

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simon JESIH

**VPLIV IZBRANIH VRST KVASOVK NA RAST
NITASTE GLIVE**
Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simon JESIH

VPLIV IZBRANIH VRST KVASOVK NA RAST NITASTE GLIVE
Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

IMPACT OF SELECTED YEAST SPECIES ON GROWTH OF
FILAMENTOUS FUNGI *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član komisije:

Član komisije:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simon Jesih

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- KG UDK 579.24+579.26:582.282.23(043)=863
- DK kvasovke/glive/biokontrolna aktivnost/nitaste glive/*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel/interakcije med kvasovko in nitasto glivo
- AV JESIH, Simon
- SA RASPOR, Peter (mentor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2007
- IN VPLIV IZBRANIH VRST KVASOVK NA RAST NITASTE GLIVE
Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XVI, 89 str., 4 pregl., 49 s., 18 pril., 101 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Vpliv biokontrolne aktivnosti 271 različnih sevov/vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel smo določali *in vitro* na sintetičnih trdnih gojiščih. Po sedmih dneh inkubacije na gojišču NYDA je najvišjo biokontrolno aktivnost dosegla kontrolna kvasovka *Candida oleophila* (49 %). Po 30 dneh pa so najvišjo povprečno biokontrolno aktivnost imele vrste *Pichia guillermondii* (10,6 %), *Aureobasidium pullulans* (9 %) in *Metschnikowia pulcherrima* (8,5 %). Izbrani sevi *A. pullulans* ZIM 2086, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guillermondii* ZIM m133 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2175 so znotraj vrste pokazali najvišjo biokontrolno aktivnost. Na biokontrolno aktivnost vpliva sestava trdnega gojiščca. Kvasovka *S. cerevisiae* je na trdnem gojišču kemijsko definiran mošt (KDM) in sintetičnem trdnem gojišču, podobnem vinu, (WYPDA) pokazala, da ima na takem gojišču prednost, saj je medij po sestavi podoben grozdju. Celični stik je pomemben dejavnik, ki vpliva na biokontrolno aktivnost posamezne vrste oz. seva kvasovke. Vrste *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* v celičnem stiku z *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel popolnoma inhibirajo njeno rast, in obratno na gojišču, kjer se že nahaja nitasta gliva si kvasovke vrst *C. oleophila*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* izborijo prostor in hrano za rast.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.24+579.26:582.282.23(043)=863
CX yeasts/fungi/biocontrol activity/filamentous fungi/*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel/yeast-filamentous fungi interaction
AU JESIH, Simon
AA RASPOR, Peter (supervisor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2007
TI IMPACT OF SELECTED YEAST SPECIES ON GROWTH OF FILAMENTOUS FUNGI *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel
DT Graduation thesis (University studies)
NO XVI, 89 p., 4 tab., 49 fig., 18 ann., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The biocontrol activity of 271 different strains of yeast isolates on filamentous fungi *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel were tested *in vitro* on solid synthetic media. After 7 days of incubation on nutrient yeast dextrose agar (NYDA), biocontrol yeast *Candida oleophila* showed the highest biocontrol activity (49 %). The highest average biocontrol activity after 30 days had species *Pichia guillermondii* (10,6 %), *Aureobasidium pullulans* (9 %) and *Metschnikowia pulcherrima* (8,5 %). Selected strains *A. pullulans* ZIM 2086, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guillermondii* ZIM m133 and *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2175 were most effective among their own species. The composition of medium has also an impact on biocontrol activity. Yeast *S. cerevisiae* showed on solid chemical defined must (CDM) and wine yeast peptone dextrose agar (WYPDA), that on this two media it has advantage, because their composition is similar to the grape. The cell-cell contact is important factor which influence on biocontrol activity of individual species/strains of yeasts. Growth of filamentous fungi in direct contact with yeasts is completely inhibited by species *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *P. guillermondii* and inverse on medium already inhabited with fungi, yeast species *C. oleophila*, *M. pulcherrima*, *P. guillermondii* find their space and food to grow.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MIKROFLORA POVRŠINE GROZDJA	2
2.2 NITASTA GLIVA <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel	3
2.3 KVASOVKE	5
2.3.1 Populacija kvasovk na grozdju	6
2.4 BOKONTROLA	7
2.4.1 Mehanizmi biokontrolnega delovanja proti nitasti glivi <i>Botrytis cinerea</i>	8
2.4.2 Uporabnost biokontrolnih agentov	11
2.4.3 Kvasovke kot biokontrolni agenti	12
2.5 CILJI RAZISKOVANJA	17
2.6 DELOVNE HIPOTEZE	17
3 METODE IN MATERIALI	19
3.1 METODE	19
3.1.1 Test biokontrolne aktivnosti <i>in vitro</i>	19
3.1.2 Test biokontrolne aktivnosti za določanje vpliva gojišča	20
3.1.3 Določanje biokontrolne aktivnosti kvasovk	20
3.1.4 Priprava suspenzij mikroorganizmov z ustrezno koncentracijo	21
3.1.5 Vpliv celičnega stika	21
3.1.5.1 Primarni nanos kvasovk (test A)	22
3.1.5.2 Primarni nanos nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel (test B)	22

3.1.6	Metoda za obdelavo podatkov	22
3.2	MATERIALI	24
3.2.1	Mikroorganizmi	24
3.2.2	Mikrobiološka gojišča	26
3.2.3	Testna gojišča	27
3.2.4	Raztopine	28
3.2.5	Laboratorijska oprema	28
4	REZULTATI	30
4.1	VPLIV GOJIŠČ NA BIOKONTROLNO AKTIVNOST KVASOVK	30
4.1.1	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Candida oleophila</i> Montrocher	30
4.1.2	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Aureobasidium pullulans</i>	31
4.1.3	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Bulleromyces albus</i>	33
4.1.4	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Candida glabrata</i>	34
4.1.5	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Candida stellata</i>	35
4.1.6	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Cryptococcus magnus</i>	36
4.1.7	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	37
4.1.8	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Hanseniaspora uvarum</i>	38
4.1.9	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	39
4.1.10	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Pichia guillermondii</i>	40
4.1.11	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Pichia kluyveri</i>	41
4.1.12	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Pichia membranifaciens</i>	42
4.1.13	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste	

