, 2004). Taksonomsko je nitasta gliva *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel uvrščena v kraljestvo gliv, deblo *Ascomycota*, razred *Leotiomyetidae*, red *Helotiales*, družino *Sclerotinaceae*.

Vrste rodu *Botrytis* so nekrotrofi, ki kot patogeni lahko okužijo določenega specifičnega gostitelja ali kot v primeru *B. cinerea* zelo širok spekter gostiteljev. Že leta 1968 je MacFarlane naštel 235 različnih gostiteljskih vrst, ki jih okužuje vrsta *B. cinerea* in druge vrste rodu *Botrytis* (MacFarlane, 1968; Jarvis, 1977). Po okužbi in odmrtnosti gostiteljskega tkiva lahko gliva preživi in sporulira kot saprofit ali tvori sklerocije, ki preživijo dolgo časa. Gliva se v različnih habitatih lahko nahaja bodisi kot micelij, mikro- in makrokonidiji, klamidospore, sklerocij, apotecij in askospore (slika 3) (Holz in sod., 2004). Splošen življenjski cikel anamorfne oblike glive *Botrytis* je sestavljen iz več faz: somatski (vegetativni) sistem micelija, ki tvori nespolne konidije (striktno makrokonidije), sklerocije in mikrokonidije (spermacij). Sklerociji ponavadi začnejo rasti v micelij ali konidije, izjemoma lahko ob ustreznih pogojih preidejo v spolno fazo in po fertilizaciji nastane apotecij (*Botryotinia* teleomorfna faza). Glivo *Botryotinia fuckeliana* v naravi redko najdemo v spolni obliki (Beever in Weeds, 2004). Tipična in najpogostejša oblika glive *B. cinerea* so konidiji, okrogli do eliptični, s kratkim vratom in brazgotino, nastalo pri osamosvajanju od konidiofora (Tenberge, 2004). Konidiji so veliki $8 - 14 \times 6 - 9 \mu\text{m}$ (Samson in sod., 2000). Ob obilju konidijev med rastno dobo v vinogradu razmnoževanje glive s spolno obliko glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel s tehnološkega stališča ni pomembno (Maček, 1990; Ellison in sod., 1998).

Bolezen se začne s primarnim ciklom glive na trti in se nadaljuje s serijo sekundarnih ciklov, ki vodijo v razširitev bolezni (Elad in sod., 2004). Pri prenosu inokuluma na gostitelja sodelujejo različni prenašalci, kot so veter, dež in žuželke. Gliva *Botrytis cinerea* okužuje liste, brste, trse in grozde skozi celo leto (slika 3) (Samson in sod., 2000; Holz in sod., 2003). Konidiji so glavni vir okužbe, s katerim se začne primarni cikel razvoja *B. cinerea*. Zgodaj spomladi se začnejo konidiji tvoriti na miceliju ali/in na sklerociju bodisi na gostiteljskem tkivu ali na površini tal (slika 3) (Elmer in Michailides, 2004). Gliva *Botrytis* raste v širokem temperaturnem območju od 1 do 32 °C, raste in se razvija pa

tudi pri temperaturi skladiščenja $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri optimalni temperaturi (med 15 in $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in optimalni relativni vlažnosti (nad 90%) poteče klitje konidijev v 5 do 9 urah in okužba v 15 urah. Cel cikel od klitja do sporulacije poteče v manj kot treh dneh (Fugelsang, 1997). Okužba se lahko začne skozi listno režo, skozi peceljček, skozi rane ali z neposredno penetracijo skozi kutikulo (McClellan in Hewitt, 1973; Maček, 1990; Coertze in Holz, 1999; Coertze in Holz, 2002). Okužbi prek nezrelih grozdnih jagod običajno sledi latentna doba. V tem obdobju se grozdi med fazo cvetenja in začetkom zorenja razvijajo brez značilnih simptomov in patogenost se pokaže šele, ko grozd dozori. Kožica zrele grozdne jagode in jagode v drugih fazah rasti oz. zorenja je dovolj močna fizikalna ovira, da prepreči penetracijo suhemu zračnemu miceliju (Coertze in Holz, 1999; Coertze in sod., 2001; Coertze in Holz, 2002).



Slika 3: Predlagan življenjski in bolezenski cikel glive *Botrytis cinerea* v vinogradu (Elmer in Michailides, 2004)

Figure 3: Proposed life cycle of *Botrytis cinerea* and disease cycle of grey mould in wine and table grape vineyards (Elmer and Michailides, 2004)

Vrste *Botrytis* okužujejo sadje in zelenjavo tudi med skladiščenjem ter transportom. Način in čas okužbe sta zelo različna pri različnih rastlinah in njihovih delih. Simptomi se

pokažejo kot sivo rjavo obarvanje, sivo bel do rumeno rjav puh (micelij in konidiji) pa raste na površini okuženega tkiva (Droby in Lichter, 2004).

Pod določenimi pogoji lahko okužba grozdnih jagod z glivo *B. cinerea* povzroči razvoj t. i. žlahrne gnilobe (Ribéreau-Gayon in sod., 1980; Doneche, 1993). Da se to zgodi v naravi, morajo grozdne jagode dozoreti cele in nepoškodovane. Med dozorevanjem morajo biti ugodne tudi podnebne razmere: menjava kratkega (3– 4 dni) vlažnega obdobja, ki omogoči klitje konidijev, ter dolgega suhega obdobja (okoli 10 dni), ki skoncentrira in pretvori sladkorje v grozdju (Doneche, 1993). Določena stopnja vlažnosti (rosa, megla, pršenje) je nujno potrebna za razvoj glive. Gliva na površini grozdne jagode s penetracijo povzroči nastanek por, skozi katere izhlapeva voda, v grozdni jagodi pa se sladkorji koncentrirajo (tudi do 360 g/l). Osmotski tlak se spremeni in glivi onemogoči dostop do hranil, zato se rast glive *B. cinerea* ustavi. Kot vir hranil lahko gliva uporabi organske kisline (vinsko in jabolčno), tako v jagodi povzroči zvišanje vrednosti pH in znižanje vsebnosti organskih kislin. Zaradi rasti glive se zgodijo tudi druge spremembe v kemični sestavi grozdja, ki pomembno vplivajo na kakovost sladkih vin (Doneche, 1993).

2.3 NAČINI KONTROLE OKUŽBE Z NITASTO GLIVO *Botrytis cinerea*

2.3.1 Samoobramba rastline

Na splošno se rastline ščitijo pred patogeni s kombinacijo različnih mehanizmov. Strukturne posebnosti, ki delujejo kot fizične ovire, preprečijo organizmu vstop v rastlino in širjenje po njej. Biokemične reakcije v rastlinskih celicah in tkivih pa »skrbijo« za nastanek spojin, ki so bodisi toksične za patogena ali inhibitorne za rast patogena na/v rastlini (Dermastia, 2006).

Kombinacije strukturnih posebnosti in biokemičnih reakcij, vključenih v obrambo rastline, so v različnih sistemih gostitelj-patogen različne. Celo pri istem gostitelju in patogenu se lahko ta kombinacija spreminja s starostjo rastline, vrsto rastlinskega organa in tkiva, prehranskega statusa rastline ter podnebja (Dermastia, 2006).

2.3.1.1 Strukturne ovire

Strukturne ovire lahko nastanejo kot posledica odpornosti in nespecifičnih odgovorov na poškodbe (Heath, 2000; Heath, 2001; Mellersh in Heath, 2001; Heath, 2002). Pojavi se lahko lignifikacija celične stene (Dixon in Paiva, 1995) ali sinteza in vgraditev fenolnih amidov v celično steno (McLusky in sod., 1999). Spremenjena celična stena tako postane fizična ovira za penetracijo glive ali je kot vir hranil neuporabna.

2.3.1.2 Tvorba sekundarnih antimikrobnih metabolitov

Rastlina tvori dva tipa antimikrobnih metabolitov; fitoaleksine in fitoanticipine (van Etten in sod., 1994; van Etten in sod., 2001; Mert-Turk, 2002). Razlika med njimi je izključno v tem, kako nastanejo; fitoaleksini se sintetizirajo in kopičijo v rastlinski celici kot odgovor na okužbo z mikroorganizmom, medtem ko so fitoanticipini prisotni v rastlini že pred stikom z mikroorganizmom. Mogoče je, da ista kemična snov služi kot fitoaleksin in/ali fitoanticipin celo v isti rastlini (van Etten in sod., 1994; van Etten in sod., 2001). Sekundarni antimikrobni metaboliti se po kemični strukturi in načinu delovanja med sabo zelo razlikujejo. Sem spadajo: resveratrol in drugi stilbeni (piceid, pterostilbeni, viniferini) ter proantocianidini pri vinski trti, α -tomatin in saponini pri listih ter nezrelih paradižnikih, kukurbitacini pri kumarah, bučah in jajčevcih, tulipalini pri tulipanih, tsibulini pri čebuli in drugi (van Baarlen in sod., 2004).

2.3.1.3 Proteini, povezani s patogenezo (ang. PR – pathogenesis-related proteins)

S patogenezo povezani (PR) proteini predstavljajo raznoliko skupino proteinov, ki jih tvorijo rastline v patoloških oz. podobnih razmerah. Razdeljeni so na osnovi aminokislinskega zaporedja, seroloških povezav ter glede na njihovo encimatsko in biološko aktivnost (van Loon in van Strien, 1999; Edreva, 2005). PR-proteini so nizkomolekularni proteini z molekulsko maso, manjšo od 50 kDa, so topni in stabilni pri nizki vrednosti pH (<3), so termostabilni in odporni na delovanje proteaz (van Loon in van Strien, 1999; Edreva, 2005). Primarno nastajajo in se kopičijo v celičnih stenah in vakuolah (van Loon in van Strien, 1999). Nastanek PR-proteinov sprožijo fizikalni dražljaji (poškodbe, UV-B-sevanje, osmotski šok, nizka temperatura, pomanjkanje in presežki vode) ali kemijski dražljaji (salicilna, poliakrilna in maščobne kisline, anorganske soli) in tudi rastlinski hormoni (van Loon in van Strien, 1999; Edreva, 2005). Fitohormoni (avksini, giberelini, citokinini, etilen in nekateri drugi) posredno vplivajo na dovzetnost rastlin za okužbo s patogenom. Biosinteza, transport, metabolizem in delovanje hormonov vplivajo na ravnotežje hormonov v celici gostitelja in s tem na dovzetnost za okužbo (van Loon in van Strien, 1999; Sharon in sod., 2004; Edreva, 2005).

Pomembna skupna lastnost vseh PR-proteinov je njihovo fungicidno delovanje. Nekateri PR-proteini imajo tudi antibakterijsko, insekticidno, nematicidno in antiviralno delovanje (van Loon in van Strien, 1999; Edreva, 2005). Pri posameznih proteinih je fungitoksičnost zelo različna, prav tako je različna tudi specifična encimska aktivnost, ki se lahko razlikuje tudi do 250-krat glede na posamezen substrat. V grozdju prisoten PR-protein hitinaza ima zelo visoko botriticidno aktivnost (van Loon in van Strien, 1999).

2.3.2 Kemična kontrola

Kemična kontrola oz. uporaba fungicidnih sredstev je glavni način, s katerim lahko zmanjšamo pojav, rast in razvoj gliv na rastlinah. Kemična kontrola se je razširila sredi devetdesetih let, saj so na tržišče prišla nova sredstva za zatiranje glive *B. cinerea* (Forster in Staub, 1996; Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Za zatiranje sive plesni in drugih bolezni, ki jih povzročajo glive *Botrytis*, se uporabljajo t. i. botriticidi. Najpogostejši način uporabe je razprševanje kemičnega sredstva na rastline. Doziranje fungicidnih sredstev je različno: 2000–3000 g/ha do 400–500 g/ha. Tudi število tretiranj na sezono se pri različnih sredstvih razlikuje: od enega ali dveh pa tudi do več kot dvajset tretiranj (Leroux, 2004).

Sintetične botriticide delimo glede na način delovanja v pet skupin (Leroux, 2004):

Fungicidi, ki vplivajo na respiracijo: ditiokarbamati (tiram, mankozeb, maneb) N-trihalometiltio fungicidi (kaptan, folpet), kloronitrili (klorotalonil), fenilpiridinamini (fluazinam), strobilurini (strobilurin A, azoksistrobin, metaminostrobin). Številne skupine fungicidov motijo dotok energije in s tem močno zavirajo rast konidijev. Predvsem gre za fungicide z večstranskim delovanjem (ang. multi-site), ki inhibirajo različne encime s tiolno skupino, vključene v respiracijo celice. Za ustrezen učinek so potrebne zaporedne aplikacije sredstev visokih odmerkov – tudi do 2000 g/ha (Leroux, 2004).

Antimikrotubulinski toksikanti: benzimidazoli (tiabendazol, karbendazim, benomil). Ta skupina fungicidov ne prepreči klitja konidijev, vendar že pri nizkih koncentracijah (500 g/ha) zavira rast oz. podaljševanje hif in povzroča deformacije kličnih hif (Leroux, 2004).

Spojine, ki vplivajo na osmoregulacijo: dikarbosimidi (klozolinat, iprodion, procimidon, vinklozolin), fenilpiroli (pirolnitrin, fenpiklonil, fludioksonil), aromatski ogljikovodiki (dikloran, kvintozen, o-fenilfenol). Inhibirajo tako vzklitje kot rast micelija, hkrati pa tudi povzročajo morfološke spremembe klične hife (otekanje, pokanje in razvejanje) (Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Fludioksonil je od 30- do 40-krat bolj toksičen od dikarboksimidov, vendar so odmerki za obe družini fungicidov podobni: 500 g fludioksonila/ha in 750 g dikarboksimida/ha (Leroux, 2004).

Fungicidi, katerih toksičnost je zavirana z aminokislinami: anilinopirimidini (ciprodinil, pirimetanil). *In vitro* študije so pokazale, da anilinopirimidini močno zavirajo podaljševanje klične hife pri *B. cinerea*, vendar je vpliv na rast micelija zelo odvisen od sestave hranilnega substrata (Leroux, 2004). Za nekatere aminokislino, posebno metionin, je dokazano, da zavirajo fungitoksičnost anilinopirimidinov (Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Anilinopirimidini preprečijo izločanje hidrolitičnih encimov (npr. proteaz, celula, lipaz, kutinaz), ki sodelujejo pri okužbi. Uporabljajo se koncentracije od 200 do 1000 g/ha (Leroux, 2004).

Inhibitorji biosinteze sterolov: alilamini (terbinafin), tiokarbamati (tolnaftat), hidroksianilidi (fenheksamid). Med sabo se razlikujejo glede na mesta delovanja, lahko delujejo kot inhibitorji epoksidacije, demetilacije, redukcije ali izomerizacije. Ti različni fungicidi ne preprečujejo klitja konidijev, vendar pri nizkih koncentracijah (750 g/ha) zavirajo podaljševanje klične hife in rast micelija (Rosslenbroich in Stuebler, 2000; Leroux, 2004).

Da je zaščita pridelka pred vrstami *Botrytis* učinkovita, je treba preventivno uporabljati botriticide v koncentracijah, višjih od tistih, ki se jih uporablja proti drugim glivam

(Leroux, 2004). Pri pridelavi sadja je uporaba botriticidov tik pred trgatvijo ali po njej oz. pred obiranjem ali po njem zelo zaželena, vendar je ta omejena in v nekaterih državah zaradi toksikološke nevarnosti prisotnih ostankov prepovedana (Cabras in sod., 1999; Cabras in Angioni, 2000). V primeru proizvodnje vina pa uporaba botriticidov pred trgatvijo vpliva tudi na primarno mikrofloro kvasovk in s tem na začetek fermentacije (Cabras in Angioni, 2000). Pomemben je tudi pojav odpornosti, ki je povezan z nekaterimi klasičnimi botriticidi, tudi z benzimidazoli, fenilkarbamati in dikarboksimidi (Rosslenbroich in Stuebler, 2000; Leroux, 2004). Uporaba kemične kontrole je zaradi razvoja odpornosti glive na različne botriticide in negativnega javnega mnenja omejena. Zato so sprejete omejitve uporabe nekaterih sredstev v obdobju pred trgatvijo (Leroux, 2004). V prihodnosti bo prav tako kot danes še vedno velika potreba po novejših in učinkovitejših botriticidih, vendar se raziskave usmerjajo tudi v razvoj drugih možnosti: biološka kontrola, uporaba rastlinskih aktivatorjev, gensko spremenjene rastline odporne na bolezen in drugo (Leroux, 2004).

Kemična kontrola se uporablja tudi za zaščito sadja po obiranju oz. trgatvi. Grozdje in drugo sadje se do porabe (prodaje, pakiranja in transporta) hrani v hladilnicah in drugih zaprtih sistemih, kjer je bolezen lažje nadzorovati. Sadje je tako shranjeno pri temperaturi 0 °C, ki je že eden od omejitvenih dejavnikov za nastanek bolezni. Kljub temu lahko gliva *B. cinerea* raste tudi pri nizkih temperaturah; bolezen se pogosto pojavi pri daljšem skladiščenju (nad 60 dni). Poleg hlajenja se v kontrolirani atmosferi kot omejitveni faktorji uporabljajo žveplov dioksid (Franck in sod., 2005), etanol (Lichter in sod., 2002; Karabulut in sod., 2003; Karabulut in sod., 2004; Karabulut in sod., 2005b), kalijev sorbat (Karabulut in sod., 2005b), natrijev bikarbonat (Karabulut in sod., 2003; Karabulut in sod., 2005a), hitosan (Bhaskara Reddy in sod., 2000; Ben-Shalom in sod., 2003; Ait Barka in sod., 2004; Bautista-Baños in sod., 2006), in tudi obsevanje z žarki UV-C (190–280 nm) (Nigro in sod., 1998).

2.3.3 Biokontrola

Biokontrola je definirana kot uporaba naravnih oz. spremenjenih organizmov, mikroorganizmov, genov ali genskih produktov, ki zmanjšajo škodo, nastalo zaradi delovanja škodljivcev, in zaščitijo pridelke ter koristne organizme (Singleton in Sainsbury, 1996).

Biokontrolna aktivnost (BKA) je način, s katerim biokontrolni organizmi delujejo. Mogočih je več mehanizmov delovanja npr. kompeticija (tekmovanje) za hrano in prostor, tvorba inhibitornih spojin, izločanje encimov, ki razgrajujejo celično steno škodljivcev, ali spojin, ki sprožijo obrambne mehanizme rastline (Fleet, 2003b). Biokontrola je zanimiva nadomestna možnost za konvencionalne metode, saj so mikrobní biokontrolni agenti manj

zahtevni za okolje, njihov kompleksen način delovanja pa zmanjša možnost za razvoj odpornosti (Elad in Steward, 2004).

Nitasta gliva *Botrytis cinerea* je zelo tekmovalna, ker so kaljenje klične hife, podaljševanje hif in rast micelija ter okužba zelo odvisni od hranil. Konidiji so občutljivi na antibiotične snovi in litične encime, ki jih tvorijo mikroorganizmi, saj zavirajo klitje in lizirajo klične hife. Zaviranje bolezni z biokontrolnimi mikroorganizmi tako temelji na zmanjšanju saprofitne sposobnosti patogene glive, zmanjšanju razširjanja spor, zmanjšanju virulence oz. inducirane resistance (Elad in Steward, 2004). Biokontrolni mikroorganizmi lahko uporabljajo različne mehanizme posamezno ali kombinirano:

Modifikacija lastnosti rastlinskih površin

Nekateri mikroorganizmi lahko spremenijo vlažnost rastlinske površine, kar je znano za površinsko aktivne bakterije rodu *Pseudomonas*, pa tudi za vrsto *Bacillus brevis*. Če take vrste mikroorganizmov nanese na mokro površino, se kapljice vode razpršijo in se hitreje posušijo. S tem se obdobje površinske vlažnosti skrajša in se posledično zmanjša tudi čas, primeren za okužbo z glivo *B. cinerea* (Elad in Steward, 2004).

Vezava na površino patogena

Biokontrolna aktivnost je lahko povezana oz. zahteva, da se biokontrolni mikroorganizmi vežejo na površino gostiteljske celice, tj. patogenega organizma. Ta mehanizem igra pomembno vlogo pri interakcijah na celičnem nivoju (ang. cell-to-cell) med glivami in drugimi mikroorganizmi. Antagonistična kvasovka *Pichia guilliermondii* se veže oz. pripne na hifo glive *B. cinerea*. Biokontrolni mikroorganizmi spremenijo proteinsko integriteto (soli, proteaze, itd.) in nekatere sladkorje, tako preprečijo vezavo patogene glive na gostitelja. Pri drugih vrstah kvasovk (*Rhodotorula glutinis* in *Cryptococcus albidus*) je vezava na konidije glive *B. cinerea* povezana s tvorbo fibrilarnega materiala (Elad in Steward, 2004). Verjetno gre za polisaharidni ekstracelularni matriks in za vključevanje lektinu podobnih snovi.

Kompeticija – tekmovanje za hrano in prostor

Bakterije, kvasovke in druge nitaste glive lahko inhibirajo patogene glive s kompeticijo za hranila, kot so dušik, ogljik, makroelementi in mikroelementi. Zmanjšanje količine hranil zmanjša hitrost klitja spor patogene glive in upočasni rast micelija ter tako zmanjša število okuženih mest in posledično omeji nekroze rastlinskega tkiva (Elad in Steward, 2004). Sposobnost hitre naselitve mesta poškodbe je pomembna lastnost biokontrolnih mikroorganizmov, ki jo lahko uporabimo pri okužbah stebela, pecljev in peceljčkov z glivo

B. cinerea. Podobno strategijo uporabljajo tudi pri poškodbah in ranah, nastalih med skladiščenjem. Različne vrste kvasovk imajo zmožnost kompeticije za hrano in prostor, zato jih uporabljajo pri zaščiti sadja in zelenjave (Roberts, 1990; Mercier in Wilson, 1994).

Parazitizem

Različni mikroorganizmi lahko parazitirajo številne vrste gliv večinoma s tvorbo encimov razgradnje celične stene gliv (ang: CWDEs – cell wall degrading enzymes) (Wisniewski in sod., 1991; Elad in sod., 1996). Med bolj znane mikoparazite spadajo vrste *Trihoderma*, *Gliocladium* in *Pythium*. *Pythium periplocum* je agresiven mikoparazit, saj z njim okužen micelij glive *B. cinerea* ni sposoben okužiti grozdja (Paul, 1999a; Paul, 1999b). Encim razgradnje celične stene gliv, ki jih mikroorganizmi tvorijo, so predvsem proteinaze, mananaze, laminarinaze in hitinaze (Elad in Steward, 2004).

Tvorba inhibitornih spojin

Antibiozo sta kot način biokontrole za različne mikroorganizme opisala Andrews (1992) in Whipps (1997). Pomen in učinke inhibitornih snovi, ki jih *in vitro* v naravnih ekosistemih tvorijo antagonisti, je težko predvideti. Vrste *Trihoderma*, *Gliocladium* in nekatere vrste *Penicillium* so pogosti producenti antibiotikov, ki reducirajo klitje konidijev in s tem nastanek poškodb. Razvoj odpornosti pri nitasti glivi *B. cinerea* omejuje uporabo biokontrolnih agentov, ki proizvajajo antibiotike (Elad in Steward, 2004).

Zmanjševanje patogenosti

Gliva *B. cinerea* sintetizira hidrolitične encime, kot so ekso- in endopoligalakturonaze, pektin metil esterase, pektat liaze, hitinaze, β -1,3-glukanaze in kutinaze. Aktivnost teh encimov je v prvi fazi interakcij med gostiteljem in patogenom odločilna za potek okužbe. V prisotnosti seva *Trihoderma harzianum* T39 se je encimska aktivnost omenjenih encimov zmanjšala (Elad in Steward, 2004). Bakterijski sev tvori proteaze, ki poleg encimske aktivnosti zmanjšujejo tudi klitje spor ter posledično zavirajo razvoj in potek okužbe (Elad in Steward, 2004).

Zaviranje tvorbe inokuluma patogene glive

Nastanek inokuluma patogene glive skozi več ciklov bolezni je pomemben dejavnik za epidemiologijo bolezni. Zato je za razvoj in širjenje bolezni bistveno zaviranje tvorbe inokuluma (Elad in Steward, 2004). Nekateri mikroorganizmi zavirajo sporulacijo glive *B. cinerea* na jagodah (Peng in Sutton, 1991).

Induciranje odpornosti rastlin

Inducirana odpornost je pomemben način biokontrole v vegetativnih tkivih rastlin in je lahko inducirana lokalno ali sistemsko. Inducirana sistemska odpornost, ki jo sprožijo mikroorganizmi (nepatogeni mikroorganizmi – saprofiti, mrtve celice kvasovk ter bakterij in drugi), lahko zaščiti rastlino pred talnimi ali listnimi patogeni (Elad in Steward, 2004).

Kombinacija mehanizmov

Načini delovanja antagonističnih kvasovk po trgatvi vključujejo kompeticijo za hrano in prostor, neposreden parazitizem in mehanizem inducirane odpornosti (Elad in Steward, 2004), ki hkrati inducira tudi odpornost rastlin, npr. poveča se aktivnost hitinaze in β -1,3-glukanaze v sadju (Ippolito in sod., 2000; Droby in sod., 2003).

2.4 BIOKONTROLNI MIKROORGANIZMI

Idealen biokontrolni mikroorganizem

- mora biti genetsko stabilen,
- mora biti učinkovit v nizkih koncentracijah in proti širokemu spektru patogenih organizmov na različnih gostiteljskih tkivih,
- mora imeti enostavne prehranske zahteve,
- mora preživeti v neugodnih okoljskih razmerah,
- mora rasti na poceni substratih v fermentorjih,
- mora biti odporen na pesticide,
- ne sme biti patogen za gostitelja in ne sme tvoriti produktov, potencialno toksičnih za človeka,
- mora biti kompatibilen z drugimi kemičnimi in fizikalnimi načini kontrole bolezni (Spadaro in Lodovica Gullino, 2004).

Poleg tega od dobrega biokontrolnega mikroorganizma pričakujemo, da bo močno zaviral rast oz. imel visoko biokontrolno aktivnost ter da bo učinkoval takoj (Sansone in sod., 2005).

Iskanja in razvoja mikrobnega antagonista se je v različnih laboratorijih po svetu lotilo več raziskovalcev. Na tržišču, predvsem v Ameriki in Aziji, so že registrirani komercialno dostopni biokontrolni proizvodi (preglednica 1) (Elad in Steward, 2004):

Preglednica 1: Komercialni biokontrolni proizvodi (Passoth in Schnürer, 2003; Elad in Steward, 2004)
Table 1: Commercial biocontrol products (Passoth and Schnürer, 2003, Elad and Steward, 2004)

Komercialno ime proizvoda	Biokontrolni mikroorganizem	
BINAB	<i>Trichoderma harzianum</i> in <i>T. polysporum</i>	nitasta gliva
MYCOSTOP	<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	bakterija
PLANTSHIELD	<i>Trichoderma harzianum</i> T22	nitasta gliva
SERENADE	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	bakterija
TRICHODEX	<i>Trichoderma harzianum</i> T39	nitasta gliva
BOTRY-ZEN	<i>Ulocladium oudemansii</i>	nitasta gliva
ASPIRE	<i>Candida oleophila</i> I-182	kvasovka
BIO-SAVE	<i>Pseudomonas syringae</i>	bakterija
YIELDPLUS	<i>Cryptococcus albidus</i>	kvasovka
AQ-10	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	kvasovkam podobna gliva
SPORODEX	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	kvasovkam podobna gliva

Od komercialno dostopnih biokontrolnih proizvodov sta na tržišču samo dva na osnovi kvasovk, čeprav imajo kvasovke večino od navedenih zelenih lastnosti. V zadnjih letih se je proučevanje novih biokontrolnih mikroorganizmov usmerilo v razvoj kvasovk, ki bodo predvidoma v nekaj letih prišle na tržišče (Segal in sod., 2002; Spadaro in Lodovica Gullino, 2004). Večina kvasovk z biokontrolno aktivnostjo spada med tako imenovane nekonvencionalne kvasovke, njihov genetski sistem pa še ni tako dobro preučen kot pri vrsti *S. cerevisiae* (Passoth in Schnürer, 2003).

2.4.1 Vrsta *Candida oleophila*

Biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Candida oleophila* proti različnim vrstam nitastih gliv (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* in več vrst rodu *Penicillium*) na različnih vrstah sadja (citrusi, hruške, jabolka, nektarine, namizno grozdje) in zelenjave (češnjev paradižnik) so dokazali različni raziskovalci (Mercier in Wilson, 1994; Mercier in Wilson, 1995; Janisiewicz in Jeffers, 1997; McGuire, 2000; Droby in sod., 2002; Karabulut in sod., 2002; Segal in sod., 2002; Spadaro in sod., 2002; Droby in sod., 2003). Verjeten mehanizem biokontrolnega delovanja je kompeticija za hrano in prostor ter indukcija obrambnih odgovorov gostitelja (Passoth in Schnürer, 2003).

V patentiranem izdelku ASPIRE® je »aktivna učinkovina« kvasovka *Candida oleophila* izolat I-182, ki inhibira rast škodljivih gliv, če se jo po trgatvi nanese na sadje, zelenjavo, ali druge pridelke in okrasne rastline v rastlinjaki. Neugodnih oz. škodljivih učinkov nima, saj se uporablja predvsem v zaprtih prostorih ter ni toksična ali patogena za živali. Uporablja se za sadje in druge površine rastlin, tudi poškodovane, kjer kvasovka *Candida oleophila* izolat I-182 zavira rast glive. Uporablja se kot razpršilo ali kopel. Pripravku se lahko dodajo kemični fungicidi, ki povečajo fungicidni učinek. Glede na izvedene teste toksičnosti ni nevarnosti za človeka (Droby in sod., 1998).

2.4.2 Vrsta *Metschnikowia pulcherrima*

Biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Metschnikowia pulcherrima* na rast nitastih gliv (*Botrytis cinerea*, *A. niger*, *Penicillium expansum*, vrst *Alternaria* in *Monilia*) so raziskovalci dokazovali predvsem na jabolkih, jagodah in kiviju, kjer naj bi šlo za tekmovanje za hrano ter prostor (Piano in sod., 1997; Cook in sod., 1999; Guinebretiere in sod., 2000; Spadaro in sod., 2002; Passoth in Schnürer, 2003; Blevé in sod., 2006). Raziskovalca Nguyen in Panon (1998) sta dokazala, da je lahko mehanizem biokontrolnega delovanja te kvasovke posledica tvorbe pulherimina. Kemična struktura tega pigmenta in njegova zmožnost vezave železa je bila odkrita že leta 1953 (Kluyver in sod., 1953). Pulherimin oz. njegov prekurzor deluje tako, da iz medija veže železo, kar

posledično vodi v njegovo pomanjkanje v okolici. To pomanjkanje je najverjetneje vzrok za zimocidno obnašanje kvasovke *M. pulcherrima*. Dodatek FeCl_3 (50 mg/l) v medij z nizko vrednostjo pH zavira zimocidno delovanje te kvasovke. Inhibitorni vpliv pa ima kvasovka *M. pulcherrima* tudi na kvasovko *S. cerevisiae* ter na kvasovke rodov *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* in *Candida* (Nguyen in Panon, 1998).

2.4.3 Kvasovke rodu *Pichia*

Biokontrolno aktivnost kvasovke *Pichia guilliermondii* in njene anamorfne oblike *Candida guilliermondii* na rast nitastih gliv so različni raziskovalci dokazali na jabolkih, breskvah, nektarinah, namiznem grozdju, citrusih, jagodah in tudi na žitaricah (Lima in sod., 1999; Zahavi in sod., 2000; Guetsky in sod., 2002; Druvefors in Schnurer, 2005).

Za kvasovko *Pichia anomala* so dokazali, da ima biokontrolno aktivnost na različne nitaste glive na skladiščenih jabolkih, vinski trti in shranjenih žitaricah. Mehanizmi, s katerimi deluje kot biokontrolni mikroorganizem, vključujejo kompeticijo za hrano in prostor, tvorbo in izločanje encimov za razgradnjo celične stene ter tvorbo zimocinov (Masih in sod., 2000; Zahavi in sod., 2000; Fredlund in sod., 2002; Druvefors in Schnurer, 2005).

Kot biokontrolno sredstvo deluje kvasovka *Pichia membranifaciens* na različne nitaste glive na nektarinah in breskvah, češnjah (Qin in sod., 2004), jabolkah (Santos in sod., 2004; Chan in Tian, 2005) ter na vinski trti (Masih in sod., 2001; Masih in Paul, 2002). Mehanizma delovanja sta predvsem tvorba in izločanje encimov za razgradnjo celične stene gliv ter tvorba zimocinov (Walker in sod., 1995; Masih in sod., 2001; Masih in Paul, 2002).

2.4.4 Črna kvasovka *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans deluje biokontrolno tako, da tekmuje za hrano in prostor ter tvori encime za razgradnjo celične stene (eksohitinaze in β -1,3-glukanaze) (Lima in sod., 1999; Janisiewicz in sod., 2000; Castoria in sod., 2001). Biokontrolno aktivnost na različne nitaste glive so dokazali na jagodah (Lima in sod., 1997), češnjah (Schena in sod., 2003; Ippolito in sod., 2005), jabolkih (Ippolito in sod., 2000; Castoria in sod., 2001), grozdju (Castoria in sod., 2001; Schena in sod., 2003) ter na vinski trti (Masih in sod., 2001; Masih in Paul, 2002).

2.4.5 Vrsta *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so uvrščene med tako imenovane GRAS (ang. generally regarded as safe) organizme, vendar je dokazano, da je lahko kvasovka *S. cerevisiae* patogena za človeka, predvsem za bolnike z oslabeлим imunskim sistemom kot posledice bolezni ali operativnih posegov (Murphy in Kavanagh, 1999). Raziskovalka Gognies je s sodelavci (2001) dokazala, da so nekateri sevi patogeni za vinsko trto, saj lahko tvorijo invazivne psevdomicelije, ki penetrirajo v rastlinske celice, povzročajo počasnejšo rast trte, lahko pa povzročijo tudi, da rastlina odmre. Kot biokontrolni mikroorganizem deluje tako, da tekmuje za hrano in prostor, tvori hlapne spojine (etanol) ter sintetizira zimocine (ang. killer toxins).

2.4.6 Kvasovke bazidiomicetnih rodov

Bazidiomicetna kvasovka vrste *Cryptococcus albidus* je v komercialnem izdelku YIELDPLUS® in deluje predvsem kot bioprotektor proti nitasti glivi *B. cinerea* na kumarah, paradižniku, fižolu in jagodah v rastlinjakih. Mehanizem delovanja je predvsem tekmovanje za hrano (Passoth in Schnürer, 2003).

Vrsta *C. laurentii* ima biokontrolno aktivnost. S kompeticijo za hrano in prostor ter stimulacijo obrambnega mehanizma gostitelja deluje na rast različnih nitastih gliv na jabolkih, hruškah, breskvah, kiviju in citrusih (Castoria in sod., 1997; Lima in sod., 1999; Zhang in sod., 2005).

Kvasovke vrste *Rhodotorula glutinis* so sposobne zavirati rast patogenih gliv na jabolkih, jagodah, kiviju, citrusih in hruškah. Mehanizmi delovanja so kompeticija za hrano in prostor, tvorba sideroforov v obliki rodotorulične kisline ter sprožitev obrambnega mehanizma gostitelja (Castoria in sod., 1997; Lima in sod., 1999; Calvente in sod., 2001; Passoth in Schnürer, 2003; Sansone in sod., 2005).

2.5 PRIMARNA POPULACIJA KVASOVK NA GROZDJU

Na grozdu je prisotna mešana populacija kvasovk. Te z grozda prehajajo v mošt, kjer imajo vodilno vlogo pri fermentaciji mošta v vino (Fleet, 1993; Fleet, 1998; Pretorius, 2000; Fleet, 2003a). Različna sestava populacije kvasovk na grozdnih jagodah in kasneje v moštu je odvisna od trgatve (letnika) in tudi od drugih dejavnikov, kot so geografska lokacija, starost vinske trte, sorta grozda, zrelost grozda ob trgatvi, mehanske poškodbe grozda (zaradi ptičev, insektov ali/in nitastih gliv), fiziološka in kemijska kompatibilnost vrste kvasovk s površino grozda (adhezivnost na površino grozdne jagode, metabolizem dostopnih hranil ...), toleranca na okoljske strese (temperatura, občasna suša, svetloba, sevanje ...), toleranca na kemične inhibitorje, ki izvirajo iz grozda in uporabljenih fitofarmacevtskih sredstev (vrsta, čas uporabe fungicidov) (Barnett in sod., 1972; Davenport, 1974; Rosini in sod., 1982; Yanagida in sod., 1992; Fleet, 1993; Martini in sod., 1996; Fleet, 1998; De La Torre in sod., 1999; Mortimer in Polsinelli, 1999; Pretorius in sod., 1999; Fleet in sod., 2002; Fleet, 2003b; Raspor in sod., 2006).

Na nezrelih grozdnih jagodah je populacija kvasovk manjša od 10^3 cfu/cm². Prevladujejo nefermentativne vrste rodov *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Pichia* in *Candida*, poleg njih pa so prisotne tudi vrste *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* in *Rhodospiridium* (Davenport, 1974; Rosini in sod., 1982; Fleet, 1993; De La Torre in sod., 1999). Prisotna je lahko tudi črna kvasovka *Aureobasidium pullulans*, katere izvor so tla (Fugelsang, 1997).

Z zorenjem grozda se poveča tudi populacija kvasovk na grozdu na 10^4 – 10^6 cfu/cm². Vrste kvasovk *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Aureobasidium pullulans*, ki so bile prisotne na nezrelih grozdnih jagodah, so večinoma prisotne tudi na zrelih grozdnih jagodah (Barnett in sod., 1972; Davenport, 1974; Rosini in sod., 1982; Longo in sod., 1991; Yanagida in sod., 1992; Martini in sod., 1996; Miklič in sod., 2002; Mills in sod., 2002; Raspor in sod., 2006), vendar na teh številčno prevladajo vrste rodov *Hanseniaspora/Kloeckera*, ki predstavljajo 50–70 % celotne populacije, ter vrste *Metschnikowia* (Fleet in sod., 2002; Fleet, 2003a; Fleet, 2003b). Nguyen in Panon (1998) trdita, da kvasovka *Metschnikowia pulcherrima* zavira rast več vrst kvasovk, vključno s *Saccharomyces cerevisiae*.

Na prezrelih in/ali poškodovanih grozdnih jagodah so hranila, ki so sicer varno shranjena v notranjosti jagode, dostopna za mikrobovno rast. Populacija kvasovk takrat naraste prek 10^6 cfu/cm², naraste pa tudi populacija bakterij (ocetno- in mlečnokislinskih) ter nitastih gliv (De La Torre in sod., 1999; Mills in sod., 2002; Tournas in Katsoudas, 2005). Na takih grozdnih jagodah so poleg vrst *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum/Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, v velikem številu tudi vrste rodov *Rhodotorula*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium pullulans* (Miklič in sod., 2002) ter fermentativne

vrste kvasovk *Saccharomyces* in *Zygosaccharomyces* (Yanagida in sod., 1992; Martini in sod., 1996; Török in sod., 1996; Pretorius in sod., 1999; van der Westhuizen in sod., 2000; Schuller in sod., 2005).

O prisotnosti vodilne kvasovke alkoholne fermentacije *S. cerevisiae* v vinogradu so različni raziskovalci objavili nasprotujoča si mnenja. Nekateri trdijo (Török in sod., 1996; Pretorius in sod., 1999), da je grozdna jagoda naraven vir te kvasovke, medtem ko so drugi (Davenport, 1974; Rosini in sod., 1982; Yanagida in sod., 1992; Vaughan-Martini in Martini, 1995; Martini in sod., 1996; Mortimer in Polsinelli, 1999; Raspor in sod., 2006) imeli velike težave pri izoliranju kvasovke iz naravnega okolja in verjamejo, da sta glavni vir vinarska oprema in vinska klet. Večina se strinja, da je najverjetneje grozdje primarni vir kvasovke *S. cerevisiae*, vendar je njihovo število tako majhno ($< 10\text{--}100\text{ cfu/cm}^2$), da jih je težko določiti z navadnimi izolacijskimi tehnikami (Yanagida in sod., 1992; Martini in sod., 1996). Raziskovalca Mortimer in Polsinelli (1999) menita, da je kvasovka *S. cerevisiae* prisotna samo na eni od tisoč grozdnih jagod. Za uspešno izolacijo te vrste je potrebna uporaba obogatitvenih tehnik (Török in sod., 1996; Pretorius in sod., 1999; Fleet in sod., 2002).

V mošt preidejo kvasovke ob trgatvi z grozdne jagode, z opreme vinograda in iz vinske kleti ter tudi s prenosom prek rok trgačev. Zaradi predvidljivega poteka in hitrosti alkoholne fermentacije mnogo vinarjev uporablja oz. dodaja selekcionirane kvasovke. Zaželenosti kvasovk, ki se jih uporablja kot inokulum, so: velika hitrost fermentacije, sposobnost popolne fermentacije sladkorja do konca (brez ostankov sladkorja v vinu), visoka toleranca oz. neobčutljivost na etanol, temperaturna toleranca, toleranca na SO_2 , sposobnost ponovnega zagona zaostale fermentacije, sposobnost tvorbe glicerola in drugih sestavin, pomembnih za posebne arome vina, sposobnost flokulacije (da jih je mogoče enostavno odstraniti, zlasti pri proizvodnji penečih vin) (Boulton in sod., 1996).

2.6 MEDSEBOJNO VPLIVANJE – INTERAKCIJE

Že tisočletja rastline, glive in drugi organizmi v naravi sobivajo in pri tem razvijajo ter spreminjajo načine medsebojnega vplivanja, ki so lahko bodisi nevtralni (0), koristni (+) ali pa uničujoči (–) (preglednica 2).

Preglednica 2: Interakcije med mikroorganizmi in vpliv enega mikroorganizma na drugega (Stopar, 2006)

Table 2: Interactions and effects between two microorganisms (Stopar, 2006)

INTERAKCIJA	Mikroorganizem	Mikroorganizem
	A	B
Nevtralizem	0	0
Komenzalizem	0	+
Amenzalizem	0	–
Sinergizem	+	+
Simbioza	+	+
Kompeticija	–	–
Antagonizem	0/+	–
Predatorstvo	+	–
Parazitizem	+	–

Nevtralizem predstavlja pomanjkanje interakcij med dvema populacijama. To je interakcija, ki je zelo težko dokazljiva. Običajnejša je, če obe populaciji mirujeta (npr. spore). Ugotovimo jo lahko med populacijama, ki sta močno oddaljeni ali zelo razredčeni in je kompeticija minimalna, ali med populacijama, ki uporabljata različne substrate in zato med sabo ne tekmujeta (npr. bakterije *Lactobacillus* in *Streptococcus* v jogurtu).

Komenzalizem je odnos, v katerem ima ena populacija koristi, druga pa nima niti koristi niti škode. Take interakcije so med organizmi pogoste, saj sprememba okolja kot posledica rasti enega mikroorganizma povzroči boljšo rast drugega mikroorganizma. Spremembe vključujejo pretvorbo netopnih snovi v topne, transport snovi iz enega področja v drugo, pretvorbo substrata z ekstracelularnimi encimi, ki omogočajo rast drugega mikroorganizma, ali pa tvorbo in sproščanje metabolitov v okolje (npr. kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* sprošča riboflavin, ki ga bakterija *Lactobacillus casei* porablja za rast).

Amenzalizem je interakcija, ki je škodljiva za eno populacijo, za drugo pa je nevtralna. Pojavi se takrat, kadar ena vrsta mikroorganizmov kot normalen produkt lastnega metabolizma tvori spojine, ki zavirajo rast druge populacije. Ko se tak organizem naseli v določenem okolju, lahko onemogoči preživetje drugemu. Tak primer je proizvodnja

alkohola ali mlečne kisline, poraba kisika ali njegova tvorba, tvorba antibiotikov ali bakteriocinov, ki preprečijo rast druge vrste.

Sinergizem je odnos, v katerem imata obe vrsti mikroorganizmov koristi, vendar povezava ni obvezna (obligatorna). Gre za sodelovanje med dvema populacijama, kjer obe opravita proces, ki ga vsaka zase ne bi zmogla.

Simbioza je odnos, v katerem sta dve vrsti odvisni druga od druge, od skupnega bivanja pa imata obe koristi. Odnos omogoča obema preživetje v razmerah, ki onemogočajo preživetje posamezni populaciji, čeprav lahko v drugačnih razmerah ti dve populaciji uspešno živita ločeno.

Kompeticija je interaktivna povezava med dvema mikroorganizmoma, ki oba potrebujeata isti limitirajoči okoljski faktor za rast. Vzrok za tako interakcijo med različnimi mikroorganizmi je pomanjkanje hranil in prostora. Zmagovalca v takem odnosu ne določa samo hitrejša izraba substrata, ampak tudi boljša toleranca na nastajajoče stresne faktorje. Te lastnosti so navadno posebne glede na vrsto, kar pomeni, da v takem okolju prihaja do izločanja dveh sorodnih vrst. Ker se razmere v okolju nenehno spreminjajo in so različni organizmi različno prilagojeni na spremenjene razmere, lahko pride do soobstoja v istem okolju.

Antagonizem se povezuje s pojavom v fitopatologiji, kjer gre za zaviranje normalne rasti patogenega organizma za rastlino z drugim organizmom, kot so bakterije in glive.

Predatorstvo je interakcija, ki je za žrtev – plen usodna, saj jo plenilec poje. Ta odnos je v primerjavi s parazitizmom kratek. Predatorske glive prek senzorjev zaznajo bakterijsko kolonijo in usmerijo rast glive v smer bakterije, izločijo spojine, ki lizirajo bakterije, sintetizirajo asimilacijske hife in jo uničijo.

Parazitizem je odnos, v katerem je predator manjši od plena. Pri tem ima ena populacija korist na račun druge, ki je oškodovana. Parazitizem je vezan na kombinacijo parazit-gostitelj in ima pomembno vlogo pri kontroli gostiteljske populacije. Parazitizem se lahko pojavi tudi med dvema mikroorganizmoma, npr. bakterije lahko parazitirajo druge vrste bakterij, glive ali alge; glive lahko parazitirajo alge ali druge vrste gliv. Hiperparazitizem je proces, v katerem organizem napada primarnega parazita. Tak primer so mikoparaziti: ene vrste gliv parazitirajo micelij, konidije ali druge strukture za prezimitev drugih gliv.

2.6.1 Sistem trta-grozdje-vino

V ekosistemu trta-grozdje-moš-vino je medsebojno vplivanje prisotno na več ravneh:

- med rastlino oz. rastlinskimi deli in mikroorganizmi;
- med različnimi mikroorganizmi; npr. med različnimi nitastimi glivami, kvasovkami, mlečnokislinskimi bakterijami, očetnokislinskimi bakterijami, mikovirusi in bakteriofagi (Fleet, 1993; Pretorius, 2000; Fleet, 2003a);
- med mikroorganizmi iste skupine: npr. med kvasovkami različnih rodov, vrst in sevov.

Bakterije, nitaste glive in kvasovke so del primarne mikroflore grozdja in imajo pomembno vlogo pri fermentaciji mošta v vino ter kemični sestavi vina (Fleet, 2003a). Njihovo medsebojno vplivanje je v vinarstvu pomembno, predvsem v smislu rezultatov teh interakcij, ki so bodisi spodbujajoče ali zavirajoče za rast določene vrste ali seva. Zgodnja rast kvasovk v moštu povzroči porabo hranil, s tem pa postane vino kot okolje za rast drugih mikroorganizmov manj ugodno. Metaboliti, ki pri tem nastajajo, so lahko za nekatere vrste toksični.