	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	43
4.1.14	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Rhodotorula glutinis</i>	44
4.1.15	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
4.1.16	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	46
4.2	BIOKONTROLNA AKTIVNOST POSAMEZNIH SEVOV KVASOVK	49
4.2.1	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Aureobasidium pullulans</i>	51
4.2.2	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Bulleromyces albus</i>	52
4.2.3	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Candida glabrata</i>	53
4.2.4	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Candida stellata</i>	54
4.2.5	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Cryptococcus magnus</i>	55
4.2.6	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	56
4.2.7	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Hanseniaspora uvarum</i>	57
4.2.8	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	58
4.2.9	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Pichia guillermondii</i>	59
4.2.10	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Pichia kluyveri</i>	60
4.2.11	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Pichia membranifaciens</i>	61
4.2.12	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	62
4.2.13	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Rhodotorula glutinis</i>	63
4.2.14	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.2.15	Biokontrolna aktivnost sevov vrste <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	65
4.3	VPLIV CELIČNEGA STIKA	66
4.3.1	Vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo	66
	4.3.1.1 Test A – primarni nanos kvasovk	66

4.3.1.2	Test B – primarni nanos nitaste glive	69
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	73
5.1	RAZPRAVA	73
5.1.1	Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost	73
5.1.2	Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk <i>in vitro</i>	74
5.1.3	Vpliv celičnega stika	75
5.2	SKLEPI	77
6	POVZETEK	78
7	VIRI	79
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1.	Izbrani sevi posamezne vrste kvasovk za določanje vpliva gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk	25
Preglednica 2.	Mikroorganizmi, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva celičnega stika	26
Preglednica 3.	Rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel (ZIM F58) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk	67
Preglednica 4.	Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel (ZIM F58)	71

KAZALO SLIK

Slika 1.	<i>Botrytis cinerea</i> : a) konidiofor, b) konidiji (Samson in sod., 2000)	5
Slika 2.	Hodogram poteka poskusa ugotavljanja vpliva izbranih vrst kvasovk na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i>	18
Slika 3.	Spremljanje biokontrolne aktivnosti kvasovk na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel <i>in vitro</i>	19
Slika 4.	Bürker – Türk-ov hemocitometer (Hemocytometer: Bürker – Türk, 2006: 1)	21
Slika 5.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	31
Slika 6.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Aureobasidium pullulans</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	32
Slika 7.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Bulleromyces albus</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	33
Slika 8.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Candida glabrata</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	34
Slika 9.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Candida stellata</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	35
Slika 10.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Cryptococcus magnus</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	36
Slika 11.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	37
Slika 12.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Hanseniaspora uvarum</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	38
Slika 13.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Metschnikowia pulcherrima</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	39

Slika 14.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Pichia guilliermondii</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	40
Slika 15.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Pichia kluyveri</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	41
Slika 16.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Pichia membranifaciens</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	42
Slika 17.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Rhodotorula aurantiaca</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	43
Slika 18.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Rhodotorula glutinis</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	44
Slika 19.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	45
Slika 20.	Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke <i>Sporidiobolus pararoseus</i> na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)	46
Slika 21.	Biokontrolna aktivnost kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher NRRL Y-2317 na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih: a) NYDA, b) WYPDA, c) YMA, d) YPDA, e) KDM, posneta z optičnim čitalcem, sedmi dan inkubacije	47
Slika 22.	Biokontrolna aktivnost kvasovke <i>Candida oleophila</i> Montrocher NRRL Y-2317 na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih: a) NYDA, b) WYPDA, c) YMA, d) YPDA, e) KDM, posneta z optičnim čitalcem, 30. dan inkubacije	48
Slika 23.	Biokontrolna aktivnost (%) posameznih vrst kvasovke na rast nitaste glive <i>Botrytis cinerea</i> v primerjavi s kontrolno kvasovko <i>C. oleophila</i>	50
Slika 24a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Aureobasidium pullulans</i>	51

Slika 24b	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Aureobasidium pullulans</i>	51
Slika 25.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Bulleromyces albus</i>	52
Slika 26.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Candida glabrata</i>	53
Slika 27.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Candida stellata</i>	54
Slika 28a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Cryptococcus magnus</i>	55
Slika 28b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Cryptococcus magnus</i>	55
Slika 29a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	56
Slika 29b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	56
Slika 30a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Hanseniaspora uvarum</i>	57
Slika 30b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Hanseniaspora uvarum</i>	57
Slika 31a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	58
Slika 31b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	58
Slika 32.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Pichia guillermondii</i>	59
Slika 33.	BKA <i>Pichia guillermondii</i> sev o/96/404 na rast nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel na trdnem gojišču NYDA posneto z optičnim čitalcem a) 7. dan, b) 15. dan in c) 30. dan inkubacije	59
Slika 34.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Pichia kluyveri</i>	60
Slika 35.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Pichia membranifaciens</i>	61
Slika 36.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	62

Slika 37a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Rhodotorula glutinis</i>	63
Slika 37b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Rhodotorula glutinis</i>	63
Slika 38a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Slika 38b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Slika 39a.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	65
Slika 39b.	Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	65
Slika 40.	Rast seva nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel (ZIM F58) po 30 dneh skupne inkubacije na plošči brez primarnega nanosa kvasovke (kontola – zgornji plošči) ter na plošči s primarnim nanosom kvasovke a) <i>C. oleophila</i> ; in b) <i>A. pullulans</i>	67
Slika 41.	Rast kvasovk na površini trdnega gojišča z (spodaj) in brez (zgoraj) primarnega nanosa nitaste glive <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel po 30 dneh a) <i>C. oleophila</i> ; in b) <i>M. pulcherrima</i>	70

KAZALO PRILOG

- Priloga A** Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana) ter njihova biokontrolna aktivnost (%) na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na trdnem gojišču NYDA po 7, 15 in 30 dneh inkubacije
- Priloga B1** Sestava kemijsko definirane mošta (KDM) (Henschke in Jiranek, 1992)
- Priloga B2** Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov
- Priloga B3** Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov
- Priloga C1** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (200x povečava) po 30 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga C2** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *A. pullulans* ZIM 2086 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga C3** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *C. oleophila* ZIM 2276 (200x povečava) po 30 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga C4** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *M. pulcherrima* ZIM 2055 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga C5** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *P. guillermondii* ZIM m133 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga C6** Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2175 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA
- Priloga D1** Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36)
- Priloga D2** Vpliv vrste gojišča v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in nitaste glive, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)
- Priloga D3** Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)
- Priloga D4** Vpliv časa inokulacije v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=3)

- Priloga D5** Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36)
- Priloga D6** Vpliv vrste gojišča v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)
- Priloga D7** Vpliv koncentracije inokuloma v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)
- Priloga D8** Vpliv časa inokulacije v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=2)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BKA	biokontrolna aktivnost
ZIM	Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
AP	kvasovkam podobna gliva <i>Aureobasidium pullulans</i>
CO	kvasovka vrste <i>Candida oleophila</i>
MP	kvasovka vrste <i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PG	kvasovka vrste <i>Pichia guilliermondii</i>
SC	kvasovka vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KDM	kemijsko definiran mošt z dodatkom agarja
NYDA	hranilni kvasni dekstrozni agar
PDA	krompirjev dekstrozni agar
YMA	kvasno – sladni agar
YPDA	kvasni pepton dekstrozni agar
WYPDA	vinski kvasni pepton dekstrozni agar

1 UVOD

Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel oz. njena bolj znana nespolna oblika *Botrytis cinerea* Pers. je fitopatogena gliva, ki jo najdemo povsod v naravi. Povzroča bolezní grozdja in vinske trte, okuži pa tudi drugo sadje in zelenjavo. Gliva s svojim delovanjem v vinogradu povzroča velike izgube pridelka tako namiznega grozdja kot grozdja za predelavo v vino.

Uporaba fitofarmaceutvskih sredstev je v preteklosti zmanjšala pojav bolezní, ki jih povzročajo *Botrytis cinerea* Pers. in njej sorodne glive. Vendar pa hiter razvoj odpornosti gliv na fungicide in nasprotovanje potrošnikov glede uporabe fitofarmaceutvskih sredstev zahtevajo razvoj alternativnih metod kontrole bolezní. Ena takih je biokontrola. Ta zajema biološke procese, ki znižajo začetno število patogenega organizma s ciljem zmanjšati izgube pridelka. Mikroorganizmi, ki delujejo kot biokontrolni agenti, so iz različnih skupin (bakterije, kvasovke in druge glive, mikoparaziti).

Kvasovke so del naravne mikrobne združbe na površini grozdja in drugega sadja ter zelenjave. Grozdje kolonizirajo že pred trgatvijo in ob trgatvi prehajajo v mošt, kjer vodijo alkoholno fermentacijo vina. Na sestavo populacije kvasovk in drugih mikroorganizmov prisotnih na grozdju pa vpliva več 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.

Uporaba kvasovk, kot biokontrolnih agentov, je za potrošnike sprejemljivejša, saj te manj oz. sploh ne obremenjujejo okolja, njihov kompleksen način delovanja pa zmanjša možnost pojava odpornosti na kemična sredstva. Mehanizmi biokontrolnega delovanja so večinoma še neznani, kot najpogostejše pa različni raziskovalci omenjajo predvsem tekmovanje za hrano in prostor, direktno interakcijo s patogenom, indukcijo obrambnega mehanizma gostitelja in druge.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROFLORA POVRŠINE GROZDJIA

Površina grozdne jagode je primerna za razvoj široke palete mikroorganizmov. Grozdna jagoda je bogat vir hranil, vsebuje različne sladkorje, organske kisline, fenole, dušikove spojine, minerale in vitamine. Poleg vode, ki v grozdni jagodi predstavlja največji delež (70-85 % teže), prevladujejo ogljikovi hidrati (15-25 % teže), predvsem glukoza in fruktoza ter pentoze in pektini (slednji dajejo grozdni jagodi strukturo). Med organskimi kislinami v grozdju najdemo predvsem vinsko in jabolčno kislino, nekaj manj je citronske in očetne kisline. K visoki vsebnosti kislin prispevajo še fenolne kisline, aminokisline in maščobne kisline. Vir dušika predstavljajo aminokisline (najbolj pogosta je prolin, ki deluje kot osmoregulator), peptidi (npr. glutation, ki je pomemben antioksidant) in amonjak. Glavni predstavniki fenolnih sestavin so antociani (značilni le za rdeče sorte grozdja) in tanini (Jackson, 2003).

Različni mikroorganizmi pridejo s pomočjo vetra, dežnih kapljic, žuželk in drugih prenašalcev na površino grozdja in vinske trte. Med prisotnimi kvasovkami, bakterijami in nitastimi glivami prihaja do različnih interakcij, ki vplivajo na njihovo rast in razvoj. Interakcije potekajo med kvasovkami različnih rodov, vrst in sevov, med kvasovkami in nitastimi glivami ter med kvasovkami in bakterijami (Fleet, 2003).

Grozdje je primarni vir kvasovk in drugih mikroorganizmov, ki ob trgatvi prehajajo v mošt, kjer sodelujejo pri fermentaciji. Na grozdju so prisotne različne vrste gliv, kot so *Botrytis*, *Uncinula*, *Plasmopara* in druge, ki povzročajo bolezni grozdja in vinske trte ter s tem spreminjajo biokemijske lastnosti grozdja (Fugelsang, 1997). Od kvasovk na grozdju prevladujejo vrste rodov *Metschnikowia*, *Hanseniasspora/Klockera*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium pullulans* in druge. Na sestavo populacije kvasovk prisotnih na grozdju vplivajo različni dejavniki kot so stopnja zrelosti grozdne jagode, sorta grozdja, geografska lokacija, starost vinske trte, mehanske poškodbe grozdja, fiziološka in kemijska kompatibilnost vrste kvasovk s površino grozdja, toleranca na okoljske strese (Fleet, 2003). O prisotnosti vodilne kvasovke alkoholne fermentacije so si mnenja deljena, saj nekateri trdijo (Török in sod., 1996; Pretorius in sod., 1999), da je grozdna jagoda naraven vir te kvasovke, medtem ko so drugi (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. Na grozdju in kasneje v moštu se nahajata tudi dve pomembni skupini bakterij. Ocetnokislinske bakterije, med njimi predvsem vrste *Acetobacter* in *Gluconobacter* (Fleet, 1993), lahko v ustreznih pogojih prevladajo in omejijo rast vinskih kvasovk, kar upočasni ali celo zaustavi alkoholno fermentacijo (Sponholz, 1993). Jabolčno-mlečnokislinske bakterije, med katerimi so poleg vrste *Oenococcus oeni*, ki vodi jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, najpomembnejše vrste rodov *Pediococcus* in *Lactobacillus* (Fleet, 1993).

2.2 NITASTA GLIVA *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel

Rod *Botrytis* je že dolgo znan, saj je eden izmed prvih opisanih nespolnih rodov gliv. Leta 1729 ga je Micheli poimenoval po Grški besedi za "grozd" oz. "šop grozdnih jagod". Kasneje, leta 1866, je de Bary odkril povezavo med nespolno (anamorfno) obliko *Botrytis cinerea* in spolno (teleomorfno) obliko *Sclerotinia fuckeliana*. Nejasnosti med rodovi je leta 1954 odpravil Whetzel, ko je spolno (teleomorfno) obliko poimenoval *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Spolna oblika je v vinogradih zelo redka (Ellis in sod., 1997), zato se ime nespolne oblike pogosteje uporablja.