2.6.1.1 Medsebojno vplivanje med kvasovkami in bakterijami

V mikrobiologiji vina sta pomembni predvsem dve skupini bakterij: jabolčno-mlečnokislinske in očetnokislinske bakterije.

Med jabolčno-mlečnokislinskimi bakterijami so poleg vrste *Oenococcus oeni*, ki vodi jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, najpomembnejše vrste *Lactobacillus* in *Pediococcus* (Fleet, 1993; Lonvaud-Funel, 1996; Fleet, 2003a). Odvisno od rodu in vrste so jabolčno-mlečnokislinske bakterije zmožne heterofermentativne pretvorbe sladkorjev v mlečno kislino, etanol in CO₂ ali homofermentativne pretvorbe sladkorjev, kjer nastaneta mlečna kislina in CO₂ (Henick-Kling, 1993; Osborne in Edwards, 2005).

Med očetnokislinskimi bakterijami so pogoste vrste *Acetobacter* in *Gluconobacter* (Fleet, 1993; Fleet, 2003a; Osborne in Edwards, 2005), ki lahko na začetku fermentacije v ustreznih pogojih prevladajo in omejijo rast vinskih kvasovk, kar upočasni dokončanje alkoholne fermentacije, v nekaterih primerih pa celo njeno zaustavitev (Sponholz, 1993). Očetnokislinske bakterije pretvarjajo sladkorje v moštu v očetno kislino (Osborne in Edwards, 2005).

Interakcije med njimi se začnejo že v vinogradu, na grozdju, še zlasti če je to poškodovano (Fleet, 1998; Fleet, 2003a; Fleet, 2003b). Oblika oz. tip interakcij ter njihov obseg je predvsem odvisen od naslednjih dejavnikov: kombinacija vpletenih sevov kvasovk in

bakterij, poraba in sproščanje hranil kvasovk in/ali bakterij, zmožnost kvasovk in/ali bakterij, da tvorijo metabolite, ki delujejo stimulatorno ali toksično (Henschke in Jiranek, 1993). Fizikalno-kemijski pogoji (nizka vrednost pH, visoka vsebnost etanola, prisotnost žveplovega dioksida, malo hranilnih snovi), ki nastanejo v mladem vinu kot posledica alkoholne fermentacije, ustvarijo stresne pogoje za rast bakterij (Alexandre in sod., 2004).

Nastanek etanola med fermentacijo je dejavnik, ki vpliva na hitrost rasti mlečnokislinskih bakterij. Rast bakterij na začetku fermentacije je inhibirana že pri 4 % (v/v) etanola (Alexandre in sod., 2004). Z močnim in hitrim začetkom fermentacije kvasovk se primarna populacija bakterij (manj od 10^3 cfu/ml) zmanjša oz. odmre. Kasneje, po končani fermentaciji mošta v vino, ko kvasovke odmrejo in začnejo avtolizirati, lahko ponovno zasledimo razmah populacije bakterij (Charpentier in Feuillat, 1993). Rast bakterij je odvisna od vrednosti pH, temperature in koncentracije nastalega etanola. Pri sorazmerno visoki vrednosti pH (nad 3,5), temperaturi 19–20 °C in pri nižji koncentraciji etanola (pod 13 %) je rast optimalna. Inhibicija rasti se pojavi pri vrednosti pH pod 3, temperaturi pod 17 °C in koncentraciji etanola nad 14 % (Lonvaud-Funel, 1995). Po normalnem začetku jabolčno-mlečnokislinske fermentacije se lahko ta naenkrat ustavi in se čez nekaj dni ponovno začne. Ta pojav je posledica interakcije oz. okužbe primarne populacije bakterij z bakteriofagi (Lonvaud-Funel, 1995).

Sposobnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, da tvori SO₂, je sečno specifična in odvisna od sestave medija (Romano in Suzzi, 1993). Večina sevov lahko tvori do 30 mg SO₂/l, so pa tudi taki, ki tvorijo več kot 100 mg/l (Rauhut, 1993). Pri teh interakcijah sodeluje tudi človek, saj je pred začetkom fermentacije potreben dodatek SO₂, ki prepreči oksidacijske reakcije in zavira rast bakterijske populacije, predvsem oetnokislinskih bakterij (Romano in Suzzi, 1993; Carrete in sod., 2002).

Srednje verižne maščobne kisline (heksanojska, oktanojska, dekanoska in dodekanojska) lahko inhibirajo tako kvasovke kot bakterije. Poleg omejene rasti bakterij lahko te maščobne kisline tudi zmanjšajo sposobnost razgradnje jabolčne kisline pri jabolčno-mlečnokislinskih bakterijah. Koncentracije dekanoske kisline pod 12,5 mg/l in dodekanojske kisline pod 2,5 mg/l lahko stimulirajoče vplivajo na malolaktično aktivnost bakterij, višje koncentracije pa imajo obraten učinek in močno zavirajo rast bakterij (Alexandre in sod., 2004).

Manoproteini lahko vežejo srednje verižne maščobne kisline, ki jih tvorijo kvasovke rodu *Saccharomyces*. Njihova odstranitev pomeni detoksifikacijo medija in lažjo rast bakterij. Hidroliza manoproteinov kvasovk in/ali drugih makromolekul in polisaharidov z mlečnokislinskimi bakterijami lahko poveča prehransko vrednost medija in tako stimulira rast mlečnokislinskih bakterij (Farias in Manca de Nadra, 2000; Alexandre in sod., 2004).

Kvasovke inhibirajo rast bakterij tudi s tvorbo antibakterijskih metabolitov (Fleet, 1998; Alexandre in sod., 2004), vendar je o tem znanega še bolj malo.

Poleg že omenjenih dejavnikov, ki inhibirajo rast bakterij, je treba omeniti tudi povsem osnovnega. Po uspešno končani fermentaciji, ki jo vodijo kvasovke, je medij – mošt oz. mlado vino glede hranil zelo osiromašeno, zlasti glede vitaminov ali aminokislin (npr. arginin), ki so esencialne za rast bakterij.

Stimulacija rasti bakterij s kvasovkami je v primerjavi z inhibicijo njihove rasti mnogo manj raziskana. Pojav stimulacije rasti bakterij je povezan z avtolizo kvasovk (Fleet, 1998), ob kateri se sprostijo dušikove spojine. Te so tudi sicer v vinu, vendar je njihova vsebnost odvisna od sorte grozdja, zrelosti grozdja ob trgatvi, gnojenja trte z dušikom in od seva kvasovk, ki je vodil fermentacijo (Henschke in Jiranek, 1993). Posledična avtolitična aktivnost kvasovk med staranjem usedline lahko pomembno vpliva na koncentracijo dušikovih spojin vključno z aminokislinami, peptidi in proteini (Martinez-Rodriguez in sod., 2001; Alexandre in sod., 2004).

Tudi druge makromolekule, kot so glukani in manoproteini, se sprostijo med avtolizo (Charpentier in Feuillat, 1993) in tudi že prej med samo fermentacijo, njihova sprostitve v vino pa je odvisna od seva kvasovk ter vinarske tehnike (Alexandre in sod., 2004). Biomasa kvasovk lahko služi tudi kot bioadsorbent in nase veže toksične snovi (kovinske ione, fenole iz grozdja). Proteolitični in pektolitični encimi, ki se sprostijo ob avtolizi kvasovk, lahko hidrolizirajo proteine in pektine iz grozdja in tako tvorijo substrat za rast drugih vrst (Charoenchai in sod., 1997).

Inhibitorno delovanje mlečnokislinskih bakterij na rast kvasovk pred koncem fermentacije je povezano s pretvorbo ogljikovih hidratov v ocatno kislino, ki zmanjša kakovost vina (Fleet, 1998). Bakterije lahko inducirajo razgradnjo celične stene kvasovk; dokazana je prisotnost zunajcelične β -1,3-glukanazne aktivnosti pri bakterijah (Alexandre in sod., 2004). Mlečnokislinske bakterije tvorijo bakteriocinom podobne inhibitorje rasti kvasovk. Pospešena hitrost umiranja kvasovk je povezana s tvorbo inhibitornih bakterijskih metabolitov (antibiotikov) (Alexandre in sod., 2004).

Poleg metabolitov, ki jih tvorijo bodisi kvasovke bodisi bakterije, so lahko interakcije med njimi tudi fizikalne. Znane so skupne flokulacije (Peng in sod., 2001), skupne ko-sedimentacije in tvorbe skupnih agregatov ter aglutinativ (Fleet, 1998; Alexandre in sod., 2004).

Quorum sensing je pojav, ko bakterije zaznavajo gostoto lastne – bakterijske populacije. Opisan je že za več rodov, vrst in sevov bakterij. Medsebojno zaznavanje temelji na

nenehni tvorbi majhnih količin signalnih molekul, ki se sproščajo v okolje in jih bakterije zaznavajo. Zunajcelična koncentracija signalnih molekul je odvisna od gostote celic. Ko je kritična koncentracija signalne molekule presežena zaradi kritične gostote celic (quorum) v okolju, se navadno sproži celični odgovor z indukcijo transkripcije genov (Miller in Bassler, 2001; Voloshin in Kaprelyants, 2004; Mueller in sod., 2006). Komunikacija med grampozitivnimi bakterijami poteka drugače kot pri gramnegativnih bakterijah. Gramnegativne bakterije uporabljajo nizkomolekularno substanco, največkrat N-acil homoserin lakton, kot feromon oz. signalno molekulo. Grampozitivne bakterije komunicirajo tako, da izločajo majhne (včasih modificirane) oligopeptide ali proteine. Signalne molekule regulirajo veliko število procesov v celici, kot so tvorba antibiotikov, agregacija celic, tvorba kapsul, izločanje proteinov, tvorba biofilma, in tudi konjugacijo, sporulacijo, virulenco itd. (Bassler, 1999; Voloshin in Kaprelyants, 2004; Mueller in sod., 2006).

Nekatere vrste bakterij tvorijo siringotoksine, ki so fitotoksični, in siringomicine, ki inhibirajo rast gliv (Woo in sod., 2002).

2.6.1.2 Medsebojno vplivanje med kvasovkami in nitasto glivo

Interakcije med kvasovkami in nitastimi glivami se začnejo že v vinogradu, kjer glive povzročajo poškodbe grozdja. Na tej stopnji so mogoče različne interakcije med kvasovkami in nitastimi glivami, ki vplivajo na kakovost mošta in vina. Okužba grozdnih jagod z nitastimi glivami spremeni biokemično sestavo in s tem pogoje za rast kvasovk na grozdju in kasneje med fermentacijo (Fleet, 2003a).

Nekatere vrste gliv, ki so prisotne na grozdju, lahko tvorijo ohratoksin A, ki je za človeka kancerogen in povzroča bolezen ledvic (Battilani in Pietri, 2002), za nekatere kvasovke pa je toksičen (Tateo in Bononi, 2001; Sage in sod., 2002). S tem se spremeni primarna mikroflora grozdja. Poleg ohratoksina A tvorijo glive rodov *Botrytis*, *Aspergillus* in *Penicillium* tudi druge metabolite (predvsem manoproteine), ki zavirajo rast kvasovk med fermentacijo (Doneche, 1993). Glive tvorijo tudi pomembno količino β -glukanov, ki posredno vplivajo na aktivnost kvasovk.

Rast oz. prisotnost gliv na grozdju vpliva tudi na populacijo oacetnokislinskih bakterij. Zaradi večje populacije je večja tudi tvorba oetne kisline in drugih metabolitov, ki zavirajo rast in razvoj kvasne populacije med fermentacijo (Fleet in Heard, 1993; Fleet, 1998; Fleet, 2003a).

Za zagotovitev dobre kakovosti grozdja vinogradniki uporabljajo različne fungicidne pripravke, ki so iz različnih kemijskih skupin in specifično delujejo na klitje spor, zavirajo

podaljševanje konidioforov in zavirajo rast micelija glive *B. cinerea* (Forster in Staub, 1996; Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Nekatera fungicidna sredstva delujejo inhibitorno tudi na rast fermentativnih kvasovk, kar lahko povzroči zamik fermentacije (Cabras in sod., 1999; Cabras in Angioni, 2000; Čuš, 2005). Nekatere vrste kvasovk, ki so tudi sicer na površini sadja, imajo močno biokontrolno aktivnost v primerjavi z drugimi glivami (Guinebretiere in sod., 2000; Fleet, 2003a; Fleet, 2003b). Posamezni sevi kvasovk *Pichia anomala* in *P. membranifaciens* lahko na vinski trti preprečijo rast sive grozdne plesni *B. cinerea* (Masih in sod., 2000; Masih in sod., 2001; Masih in Paul, 2002). Določeni sevi kvasovke *Aureobasidium pullulans* zmanjšajo hitrost rasti glive *B. cinerea* na jabolkih, jagodah in grozdju (Lima in sod., 1997; Schena in sod., 1999; Castoria in sod., 2001; Ippolito in sod., 2005). Raziskovalca Druvefors in Schnurer (2005) sta testirala 58 vrst (116 sevov) kvasovk, izmed katerih je sedem vrst kvasovk zmanjšalo hitrost rasti glive *Penicillium roquefortii* na pšeničnih zrnih v silosih. Guinebretierjeva je s sodelavci (2000) za kvasovki *Candida reukaufii* in *Metschnikowia pulcherrima* podobno dokazala na jagodah. Mehanizmi, prisotni pri interakcijah med kvasovkami, filamentoznimi glivami in bakterijami, so večinoma še neznani. Izločanje encimov (1,3- β -glukanaze) za razgradnjo celične stene gliv (Masih in sod., 2001; Masih in Paul, 2002), kompeticija oz. tekmovanje za hrano in prostor (Spadaro in sod., 2002; Spadaro in Lodovica Gullino, 2004), predatorstvo (Lachance in Pang, 1997; Lachance in Starmer, 1998), tvorba zimocinov (Walker in sod., 1995) so mogoči mehanizmi biokontrole. Vendar raziskovalca Druvefors in Schnurer (2005) povezave med biokontrolno aktivnostjo kvasovk ter njihovo kompeticijo za hrano in prostor ali tvorbo zimocinov v primeru glive *Penicillium roquefortii* na pšeničnih zrnih v silosih nista dokazala.

Kvasovke med alkoholno fermentacijo tvorijo etanol, na katerega so nitaste glive občutljive že pri majhnih koncentracijah. Čeprav v vinu ne preživijo, lahko rastejo tako na zunanji kot na notranji strani lesenih sodov pa tudi na plutastih zamaških (Fleet, 1998). Zmožne so torej pobirati ostanke hranil v okolju z nizko koncentracijo etanola. Poleg estetskega problema njihove rasti na takih površinah je tvorba senzorično nezaželenih metabolitov zelo velik problem (Lee in Simpson, 1993; Pereira in sod., 2000). Predvsem kloroanizoli (2,4,6-trikloroanizol in drugi anizoli), klorofenoli, geosmin, guajakol in drugi (Lee in Simpson, 1993; Pereira in sod., 2000), ki prehajajo v vino, ustvarjajo neustrezno aromo in okus vina po pluti, plesni, gnilem, zemlji in po lesu (Pereira in sod., 2000).

Nekateri proteini nitastih gliv zavirajo rast kvasovk (Doneche, 1993). Gliva *Botrytis cinerea* tvori »botriticin«, glikoprotein, ki inhibitorno vpliva na nekatere vrste kvasovk (npr. *Rhodotorula*) (Fleet in sod., 2002). In obratno – proteini celične stene kvasovk, predvsem 1,3- β -glukani, lahko vežejo mikotoksine, ki jih tvorijo nitaste glive. Na koncu fermentacije – pri pretakanju vina se toksini izločijo in odstranijo (Fleet, 2003a).

2.6.1.3 Medsebojno vplivanje med različnimi rodovi/vrstami/sevi kvasovk

Interakcije med različnimi vrstami in sevi kvasovk se začnejo že na grozdju. Gre predvsem za kompeticijo za hrano in prostor. Rezultat teh interakcij vpliva na naravno mikrofloro, ki bo po trgatvi sprožila začetek fermentacije. Od primarne mikroflоре je odvisno, ali se bo fermentacija sploh začela, ali bo potekala počasneje ter ali bo potekla burno in hitro. Potek fermentacije je bistven za nastanek metabolitov. Kvasovka *S. cerevisiae* je vodilna kvasovka alkoholne fermentacije, vendar so ne-*Saccharomyces* kvasovke tiste, ki fermentacijo začnejo. Kvasovke rodov *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Hansenula* in *Kluyveromyces* na začetku fermentacije poleg etanola in CO₂, tvorijo t. i. sekundarne metabolite (glicerol, maščobne kisline srednje dolžine (C₆–C₁₂) in njim ustrezne etilestre, aldehide in ketone ter tudi višje alkohole in organske kisline (ocetna kislina)), ki prispevajo k senzoričnim lastnostim vina. Znano je, da so heksanjska, oktanojska in dekanjojska kislina toksične za kvasovko *S. cerevisiae* (Viegas in sod., 1989). Po 2 do 3 dneh fermentacije, ko koncentracija etanola naraste nad 5 % (v/v), se zaradi občutljivosti na etanol populacija kvasovk spremeni. Na etanol občutljive ne-*Saccharomyces* vrste začnejo odmirati, *Saccharomyces* kvasovke pa postanejo dominantne in zaključijo proces (Fleet, 1998; Romano, 2002). Če se fermentacija zaključi prehitro in so v vinu prisotni ostanki nepovretega sladkorja (nad 2–5 g/l), to predstavlja okolje za rast drugih vrst kvasovk. Vrste *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces balii* in *Z. fermentati* imajo tudi visoko toleranco na etanol (nad 10 %) in so znane kot kvarljivke vina (Fleet, 2003a).

Kompeticijsko-antagonistični odnos se pojavlja v primeru kvasovk, ki izločajo eksotoksine (Young, 1987; Fleet, 1998). Eksotoksini, po kemični sestavi proteini ali glikoproteini, lahko ubijejo celice kvasovk iste ali sorodne vrste in se imenujejo zimocini (ang. killer toxins) (Shimizu, 1993). Po fenotipu delimo kvasovke na zimocidne (ang. killer yeasts), občutljive (ang. sensitive yeasts) in nevtralne (ang. neutral yeasts). Zapis za zimocin se pri različnih kvasovkah nahaja na različnih mestih. Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ga najdemo na dvoverižni RNA (dsRNA) in je vključen v virusom podobne delce. Pri kvasovkah rodov *Pichia* in *Kluyveromyces* se nahaja na linearnem plazmidu, pri vrsti *Candida glabrata* pa je zapis kodiran z geni na kromosomu (Golubev, 1998). Zimocidnost je bila dokazana za različne seve vrste *Saccharomyces cerevisiae* kot tudi za druge ne-*Saccharomyces* vrste *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Triosporon* in *Zygosaccharomyces* (Wickner, 1974; Wickner, 1976; Young, 1987; van Vuuren in Jacobs, 1992; Shimizu, 1993; Izgu in sod., 1997; Chen in sod., 2000; Ciani in Fatichenti, 2001; Zagorc in sod., 2001; Flegelová in sod., 2002; Marquina in sod., 2002; Weiler in Schmitt, 2003; Comitini in sod., 2004a; Comitini in sod., 2004b; Izgu in Altinbay, 2004; Novotná in sod., 2004; Pfeiffer in sod., 2004; Santos in Marquina, 2004; Izgu in sod., 2005; Izgu in sod., 2006). Zimocini oz. killer toksini

delujejo na senzitivne celice na različne načine, kot so inhibicija prepisovanja DNA, indukcija sprememb membranske permeabilnosti, zaustavitev celične delitve v fazi G1, lahko pa tudi vpliva na sintezo celične stene tako, da inhibira β -1,3-glukan sintazo. Vplivi ekoloških dejavnikov (vrednost pH, temperatura, etanol, kovinski ioni, NaCl in koncentracija sladkorjev) na tovrstno interakcijo še niso popolnoma pojasnjeni. Vključitev NaCl v medij močno poveča senzitivnost celic na killer toksin in hkrati razširi spekter vrst, ki jih toksin lahko prizadene (Llorente in sod., 1997; Fleet, 1998). Zunanji sloj celične stene kvasovk je sestavljen predvsem iz mananoproteinov, β -1,3-glukanov in β -1,6-D-glukanov ter hitina (Fleet, 1991). Vse te komponente lahko delujejo kot primarna vezna mesta in receptorji za različne zimocidne encime.

Pojav predatorstvo oz. nekrotrofni parazitizem je pri nitastih glivah znan od leta 1992 (Lumsden, 1992), nekaj let kasneje sta ta pojav opisala Lachance in Pang (1997) tudi pri kvasovkah. Dokazala sta, da sedem vrst kvasovk fizično penetrira v celico druge kvasovke in jo ubije. Še več, ugotovila sta, da je predatorstvo teh kvasovk povezano z njihovo potrebo po organskem žveplu, saj niso zmožne izkoristiti sulfata kot edinega vira žvepla. Kvasovke vrst *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia hibisci* in druge so občutljive na eno ali več vrst predatorskih kvasovk (Lachance in sod., 2000).

2.6.1.4 Razlike med tekočim in trdnim substratom

Rast in razvoj kvasovk v tekočem ekosistemu (mošt-vino) so raziskovali in še raziskujejo številni raziskovalci. Medtem ko je o okoljskih signalih, ki vplivajo na rast in razvoj kolonije na trdnih substratih (grozdje), še vedno znanega zelo malo. V homogenem tekočem mediju imajo vse celice enake pogoje in lahko rastejo neovirano, dokler ne nastane splošno pomanjkanje hranil ali dokler ne nastane dovolj velika količina stranskih produktov, ki zavirajo rast. Heterogeni trdni mediji pa predstavljajo mikroorganizmom dodatne izzive za rast (Malakar in sod., 2002). Kvasovke se, kadar rastejo na trdnih substratih, organizirajo v kolonije, ki so po videzu zelo različne. Pomembna razlika med tekočim in trdnim substratom je v dostopnosti hranil. Položaj postane še bolj zapleten, ko se v začetni fazi rasti celice začnejo kopičiti ena na drugo, tako da niso vse celice znotraj ene kolonije enako oddaljene od hranil (Meunier in Choder, 1999). Med razvojem se okoli kolonije kvasovk stalno tvori gradient tako hranil, ki se sproti porabljajo, kot tudi metabolitov, ki nastajajo (Palková in sod., 1997; Palková in Forstová, 2000). Večja kot je kolonija, večje so zahteve po dovajanju hranil do celic v sredini kolonije ter po odvajanju nastalih metabolitov na rob kolonije. Poleg tega je začetna koncentracija inokuluma celic na površini trdnega gojišča zelo pomembna, saj določa prostorsko porazdelitev kolonij. V tem kontekstu so torej pomembne interakcije med dvema ali več kolonijami (ang. inter colony) in tudi znotraj ene kolonije (ang. intra colony) (Malakar in sod., 2002). Kadar je

začetna koncentracija večja, so kolonije bližje, nastajajoči produkti pa začnejo vplivati na rast sosednje kolonije. Kolonije zato zrastejo manjše. Če je začetna koncentracija manjša, so kolonije med sabo bolj oddaljene in lahko zrastejo večje, preden začnejo komunicirati s sosednjo kolonijo, hkrati pa postanejo interakcije znotraj kolonije pomembnejše (Malakar in sod., 2002).

Mogoč mehanizem prehoda hranil do bolj oddaljenih celic znotraj ene kolonije je pasivni kapilarni prehod hranil skozi pore celične stene kvasovk (Meunier in Choder, 1999). Ni znano, ali in kako celice komunicirajo med seboj znotraj kolonije in ali obstaja kakšna hierarhija med številnimi celicami v eni koloniji, ali posamezne celice tvorijo ter izločajo kakšne snovi, ki sodelujejo pri organizaciji kolonije. Meunier in Choder (1999) sta dokazala hierarhično obnašanje celic znotraj kolonije. Celice na trdnih substratih rastejo dvofazno. Prva faza je faza hitre rasti, kjer se celice delijo podobno hitro kot v eksponentni fazi rasti v tekočem mediju. Na koncu eksponentne faze rasti pa posamezna kolonija hitro preide v počasno rast. V tej drugi fazi so razlike med celicami v sredini in tistimi na obrobju kolonije. Celice v sredini kolonije preidejo v stacionarno fazo rasti, medtem ko je nadaljno rast posameznih celic mogoče zaslediti le na periferiji kolonije. Dokazala sta tudi, da kadar je na plošči več kot 200 kolonij, te ne preidejo v drugo fazo rasti, temveč vse vstopijo v stacionarno fazo.

Leto kasneje sta Varon in Choder (2000) ugotovila, da je kolonija kvasovke *S. cerevisiae* organizirana enota. Organiziranost kolonije je povezana z njeno starostjo – starejša kot je kolonija, bolj so celice znotraj kolonije urejene, organiziranost celic pa se povečuje tudi od roba proti notranjosti kolonije. Prisotnost povezovalnih fibril sta ugotovila pri tri tedne starih kolonijah. Te naj bi imele poleg funkcije povezovanja celic v organizirano mrežo tudi sposobnost sprejemanja in prenosa signalov iz okolja in v okolje. Mogoče je tudi, da sodelujejo pri prenosu hranil in produktov od ene do druge celice (Varon in Choder, 2000).

V zadnjem času je vse več raziskav usmerjenih h komunikacijam med kolonijami na daljavo (ang. long-range). Znan je pojav feromonskega zaznavanja gostote celic (ang. quorum sensing) pri bakterijah (Miller in Bassler, 2001), kjer bakterije komunicirajo s pomočjo nizkomolekularnih spojin. Pri kvasovki *Candida albicans* je molekula zaznavanja gostote celic farnesol, ki sproži signal inhibicije tvorbe biofilma (Ramage in sod., 2002). Pri kvasovkah so Palková in sodelavci (1997) dokazali hlapni amoniak kot eno od signalnih molekul komunikacije, ki ga kolonije kvasovk oddajajo v impulzih (Palková in sod., 1997; Palková in Forstová, 2000; Zikánová in sod., 2002; Palková in Váchova, 2003). Kolonija v stiku s hlapnim amoniakom odgovori z lastno tvorbo amoniaka, ne glede na to v kateri fazi razvoja se trenutno nahaja (Palková in Váchova, 2003). Posledično pride do hkratne inhibicije rasti sosednjih kolonij. Te nato zmanjšajo tvorbo amoniaka, ponovno rast pa usmerijo v pristo smer (Palková in sod., 1997; Palková, 2004). Tak način

komunikacije in usmerjeno rast kolonij so odkrili pri različnih rodovih kvasovk. Različen je bil le čas, v katerem se je pri kvasovkah iste vrste tak pojav pokazal (Palková in sod., 1997; Palková in Forstová, 2000; Palková in sod., 2002; Zikánová in sod., 2002; Palková in Váchova, 2003). Podobno funkcijo naj bi imel tudi bikarbonat (Ohkuni in sod., 1998). Zaznavanje gostote lastne populacije omogoča specifične odgovore celotne populacije pri regulaciji fizioloških procesov, kot so sinteza antibiotikov, tvorba biofilma in drugo.

2.7 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen dela je bil ugotoviti, ali imajo različne vrste in sevi kvasovk, ki so naravno prisotne v ekosistemu trta-grozdje-mošť-vino, biokontrolno aktivnost in ali te kvasovke zavirajo rast nitaste glive *Botrytis cinerea* Pers., prav tako avtohtono prisotno v vinogradu na trti in grozdju. V ta namen smo proučili naključno izbrane seve različnih vrst kvasovk, izoliranih z različnih geografskih lokacij v Sloveniji.

Kvasovke in druge glive, prisotne na grozdju, z različnimi mehanizmi vplivajo na medsebojno rast in razvoj. Izhodišče raziskovalne hipoteze temelji na malo proučenem področju medsebojnega vplivanja med kvasovkami na trdnem mediju in njihovega biokontrolnega delovanja na rast nitaste glive. Pri raziskovalnem delu smo se osredotočili na preučevanje teh interakcij. Ugotavljali bomo tudi prisotnost signalnih molekul komunikacije med kolonijami kvasovk različnih vrst.

Pridobljene ugotovitve bodo pomembno prispevale k razumevanju pojavnosti oz. prisotnosti primarne populacije vinskih kvasovk in gliv že na grozdju ter interakcij med njimi. Spoznanja s tega področja bodo uporabna tudi širše v naravnem okolju, saj ima uporaba kvasovk kot biokontrolnih agentov velik komercialni potencial.

Postavili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1:

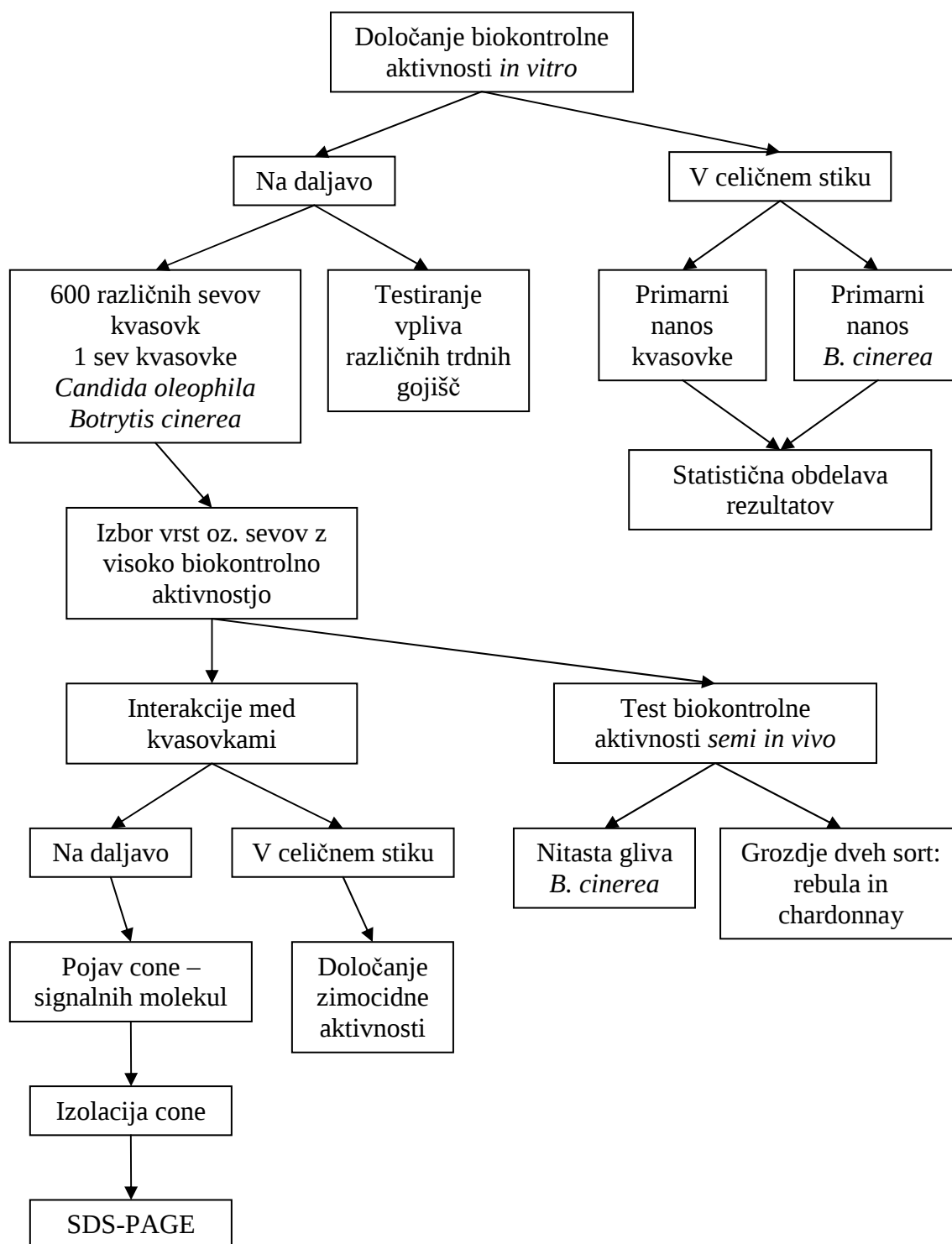
Nekatere vrste in/ali sevi kvasovk imajo biokontrolno aktivnost, s katero zavirajo rast nitaste glive.

Hipoteza 2:

Med kvasovkami in glivo prihaja do interakcij med kolonijami na daljavo in med celicami v neposrednem stiku.

Hipoteza 3:

Pri interakcijah med kolonijami sodelujejo signalne molekule proteinske narave, katerih tvorba je odvisna od pogojev v okolju ter od stopnje razvoja kolonije.



Slika 4: Načrt poteka poskusa

Figure 4: Experiment flow chart

3 METODE IN MATERIALI

3.1 METODE

3.1.1 Priprava vzorcev

Izbrane seve kvasovk (priloga A) shranjene v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM, 2007) smo nacepili na gojišče za revitalizacijo (YM agar). Po inkubaciji smo eno cepilno zanko tri do pet dni starih celic prenesli v epruvete s fiziološko raztopino. Suspenzijo celic v epruveti smo premešali z vrtinčnikom. Suspenziji celic kvasovk smo spektrofotometrično izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 650 nm in poenotili vrednost z dodatkom fiziološke raztopine ali pa z dodatkom celic kvasovk na 0,2. Število celic tako pripravljene suspenzije smo nato prešteli pod mikroskopom z uporabo Bürker-Türkovega hemocitometra (Brand). Suspenzijo celic kvasovk smo pripravili do ustrezne koncentracije celic.

Seve nitaste glive *Botrytis cinerea* shranjene v ZIM smo prav tako najprej revitalizirali. Nacepili smo jih na PDA hranilni medij (poglavje 3.2.3.4), in inkubirali 15 dni, da se je micelij glive lepo razrasel, ter da so hife začele tvoriti spore. Zračni micelij s sporami smo nato s pinceto prenesli v epruveto s fiziološko raztopino in premešali na vrtinčniku. Spektrofotometrično smo izmerili optično gostoto, število spor pa smo prešteli pod mikroskopom z uporabo Bürker-Türkovega hemocitometra (Brand). Suspenzijo spor nitaste glive smo pripravili do ustrezne koncentracije spor/ml.

3.1.1.1 Določanje skupnega števila celic kvasovk in spor nitaste glive

Na Bürker-Türkovi hemocitometer smo dali 15 µl v fiziološki raztopini pripravljene razredčene suspenzije celic kvasovk ali spor nitaste glive. Pod mikroskopom smo prešteli število celic oz. spor in število izrazili kot skupno število celic oz. spor na ml (enačba 1).

$$N = X \times R \times f \quad \dots(1)$$

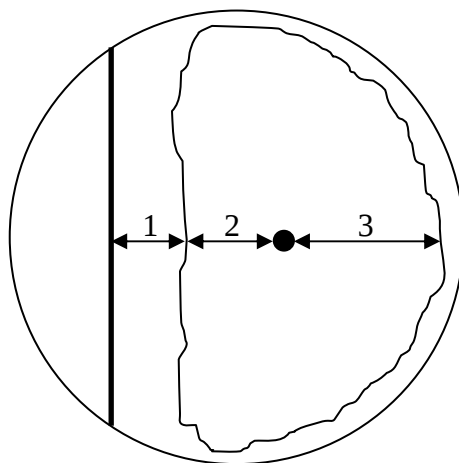
N– skupno število celic oz. spor v 1 ml vzorca; X– število celic oz. spor prešteti v kvadratu; R– faktor razredčitve vzorca; f– Bürker-Türkova konstanta, odvisna od območja štetja ($f = 2,5 \times 10^5$)

3.1.2 Določanje vpliva biokontrolne aktivnosti *in vitro*

3.1.2.1 Določanje BKA *in vitro* med kvasovko in nitasto glivo na daljavo

Biokontrolno aktivnost (BKA) različnih vrst oz. sevov kvasovk (priloga A) na rast nitaste glive *B. cinerea* smo spremljali na sintetičnem trdnem gojišču NYDA (ang. nutrient yeast dextrose agar), ki smo ga pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.2. Princip enostavnega testa je na določeni razdalji, na plošči s sintetičnim gojiščem, nacepiti oba mikroorganizma (Spadaro in sod., 2002). Na 90 mm Petri ploščo smo 20 mm od roba plošče v ravni črti s cepilno zanko nanesti tri do pet dni staro kolonijo kvasovk, na piko 32 mm stran od linije kvasovk in od roba plošče pa smo s pipeto nanesti kapljico (50 μ l) suspenzije spor nitaste glive (10^4 spor/ml) (glej sliko 5). Test smo izvajali v treh paralelkah. Po inkubaciji pet do sedem dni pri 25 °C, ko je micelij glive dosegel rob plošče, smo merili tri razdalje (slika 5):

- 1... biokontrolna aktivnost kvasovke oz. zaviranje rasti micelija nitaste glive v smeri proti kvasovki;
- 2... radialna rast micelija nitaste glive proti kvasovki;
- 3... radialna rast micelija nitaste glive proti robu plošče.



Slika 5: Določanje biokontrolne aktivnosti *in vitro*. V ČRTO je nanesena posamezna kolonija kvasovk, kot PIKA je nanesena suspenzija spor nitaste glive. Po inkubaciji smo merili razdalje: 1, 2, 3.

Figure 5: Biocontrol activity measurement *in vitro*. On a LINE each yeast colony was inoculated, as a DOT filamentous fungi spore suspension was inoculated. After incubation distances 1, 2, 3 were measured.

Z enačbo 2 smo izračunali odstotek biokontrolne aktivnosti kvasovk na rast nitaste glive.

$$\text{Biokontrolna aktivnost (\%)} = \frac{\text{razdalja 1}}{(\text{razdalja 1} + \text{razdalja 2})} \times 100 \quad \dots(2)$$

Podatke o biokontrolni aktivnosti za vse testirane seve smo s programom Microsoft Excel tudi statistično obdelali (average, SD).

3.1.2.1.1 Vpliv različnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovk

S testom, opisanim v poglavju 3.1.2.1, smo ugotavljali vpliv petih sintetičnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovk. Sintetična trdna gojišča YM, YPDA, WYPDA, NYDA in KD smo pripravili po recepturah opisanih v poglavjih 3.2.2 in 3.2.3. Pri testiranju vpliva gojišč smo uporabili nitasto glivo z ZIM oznako F58, med vsemi sevi kvasovk pa smo izbrali kontrolno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher ter po tri predstavnike izbranih štirih vrst kvasovk z biokontrolno aktivnostjo (Priloga A).

3.1.2.2 Določanje BKA *in vitro* med kvasovko in nitasto glivo v celičnem stiku

Na ploščah z različnima sintetičnima gojiščema (NYDA in PDA) smo ugotavljali vpliv celičnega stika (ang. cell-to-cell contact) med različnimi sevi nitaste glive (preglednica 6) ter izbranimi sevi kvasovk (preglednica 25), ki naj bi bil eden od mehanizmov biokontrolne aktivnosti.

Vpliv celičnega stika smo ugotavljali tako, da smo kot primarni nanos na površino trdnega gojišča nanесли bodisi suspenzijo celic kvasovk z določeno koncentracijo (test A), ali pa suspenzijo spor nitaste glive z določeno koncentracijo (test B). Na površino posušenega primarnega nanosa pa smo nato v določenih časovnih intervalih nanесли ali suspenzijo spor nitaste glive (pri testu A) ali suspenzijo celic kvasovk (pri testu B).

Po skupni inkubaciji smo spremljali radialno rast nitaste glive na trdnem gojišču s primarnim nanosom kvasovk v primerjavi z rastjo na plošči brez kvasovk (pri testu A) oz. rast kolonije kvasovk na plošči s primarnim nanosom nitaste glive v primerjavi z rastjo kolonije na plošči brez nanosa nitaste glive (pri testu B) sedmi dan, nato pa še 15. in 30. dan. Poskus smo izvajali v treh paralelkah.

3.1.2.2.1 Test A – primarni nanos suspenzije kvasovk

Na označene pripravljene plošče z NYDA ali PDA gojiščem, smo po celotni površini razporedili s steklenimi kroglicami 0,5 ml sveže pripravljene suspenzije kvasovk, s koncentracijo celic (10^8 ali 10^6 cfu/ml). Steklene kroglice smo predhodno sterilizirali 20

minut pri temperaturi 120 °C. Odprte Petri plošče smo v sterilni komori ob ognju posušili. Ko se je primarni nanos kvasovk posušil (čas t_0), smo na sredino plošče nanegli 50 μ l suspenzije spor nitaste glive s koncentracijo spor (10^4 spor/ml na plošče s koncentracijo kvasovk 10^8 cfu/ml in 10^3 spor/ml na plošče s koncentracijo kvasovk 10^6 cfu/ml), v različnih časovnih intervalih (0 h, 24 h, 48 h). Inkubacija je potekala pri 25 °C. Radialno rast glive v primerjavi z rastjo na plošči brez kvasovke (kontrola) smo spremljali sedmi dan, nato pa še 15. in 30. dan. Po uporabi smo steklene kroglice očistili z detergentom, dobro sprali z destilirano vodo in jih posušili.

3.1.2.2.2 Test B – primarni nanos suspenzije spor nitaste glive

Tudi pri tem testu smo na označene plošče z gojiščem NYDA in PDA po celotni površini razporedili s steklenimi kroglicami 0,5 ml sveže pripravljene suspenzije spor nitaste glive z določeno koncentracijo (10^4 ali 10^3 spor/ml). Odprte Petri plošče smo posušili ob ognju v sterilni komori. Ko se je primarni nanos suspenzije spor nitaste glive posušil, smo začeli meriti čas t_0 . Plošče smo inkubirali pri 25 °C. Po samostojni inkubaciji smo ob času 48 h, 72 h, 96 h na sredino plošče nanegli kapljico – 50 μ l suspenzije kvasovk, s koncentracijo celic (10^8 cfu/ml kvasovk na plošče s koncentracijo spor nitaste glive 10^4 spor/ml in 10^6 cfu/ml kvasovk na plošče s koncentracijo spor nitaste glive 10^3 spor/ml). Radialno rast glive v primerjavi z rastjo na plošči brez kvasovke (kontrola) smo spremljali sedmi dan, nato pa še 15. in 30. dan.

3.1.2.2.3 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (1999). S poskusi dobljene podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro NPAR1WAY (neparametrični Wilcoxonov test), ker podatki niso zvezni.

Za obdelavo podatkov smo uporabili več statističnih modelov, v katere smo vključili po en vpliv: vpliv različnih kvasovk (Ap 2098, Co 2276, Mp 2055, Pg 624, Sc 2180), vpliv različnih sevov nitaste glive (F58, F61, F63), vpliv skupine v celičnem stiku (F58-Ap2098, F61-Ap2098, F63-Ap2098, F58-Co2276, F61-Co2276, F63-Co2276, F58-Mp2055, F61-Mp2055, F63-Mp2055, F58-Pg624, F61-Pg624, F63-Pg624, F58-Sc2180, F61-Sc2180, F63-Sc2180), vpliv gojišča (NYDA in PDA), vpliv kombinacije koncentracij inokuluma ($10^6/10^3$ in $10^8/10^4$), vpliv časa inokulacije (za kvasovke: 0, 24 in 48 ur ter za nitasto glivo: 48, 72 in 96 ur) ter vpliv časa odčitavanja (7, 15 in 30 dni).

3.1.3 Določanje biokontrolne aktivnosti *semi in vivo*

Test temelji na posnemanju pogojev v okolju. Za testiranje biokontrolne aktivnosti *semi in vivo* smo izbrali zdravo, nepoškodovano, zrelo grozdje dveh sort: sorto rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula), ki je bolj občutljiva na okužbe z nitasto glivo *B. cinerea* ter sorto chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay), ki je manj občutljiva na okužbe z *B. cinerea*. Grozdje smo analizirali v fazi tehnološke zrelosti tj. ob trgatvi na Ampelografskem vrtu Kromberka.

Da bi izničili primarni vpliv iz okolja, smo cele - nepoškodovane, zdrave in reprezentativne grozdne jagode s peceljčkom previdno odrezali od grozda. Grozdne jagode smo površinsko sterilizirali, tako da smo jih za dve minuti potopili v 2 % raztopino Na-hipoklorita in nato še spirali dve minuti pod tekočo vodo, ter sprali s sterilno destilirano H₂O. Tako pripravljene jagode smo ločili v dve skupini (po deset jagod na petrijevko): pri skupini A smo suspenzijo kvasovk z biokontrolno aktivnostjo ter suspenzijo spor nitaste glive nanašali s pršilko; pri skupini B pa smo suspenzijo kvasovk z biokontrolno aktivnostjo ter suspenzijo spor nitaste glive s pomočjo injekcijske igle (premer igle 0,4 mm) vnašali direktno v jagodo, tako smo umetno ustvarili poškodbo kože grozdne jagode in s tem omogočili lažji dostop do hranil. Test smo izvajali v treh paralelakah. Po deset jagod smo po razdelili v prazne Petri plošče in jih ločili v dve enoti:

Prva enota (skupine od A do E) – je bila tretirana z injekcijsko iglo, s katero smo naredili luknjico v kožico grozdne jagode in vanjo tik pod površino kože vnesli 20 µl suspenzije kvasovk z koncentracijo 10⁸ cfu/ml; z drugo injekcijsko iglo pa smo v jagodo vnesli 10 µl suspenzije spor nitaste glive *B. cinerea* z koncentracijo 10⁴ spor/ml.

Druga enota (skupine od K do O) – je bila tretirana s pršilko, s katero smo v oddaljenosti cca. 20 cm od plošče po površini vseh 10 jagod razpršili dva polna brizga tj. 1,6 ml suspenzije kvasovk s koncentracijo 10⁸ cfu/ml; z drugo brizgalko pa smo razpršili en brizg tj. 0,8 ml suspenzije spor nitaste glive *B. cinerea* z koncentracijo 10⁴ spor/ml.

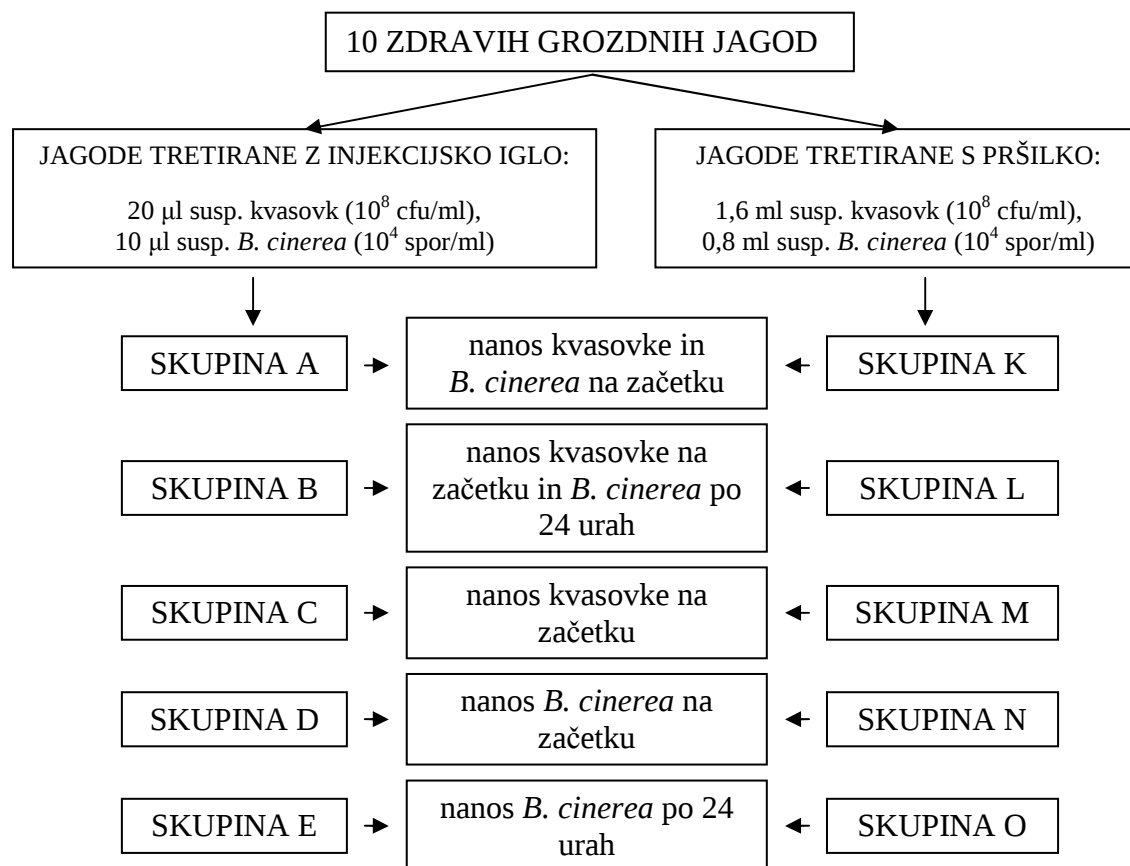
Znotraj obeh enot pa smo imeli pet skupin, ki smo jih različno tretirali glede na čas inokulacije suspenzije kvasovk ali nitaste glive:

- SKUPINI A in K: suspenzijo kvasovk in nitaste glive smo nanegli na začetku.
- SKUPINI B in L: suspenzijo kvasovk smo nanegli na začetku, suspenzijo nitaste glive smo nanegli 24 h kasneje.
- SKUPINI C in M: samo suspenzijo kvasovk smo nanegli na začetku.
- SKUPINI D in N: samo suspenzijo nitaste glive smo nanegli na začetku.
- SKUPINI E in O: samo suspenzijo nitaste glive smo nanegli 24 h kasneje.