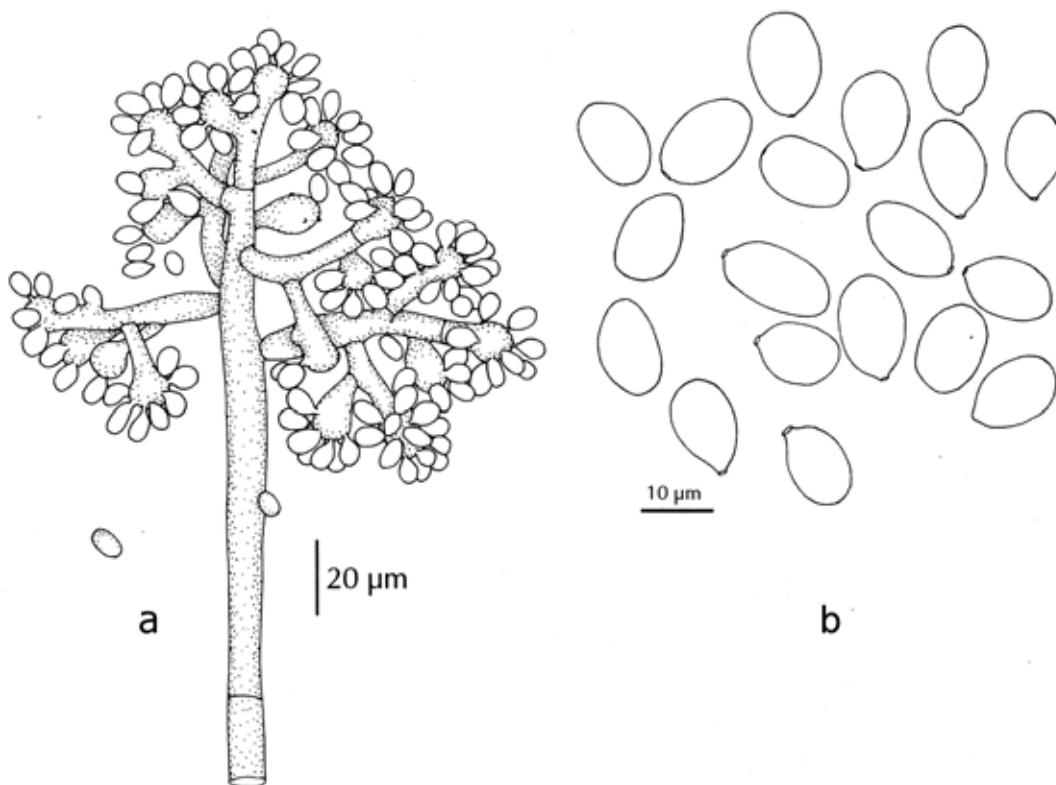
Botrytis cinerea je nekrotrof, ki lahko okuži skoraj vsako rastlino ali rastlinski del in povzroča velike izgube pridelka (Rosslenbroich in Stuebler, 2000; Masih in sod., 2000), zato jo v mediteranskih deželah, kjer uspeva četrtnina svetovne razporeditve vinske trte, uvrščajo med najpomembnejše parazite vinske trte (Cabras in Angioni, 2000).

Prav mediteranska klima (zmerna ali hladna in vlažna) nudi ugodne pogoje za rast in razvoj nitaste glive *Botrytis cinerea*. Grozdje je prizadeto količinsko, kar se odraža v prehitrem odpadanju grozdja in zmanjšanju količine grozdnega soka ter kakovostno zaradi spremenjene kemijske sestave okuženih jagod. Nitasta gliva pretvori enostavne sladkorje (glukozo in fruktozo) v glicerol in glukonsko kislino in sintetizira encime, ki katalizirajo oksidacijo fenolnih skupin. Vsebuje tudi zelo bogat encimski kompleks, s katerim lahko razgradi pektin in celulozo, kar vodi v dvig stopnje metanola v vinu. Poleg tega izloča tudi polisaharide, kot je β -glukan, ki otežuje samousedanje vina. Pri rdečem grozdju razgrajuje antociane, ki dajejo rdečemu vinu značilno barvo. Taka vina imajo neprijeten okus, so občutljiva za oksidacijo in okužbo z bakterijami ter so zato neprimerna za zorenje (Ellis in sod., 1997).

Botrytis cinerea okuži liste, brste, šparone in grozde (Nair in Hill, 1992). Opisani so bili različni načini okužb grozdnih jagod in sicer skozi brazde (Nair in Parker, 1985), cvetni pecelj, naravne odprtine (Pucheu-Plante in Mercier, 1983), rane (Nair in sod., 1988) ali z direktno penetracijo kože (Coertze in sod., 2001). Konidiji nitaste glive *Botrytis cinerea* so skoraj vedno prisotni v vinogradih in se prenašajo predvsem po zraku ali z dežjem. Za uspešno pritrnitev konidijev na površino grozda je potrebna kombinacija svežih ran na mokri oz. vlažni površini grozda ter sveže razpršenih konidijev (Coertze in Holz, 2002; Doss in sod., 1995; Spotts in Holz, 1996).

Nitasta gliva *Botrytis cinerea* se v različnih habitatih lahko nahaja bodisi kot micelij, mikro- in makrokonidiji, klamidiospore, sklerocij, apotecij in askospore (Holz in sod., 2004). Splošen življenski 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). Spolna oblika je v naravi zelo redka (Beever in Weeds, 2004). *Botrytis cinerea* tvori rjavo-olivne septirane hife, debele, temne in razvejane konidiofore z ovalnimi, sivimi konidiji. Konidiji so glavni vir okužbe, s katerimi se prične primarni cikel razvoja *B. cinerea*. Vzkljujejo pri temperaturi od 1 do 30 °C in vsaj 90 % vlagi (Ellis in sod., 1997). Veliki so 8 – 14 x 6 – 9 µm (Samson in sod., 2000).

Botrytis cinerea je zelo zanimiva nitasta gliva zaradi svoje dvojne vloge, saj lahko pod določenimi pogoji na grozdju povzroči t. i. žlahtno gnilobo (Doneche, 1993). Pozitivne lastnosti take okužbe so znane že od leta 1775, saj pozna okužba z nitasto glivo *Botrytis cinerea* povzroči sušenje grozdnih jagod in koncentriranje sladkorjev, brez povečane vsebnosti kislin (Rosslenbroich in Stuebler, 2000).



Slika 1: *Botrytis cinerea*: a) konidiofor, b) konidiji (Samson in sod., 2000)

2.3 KVASOVKE

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana glede na morfološke in fiziološke lastnosti (Raspor, 1996). So enocelične glive in so klasificirane v dve filogenetski skupini; teleomorfne in anamorfne askomicete in teleomorfne in anamorfne bazidiomicete (Esteve-Zarzoso in sod., 1999).

V naravi so zelo razširjene, večinoma se nahajajo na tleh ali na razpadajočih organskih odpadkih v okolju ter sodelujejo pri procesu kroženja organskih in anorganskih snovi (Reed in Nagodawithana, 1991). V vinogradu se lahko iz tal na površino grozdja prenesejo s pomočjo vetra, različnih insektov, malih sesalcev, ptičev ali človeka. Mikrofloro kvasovk na grozdju predstavljajo predvsem oksidativne ali slabo fermentativne vrste (Dequin in sod., 2003).

Kvasovke imajo izjemno mesto v človekovi zgodovini. Čeprav se ni zavedal njihovega obstoja, je človek že pred tisočletji opazil aktivno vlogo kvasovk v naravnih procesih, kot

je fermentacija sadnih sokov in jih uporabil za pridobivanje hrane. Danes so kvasovke najbolj pomembna skupina mikroorganizmov, ki jih človek uporablja v komercialne namene. Kvasovke se uporabljajo v modernih in tradicionalnih biotehnologijah. Uporabljajo se za proizvodnjo biomase, alkoholnih pijač in metabolnih produktov. Posebno mesto imajo kvasovke v tehnologiji raziskav dednine, obnašanja evkariontov in ekspresijskih mehanizmov številnih proteinov. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* ima status GRAS (ang. generally regarded as safe) organizma, zato se jo lahko uporablja tudi pri raziskovalnem delu, kjer ne bi uspeli z nobenim drugim mikroorganizmom (Raspor, 1996).

Do zdaj je bilo odkritih približno 750 različnih vrst kvasovk, vendar so le redke vrste ubikvitarne. Raziskanih je bilo relativno malo naravnih habitatov zato se z raziskovanjem novih pričakuje pojav novih vrst kvasovk. Ker se kvasovke uporabljajo tako v tradicionalni kot v sodobni biotehnologiji, se za odkrivanje novih vrst razvijajo nove metode (Boekhout in Phaff, 2003).

Mehanizmi in aktivnosti, s katerimi kvasovke vplivajo na proizvodnjo vina so:

- vpliv na kvaliteto grozdja pred trgatvijo; biokontrola plesni
- vodenje alkoholne fermentacije
- biokatalizna transformacija nevtralnih grozdnih sestavin v aktivne
- vpliv na kakovost vina z avtolizo
- bioabsorbcija komponent grozdnega soka
- povzročanje kvara vina med shranjevanjem v kleti in po stekleničanju (Fleet, 2003)

2.3.1 Populacija kvasovk na grozdju

Kvasovke so prisotne na grozdju, na vinski trti, v moštu in vinu ter v vinski kleti. Grozdje je primarni vir kvasovk, ki prehajajo v mošt, kjer vodijo alkoholno fermentacijo mošta v vino. Pomemben vpliv na število in raznolikost kvasovk, prisotnih na površini grozdnih jagod imajo različni dejavniki, kot so: vinogradniška lega, klimatski pogoji, sorta grozdja in stopnja zrelosti ob trgatvi, uporaba škropiv in fizične poškodbe grozdja (Barnett in sod., 1972; Rosini in sod., 1982; Yanagidain 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, 2003; Raspor in sod., 2006).

Na nezrelih grozdnih jagodah je populacija kvasovk nizka ($10 - 10^3$ CFU/g). Z zorenjem, sladkorji iz notranjih tkiv grozdnih jagod pronicajo na površino in spodbujajo rast kvasovk tako da se njihova populacija poveča na $10^4 - 10^6$ CFU/g, ko je grozdje zrelo za trgatvev (Fleet in sod., 2002). Kvasovke rodov *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Pichia* in *Candida* ter kvasovkam podobna gliva *Aureobasidium pullulans* prevladujejo na nezrelih grozdnih jagodah. Večina teh vrst je prisotna tudi na zrelem grozdju, vendar številčno takrat prevladajo apikulatne kvasovke rodov *Hanseniaspora/Kloeckera* ter kvasovke rodu *Metschnikowia*. V vinogradniški regiji Dolenjska se poleg teh, na zrelih grozdnih jagodah nahajajo vrste rodov *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Sporobolomyces*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* (Raspor in sod., 2006). V obdobju zorenja se na površini tako zdravega kot poškodovanega grozdja kvasovkam podobna gliva *Aureobasidium pullulans* pojavlja v koncentracijah od 10^2 ali 10^5 CFU/g (Beh in sod., 2003). Zanj je značilno, da je ubikvitarna, njena rast je dimorfna, tvori fermentativno stabilne polisaharide npr. pululan (Demain in sod., 1998). *Saccharomyces cerevisiae* kot vodilna kvasovka fermentacije ni razširjena na zdravih, nepoškodovanih grozdnih jagodah. Na grozdju se nahaja v populacijah, manjših od $10 - 100$ CFU/g (Fleet in sod., 2002; Mannazzu in sod., 2002).

Poškodba kože grozdne jagode in površine grozdja poveča razpoložljivost hranil, s tem pa se populacija prisotnih kvasovk poveča ($>10^6$ CFU/g). Na poškodovanem grozdju prevladujejo kvasovke rodov *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces* in *Zygosaccharomyces* (Fleet in sod., 2003). Poškodovano grozdje pa nudi ustrezne pogoje za rast in razvoj tudi različnim nitastim glivam ter očetnokislinskim in jabolčno-mlečnokislinskim bakterijam.

2.4 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). Biokontrolo lahko z enostavnim izrazom definiramo tudi kot uporabo enega živega organizma za kontrolo rasti drugega (Paulitz in Belanger, 2001). Za obvladovanje rasti in razmnoževanja škodljivega organizma se uporablja njegove naravne sovražnike (Pajk, 2006). Ker biokontrola izkorišča naravne cikle, je sprejemljiva tudi pri sonaravnem kmetijstvu (Wilson in Wisniewski, 1994).

Do biokontrole pride, ko se število in aktivnost patogenega organizma zmanjša zaradi prisotnosti drugega organizma – biokontrolnega agenta, na gostitelju pa njegova prisotnost ne povzroča pomembnejše škode (Campbell, 1989; Pajk, 2006). Za kontrolo bolezni rastlin se uporabljajo mikrobní biokontrolni agenti, saj so večinoma naravno prisotni na površini sadja oz. rastlin. Uporaba mikrobnih biokontrolnih agentov ima številne prednosti pred tradicionalno uporabo fitofarmaceutskih sredstev. Mikroorganizmi, ki se jih uporablja kot biokontrolne agente so del naravno prisotne mikroflore in so splošno znani kot varni ljudem in živalim. Njihove prednosti so predvsem: biorazgradljivost, prijaznost do okolja, specifično delovanje na ciljne organizme, enostavna genetska modifikacija ter možnosti razvoja v komercialne namene. Po drugi strani pa je njihova uporaba v naravi omejena, saj so mikrobní biokontrolni agenti občutljivi na neugodne vremenske pogoje (vročina, mraz, ekstremna suhost), ki omejujejo življenjsko dobo. Poleg tega je njihova biokontrolna aktivnost (BKA) manjša v primerih, kjer so patogeni mikroorganizmi že močno razviti oz. že vpleteni v razvoj bolezni (Droby in sod., 1993). Mikrobní biokontrolni agenti ne delujejo na širok spekter patogenih mikroorganizmov v primerjavi s fungicidi, temveč učinkujejo na specifične patogene mikroorganizme (Irtwange, 2006).