Poleg teh skupin smo imeli tudi dve kontrolni skupini:

X: na jagode smo fiziološko raztopino nanesli na začetku,

Y: na jagode smo fiziološko raztopino nanesli na začetku in po 24 urah.



Slika 6: Shema poskusa določanja BKA semi *in vivo*

Figure 6: Flow chart of BCA determination semi *in vivo*

Petri plošče z jagodami smo inkubirali pet dni pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ocenili gnilobo po prirejeni Unterstenhöfferjevi lestvici (Püntener, 1981).

Preglednica 3: Prirejena Unterstenhöffer-jeva lestvica za oceno gnilobe grozdne jagode

Table 3: Modified Unterstenhöffer scale for evaluation of grape berries infection level

Razred okuženosti	Okužba	Opis
1	0 %	Popolnoma zdrava grozdna jagoda
2	1– 5 %	Na jagodi je vidna rjava pega, začetek okužbe
3	5– 25 %	Okužena do četrtna jagode
4	25– 50 %	Okužena je četrtna do polovica jagode
5	nad 50 %	Več kot polovica jagode je okužena

Stopnjo okužbe smo izračunali po Thowsend-Heubergerjevi enačbi (Püntener, 1981):

$$\% \text{ okuženosti} = \left[\frac{\sum_0^i (n \times v)}{i \times N} \right] \times 100 \quad \dots(3)$$

n- število jagod v posameznem razredu; v- razred; i- število najvišjega razreda; N - število vseh pregledanih jagod

Podatke o biokontrolni aktivnosti *semi in vivo* smo s programom Microsoft Excel tudi statistično obdelali (average, SD).

3.1.4 Interakcije med kvasovkami

3.1.4.1 Interakcije med kvasovkami na daljavo

Interakcije med kvasovkami na daljavo smo ugotavljali na gojiščih GM, GM-BCP in GMan, katerih sestava in priprava so opisane v poglavju 3.2.4. Pripravljene plošče z gojiščem smo s pomočjo milimetrskega papirja natančno označili. Na označena mesta smo nanesti vzorce. Plošče smo inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C), pojav signalnih molekul pa smo periodično spremljali. Hkrati smo inkubirali tudi prazne – nenacepljene kontrolne plošče gojišča. Poskus smo izvedli v treh paralelkah in dveh ponovitvah.

Pri nanašanju kvasovk iste vrste (monokolonija) smo za prenos posamezne celice uporabili mikromanipulator, ki omogoča natančno delo pod mikroskopom. Mikromanipulator je sestavljen tako, da je mogoče delovno ročico mikromanipulatorja, ki drži iglo natančno premikati v treh dimenzijah. Z iglo smo pod mikroskopom posamezno celico prenesli na točno določeno mesto označeno na plošči (slika 7a).

Pri določanju interakcij med dvema različnima vrstama kvasovk (mešana kolonija) pa smo označena mesta na plošči nanašali suspenzijo celic s pipeto. Celice ene oz. druge vrste smo nanašali v cikcak vzorcu, tako da so bile posamezne kolonije oddaljene druga od druge kot kaže slika 7b. Na posamezno označeno mesto smo nanesti kapljico (7 µl) suspenzije celic kvasovk s koncentracijo 10⁸ cfu/ml. Izbrane seve kvasovk smo nanesti v vseh medsebojnih kombinacijah (preglednica 4).

Preglednica 4: Kombinacije interakcij med kvasovkami

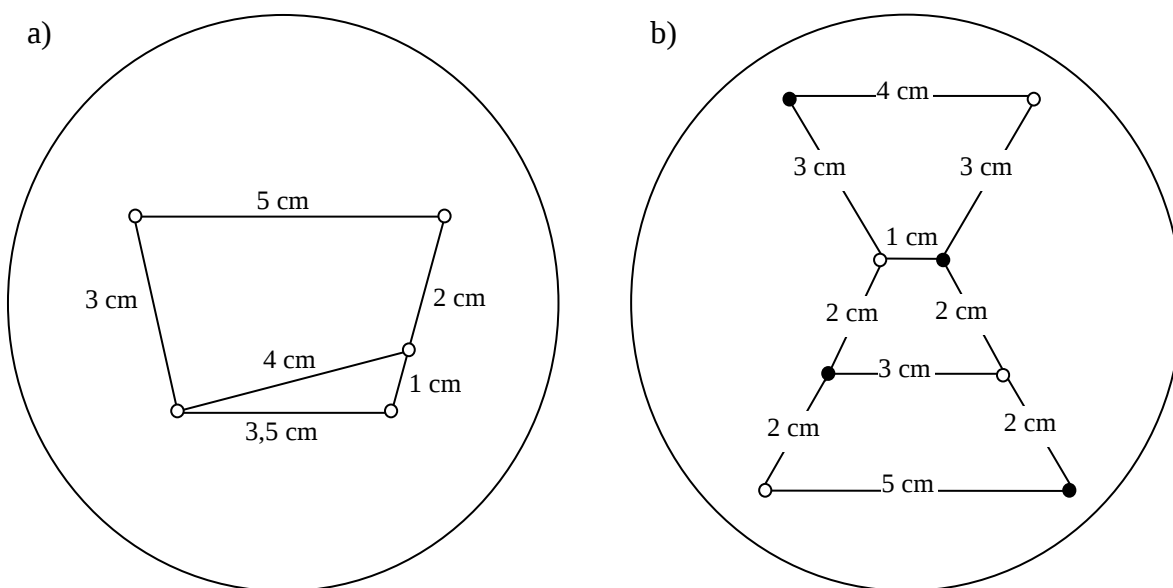
Table 4: Combinations of interactions between yeasts tested

	AP	CO	MP	PG	SC
AP	mono	mešana	mešana	mešana	mešana
CO		mono	mešana	mešana	mešana
MP			mono	mešana	mešana
PG				mono	mešana
SC					mono

Legenda/Legend: AP - *Aureobasidium pullulans*, CO - *Candida oleophila*, MP - *Metschnikowia pulcherrima*, PG - *Pichia guilliermondii*, SC - *Saccharomyces cerevisiae*

Palková je s sodelavci leta 1997 na testnem gojišču z glicerolom GM (ang. glycerol medium) ter visoko koncentracijo Ca^{2+} ionov, dokazala obstoj t. i. motne cone (ang. turbid path). Usmerjenost motne cone k sosednji koloniji kvasovk potrjuje komunikacijo med kolonijami kvasovk na daljavo (ang. long distance communication). Nastanek motnih con smo spremljali vsak dan tudi pri naših raziskavah.

Testno gojišče GM-BCP smo uporabili za dokazovanje tvorbe NH_3 , kot ene od signalnih molekul. Princip enostavne metode je v uporabi barvila bromkrezol vijolično (BCP, ang. bromcresol purple) v trdnem gojišču, ki je bogato s Ca^{2+} . Zaradi tvorbe NH_3 , kot ene od signalnih molekul, pride do barvne reakcije barvila, ki se iz rumene spremeni v vijolično. Gojišče GM-BCP smo pripravili po recepturi opisani v poglavju 3.2.4.2.



Slika 7: Shema inokulacije izbranih sevov kvasovk na določenih razdaljah a) mono inokulacija; b) mešana inokulacija

Figure 7: Scheme of yeast strain inoculation on marked distances a) mono inoculation; b) mixed inoculation

3.1.4.2 Interakcije med dvema kvasovkama v stiku

Ugotavljanje biokontrolne aktivnosti pri kvasovkah različnih vrst je temeljilo na dejstvu, da so nekatere vrste in sevi kvasovk zmožni tvoriti zimocine (ang. killer toxin). Zato smo uporabili barvno testno gojišče YEPD z metilenskim modrilom, ki se uporablja za določanje zimocidne aktivnosti.

3.1.4.2.1 Določanje zimocidne aktivnosti

Test temelji na spoznanju, da celične stene občutljivih celic, ki so bile izpostavljene delovanju zimocinov, postanejo prepustne za molekule barvil (Špaček in Vondrejs, 1986). Ker se test izvaja na trdem gojišču z metilenskim modrilom, so odmrle celice, ki so bile izpostavljene zimocinom, vidne kot moder obroč okoli zimocidne kvasovke. Med obročem in kolonijami zimocidnih kvasovk je čista cona, katere širina je odvisna od aktivnosti in količine izločenega toksina, ki difundira v gojišče okoli zimocidne kvasovke. Relativna aktivnost (pogojena s koncentracijo) je linearno odvisna od logaritma kvadrata premera cone inhibicije (Young, 1987).

Pripravili smo Petri plošče z gojiščem za testiranje zimocidnosti, YEPD z metilenskim modrilom s pH vrednostjo (3,0, 4,0 in 5,0). Po celotni površini smo s sterilnimi steklenimi kroglicami razporedili 1 ml suspenzije supersenzitivne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* S6 (ZIM 1859), kjer je bila koncentracija celic 10^5 cfu/ml. Odprto Petri ploščo

smo osušili ob ognju v sterilni komori. Ko se je primarni nanos senzitivnih kvasovk posušil, smo izvedli sekundarni nanos posameznih kolonij kvasovk, ki jih želimo testirati na zimocidnost. Prenesli smo jih na testna gojišča s cepilno zanko v obliki črte. Plošče smo 78 ur inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C).

3.1.4.2.2 Določanje navzkrižne zimocidne aktivnosti

Izvedli pa smo tudi različico testa, ko smo kvasovke navzkrižno testirali na zimocidno aktivnost. Petri plošče smo pripravili z gojiščem za testiranje zimocidnosti, YEPD z metilenskim modrilom in uravnali pH vrednost na 4,5. Po celotni površini smo s sterilnimi steklenimi kroglicami razporedili 1 ml suspenzije celic posamezne kvasovke, kjer je bila koncentracija celic 10^5 cfu/ml. Odprto Petri ploščo smo osušili ob ognju v sterilni komori. Ko se je primarni nanos kvasovk posušil, smo izvedli sekundarni nanos posameznih kolonij zimocidnih kvasovk. Prenesli smo jih na testna gojišča s cepilno zanko v obliki črte. Plošče smo 78 ur inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C).

Zimocidne kvasovke imajo v svoji okolici čisto cono, ki jo obdaja moder obroč odmrlih senzitivnih kvasovk. Cona je različno široko območje (2 do 5 mm ali celo nekaj mm več) okrog kolonije ali v ravni črti nanešenih celic seva, kjer ni prišlo do rasti senzitivnih kvasovk v filmu. Moder obroč celic predstavlja mrtve celice, ki so rasle do trenutka, ko so prišle v stik z difundiranim zimocinom. Po vezavi toksina na celico so v njeni celični steni in membrani nastale pore, ki so prepustne za metilensko modrilo.

3.1.5 Identifikacija signalnih molekul

3.1.5.1 Izolacija ekstracelularnih proteinov iz trdnega medija

Iz agarja smo s skalpelom previdno izrezali košček cone (bistre in/ali motne) velik približno 5×5 mm, ki obdaja kolonijo celic in ga na parafilmu razkosali na manjše delčke. Te smo previdno pobrali v polipropilenske centrifugirke z navojnim zamaškom (15 ml). Dodali smo 2 ml pufra za ekstrakcijo ekstracelularnih proteinov iz agarja. Vzorce smo inkubirali 60 min pri 28 °C, na stresalniku. Po inkubaciji smo centrifugirali 10 min pri 14000 obratih/min. Supernatant (1 ml) smo previdno odpipetirali v zbirno epruveto po Eppendorfu. Trdnemu vzorcu smo dodali 0,5 ml dH₂O, premešali na vrtinčniku in še 1 × centrifugirali 5 min pri 14000 obratih/min ter odpipetirali supernatant v isto zbirno epruveto po Eppendorfu. Trdnemu vzorcu smo ponovno dodali 0,5 ml dH₂O, premešali na vrtinčniku, še 1 × centrifugirali 5 min pri 14000 obratih/min in odpipetirali supernatant v isto zbirno epruveto po Eppendorfu v kateri smo že imeli supernatant. Zbrani supernatant smo nato centrifugirali 15 min pri 14000 obratih/min in nato previdno odpipetirali 1,5 ml

supernatanta v novo epruveto po Eppendorfu. Ekstraktu smo izmerili koncentracijo proteinov po metodi opisani v poglavju 3.1.5.2, do nadaljnje uporabe pa smo ga shranili pri -80°C .

3.1.5.2 Določanje koncentracije proteinov

Za določanje koncentracije ekstracelularnih proteinov izločenih v trdno gojišče smo uporabili kolorimetrično metodo po Bradfordu (1976).

Metoda temelji na dejstvu, da se barvilo Comassie brilliant modro G-250 specifično veže na protein. Rdeča barva barvila se spremeni v modro, s tem pa se spremeni absorpcijski maksimum barvila iz 465 na 595 nm. Vezava barvila na protein je zelo hitra (okoli dve minuti), kompleks protein – barvilo pa je stabilen relativno dolgo (približno eno uro).

Metodo je možno izvajati v dveh območjih: standardna procedura (ang. standard assay) za območje koncentracij od 0,1 do 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in mikro procedura (ang. micro assay) za območje koncentracij od 0,01 do 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Uporabili smo mikro proceduro. K 100 μl ekstrakta in 700 μl dH_2O smo dodali 200 μl nerazredčenega Bradfordovega reagenta, premešali in po 5 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Pri slepem vzorcu smo namesto ekstrakta uporabili 0,15 M raztopino NaCl.

Iz umeritvene krivulje (priloga 2) smo odčitali maso proteinov v 100 μl ekstrakta. Za umeritveno krivuljo smo kot standard uporabili goveji serumski albumin, ki smo ga raztopili v 0,15 M raztopini NaCl.

3.1.5.3 Koncentriranje proteinov

Za koncentriranje ekstracelularnih proteinov izoliranih iz trdnega gojišča smo uporabili plastične centrifugirke po Eppendorfu s filtrom, ki se uporabljajo za koncentriranje nukleinskih kislin, protiteles, za odstranjevanje soli in detergentov, za frakcionacijo celičnih komponent, za čiščenje virusov, proteinov in encimov, za odstranjevanje majhnih molekul npr. »primerjev« iz PCR mešanic. Po končanem centrifugiranju vzorca, lahko s pinceto filter obrnemo, s ponovnim centrifugiranjem pa omogočimo, da se koncentrat prenese v epruveto po Eppendorfu, od koder ga lahko pobereмо.

Uporabili smo centrifugirke po Eppendorfu z delovnim volumnom 0,5 ml in velikostjo por 4 kDa. Zamrznjene ekstrakte smo najprej v vodni kopeli pri 37°C odtalili in jih dve minuti centrifugirali pri 14000 obratih/min. Nato smo 0,5 ml ekstrakta odpipetirali v centrifugirke

po Eppendorfu. Centrifugirali smo pri 10000 obratih/min 45 minut. Filtrat smo odlili, v centrifugirke po Eppendorfu pa dodali 350 μ l bdH_2O in centrifugirali pri 13000 obratih/min 20 minut. Filtrat smo spet odlili, v centrifugirke po Eppendorfu pa dodali novih 350 μ l bdH_2O in centrifugirali pri 13000 obratih/min še 20 minut. Nato smo filtrat odlili, filter obrnili in centrifugirali dve minuti pri 4000 obratih/min. Koncentrat (200 μ l) smo s pipeto previdno prenesli v epruveto po Eppendorfu in shranili pri temperaturi -20°C . Filtre smo nato sprali z bdH_2O , in jih ponovno uporabili za druge vzorčke.

3.1.5.4 Raztapljanje proteinov

Koncentrate ekstraktov proteinov, ki smo jih predhodno odtajali na ledu, smo zmešali z vzorčnim pufrom 1 (preglednica 19) v razmerju 1:1 in jih takoj segreli na 100°C za 90 sekund. Tako pripravljene vzorce smo hranili pri temperaturi -20°C . Pred uporabo smo jih odtajali na sobni temperaturi, ponovno segreli na 100°C za 60 sekund, ohladili in nanesli na gel za analizo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE).

3.1.5.5 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE)

Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo je metoda za ločevanje proteinov na osnovi molekulske mase. SDS (ang. sodium dodecil sulphate) je anionski detergent, ki se veže na hidrofobne dele proteina, poruši njegovo strukturo in ga tako denaturira. Na 1 g proteina se veže približno 1,4 g SDS. Kompleksi SDS-polipeptid imajo vsi enak naboj, potujejo v isto smer (proti anodi), ločijo se samo po velikosti. V vzorčnem pufru, ki se doda ekstraktu pred nanosom na gel, je prisoten tudi β -merkaptotanol ali DTT. Oba imata vlogo reducenta in reducirata disulfidne vezi, ki stabilizirajo terciarno strukturo proteina (Lodish in sod., 1995; Walker, 1996).

Poliakrilamidni gel nastane s polimerizacijo akrilamidnih monomer v dolge poliakrilamidne verige, ki so kovalentno prečno povezane z bis-akrilamidom. Polimerizacija poteče v prisotnosti prostih radikalov, ki jih tvori APS v prisotnosti TEMED. Koncentracija akrilamida določa povprečno dolžino verige polimera, koncentracija bisakrilamida pa obseg križnega povezovanja. Oboje je pomembno pri določanju lastnosti gela, kot so: gostota, elastičnost in velikost por (Walker, 1996). S spreminjanjem koncentracij akrilamida in bisakrilamida v gelu variramo velikost por.

SDS-PAGE smo izvedli na osnovi metode po Laemmliju (1970). Gre za diskontinuirni sistem, kjer je gel sestavljen iz koncentracijskega in ločilnega gela. Uporabili smo sistem SE 600 (HIS), za analizo celokupnih topnih proteinov v celičnem ekstraktu. Postopek zajema več faz:

Vlivanje gelov

Med stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli tvorijo kalup, smo najprej vlili ločilni gel (preglednica 20) do višine 0,7 cm pod glavnikom. Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto nanесли tanko plast destilirane vode, ki gelu preprečuje stik s kisikom, kar omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko se gel strdi, se med njim in plastjo vode pojavi izrazita črta. Ko je gel polimeriziral (1 ura), smo vodo odlili, gel enkrat sprali s pufrom 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8) nato pa površino gela dobro osušili (s fenom). Med stekleni plošči smo namestili glavnik in nato vlili še koncentracijski gel (preglednica 21). Pustili smo 30 minut, da je gel polimeriziral, nato smo previdno odstranili glavnik. Nastale žepke smo 2 × sprali z 1 × SDS elektroforeznim pufrom (preglednica 23) in jih nato napolnili z istim pufrom.

Nanos vzorcev

V žepke, napolnjene z 1 × SDS elektroforeznim pufrom, smo nanašali različne volumne vzorcev, tako da je bila masa proteinov na žepke 5 µg.

SDS-PAGE

Kalup smo namestili med dve posodi (zgornja in spodnja posoda), kjer se nahajata obe elektrodi. Obe posodi smo napolnili z 1 × SDS elektroforeznim pufrom. Elektroforetska aparatura ima vgrajen hladilni sistem v obliki pretočnih cevi, ki smo jih priključili na vodovod. Hlajenje med potekom elektroforeze preprečuje pregrevanje gela in s tem slabše ločevanje.

Potovanje vzorcev je potekalo v smeri anode, najprej 60 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato 75 minut pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba gela.

3.1.5.6 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

Po končani elektroforezi smo gele barvali s srebrom. Barvanje s srebrom sodi med najbolj občutljive ne-radioaktivne metode za detekcijo proteinov. Je 100 × bolj občutljiva od barvanja npr. s Comassie brilliant modrim. Meja detekcije je 2–5 ng proteina. Barvanje temelji na vezavi srebrovih ionov na sulfidrilne in karboksilne skupine proteinov in naknadni redukciji do kovinskega srebra (Merril, 1987). Obstaja več različic barvanja. Mi smo uporabili postopek opisan v preglednici 5 (Yan in sod., 2000).

Preglednica 5: Barvanje proteinov s srebrom (Yan in sod., 2000)

Table 5: Silver staining of proteins (Yan et al., 2000)

korak	raztopina	čas
fiksacija	200 ml 95 % (v/v) raztopine etanola 50 ml ledocetne kisline bdH ₂ O = do 500 ml	30 min
predtretiranje	150 ml 95 % raztopine etanola 10 ml 10 % (w/v) raztopine Na ₂ S ₂ O ₃ 34 g Na-acetata bdH ₂ O do 500 ml	30 min
izpiranje	250 ml bdH ₂ O/gel	3 × 5 min
barvanje	6,25 ml 20 % (w/v) raztopine AgNO ₃ bdH ₂ O do 500 ml	20 min
izpiranje	250 ml bdH ₂ O/gel	2 × 1 min
razvijanje	12,5 g Na ₂ CO ₃ 200 µl 37 % formaldehida bdH ₂ O do 500 ml	2– 5 min
ustavitev reakcije	7,3 g EDTA-Na ₂ × 2H ₂ O bdH ₂ O do 500 ml	10 min
izpiranje	250 ml bdH ₂ O/gel	3 × 5 min

Po končanem barvanju smo gele preslikali z optičnim čitalcem.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Testni mikroorganizmi

3.2.1.1 Nitasta gliva *Botrytis cinerea* Pers.

Testirali smo tri različne seve, ki so shranjeni v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM, 2007):

Preglednica 6: Testirani sevi nitaste glive *Botrytis cinerea* Pers. shranjenih v ZIM

Table 6: Tested strains of filamentous fungi *Botrytis cinerea* Pers. preserved in ZIM

Oznaka	Izvor
F 58	sev izoliran s površine grozdja, Slovenija
F 61	sev prejet od dr. Doris Rauhut, Nemčija
F 63	sev prejet od dr. Paul Bernard, Francija

Po revitalizaciji smo seve nitaste glive hranili na hranilnih ploščah s PDA gojiščem v inkubatorju pri 28 °C. Vitalnost nitaste glive smo ohranjali s precepljanjem kulture na svežo Petri ploščo s PDA gojiščem vsake dva do tri tedne.

3.2.1.2 Kvasovke

Pri našem delu smo v prvem delu raziskovalnega dela naključno izbrali 600 sevov kvasovk različnih vrst povezanih z ekosistemom grozdje/mošť/vino. Seznam vseh testiranih kvasovk na biokontrolno aktivnost je v Prilogi A.

Kontrolno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher NRRL Y-2317, smo prejeli iz ARS Culture Collection in je shranjena pod številko ZIM 2276 v Zbirki industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana (ZIM, 2007)

Prav tako je v ZIM shranjena supersenzitivna kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* S6 (ZIM 1859), ki smo jo uporabili za testiranje oz. ugotavljanje delovanja zimocinov.

Po revitalizaciji smo kvasovke hranili na YM trdnem hranilnem gojišču v inkubatorju pri 28 °C. Vitalnost kvasovk smo ohranjali s precepljanjem kulture na sveža YM gojišča vsakih tri do pet dni.

3.2.2 Splošna gojišča

Za namnoževanje biomase, za vzdrževanje kultur kvasovk in za testiranje biokontrolne aktivnosti in drugih interakcij smo uporabili splošno uveljavljeni neselektivni gojišči, kot sta YM in YPDA. Gojišča smo pripravili po sledečih recepturah ter jih sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut). Čistost vseh kemikalij je p.a. (pro analysi).

3.2.2.1 YM (ang. yeast-malt) agar

Preglednica 7: Sestava YM trdnega gojišča

Table 7: Composition of yeast malt agar

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	3 g
sladni ekstrakt	Biolife, Italija	3 g
pepton	Oxoid, Anglija	5 g
glukoza	Kemika, Hrvaška	10 g
agar	Biolife, Italija	20 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.2.2 YPDA (ang. yeast peptone dextrose agar)

Preglednica 8: Sestava YPDA trdnega gojišča

Table 8: Composition of yeast peptone dextrose agar

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	5 g
pepton	Oxoid, Anglija	10 g
glukoza	Kemika, Hrvaška	10 g
agar	Biolife, Italija	20 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.3 Gojišča za določanje BKA

Za testiranje biokontrolne aktivnosti in drugih interakcij smo poleg YM (poglavje 3.2.2.1) in YPDA (poglavje 3.2.2.2) uporabili še naslednja gojišča: WYPDA, NYDA, kemijsko definirano gojišče in PDA. Gojišča smo pripravili po sledečih recepturah ter jih sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut).

3.2.3.1 WYPDA (ang. wine yeast peptone dextrose agar)

Preglednica 9: Sestava WYPDA trdnega gojišča – modificirano po Nissen & Arneborg, 2003 z dodatkom agarja

Table 9: Composition of wine yeast peptone dextrose agar

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	5 g
pepton	Oxoid, Anglija	10 g
glukoza	Kemika, Hrvaška	200 g
agar	Biolife, Italija	20 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.3.2 NYDA (ang. nutrient yeast dextrose agar)

Preglednica 10: Sestava NYDA trdnega gojišča

Table 10: Composition of nutrient yeast dextrose agar

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	5 g
hranilna brozga	Oxoid, Anglija	10 g
glukoza	Kemika, Hrvaška	10 g
agar	Biolife, Italija	15 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.3.3 KDM - kemijsko definiran mošt (ang. chemical defined must)

Preglednica 11: Sestava kemijsko definirane mošta (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992)

Table 11: Composition chemical defined must (Henschke in Jiranek, 1992)

sestavina	proizvajalec	količina na 1 l	priprava
glukoza	Kemika, Hrvaška	200 g	
K tartrat	Merck, Nemčija	5 g	
L- jabolčna kislina	Sigma, USA	3 g	tehtanje posameznih sestavin
Citronska kislina	Sigma, USA	0,2 g	
K ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija	1,14 g	
MgSO ₄ × 7H ₂ O	Sigma, USA	1,23 g	
CaCl ₂ × 2H ₂ O	Merck, Nemčija	0,44 g	

nadaljevanje preglednice 11: Sestava kemijsko definiranega mošta

MnCl ₂ × 4H ₂ O	Merck, Nemčija	198,2 µg	Izhodno raztopino smo ločeno pripravili za vsak mineral (preglednica 12).
ZnCl ₂	Fluka, USA	135,5 µg	
FeCl ₂	Merck, Nemčija	32,0 µg	
CuCl ₂ × 2H ₂ O	Aldrich, USA	13,6 µg	
borna kislina	Merck, Nemčija	5,7 µg	
Co(NO ₃) ₂ × 6H ₂ O	Sigma, USA	29,1 µg	
Na-molibdat × 2H ₂ O	Kemika, Hrvaška	24,2 µg	
KJO ₃	/	10,8 µg	Vitamine smo pripravili v skupni izhodni raztopini (preglednica 13).
Mio-inositol	Sigma, USA	100 mg	
piridoksin × HCl	Aldrich, USA	2 mg	
nikotinska kislina	Sigma, USA	2 mg	
Ca-pantotenat	Fluka, USA	1 mg	
tiamin × HCl	Aldrich, USA	0,5 mg	
P-amino benzojeva ksl.	/	0,2 mg	
riboflavin	Sigma, USA	0,2 mg	
biotin	Fluka, USA	0,125 mg	
folna kislina	Sigma, USA	0,2 mg	tehtanje posameznih sestavin
alanin	Merck, Nemčija	100 mg	
arginin	Aldrich, USA	750 mg	
asparagin	Sigma, USA	150 mg	
aspartinska kislina	Sigma, USA	350 mg	
glutaminska kislina	Sigma, USA	500 mg	
glutamin	Merck, Nemčija	200 mg	
glicin	Sigma, USA	50 mg	
histidin	Sigma, USA	150 mg	
izolevcin	Merck, Nemčija	200 mg	
levcin	Sigma, USA	300 mg	
lizin	Sigma, USA	250 mg	
metionin	Sigma, USA	150 mg	
fenilalanin	Sigma, USA	150 mg	
prolin	Sigma, USA	500 mg	
serin	Sigma, USA	400 mg	
treonin	Sigma, USA	350 mg	
triptofan	Sigma, USA	100 mg	
tirozin	Aldrich, USA	20 mg	
valin	Sigma, USA	200 mg	
agar	Biolife, Italija	20 g	
dH ₂ O		do 1000 ml	

Sestavine smo zatehtali v merilno bučko ob pripravi gojišča.

Priprava založnih raztopin mineralov:

Preglednica 12: Priprava založnih raztopin mineralov

Table 12: Preparation of stock solutions of minerals

sestavina	priprava	konc. založne raztopine (g/l)
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,1982 g v 100 ml destilirane vode	1,982
ZnCl_2	0,1355 g v 100 ml destilirane vode	1,355
FeCl_2	0,0320 g v 100 ml destilirane vode	0,320
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0136 g v 100 ml destilirane vode	0,136
borna kislina	0,0057 g v 100 ml destilirane vode	0,057
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,0291 g v 100 ml destilirane vode	0,291
Na-molibdat $\times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0242 g v 100 ml destilirane vode	0,242
KJO_3	0,0108 g v 100 ml destilirane vode	0,108

Založne raztopine mineralov smo pripravili posamezno. Raztopine smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C. Dodali smo 100 µl založne raztopine posameznega minerala v 1 liter kemijsko definiranega mošta.

Priprava založne raztopine vitaminov:

Preglednica 13: Priprava založne raztopine vitaminov

Table 13: Preparation of stock solution of vitamins

sestavina	priprava	konc. založne raztopine (g/l)
Mio-inositol	10 g v 100 ml destilirane vode	100
piridoksin $\times \text{HCl}$	2 g v 100 ml destilirane vode	20
nikotinska kislina	2 g v 100 ml destilirane vode	20
Ca-pantotenat	1 g v 100 ml destilirane vode	10
tiamin $\times \text{HCl}$	0,5 g v 100 ml destilirane vode	5
P-amino benzojeva ksl.	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
riboflavin	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
biotin	0,0125 g v 100 ml destilirane vode	0,125
folna kislina	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2

Založno raztopino vitaminov smo pripravili skupaj v eni raztopini, ki smo jo sterilizirali s filtriranjem skozi sterilni membranski filter. Dodali smo 1 ml založne raztopine vitaminov v 1 liter kemijsko definiranega mošta.

3.2.3.4 PDA (ang. potato dextrose agar) - krompirjev glukozni agar

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). S segrevanjem v vodni kopeli smo 39 g krompirjevega glukoznega agarja raztopili v 1 l destilirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 min, 121 °C.

3.2.4 Gojišče za določanje interakcij med kvasovkami

3.2.4.1 Gojišče GM (ang. glycerol medium) (Palková in sod., 1997)

Preglednica 14: Sestava GM (ang. glycerol medium) trdnega gojišča

Table 14: Composition of solid glycerol medium

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	10 g
glicerol	Oxoid, Anglija	30 ml
agar	Biolife, Italija	20 g
CaCl ₂	Kemika, Hrvaška	30 mM
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.4.2 Gojišče GM – BCP (Palková in sod., 1997)

Preglednica 15: Sestava GM -BCP (ang. glycerol medium with bromcresol puprle) trdnega gojišča

Table 15: Composition of solid glycerol medium with bromcresol purple

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	10 g
glicerol	Oxoid, Anglija	30 ml
agar	Biolife, Italija	20 g
CaCl ₂	Kemika, Hrvaška	30 mM
Bromkrezol vijolično	Merck, Nemčija	0,1 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.4.3 Gojišče GMan (ang. manose medium) (Vopálenská in sod., 2005)

Preglednica 16: Sestava GMan (ang. mannose medium) trdnega gojišča

Table 16: Composition of solid mannose medium

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	10 g
manosa	Oxoid, Anglija	30 g
agar	Biolife, Italija	20 g
CaCl ₂	Kemika, Hrvaška	30 mM
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.4.4 Gojišče za določanje zimocidne aktivnosti

Gojišče za določanje zimocidnosti pripravimo tako, da v razmerju 1:1 zmešamo 2 × koncentrirano YEPD-MB gojišče (preglednica 17) in citratno-fosfatni pufer (poglavje 3.2.5.2) z ustrežno pH vrednostjo. Steriliziramo pri 121 °C, 15 minut.

Preglednica 17: Sestava YEPD - MB (ang. yeast extract-peptone-dextrose agar with methylene blue) trdnega gojišča

Table 17: Composition of yeast extract peptone dextrose + methylene blue agar

sestavina	proizvajalec	masa
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	5 g
pepton	Oxoid, Anglija	5 g
glukoza	Kemika, Hrvaška	10 g
agar	Biolife, Italija	20 g
metilensko modrilo	Merck, Nemčija	0,03 g
dH ₂ O		do 1000 ml

3.2.5 Raztopine, reagenti

3.2.5.1 Fiziološka raztopina

Priprava izhodne fiziološke raztopine:

KH₂PO₄ (Merck)

3,4 g

dodamo 50 ml dH₂O

uravnamo pH = 7,2 z 3 M vodno raztopino NaOH

dodamo dH₂O do 100 ml

Hranimo: 3 mesece pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Izhodno fiziološko raztopino hranimo v hladilniku in jo redčimo pred uporabo v razmerju 1,25 : 1000 ml destilirane vode. Sledi sterilizacija v avtoklavu ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 minut).

3.2.5.2 Citratno-fosfatni pufer

citronska kislina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$; Sigma) 0,1 M

di-Natrijev-hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; Merck) 0,2 M

Citratno-fosfatni pufer pripravimo tako, da raztopini citronske kisline in natrijevega fosfata pripravimo ločeno in ju postopoma ob stalnem merjenju vrednosti pH zmešamo skupaj do pH vrednosti 4,5.

3.2.5.3 Pufer za ekstrakcijo ekstracelularnih proteinov iz agarja

Preglednica 18: Priprava pufra za ekstrakcijo proteinov iz agarja

Table 18: Preparation of buffer for protein extraction

sestavina	količina	končna koncentracija
1 M raztopina Tris-HCl, pH = 7,8	5 ml	50 mM
10 % (w/v) raztopina SDS	20 ml	2 % (w/v)
0,5 M raztopina EDTA (pH = 8,0)	20 ml	100 mM
Cistein (Sigma)	0,12 g	10 mM
dodamo dH ₂ O do 100 ml		

Raztopine za pripravo pufra za ekstrakcijo:

1,0 M raztopina Tris-HCl, pH = 7,8

Tris-baza (Sigma) 6,0 g

dodamo 40 ml bdH₂O

uravnamo pH na 7,8 s konc. HCl

dodamo bdH₂O do 50 ml

Hranimo: 3 mesece pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v temi

10 % (w/v) raztopina SDS

SDS (Sigma) 10,0 g

dodamo bdH₂O do 100 ml

Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi

0,5 M EDTA pH = 8.0

Dinatrijeva sol EDTA dihidrat (Kemika)

18,6 g

dodamo 70 ml bdH₂Ouravnamo pH na 8,0 z 10 N NaOH (400 g NaOH (Merck) v 1 l bdH₂O)dodamo bdH₂O do 100 ml

avtoklaviramo

Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi

3.2.5.4 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

NaCl (Merck) za pripravo 0,15 M vodne raztopine

Bradford reagent (Biorad)

BSA (Sigma) za pripravo izhodne raztopine

3.2.5.5 Raztapljanje proteinov

Vzorčni pufer 1:

Preglednica 19: Priprava vzorčnega pufra 1 (Protein electrophoresis..., 1994)

Table 19: Preparation of sample buffer 1 (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina	končna koncentracija
0,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 6,8	2,5 ml	0,125 M
10 % (w/v) raztopina SDS	4,0 ml	4 % (w/v)
Glicerol (Sigma)	2,0 ml	20 % (v/v)
Bromfenol modro (Sigma)	2,0 mg	0,02 % (w/v)
DDT (Sigma)	0,31 g	0,2 M
dodamo bdH ₂ O do 10 ml		

Hranimo: 6 mesecev pri T = -20 °C (aliquoti po 0,5 ml)

Raztopine za pripravo vzorčnega pufra 1:

0,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 6,8

Tris-baza (Sigma)

3,0g

dodamo 40 ml bdH₂O

uravnamo pH na 6,8 s konc. HCl

dodamo bdH₂O do 50 ml

Hranimo: 3 mesece pri T = 4 °C v temi

10 % (w/v) raztopina SDS

SDS (Sigma)

10,0g

dodamo bdH₂O do 100 ml

Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi

3.2.5.6 SDS-PAGE

3.2.5.6.1 Ločilni gel

Preglednica 20: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 10 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis..., 1994)

Table 20: Preparation of 1 mm thick running gel with different acrylamide concentration (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina
Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	13 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	9,8 ml
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 ml
bdH ₂ O	15,7 ml
10 % (w/v) raztopina APS	195 µl
TEMED	13 µl

Raztopini APS in TEMED smo dodali k ostalim štirim sestavinam gela (akrilamid/bisakrilamid + raztopina Tris-HCl + raztopina SDS + bdH₂O) potem, ko smo le te predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli 15 min. Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov (2 × 18 ml).

3.2.5.6.2 Koncentracijski gel

Preglednica 21: Priprava koncentracijskega gela z debelino 1 mm z 4 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis..., 1994)

Table 21: Preparation of 1 mm thick running gel with different acrylamide concentration (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina
Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	1,77 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 6,8	3,4 ml
10 % (w/v) raztopina SDS	0,1 ml
bdH ₂ O	8 ml
10 % (w/v) raztopina APS	66 µl
TEMED	6 µl

Raztopini APS in TEMED smo dodali k ostalim štirim sestavinam gela (akrilamid/bisakrilamid + raztopina Tris-HCl + raztopina SDS + bdH₂O) potem, ko smo le te predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli (15 minut). Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov.

Raztopine za pripravo ločilnega in koncentracijskega gela:

1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8

Tris-baza (Sigma)	36,3 g
dodamo 150 ml bdH ₂ O	
uravnamo pH na 8,8 s konc. HCl	
dodamo bdH ₂ O do 200 ml	
Hranimo: 3 mesece pri T = 4 °C v temi	

0,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 6,8

Tris-baza (Sigma)	3,0 g
dodamo 40 ml bdH ₂ O	
uravnamo pH na 6,8 s konc. HCl	
dodamo bdH ₂ O do 50 ml	
Hranimo: 3 mesece pri T = 4 °C v temi	

10 % (w/v) raztopina SDS

SDS (Sigma)	10,0 g
dodamo bdH ₂ O do 100 ml	
Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi	

Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %) (Sigma)

10 % (w/v) raztopina APS

Amonijev PerSulfat (Sigma)	0,1 g
dodamo bdH ₂ O do 1 ml	
Vedno pripravimo sveže!	

TEMED (TEtraMetilEtilenDiamin) (Sigma)

3.2.5.6.3 Marker – standard

raztopina obarvanih proteinov znanih molekulskih mas (14400 – 116000 Da) (Fermentas)

3.2.5.6.4 SDS elektroforezni pufer

5 × SDS elektroforezni pufer (pH = 8,3)

Preglednica 22: Sestava 5 × SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994)

Table 22: Composition of 5 × SDS electrophoresis buffer (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris - baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
Glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (w/v)
dodamo bdH ₂ O do 1000 ml		

1 × SDS elektroforezni pufer

1 × SDS elektroforezni pufer, lahko pripravimo tako, da k 1/5 volumna 5 × SDS elektroforeznega pufra dodamo 4/5 bdH₂O. Lahko pa ga pripravimo posebej – glej preglednico 23.

Preglednica 23: Sestava 1 × SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994)

Table 23: Composition of 1 × SDS electrophoresis buffer (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris- baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
Glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo bdH ₂ O do 1000 ml		

3.2.5.6.5 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu - barvanje s srebrom

95 % (v/v) raztopina etanola

100 % (v/v) etanol (Merck) 190 ml

bdH₂O 10 ml10 % (w/v) raztopina Na₂S₂O₃Na₂S₂O₃ × 5 H₂O (Merck) 15,7 gdodamo bdH₂O do 100 ml

Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi v temi

20 % (w/v) raztopina AgNO₃AgNO₃ (Sigma)

20 g

dodamo bdH₂O do 100 ml

Hranimo: 6 mesecev pri sobni temperaturi v temi

100 % ledocetna kislina (Merck)

Na-acetat (Fluka)

Na₂CO₃ (Merck)

37 % formaldehid (Merck)

EDTA-Na₂ × 2H₂O (Kemika)**3.2.6 Oprema in pribor**

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo in pribor. Poleg tega pa še:

Naprave:

avtoklav

(Sutjeska, Beograd, SČG)

pH meter Sevenmulti

(Mettler, Toledo)

hladilnik

(LTH, Škofja Loka, Slovenija)

zamrzovalnik (-20 °C)

(LTH, Škofja Loka, Slovenija)

zamrzovalnik (-80 °C)

(HETO Ultra Freeze)

ultrazvočna kopel

(Bandelin, Berlin, Nemčija)

tehnica Exacta 1200EB

(Sartorius, Nemčija)

vrtinčnik

(Tehtnica, Železniki, Slovenija)

inkubacijska komora Ceromat HK

(B.Braun, Melsungen, Nemčija)

brezprašna komora PIO SMBC 122AV

(Iskra PIO, Slovenija)

mikroskop (ATC 2000)

(Leica, Nemčija)

mikromanipulator M152

(Narishige, Japonska)

spektrofotometer MA 9510

(Iskra PIO, Slovenija)

spektrofotometer Pharmacia Biotech Ultraspec 2000

optični čitalec HP SCAN JET 5P

(HP, ZDA)

fotoaparater Minolta X-300s

(Konica Minolta, Tokyo, Japonska)

digitalni fotoaparater PowerShot S400

(Canon, Tokyo, Japonska)

avtomatske pipete

(Eppendorf, Hamburg Nemčija)

(Gilson, Francija)

centrifuga

(Eppendorf, Hamburg Nemčija)

SDS-PAGE

Vertikalni diskontinuuirni elektroforetski sistem SE 600 (Hoeffer Scientific Instruments)

- 1 mm glavniki
- 1 mm distančniki
- steklene plošče
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama
- hladilni sistem v obliki pretočnih cevi

Steklovina (različni proizvajalci):

čaše

merilni valji

epruvete

erlenmajerice

steklene kroglice

števne ploščice Burkera-Turka

(Brand)

objektna in krovnna stekelca

Plastični material:

merilni valji

plastične cepilne zanke

plastične kivete Sarstedt

plastične Petri plošče

polipropilenske epruvete po Eppendorfu

(Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

polipropilenske centrifugirke z navojnim zamaškom

(Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

nastavki za avtomatske pipete

(Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

plastične banjice

Ostalo:

pinceta

škarje

parafilm

vata

aluminijasta folija

ravnilo

milimetrski papir

4 REZULTATI

Z raziskovalnim delom smo skušali ugotoviti, katere kvasovke imajo biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* Pers. Zanimalo nas je, kako je ta lastnost povezana s posameznim rodом, vrsto ali sevom kvasovk. V ta namen smo v skladu z delovno hipotezo 1 izbrali iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) 607 sevov različnih vrst in rodov kvasovk (preglednica 24 in priloga A). Večino izbranih kvasovk povezuje lastnost, da so bile izolirane iz ekosistema trta-grozdje-moš-vino-klet, pretežno iz slovenskega geografskega območja, kar pomeni, da imajo morda že naravno izražene obrambne mehanizme proti fitopatogeni glivi. V tem delu testa smo uporabili fitopatogeno glivo *B. cinerea*, prav tako izolirano s površine grozdja v Sloveniji in shranjeno v ZIM.

V skladu s hipotezo 2 smo skušali ugotoviti, ali prihaja do interakcij med kvasovkami ter nitasto glivo na daljavo in med celicami kvasovk v neposrednem stiku na trdnem gojišču. V ta namen smo raziskovali štiri kombinacije:

kvasovka in nitasta gliva na daljavo – test biokontrolne aktivnosti (BKA);

kvasovka in nitasta gliva v direktnem stiku – primarno smo en organizem nanесли na gojišče, sekundarno pa smo po določenem času nanесли drugega;

kvasovka in kvasovka na daljavo – na določene razdalje (po pripravljenem vzorcu) smo nanесли kvasovke istih ali različnih vrst;

kvasovka in kvasovka v direktnem stiku – na testno gojišče smo primarno nanесли eno vrsto kvasovk, po določenem času pa smo sekundarno nanесли drugo vrsto kvasovk.

Preverili smo tudi kompetitivno prednost kvasovk ali nitaste glive tako, da smo kvasovko ali nitasto glivo nacepili na trdno gojišče z določeno časovno prednostjo, pa tudi s prednostjo v smislu direktnega stika s podlago.

Ugotovljeno biokontrolno aktivnost izbranih sevov smo nato preverili še v *semi in vivo* pogojih, to je na groznjih jagodah dveh sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.) v laboratorijskih pogojih. Izbrali smo, na okužbo z nitasto glivo *B. cinerea*, bolj odporno sorto chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) in manj odporno sorto rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula).

Za potrditev hipoteze 3 smo kvasovke iste ali različnih vrst nanесли na trdno gojišče in po določenem času ugotavljali tvorbo signalnih molekul. Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določali z metodo po Bradfordu. Proteine pa smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE).

4.1 BIOKONTROLNA AKTIVNOST (BKA) *IN VITRO*

Testiranje biokontrolne aktivnosti *in vitro* smo izvedli na 607 avtohtonih sevih (priloga A) različnih vrst in rodov kvasovk, ter 1 sev kontrolne kvasovke vrste *Candida oleophila* Montrocher. Skupine posameznih vrst niso bile enako velike, saj je bilo število sevov znotraj posamezne vrste različno (preglednica 24). Biokontrolno aktivnost (BKA) posameznega seva smo izrazili kot odstotek inhibicije rasti nitaste glive (enačba 2) in nato izračunali povprečno vrednost biokontrolne aktivnosti za posamezno vrsto (slika 8).