Glede na vedno večji pritisk potrošnikov se uporaba fitofarmaceutskih sredstev zmanjšuje. Glavna ovira pri doseganju tega cilja je omejeno število naravnih alternativ. V zadnjem času je mnogo raziskav usmerjenih v proučevanje biokontrolnega načina zatiranja bolezni pridelkov pred in po njihovem obiranju. Znanih je že nekaj produktov dostopnih na tržišču, z dokazano biokontrolno aktivnostjo, drugi pa so še v fazi raziskav. Glavna ovira uspešnosti biokontrolnega produkta je njegova zmanjšana učinkovitost in pomanjkanje konsistence, pri uporabi v naravi. Z razumevanjem tehnologije formulacije, aplikacije, mikrobiološke ekologije in genetike se uspešnost biokontrolnega načina zatiranja bolezni povečuje (Irtwange, 2006).

2.4.1 Mehanizmi biokontrolnega delovanja proti nitasti glivi *Botrytis cinerea*

Biokontrolna aktivnost je način, s katerim biokontrolni organizmi delujejo. Mehanizem delovanja je mogoče pojasniti kot neko vrsto strategije, ki jo uporablja koristen mikroorganizem za preprečevanje nastanka bolezni, ki jo povzroča patogen mikroorganizem oz. škodljivec. Kako učinkovita je ta strategija, določa tudi obnašanje patogena oz. nitaste glive *B. cinerea* med pred-penetracijsko fazo na površini zdrave rastline in odmirajoče rastlinsko tkivo kot vir inokuluma. Nitaste glive rodu *Botrytis* so izredno tekmovalne, saj je od oskrbe s hranili odvisno kaljenje spor, rast klične hife ter

infekcija. Mehanizmi zaviranja bolezni, ki jo povzroča nitasta gliva *B. cinerea*, so osnovani na zmanjšanju njene saprofitske sposobnosti, zmanjšanju širjenja spor in virulence ter sproženju odpornosti v gostiteljski rastlini. V procesu biokontrole je vpletenih več mehanizmov delovanja. Mikrobní biokontrolni agenti pri inhibiciji enega ali več rastlinskih patogenih organizmov oz. škodljivcev uporabljajo vsaj enega, ali pa kombinacijo različnih mehanizmov (Elad in Steward, 2004).

Modifikacija lastnosti rastlinskih površin

Mikroorganizmi lahko spremenijo vlažnost rastlinske površine. Taka modifikacija ovira prilepljanje in rast patogena na rastlinski površini. Bakterije vrste *Bacillus brevis* povzročijo, da se kapljice vode razpršijo in hitreje osušijo, tako da se zmanjša vlažnost rastlinske površine in s tem omejijo kaljenje in infekcijo z nitasto glivo *B. cinerea* (Elad in Steward, 2004).

Vezava na površino patogenega organizma

Biokontrolno delovanje je povezano z vezavo biokontrolnih agentov na površino celic gostitelja – patogenega organizma. Ta mehanizem ima pomembno vlogo v medceličnih interakcijah med nitasto glivo in drugimi mikroorganizmi. Biokontrolno delovanje je povezano z vezavo biokontrolnih agentov na površino celic gostitelja – patogenega organizma. Ta mehanizem ima pomembno vlogo v medceličnih interakcijah med nitasto glivo in drugimi mikroorganizmi. Biokontrolni mikroorganizmi spremenijo lastnosti proteinov (soli, proteaze, itd.) in določenih sladkorjev, ki lahko blokirajo vezavo patogenega mikroorganizma na rastlino. Vezava kvasovk *Rhodotorula glutinis* in *Cryptococcus albidus* na konidije nitaste glive *B. cinerea* je povezano s tvorbo polisaharidnega ekstracelularnega matriksa (Elad in Steward, 2004).

Tekmovanje za hrano in prostor – kompeticija

Bakterije, kvasovke in nitaste glive lahko inhibirajo patogene glivne s tekmovanjem za hranila, kot so dušik, ogljik, makro in mikroelementi. Hrano in/ali prostor različni mikroorganizmi različno hitro izkoriščajo. To vodi v hitrejšo rast in razvoj enega mikroorganizma, medtem ko drugi ne dobiva zadosti hranil in umre. Zmanjšanje koncentracije hranil v okolju se kaže v zmanjšanju kaljenja spor in v počasnejši rasti klične hife patogene glive. Bakterije iz rodu *Pseudomonas* hitreje porabijo aminokislino kakor konidiji *B. cinerea*. Pomembna značilnost biokontrolnih agentov, ki se uporablja za zaščito

pred infekcijo z nitasto glivo *B. cinerea*, je njihova sposobnost hitrega koloniziranja mesta poškodbe (Elad in Steward, 2004).

Parazitizem

Do parazitizma pride, ko en organizem za ves ali samo nek del svojega življenja pridobi potrebno hrano na račun drugega organizma. Znan je pojav parazitizma gliv z različnimi mikroorganizmi in temelji na proizvodnji encimov za razgradnjo celične stene gliv (Wisniewski in sod., 1991; Elad in sod., 1996). Izolati vrst *Trichoderma reesei* in *Trichoderma harzianum* imajo vlogo v mikoparazitizmu, saj so sposobni proizvajati proteinaze, manaze, laminarinaze in hitinaze (Elad in Steward, 2004). Kvasovka *Pichia guilliermondii* kaže visoko aktivnost encima β -1-3 glukanaza, ki sodeluje pri razgradnji celične stene patogene glive (Jijakli in Lepoivre, 1998).