Preglednica 24: Skupno število sevov različnih vrst kvasovk vključenih v raziskavo

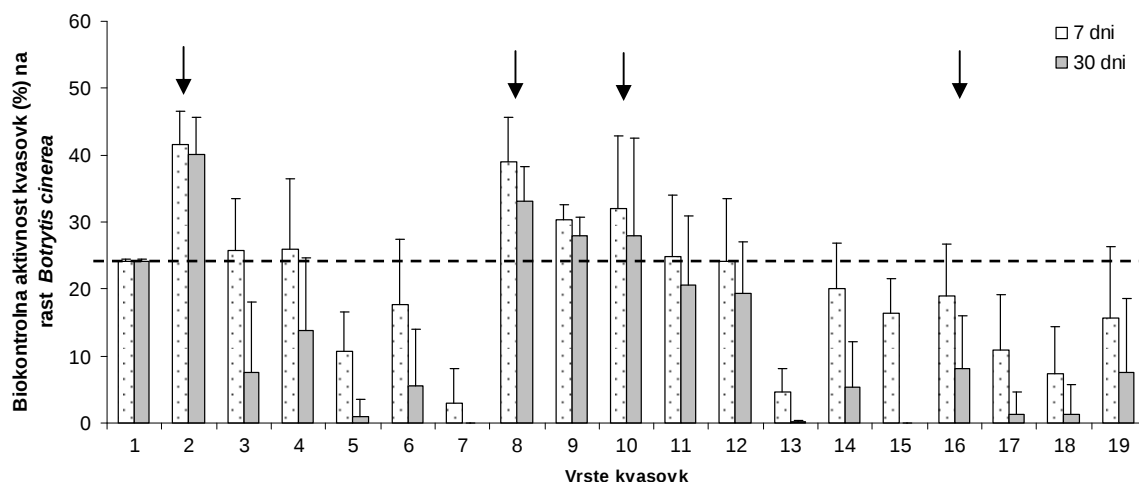
Table 24: Number of total yeast strains tested in our research

Vrste kvasovk	Št. sevov
<i>Candida oleophila</i> Montrocher	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	24
<i>Bulleromyces albus</i>	10
<i>Candida</i> spp.	41
<i>Cryptococcus</i> spp.	97
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	37
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	75
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	46
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	4
<i>Pichia</i> spp.	29
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	10
<i>Rhodotorula glutinis</i>	62
<i>Saccharomyces bayanus</i>	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	29
<i>Sporobolomyces roseus</i>	74
Druge vrste kvasovk / Other yeast spp.	9
Skupaj	608

Kvasovka *Candida oleophila* je dosegla 24,1 % inhibicijo rasti nitaste glive. Biokontrolna aktivnost te kvasovke je zelo stabilna, njen odstotek se ob inkubaciji 30 dni ni spremenil (slika 8).

Povprečna vrednost biokontrolne aktivnosti vrste *Aureobasidium pullulans* je bila po sedmih dneh višja od BKA kvasovke *C. oleophila* in je dosegla 41,5 %, po 30 dneh pa se je odstotek BKA znižal na 40,1 % (slika 8).

Tudi vrsta *Metschnikowia pulcherrima* je po sedmih dneh dosegla višji odstotek biokontrolne aktivnosti od vrste *C. oleophila* (39,1 %), po 30 dneh inkubacije pa se je odstotek BKA znižal na 33,1 %. Njej sorodna vrsta *M. reukaufii* je dosegla 30,5 % po sedmih dneh, 28,0 % biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive pa po 30 dneh (slika 8).



Slika 8: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botrytis cinerea*

Figure 8: Biocontrol activity (%) of individual yeast species on *Botrytis cinerea* growth

Legenda/Legend: 1 – *Candida oleophila*; 2 – *Aureobasidium pullulans*; 3 – *Bulleromyces albus*; 4 – *Candida* spp.; 5 – *Cryptococcus* spp.; 6 – *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*; 7 – *Hanseniaspora uvarum*; 8 – *Metschnikowia pulcherrima*; 9 – *Metschnikowia reukaufii*; 10 – *Pichia guilliermondii*; 11 – *Pichia kluyveri*; 12 – *Pichia membranifaciens*; 13 – *Rhodotorula aurantiaca*; 14 – *Rhodotorula glutinis*; 15 – *Saccharomyces bayanus*; 16 – *Saccharomyces cerevisiae*; 17 – *Sporidiobolus pararoseus*; 18 – *Sporobolomyces roseus*; 19 – Druge vrste kvasovk (Other yeast species)

Vrsta *Pichia guilliermondii* je po sedmih dneh dosegla 32,1 %, po 30 dneh pa 27,9 % biokontrolno aktivnost rasti nitaste glive.

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je dosegla 18,9 % biokontrolno aktivnost po sedmih dneh, odstotek BKA pa se je do 30. dne znižala na 8,1 %.

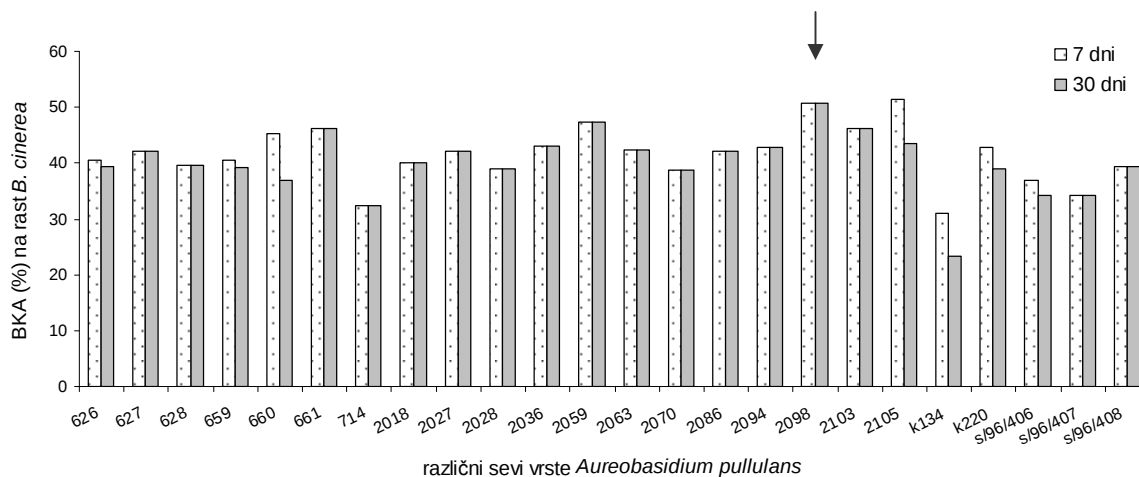
Tudi nekatere druge vrste so presegle mejo 24,0 % biokontrolne aktivnosti, ki jo je izkazala kvasovka *C. oleophila*, npr.: *Candida* spp. 24,7 % po sedmih dneh in 9,4 % po 30 dneh; ter *Pichia membranifaciens*, ki je dosegla 26,4 % po sedmih dneh in 11,6 % po 30 dneh.

Vrste *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces bayanus*, *Sporidiobolus pararoseus*; in *Sporobolomyces roseus* so imele biokontrolno aktivnost zelo nizko že po sedmih dneh, po 30 dneh pa praktično niso zavirale rasti nitaste glive (slika 8). Rezultati biokontrolne aktivnosti izraženi kot odstotek inhibicije rasti nitaste glive drugih testiranih vrst kvasovk so prikazani v prilogi A.

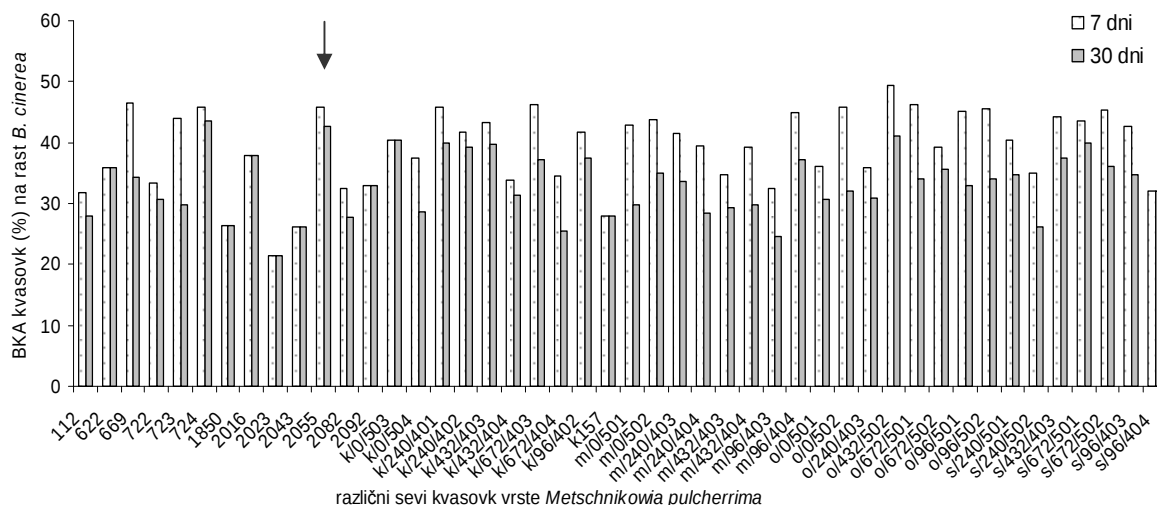
Rezultati kažejo, da so imele tri vrste kvasovk (*A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii*) višjo biokontrolno aktivnost od kvasovke *Candida oleophila*. Višjo biokontrolno aktivnost je imela tudi vrsta *M. reukaufii*, a je kljub dobri povprečni vrednosti nismo uvrstili med izbrane vrste, saj so jo predstavljali le štirje sevi (priloga A) (slika 8).

Zato smo od izbranih vrst iskali tiste seve, ki imajo znotraj vrste najvišjo biokontrolno aktivnost. Biokontrolno aktivnost posameznih sevov pa smo preverili tudi pri vrsti *Saccharomyces cerevisiae*.

Izmed skupno 24 sevov vrste *Aureobasidium pullulans* jih je 16 doseglo visok odstotek inhibicije (nad 40 %) rasti nitaste glive *B. cinerea*. Opazna lastnost sevov te vrste je tudi, da so kvasovke začetno moč inhibicije rasti glive večinoma obdržale tudi po 30 dneh skupne inkubacije. Najboljše rezultate pa je pokazal izbrani sev s številko ZIM 2098, saj je dosegel 50,7 % inhibicije po sedmih dneh, enako močno pa je zaviral rast nitaste glive tudi še po 30 dneh skupne inkubacije (slika 9).



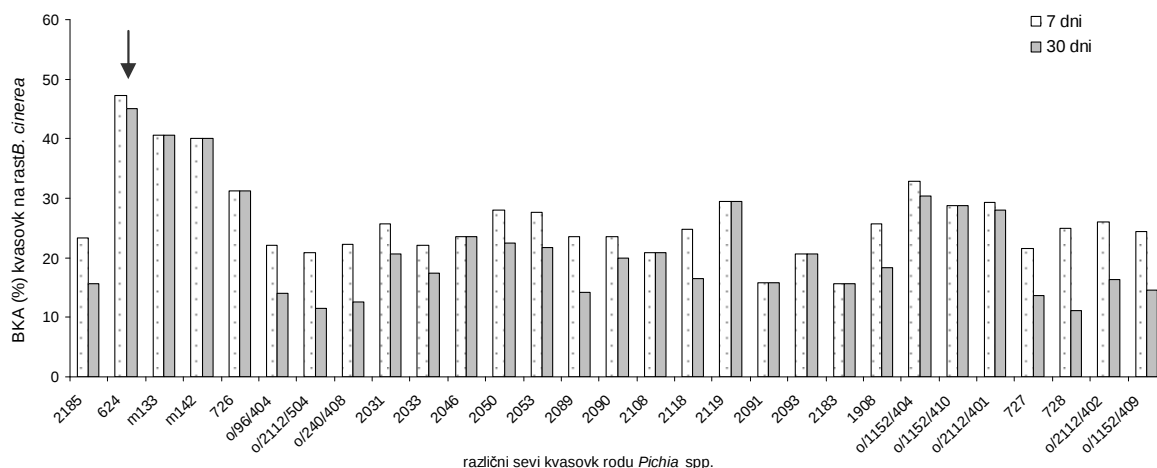
Slika 9: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste *Aureobasidium pullulans* na rast nitaste glive
Figure 9: Biocontrol activity (%) of *Aureobasidium pullulans* yeast strains on filamentous fungi growth



Slika 10: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste *Metschnikowia pulcherrima* na rast nitaste glive

Figure 10: Biocontrol activity (%) of *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains on filamentous fungi growth

Pri vrsti *Metschnikowia pulcherrima* smo testirali 46 različnih sevov. Izmed teh je polovica (24) sevov po sedmih dneh inkubacije pokazala visok odstotek inhibicije rasti (nad 40 %). Močno inhibicijo rasti (nad 40 %) nitaste glive po 30 dneh skupne inkubacije, pa je imelo le nekaj sevov. Kot najboljšega smo izbrali sev s številko ZIM 2055 (slika 10).

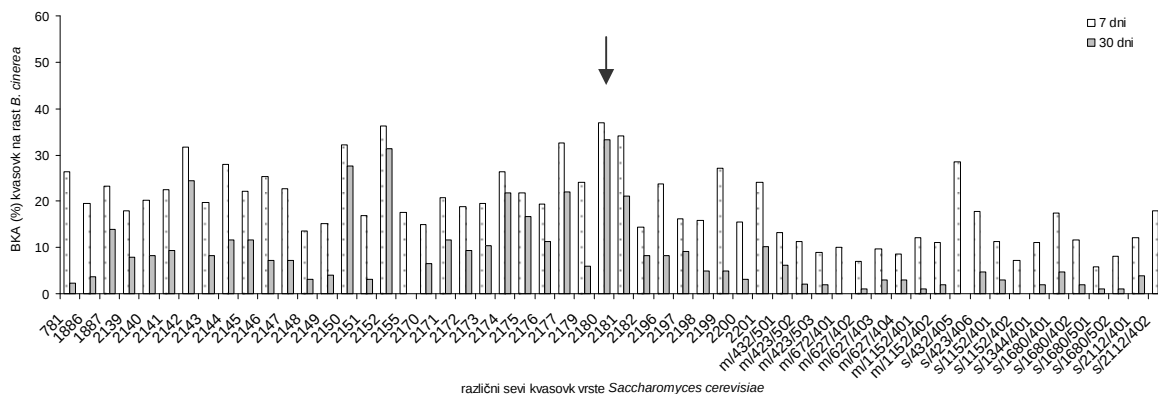


Slika 11: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov rodu *Pichia* na rast nitaste glive

Figure 11: Biocontrol activity (%) of *Pichia* spp. yeast strains on filamentous fungi growth

Le štirje sevi rodu *Pichia* so pokazali več kot 30,0 % inhibicijo rasti nitaste glive in vsi so pripadali vrsti *Pichia guilliermondii* (priloga A). Kot najboljši pa je bil izbran sev z ZIM

številko 624. Po sedmih dneh inkubacije je zaviral rast nitaste glive 47,2 %, po 30 dneh inkubacije pa 45,0 % (slika 11).



Slika 12: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih sevov vrste *Saccharomyces cerevisiae* na rast nitaste glive
Figure 12: Biocontrol activity (%) of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on filamentous fungi growth

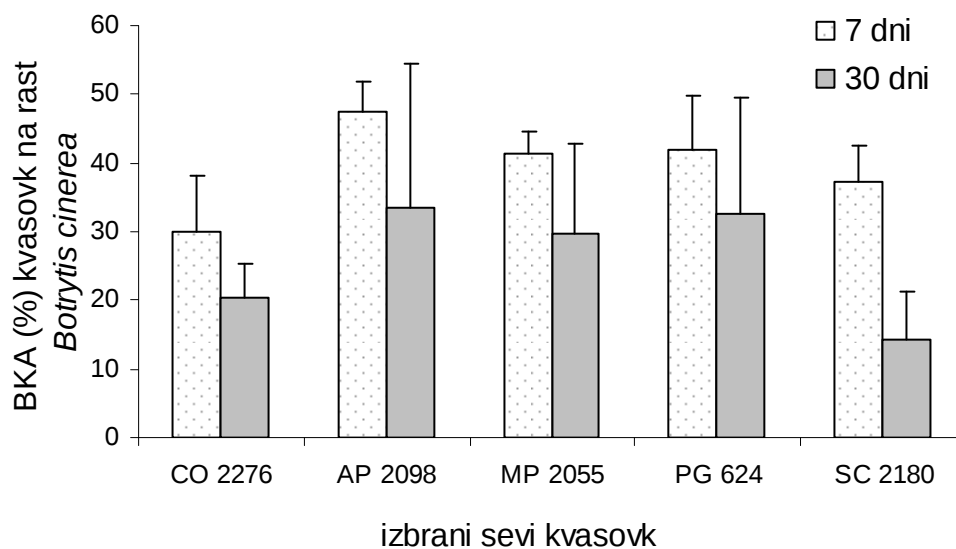
Vrsto *Saccharomyces cerevisiae* smo analizirali prav zaradi njene vloge pri alkoholni fermentaciji, čeprav njena povprečna biokontrolna aktivnost ni bila nad mejno vrednostjo kvasovke *C. oleophila* (slika 12). Opazili smo, da je bila pri vrsti *Saccharomyces cerevisiae* začetna (po sedmih dneh inkubacije) biokontrolna aktivnost pri šestih sevih višja od 30,0 %. Po 30 dneh inkubacije pa je nad to vrednostjo ostala le pri dveh sevih – ZIM 2152 in ZIM 2180. Izbrali smo sev z ZIM številko 2180, saj je imel višje vrednosti inhibicije rasti nitaste glive tako sedmi (36,9 %), kot 30. dan (33,3 %).

Za nadaljnjo analizo smo tako izmed testiranih vrst kvasovk izbrali posamezne seve (preglednica 25). Poleg kontrolne kvasovke *Candida oleophila* Montrocher smo izbrali avtohtone seve kvasovk, ki so bili izolirani iz slovenskega vinorodnega področja. Njihove vrednosti biokontrolne aktivnosti, kot tudi vrednosti kontrolne kvasovke *Candida oleophila* so izražene kot odstotek inhibicije rasti nitaste glive *B. cinerea* in predstavljene na sliki 13.

Preglednica 25: Izbrani sevi kvasovk z višjo biokontrolno aktivnostjo znotraj vrste

Table 25: Selected yeast strains with higher biocontrol activity

kvasovke	oznaka	izvor
<i>Aureobasidium pullulans</i>	AP 2098	Površina grozdne jagode sorte Žametna črnina, Trška gora, 2000
<i>Pichia guilliermondii</i>	PG 624	Površina grozdne jagode sorte Rebula, Goriška Brda, 2004
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MP 2055	Površina grozdne jagode sorte Modra frankinja, Hom, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC 2180	Mošt sorte Kraljevina - spontana fermentacija, 2000

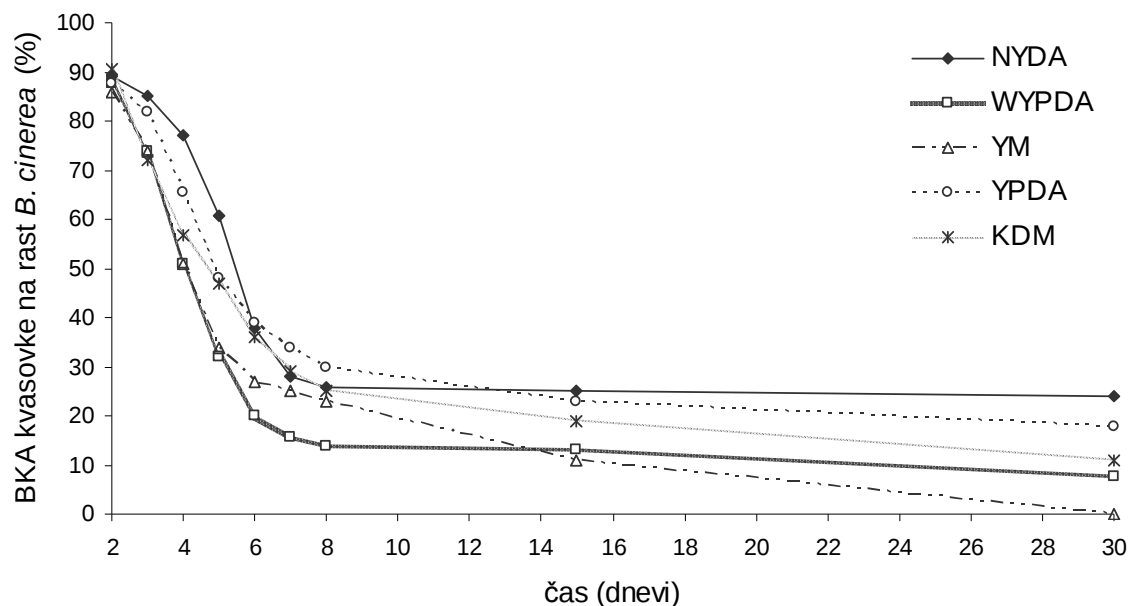
Slika 13: Izbrani sevi kvasovk z višjo biokontrolno aktivnostjo – BKA (%) od kontrolne kvasovke *Candida oleophila* Montrocher.Figure 13: Yeast strains selected from yeast species with higher biocontrol activity – BCA (%) than control yeast *Candida oleophila* Montrocher.

4.2 VPLIV GOJIŠČA NA BIOKONTROLNO AKTIVNOST

Vpliv petih različnih sintetičnih trdnih gojišč (sestava posameznega gojišča je opisana v poglavjih 3.2.2 in 3.2.3) na biokontrolno aktivnost (BKA) kvasovk smo ugotavljali s testom biokontrolne aktivnosti (poglavje 3.1.2). V test so bili vključeni naključno izbrani trije sevi različnih vrst kvasovk (seznam sevov glej prilogo A). Dobljeni rezultati tako odražajo povprečno vrednost treh izbranih sevov, razen pri kvasovki *Candida oleophila* Montrocher, kjer smo imeli samo en sev za testiranje.

4.2.1 Vpliv gojišča na BKA kvasovke *Candida oleophila* Montrocher

Biokontrolna aktivnost kvasovke *Candida oleophila* Montrocher na različnih gojiščih je prikazana na sliki 14. Razlike med posameznimi gojišči se pokažejo že tretji dan, bolj očitne pa postanejo četrty oz. peti dan. Razpon biokontrolne aktivnosti kvasovke *C. oleophila* Montrocher na različnih gojiščih je bil peti dan od 61 do 32 %. Biokontrolna aktivnost kvasovke je bila po sedmih dneh na gojišču NYDA 28 % in se do 30. dne skoraj ni zmanjšala (24 %). Na gojiščih YPDA in KDM je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 34 % in 29 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 18 % in 11 %. Na gojiščih WYPDA in YM je sedmi dan kvasovka kazala 16 % in 25 % biokontrolno aktivnost, ki se je do 30. dne znižala na 8 % in 0 %.

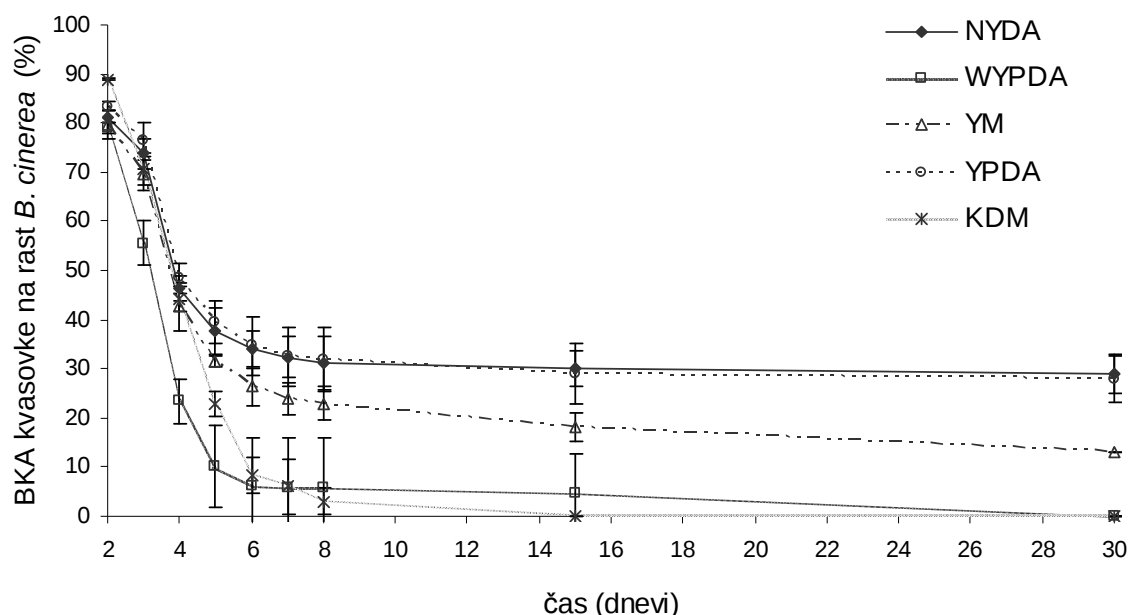


Slika 14: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Candida oleophila* Montrocher na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih sintetičnih gojiščih

Figure 14: Biocontrol activity (%) of yeast species *Candida oleophila* Montrocher on *Botrytis cinerea* growth on different solid synthetic medium

4.2.2 Vpliv gojišča na BKA kvasovke *Aureobasidium pullulans*

Vpliv različnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovke *Aureobasidium pullulans* kaže, da kvasovka na gojiščih WYDPA in KDM hitro izgublja svojo biokontrolno aktivnost. Ta je bila na obeh gojiščih že peti dan 10 % oz 23 %, do sedmega dne je padla na 6 %, do 30. dne pa na 0 %. Vrednosti biokontrolne aktivnosti te kvasovke na gojiščih NYDA in YPDA so bile četrty dan 46 % in 49 %, sedmi dan so vrednosti biokontrolne aktivnosti na obeh gojiščih enake 32 %, do 30. dne pa vrednosti malo padejo – na 29 % in 28 %. Tudi na gojišču YM smo zaznali podoben potek krivulje, le da so vrednosti vseskozi za približno 8 % nižje. Četrty dan je imela kvasovka 43 % biokontrolno aktivnost, sedmi dan 24 %, 30. dan pa 13 % (slika 15).

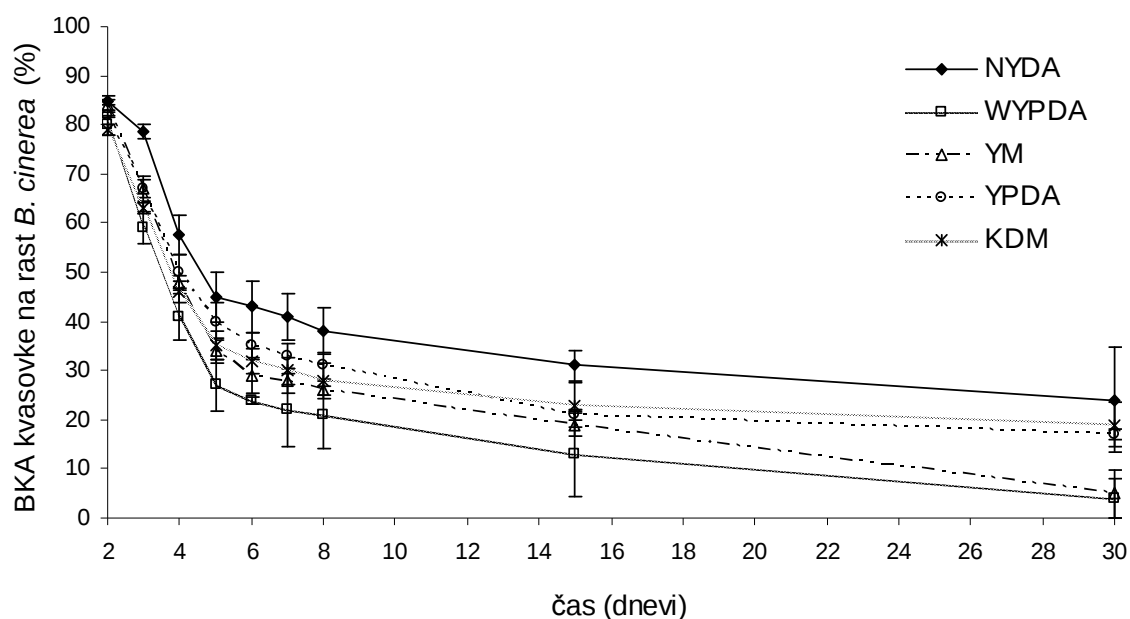


Slika 15: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste *Aureobasidium pullulans* na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih sintetičnih gojiščih

Figure 15: Biocontrol activity (%) of yeast species *Aureobasidium pullulans* on *Botrytis cinerea* growth on different solid synthetic medium

4.2.3 Vpliv gojišč na BKA kvasovke *Metschnikowia pulcherrima*

Pri biokontrolni aktivnosti kvasovke *Metschnikowia pulcherrima* na različnih gojiščih vidimo, da krivulje biokontrolne aktivnosti na različnih gojiščih potekajo podobno. Vrednosti so se peti dan gibale od 27 % na gojišču WYPDA, do 34 % na YM mediju, 35 % na KDM, 40 % na gojišču YPDA ter do 45 % pri NYDA. Vrednosti biokontrolne vrednosti so s časom padale, sedmi dan je imela najvišjo biokontrolno aktivnost kvasovka *M. pulcherrima* na gojišču NYDA (41 %). Vrednosti na ostalih gojiščih YPDA, KDM, YM in WYPDA pa so bile za vsako gojišče posebej 33 %, 30 %, 28 % in 22 %. Na koncu skupne inkubacije – 30. dan, pa je imela kvasovka *M. pulcherrima* na gojišču NYDA najvišjo vrednost biokontrolne aktivnosti 24 %, na gojiščih KDM in YPDA sta bili vrednosti 19 % in 17 %, na gojiščih YM in WYPDA pa je bila biokontrolna aktivnost zelo nizka 5 % in 4 % (slika 16).

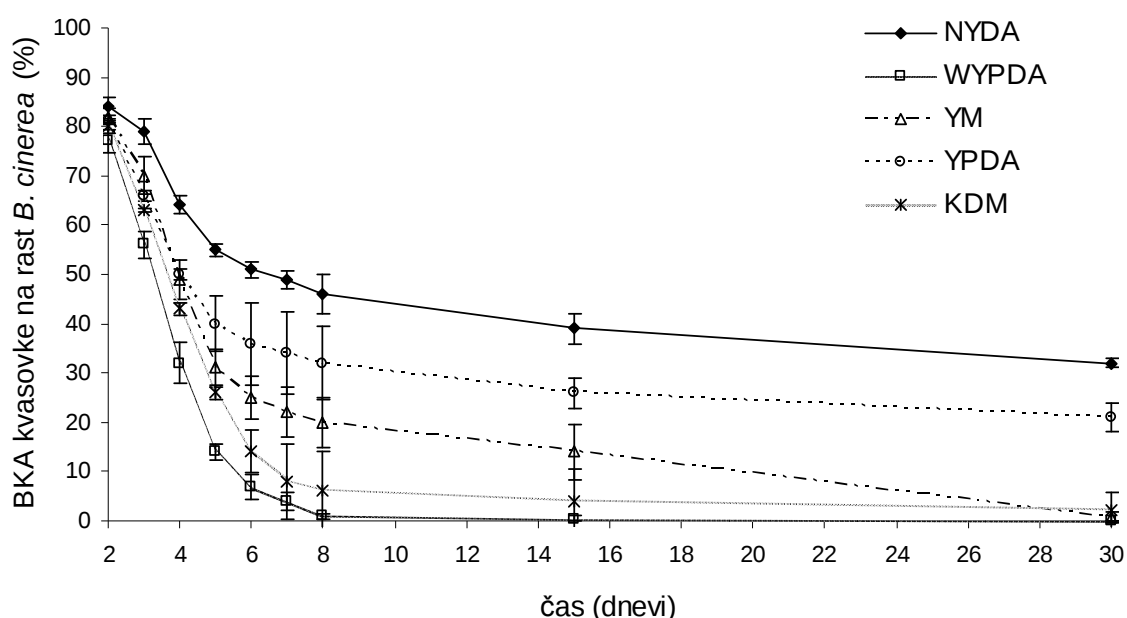


Slika 16: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste *Metschnikowia pulcherrima* na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih sintetičnih gojiščih

Figure 16: Biocontrol activity (%) of yeast species *Metschnikowia pulcherrima* on *Botrytis cinerea* growth on different solid synthetic medium

4.2.4 Vpliv gojišča na BKA kvasovke *Pichia guilliermondii*

Kvasovka *P. guilliermondii* ima na gojišču NYDA visoko biokontrolno aktivnost, skozi ves čas skupne inkubacije. Četrty dan je njena vrednost 64 %, medtem ko je na drugih gojiščih nižja: 50 % in 49 % na YPDA in YM, 43 % na KDM ter 32 % na WYPDA. Sedmi dan so razlike še očitnejše; medtem ko kvasovka na gojišču NYDA še vedno dobro zavira rast nitaste glive (49 %), pa se vrednosti na drugih gojiščih znižajo na 34 % na YPDA, 22 % na gojišču YM, ter na pod 10 % na gojiščih WYPDA in KDM. Vrednost biokontrolne aktivnosti se 30. dan ustali pri 32 % na gojišču NYDA, ter pri 21 % na gojišču YPDA. Na ostalih treh gojiščih ni več zaznati biokontrolne aktivnosti kvasovke, na gojišču WYPDA lahko to opazimo že osmi dan (slika 17).

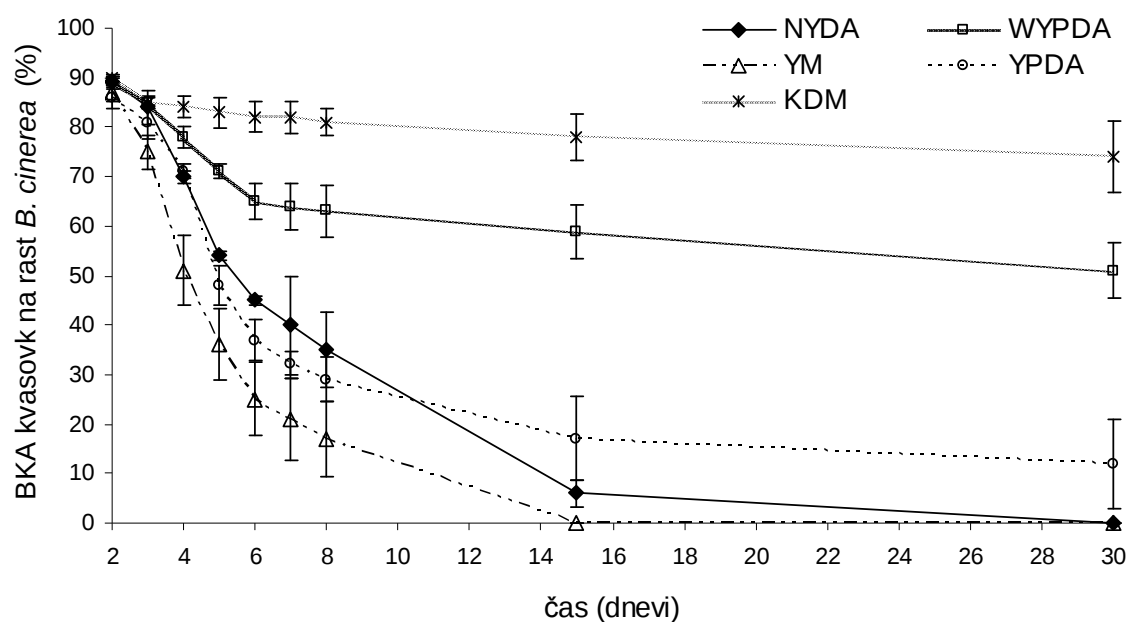


Slika 17: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste *Pichia guilliermondii* na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih sintetičnih gojiščih

Figure 17: Biocontrol activity (%) of yeast species *Pichia guilliermondii* on *Botrytis cinerea* growth on different solid synthetic medium

4.2.5 Vpliv gojišča na BKA kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* opazimo, da biokontrolna aktivnost ni najboljša na gojišču NYDA, kot je to pri drugih vrstah kvasovk. Kvasovka ima visoke vrednosti biokontrolne aktivnosti in jih obdrži do konca inkubacije na gojišču KDM in WYPDA, ki imata oba povečano vsebnost glukoze. Peti dan kvasovka zavira rast nitaste glive na KDM 83 %, na WYPDA pa 71 %. Njena vrednost do sedmega dne pade na 82 % ter 64 %, na koncu inkubacije pa sta vrednosti 74 % na KDM ter 51 % na WYPDA. Na gojišču NYDA, kjer so druge kvasovke dosegale dobro biokontrolno aktivnost pa *S. cerevisiae* peti dan 54 % zavira rast glive, sedmi dan pade vrednost na 40 %, na koncu inkubacije pa biokontrolne aktivnosti ni. Na gojiščih YM in YPDA je biokontrolna aktivnost peti dan 36 % in 48 %, sedmi dan pa 21 % in 32 odstotna. Po 30 dneh skupne inkubacije kvasovka zavira rast nitaste glive na gojišču YPDA 12 %, na gojišču YM pa biokontrolne aktivnosti ni več že po 15 dneh skupne inkubacije (slika 18).

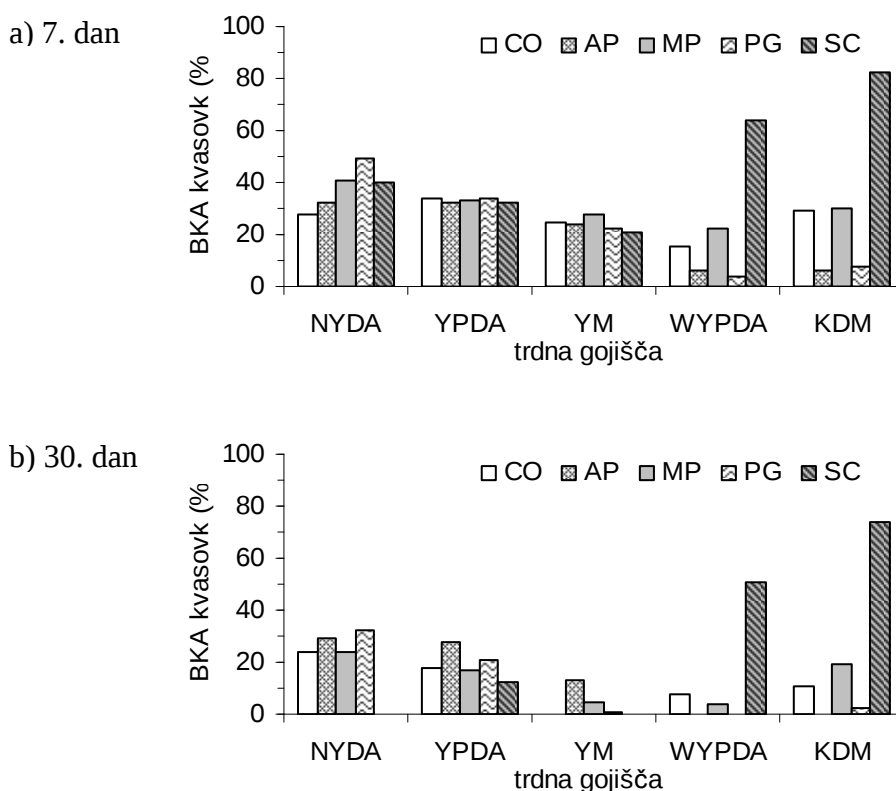


Slika 18: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih sintetičnih gojiščih

Figure 18: Biocontrol activity (%) of yeast species *Saccharomyces cerevisiae* on *Botrytis cinerea* growth on different solid synthetic medium

4.2.6 Primerjava biokontrolne aktivnosti kvasovk na različnih gojiščih

Če povzamemo rezultat lahko ugotovimo, da so izbrane kvasovke najbolj stabilno biokontrolno aktivnost izražale na gojišču NYDA. Podobne rezultate so dosegale na gojišču YPDA, vendar so se vrednosti 30. dan skupne inkubacije na gojišču NYDA obdržale na vrednostih od 24 do 32 % (razen *S. cerevisiae* na 0 %), na gojišču YPDA pa so bile vrednosti 30. dan od 12 do 28 % (slika 19).



Slika 19: Biokontrolna aktivnost (%) različnih vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na različnih trdnih gojiščih; (a) 7. dan in (b) 30. dan inkubacije

Figure 19: Biocontrol activity (%) of different yeast species on *Botrytis cinerea* growth on different solid medium after (a) 7 days and (b) 30 days of incubation

Gojišče YM je na biokontrolno aktivnost vseh izbranih kvasovk delovalo podobno, prvih sedem dni smo opazili hiter padec vrednosti na 33 ± 3 %, nato pa so se vrednost posameznih vrst kvasovk zniževale in 30. dan padle pod 15 % (slika 19).

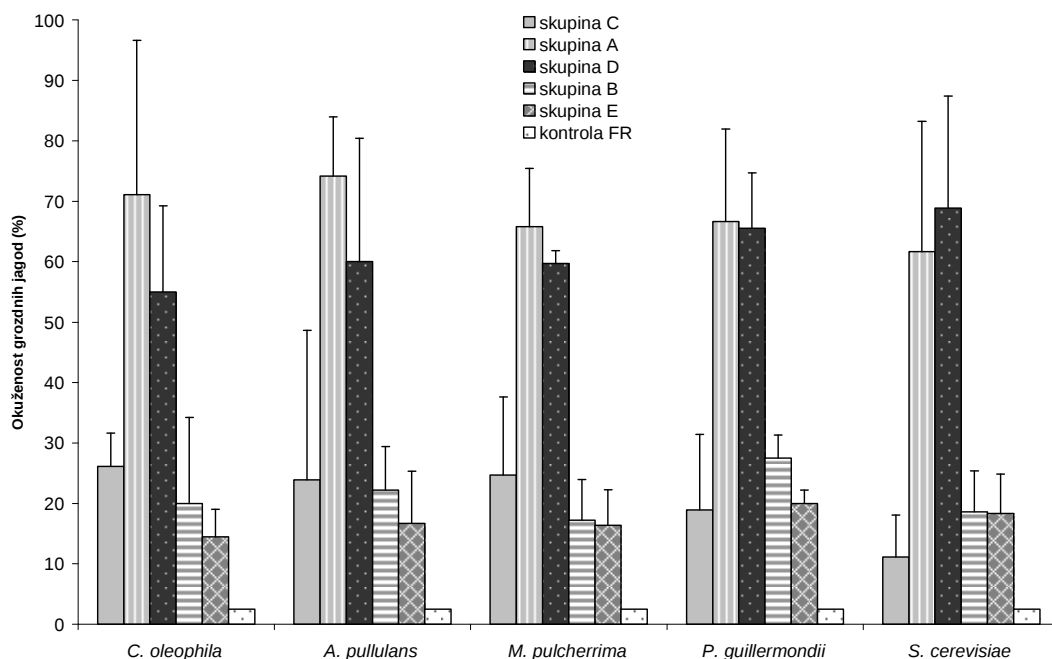
Gojišči KDM in WYPDA pa sta pokazali, da ima *S. cerevisiae* na takem gojišču izrazito prednost, saj je po 30 dneh skupne inkubacije z glivo zavirala njeno rast 51 % na WYPDA mediju in 74 % na KDM (slika 19).

4.3 VPLIV KVASOVK NA RAST NITASTE GLIVE *SEMI IN VIVO*

Vpliv izbranih sevov kvasovk na rast nitaste glive smo testirali *semi in vivo*, na grozdnih jagodah v laboratorijskih pogojih, kot je opisano v poglavju 3.1.3. Po inkubaciji smo ocenili gnilobo posamezne grozdne jagode (glej preglednico 3) in izračunali odstotek okuženosti po enačbi 3. Rezultati so predstavljeni ločeno glede na način nanašanja fitopatogene glive ter kvasovke (z injekcijsko iglo ali s pršilko) za sorto grozdja rebula (sliki 20 in 21) in za sorto grozdja chardonnay (sliki 22 in 23).

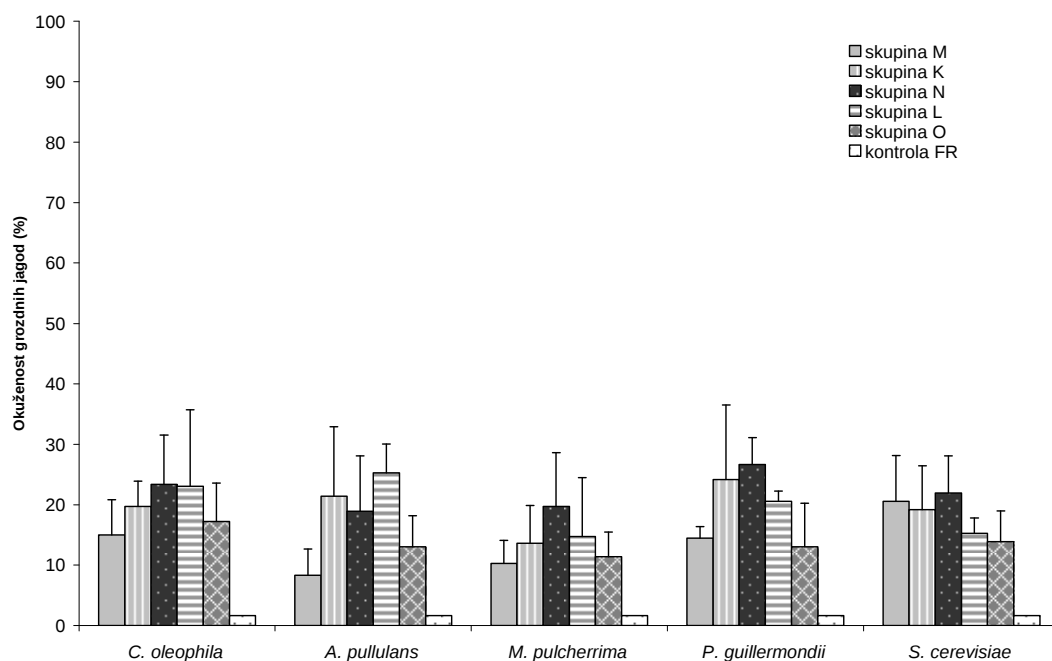
4.3.1 Sorta rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula)

Okuženost skupin grozdnih jagod sorte rebula, kjer smo različne vrste kvasovk in nitasto glivo nanašali z injekcijsko iglo, vidimo na sliki 20. Opazimo lahko da, vsaka posamezna vrsta kvasovk (skupina C) vpliva na okuženost grozdnih jagod. Okuženost skupine C je pri različnih vrstah kvasovk različen in se giblje od 11,1 % pri *S. cerevisiae*, 18,9 % pri *P. guilliermondii*, 23,9 % pri *A. pullulans*, 24,7 % pri *M. pulcherrima* do 26,1 % pri *C. oleophila* Montrocher. Pri grozdnih jagodah skupin A, tretiranih sočasno s kvasovkami in nitasto glivo ugotovimo, da vpliv ni zaviralen, kot smo pričakovali. Oba mikroorganizma skupaj izkoriščata hranila, ki so jima na voljo in povzročata višjo okuženost grozdnih jagod, kot če bi bila na jagodah prisotna posamezno. Okuženost grozdnih jagod skupine A, kjer smo nanašali kvasovko *A. pullulans* je bila 74,2 %. Grozdne jagode skupine A v sočasnem stiku z nitasto glivo in kvasovko *C. oleophila* Montrocher so bile okužene 71,1 %, pri vrsti *P. guilliermondii* in glivi je bila okužba grozdnih jagod skupine A 66,7 %, vrsta *M. pulcherrima* pa je skupaj z nitasto glivo povzročila 65,8 % okuženost grozdnih jagod skupine A. Vrsta *S. cerevisiae* skupaj z nitasto glivo povzroči 61,7 % stopnjo okuženosti grozdnih jagod skupine A. Grozdne jagode kontrolne skupine D (tretirane samo z nitasto glivo na začetku) so imele manjšo stopnjo okuženosti v vseh primerih, razen v kombinaciji s kvasovko *S. cerevisiae*. Pri skupini B smo kvasovko nanesli na začetku, fitopatogeno glivo pa 24 ur kasneje. Pričakovali smo, da bo populacija kvasovk izkoristila časovno prednost tako, da bo zavirala rast nitaste glive. Okuženost grozdnih jagod skupine B je manjša. Pri grozdnih jagodah skupine B tretiranih s kvasovko *P. guilliermondii* na začetku, po 24 urah pa še z *B. cinerea* je okuženost 27,5 %. Skupina B grozdnih jagod tretiranih s kvasovko *A. pullulans* 24 ur pred nanosom glive je 22,2 % okužena. Pri vrsti *C. oleophila* Montrocher je okuženost grozdnih jagod 20,0 %, pri vrsti *M. pulcherrima* 17,2 %, pri *S. cerevisiae* pa 18,6 %. Na grozdnih jagodah kontrolne skupine E, na katere smo nanesli samo nitasto glivo po 24 urah, se je okuženost grozdnih jagod gibala od 14,4 % do 20,0 %. Kontrolna skupina grozdnih jagod, ki smo ji sterilno fiziološko raztopino dodali z iglo, ni pokazala bistvene okuženosti (2,5 %) (slika 20).



Slika 20: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula) pri nanašanju *B. cinerea* in kvasovk z injekcijsko iglo

Figure 20: *Vitis vinifera* L. cv. Rebula grape berries infection (%) when applying *B. cinerea* and yeasts by medical needle



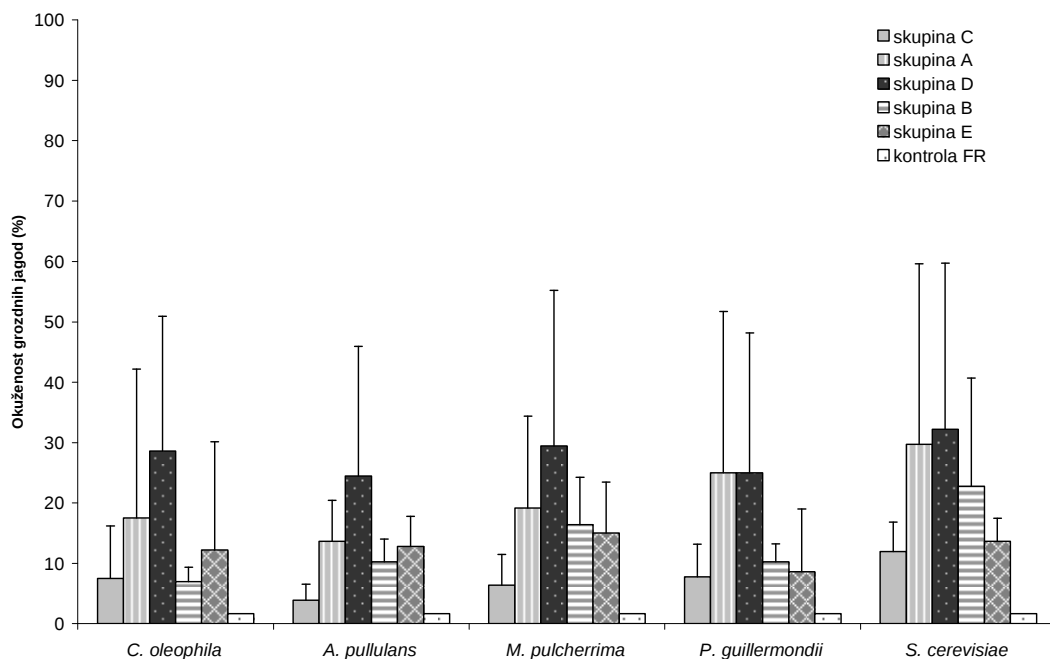
Slika 21: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula) ob nanašanju *B. cinerea* in kvasovk s pršilko

Figure 21: *Vitis vinifera* L. cv. Rebula grape berries infection (%) when applying *B. cinerea* and yeasts by spraying

Pri nanosu fitopatogene glive *B. cinerea* in kvasovke na grozdne jagode sorte Rebula s pršilko je stopnja okuženosti grozdnih jagod nižja – pod 25,0 %. Pri skupini K lahko opazimo biokontrolno aktivnost kvasovk, saj so grozdne jagode te skupine manj okužene od skupine N, kjer je s pršilko nanesena samo nitasta gliva. Kvasovke so zmanjšale okuženost grozdnih jagod; vrsta *C. oleophila* Montrocher za 3,6 %, vrsta *M. pulcherrima* za 6,1 %, vrsta *P. guillermundii* za 2,5 % in vrsta *S. cerevisiae* za 2,2 %. Le pri vrsti *A. pullulans* je bila okuženost skupine K večja (za 2,5 %) od okuženosti grozdnih jagod skupine N. Okuženost grozdnih jagod skupine L (glivo smo na grozdne jagode nanesli 24 ur po nanosu kvasovke) je bila pri kvasovki *C. oleophila* Montrocher 23,1 %, pri *A. pullulans* 25,3 %, pri vrsti *M. pulcherrima* 14,7 %, pri kvasovki *P. guillermundii* 20,6 % ter 15,3 % pri vrsti *S. cerevisiae*. V teh primerih je bila okuženost grozdnih jagod skupine L večja od okuženosti skupine O, ki smo jo, s 24 urnim zamikom pršili samo s suspenzijo spor nitaste glive. Okuženost kontrolne skupine, ki smo jo pršili s sterilno fiziološko raztopino, je bila 1,7 % (slika 21).

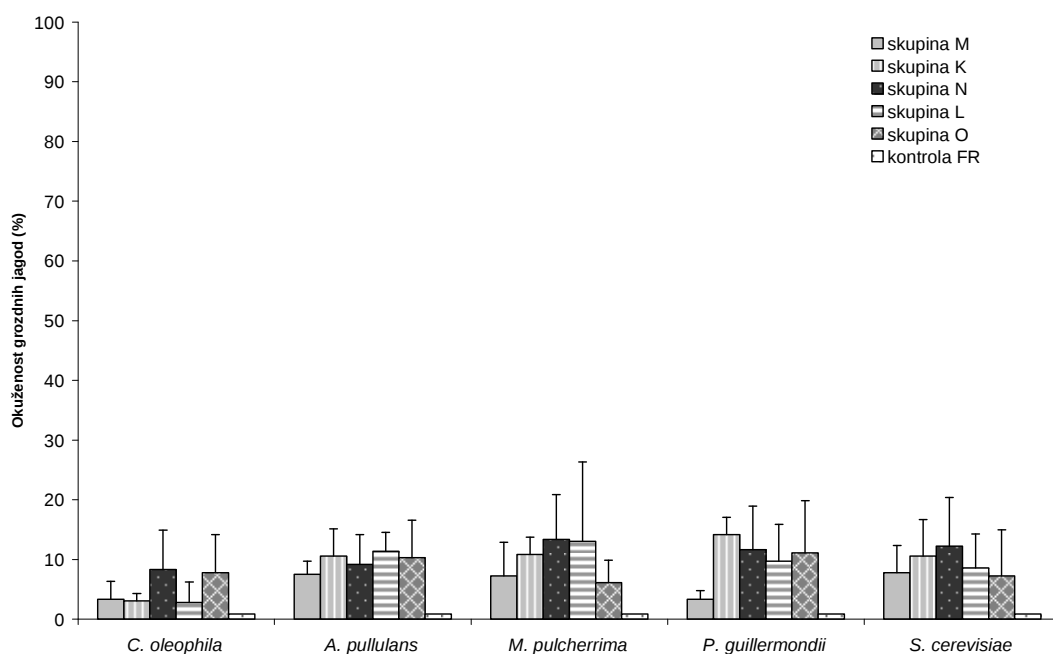
4.3.2 Sorta chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay)

Pri skupini A grozdnih jagodah sorte chardonnay (slika 22), lahko ugotovimo, da sta kvasovki *C. oleophila* Montrocher in *A. pullulans* pokazali biokontrolno aktivnost, ne glede na to ali je bila gliva nanesena sočasno z njima ali 24 ur kasneje. Stopnja okuženosti skupine A tretirane s kvasovko *C. oleophila* Montrocher (17,5 %) in skupine D (28,6 %) se je razlikovala za 11,1 %, okuženost skupine B pa se je razlikovala za 5,3 % od skupine E. Pri kvasovki *A. pullulans* so bile grozdne jagode skupine A okužene 13,6 %, okuženost grozdnih jagod skupine D pa je bila 24,4 %. Skupina B je bila okužena 10,3 %, skupina E, pa je bila okužena 12,8 %. Kvasovki *M. pulcherrima* in *S. cerevisiae* sta zavirali rast glive *B. cinerea* samo v primeru ko sta bili na grozdne jagode naneseni sočasno z glivo (skupina A). Pri nanosu glive na grozdne jagode 24 ur kasneje pa tega vpliva ni bilo (skupina B). Stopnja okužbe skupine A tretirane z *M. pulcherrima* je bila 19,2 %, skupine D pa 29,4 %. Pri skupini A tretirani s kvasovko *S. cerevisiae* so bile grozdne jagode okužene 29,7 %, pri skupini D pa 32,2 %. Skupini A in D tretirani s kvasovko *P. guillermundii* sta bili okuženi enako (25,0 %). Skupine B in E so bile pri kvasovki *M. pulcherrima* okužene 16,4 % in 15 %, pri kvasovki *P. guillermundii* 10,3 % in 8,6 %, pri kvasovki *S. cerevisiae* pa 22,8 % in 13,6 %. Kontrolna skupina grozdnih jagod, tretirana s sterilno fiziološko raztopino skoraj ni bila okužena (1,7 %) (slika 22).



Slika 22: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) pri nanašanju *B. cinerea* in kvasovk z injekcijsko iglo

Figure 22: *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay grape berries infection (%) when applying *B. cinerea* and yeasts by medical needle



Slika 23: Okuženost grozdnih jagod (%) sorte chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) ob nanašanju *B. cinerea* in kvasovk s pršilko

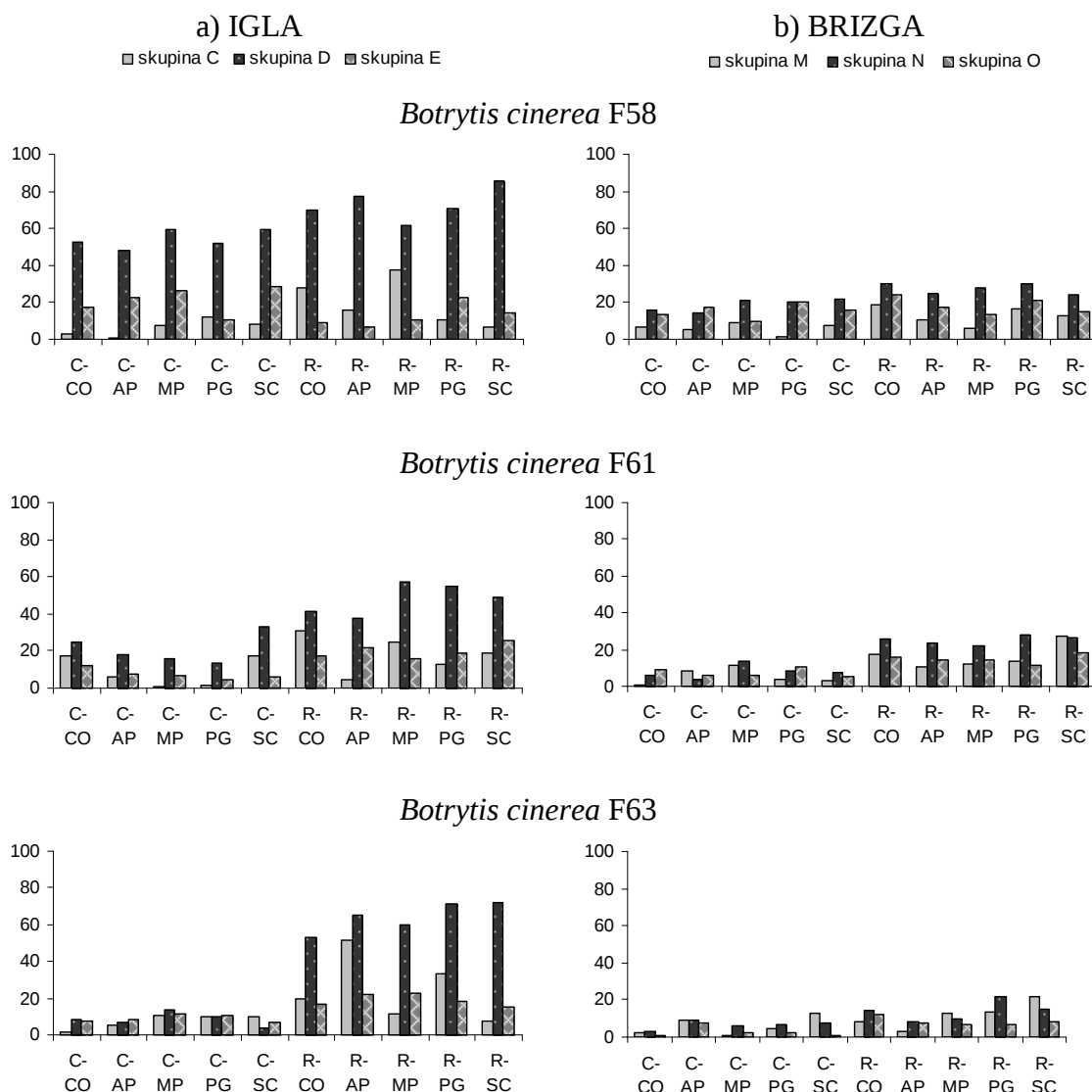
Figure 23: *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay grape berries infection (%) when applying *B. cinerea* and yeasts by spraying

Pri nanašanju glive *B. cinerea* in kvasovk s pršenjem na grozdne jagode sorte chardonnay so bile najmanj okužene skupine tretirane s kvasovko *C. oleophila* Montrocher. Okuženost grozdnih jagod tretiranih samo s to vrsto kvasovke je bila 3,3 % (skupina M). S kvasovko *C. oleophila* Montrocher tretirana skupina K (sočasni nanos *B. cinerea* in kvasovke) je bila okužena 3,1 %, skupina L (24 ur kasneje naneseemo glivo) pa je okužena 2,8 %. Kvasovki *M. pulcherrima* in *S. cerevisiae* zmanjšata okuženost grozdnih jagod skupine K za 2,5 % in 1,6 %, okuženost skupine K pri kvasovkah *A. pullulans* in *P. guilliermondii* pa je 10,6 % in 14,2 %. Grozdne jagode, ki so bile tretirane s kvasovko, po 24 urah pa še z glivo (skupina L), so bile v primeru kvasovk *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *S. cerevisiae* bolj okužene od grozdnih jagod skupine O. Kvasovka *P. guilliermondii* je zmanjšala okuženost grozdnih jagod skupine L v primerjavi s skupino O. Kontrolna skupina grozdnih jagod, ki smo jo tretirali s sterilno fiziološko raztopino, praktično ni okužena (0,7 %) (slika 23).

Razlike med okuženostjo grozdnih jagod sorte rebula ter sorte chardonnay lahko opazimo na slikah 20 – 23. Sorta rebula je za okužbe z nitasto glivo *B. cinerea* bolj dovzetna od sorte chardonnay. Glede na rezultate pa lahko ugotovimo, da so razlike v stopnji okuženosti grozdnih jagod povezane tudi z načinom nanosa kvasovk in nitaste glive *B. cinerea*. Skupine grozdnih jagod, ki smo jim z injekcijsko iglo poškodovali površino, so bile bolj okužene od skupin grozdnih jagod, ki so imele površino nepoškodovano in smo glivo *B. cinerea* in kvasovke nanašali s pršenjem.

4.3.3 Razlike med sevi nitaste glive

Razlike v okuženosti grozdnih jagod smo opazili tudi med posameznimi sevi nitaste glive *B. cinerea* (slika 24). Največjo okuženost grozdnih jagod povzroča sev z oznako ZIM F58, ki je bil izoliran s površine grozdne jagode v Sloveniji. Sev ZIM F58 nanosen na začetku eksperimenta v grozdne jagode sorte chardonnay z injekcijsko iglo povzroči okuženost grozdnih jagod od 48,3 % do 59,2 %. Pri sorti rebula pa je ta odstotek še višji in se giblje med 61,7 % in 85,8 %. Pri nanosu tega seva 24 ur kasneje pa so grozdne jagode sorte chardonnay okužene od 10,8 % do 28,3 %, grozdne jagode sorte rebula pa od 6,7 % do 22,5 %. Ob uporabi pršilke za nanos nitaste glive na začetku eksperimenta (ob času 0h) je stopnja okuženosti grozdnih jagod sorte chardonnay od 14,2 % do 21,7 %, okuženost grozdnih jagod sorte rebula pa se giblje med 24,2 % in 30,0 %. Pri nanosu glive po 24 urah je okuženost grozdnih jagod sorte chardonnay od 10,0 % do 20,0 %, pri sorti rebula se odstotek okuženih grozdnih jagod giblje med 13,3 % in 24,2 % (slika 24).



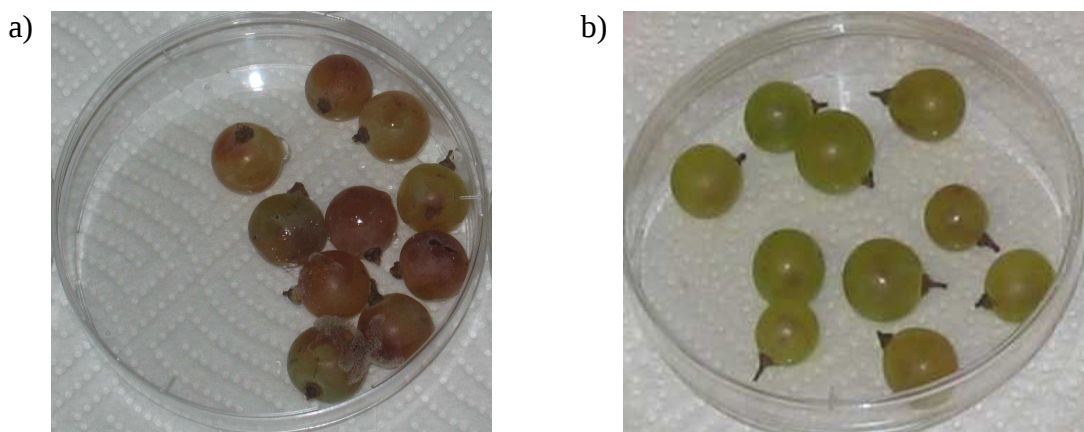
Slika 24: Okuženost grozdnih jagod (%), ki jo povzroča posamezen sev nitaste glive *B. cinerea* (F58, F61 in F63), ter posamezna vrsta kvasovk nanesenih na grozdne jagode a) z iglo; b) z brizgo ob času 0 h in 24 h

Figure 24: Grape berries infection (%) caused by three different *B. cinerea* strains (F58, F61 and F63) and individual yeast strain placed on grape berries either a) with a needle or b) with a spray at time 0 h and 24 h later

Legenda/Legend: C-CO: grozdne jagode sorte chardonnay tretirane s kvasovko *Candida oleophila* Montrocher; C-AP; grozdne jagode sorte chardonnay tretirane s kvasovko *Aureobasidium pullulans*; C-MP; grozdne jagode sorte chardonnay tretirane s kvasovko *Metschnikowia pulcherrima*; C-PG; grozdne jagode sorte chardonnay tretirane s kvasovko *Pichia guilliermondii*; C-SC; grozdne jagode sorte chardonnay tretirane s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*; R-CO: grozdne jagode sorte rebula tretirane s kvasovko *Candida oleophila* Montrocher; R-AP; grozdne jagode sorte rebula tretirane s kvasovko *Aureobasidium pullulans*; R-MP; grozdne jagode sorte rebula tretirane s kvasovko *Metschnikowia pulcherrima*; R-PG; grozdne jagode sorte rebula tretirane s kvasovko *Pichia guilliermondii*; R-SC; grozdne jagode sorte rebula tretirane s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*

Sev z oznako ZIM F61 smo prejeli od raziskovalcev iz Nemčije. Pri nanosu z injekcijsko iglo je bila okuženost skupine D grozdnih jagod sorte chardonnay od 13,3 % do 33,3 %, grozdnih jagod sorte rebula pa med 37,5 % in 57,5 %. Pri nanosu fitopatogene glive po 24 urah pa se je okuženost skupine E gibala med 4,2 % in 11,7 % pri grozdnih jagodah sorte chardonnay oz. med 15,8 % in 25,8 % pri grozdnih jagodah sorte rebula. Pri uporabi pršilke za nanos seva z oznako ZIM F61 je bila okuženost skupine N grozdnih jagod sorte chardonnay od 4,2 % do 13,3 % oz. med 5,0 % in 10,8 % pri skupini O. Pri sorti rebula smo opazili nekoliko večje vrednosti okuženosti grozdnih jagod in sicer od 21,7 % do 28,3 % pri skupini N in med 11,7 % in 18,3 % pri skupini O, če smo glivo nanесли 24 ur kasneje (slika 24).

Sev *B. cinerea* iz Francije smo v zbirko ZIM shranili pod oznako F63. Pri nanosu na grozdne jagode sorte chardonnay z injekcijsko iglo ob začetku eksperimenta (skupina D), smo opazili, da je okuženost grozdnih jagod od 4,2 % do 13,3 %, če pa smo glivo nanесли 24 ur kasneje, je bila okuženost grozdnih jagod skupine E od 6,7 % do 11,7 %. Pri sorti rebula je bila okuženost grozdnih jagodah višja. Odstotek okuženosti grozdnih jagod skupine D je bila med 53,3 % in 71,7 %, pri skupini E pa se je odstotek okuženosti znižal na 15,0 % do 22,5 %. Pri nanašanju suspenzije spor nitaste glive s pršilko na površino grozdnih jagod sorte chardonnay je bila okuženost skupine N od 3,3 % do 9,2 %, pri skupini O pa so se vrednosti gibale med 0,8 % in 7,5 %. Pri sorti rebula je bila okuženost grozdnih jagod skupine N od 8,3 % do 21,7 %, skupine O pa med 6,7 % in 11,7 % (slika 24).



Slika 25: Okuženost grozdnih jagod (a) sorte rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula) in (b) sorte chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) pri nanosu kvasovke *Candida oleophila* Montrocher in glive *Botrytis cinerea* z injekcijsko iglo na začetku eksperimenta (skupina A)

Figure 25: Grape berries infection of (a) cultivar Rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula) and (b) cultivar Chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) when yeast *Candida oleophila* Montrocher and filamentous fungi *Botrytis cinerea* were applied by needle injection in the beginning of experiment (group A)

4.4 VPLIV CELIČNEGA STIKA

4.4.1 Vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo

Vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo smo spremljali na trdnem gojišču. Izbrali smo dva različna trdna medija; gojišče NYDA ter gojišče PDA, katerih sestava in priprava sta opisani v poglavju 3.2.3. Izvedba dveh tipov testa (A in B) je opisana v poglavju 3.1.2.2. Test smo izvajali v treh paralelkah. Prisotnost rasti nitaste glive (pri testu A) oz. kvasovk (pri testu B) v primerjavi s kontrolno ploščo smo spremljali sedmi, 15. in 30. dan in jo označili z 0, če na nobeni plošči ni bilo rasti; z 1, če smo rast opazili na eni plošči; z 2, če je bila rast vidna na dveh ploščah; in s 3, če je bila rast prisotna na vseh treh paralelkah.

Na koncu, po 30 dneh inkubacije, smo kolonije glede na velikost razvrstili v velikostne razrede: ni rasti (-); premer kolonije do 1 cm (<1); premer kolonije od 1– 2 cm (1-2); premer kolonije od 2– 3 cm (2-3); premer kolonije od 3– 4 cm (3-4); premer kolonije od 4– 5 cm (4-5); premer kolonije nad 5 cm (>5).

4.4.1.1 Test A – primarni nanos kvasovk

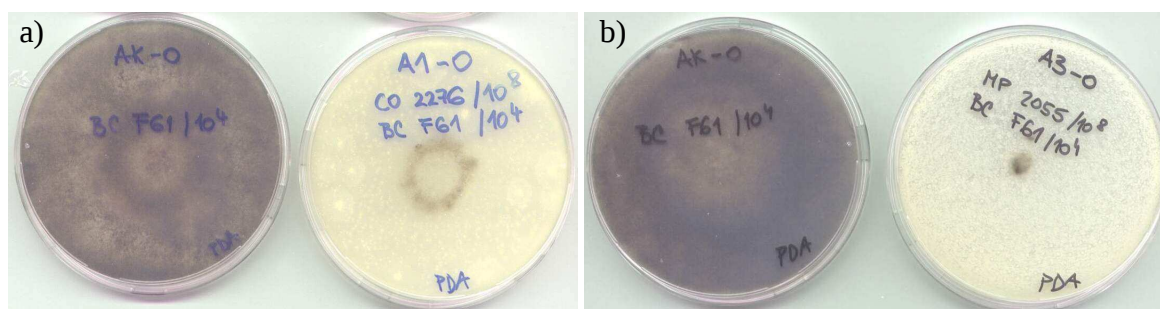
Rast vseh treh sevov nitaste glive *B. cinerea* na kontrolni plošči brez nanosa celic kvasovk je pri inkubaciji na sobni temperaturi potekala normalno. V petih do sedmih dneh je gliva dosegla rob plošče tako na gojišču NYDA, kot na gojišču PDA. Trideseti dan, ko smo pregledovali rezultate, pa je bila kontrolna plošča popolnoma prerasla z nitasto glivo *B. cinerea* (preglednica 26). Premer kolonije nitaste glive na kontrolni plošči je tako enak premeru plošče same, to je 9 cm, zato podatek ni prikazan v preglednici 26.

Pri rasti nitaste glive na plošči s primarnim nanosom kvasovk pa so vsi trije sevi nitaste glive *B. cinerea* rasli bolj počasi. Po petih do sedmih dneh inkubacije smo s prostim očesom komaj zaznali začetek rasti micelija. Plošče smo inkubirali naprej in 15. ter 30. dan ponovno ocenili prisotnost rasti. S statistično obdelavo podatkov (priloga B) dobljenih pri testu A smo ugotovili, da se prisotnost oz. odsotnost rasti nitaste glive pokaže že sedmi dan inkubacije in se statistično značilno ne razlikuje od rezultatov dobljenih po 15 ali 30 dneh inkubacije.

V preglednici 26 lahko vidimo, da testirani sevi kvasovk *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guilliermondii* na gojišču NYDA popolnoma zavirajo rast vseh treh sevov nitaste glive *Botrytis cinerea*. Na gojišču PDA pa je rast nitaste glive prisotna na ploščah, kjer smo kvasovke in nitasto glivo nanесли hkrati ob času 0 (tj. ob posušitvi plošč). Tudi kvasovka *Candida oleophila* Montrocher zavira rast nitaste glive na

gojišču NYDA, z izjemo rasti sevov F61 in F63 na plošči inokulirani na začetku (ob času 0h). Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* dopušča rast nitaste glive na plošči z nižjo koncentracijo celic kvasovk na začetku (ob času 0h), ob kasnejšem nanosu nitaste glive na primarni nanos kvasovk pa rast ni opazna. Na ploščah s PDA gojiščem s primarnim nanosom različnih vrst kvasovk na začetku (ob času 0h) zrastejo vsi sevi nitaste glive, nekateri tudi pri kasnejši inokulaciji. Sev nitaste glive F63 je najboljše premagoval oviro primarnega nanosa kvasovk (preglednica 26).

Iz dobljenih rezultatov smo tudi ugotovili, da posamezne vrste kvasovk različno močno zavirajo rast nitaste glive. Najmočnejše seveda zavirajo rast tiste kvasovke, kjer rasti sploh ni bilo. Tam, kjer pa se je rast kolonije nitaste glive pojavila, pa smo opazili, da je bila velikost kolonije po 30 dneh inkubacije različno velika. Na primer: pri kvasovki *P. guilliermondii* od manj kot 1 cm do največ 2 cm, medtem ko je na primarnem nanosu kvasovke *S. cerevisiae* nitasta gliva zrasla v premer tudi več kot 3 cm. Na sliki 26 vidimo razlike v premeru rasti seva F61 nitaste glive *B. cinerea* na površini primarnega nanosa kvasovke *C. oleophila* Montrocher in na površini primarnega nanosa *M. pulcherrima*.



Slika 26: Rast seva nitaste glive *B. cinerea* F61 po 30 dneh skupne inkubacije na plošči brez primarnega nanosa kvasovke (AK - kontrola) ter na plošči s primarnim nanosom kvasovke a) *C. oleophila* Montrocher; in b) *M. pulcherrima*

Figure 26: Growth of *B. cinerea* F61 strain after 30 days incubation on agar plate without yeast biocoating (AK - control plate) and on agar plate with yeast a) *C. oleophila* Montrocher or b) *M. pulcherrima* biocoats

Preglednica 26: Rast treh različnih sevov nitaste glive *B. cinerea* (F58, F61, F63) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk

Table 26: Growth of different *B. cinerea* strains (F58, F61, F63) on solid NYDA or PDA medium with different yeast strains and their concentration biocoating

nitasta gliva <i>Botrytis cinerea</i>														
goji šče	konc.	t _{inok}	sev F58				sev F61				sev F63			
			rast ^a		2r ^b (cm)		rast		2r (cm)		rast		2r (cm)	
			7 ^c	15	30	V	7	15	30	V	7	15	30	V
primarni nanos kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher														
N Y D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	10 ⁶ /10 ³	0	0	0	0	-	1	2	3	1-2	3	3	3	1-2
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
P D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	3	3	3	1-2	3	3	3	2-3	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	1	2	2-3	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	10 ⁶ /10 ³	0	3	3	3	1-2	2	3	3	3-4	3	3	3	2-3
		24	2	2	2	1-2	0	2	2	2-3	3	3	3	2-3
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
primarni nanos kvasovke <i>Aureobasidium pullulans</i>														
N Y D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	10 ⁶ /10 ³	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
P D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	1	2	2	1-2
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	10 ⁶ /10 ³	0	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3
		24	0	0	0	-	3	3	3	1-2	3	3	3	1-2
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	3	3	3	1-2
primarni nanos kvasovke <i>Metschnikowia pulcherrima</i>														
N Y D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	10 ⁶ /10 ³	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
P D A	10 ⁸ /10 ⁴	0	3	3	3	2-3	3	3	3	<1	3	3	3	1-2
		24	3	3	3	1-2	3	3	3	<1	3	3	3	1-2
		48	0	0	0	-	0	0	0	-	3	3	3	<1
	10 ⁶ /10 ³	0	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3	3	3	3	2-3
		24	3	3	3	1-2	3	3	3	1-2	3	3	3	2-3
		48	0	0	0	-	0	2	3	1-2	3	3	3	1-2

nadaljevanje preglednice 26: Rast treh različnih sevov nitaste glive *B. cinerea* (F58, F61, F63) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk

primarni nanos kvasovke <i>Pichia guilliermondii</i>																
N	10 ⁸ /10 ⁴	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-		
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-		
		Y	48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	
		D	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	
		A	10 ⁶ /10 ³	24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
				48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
P	10 ⁸ /10 ⁴	0	3	3	3	<1	3	3	3	<1	3	3	3	<1		
		24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-		
		Y	48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	
		D	0	3	3	3	1-2	3	3	3	1-2	3	3	3	1-2	
		A	10 ⁶ /10 ³	24	0	0	0	-	0	0	0	-	3	3	3	<1
				48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
primarni nanos kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>																
N	10 ⁸ /10 ⁴	0	0	0	0	-	0	1	2	1-2	0	0	1	1-2		
		24	0	0	0	-	0	1	1	2-3	0	2	2	2-3		
		Y	48	0	0	0	-	0	1	2	2-3	0	0	2	1-2	
		D	0	3	3	3	3-4	3	3	3	3-4	3	3	3	3-4	
		A	10 ⁶ /10 ³	24	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
				48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
P	10 ⁸ /10 ⁴	0	3	3	3	2-3	3	3	3	3-4	3	3	3	2-3		
		24	0	0	0	-	0	2	3	3-4	0	0	0	-		
		Y	48	0	0	0	-	0	2	3	2-3	0	0	0	-	
		D	0	3	3	3	3-4	3	3	3	3-4	3	3	3	3-4	
		A	10 ⁶ /10 ³	24	2	2	2	3-4	0	0	0	-	2	2	2	3-4
				48	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-

Legenda: ^a - rast smo ocenili po sistemu 0,1,2,3: 0 – ni rasti; 1 – rast je vidna na eni plošči; 2 – rast je vidna na dveh ploščah; 3 – rast je prisotna na vseh treh paralelkah; ^b premer kolonij je podan kot povprečna vrednost velikosti premera kolonij na treh paralelkah po 30 dneh inkubacije; ^c čas skupne inkubacije (dnevi); V – vzorec;

Legend: ^a – estimated growth, according to 0,1,2,3 system: 0 – no growth; 1 – growth on one plate; 2 – growth on two plates; 3 – growth on all three parallel plates; ^b – colony diameter as mean value of all three parallel, after 30 days of incubation; ^c time of co-incubation (days); V - sample

4.4.1.2 Test B – primarni nanos nitaste glive

S testom B smo ugotovili, da kvasovke vrst *Candida oleophila* Montrocher, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii* in *Saccharomyces cerevisiae* zrastejo na površini gojišča NYDA s primarnim nanosom vseh treh sevov nitaste glive *Botrytis cinerea* ne glede na koncentracijo celic in čas zamika inokulacije. Na gojišču PDA s primarnim nanosom vseh treh sevov nitaste glive *Botrytis cinerea* pa se rast teh kvasovk pojavi v koncentracijskem razmerju 10⁶/10³ ob inokulaciji 48 h po posušitvi plošč. Ugotovili smo tudi, da kvasovka *Aureobasidium pullulans*, zraste na ploščah obeh gojišč s

primarnim nanosom nitaste glive *B. cinerea* le v koncentracijskem razmerju $10^6/10^3$ (preglednica 27).

Velikosti kolonij kvasovk, ki so zrasle na ploščah s primarnim nanosom nitaste glive so različne v primerjavi z velikostjo kolonije kvasovk na ploščah brez nanosa (preglednica 27 in slika 27). Razlike v velikosti premera kolonij kvasovk, so evidentne, kar pomeni, da tudi nitasta gliva vpliva zaviralno na rast kvasovk.

Iz priloge B ugotovimo, da čas skupne inkubacije v testu B na rezultate ne vpliva, saj se rezultati odčitani 7. dan statistično značilno ne razlikujejo od dobljenih rezultatov po 15 ali 30 dneh.

Preglednica 27: Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih sevov nitaste glive *B. cinerea* in njihovih koncentracij v primerjavi z rastjo na trdnem gojišču brez primarnega nanosa nitaste glive

Table 27: Growth of different yeasts on solid NYDA or PDA medium with or without biocoating with different *B. cinerea* strains and their concentration

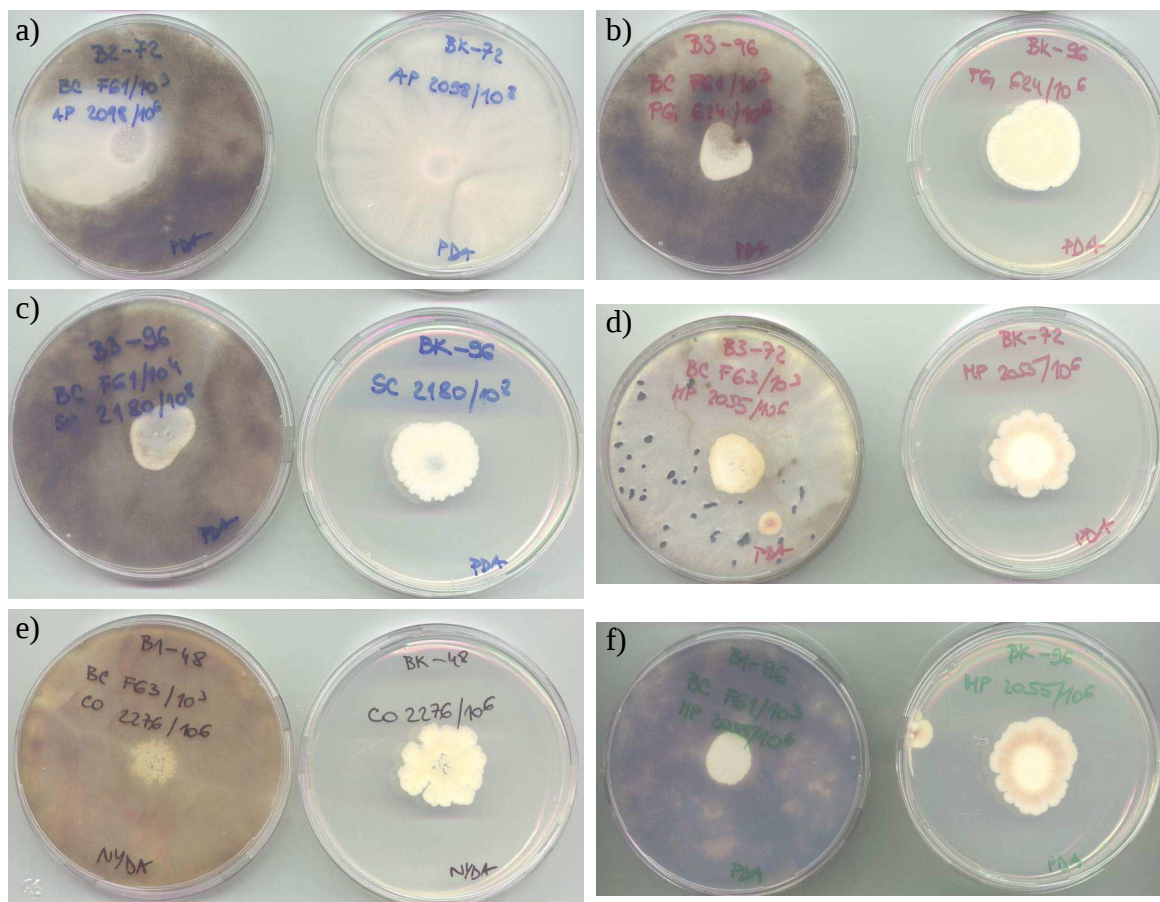
kvasovke																											
			<i>Candida oleophila</i> Montrocher					<i>Aureobasidium pullulans</i>					<i>Metschnikowia pulcherrima</i>					<i>Pichia guilliermondii</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
gojišče	konc.	t _{inok}	rast ^a			2r ^b (cm)		rast			2r (cm)		rast			2r (cm)		rast			2r (cm)		rast			2r (cm)	
			7	15	30	K	V	7	15	30	K	V	7	15	30	K	V	7	15	30	K	V	7	15	30	K	V
primarni nanos: <i>Botrytis cinerea</i> sev F58																											
NYDA	10 ⁸ /10 ⁴	48	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
		72	3	3	3	2-3	<1	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
		96	3	3	3	2-3	<1	0	0	0	3-4	-	3	3	3	2-3	1-2	3	3	3	3-4	<1	3	3	3	2-3	<1
	10 ⁶ /10 ³	48	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	4-5	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
		72	3	3	3	3-4	<1	0	0	0	4-5	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	<1
		96	3	3	3	3-4	<1	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	<1
	10 ⁸ /10 ⁴	48	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	0	0	0	2-3	-	3	3	3	3-4	1-2	0	0	0	3-4	-
		72	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	0	0	0	2-3	-	0	0	0	3-4	-	0	0	0	3-4	-
		96	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	0	0	0	2-3	-	0	0	0	3-4	-	0	0	0	3-4	-
PDA	10 ⁶ /10 ³	48	1	1	1	3-4	1-2	3	3	3	>5	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	1-2	1	1	1	2-3	<1
		72	0	0	0	3-4	-	0	0	0	>5	-	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	<1	0	0	0	2-3	-
		96	0	0	0	2-3	-	0	0	0	>5	-	0	0	0	3-4	-	0	0	0	3-4	-	0	0	0	2-3	-
primarni nanos: <i>Botrytis cinerea</i> sev F61																											
NYDA	10 ⁸ /10 ⁴	48	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		72	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		96	2	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	2-3	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
	10 ⁶ /10 ³	48	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	4-5	3-4	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		72	3	3	3	3-4	2-3	0	0	0	4-5	-	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		96	3	3	3	3-4	1-2	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	1-2	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2

nadaljevanje preglednice 27: Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih sevov nitaste glive *B. cinerea* in njihovih koncentracij v primerjavi z rastjo na trdnem gojišču brez primarnega nanosa nitaste glive

PDA	10 ⁸ /10 ⁴	48	2	2	3	3-4	2-3	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	1-2	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3
		72	2	2	2	3-4	1-2	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3
		96	1	1	1	3-4	1-2	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3
	10 ⁶ /10 ³	48	2	2	3	3-4	2-3	3	3	3	>5	4-5	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	3-4	2-3	1	1	1	2-3	2-3
		72	2	2	3	3-4	1-2	3	3	3	>5	4-5	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3	0	0	0	2-3	-
		96	1	1	1	2-3	1-2	0	0	0	>5	-	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3	0	0	0	2-3	-
primarni nanos: <i>Botrytis cinerea</i> sev F63																											
NYDA	10 ⁸ /10 ⁴	48	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	2-3
		72	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		96	3	3	3	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	3	3	3	2-3	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
	10 ⁶ /10 ³	48	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	4-5	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	2-3
		72	3	3	3	3-4	1-2	0	0	0	4-5	-	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
		96	3	3	3	3-4	1-2	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	2-3	3	3	3	3-4	1-2	3	3	3	2-3	1-2
PDA	10 ⁸ /10 ⁴	48	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	3	3	3	2-3	2-3	3	3	3	3-4	2-3	0	0	0	3-4	-
		72	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	0	1	1	2-3	1-2	0	0	0	3-4	-	0	0	0	3-4	-
		96	0	0	0	3-4	-	0	0	0	4-5	-	0	0	0	2-3	-	0	0	0	3-4	-	0	0	0	3-4	-
	10 ⁶ /10 ³	48	2	2	2	3-4	1-2	3	3	3	>5	1-2	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		72	0	0	0	3-4	-	1	2	2	>5	1-2	0	2	3	3-4	2-3	3	3	3	3-4	2-3	3	3	3	2-3	1-2
		96	0	0	0	2-3	-	0	0	0	>5	-	0	1	3	3-4	1-2	0	0	0	3-4	-	0	0	0	2-3	-

Legenda: ^a - rast smo ocenili po sistemu 0,1,2,3: 0 – ni rasti; 1 – rast je vidna na eni plošči; 2 – rast je vidna na dveh ploščah; 3 – rast je prisotna na vseh treh paralelkah; ^b premer kolonij je podan kot povprečna vrednost velikosti premera kolonij na treh paralelkah po 30 dneh inkubacije; ^c čas skupne inkubacije (dnevi); K – kontrolna plošča; V - vzorec

Legend: ^a – estimated growth, according to 0,1,2,3 system: 0 – no growth; 1 – growth on one plate; 2 – growth on two plates; 3 – growth on all three parallel plates; ^b – colony diameter as mean value of all three parallel, after 30 days of incubation; ^c time of co-incubation (days); K – control plate; V - sample



Slika 27: Rast kvasovk na površini trdnega gojišča z ali brez primarnega nanosa enega od sevov nitaste glive *B. cinerea* po 30 dneh. (a) kvasovka *A. pullulans* (10^6 cfu/ml) nanesena po 72 urah na PDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F61 (10^3 spor/ml), (b) kvasovka *P. guilliermondii* (10^6 cfu/ml) nanesena po 96 urah na PDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F61 (10^3 spor/ml), (c) kvasovka *S. cerevisiae* (10^8 cfu/ml) nanesena po 96 urah na PDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F61 (10^4 spor/ml), (d) kvasovka *M. pulcherrima* (10^6 cfu/ml) nanesena po 72 urah na PDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F63 (10^3 spor/ml); (e) kvasovka *C. oleophila* Montrocher (10^6 cfu/ml) nanesena po 48 urah na NYDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F63 (10^3 spor/ml); (f) kvasovka *M. pulcherrima* (10^6 cfu/ml) nanesena po 96 urah na PDA gojišče s suhim bioslojem *B. cinerea* F61 (10^3 spor/ml)

Figure 27: Yeast growth on solid medium surface with or without *B. cinerea* strains biocoat after 30 days. (a) yeast *A. pullulans* (10^6 cfu/ml) inoculated after 72 h on the top of PDA medium biocoted with *B. cinerea* F61 (10^3 spores/ml), (b) yeast *P. guilliermondii* (10^6 cfu/ml) inoculated after 96 h on the top of PDA medium biocoted with *B. cinerea* F61 (10^3 spores/ml), (c) yeast *S. cerevisiae* (10^8 cfu/ml) inoculated after 96 h on the top of PDA medium biocoted with *B. cinerea* F61 (10^4 spores/ml), (d) yeast *M. pulcherrima* (10^6 cfu/ml) inoculated after 72 h on the top of PDA medium biocoted with *B. cinerea* F63 (10^3 spores/ml); (e) yeast *C. oleophila* Montrocher (10^6 cfu/ml) inoculated after 48 h on the top of NYDA medium biocoted with *B. cinerea* F63 (10^3 spores/ml); (f) yeast *M. pulcherrima* (10^6 cfu/ml) inoculated after 96 h on the top of PDA medium biocoted with *B. cinerea* F61 (10^3 spores/ml).

4.4.2 Vpliv celičnega stika med kvasovko in kvasovko

Vpliv ene vrste kvasovk na drugo, smo določali s testom za določanje zimocidne aktivnosti. Izbranim sevom kvasovk smo zimocidno aktivnost določili na gojišču YEPD z metilenskim modrilom in uravnano pH vrednostjo (3,0, 4,0 in 5,0). Po površini plošče smo nanесли celice supersenzitivne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* S6 (ZIM 1859). Na primarni nanos teh celic smo po posušitvi plošče sekundarno nanašali izbrane seve. Za ugotavljanje medsebojnega vpliva posamezne vrste kvasovke v direktnem stiku smo izvedli tudi navzkrižni test zimocidne aktivnosti. Po površini gojišča smo enakomerno porazdelili vsako od testiranih kvasovk.

Preglednica 28: Zimocidna aktivnost kvasovk pri pH vrednostih 3,0, 4,0 in 5,0 (+++ močna, ++ zmerna, + šibka, - ni zimocidne aktivnosti)

Table 28: Yeast killer activity at pH values 3.0, 4.0 and 5.0 (+++ strong, ++ medium, + weak, - no killer activity)

kvasovke	zimocidna aktivnost pri pH		
	3	4	5
AP 2098	++	+++	++
CO 2276	+	+	+
MP 2055	+++	+++	+++
PG 624	++	+++	++
SC 2180	-	-	-

Sevi izbranih vrst kvasovk so pokazali različno močno zimocidno aktivnost. Sev kvasovke *Candida oleophila* Montrocher je imel šibko zimocidno aktivnost na testno supersenzitivno kvasovko *S. cerevisiae* S6. Izbrani sevi kvasovk *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guilliermondii*, ki so imeli dobro biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *B. cinerea*, so pokazali zmerno do močno zimocidno aktivnost. Njihova zimocidna aktivnost je bila najbolj izražena pri pH 4,0. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* pa zimocidne aktivnosti ni pokazala (preglednica 28).