Tvorba inhibitornih spojin

Antibioza je pojav, ko en mikroorganizem tvori specifične ali nespecifične metabolite, litične agente in encime, ki preprečujejo rast in razmnoževanje patogenega mikroorganizma. Antibiotiki so lahko hlapne ali nehlapne snovi, ki delujejo pri nizkih koncentracijah. Nekateri mikroorganizmi tvorijo antibiotike, kadar imajo na razpolago zadostno količino hranil, predvsem ogljika, medtem ko drugi tvorijo antibiotike, kadar se razpoložljivost hranil zmanjša. Antibioza je kot način biokontrole opisana pri mnogih mikroorganizmih. Pomembnost inhibitornih spojin v naravnih ekosistemih je težko predvidljiva, saj jih mikroorganizmi proizvajajo *in vitro*. Bakterija *Bacillus brevis* izloča antibiotik gramicidin S, ki je učinkovit proti nitasti glivi *B. cinerea* (Elad in Steward, 2004).

Zmanjševanje patogenosti

Nitasta gliva *B. cinerea* pri procesu infekcije gostitelja sintetizira hidrolitične encime, ki pomembno vplivajo na potek okužbe. Aktivnosti encimov ekso- in endopoligalakturonaze, pektin metil esteraze, pektat liaze, hitinaze, β -1-3 glukanaze in kutinaze, ki jih proizvaja nitasta gliva *B. cinerea*, so se v prisotnosti seva *Trichoderma harzianum* T39 zmanjšale. Bakterijski sev tvori proteaze, ki zmanjšajo aktivnost encimov ter s tem upočasnijo in 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

Induciranje odpornosti je pomemben način biokontrole v vegetativnih tkivih rastlin. Lokalna okužba z enim patogenim organizmom lahko sproži (inducira) odpornost ne le na istega patogenega mikroorganizma, ampak tudi na celo vrsto drugih. Taka odpornost se kaže lokalno, na mestu napada, pa tudi sistemsko, v neokuženih delih rastline. Sistemska indukcija odpornosti pomeni tvorbo enega ali več signalov, ki potujejo po rastlini in aktivirajo obrambne mehanizme v neokuženih delih rastline (Mauch–Mani in Metraux, 1998). Mrtve celice nekaterih kvasovk in bakterij so sposobne inducirati lokalno odpornost in s tem preprečiti razvoj nitaste glive *B. cinerea* (Elad in Steward, 2004).

Kombinacija mehanizmov

Biokontrola je rezultat več kombiniranih načinov delovanja biokontrolnih agentov. Biokontrolno delovanje kvasovk vključuje kompeticijo za hrano in prostor, neposreden parazitizem in mehanizem inducirane odpornosti (Elad in Steward, 2004).

2.4.2 Uporabnost biokontrolnih agentov

V zadnjih letih se je razvoj biokontrolnih izdelkov za kontrolo bolezni sadja in zelenjave precej povečal. Tako so na tržišču dostopni različni produkti, ki kot biokontrolno učinkovino vsebujejo različne mikroorganizme. Tak je npr. Aspire, ki vsebuje kvasovko vrste *Candida oleophila* Montrocher sev I-182 in je učinkovit proti nitastim glivam rodov *Botrytis* in *Penicillium* (Droby in sod., 1998). Z večjo uporabo biokontrolnih agentov v naravi se je povečala tudi skrb glede zdravja in varnosti uporabe tako zaščitene sadja in zelenjave v prehrani. Za nekatere biokontrolne mikroorganizme je znano, da so lahko za imuno kompromitirane ljudi priložnostno patogeni. Po drugi strani, pa so ti mikroorganizmi naravno prisotni na poljedelskih izdelkih in smo jim ljudje neprestano izpostavljeni (Whiteside in sod., 1994). Čeprav so prisotni v velikem številu na površini

sadja in zelenjave, preživijo in rastejo samo na zelo omejenih mestih npr. na površini rane. Pri nanosu biokontrolnih mikroorganizmov na nedotaknjeno površino sadja se populacija v zelo kratkem času zmanjša na raven naravno prisotne mikroflore (Droby in sod., 1993). Kljub podatkom v literaturi, ki kažejo da so nekateri biokontrolni agenti enako učinkoviti kot fungicidi, se v naravi njihovo delovanje težko primerja z fungicidi (Irtwange, 2006). Biokontrolni agenti so bolj občutljivi na koncentracijo patogenega mikroorganizma, medtem ko za delovanje fungicidov ta nima takega pomena. Znano je, da se pri povečani koncentraciji spor patogenega mikroorganizma učinkovitost biokontrolnega agenta zmanjša (Chalutz in Wilson, 1990; Janisiewicz, 1988; McLaughlin in sod., 1990). Na učinkovitost delovanja biokontrolnega agenta v zaprtih sistemih, kot so hladilnice in skladišča, pa vpliva tudi izvajanje strogega sanitarnega programa, ki zmanjša razmnoževanje patogenega mikroorganizma v vodnih sistemih, na tekočih trakovih, krtačah in tleh pakirnic.

Poleg že omenjenih dejavnikov pa na ohranitev kakovosti oz. zdravstvenega stanja obranega sadja ali zelenjave vpliva njegovo fiziološko stanje. Po obiranju se začne pridelek starati, posledica je povečana občutljivost tkiva na napade patogenih mikroorganizmov, delna razgradnja celične stene ter posledično večje prepuščanje topljencev. Prezrelo sadje je bolj občutljivo na napad nitastih gliv, kot sadje, ki je nabrano v času optimalne zrelosti (Boonyakiat in sod., 1987).

Za izboljšanje biokontrolne aktivnosti mikrobnega biokontrolnega agenta se lahko v zaprtih sistemih, kot so skladišča, hladilnice, pakirnice itd., uporabljajo aditivi. Dodatek CaCl_2 suspenziji celic kvasovk je izboljšal biokontrolno aktivnost kvasovk *P. guilliermondii* in *C. oleophila* na jabolkih (McLaughlin in sod., 1992; Wisniewski in sod., 1995) dodatek 2-deoksi-D-glukoze pa je izboljšal biokontrolno aktivnost kvasovk *Sporobolomyces roseus* ali *C. saitoana* (Janisiewicz, 1994). Izboljšanje učinkovitosti biokontrole pa je možno tudi s fizikalnimi metodami, kot so toplotna obdelava (Barkai-Golan in Phillips, 1991; Cook in sod., 1999), UV-svetloba (Droby in sod., 1993), uporaba modificirane ali kontrolirane atmosfere ter hladno skladiščenje (Sugar in sod., 1994).