Preglednica 29: Navzkrižna zimocidna aktivnost kvasovk pri pH vrednosti 4,5 (+++ močna, ++ zmerna, + šibka, - ni zimocidne aktivnosti)

Table 29: Crossway yeast killer activity at pH values 4.5 (+++ strong, ++ medium, + weak, - no killer activity)

testne kvasovke	primarni nanos kvasovk				
	AP 2098	CO 2276	MP 2055	PG 624	SC 2180
AP 2098		+	+	+	+++
CO 2276	+		+	-	++
MP 2055	+++	+++		+++	+++
PG 624	+++	++	+++		+++
SC 2180	-	-	-	-	

Pri testu navzkrižne zimocidne aktivnosti (preglednica 29), smo ugotovili, da kvasovki *M. pulcherrima* sev ZIM 2055 in *P. guillermundii* sev ZIM 624 močno zimocidno delujeta na vse vrste kvasovk nanese kot primarni nanos na testnem gojišču (razen zmerne zimocidne aktivnosti *P. guillermundii* na primarnem nanosu kvasovke *C. oleophila* Montrocher). Kvasovka *A. pullulans* ZIM 2098 deluje močno zimocidno samo na vrsto *S. cerevisiae* ZIM 2180, na ostale tri vrste kvasovk pa ima šibko zimocidno aktivnost. Kvasovka *C. oleophila* Montrocher ima šibko zimocidno aktivnost na kvasovki *A. pullulans* ZIM 2098 ter *M. pulcherrima* ZIM 2055 in zmerno zimocidno aktivnost na kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2180. Kvasovka *S. cerevisiae* ZIM 2180 zimocidne aktivnosti do drugih vrst kvasovk ni pokazala.

4.5 SIGNALNE MOLEKULE

Prisotnost signalnih molekul smo določali med kvasovkami iste vrste (ang. intra species) ter med kvasovkami različnih vrst (ang. inter species). Na testnih gojiščih smo makroskopsko spremljali nastanek oz. pojav motne in/ali bistre cone okoli posamezne kolonije kvasovk.

4.5.1 Signalne molekule med kvasovkami iste vrste

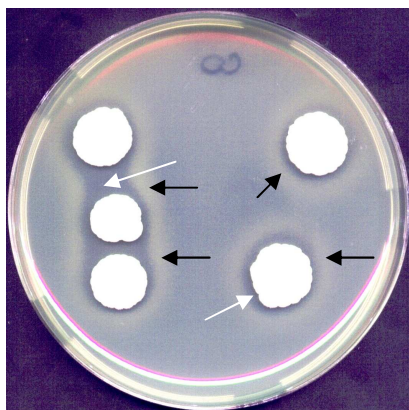
Pojav motne oz. bistre cone okoli posamezne kolonije kvasovke iste vrste smo najprej zaznali pri vrsti *Aureobasidium pullulans*. Po 21 dneh inkubacije smo okoli kolonije lahko opazili kolobar bistre cone, ki je mejil na motno cono. Pri kvasovki *C. oleophila* Montrocher smo take kolobarje opazili po 28 dneh inkubacije (slika 28). Kvasovka *S. cerevisiae* je šele po 45 dneh inkubacije tvorila take kolobarje, medtem ko pri kvasovkah *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* tovrstnega pojava nismo zaznali niti po dolgotrajni inkubaciji (preglednica 30).

Preglednica 30: Pojav (+) bistre oz. motne cone okoli kolonij kvasovk iste vrste na GM mediju ter sprememba barve GM-BCP medija

Table 30: Appearance (+) of clear and/or turbid zone around yeast colonies of same species on GM medium and color change of GM-BCP medium

MONO	Prisotnost cone na GM (dnevi)					Pojav barvne reakcije na GM-BCP (h)							
	3-5	14	21	28	45	24	48	72	96	120	144	168	
AP	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CO	-	-	-	+	-	-	-	-	-/+	+	+	+	
MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

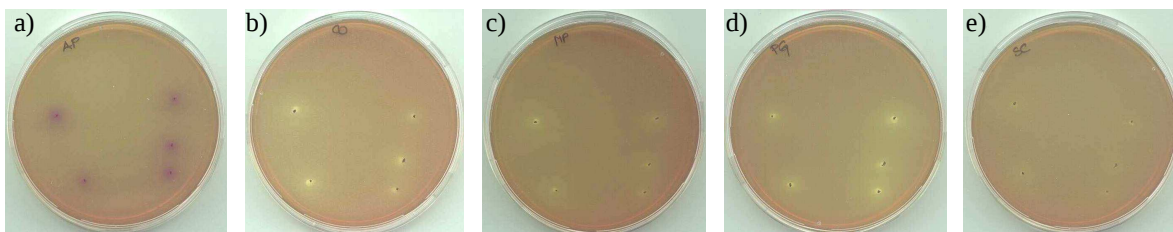
Na ploščah z barvilom bromkrezol vijolično smo spremljali spremembo barve gojišča, kot posledico spremembe pH. Že po 24 urah se je barva gojišča okoli kolonij vrste *A. pullulans* spremenila iz rumene v vijolično (slika 29a). Pri kvasovki *C. oleophila* Montrocher se je šibka sprememba barvila pokazala po 96 urah in je postajala proti koncu inkubacije vse izrazitejša (slika 29). Kolonije drugih vrst kvasovk niso spremenile barve gojišča GM-BCP iz rumene v vijolično v svoji okolici niti po sedmih dneh (168 h) inkubacije (preglednica 30, slika 29).



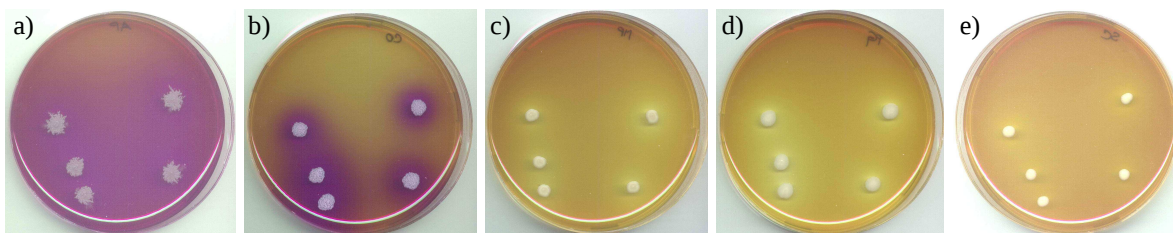
Slika 28: Prisotnost pojava bistre (svetla puščica) in motne (temna puščica) cone okoli posameznih kolonij kvasovke *Candida oleophila* Montrocher

Figure 28: Appearance of clear (light arrow) and turbid (dark arrow) zone around *Candida oleophila* Montrocher colonies

24 h



168 h



Slika 29: Sprememba barve trdnega gojišča GM-BCP v okolici kolonij po (zgoraj) 24 urah inkubacije in (spodaj) po 168 h inkubacije pri kvasovkah (a) *A. pullulans*, (b) *C. oleophila* Montrocher, (c) *M. pulcherrima*, (d) *P. guillermondii*, (e) *S. cerevisiae*

Figure 29: Color change of solid medium GM-BCP after (up) 24 h incubation and (down) 168 h incubation around colonies (a) *A. pullulans*, (b) *C. oleophila* Montrocher, (c) *M. pulcherrima*, (d) *P. guillermondii*, (e) *S. cerevisiae*

4.5.2 Signalne molekule med kvasovkami različnih vrst

Pojav motne in/ali bistre cone okoli kolonij kvasovk *Aureobasidium pullulans* smo opazili 21. dan inkubacije na ploščah v kombinaciji z vsemi drugimi kvasovkami. Pri kvasovki

C. oleophila Montrocher smo take kolobarje opazili po 28 dneh inkubacije na ploščah, kjer je bila ta kvasovka nanescena v bližino bodisi kvasovke *M. pulcherrima* (slika 30a) ali kvasovke *S. cerevisiae* (slika 30b). Pri ostalih kombinacijah kvasovk nismo zaznali pojava motne in/ali bistro cone niti po 45 dneh skupne inkubacije (preglednica 31).

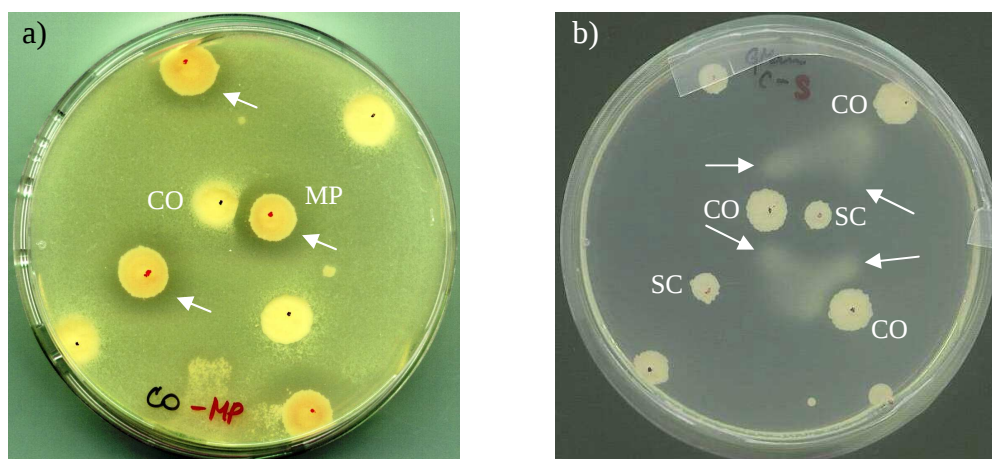
Preglednica 31: Pojav (+) bistro oz. motne cone okoli kolonij kvasovk različnih vrst na GM mediju ter sprememba barve GM-BCP medija

Table 31: Appearance (+) of clear and/or turbid zone around yeast colonies of different yeast species on GM medium and color change of GM-BCP medium

MEŠANA	Prisotnost cone na GMan (dnevi)					Pojav barvne reakcije na GM-BCP (h)				
	3-5	14	21	28	45	24	48	72	96	144
AP-CO	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AP-MP	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AP-PG	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AP-SC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CO-MP	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
CO-PG	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CO-SC	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MP-PG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP-SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG-SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Iz slike 30b je vidna usmerjenost motne cone od ene k drugi koloniji kvasovk vrste *C. oleophila* Montrocher (večje kolonije – označena z CO), kar nakazuje komunikacijo med kolonijami na daljavo. Vrsta *S. cerevisiae* (manjša kolonija vmes – označena kot SC) pri tej komunikaciji sodeluje, saj je cona usmerjena tudi proti oz. stran od kolonije.

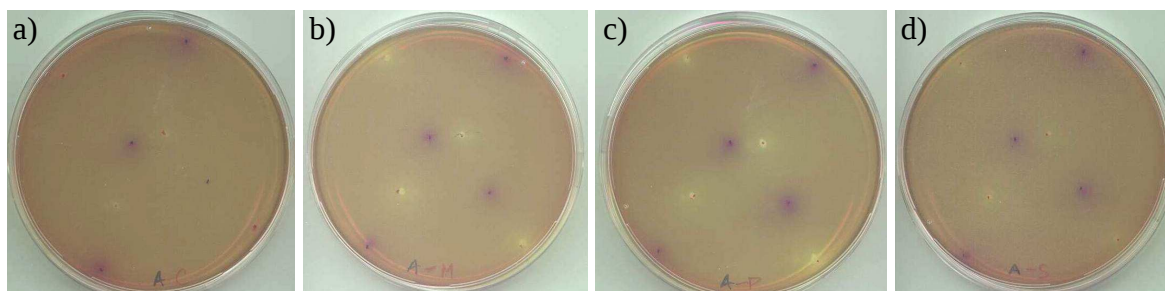
Na testnih ploščah, ki v mediju vsebujejo barvni indikator, smo spremljali spremembo barve gojišča, kot posledico spremembe pH. Barvilo bromkrezol vijolično v GM mediju spremeni barvo iz rumene (pH pod 5,2) v vijolično (pH nad 6,8). Že po 24 urah se je barva gojišča okoli kolonij vrste *A. pullulans* spremenila iz rumene v vijolično na ploščah v prisotnosti vseh štirih vrst kvasovk (slika 31). Sprememba barve gojišča okoli kolonij vrste *A. pullulans* pa je postajala intenzivnejša, hkrati pa so barvo gojišča začele v svoji okolici spreminjati tudi kolonije drugih vrst kvasovk.



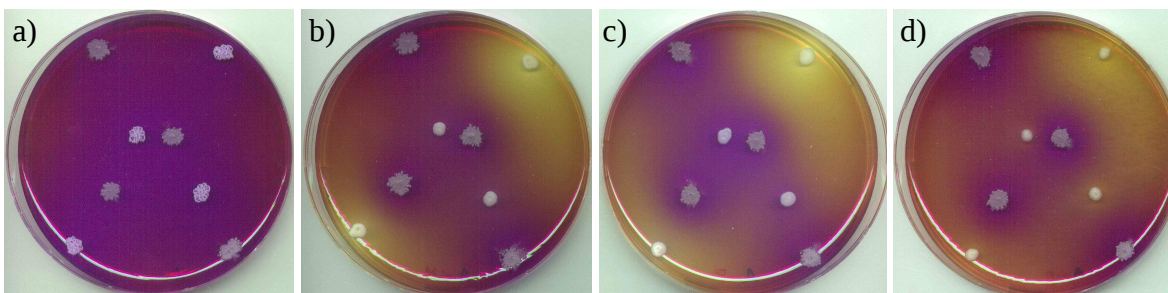
Slika 30: Pojav bistro in/ali motne cone med kolonijami kvasovk (a) *Candida oleophila* Montrocher (CO) in *Metschnikowia pulcherrima* (MP); (b) *Candida oleophila* Montrocher (CO) in *Saccharomyces cerevisiae* (SC)

Figure 30: Appearance of clear and/or turbid zone around yeast colonies of (a) *Candida oleophila* Montrocher (CO) and *Metschnikowia pulcherrima* (MP); (b) *Candida oleophila* Montrocher (CO) and *Saccharomyces cerevisiae* (SC)

24 h



144 h

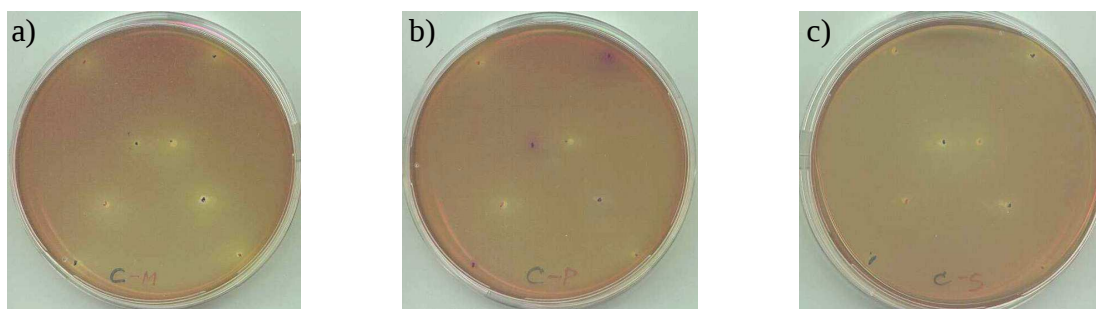


Slika 31: Sprememba barve gojišča GM-BCP okoli kolonij (zgoraj) 24 h inkubacije in (spodaj) po 144h inkubacije. (a) *A. pullulans* – *C. oleophila*; (b) *A. pullulans* – *M. pulcherrima*; (c) *A. pullulans* – *P. guilliermondii*; (d) *A. pullulans* – *S. cerevisiae*

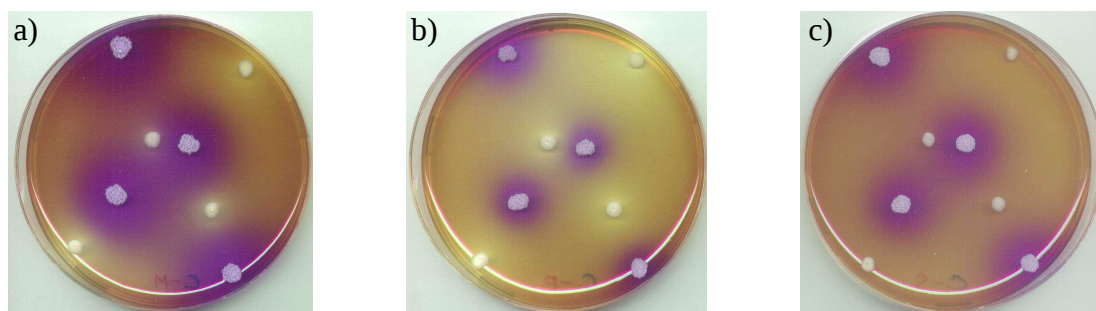
Figure 31: Color change of solid GM-BCP medium around colonies (up) after 24 h of incubation and (down) after 144 h of incubation (a) *A. pullulans* – *C. oleophila*; (b) *A. pullulans* – *M. pulcherrima*; (c) *A. pullulans* – *P. guilliermondii*; (d) *A. pullulans* – *S. cerevisiae*

Pri kvasovki *C. oleophila* Montrocher se je neznatna sprememba barvila pokazala po 96 urah in je s časom postajala vse bolj izrazita (slika 32). Po 144 urah inkubacije je barva okoli kolonij kvasovke *C. oleophila* Montrocher močno izražena, hkrati pa se okolica kolonij drugih vrst ni spremenila.

24 h



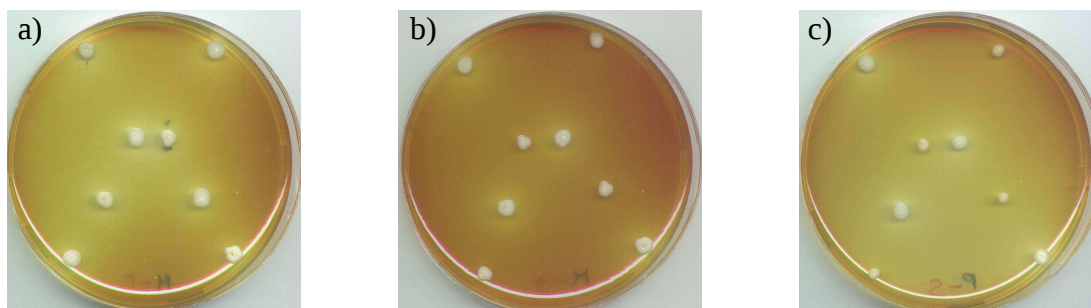
144 h



Slika 32: Sprememba barve gojišča GM-BCP okoli kolonij kvasovk (zgoraj) po 24 h inkubacije in (spodaj) po 144 h inkubacije. (a) *C. oleophila* Montrocher – *M. pulcherrima*; (b) *C. oleophila* Montrocher – *P. guilliermondii* (c) *C. oleophila* Montrocher – *S. cerevisiae*

Figure 32: Color change of solid GM.BCP medium around yeast colonies (up) after 24 h of incubation and (down) after 144 h of incubation. (a) *C. oleophila* Montrocher – *M. pulcherrima*; (b) *C. oleophila* Montrocher – *P. guilliermondii* (c) *C. oleophila* Montrocher – *S. cerevisiae*

Ostale kolonije iste vrste kvasovk niso spremenile barve gojišča v svoji okolici niti po sedmih dneh inkubacije (slika 33 in preglednica 31). Še več, okolica kolonij *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* se je spremenila v še bolj rumeno, kar kaže na padec pH pod 5,2, medtem ko je okolica kolonij vrst *S. cerevisiae* ostala nespremenjena.



Slika 33: Barva gojišča GM-BCP okoli kolonij kvasovk po 144 h inkubacije. (a) *M. pulcherrima* – *P. guillermondii*; (b) *M. pulcherrima* – *S. cerevisiae*; (c) *P. guillermondii* – *S. cerevisiae*

Figure 33: Color of solid GM-BCP medium around yeast colonies after 144 h of incubation. (a) *M. pulcherrima* – *P. guillermondii*; (b) *M. pulcherrima* – *S. cerevisiae*; (c) *P. guillermondii* – *S. cerevisiae*

4.5.3 Količina ekstracelularnih proteinov

Količino proteinov v vzorcih motne in/ali bistre cone iz okolice kolonij smo izmerili spektrofotometrično. Maso oz. koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili z umeritveno krivuljo (priloga C).

Preglednica 32: Masa proteinov (μg) v okolici kolonij določenih z mikro proceduro po Bradfordu

Table 32: Protein mass (μg) in colony surrounding agar, determined using Bradford micro-procedure

vzorec		A_{595}	Masa proteinov (μg) v 100 μl vzorca	Konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Razlika konc. proteinov ($\mu\text{g/ml}$) med vzorcem in kontrolo
K	GMan	0,461	10,07	100,7	/
1	AP -B	0,468	10,22	102,2	+ 1,5
2	AP -M	0,366	7,88	78,8	- 21,9
3	CO -B	0,515	11,30	113,0	+ 12,3
4	CO -M	0,479	10,47	104,7	+ 4
5	AP-MP -B	0,457	9,96	99,6	- 1,1
6	AP-MP -M	0,624	13,81	138,1	+ 37,4
7	AP-SC -B	0,462	10,08	100,8	+ 0,1
8	AP-SC -M	0,469	10,25	102,5	+ 1,8
9	CO-MP -B	0,414	8,99	89,9	- 10,8
10	CO-MP -M	0,448	9,77	97,7	- 3
11	AP-CO -B	0,462	10,09	100,9	+ 0,2
12	AP-CO -M	0,419	9,09	90,9	- 9,8
13	AP-PG -B	0,468	10,23	102,3	+ 1,6
14	AP-PG -M	0,469	10,24	102,4	+ 1,7
15	CO-SC -pot	0,399	8,64	86,4	- 14,3
16	CO-MP -B	0,424	9,21	92,1	- 8,6

Količine izoliranih proteinov v vseh vzorcih in tudi v vzorcu kontrolnega trdnega gojišča se nahajajo v istem velikostnem razredu (preglednica 32). Izračunane razlike vsebnosti proteinov glede na kontrolni medij GMan ne moremo povezati z motnostjo oz. bistrostjo cone.

4.5.4 SDS – PAGE

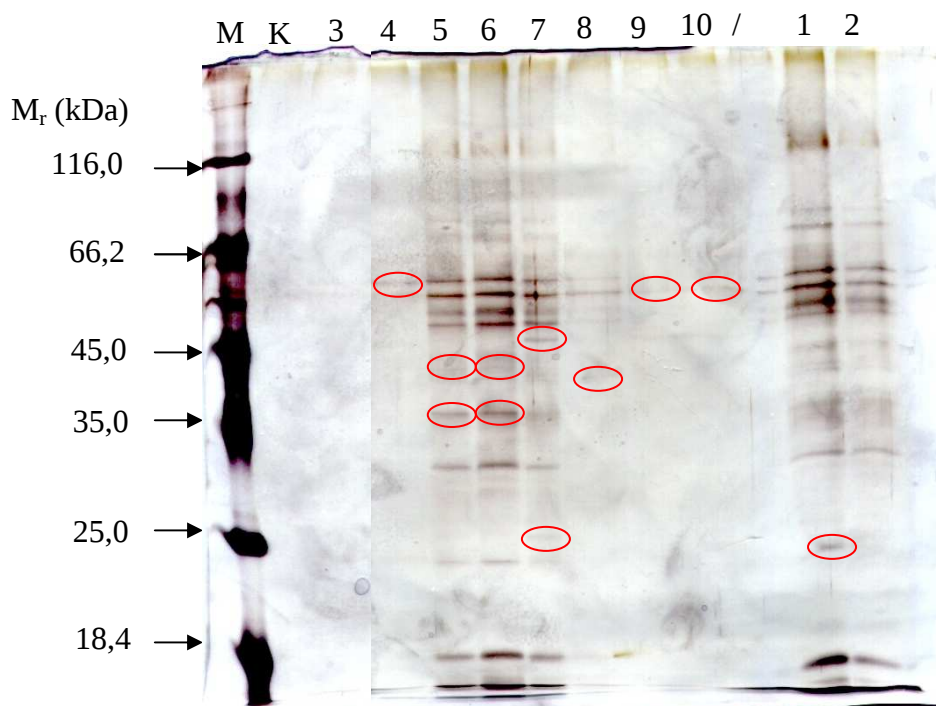
S poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo proteine ločili, po barvanju s srebrom pa smo na gelu opazili profile posameznih vzorcev. Ugotovili smo, da v vzorcu kontrolnega medija (K) ni proteinov v območju 18,4 do 116,0 kDa (sliki 34 in 35).

Pri vrsti *Candida oleophila* Montrocher (slika 34) v vzorcu bistre cone (linija 3) v območju med 18,4 in 116,0 kDa nismo opazili nobenega benda, v vzorcu motne cone (linija 4) pa smo opazili prisotnost enega benda ocenjene velikosti okoli 55 kDa. Podobno smo ugotovili tudi pri vzorcih, ki so vsebovali cone iz okolice kolonij te vrste (slika 34, linija 9 in 10 – *C. oleophila* Montrocher in *M. pulcherrima*; ter slika 35, linija 15 – *C. oleophila* Montrocher in *S. cerevisiae* ter linija 16 – *C. oleophila* Montrocher in *M. pulcherrima*).

Vzorec cone izolirane iz okolice posamezne kolonije vrste *Aureobasidium pullulans* (slika 34, liniji 1, 2), na gelu pokaže veliko število velikostno različnih proteinov. Vidimo tudi, da se vzorec z bistro cono razlikuje od vzorca z motno cono v enem proteinu ocenjene velikosti okoli 25,0 kDa (slika 34). Podoben proteinski profil opazimo pri vzorcih con, kjer je ena od kolonij pripadala vrsti *A. pullulans* (slika 34, liniji 5, 6 – *A. pullulans* in *M. pulcherrima*, liniji 7, 8 – *A. pullulans* in *S. cerevisiae*, ter slika 35, liniji 11, 12 – *A. pullulans* in *C. oleophila* Montrocher, liniji 13, 14 – *A. pullulans* in *P. guilliermondii*).

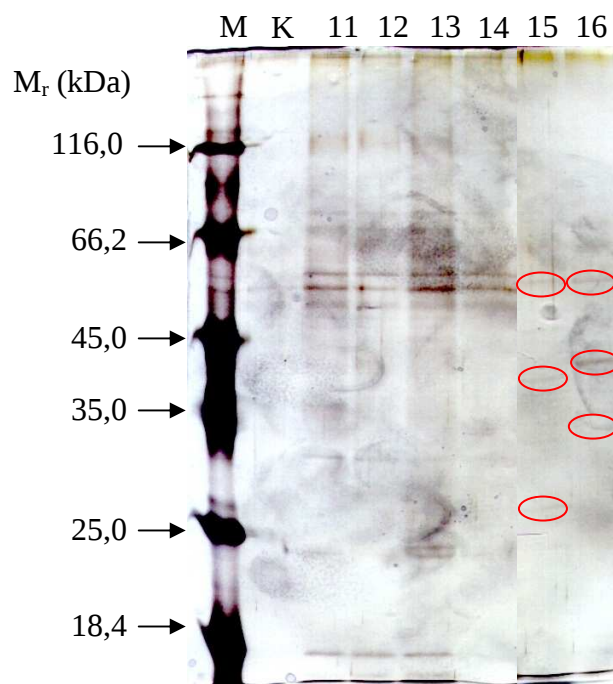
V vzorcu cone med *A. pullulans* in *M. pulcherrima* (slika 34, liniji 5, 6) smo opazili proteina ocenjenih velikosti okoli 45 kDa in 35 kDa, ki se pojavita tudi v vzorcu cone med *C. oleophila* Montrocher in *M. pulcherrima* (slika 35, linija 16).

V vzorcu bistre cone med kvasovkama *A. pullulans* in *S. cerevisiae* (slika 34, linija 7) se pojavita dva proteina ocenjene velikosti okoli 45 kDa in 25 kDa. V vzorcu motne cone med kvasovkama *A. pullulans* in *S. cerevisiae* (slika 34, linija 8) pa se pojavi protein ocenjene velikosti okoli 40 kDa. Proteina z ocenjenima velikostma 40 kDa in 25 kDa smo poleg proteina z ocenjeno velikostjo 55 kDa opazili v vzorcu usmerjene motne cone (slika 30b) med kvasovkama *C. oleophila* Montrocher in *S. cerevisiae* (slika 35, linija 15).



Slika 34: SDS – PAGE analiza ekstracelularnih proteinov. M – raztopina proteinov znanih Mr v kDa; K – kontrolno trdno gojišče, 1 – 10 vzorci; ločilni gel: 10 % (w/v) akrilamid, koncentracijski gel: 4 % (w/v) akrilamid. Proteini so bili detektirani s srebrom.

Figure 34: SDS – PAGE analysis of extra cellular proteins. M – solution of proteins with known Mr in kDa; K – control solid medium, 1 – 10 samples, running gel: 10 % (w/v) acrylamid, stacking gel: 4 % (w/v) acrylamid. Proteins were stained with silver.



Slika 35: SDS – PAGE analiza ekstracelularnih proteinov. M – raztopina proteinov znanih M_r v kDa; K – kontrolno trdno gojišče, 11 – 16 vzorci, ločilni gel: 10 % (w/v) akrilamid, koncentracijski gel: 4 % (w/v) akrilamid. Proteini so bili detektirani s srebrom.

Figure 35: SDS – PAGE analysis of extra cellular proteins. M – solution of proteins with known M_r in kDa; K – control solid medium, 11 – 16 samples, running gel: 10 % (w/v) acrylamid, stacking gel: 4 % (w/v) acrylamid. Proteins were stained with silver.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Grozdje-moš-vino so ekosistemi, v katerih je prisotna mešana populacija kvasovk, gliv, bakterij in drugih mikroorganizmov (Fleet, 1993; Pretorius, 2000; Fleet, 2003). Glive različnih rodov povzročajo bolezni grozdja in vinske trte, tvorijo mikotoksine in s tem spreminjajo biokemijske lastnosti grozdja (Fleet, 2003). Okužbe, ki jih s svojim delovanjem v vinogradu povzročijo gliva *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel oz. predvsem njena nespolna oblika *Botrytis cinerea* Pers. in njej sorodne glive, imajo velik gospodarski pomen (Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Kvasovke, prisotne na grozdju, prehajajo v mošt, kjer imajo vodilno vlogo pri fermentaciji mošta v vino. Različna sestava populacije kvasovk in gliv na grozdni jagodi je odvisna od več dejavnikov (Barnett in sod., 1972; Davenport, 1974; Rosini in sod., 1982; Yanagida in sod., 1992; Fleet, 1993; Vaughan-Martini in Martini, 1995; Martini in sod., 1996; Török in sod., 1996; De La Torre in sod., 1999; Mortimer in Polsinelli, 1999; Pretorius in sod., 1999; Pretorius, 2000; Fleet, 2003). Vinogradniki za zagotovitev dobre kakovosti grozdja uporabljajo različne fungicidne pripravke, ki so iz različnih kemijskih skupin in specifično delujejo na klitje spor, zavirajo podaljševanje konidioforov in zavirajo rast micelija *B. cinerea* (Forster in Staub, 1996; Rosslenbroich in Stuebler, 2000). Nekatera fungicidna fitofarmacevtska sredstva delujejo inhibitorno na rast fermentativnih kvasovk, kar lahko povzroči zamik fermentacije (Cabras in sod., 1999; Cabras in Angioni, 2000). Okužba grozdnih jagod z nitastimi glivami spremeni biokemično sestavo in s tem pogoje za rast kvasovk na grozdju ter kasneje med fermentacijo (Fleet, 2003).

Razvoj odpornosti gliv na fungicide in vedno večji pritisk potrošnikov, da se zmanjša uporaba fitofarmacevtskih sredstev, vodita v razvoj novih strategij kontrole rasti gliv na grozdju. Te zajemajo predvsem uporabo kvasovk z biokontrolno aktivnostjo. Biokontrola je zanimiva nadomestna možnost za konvencionalne načine zatiranja bolezni, saj so biokontrolni mikroorganizmi manj zahtevni za okolje, njihov kompleksen način delovanja pa zmanjša možnost za razvoj odpornosti (Elad in Steward, 2004). V svetu se zato vedno več finančnih sredstev namenja za raziskave potencialnih biokontrolnih mikroorganizmov in njihovih mehanizmov delovanja. Trenutno je na voljo kar nekaj komercialnih biokontrolnih proizvodov, vendar sta samo dva, ki vsebujeta kvasovki, in sicer kvasovko *Candida oleophila* sev I-182 (Aspire®) ali *Cryptococcus albidus* (YieldPlus®), z dokazano biokontrolno aktivnostjo na rast nitaste glive (Passoth in Schnürer, 2003). Rast in razvoj kvasovk v tekočem ekosistemu mošt-vino so (in še proučujejo) proučevali številni raziskovalci, medtem ko je o okoljskih signalih, ki vplivajo na rast in razvoj kolonije na trdnih substratih, še vedno znanega zelo malo. Pomembna razlika med tekočim in trdnim substratom je v dostopnosti hranil, saj niso vse celice znotraj ene kolonije enako oddaljene

od hranil. Na podlagi omenjenega smo za izhodišče raziskovalne hipoteze postavili malo raziskano področje interakcij med različnimi vrstami in sevi kvasovk ter njihovega biokontrolnega delovanja na rast nitaste glive na grozdju. Želeli smo ugotoviti, ali so avtohtono prisotne kvasovke v okolju trta-grozdje-mošť-vino biokontrolno aktivne in ali njihova biokontrolna aktivnost vpliva na rast v istem okolju prisotne nitaste glive *B. cinerea* Pers. Zanimalo nas je tudi, ali med njimi na trdnih podlagah prihaja do interakcij med kolonijami na daljavo ali med celicami v neposrednem stiku. Prav tako smo želeli tudi proučiti, ali se pri interakcijah na trdnem substratu v okolje sproščajo signalne molekule proteinske narave.

5.1.1 Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk *in vitro*

Vpliv biokontrolne aktivnosti (BKA) kvasovk *in vitro* smo določali z enostavnim testom (Spadaro in sod., 2002). Primerjali smo BKA avtohtonih kvasovk z BKA kontrolne kvasovke *Candida oleophila* Montrocher, ki smo jo dobili iz zbirke ARS Culture Collection. Ugotovili smo, da rast nitaste glive *B. cinerea* nekatere vrste kvasovk zavirajo bolj kot kontrolna kvasovka *C. oleophila* (slika 8). Ta je rast nitaste glive zavirala 24-odstotno med celotno 30-dnevno inkubacijo. Višjo začetno povprečno biokontrolno aktivnost (merjeno sedmi dan inkubacije) na gojišču NYDA so imele vrste *Aureobasidium pullulans* (41,5 %), *Metschnikowia pulcherrima* (39,1 %) ter *M. reukaufii* (30,5 %). Njihova BKA se je proti koncu inkubacije (30. dan) sicer znižala, vendar ne pod 25 %. Glede na dobljene rezultate BKA lahko ugotovimo, da so ti primerljivi s podatki v literaturi. Še več, z istim testom so Spadaro in sodelavci (2002) za štiri seve kvasovke *M. pulcherrima* pokazali, da na gojišču NYDA zavirajo rast nitaste glive *B. cinerea* od 12,5 % do 18,8 %. Tudi Guinebretiere in sodelavci (2000) so za tri seve vrste *M. reukaufii* ter en sev vrste *M. pulcherrima* ugotovili, da zavirajo rast fitopatogene glive *B. cinerea* na gojišču PDA tako, da je cona inhibicije rasti velika od 2,3 mm do 3,5 mm, na gojišču YM pa od 2,3 mm do 3,7 mm (Guinebretiere in sod., 2000). V našem primeru so bile cone velike od 5 do 15 mm, kar kaže na boljšo BKA naših sevov. Masih in sodelavci (2001) ter Masih in Paul (2002) so ugotovili, da vrsta *Pichia membranifaciens* na plošči z nitasto glivo *B. cinerea* tvori majhno cono inhibicije. BKA te vrste kvasovke na rast glive *B. cinerea* sorodnih fitopatogenih gliv sta na sintetičnem mediju, ki vsebuje jabolčni sok, dokazala Chan in Tian (2005). Santos in sodelavci (2004) so pri tej vrsti na plošči z dodatkom NaCl (6 %) ugotovili od 6 do 32 mm veliko cono inhibicije. Vrste *P. guillermoidii*, ki je v našem poskusu pokazala najboljše rezultate, v raziskavo niso zajeli. Rast nitaste glive je po sedmih dneh inkubacije inhibirala 32,1 %, po 30 dneh pa 27,9 %. Njej sorodni vrsti *P. membranifaciens* in *P. kluyveri* sta imeli nižjo BKA, vrsta *P. membranifaciens* pa je rast nitaste glive sedmi dan zavirala za 26,4 %, vendar je njena biokontrolna aktivnost do 30. dne padla na 11,6 %.

Kvasovke drugih vrst npr.: *Bulleromyces albus*, *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces bayanus* in *S. cerevisiae* so v našem poskusu pokazale višjo ali enako začetno biokontrolno aktivnost kot kontrolna kvasovka *C. oleophila*, vendar je njihova BKA po daljšem času inkubacije padla (slika 8). Vrste *Cryptococcus* spp., *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporidiobolus pararoseus* in *Sporobolomyces roseus* so imele biokontrolno aktivnost zelo nizko že na začetku, po 30 dneh pa praktično niso inhibirale rasti nitaste glive (slika 8). Podobne rezultate so v svoji študiji predstavili tudi Santos in sodelavci (2004). Vrsta *Cry. albidus*, ki se kot biokontrolni mikroorganizem nahaja v patentiranem izdelku Yieldplus®, učinkovito deluje proti nitasti glivi *B. cinerea* na zelenjavi ter jagodah (Dik in Elad, 1999; Helbig, 2002). V našem poskusu so trije testirani sevi te vrste sedmi dan inkubacije pokazali od 3 do 4 % BKA, po 30 dneh pa se je BKA znižala na 2,5 %. Tudi ostali sevi, predstavniki več različnih vrst rodu *Cryptococcus*, so pokazali povprečno 11 % BKA na začetku, ki pa je padla na 1 % po 30 dneh inkubacije (priloga A). S povprečno začetno vrednostjo (18,9 %) biokontrolne aktivnosti se je kot zanimiva pokazala tudi vrsta *S. cerevisiae*. Po 30 dneh je vrednost BKA padla na 8,1 %. Kljub znani zimocidni aktivnosti vrste *S. cerevisiae*, ki deluje predvsem na seve iste vrste, se s to kvasovko v smislu biokontrolne aktivnosti raziskovalci niso posebej ukvarjali. Gognies in sodelavci (2001) trdijo, da je kvasovka fitopatogena za vinsko trto *Vitis vinifera*. Starejša študija (Suzzi in sod., 1995) zajame 586 sevov različnih vrst kvasovk, izoliranih s površine grozdja v Italiji, med njimi 393 sevov vrste *S. cerevisiae*. Na osnovi presejalnega testa so ugotovili, da 10 sevov vrste *S. cerevisiae* ter štirje sevi vrste *Zygosacharomyces* spp. učinkovito zavirajo rast fitopatogenih gliv *Cladosporium variabile*, *Phomopsis longicola*, medtem ko druge vrste testiranih fitopatogenih gliv npr. *B. cinerea* zavirajo slabše ali sploh ne. Vrsto *R. glutinis* nekateri viri (Castoria in sod., 1997; Calvente in sod., 2001; Qin in sod., 2004; Sansone in sod., 2005) navajajo kot biokontrolno aktivno vrsto, vendar naši sevi tega niso potrdili.

Čeprav podatki v literaturi nekatere vrste kvasovk pogosteje omenjajo kot biokontrolno aktivne kot druge, je vse več raziskovalcev prepričanih, da je ta lastnost sevno specifična (Suzzi in sod., 1995; Lima in sod., 1999; Guinebretiere in sod., 2000; Castoria in sod., 2001; Spadaro in sod., 2002; Santos in sod., 2004; Druvefors in Schnurer, 2005; Bleve in sod., 2006). Tudi v našem primeru so se znotraj posamezne biokontrolno aktivne vrste kvasovk pokazale razlike med sevi (slike 9–12). Pri vrstah z nizko povprečno BKA so razlike v BKA posameznih sevov večje (priloga A). Zato smo znotraj vrst z visoko BKA izbrali seve, ki so močno BKA pokazali takoj na začetku ter so močno zavirali rast tudi še po dolgotrajni inkubaciji.

5.1.2 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost

Vpliv petih različnih sintetičnih trdnih gojišč na pojav BKA kvasovk smo ugotavljali s testom biokontrolne aktivnosti. V test so bili vključeni trije naključno izbrani sevi vsake od 16 različnih vrst kvasovk (priloga A).

Vpliv gojišča na pojav BKA posamezne vrste kvasovk se začne kazati že tretji dan inkubacije. Iz rezultatov, predstavljenih na slikah 14–18, lahko ugotovimo, da so izbrane kvasovke na posameznem gojišču izražale različno biokontrolno aktivnost. Najbolj stabilno BKA so kvasovke izražale na gojiščih NYDA in YPDA. Biokontrolna aktivnost izbranih petih sevov različnih vrst kvasovk (*C. oleophila* Montrocher, *A. pullulans* 2098, *M. pulcherrima* 2055, *P. guillermundii* 624 in *S. cerevisiae* 2180) na gojišču NYDA se je 30. dan skupne inkubacije v povprečju gibala med 24 in 32 % za vse kvasovke, razen vrste *S. cerevisiae* (0 %), na gojišču YPDA pa so bile vrednosti med 12 in 28 %. Podobne vrednosti niso presenetljive, saj imata medija podobno sestavo. Verjetno je razlika v vrednostih posledica prisotnosti 2 g/l NaCl v mediju NYDA (gojišče YPDA ne vsebuje NaCl). Vpliv NaCl na zimocidno delovanje kvasovk so v svoji študiji predstavili Llorente in sodelavci (1997). Ugotovili so, da prisotnost NaCl v koncentraciji do 6 % (w/v) poveča občutljivost tarčnih sevov na izločene zimocine (ang. killer toxin). Tudi gojišče YM je na BKA vseh izbranih kvasovk delovalo podobno, le da lahko 30. dan zaznamo padec vrednosti BKA pod 15 %. Rezultati so pokazali tudi, da kar trije sevi vrste *M. pulcherrima* zavirajo rast nitaste glive *B. cinerea* po petih dneh inkubacije na gojišču NYDA za 45 %, na gojišču YPDA za 40 %, na gojišču YM pa za 34 %, medtem ko so Spadaro in sodelavci (2002) za svoje seve določili vrednosti BKA na gojišču NYDA od 12,5 do 18,8 %, na gojišču YPDA od 6,3 do 10,4 %, na gojišču YM pa sploh ne. BKA sevov *M. pulcherrima* je bila visoka tudi na gojišču KDM (35 %) in na gojišču WYPDA (27 %).

V naš poskus smo vključili tudi dve gojišči, po sestavi podobni vsebini grozdne jagode v času zrelosti oz. moštu. Obe gojišči KDM in WYPDA vsebujeta 200 g/l glukoze, razlikujeta se v vsebnosti ostalih makro- in mikroelementov (preglednici 9, 11). Vsebnost visoke koncentracije glukoze v mediju je najbolje izkoristila kvasovka *S. cerevisiae* in po 30 dneh skupne inkubacije zavirala rast glive za 51 % na gojišču WYPDA ter 74 % na KDM (sliki 18 in 19), kar pomeni, da je bila cona inhibicije velika 16 mm oz. 24 mm. Ugotovljena BKA kvasovke *S. cerevisiae* na mediju, po sestavi podobnemu grozdju oz. moštu, predstavlja pomembno odkritje in odpira veliko možnosti uporabe.

5.1.3 Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk *semi in vivo*

Sadje je kot vir hranil primerno mesto za rast in razvoj ne samo kvasovk, ampak tudi insektov in drugih organizmov. To je odprt sistem, v katerem prihaja do nestabilnosti

populacije kvasovk zaradi sprememb, ki jih s svojo prisotnostjo povzročajo različni organizmi (Abranches in sod., 2001). Različni raziskovalci so BKA kvasovk in drugih mikroorganizmov *semi in vivo* testirali na različnem sadju. Nekateri raziskovalci so problem zastavili širše in preučevali trojne sisteme – različno sadje kot gostitelj, različne glive kot patogen in različne kvasovke kot biokontrolni organizem (Lima in sod., 1999) ali dvojne sisteme – ena vrsta sadja, različne fitopatogene glive in različne biokontrolne kvasovke (Spadaro in sod., 2002; Qin in sod., 2004). Nekateri so se usmerili bolj specifično in preučevali biokontrolno delovanje ene vrste/seva kvasovke na eno ali dve fitopatogeni glivi na eni vrsti sadja (Mercier in Wilson, 1995; El-Ghaouth in sod., 1998; Droby in sod., 2002). V našem poskusu smo imeli sistem dveh sort grozdja *Vitis vinifera* L. cv. Rebula in *V. vinifera* L. cv. Chardonnay, tri seve fitopatogene glive *B. cinerea* (F 58, F 61 in F 63) ter po en sev kvasovk vrste *C. oleophila* Montrocher, *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 in *S. cerevisiae* ZIM 2180 z ugotovljeno biokontrolno aktivnostjo.

Iz rezultatov, predstavljenih na slikah 20–23, lahko ugotovimo, da je sorta grozdja rebula bolj dovzetna za okužbe z nitasto glivo *B. cinerea* od sorte chardonnay. Okuženost grozdnih jagod sorte rebula skupine A, tretiranih z iglo, je od 62 % do 74 % (slika 20), medtem ko se okuženost grozdnih jagod sorte chardonnay, prav tako tretiranih z iglo, giblje med 13 % in 34 % (slika 22). Okuženost skupine K, tretirane z brizganjem, se pri sorti rebula giblje med 13 % in 24 % (slika 21), pri sorti chardonnay pa med 3 % in 14 % (slika 23). Ugotovimo lahko tudi, da v skladu z ugotovljeno BKA na sintetičnih gojiščih WYPDA in KDM kvasovka *S. cerevisiae* 2180, ne glede na to, kako smo jo nanegli, na grozdju obeh sort zavira rast in razvoj nitaste glive *B. cinerea*. Tudi *C. oleophila* Montrocher in *M. pulcherrima* 2055 na začetku znižata stopnjo okuženosti grozdnih jagod sorte chardonnay, tretiranih bodisi z injekcijsko iglo ali brizgo (skupina A), medtem ko na grozdju sorte rebula znižata stopnjo okuženosti, če sta nanegli s pršenjem (skupina K). Popolnoma nasprotno ne glede na to, kako smo na grozdje obeh sort nanegli biokontrolno kvasovko *P. guilliermondii* 624, le-ta poveča stopnjo okuženosti v primerjavi s skupinama D oz. N. Tudi kvasovka *A. pullulans* 2098 namesto pričakovane znižane stopnje okuženosti le-to poveča razen v skupini A na grozdju sorte chardonnay. Če pa 24 ur pred okužbo s fitopatogeno glivo nanese biokontrolno kvasovko, je slika nekoliko drugačna. Na grozdju sorte rebula je stopnja okuženosti grozdnih jagod skupin B in L večja od stopnje okuženosti skupin grozdnih jagod, na katere smo po 24 urah nanegli samo fitopatogeno glivo (skupini E in O). Na grozdju sorte chardonnay stopnjo okužbe znižata vrsti *C. oleophila* Montrocher in *A. pullulans*, zvečata pa jo kvasovki *M. pulcherrima* in *S. cerevisiae*. Nekateri študije, ki obravnavajo predvsem namizno grozdje, navajajo, da lahko pojav bolezni na grozdju zmanjšajo kvasovke *A. pullulans* (Lima in sod., 1999; Schena in sod., 2003), *M. pulcherrima* (Bleve in sod., 2006) ter *Candida guilliermondii* (Zahavi in sod., 2000).

O povečani stopnji okuženosti oz. o grozdni gnilobi kot posledici okužbe s kvasovkami so pred 20 leti poročali Bisiach in sodelavci (1986). Kot močno invazivne navajajo vrste *Hanseniaspora uvarum*/*Kloeckera apiculata*, *Saccharomycopsis vini*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* in druge, za katere danes vemo, da so pomembne pri fermentaciji mošta.

5.1.4 Vpliv celičnega stika

Vpliv celičnega stika smo spremljali med kvasovko in nitasto glivo *B. cinerea* na trdnem sintetičnem gojišču. Iz rezultatov, predstavljenih v preglednici 26, lahko povzamemo, da je celični stik pomemben dejavnik, ki vpliva na BKA posamezne vrste oz. seva kvasovke. Kvasovke vrst *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* popolnoma inhibirajo rast treh testiranih sevov nitaste glive *B. cinerea* na gojišču NYDA. Ovrednotenje BKA v smislu spremljanja kinetike rasti nitaste glive na primarnem nanosu različnih vrst oz. sevov kvasovk ni bilo mogoče, saj je sedmi dan inkubacije gliva na kontrolni plošči dosegla njen rob. Mehanska ovira oz. pomanjkanje prostora je torej onemogočilo spremljati kinetiko rasti nitaste glive na plošči z nanosom/brez nanosa kvasovk.

Iz rezultatov, predstavljenih v preglednici 27, lahko ugotovimo, da si kvasovke vrst *C. oleophila* Montrocher, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* na gojišču NYDA s primarnim nanosom različnih sevov nitaste glive izborijo prostor in hrano. Po 30 dneh inkubacije opazimo razlike v velikosti kolonij na ploščah s primarnim nanosom v primerjavi z velikostjo kolonij nitaste glive na kontrolnih ploščah. Ena od mogočih razlag bi lahko bila časovna prednost – glivo smo na ploščo nanесли 48, 72 ali 96 ur pred nanosom kvasovke, vendar kolonija kvasovk po 30 dneh skupne inkubacije doseže isto končno velikost ne glede na to, ali smo jo nanесли 48, 72 ali pa 96 ur po posušitvi plošče. Bolj verjetna je torej razlaga, da je zaradi sočasne rasti nitaste glive in kvasovke na isti plošči po 30 dneh inkubacije zmanjkalo hranil in prostora. Mogoče je tudi, da nitasta gliva s svojo prisotnostjo zavira rast kvasovk. Kvasovka *A. pullulans* je sposobna rasti na površini primarnega nanosa glive *B. cinerea* le v koncentracijskem razmerju $10^6 : 10^3$.

Vpliv celičnega stika med dvema vrstama kvasovk smo določali s testom za določanje zimocidne aktivnosti. Rezultati kažejo, da imajo kvasovke različno močno zimocidno aktivnost in tako druga na drugo različno vplivajo. Izbrani sev vrste *S. cerevisiae* ni kazal zimocidne aktivnosti niti na zelo občutljivo kvasovko *S. cerevisiae* S6 niti na kvasovke drugih vrst. Njegove BKA na rast nitaste glive *B. cinerea*, ugotovljene na gojiščih z visokim deležem glukoze ter na grozdnih jagodah, ne moremo povezati z zimocidnostjo. Zimocidno aktivnost vrste *P. guilliermondii* in drugih vrst rodu *Pichia* so dokazali različni raziskovalci (Izgu in sod., 1997; Santos in sod., 2000; Zagorc in sod., 2001; Comitini in sod., 2004a; Comitini in sod., 2004b; Santos in Marquina, 2004; Izgu in sod., 2005; Izgu in

sod., 2006), medtem ko naj bi bil za inhibitorno delovanje vrste *M. pulcherrima* na rast drugih kvasovk odgovoren pigment pulherimin, ki ga ta kvasovka izloča v svojo okolico (Nguyen in Panon, 1998). Šibko do zmerno zimocidno delovanje sta pokazali kvasovki *C. oleophila* in *A. pullulans* na kvasovko *S. cerevisiae* S6 ter na druge vrste kvasovk pri navzkrižnem testu.

5.1.5 Signalne molekule

Celice kvasovk, ki rastejo na trdnih gojiščih, lahko tvorijo organizirane enote – kolonije, ki so nemobilne, zato je oblika kolonije odvisna od načina celične delitve kvasovk. Prav zato verjetno obstajajo pozicijske informacije in znotrajcelični signali, ki določajo mesto začetka naslednje celične delitve, smer rasti in razporeditev celic znotraj kolonije. V tem pogledu je tvorba kolonije kvasovk podobna organizaciji specializiranih tkiv pri višjih evkariontih (Mináriková in sod., 2001). V starejši študiji so Palková in sodelavci (1997) dokazali, da so kvasovke iste vrste sposobne sprejemati in oddajati signale na daljavo. Kot signalno molekulo so dokazali amoniak. Dokazali so tudi, da kolonija, ki prva preide v fazo intenzivne tvorbe amoniaka, kot odgovor sproži tvorbo amoniaka sosednjih kolonij in posledično sinhronizacijo rasti (Palková in Forstová, 2000).

V naši raziskavi smo pojav signalne molekule amoniaka določali posredno kot spremembo barve gojišča v okolici kolonij kvasovk po metodi, ki so jo predstavili Palková in sodelavci (1997). Na testnem barvnem gojišču se zaradi tvorbe zunajceličnih signalnih molekul (najverjetneje amoniaka) okolica kolonij spremeni. Sprememba barve gojišča iz rumene v vijolično je posledica dviga vrednosti pH s 5,2 na 6,8. Posamezne celice kvasovk iste vrste (monokolonije) smo z mikromanipulatorjem nanесли na točno določeno razdaljo med kolonijami (slika 7). Pri kvasovki *A. pullulans*, se je začela spreminjati barva gojišča kmalu po inokulaciji (po 24 urah), v okolici vseh kolonij ne glede na oddaljenost (slika 29). Tudi okolica kolonije kvasovke *C. oleophila* se je spremenila, vendar šele po štirih dneh inkubacije. Pri drugih kvasovkah spremembe barve gojišča v vijolično kot posledice tvorbe signalne molekule nismo opazili niti po sedmih dneh. Pri vrsti *Candida mogii* so Palková in sodelavci (1997) pojav tvorbe amoniaka spremljali sedem dni in dokazali začetek tvorbe amoniaka po 19 urah inkubacije. Temu pojavu je sledil padec vrednosti pH oz. pojav rumene barve v okolici kolonije kot odgovor na prisotnost sosednje kolonije. Zaradi zaznavanja sosednje kolonije je sledil drugi, še močnejši impulz tvorbe amoniaka, ki se je pri tej vrsti pojavil po 114 urah inkubacije. V našem primeru pojav vijolične barve ni sledil pojav rumene, temveč je signal postajal močnejši in vijolična barva se je do sedmega dne inkubacije močno razvila, kar kaže na to, da kolonije kvasovk iste vrste *A. pullulans* ali *C. oleophila* tvorijo zunajcelične signalne molekule, vendar te molekule kvasovke ne zaznavajo kot povratnega signala komunikacije.

Kvasovke različnih vrst smo na testno ploščo na določeno razdaljo med kolonijami (slika 7) nanесли kot suspenzijo celic. Pojav vijolične barve smo opazili po 24 urah inkubacije na tistih ploščah, na katerih je bila prisotna kvasovka *A. pullulans*. Nastanek signalne molekule (najverjetneje amoniaka) so zaznale kvasovke drugih vrst in nanj odgovorile s spremembo barvila v svoji okolici. Ta se pri kombinaciji kvasovk *A. pullulans* in *C. oleophila* pojavi že po dveh dneh. Pri kombinacijah *A. pullulans* z drugimi tremi kvasovkami pa je izražena po šestih dneh inkubacije (slika 31). Opazimo lahko tudi, da je v okolici bolj oddaljenih kolonij (vrst *P. guilliermondii* in *M. pulcherrima*) od kolonij vrste *A. pullulans* vidna sprememba gojišča v rumeno barvo (slika 31). Na ploščah, na katerih smo nacepili kombinaciji kvasovk *C. oleophila* in *M. pulcherrima*, *C. oleophila* in *P. guilliermondii* ter *C. oleophila* in *S. cerevisiae*, se barva gojišča po določenem času spremeni samo v okolici kolonij vrste *C. oleophila* (slika 32). Glede na rezultate lahko sklepamo, da vrsta *C. oleophila* tvori signalne molekule, ki zvišajo vrednost pH. Opazimo tudi, da druge tri vrste kvasovk spremenijo barvo gojišča okoli kolonije v rumeno. Verjetno gre v teh primerih za nastanek signalnih molekul, ki vrednost pH v okolici kolonij znižajo pod 5,2. Spremembo barvila gojišča v rumeno opazimo tudi pri kombinaciji kvasovk *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii*, *M. pulcherrima* in *S. cerevisiae* ter *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* (slika 33).

Na minimalnem gojišču z manozo smo po 21 dneh inkubacije motno oz. bistro cono opazili med kvasovkami vrste *A. pullulans* in drugimi tremi vrstami kvasovk. Usmerjeno motno cono, ki nakazuje komunikacijo med kolonijami na daljavo, smo med kolonijama kvasovk *C. oleophila* in *S. cerevisiae* opazili po 28 dneh inkubacije (preglednica 31, slika 30b). Motna ali bistra cona se je pojavila tudi pri kombinaciji kvasovk *C. oleophila* in *M. pulcherrima*.

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE analiza) zunajceličnih proteinov je pokazala, da kontrolni vzorec ne vsebuje proteinov (sliki 34, 35). Največ proteinov v svojo okolico izločajo kvasovke vrste *A. pullulans*. Razlika med motno in bistro cono okoli monokolonije kvasovke *A. pullulans* se je pokazala kot dodaten protein velikosti okoli 25 kDa, ki se je pojavil v bistri coni. Pri vrsti *C. oleophila* Montrocher smo opazili prisotnost enega proteina ocenjene velikosti okoli 55 kDa. Ta se je poleg dveh, ki najverjetneje izhajata od kvasovke *S. cerevisiae*, z ocenjenima velikostma 40 kDa in 25 kDa pokazal tudi v vzorcu usmerjene motne cone med *C. oleophila* in *S. cerevisiae*. V vzorcih cone, ki smo jo izolirali iz okolice kolonij kvasovk *C. oleophila* in *M. pulcherrima*, lahko poleg že omenjenega, približno 55 kDa velikega proteina, opazimo še dva proteina, z ocenjeno velikostjo okoli 40 kDa in 35 kDa.

Na podlagi napisanega lahko ugotovimo, da so avtohtono prisotne kvasovke v okolju trta-grozdje-moš- vino biokontrolno aktivne in da njihova BKA vpliva na rast v istem okolju

prisotne nitaste glive *B. cinerea* Pers. Hkrati smo BKA dokazali tudi za vodilno kvasovko alkoholne fermentacije *Saccharomyces cerevisiae*. Njena BKA je na gojiščih, podobnih vsebini grozdne jagode oz. mošta, tudi po dolgotrajni inkubaciji zelo visoka. To odkritje odpira nove možnosti v razumevanju pojavnosti oz. prisotnosti primarne populacije vinskih kvasovk in drugih gliv že na grozdju ter interakcij med njimi. Med kvasovkami in nitasto glivo prihaja do interakcij v neposrednem stiku, najverjetneje gre za kompeticijo za hrano in prostor. Očitne so tudi interakcije med kolonijami iste ali različnih vrst kvasovk na daljavo, saj pri tem med kolonijami različnih vrst kvasovk nastane usmerjena motna oz. bistra cona. Za komunikacijo med kvasovkama *C. oleophila* in *S. cerevisiae* ni znanstvenih objav. Zato bodo pridobljene ugotovitve pomembno prispevale k razumevanju komunikacije med različnimi rodovi in vrstami kvasovk, hkrati pa so lahko spoznanja s tega področja uporabna tudi širše v naravnem okolju, saj se lahko kvasovke kot biokontrolni agenti v praksi zelo različno uporabljajo.

5.2 SKLEPI

Nekatere vrste kvasovke, izolirane iz ekosistema trta-grozdje-moš-vino v Sloveniji, imajo močno BKA na rast nitaste glive *B. cinerea* Pers. Višjo povprečno BKA so na gojišču NYDA imele vrste *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii*. Kvasovke drugih vrst npr.: *Bulleromyces albus*, *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces bayanus* in *S. cerevisiae* so pokazale zmerno začetno biokontrolno aktivnost, vendar je njihova BKA v času inkubacije padala. Vrste *Cryptococcus* spp., *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporidiobolus pararoseus* in *Sporobolomyces roseus* pa niso biokontrolno aktivne.

Biokontrolna aktivnost je sevno specifična lastnost. Med kvasovkami z visoko biokontrolno aktivnostjo smo izbrali seve z najvišjo BKA: *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 in *S. cerevisiae* ZIM 2180.

Na BKA kvasovk vpliva sestava gojišča. Moštu podobna medija WYPDA in KDM vplivata na BKA kvasovke *S. cerevisiae*. Po 30 dneh skupne inkubacije le-ta zavira rast glive za 51 % na gojišču WYPDA in 74 % na KDM.

Sorta grozdja rebula (*Vitis vinifera* L.) je bolj dovzetna za okužbo z nitasto glivo *B. cinerea* kot sorta chardonnay (*V. vinifera* L.). Okuženost grozdnih jagod sorte rebula (*V. vinifera* L.), tretiranih z injekcijsko iglo, je znašala od 62 % do 74 %, medtem ko se okuženost grozdnih jagod sorte chardonnay (*V. vinifera* L.), prav tako inficiranih z injekcijsko iglo, giblje med 13 % in 34 %. Okuženost skupine, tretirane s pršenjem, je bila pri sorti rebula (*V. vinifera* L.) med 13 % in 24 %, pri sorti chardonnay (*V. vinifera* L.) pa med 3 % in 14 %.

Kvasovka *S. cerevisiae* na grozdju obeh sort zavira rast in razvoj nitaste glive *B. cinerea* ne glede na to, kako smo biokontrolno kvasovko nanесли. Kot dobri biokontrolni kvasovki se *semi in vivo* pokažeta tudi seva vrste *C. oleophila* in *M. pulcherrima*.

Celični stik je pomemben dejavnik, ki vpliva na BKA posamezne vrste oz. seva kvasovke. Primarni nanos kvasovk vrst *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* na trdno gojišče NYDA popolnoma inhibira rast treh testiranih sevov nitaste glive *B. cinerea*. Obratno pa si, na gojišču NYDA s primarnim nanosom glive *B. cinerea*, vse kvasovke izborijo prostor in hrano.

Izbrani sevi kvasovk imajo različno izraženo zimocidno aktivnost. Močno zimocidno delovanje sta pokazala seva vrste *P. guilliermondii* ZIM 624 in sev vrste *M. pulcherrima* ZIM 2055. Šibko do zmerno zimocidno delovanje sta pokazali kvasovki *C. oleophila* ZIM

2276 in *A. pullulans* ZIM 2098. Sev vrste *S. cerevisiae* ZIM 2180 ni kazal zimocidne aktivnosti.

Tvorbo signalne molekule, najverjetneje amoniaka, smo posredno opazili pri kolonijah vrst *A. pullulans* in *C. oleophila*, pri drugih vrstah tega nismo zaznali. Kvasovka *A. pullulans* tvori signalne molekule, ki spremenijo vrednost pH gojišča v prisotnosti kolonij drugih vrst kvasovk. Te po določenem času odgovorijo z lastno tvorbo signalnih molekul. Tudi kvasovka *C. oleophila* na plošči v prisotnosti kolonij drugih vrst tvori signalne molekule. Kvasovke *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* ne tvorijo signalnih molekul, ki bi barvo spremenile v vijolično, se pa barva v okolici njihovih kolonij spremeni v rumeno, kar kaže na padec vrednosti pH gojišča v njihovi okolici pod 5,2. Mogoče je, da te vrste kvasovk tvorijo drugačne vrste signalnih molekul.

Med kolonijama kvasovk *C. oleophila* in *S. cerevisiae* se po določenem času inkubacije tvori usmerjena motna cona, ki nakazuje interakcijo med kolonijami različnih rodov kvasovk na daljavo.

Razlike v proteinskem profilu motne in bistre cone vzorca kvasovke *A. pullulans* lahko opazimo kot dodaten protein (velikosti okoli 25 kDa) v bistri coni vzorcev. V vzorcu usmerjene motne cone med kvasovkama *C. oleophila* in *S. cerevisiae* lahko opazimo tri proteine, velike približno 55 kDa, 40 kDa in 25 kDa.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Gliva *Botrytis cinerea* Pers. in njej sorodne glive po svetu povzročajo veliko gospodarsko škodo pri pridelavi grozdja ter drugega sadja in zelenjave, okrasnega cvetja ter pri shranjevanju in transportu kmetijskih pridelkov. Z uporabo fungicidnih sredstev, t. i. botriticidov, lahko zmanjšamo pojav, rast in razvoj gliv na rastlinah. Biokontrola je zanimiva nadomestna možnost za konvencionalne metode, saj so botriticidi vedno manj zaželeni. Mikrobní biokontrolni organizmi so manj obremenjujoči za okolje, njihov kompleksen način delovanja pa zmanjša možnost pojava odpornosti.

V prvem delu smo ugotavljali biokontrolno aktivnost (BKA) 607 avtohtonih sevov različnih vrst kvasovk na rast nitaste glive *B. cinerea*, ki se v Sloveniji pojavlja na substratih trta-grozdje-mošť-vino. BKA sevov smo določali *in vitro* na sintetičnih trdnih gojiščih. Rast glive *B. cinerea* so nekatere vrste kvasovk zavirale bolj kot kontrolna kvasovka *C. oleophila* Montrocher. Med posameznimi sevi znotraj iste vrste kvasovk so se pokazale razlike v BKA. Najvišjo BKA so pokazali izbrani sevi vrst *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 ter *S. cerevisiae* ZIM 2180. Na BKA je vplivala tudi sestava sintetičnega hranilnega gojišča. Na gojiščih KDM in WYPDA, ki vsebujeta 200 g/l glukoze, je kvasovka *S. cerevisiae* zavirala rast glive za 74 % na KDM in za 51 % na gojišču WYPDA.

V nadaljevanju naših raziskav smo BKA izbranih sevov preverili v sistemu *semi in vivo* na grozdnih jagodah dveh sort. Okuženost grozdnih jagod sorte rebula (*Vitis vinifera* L. cv. Rebula), tretiranih z injekcijsko iglo, je precej velika, in sicer od 62 do 74 %, medtem ko se okuženost grozdnih jagod sorte chardonnay (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay), prav tako tretiranih z injekcijsko iglo, giblje med 13 in 34 %. Okuženost grozdnih jagod, tretiranih s pršenjem, je bila pri sorti rebula med 13 in 24 %, pri sorti chardonnay pa med 3 % in 14 %. Kvasovka *S. cerevisiae* je na grozdju obeh sort zavirala rast in razvoj nitaste glive *B. cinerea*.

Prav tako smo raziskave usmerili v preučevanje interakcij med kvasovkami in nitasto glivo v celičnem stiku. Primarni nanos kvasovk vrst *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii*, na trdno gojišče NYDA, popolnoma inhibira rast treh testiranih sevov nitaste glive *B. cinerea*. In obratno – na gojišču NYDA s primarnim nanosom nitaste glive si kvasovke *C. oleophila*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* in *S. cerevisiae* izborijo prostor in hrano ter na ta način omejijo rast glive *B. cinerea*.

Ugotavljali smo vpliv celičnega stika med dvema vrstama kvasovk. Izbrani sev vrste *S. cerevisiae* ZIM 2180 ni kazal zimocidne aktivnosti na izbrane testne kvasovke. Šibko do

zmerno zimocidno delovanje sta pokazali kvasovki *C. oleophila* in *A. pullulans* na sev kvasovke *S. cerevisiae* S6 ter na druge vrste kvasovk pri navzkrižnem testu.

Pojav signalnih molekul, ki na trdnem gojišču omogočajo komunikacijo med kolonijami kvasovk na daljavo, smo ugotavljali v zadnjem delu raziskav. Po 24 urah je okolica kolonij kvasovke *A. pullulans* začela spreminjati barvo, kot posledico tvorbe signalnih molekul, najverjetneje amoniaka. Pri kvasovki *C. oleophila* smo tvorbo signalnih molekul opazili šele po štirih dneh inkubacije. Pri drugih vrstah kvasovk tvorbe signalnih molekul kot spremembo vrednosti pH v okolici kolonij nismo opazili.

Na minimalnem gojišču smo po 28 dneh inkubacije med kolonijama kvasovk *C. oleophila* in *S. cerevisiae* opazili usmerjeno motno cono, kar kaže na komunikacijo med kolonijami na daljavo. Motna ali bistra cona se je pojavila tudi pri drugih kombinacijah kvasovk. Količino proteinov v vzorcih motne ali bistre cone smo izmerili spektrofotometrično. Z poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE) smo analizirali zunajcelične proteine. Vzorci con izoliranih iz okolice kolonij kvasovke *A. pullulans* so vsebovali enake proteinske profile, z razliko enega proteina velikosti okoli 25 kDa, ki se je pojavil v vzorcih bistre cone. Pri vrsti *C. oleophila* Montrocher smo opazili prisotnost enega proteina ocenjene velikosti okoli 55 kDa. Poleg tega, se v vzorcu usmerjene motne cone med *C. oleophila* in *S. cerevisiae* nahajata še dva z ocenjenima velikostma 40 kDa in 25 kDa, ki najverjetneje izhajata od kvasovke *S. cerevisiae*. V vzorcih cone, ki smo jo izolirali iz okolice kolonij kvasovk *C. oleophila* in *M. pulcherrima*, pa smo poleg približno 55 kDa velikega proteina opazili še dva z ocenjeno velikostjo okoli 40 kDa in 35 kDa. Potrebne so nadaljnje raziskave, saj med količino v vzorcih določenih proteinov in rezultati, dobljenimi z gelsko elektroforezo, ni povezave.

6.2 SUMMARY

Filamentous fungi *Botrytis cinerea* Pers. and related species are of great economical importance, since they affect many fruits including grapes and vegetables, flowers and other products. Chemical control and use of botryticides is by now most effective way to prevent occurrence of *Botrytis* disease. But since increased public concern and fast development resistance by fungi to novel fungicides, biocontrol became an interesting alternative to conventional methods. Microbe biocontrol agents are less demanding to nature, and their complex way of working decreases risk for resistance development.

The aim of our study was to screen 607 autochthonous yeast strains for their biocontrol activity (BCA). BCA of yeast strains was tested *in vitro* on solid synthetic medium. Between yeast species differences in their biocontrol activity (%) were found: *Aureobasidium pullulans* (41.5 %), *Metschnikowia pulcherrima* (39.1 %), *Pichia guilliermondii* (29.6 %) and *Saccharomyces cerevisiae* (25.9 %), respectively. Selected strains *A. pullulans* ZIM 2098, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guilliermondii* ZIM 624 and *S. cerevisiae* ZIM 2180 showed best BCA between the strains of their own species. The composition of solid synthetic medium had impact on BCA. *S. cerevisiae* showed 74 % and 51 % inhibition of filamentous fungi growth on KDM and WYPDA medium, respectively.

Biocontrol activity of selected yeast strains was evaluated also on *semi in vivo* tests. Grape berries of two cultivars (*Vitis vinifera* L.) were treated either with needle or with spraying. Grape berries of cultivar Rebula were more sensitive to *Botrytis* infection than grape berries of cv. Chardonnay. Degree of infected grape berries was 62 % to 74 % on berries cv. Rebula treated with needle, while on cv. Chardonnay infection was 13 % to 34 %. Berries treated with spraying were 13 % to 24 % and 3 % to 14 % for cv. Rebula and Chardonnay, respectively. Yeast *S. cerevisiae* inhibited occurrence of *B. cinerea* disease on grapes of both cultivars.

In our work, the interaction between yeasts and filamentous fungi in cell-to-cell contact were studied as well. On solid medium primary biocoated with yeast species *A. pullulans*, *M. pulcherrima* and *P. guilliermondii* growth of *B. cinerea* was completely inhibited. And vice versa, on solid synthetic medium previously inhabited with *B. cinerea* yeast species *C. oleophila*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii* and *S. cerevisiae* find their place and food for growth.

Cell-to-cell contact between two yeast species were estimated on the basis of killer activity. Yeast strain *S. cerevisiae* ZIM 2180 had no killer activity neither on supersensitive yeast *S. cerevisiae* S6, neither on yeasts of other species. Weak to medium

killer activity showed yeasts *C. oleophila* and *A. pullulans* on *S. cerevisiae* S6 and to other yeast species.

Signal molecules enables long-distance communication between yeast colonies. After 24 hours of incubation the surrounding of *A. pullulans* colonies changed color, as consequence of signal molecules (most likely NH_3) production. Medium color change were also observed around *C. oleophila* colonies, but only after 4 days of incubation. Signal molecule production as changes in pH value in the medium around colonies were not observed for any other yeast species.

After 28 days of incubation the directed turbid path was observed between colonies of *C. oleophila* and *S. cerevisiae*. Turbid or clear zone was also observed with other yeasts. Quantity of proteins were measured spectrophotometrically and analyzed using SDS-PAGE analysis. Samples collected from surrounding of *A. pullulans* colonies showed identical protein profiles for clear and turbid zone, with difference of one protein with approximate size of 25 kDa present in clear zone. In samples collected near *C. oleophila* colonies protein with approximate size of 55 kDa was noticed. Beside this one, in sample of directed turbid zone between *C. oleophila* and *S. cerevisiae*, two more proteins with approximate size 40 kDa and 25 kDa, probably originated from *S. cerevisiae*, were found. In samples of turbid zone between colonies of *C. oleophila* and *M. pulcherrima*, beside protein with approx. size 55 kDa, proteins with approx. size 40 kDa and 35 kDa were noticed. For detailed protein profile further experiments should be performed.

7 VIRI

Abranches J., Starmer W. T., Hagler A. N. 2001. Yeast-yeast interactions in guava and tomato fruits. *Microbial Ecology*, 42: 186-192.

Ait Barka E., Eullaffroy P., Clement C., Vernet G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22, 8: 608-614.

Alexandre H., Costello P. J., Remize F., Guzzo J., Guilloux-Benatier M. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* - *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 141-154.

Andrews J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 603-635, citiran v: Elad Y., Steward A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. V: *Botrytis*: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 223-241.

Barnett J. A., Delaney M. A., Jones E., Magson A. B., Winch B. 1972. The number of yeasts associated with grapes of Bordeaux. *Archives of Microbiology*, 83: 52-55.

Bassler B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2, 6: 582-587.

Battilani P., Pietri A. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 639-643.

Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A. N., Velázquez-del Valle M. G., Hernández-López M., Ait Barka E., Bosquez-Molina E., Wilson C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 2: 108-118.

Beever R. E., Weeds P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. V: *Botrytis*: biology, pathology and control Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 29-52.

Ben-Shalom N., Ardi R., Pinto R., Aki C., Fallik E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, 2: 285-290.

Bhaskara Reddy M. V., Belkacemi K., Corcuff R., Castaigne F., Arul J. 2000. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 1: 39-51.

Bisiach M., Minervini G., Zerbetto F. 1986. Possible integrated control of grapevine sour rot. *Vitis*, 25: 118-128.

Blažič M., Seljak G., Žežlina I. 2001. Nekajletne izkušnje pri zatiranju sive grozdne plesni *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Fuck. na Primorskem. Zbornik predavanj in referatov 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 129-134.

Bleve G., Grieco F., Cozzi G., Logrieco A., Visconti A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. International Journal of Food Microbiology, 108: 204-209.

Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: 102-192.

Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 1-2: 248-254.

Cabras P., Angioni A. 2000. Pesticide residues in grappes, wine, and their processing products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 4: 967-973.

Cabras P., Angioni A., Garau V. L., Pirisi F. M., Fariss G. A., Madau G., G. E. 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3854-3857.

Calvente V., de Orellano M. E., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M. I. 2001. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodothorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 26: 226-229.

Carrete R., Vidal M. T., Bordons A., Constanti M. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiology Letters, 211: 155-159.

Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biology and Technology, 22: 7-17.

Castoria R., de Curtis F., Lima G., de Cicco V. 1997. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biology and Technology, 12: 293-300.

Chan Z., 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.

Charoenchai C., Fleet G. H., Henschke P. A., Todd B. E. N. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Australian Journal of Grape & Wine Research, 3, 1: 2-8.

Charpentier C., Feuillat M. 1993. Yeast autolysis. V: Wine microbiology and biotechnology Fleet G.H. (ed). Philadelphia, Harwood Academic Publishers. 225-242.

Chen W. B., Han Y. F., Jong S. C., Chang S. C. 2000. Isolation, purification and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 12: 5348-5352.

Ciani M., Fatichenti F. 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. Applied and Environmental Microbiology, 67: 3058-3063.

Coertze S., Holz G. 1999. Surface colonization, penetration, and lesion formation on grapes inoculated fresh or after cold storage with single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 83: 917-924.

Coertze S., Holz G. 2002. Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: wound infection by dry, airborne conidia. South African Journal for Enology and Viticulture, 23, 2: 72-77.

Coertze S., Holz G., A. S. 2001. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 85: 668-677.

Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M. 2004a. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. FEMS Microbiology Letters, 238: 235-240.

Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Mannazzu I., Ciani M. 2004b. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. Microbiology Ecology, 150: 2535-2541.

Cook D. W. M., Long P. G., Ganesh S. 1999. The combined effect of delayed application of yeast biocontrol agents and fruit curing for the inhibition of the postharvest pathogen *Botrytis cinerea* in kiwifruit. Postharvest Biology and Technology, 16: 233-243.

Čuš F. 2005. Delovanje nekaterih fungicidov na kvasovke s površine grozdne jagode pri sorti Rebula (*V. vinifera*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 168 str.

Čuš F., Juretič V., Korošec-Koruza Z. 2003. Učinkovitost štirih botriticidov pri sorti Rebula (*Vitis vinifera* L.) v vinorodnem okolišu Goriška Brda v letu 2002. Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 144-148.

Davenport R. R. 1974. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. Vitis, 13: 123-130.

De La Torre M. J., Millan M. C., Perez-Juan P., Morales J., Ortega J. M. 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. Microbios, 100, 395: 27-40.

Dermastia M. 2006. Rastlinski mikrob in patogeneza. Teze predavanj 2005-2006. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. <http://botanika.biologija.org/predmeti/MB-4L-teze-predavanj-2006.pdf>. (17.9.2006)

Dik A. J., Elad Y. 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 123-137.

Dixon R. A., Paiva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097.

Doneche B. J. 1993. Botrytized wines. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Philadelphia, Harwood Academic Publishers. 327-351.

Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Katz H., Chalutz E., Keren-Tzur M., Shachnai A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12: 97-101.

Droby S., Lichter A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 349-367.

Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E. E., Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92, 4: 393-399.

Droby S., Wisniewski M., El Ghaouth A., Wilson C. 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, 27: 127-135.

Druvefors U. A., Schnurer J. 2005. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*, 5: 373-378.

Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: reserch progress in the last 15 years. *General Applied Plant Physiology*, 31, 1-2: 105-124.

Elad Y., Malathrakis N. E., Dik A. J. 1996. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection*, 15, 3: 229-240.

Elad Y., Steward A. 2004. Microbial control of *Botrytris* spp. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 223-241.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 1-8.

El-Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88, 4: 282-291.

Ellison P., Asha G., McDonald C. 1998. An expert system for the management of *Botrytis cinerea* in Australian vineyards. 1. Development. *Agricultural Systems*, 56, 2: 185-207.

Elmer P. A. G., Michailides T. J. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publisher. 243-272.

Farias M. E., Manca de Nadra M. C. 2000. Purification and partial characterisation of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiology letters*, 185: 263-266.

Fleet G. H. 1991. Cell walls. V: *The yeasts*, 2nd edn. Vol. 4: Yeast organelles. Rose A.H., Harrison J.S. (ed). London, Academic Press. 243-253.

Fleet G. H. 1993. The microorganisms of winemaking - isolation, enumeration and identification. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 1-26.

Fleet G. H. 1998. Yeasts - what reactions and interactions really occur in natural habitats. *Food Technology and Biotechnology*, 36, 4: 285-289.

Fleet G. H. 2003a. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11-22.

Fleet G. H. 2003b. Yeasts in fruit and fruit products. V: *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects* Boekhout T., Robert V. (ed). Boca Raton, CRC Press. 267-287.

Fleet G. H., Heard G. M. 1993. Yeasts - growth during fermentation. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 27-54.

Fleet G. H., Prakitchaiwattana C., Beh A. L., Heard G. 2002. The yeast ecology of wine grapes. V: *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts* Ciani M. (ed). India, Research Singpost. 1-17.

Flegelová H., Novotná D., K. V., Janderová B. 2002. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Research*, 2, 1: 73-79.

Forster B., Staub T. 1996. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 15, 6: 529-537.

Franck J., Latorre B. A., Torres R., Zoffoli J. P. 2005. The effect of preharvest fungicide and postharvest sulfur dioxide use on postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 37: 20-30.

Fredlund E., Druvefors U., Boysen M. E., Lingsten K. J., Schnuerer J. 2002. Physiological characteristics of the biological yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*, 2: 395-402.

Fugelsang K. C. 1997. Yeasts and molds. V: Wine microbiology(ed). New York, Chapman & Hall. 68-115.

Gognies S., Belarbi A., Ait Barka E. 2001. *Saccharomyces cerevisiae*, a potential pathogen towards grapevine, *Vitis vinifera*. FEMS Microbiology Ecology, 37, 2: 143-150.

Golubev W. I. 1998. Mycocines - killer toxins. V: The yeasts, a taxonomy study Kurtzman C.P., Fell J.W. (ed). Amsterdam, Elsevier Science. 55-62.

Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Fischer E., Dinoor A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppresion. Phytopathology, 92: 976-985.

Guinebretiere M. H., Nguyen-The C., Morrison N., Reich M., Nicot P. 2000. Isolation and characterisation of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. Journal of Food Protection, 63, 3: 386-394.

Heath M. C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion in Plant Biology, 3: 315-319.

Heath M. C. 2001. Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? Physiological and Molecular Plant Pathology, 58: 53-54.

Heath M. C. 2002. Cellular interactions between biotrophic fungal pathogens and host or nonhost plants. Canadian Journal of Plant Pathology, 24: 259-264.

Helbig J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. BioControl, 47: 85-99.

Henick-Kling T. 1993. Malolactic fermentation. V: Wine microbiology and biotechnology Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 289-326.

Henschke P. A., Jiranek V. 1993. Yeasts - metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 77-164.

Holz G., Coertze S., Williamson B. 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. V: *Botrytis*: biology, pathology and control Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 9-28.

Holz G., Guetschow M., Coertze S. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. Plant Disease, 87, 4: 351-358.

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte: ilustriran prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, SVA Veritas: 191.

Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. E. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 265-272.

Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 36: 245-252.

Izgu F., Altinbay D. 2004. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, 68, 3: 685-693.

Izgu F., Altinbay D., Acun T. 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 4: 669-676.

Izgu F., Altinbay D., Sertkaya A. 2005. Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, 69, 11: 2200-2206.

Izgu F., Altinbay D., Yucelis A. 1997. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14: 125-131.

Janisiewicz W. J., Jeffers S. N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16, 7: 629-633.

Janisiewicz W. J., Tworowski T. J., Sharer C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90, 11: 1196-1200.

Jarvis W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. A guide to the literature. Monograph No. 15, Canadian Department of Agriculture, Ottawa, Canada, citiran v: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. V: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 1-8.

Karabulut O. A., Arslan U., Ilhan K., Kuruoglu G. 2005a. Integrated control of postharvest diseases of sweet cherry with yeast antagonists and sodium bicarbonate applications within a hydrocooler. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 2: 135-141.

Karabulut O. A., Cohen L., Wiess B., Daus A., Lurie S., Droby S. 2002. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biology and Technology*, 24: 103-111.

Karabulut O. A., Mlikota Gabler F., Mansour M., Smilanick J. L. 2004. Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 2: 169-177.

Karabulut O. A., Romanazzi G., Smilanick J. L., Lichter A. 2005b. Postharvest ethanol and potassium sorbate treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 2: 129-134.

Karabulut O. A., Smilanick J. L., Mlikota Gabler F., Mansour M., Droby S. 2003. Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest disease of grape in central California. *Plant Disease*, 87, 11: 1384-1389.

Kluyver A. J., van der Walt J. P., van Triet J. 1953. Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39: 583-593.

Lachance M. A., Pang W. M. 1997. Predacious yeasts. *Yeast*, 13, 3: 225-232.

Lachance M. A., Starmer W. T. 1998. Ecology and yeasts. V: The yeasts, a taxonomic study Kurtzman C.P., Fell J.W. (ed). Amsterdam, Elsevier Science B. 21-30.

Lachance M.-A., Pupovac-Velikonja A., Natarajan S., Schlag-Edler B. 2000. Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 495-505.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 15: 680-685.

Lee T. H., Simpson R. F. 1993. Microbiology and chemistry of cork taints in wine. V: Wine Microbiology and Biotechnology Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 353-371.

Leroux P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 195-222.

Lichter A., Zutkhy Y., Sonogo L., Dvir O., Kaplunov T., Sarig P., Ben-Arie R. 2002. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 3: 301-308.

Lima G., Arru S., De Curtis F., Arras G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 223-229.

Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169-178.

Llorente P., Marquina D., Santos A., Peinado J. M., Spencer-Martins I. 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3: 1165-1167.

Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Darnell J. 1995. *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York, Scientific American Books: 1344 str.

Longo E., Cansado J., Agrelo D., Villa T. G. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 2: 141-144.

Lonvaud-Funel A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiology letters*, 126: 209-214.

Lonvaud-Funel A. 1996. Microorganisms of winemaking. *Cerevisia*, 21, 1: 55-58.

Lumsden R. D. 1992. Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. V: The fungal community, its organisation and role in the ecosystem. 2nd ed. Wickow D.T., Carroll G.C. (ed). New York, Dekker. 275-293., citiran v: Lachance M. A., Pang W. M. 1997. Predacious yeasts. *Yeast*, 13, 3: 225-232.

MacFarlane H. H. 1968. Review of Applied Mycology. Pp. 820 in plant host-pathogen index to volumes 1–40 (1922–1968). citiran v: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. V: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 1-8.

Maček J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za Agronomijo: 275 str.

Malakar P. K., Barker G. C., Zwietering M. H., van't Riet K. 2002. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 2632: 1-10.

Manual für Feldversuche im Pflanzenschutz. 1981. Püntener W. (ed.) Basel, Ciba-Geigy AG, 34-35.

Marquina D., Santos A., Peinado J. M. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5: 65-71.

Martinez-Rodriguez A. J., Carrascosa A. V., Polo M. C. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *International Journal of Food Microbiology*, 68: 155-160.

Martini A., Ciani M., Scorzetti G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 4: 435-440.

Masih E. I., Alie I., Paul B. 2000. Can the grey mould disease of grape-vine be controlled by yeast? FEMS Microbiology Letters, 189: 233-237.

Masih E. I., Paul B. 2002. Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. Current Microbiology, 44: 391-395.

Masih E. I., Slezack-Deschaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C., Adholeya A., Paul B. 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. FEMS Microbiology Letters, 202: 227-232.

McClellan W. D., Hewitt B. 1973. Early *Botrytis* rot of grapes: Time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. Phytopathology, 63: 1151-1157.

McGuire R. G. 2000. Population dynamics of postharvest decay antagonists growing epiphytically and within wounds on grapefruit. Phytopathology, 90, 11: 1217-1223.

McLusky S. R., Bennett M. H., Beale M. H., Lewis M. J., Gaskin P., J.W. M. 1999. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3"-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. Plant Journal, 17: 523-534.

Mellersh D. G., Heath M. C. 2001. Plasma membrane - cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. Plant Cell, 13: 413-424.

Mercier J., Wilson C. L. 1994. Colonisation of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biological Control, 4: 138-144.

Mercier J., Wilson C. L. 1995. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) on apple. Postharvest Biology and Technology, 6: 9-15.

Merril C. R. 1987. Detection of proteins separated by electrophoresis. Advances in Electrophoresis, 1: 111-137.

Mert-Turk F. 2002. Phytoalexins: defence or just a response to stress? Journal of Cell and Molecular Biology, 1: 1-6.

Meunier J. R., Choder M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. Yeast, 15: 1159-1169.

Miklič D., Čadež N., Smole Možina S., Raspor P. 2002. Poškodbe površine jagod spreminjajo mikrobno združbo grozdja. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina Raspor P. (ed). Ljubljana Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 121-129.

Miklič Milek D., Jesih S., Raspor P. 2007. The potential of wine yeasts as biocontrol agents against *Botrytis cinerea* diseases on grape. FEMS Yeast Research (poslano v tisk).

Miller M., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology, 55: 165-199.

Mills D. A., Johannsen E. A., Cocolin L. 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 68, 10: 4884-4893.

Mináriková L., Kuthan M., Řiřicová M., Forstová J., Palková Z. 2001. Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. Experimental cell research, 271: 296 - 304.

Mlikota Gabler F., Smilanick J. L., Mansour M., Ramming D. W., Mackey B. E. 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 93, 10: 1263-1273.

Mortimer R., Polsinelli M. 1999. On the origins of wine yeast. Research in Microbiology, 150: 199-204.

Mueller J., Kuttler C., Hense B. A., Rothballer M., Hartmann A. 2006. Cell-cell communication by quorum sensing and dimension-reduction. Journal of Mathematical Biology, 53: 672-702.

Murphy A., Kavanagh K. 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. Enzyme and Microbial Technology, 25: 551-557.

Nguyen H., Panon G. 1998. The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. Sciences des Aliments, 18: 515-526.

Nigro F., Ippolito A., Lima G. 1998. Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. Postharvest Biology and Technology, 13: 171-181.

Novotná D., Flegelová H., Janderová B. 2004. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 4, 8: 803-813.

Ohkuni K., Hayashi M., Yamashita I. 1998. Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14: 623-631.

Osborne J. P., Edwards C. G. 2005. Bacteria important during winemaking. V: Advances in food and nutrition research. 50. Taylor S.L. (ed). Amsterdam, Elsevier. 139-177.

Palková Z. 2004. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. EMBO European Molecular Biology Organization, 5, 5: 470 - 476.

Palková Z., Devaux F., Řičicová M., Mináriková L., Le Crom S., Jacq C. 2002. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 3901-3914.

Palková Z., Forstová J. 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of Cell Science*, 113: 1923-1928.

Palková Z., Janderová B., Gabriel J., Zikánová B., Pospíšek M., Forstová J. 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, 390, 4: 532-536.

Palková Z., Váchova L. 2003. Ammonia signalling in yeast colony formation. *International Review of Cytology*, 225: 229 - 272.

Passoth V., Schnürer J. 2003. Non-conventional yeasts in antifungal application. V: *Functional genetics of industrial yeasts* de Winde J.H. (ed). Berlin, Springer. 297-329.

Paul 1999a. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. *FEMS Microbiology Letters*, 176: 25-30.

Paul B. 1999b. *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters*, 181: 277-280.

Peng G., Sutton J. C. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13: 247-257.

Peng X., Sun J., Inerentant D., Michiels C., Verachtert H. 2001. Flocculation and coflocculation of bacteria by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 777-781.

Pereira C. S., Marques J. J. F., San Romão M. V. 2000. Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception - a critical review. *Critical Reviews in Microbiology*, 26, 3: 147-162.

Pfeiffer I., Golubev W. I., Farkas Z., Kucsera J., Golubev N. 2004. Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 4: 369-375.

Piano S., Neyrotti V., Migheli Q., Gullino M. L. 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11: 131-140.

Pretorius I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Review. Yeast*, 16: 675-729.

Pretorius I. S., van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 20, 2: 61-74.

Qin G., Tian S., Xu Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 51-58.

Ramage G., Saville S. P., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L. 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 11: 5459-5463.

Raspor P., Miklič Milek D., Polanc J., Smole-Možina S., Čadež N. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 97-102.

Rauhut D. 1993. Yeasts - production of sulfur compounds. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood academic publishers. 183-224.

Ribéreau-Gayon J., Ribéreau-Gayon P., G. S. 1980. *Botrytis cinerea* in enology. V: *The biology of Botrytis* Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R. (ed). London, Academic Press. 251-274.

Roberts R. G. 1990. Postharvest biological control of grey mould of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 80: 526-530.

Romano P. 2002. Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. V: *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts* Ciani M. (ed). India, Research Singpost. 199-110.

Romano P., Suzzi G. 1993. Sulfur dioxide and wine microorganisms. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 373-393.

Rosini G., Federici F., Martini A. 1982. Yeast flora on grape berries during ripening. *Microbiology Ecology* 8: 83-89.

Rosslenbroich H. J., Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19: 557-561.

Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F., 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.

Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O., Ur. (2000). *Introduction to food- and airborne fungi*. 6th ed. Wageningen, Ponsen & Looyen, 389.

Sansone G., Rezza I., Calvente V., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M. I. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 3: 245-251.

Santos A., Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, 150: 2527-2534.

Santos A., Marquina D., Leal J. A., Peinado J. M. 2000. (1-6)-beta.D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5: 1809-1813.

Santos A., Sánchez A., Marquina D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159: 331-338.

SAS Software. Version 8.01. (1999). Cary, SAS Institute Inc.

Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F., Droby S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17: 189-199.

Schena L., Nigro F., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A. 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30: 209-220.

Schuller D., Alves H., Dequin S., Casal M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 167-177.

Segal E., Yehuda H., Droby S., Wisniewski M., Goldway M. 2002. Cloning and analysis of CoEXG1, a secreted 1,3- β -glucanase of the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Yeast*, 19: 1171-1182.

Sharon A., Elad Y., Barakat R., Tudzynski P. 2004. Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. V: *Botrytis: biology, pathology and control* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publisher. 163-179.

Shimizu K. 1993. Killer yeasts. V: *Wine microbiology and biotechnology* Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 1-26.

Singleton P., Sainsbury D. 1996. *Dictionary of microbiology and molecular biology* 2nd ed. Chichester Wiley-interscience publication: 1019.

Spadaro D., Lodovica Gullino M. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 2: 185-194.

Spadaro D., Vola R., Piano S., Lodovica Gullino M. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24: 123-134.

Sponholz W.-R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. V: Wine microbiology and biotechnology Fleet G.H. (ed). Australia, Harwood Academic Publishers. 395-420.

Stopar D. 2006. Zapiski s predavanj Mikrobna ekologija - Mikrobiologi. <http://www.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/interakcijeMIKROBI.pdf> (1.10.2006)

Suzzi G., Romano P., Ponti I., Montuschi C. 1995. Natural wine yeasts as biocontrol agents. Journal of Applied Bacteriology, 78: 304-308.

Špaček R., Vondrejs V. 1986. Rapid method for estimation of killer toxin activity in yeasts. Biotechnology Letters, 8, 10: 701-706.

Tateo F., Bononi M. 2001. Survey on ochratoxin A in wines. First data concerning a sampling of bottled red wines. Bulletin de l'O.I.V., 74, 849-850: 772-780.

Tenberge K. B. 2004. Morphology and cellular organisation in *Botrytis* interactions with plants. V: *Botrytis*: biology, pathology and control Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Török T., Mortimer R. K., Romano P., Polsinelli M. 1996. Quest for wine yeast - an old story revisited. Journal of Industrial Microbiology, 17: 303-313.

Tournas V. H., Katsoudas E. 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. International Journal of Food Microbiology, 105: 11-17.

Turković Z. 1952. Ampelografski atlas. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod: 36.

van Baarlen P., Legendre L., van Kan J. A. L. 2004. Plant defence compounds against *Botrytis* infection. V: *Botrytis*: biology, pathology and control Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 143-161.

van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Pretorius I. S. 2000. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. South African Journal of Enology & Viticulture, 21, 1: 3-9.

van Etten H. D., Mansfield J. W., Bailey J. A., Farmer E. E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". Plant Cell, 9: 1191-1192.

van Etten H. D., Temporini E., Wasmann C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? Physiological and Molecular Plant Pathology, 59: 83-93.

van Loon L. C., van Strien E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85-97.

van Vuuren H. J. J., Jacobs C. J. 1992. Killer yeasts in the wine industry: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 2: 119-128.

Varon M., Choder M. 2000. Organisation and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *Journal of Bacteriology*, 182, 13: 3877-3880.

Vaughan-Martini A., Martini A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 6: 514-522.

Viegas C. A., Rosa M. F., Sa-Correia I., Novais J. M. 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1: 21-28.

Vivier M. A., Pretorius I. S. 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends in Biotechnology*, 20, 11: 472-478.

Voloshin S. A., Kaprelyants A. S. 2004. Cell-cell interactions in bacterial populations. *Biochemistry*, 69, 11: 1268-1275.

Walker G. M., McLeod A. H., V.J. H. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127: 213-222.

Walker J. M. 1996. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. V: The protein protocols handbook Walker J.M. (ed). Totowa, New Jersey, Humana Press. 55-61.

Weiler F., Schmitt M. J. 2003. Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Microbiology Research*, 3: 69-76.

Whipps J. M. 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, 26: 1-134. citiran v: Elad Y., Steward A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. V: *Botrytis*: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed). Netherland, Kluwer Academic Publishers. 223-241.

Wickner R. B. 1974. Killer character of *Saccharomyces cerevisiae* - Curing by growth at elevated temperature. *Journal of Bacteriology*, 117, 3: 1356-1357.

Wickner R. B. 1976. Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriological Reviews*, 40, 3: 757-773.

Wisniewski M., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C., Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 4: 245-258.

Woo S., Fogliano V., Scala F., Lorito M. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 353-356.

Yan J. X., Wait R., Berkelman T., Harry R. A., Westbrook J. A., Wheeler C. H., Dunn M. J. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21: 3666-3672.

Yanagida F., Ichinose F., Shinohara T., Goto S. 1992. Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at Central Japan. *Journal of General and Applied Microbiology*, 38: 501-504.

Young T. W. 1987. Killer yeasts. V: *The Yeasts, Yeasts and the environment*. Vol. 2. Rose A.H., Harrison J.S. (ed). London, Academic Press. 131-164.

Zagorc T., Maráz A., Povhe Jemec K., Péter G., Resnik M., Nemanič J., Raspor P. 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*, 18: 441-451.

Zahavi T., Cohen L., Weiss B., Schena L., Daus A., Kaplunov T., Zutkhi J., Ben-Arie R., Droby S. 2000. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 2: 115-124.

Zhang H., Zheng X., Yu T. 2005. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food control*, in press.

Zikánová B., Kuthan M., Řičicová M., Forstová J., Palková Z. 2002. Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 962-967.

ZIM, Collection of Industrial Microorganisms, University of Ljubljana, Biotechnical faculty. Ljubljana, Slovenia <http://www.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/chair/CIM.htm> (maj, 2007)

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Rasporju se zahvaljujem, da mi je omogočil začetek poti, ko me je, kot mlado raziskovalko, sprejel v skupino. Ponosna sem, da sem premagala vse ovire na tej poti.

Predsedniku komisije prof. dr. Francu Pohlevnu se iskreno zahvaljujem za njegov hiter, natančen in strokoven pregled dela. Njegovo razumevanje, takojšnja pripravljenost in dosegljivost, tudi med prazniki, je zame neprecenljivo. Članici komisije profesorici dr. Ani Plemenitaš hvala za strokovne popravke doktorske disertacije.

Vesna, za tvoj SMS »Lahko zagovarjaš!«, se ti iskreno zahvaljujem. Razumela si, kako težko sem čakala na tako novico.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Zori Korošec Koruza za pomoč pri izbiri grozdja in organizacijo dostave le-tega z Ampelografskega vrta Kromperk.

Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem doc. dr. Lei Gašperlin in dr. Tomažu Polaku. Tomaž, cenim tvoje prijateljstvo in nasvete.

Za prispevek k delu se zahvaljujem tudi diplomantu Simonu Jesihu.

Za pomoč pri zbiranju strokovne literature in vedno »nujno« potrebni člankov se zahvaljujem gospema Ivici Hočevar in Barbari Slemenik. Za urejanje le teh v EndNote bazo, ki mi je precej olajšala pisanje tega dela, se zahvaljujem Nini.

Za lektorske popravke se zahvaljujem Urši Fendre.

Vsem zaposlenim na Oddelku za živilstvo se zahvaljujem za prijetno družbo in lepe trenutke - zaradi Vas je delovni dan hitreje minil.

Zaposlenim na dekanatu, referatu in drugih oddelkih Biotehniške fakultete, ki so spremljali, me bodrili in kakorkoli (tudi nevede) pomagali se iskreno zahvaljujem.

Mojim sodelavcem!

Vlasta - energija tvoja je b'la prava,
da je zadišala tudi mrzla kava.
Probleme hitro znala si rešiti,
in s humorjem vedno jih obiti.

Urša - v laboratoriju si tehnično mi pomagala,
moje plošče si brez besed razliti znala.
Prijateljstva ni konec zdaj v maju,
saj materinstva čas še veže naju.

Neža - že pri diplomi si mi pokazala,
kakšna naj bo znanstvenica prava.
Pri kvasovkah sva isti jezik govorili,
uspehov sva se skupaj veselili.

Janja - znala si me nasmejati,
in svežo energijo delu dati.
Delo je res lažje b'lo začeti,
ko z domačije prišli so paketi.

Štefan - vedno znal si pomagati,
in pri tem se malo poigrati.
Misel - sol v čevelj za na pot,
še dan's me spremlja vsepovsod. ☺

Kar naprej ste spraševali
in odgovore iskali;
Polona, Borut, Mihaela, Katja,
Sergej, Franci, Matej in Maja,
znali ste mi svetovati,
večkrat tudi po strokovni plati.

Delovno ozračje pa ste spremenili
in vsak s svojo energijo napolnili;
Dragica, Martina, Jure, Roman, Jan in Ana,
morda še koga lahko bi tukaj napisala.

Raziskave – te so tekmovanje,
zato diskusije naj bodo tajne.
Enej, Vasilka, Urška L. in Hrvoje
v »strepto-šifrah« govorili ste po svoje.

Šli bomo vsak po svoji poti,
dokler usoda nas nekje ne zmoti,
in ko se srečamo tedaj,
skupaj bomo šli na pivo (zaradi rime beri: čaj).

IN TUKAJ SO ŠE MOJI VSI -
Z MANO VEDNO SO BILI,
KADAR MI JE BILO TEŽKO,
PA TUDI, KADAR MI JE GLADKO ŠLO!

Z Vami delim srečo in zadovoljstvo ob končanem delu!

Če sem koga pozabila – naj mi ne zameri, da ga nisem omenila!

PRILOGE

Priloga A: Seznam testiranih sevov (Σ : 608) kvasovk izoliranih iz sistema trta/grozdje/moš/vino in shranjenih v Zbirko industrijskih mikroorganizmov, (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana), njihova biokontrolna aktivnost - BKA (%) na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na trdnem gojišču NYDA po 7. in 30. dneh inkubacije.

* **krepko** – so označeni sevi, pripadniki 16 različnih vrst kvasovk izbrani za testiranje vpliva gojišč

Sevi kvasovk (ZIM)		BKA (%)					
<i>Candida oleophila</i>		7. dan	30. dan				
1	2276	24,14	24,14	5	523	41,84	11,46
<i>Aureobasidium pullulans</i>		7. dan	30. dan	6	573	28,26	2,20
1	2018	40,48	39,29	7	1990	34,52	34,52
2	2027	42,11	42,11	8	1996	31,00	9,09
3	2028	39,73	39,73	9	1998	29,90	4,17
4	2036	40,54	39,19	10	1999	36,36	1,03
5	2059	45,21	36,99	11	2000	38,96	38,96
6	2063	46,15	46,15	12	2002	27,55	3,06
7	2070	32,35	32,35	13	2003	36,08	3,06
8	2086	40,00	40,00	14	2004	37,25	8,08
9	2094	42,11	42,11	15	2005	25,00	25,00
10	2098	38,89	38,89	16	69	24,69	24,69
11	2103	43,04	43,04	17	2136	24,71	24,71
12	2105	47,30	47,30	18	2049	28,05	17,07
13	626	42,31	42,31	19	2111	18,48	11,96
14	627	38,67	38,67	20	2112	21,18	14,12
15	628	42,17	42,17	21	2121	20,93	11,63
16	659	42,86	42,86	22	1876	15,73	7,87
17	660	50,67	50,67	23	1903	13,48	4,49
18	661	46,25	46,25	24	1904	17,98	6,74
19	714	51,32	43,42	25	1906	18,68	9,89
20	k220	31,11	23,33	26	1910	18,39	8,05
21	k134	42,86	38,96	27	1911	13,95	5,81
22	s/96/406	36,99	34,25	28	1912	10,71	3,57
23	s/96/407	34,25	34,25	29	1913	15,73	6,74
24	s/96/408	39,47	39,47	30	1838	16,33	0,00
<i>Bulleromyces albus</i>		7. dan	30. dan	31	1842	0,00	0,00
1	s202	21,25	17,50	32	1843	19,78	0,00
2	645	23,46	18,52	33	1844	22,58	0,00
3	646	20,48	16,87	34	1982	26,51	24,51
4	643	31,52	23,40	35	1984	24,68	23,38
5	644	30,93	0,00	36	1989	22,92	16,54
6	k303	30,88	0,00	37	2011	24,39	24,39
7	k 322	23,96	0,00	38	2010	30,49	30,49
8	m 207	27,84	0,00	39	1766	30,49	30,49
9	m 308	19,35	0,00	40	62	32,50	11,25
10	o 305	27,37	0,00	41	1786	32,43	21,62
<i>Candida spp.</i>		7. dan	30. dan	<i>Cryptococcus spp.</i>		7. dan	30. dan
1	2110	33,33	28,40	1	665	9,30	1,16
2	2184	31,11	14,44	2	2062	3,66	0,00
3	383	44,12	14,71	3	640	3,85	2,56
4	510	42,86	28,57	4	715	12,82	2,56
				5	638	0,00	0,00
				6	639	0,00	0,00
				7	2060	2,78	2,78

nadaljevanje priloge A: Seznam testiranih sevov...

8	2039	3,70	0,00	62	m104	14,10	0,00
9	2058	0,00	0,00	63	M201	0,00	0,00
10	2066	6,58	3,95	64	m202	14,10	0,00
11	2073	11,39	5,06	65	M203	0,00	0,00
12	2077	6,49	3,90	66	m204	7,35	0,00
13	2084	14,81	6,17	67	m205	6,17	0,00
14	647	6,10	4,88	68	m215	18,60	0,00
15	634	11,34	0,00	69	m216	10,67	0,00
16	635	0,00	0,00	70	m217	20,99	0,00
17	636	0,00	0,00	71	m218	5,33	0,00
18	637	11,22	2,04	72	m219	8,57	0,00
19	s109	12,79	0,00	73	m220	0,00	0,00
20	s110	16,87	9,64	74	M223	0,00	0,00
21	s111	12,50	0,00	75	m224	10,53	0,00
22	s112	17,11	0,00	76	m226	16,67	0,00
23	s113	0,00	0,00	77	m227	10,39	0,00
24	s120	12,66	0,00	78	m228	19,79	1,04
25	s121	11,22	0,00	79	m229	6,58	0,00
26	s122	13,58	0,00	80	m301	11,11	0,00
27	s123	21,62	0,00	81	m302	10,81	0,00
28	s124	11,11	0,00	82	m303	10,98	0,00
29	s125	8,33	0,00	83	m307	11,46	0,00
30	s139	6,25	0,00	84	m312	8,86	0,00
31	s201	14,29	0,00	85	m313	12,50	0,00
32	S212	21,79	12,82	86	o104	4,04	0,00
33	s213	4,04	0,00	87	o114	8,33	0,00
34	s214	17,95	0,00	88	o115	19,35	5,38
35	s215	15,00	0,00	89	o116	14,47	0,00
36	s216	12,00	0,00	90	o117	15,63	1,04
37	s217	21,52	13,92	91	o301	12,37	0,00
38	s302	7,22	0,00	92	o306	17,07	0,00
39	s304	8,64	0,00	93	o307	13,25	0,00
40	k202	13,10	0,00	94	o308	18,75	0,00
41	k203	16,05	0,00	95	o309	15,79	0,00
42	k204	15,38	0,00	96	o310	1,03	0,00
43	k205	11,39	0,00	97	o314	9,38	0,00
44	k206	10,53	0,00	Debaryomyces hansenii			
45	K207	0,00	0,00	var. hansenii			
46	k208	19,51	0,00	1	2025	29,27	29,27
47	k209	11,11	0,00	2	2120	31,46	31,46
48	k210	3,03	0,00	3	2186	26,44	21,84
49	k222	12,50	0,00	4	716	10,98	10,98
50	k302	21,79	0,00	5	717	9,85	9,85
51	k309	15,38	0,00	6	o/1152/401	10,59	10,59
52	k316	19,51	0,00	7	o/1152/402	8,16	0,00
53	k317	13,00	0,00	8	o/1152/407	6,06	0,00
54	k318	18,06	0,00	9	o/1152/413	39,81	0,00
55	K319	0,00	0,00	10	o/1152/414	10,13	10,13
56	k320	16,00	0,00	11	o/1152/418	5,10	0,00
57	k321	0,00	0,00	12	o/1152/419	14,46	14,46
58	k331	10,20	0,00	13	o/1152/420	31,00	0,00
59	m101	11,84	0,00	14	o/1152/421	20,20	0,00
60	m102	20,41	10,20	15	o/1152/422	23,96	3,13
61	m103	12,50	0,00	16	o/1152/423	20,20	3,06
				17	o/1152/425	8,64	8,64

nadaljevanje priloge A: Seznam testiranih sevov...

18	o/1152/426	21,51	4,30	34	s/96/401	0,00	0,00
19	o/1152/429	8,86	8,86	35	s/96/402	0,00	0,00
20	o/1152/430	16,00	0,00	36	o/240/401	0,00	0,00
21	o/1152/433	13,25	13,25	37	o/240/402	0,00	0,00
22	o/1152/434	8,91	0,00	38	o/240/404	13,83	0,00
23	k/1152/404	10,81	10,81	39	o/240/405	0,00	0,00
24	k/1152/405	22,68	1,03	40	o/240/411	0,00	0,00
25	k/1152/406	9,21	9,21	41	o/240/412	0,00	0,00
26	k/1152/413	31,00	0,00	42	k/240/501	15,05	0,00
27	k/1152/414	10,39	0,00	43	k/240/502	0,00	0,00
28	k/1344/401	34,74	0,00	44	m/240/401	0,00	0,00
29	k/1344/402	15,85	15,85	45	m/240/402	0,00	0,00
30	k/1344/403	23,00	0,00	46	m/240/601	0,00	0,00
31	o/1680/404	8,00	0,00	47	m/240/602	0,00	0,00
32	k/1680/401	31,87	0,00	48	s/240/401	8,33	0,00
33	k/1680/402	8,86	0,00	49	o/432/401	13,83	0,00
34	k/1680/403	11,67	0,00	50	o/432/402	0,00	0,00
35	k/1680/404	8,79	0,00	51	k/432/401	6,52	0,00
36	k/2112/401	15,00	0,00	52	k/432/402	0,00	0,00
37	k/2112/402	33,98	0,00	53	m/432/401	13,68	0,00
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		7. dan	30. dan	54	m/432/402	1,16	0,00
1	2015	8,79	0,00	55	o/672/402	0,00	0,00
2	2022	10,42	0,00	56	k/672/401	7,29	0,00
3	2032	20,83	0,00	57	k/672/402	0,00	0,00
4	2040	1,32	0,00	58	m/672/601	11,46	0,00
5	2048	13,54	0,00	59	m/672/602	1,25	0,00
6	2057	5,21	0,00	60	s/672/401	0,00	0,00
7	2068	9,78	0,00	61	s/672/402	0,00	0,00
8	2080	0,00	0,00	62	o/1152/501	0,00	0,00
9	2088	3,75	0,00	63	o/1152/502	0,00	0,00
10	2096	9,68	0,00	64	o/1152/503	0,00	0,00
11	2109	0,00	0,00	65	k/1152/402	0,00	0,00
12	2115	0,00	0,00	66	m/1152/601	0,00	0,00
13	2117	1,16	0,00	67	m/1152/602	0,00	0,00
14	1902	4,65	0,00	68	s/1152/601	0,00	0,00
15	1905	0,00	0,00	69	s/1152/602	8,57	0,00
16	1907	0,00	0,00	70	o/2112/501	0,00	0,00
17	668	0,00	0,00	71	o/2112/502	0,00	0,00
18	718	0,00	0,00	72	m/2112/601	0,00	0,00
19	719	0,00	0,00	73	m/2112/602	0,00	0,00
20	720	0,00	0,00	74	s/2112/601	2,63	0,00
21	721	0,00	0,00	75	s/2112/601	0,00	0,00
22	o102	0,00	0,00	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		7. dan	30. dan
23	o111	0,00	0,00	1	112	31,71	28,05
24	o113	1,08	0,00	2	622	35,96	35,96
25	k/0/501	0,00	0,00	3	669	46,58	34,25
26	k/0/502	6,32	0,00	4	722	33,33	30,77
27	m/0/601	0,00	0,00	5	723	44,05	29,76
28	o/96/401	7,53	0,00	6	724	45,88	43,53
29	o/96/402	0,00	0,00	7	1850	26,44	26,44
30	k/96/501	3,66	0,00	8	2016	37,93	37,93
31	k/96/502	0,00	0,00	9	2023	21,43	21,43
32	m/96/401	10,31	0,00	10	2043	26,14	26,14
33	m/96/402	0,00	0,00	11	2055	45,83	42,71

nadaljevanje priloge A: Seznam testiranih sevov...

12	2082	32,53	27,71	4	2050	28,09	22,47
13	2092	32,93	32,93	5	2053	27,71	21,69
14	k/0/503	40,28	40,28	6	2089	23,53	14,12
15	k/0/504	37,50	28,75	7	2090	23,53	20,00
16	k/240/401	45,88	40,00	8	2108	20,83	20,83
17	k/240/402	41,67	39,29	9	2118	24,71	16,47
18	k/432/403	43,37	39,76	10	2119	29,49	29,49
19	k/432/404	33,73	31,33	<i>Pichia membranifaciens</i> 7. dan 30. dan			
20	k/672/403	46,15	37,18	1	2091	15,73	15,73
21	k/672/404	34,44	25,56	2	2093	20,69	20,69
22	k/96/402	41,67	37,50	3	2183	15,66	15,66
23	k157	27,91	27,91	4	1908	25,61	18,29
24	m/0/501	42,86	29,87	5	727	32,91	30,38
25	m/0/502	43,75	35,00	6	728	28,77	28,77
26	m/240/403	41,57	33,71	7	o/1152/404	29,33	28,00
27	m/240/404	39,51	28,40	8	o/1152/409	21,59	13,64
28	m/432/403	34,83	29,21	9	o/1152/410	25,00	11,11
29	m/432/404	39,29	29,76	10	o/2112/401	26,09	16,30
30	m/96/403	32,47	24,68	11	o/2112/402	24,44	14,61
31	m/96/404	44,87	37,18	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> 7. dan 30. dan			
32	o/0/501	36,00	30,67	1	2051	2,11	0,00
33	o/0/502	45,68	32,10	2	2052	6,32	0,00
34	o/240/403	35,80	30,86	3	2071	2,08	0,00
35	o/432/502	49,40	40,96	4	2078	2,06	0,00
36	o/672/501	46,34	34,15	5	2099	1,05	0,00
37	o/672/502	39,29	35,71	6	2100	1,04	0,00
38	o/96/501	45,12	32,93	7	2102	8,60	0,00
39	o/96/502	45,45	34,09	8	657	8,25	0,00
40	s/240/501	40,28	34,72	9	658	4,17	0,00
41	s/240/502	35,00	26,25	10	S306	10,53	1,05
42	s/432/403	44,32	37,50	<i>Rhodotorula glutinis</i> 7. dan 30. dan			
43	s/672/501	43,53	40,00	1	2017	15,79	5,43
44	s/672/502	45,35	36,05	2	2024	16,49	9,28
45	s/96/403	42,70	34,83	3	2026	19,28	0,00
46	s/96/404	31,94	31,94	4	2030	24,10	7,23
<i>Metschnikowia reukaufii</i> 7. dan 30. dan				5	2034	17,07	1,22
1	2019	30,23	26,74	6	2037	26,32	9,21
2	2021	27,14	25,71	7	2042	24,39	0,00
3	2064	32,18	32,18	8	2045	14,29	1,30
4	2069	31,76	27,06	9	2047	23,81	0,00
<i>Pichia fermentas</i> 7. dan 30. dan				10	2056	25,93	8,64
1	2185	23,33	15,56	11	2061	7,41	0,00
<i>Pichia guilliermondii</i> 7. dan 30. dan				12	2065	15,63	6,32
1	624	47,25	45,05	13	2072	25,61	0,00
2	m133	40,66	40,66	14	2075	14,89	1,08
3	m142	40,00	40,00	15	2083	20,55	0,00
4	726	31,25	31,25	16	2085	14,74	1,08
5	o/96/404	22,11	13,98	17	2097	9,28	0,00
6	o/240/408	20,83	11,58	18	2101	28,92	19,28
7	o/2112/504	22,34	12,63	19	615	23,75	0,00
<i>Pichia kluyveri</i> 7. dan 30. dan				20	616	10,64	3,19
1	2031	25,61	20,73	21	617	11,58	1,05
2	2033	22,09	17,44	22	618	17,53	11,46
3	2046	23,53	23,53	23	653	10,31	0,00

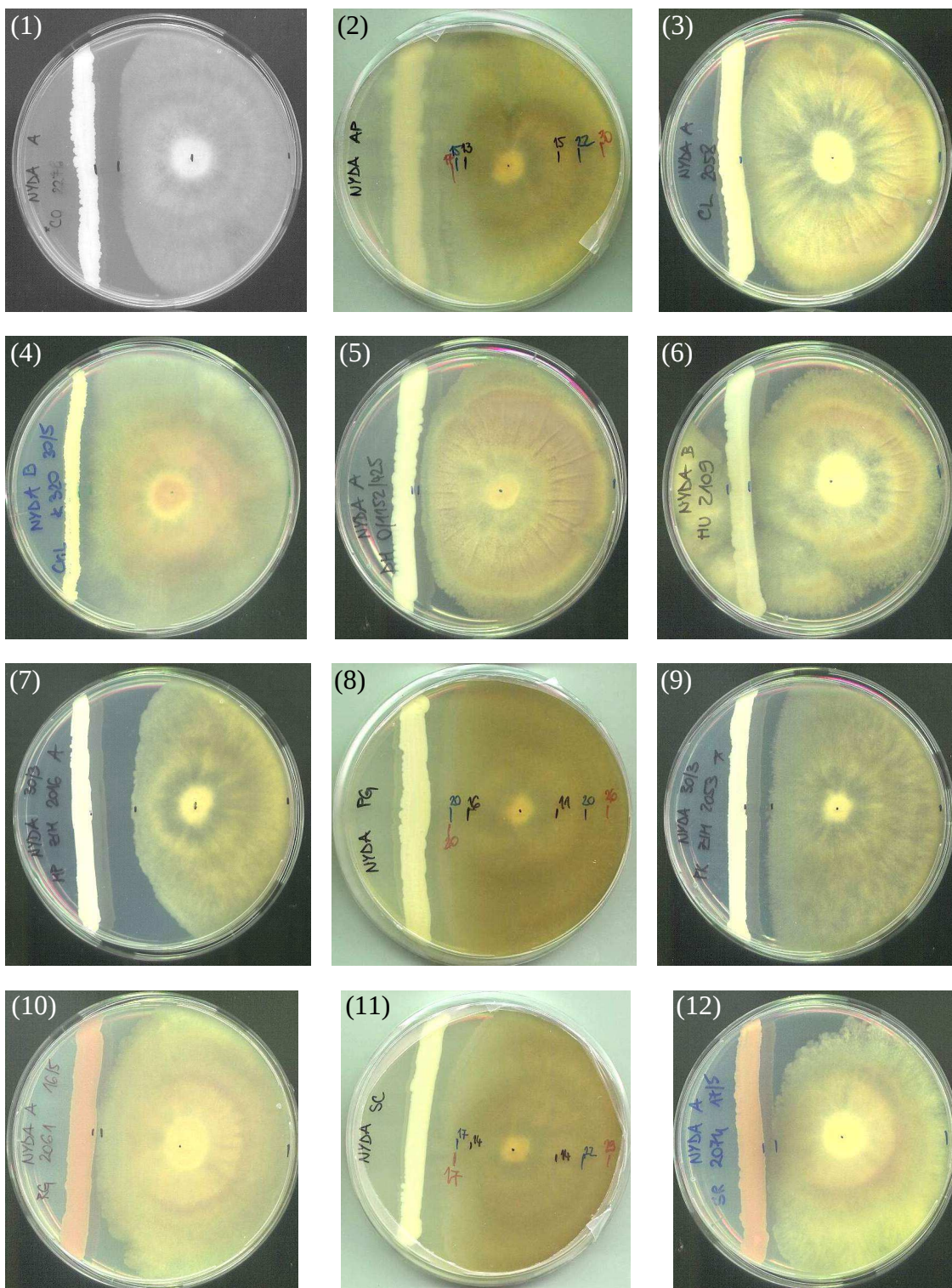
nadaljevanje priloge A: Seznam testiranih sevov...

24	654	14,58	0,00	9	2147	27,91	11,63
25	655	17,28	0,00	10	2148	22,09	11,63
26	656	26,19	0,00	11	2149	25,30	7,23
27	730	36,59	20,73	12	2150	22,62	7,14
28	731	34,57	17,28	13	2151	13,54	3,13
29	s101	19,77	0,00	14	2152	15,15	4,04
30	s102	20,20	5,21	15	2170	32,18	27,59
31	s133	16,67	0,00	16	2171	16,84	3,19
32	s141	29,27	19,51	17	2172	36,25	31,25
33	s203	16,05	0,00	18	2173	17,58	0,00
34	s204	19,23	0,00	19	2174	14,89	6,45
35	k227	19,23	0,00	20	2175	20,78	11,69
36	k304	18,07	9,64	21	2176	18,75	9,28
37	k314	23,81	11,90	22	2177	19,59	10,31
38	k315	14,43	9,38	23	2179	26,44	21,84
39	k324	22,35	0,00	24	2180	21,88	16,67
40	k325	12,63	2,15	25	2181	19,39	11,22
41	m213	15,46	8,25	26	2182	32,47	22,08
42	m230	23,46	0,00	27	2196	24,10	6,02
43	m305	7,37	0,00	28	2197	36,90	33,33
44	m314	16,00	0,00	29	2198	34,12	21,18
45	o120	23,81	0,00	30	2199	14,43	8,25
46	o302	13,68	0,00	31	2200	23,81	8,33
47	o120	14,58	4,26	32	2201	16,16	9,09
48	k102	6,32	0,00	33	m/432/501	15,85	4,88
49	k113	23,46	0,00	34	m/432/502	27,16	4,94
50	k127	27,38	0,00	35	m/432/503	15,46	3,09
51	k140	31,33	9,64	36	s/432/405	24,05	10,13
52	k144	19,59	7,22	37	s/432/406	13,13	6,12
53	k155	29,76	15,48	38	m/672/401	11,34	2,13
54	m107	30,12	22,89	39	m/672/402	8,91	2,02
55	m113	15,15	2,08	40	m/672/403	10,10	0,00
56	m114,	26,74	15,12	41	m/672/404	7,00	0,99
57	m119,	26,51	15,66	42	m/1152/401	9,71	3,06
58	s110,	23,26	0,00	43	m/1152/402	8,57	2,94
59	s111	11,46	2,08	44	s/1152/401	12,12	1,01
60	o/240/407	19,74	10,53	45	s/1152/402	11,11	1,98
61	o/240/409	29,55	20,45	46	s/1344/401	28,57	0,00
62	o/240/410	31,17	20,78	47	s/1680/401	17,71	4,76
Saccharomyces bayanus		7. dan	30. dan	48	s/1680/402	11,22	2,91
1	2113	17,86	0,00	49	s/1680/501	7,14	0,00
2	2114	21,92	0,00	50	s/1680/502	11,11	1,94
3	2122	15,91	0,00	51	s/2112/401	17,48	4,76
4	2123	9,76	0,00	52	s/2112/402	11,65	1,94
Saccharomyces cerevisiae		7. dan	30. dan	53	781	5,77	0,97
1	2139	26,44	2,30	54	1886	8,16	0,97
2	2140	19,51	3,66	55	1887	12,12	3,85
3	2141	23,26	13,95	56	2155	18,00	9,00
4	2142	18,00	8,00	Sporidiobolus pararoseus		7. dan	30. dan
5	2143	20,24	8,33	1	648	25,26	0,00
6	2144	22,45	9,38	2	650	18,42	0,00
7	2145	31,71	24,39	3	651	7,22	4,12
8	2146	19,79	8,33	4	652	6,76	0,00
				5	s106	10,31	5,32
				6	s107	20,99	0,00

nadaljevanje priloge A: Seznam testiranih sevov...

7	s117	9,18	5,15	31	S305	0,00	0,00
8	s118	5,71	0,00	32	S308	9,87	1,03
9	s152	0,00	0,00	33	K214	0,00	0,00
10	s208	11,58	5,32	34	k215	13,10	0,00
11	s301	21,62	0,00	35	K216	0,00	0,00
12	s303	6,06	3,09	36	k217	6,33	0,00
13	k308	8,33	2,13	37	K218	0,00	0,00
14	k311	2,11	0,00	38	K219	0,00	0,00
15	k312	10,39	0,00	39	K223	0,00	0,00
16	k323	11,22	3,19	40	K224	0,00	0,00
17	k328	4,00	0,00	41	k305	5,13	0,00
18	m110	2,67	0,00	42	k306	19,05	0,00
19	m209	14,10	0,00	43	K307	10,21	1,03
20	m306	12,16	0,00	44	K313	0,00	0,00
21	m310	13,43	0,00	45	k326	16,00	0,00
22	m315	3,09	1,03	46	K327	7,35	0,00
23	m316	10,00	6,82	47	K329	6,25	0,00
24	o110	17,14	0,00	48	k330	16,46	11,39
25	o128	13,89	0,00	49	M107	6,16	0,00
26	o129	11,76	0,00	50	M108	1,27	0,00
27	o130	14,08	0,00	51	M208	6,19	3,13
28	o304	14,94	0,00	52	m210	12,20	2,44
29	o316	7,35	0,00	53	M211	3,65	0,00
<i>Sporobolomyces roseus</i>		7. dan	30. dan	54	m212	4,94	0,00
1	2038	6,33	5,06	55	M214	3,03	0,00
2	2067	10,75	5,49	56	m221	11,54	0,00
3	2074	26,32	7,53	57	M222	5,16	0,00
4	2076	4,21	0,00	58	m231	9,88	0,00
5	2087	4,12	1,03	59	M309	1,03	0,00
6	2095	11,36	5,68	60	m311	7,04	2,82
7	649	6,15	0,00	61	M317	1,00	0,00
8	s104	10,34	6,90	62	M318	2,08	0,00
9	s105	15,19	0,00	63	O106	4,21	2,11
10	s115	6,25	0,00	64	o107	13,58	0,00
11	s116	1,20	0,00	65	o121	3,80	0,00
12	s119	32,50	21,25	66	o122	17,28	0,00
13	S127	3,65	0,00	67	o123	24,71	0,00
14	S136	4,89	0,00	68	O124	0,00	0,00
15	s137	8,33	0,00	69	o126	11,39	0,00
16	S138	1,03	0,00	70	O127	3,03	0,00
17	s140	11,43	0,00	71	o131	5,48	0,00
18	S142	2,08	0,00	72	O303	6,18	0,00
19	S143	1,03	0,00	73	o312	21,62	0,00
20	s145	1,27	0,00	74	o313	3,13	1,04
21	S146	3,03	0,00	Druge vrste		7. dan	30. dan
22	S147	4,04	0,00	1	371	27,38	27,38
23	s148	3,70	0,00	2	623	0,00	0,00
24	S149	1,00	0,00	3	664	0,00	0,00
25	s150	14,47	6,58	4	2041	17,19	3,13
26	S151	1,03	0,00	5	2044	18,33	0,00
27	S153	5,68	0,00	6	202	19,75	0,00
28	s206	17,95	6,41	7	2029	7,32	0,00
29	S209	0,00	0,00	8	2124	27,06	21,18
30	s210	19,10	0,00	9	365	24,14	17,24

Priloga A1: Biokontrolna aktivnost nekaterih sevov/vrst kvasovk posneto z optičnim čitalcem po 30 dneh inkubacije na trdnem gojišču NYDA. (1) *Candida oleophila* Montrocher, (2) *Aureobasidium pullulans*, (3) *Candida* spp., (4) *Cryptococcus laurentii*, (5) *Debaryomyces hansenii*, (6) *Hanseniaspora uvarum*, (7) *Metschnikowia pulcherrima*, (8) *Pichia guilliermondii*, (9) *Pichia kluyveri*, (10) *Rhodotorula glutinis*, (11) *Saccharomyces cerevisiae*, (12) *Sporobolomyces roseus*



Priloga B: Statistična analiza rezultatov biokontrolne aktivnosti med kvasovkami in nitasto glivo v celičnem stiku – test A

Priloga B1: Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36).

čas inokulacije (h)	seva kvasovke					P-vrednost
	AP 2098	CO 2276	MP 2055	PG 624	SC 2180	
0	1,5±1,5 ^b	1,6±1,4 ^b	1,5±1,5 ^b	1,5±1,1 ^b	2,3±1,2 ^a	0,1023
24	1,1±1,4 ^{ab}	0,6±1,0 ^{bc}	1,5±1,5 ^a	0,3±0,8 ^c	0,6±1,0 ^{bc}	0,0004
48	0,3±0,8 ^b	0,0±0,0 ^b	0,6±1,2 ^a	0,0±0,0 ^b	0,3±0,7 ^b	0,0029

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnilo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c,d} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B2: Vpliv seva nitaste glive v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=60).

čas inokulacije (h)	seva nitaste glive			P-vrednost
	F 58	F 61	F 63	
0	1,7±1,5 ^a	1,7±1,4 ^a	1,7±1,5 ^a	0,9851
24	0,8±1,3 ^a	0,7±1,2 ^a	1,0±1,3 ^a	0,4229
48	0,0±0,0 ^b	0,2±0,7 ^b	0,5±1,1 ^a	0,0029

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnilo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B3: Vpliv vrste gojišča v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in nitaste glive, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).

kombinacija	čas (h)		0			14			28		
	konc.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.	
AP2098F58	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
AP2098F58	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
AP2098F61	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
AP2098F61	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
AP2098F63	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	
AP2098F63	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	1,7±0,6	0,034	0±0	0±0	1,000	
CO2276F58	10 ⁶ /10 ³	2±1,7	3±0	0,317	0±0	2±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
CO2276F58	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
CO2276F61	10 ⁶ /10 ³	2±1	2,7±0,6	0,346	0±0	1,3±1,2	0,188	0±0	0±0	1,000	
CO2276F61	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	1±1	0,121	0±0	1±1	0,121	0±0	0±0	1,000	
CO2276F63	10 ⁶ /10 ³	3±0	3±0	1,000	0±0	3±0	0,121	0±0	0±0	1,000	
CO2276F63	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
MP2055F58	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
MP2055F58	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
MP2055F61	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	1,7±1,5	0,121	
MP2055F61	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	
MP2055F63	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	
MP2055F63	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	
PG624F58	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
PG624F58	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
PG624F61	10 ⁶ /10 ³	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	
PG624F61	10 ⁸ /10 ⁴	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	

nadaljevanje priloge B3: Vpliv vrste gojišča...

PG624F63	$10^6/10^3$	0±0	3±0	0,025	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000
PG624F63	$10^8/10^4$	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	$10^6/10^3$	2±1,7	3±0	0,317	0±0	2±0	0,025	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	$10^8/10^4$	0±0	3±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F61	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F61	$10^8/10^4$	1±1	3±0	0,037	0,7±0,6	1,7±1,5	0,369	1±1	1,7±1,5	0,500
SC2180F63	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	0±0	2±0	0,025	0±0	0±0	1,000
SC2180F63	$10^8/10^4$	0,3±0,6	3±0	0,034	1,3±1,2	0±0	0,114	0,7±1,2	0±0	0,317

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B4: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).

kombinacija	čas (h)	0			24			48		
	gojišče	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.
AP2098F58	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F58	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	1,7±0	0,034	3±0,6	0±0	0,025
CO2276F58	NYDA	2±1,7	0±0	0,114	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
CO2276F58	PDA	3±0	3±0	1,000	2±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
CO2276F61	NYDA	2±1,0	0±0	0,034	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
CO2276F61	PDA	2,7±0,6	1,0±1,2	0,072	1,3±0	1,0±1,0	0,637	0±1,0	0±0	1,000
CO2276F63	NYDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
CO2276F63	PDA	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F61	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F61	PDA	3±0	3±0	1,000	3±1,5	3±0	1,000	1,7±0	0±0	0,121
MP2055F63	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F63	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
PG624F58	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
PG624F58	PDA	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
PG624F61	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
PG624F61	PDA	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
PG624F63	NYDA	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
PG624F63	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	NYDA	2±1,7	0±0	0,114	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	PDA	3±0	3±0	1,000	2±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
SC2180F61	NYDA	3±0	1±0	0,034	0±0	0,7±1,0	0,114	0±0,6	1±1	0,121
SC2180F61	PDA	3±0	3±0	1,000	0±0	1,7±0	0,121	0±1,5	1,7±1,5	0,121
SC2180F63	NYDA	3±0	0,3±0	0,034	0±0	1,3±0,6	0,114	0±1,2	0,7±1,2	0,317
SC2180F63	PDA	3±0	3±0	1,000	2±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B5: Vpliv časa inokulacije v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokulata (N=3).

kombinacija	koncentracija	$10^6/10^3$				$10^8/10^4$			
	gojišče	0	24	48	P-vr.	0	24	48	P-vr.
AP2098F58	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F58	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	3,0±0	0±0	0,018
AP2098F61	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
AP2098F63	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	PDA	3±0	3±0	3±0,6	1,000	3±0	1,7±0	0±0	0,020
CO2276F58	NYDA	2±1,7	0±0	0±0	0,102	0±0	0±0	0±0	1,000
CO2276F58	PDA	3±0	2±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
CO2276F61	NYDA	2±1	0±0	0±0	0,022	0±0	0±0	0±0	1,000
CO2276F61	PDA	2,7±0,6	1,3±0	0±1	0,046	1±1,2	1±1	0±0	0,230
CO2276F63	NYDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
CO2276F63	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	3,0±0	0±0	0,105
MP2055F61	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F61	PDA	3±0	3±1,5	1,7±0	0,018	3±0	3,0±0	0±0	0,018
MP2055F63	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F63	PDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3,0±0	3,0±0	1,000
PG624F58	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
PG624F58	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
PG624F61	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
PG624F61	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
PG624F63	NYDA	0±0	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	0±0	1,000
PG624F63	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
SC2180F58	NYDA	2±1,7	0±0	0±0	0,102	0±0	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	PDA	3±0	2±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
SC2180F61	NYDA	3±0	0±0	0±0,6	0,018	1±0	0,7±1	1±1	0,859
SC2180F61	PDA	3±0	0±0	0±1,5	0,018	3±0	1,7±0	1,7±1,5	0,230
SC2180F63	NYDA	3±0	0±0	0±1,2	0,018	0,3±0	1,3±0,6	0,7±1,2	0,486
SC2180F63	PDA	3±0	2±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c,d} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B6: Vpliv časa odčitavanja v poskusu A na rast v odvisnosti od gojišča, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=15).

koncentracija inokulata	gojišče	NYDA				PDA			
	čas inokulacije (h)	7	15	30	P-vr.	7	15	30	P-vr.
$10^6/10^3$	0	1,1±1,4	1,1±1,5	0,8±1,4	0,791	2,9±0,3	3±0	3±0	0,368
$10^6/10^3$	24	0,0±0	0,0±0	0,0±0	1,000	2±1,3	2,1±1,2	2,1±1,2	0,983
$10^6/10^3$	48	0,0±0	0,0±0	0,0±0	1,000	0,4±1,1	0,5±1,1	0,6±1,2	0,876
$10^8/10^4$	0	0,0±0	0,1±0,3	0,2±0,6	0,343	2,6±1,1	2,7±0,9	2,7±0,8	0,996
$10^8/10^4$	24	0,0±0	0,2±0,6	0,2±0,6	0,343	0,9±1,4	1,1±1,4	1,3±1,4	0,759
$10^8/10^4$	48	0,0±0	0,1±0,3	0,3±0,7	0,318	0,2±0,8	0,3±0,9	0,4±1,1	0,813

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B7: Vpliv vrste seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36).

čas inokulacije (h)	vrsta kvasovke					P-vr.
	AP 2098	CO 2276	MP 2055	PG 624	SC 2180	
48	1,4±1,5 ^b	1,9±1,1 ^b	2,5±1,1 ^a	3,0±0 ^a	1,9±1,3 ^b	<0,0001
72	0,1±0,5 ^b	1,7±1,3 ^a	1,7±1,5 ^a	2,3±1,3 ^a	1,8±1,5 ^a	<0,0001
96	0,0±0 ^b	1,4±1,3 ^a	1,6±1,5 ^a	1,5±1,5 ^a	1,5±1,5 ^a	<0,0001

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c,d} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B8: Vpliv vrste seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=60).

čas inokulacije (h)	sev nitaste glive			P-vrednost
	F 58	F 61	F 63	
48	2,0±1,3 ^a	2,1±1,2 ^a	2,4±1,2 ^a	0,2715
72	1,4±1,5 ^a	1,5±1,4 ^a	1,7±1,4 ^a	0,3527
96	1,2±1,5 ^a	1,1±1,3 ^a	1,3±1,5 ^a	0,9344

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c,d} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B9: Vpliv vrste gojišča v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=3).

kombinacija	čas (h)	48			72			96		
	konc.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.
AP2098F58	$10^6/10^3$	2,3±1,2	3±0	0,317	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F58	$10^8/10^4$	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	$10^8/10^4$	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	0±0	1,7±0,6	0,034	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	$10^8/10^4$	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
CO2276F58	$10^6/10^3$	3±0	1±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
CO2276F58	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
CO2276F61	$10^6/10^3$	2±0	2,3±0,6	0,317	1,7±0,6	2,3±0,6	0,197	1,7±0,6	1±0	0,114
CO2276F61	$10^8/10^4$	1,7±0,6	2,3±0,6	0,197	2±0	2±0	1,000	1±1	0,7±0,6	0,637
CO2276F63	$10^6/10^3$	3±0	2±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
CO2276F63	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
MP2055F58	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
MP2055F58	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
MP2055F61	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
MP2055F61	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
MP2055F63	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	1,7±1,5	0,121	3±0	1,7±1,5	0,121
MP2055F63	$10^8/10^4$	3±0	3±0	1,000	3±0	0,7±0,6	0,034	3±0	0±0	0,025
PG624F58	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025
PG624F58	$10^8/10^4$	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
PG624F61	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025
PG624F61	$10^8/10^4$	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
PG624F63	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025
PG624F63	$10^8/10^4$	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
SC2180F58	$10^6/10^3$	3±0	1±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
SC2180F58	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
SC2180F61	$10^6/10^3$	3±0	1±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025
SC2180F61	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	1,000
SC2180F63	$10^6/10^3$	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025
SC2180F63	$10^8/10^4$	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnilo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B10: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).

kombinacija	čas (h)	48			72			48		
	gojišče	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$	P-vr.
AP2098F58	NYDA	2,3±1,2	0±0	0,034	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F58	PDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	NYDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	PDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	NYDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±1,5	1,000	0±0	0±1,5	1,000
AP2098F63	PDA	3±0	0±0	0,025	1,7±0	0±0,6	0,034	0±0	0±0	1,000

nadaljevanje priloge B10: Vpliv koncentracije inokuluma...

CO2276F58	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
CO2276F58	PDA	1±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
CO2276F61	NYDA	2±0	1,7±0	0,317	1,7±0	2±0	0,317	1,7±0	1±0	0,346
CO2276F61	PDA	2,3±0	2,3±0	1,000	2,3±0	2±0	0,317	1±0	0,7±0	0,317
CO2276F63	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0,6	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
CO2276F63	PDA	2±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
MP2055F58	PDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F61	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
MP2055F61	PDA	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
MP2055F63	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0,6	3±0	1,000	3±0,6	3±0	1,000
MP2055F63	PDA	3±0,6	3±0	1,000	1,7±0	0,7±0	0,369	1,7±1	0±0	0,121
PG624F58	NYDA	3±0,6	3±0	1,000	3±0,6	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
PG624F58	PDA	3±0,6	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	0±0,6	0±0	1,000
PG624F61	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
PG624F61	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
PG624F63	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
PG624F63	PDA	3±0	3±0	1,000	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000
SC2180F58	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
SC2180F58	PDA	1±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F61	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
SC2180F61	PDA	1±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000	0±0	0±0	1,000
SC2180F63	NYDA	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	1,000
SC2180F63	PDA	3±0	0±0	0,025	3±0	0±0	0,025	0±0	0±0	1,000

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnilo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B11: Vpliv časa inokulacije v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=2).

kombinacija	čas (h)	10 ⁶ /10 ³				10 ⁸ /10 ⁴			
	gojišče	48	72	96	P-vr.	48	72	96	P-vr.
AP2098F58	NYDA	2,3±1,2	0±0	0±0	0,021	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F58	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	NYDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F61	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
AP2098F63	NYDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±1,5	0±1,5	1,000
AP2098F63	PDA	3±0	1,7±0	0±0	0,020	0±0	0±0,6	0±0	1,000
CO2276F58	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
CO2276F58	PDA	1±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
CO2276F61	NYDA	2±0	1,7±0	1,7±0	0,565	1,7±0	2±0	1±0	0,236
CO2276F61	PDA	2,3±0	2,3±0	1±0	0,046	2,3±0	2±0	0,7±0	0,034
CO2276F63	NYDA	3±0	3±0,6	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
CO2276F63	PDA	2±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F58	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
MP2055F58	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F61	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
MP2055F61	PDA	3±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
MP2055F63	NYDA	3±0	3±0,6	3±0,6	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
MP2055F63	PDA	3±0,6	1,7±0	1,7±1	0,230	3±0	0,7±0	0±0	0,029

nadaljevanje priloge B11: Vpliv časa inokulacije...

PG624F58	NYDA	3±0,6	3±0,6	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
PG624F58	PDA	3±0,6	3±0	0±0,6	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
PG624F61	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
PG624F61	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
PG624F63	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
PG624F63	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	3±0	0±0	0±0	0,018
SC2180F58	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
SC2180F58	PDA	1±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
SC2180F61	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
SC2180F61	PDA	1±0	0±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000
SC2180F63	NYDA	3±0	3±0	3±0	1,000	3±0	3±0	3±0	1,000
SC2180F63	PDA	3±0	3±0	0±0	0,018	0±0	0±0	0±0	1,000

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga B12: Vpliv časa odčitavanja v poskusu B na rast v odvisnosti od gojišča, časa inokulacije in koncentracije inokulata (N=15).

koncentracija inokulata	gojišče čas inokulacije (h)	NYDA				PDA			
		7	15	30	P-vr.	7	15	30	P-vr.
$10^6/10^3$	48	2,9±0,3	2,9±0,3	2,8±0,3	0,737	2,5±0,3	2,5±0,8	2,5±0,8	0,939
$10^6/10^3$	72	2,3±1,2	2,3±1,2	2,3±1,3	0,999	1±1,4	1,2±1,4	1,3±1,5	0,839
$10^6/10^3$	96	2,3±1,2	2,3±1,2	2,3±1,3	0,999	0,1±0,3	0,2±0,6	0,3±0,8	0,779
$10^8/10^4$	48	2,3±1,3	2,3±1,2	2,3±1,2	0,999	0,9±1,4	0,9±1,4	1±1,5	0,989
$10^8/10^4$	72	2,3±1,2	2,3±1,2	2,3±1,2	1,000	0,1±0,5	0,2±0,6	0,2±0,6	0,8261
$10^8/10^4$	96	2,2±1,4	2,3±1,3	2,3±1,2	0,992	0,1±0,3	0±0	0,1±0,3	0,599

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik; ^{a,b,c} skupine, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje mase skupnih proteinov (mikro assay) po Bradfordu.