2.4.3 Kvasovke kot biokontrolni agenti

Značilnosti idealnega biokontrolnega agenta so: genetska stabilnost, učinkovitost pri nizkih koncentracijah proti širokem spektru patogenih organizmov na različnih gostiteljskih tkivih, enostavne prehranske zahteve, preživetje v neugodnih vremenskih razmerah, rast na

poceni substratih v fermentorjih, niso patogeni za gostiteljsko rastlino in ne tvorijo metabolitov, toksičnih za ljudi, odpornost proti fungicidom in združljivost z drugimi kemijskimi in fizikalnimi načini kontrole bolezni (Wilson in Wisniewski, 1994). Kvasovke, poleg nekaterih naštetih lastnosti, ne proizvajajo alergeni ali mikotoksinov ter antibiotikov, sposobne so kolonizirati suhe površine za daljša časovna obdobja, zato je vse več raziskav usmerjenih v preučevanje kvasovk kot biokontrolnih agentov. Znani so koristni učinki dodatka kvasovk v prehrano in krmo, saj vsebujejo visoko vsebnost vitaminov, mineralov in esencialnih aminokislin (Stringer, 1982; Bui in Galzy, 1990; Hussein in sod., 1996).

Poleg tega je uporaba kvasovk kot biokontrolnih agentov sprejemljiva tudi za potrošnike, saj so kvasovke del naravne mikrobne populacije na površini sadja in zelenjave (Eckert, 1991; McLaughlin in sod., 1990). Ker so fenotipsko prilagojene, lahko učinkovito kolonizirajo in tekmujejo za hrano in prostor z drugimi mikroorganizmi na površini sadja. So tolerantne na visoke koncentracije sladkorjev, visok osmotski pritisk in na nizek pH, preživijo pa tudi pri ekstremnih pogojih skladiščenja (temperatura blizu 0 °C, visoka relativna vlaga, itd.) (Jijakli in Lepoivre, 1998). Kvasovke kot biokontrolni agenti ne tvorijo antibiotikov, temveč kot glavne mehanizme biokontrolnega delovanja uporabljajo predvsem tekmovanje za hrano in prostor ter parazitizem (Droby in sod., 1993; Wilson in Wisniewski, 1994).

Tekmovanje za hrano in prostor so kot mehanizem biokontrolnega delovanja na rast patogenih gliv *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* in *P. digitatum* dokazali za kvasovke vrst *Pichia guilliermondii*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii* in *Metschnikowia pulcherrima* (Droby in sod., 1989; Elad in sod., 1994; Piano in sod., 1997; Roberts 1990; Saligkarias in sod., 2002; Vero in sod., 2002). Ta mehanizem je pomemben za kontrolo nitastih gliv, kot je *B. cinerea*, saj le te za kaljenje in infekcijo gostiteljskega tkiva potrebujejo veliko količino hranil (Blakeman in Brodie, 1977). Dodatek hranil v gojišče zmanjša biokontrolno aktivnost kvasovke *P. guilliermondii* proti patogeni glivi *P. digitatum* (Droby in sod., 1989). Biokontrolni kvasovki *Cry. laurentii* in *Sporobolomyces roseus* sta hitreje porabljali sladkorje kakor patogena gliva *B. cinerea*, vendar pa se kvasovke z ali brez biokontrolne aktivnosti v porabi sladkorjev med sabo niso razlikovale. To kaže, da pri mehanizmih inhibicije rasti nitaste glive sodelujejo dodatni dejavniki (Filonow, 1998). S pomočjo postopka, kjer je biokontrolni mikroorganizem ločen od patogenega s fizično oviro, so Janisiewicz in sodelavci (2000) raziskovali tekmovanje za hrano, ločeno od tekmovanja za prostor. Testne plošče so vsebovale

difuzijsko membrano, ki omogoča prehod hranil, mikroorganizma pa sta prostorsko ločena. Kvasovka *Aureobasidium pullulans* je iz jabolčnega soka izčrpala aminokislino in inhibirala kaljenje spor ter rast konidijev patogene glive *Penicillium expansum*. Po dodatku jabolčnega soka je gliva *P. expansum* kalila normalno oz. enako kot kontrolna skupina, brez prisotne kvasovke (Janisiewicz in sod., 2000).

Biokontrolna aktivnost kvasovke *Metschnikowia pulcherrima* na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na jabolkih pod različnimi pogoji skladiščenja je zmanjšana ali je ni v prisotnosti nitratov (Piano in sod., 1997; Droby in Chalutz, 1993). Biokontrolna aktivnost kvasovke *M. pulcherrima* je odvisna tudi od koncentracije obeh mikroorganizmov; pri koncentraciji celic 10^6 CFU/ml kvasovka *M. pulcherrima* ni biokontrolno aktivna, pri koncentraciji 10^7 – 10^8 CFU/ml pa je učinkovito zavirala rast patogene glive (10^5 spor/ml). Vendar je pri visoki koncentraciji celic biokontrolne kvasovke (10^8 ali 10^9 CFU/ml) njena aktivnost zmanjšana zaradi gostote lastne populacije. Z dodatkom hranil in/ali s povečano vlažnostjo na ranjenem mestu se aktivnost poveča (Mercier in Wilson, 1995).

Podobno so štirje sevi vrste *Metschnikowia pulcherrima* zavirali rast patogenih gliv *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria* sp. in *Monilia* sp. na jabolkih (Spadaro in sod., 2002). Sevi biokontrolne kvasovke *Metschnikowia pulcherrima*, naneseni v koncentracijah 10^8 CFU/ml na umetno poškodovane dele jabolk, so ustavili rast nitastih gliv *B. cinerea*, in *P. expansum* pri temperaturi skladiščenja 4 °C, glive *Monilia* pa tudi pri temperaturi 23 °C. Testirani sevi kvasovke niso rasli pri temperaturi 37 °C, tako da s toksikološkega vidika njihove uporabe niso problematični. Biokontrolna aktivnost sevov *M. pulcherrima* je odvisna od uporabljene koncentracije celic, saj pri koncentraciji 10^6 CFU/ml noben sev ne kaže biokontrolne aktivnosti, hkrati pa je biokontrolna aktivnost povezana z živostjo celic. Sočasna kultivacija na sintetičnem gojišču povzroči popolno inhibicijo kaljenja spor nitaste glive *B. cinerea* (10^5 spor/ml), v prisotnosti celic biokontrolne kvasovke *M. pulcherrima* (10^8 CFU/ml), medtem ko filtrat celic kvasovk in avtoklavirana suspenzija celic kvasovk ne zmanjšajo kaljenja spor (Spadaro in sod., 2002).

Kvasovke *Pichia membranifaciens*, *P. guillermondii*, *P. anomala*, *Candida saitoana* in *Cryptococcus albidus* inhibirajo rast nitastih gliv *B. cinerea*, *Monilia fructicola*, *Penicillium expansum* in *Rhizopus stolonifer* tako da parazitirajo micelij (Wisniewski in sod., 1991). Pri tem tvorijo encime β -1-3 glukanazo, eksohitinaze in druge litične encime, ki povzročajo razgradnjo celične stene glive (Wisniewski in sod., 1991; Jijakli in Lepoivre, 1998; El-Ghaouth in sod., 2003; Chan in Tian, 2005). Površinski proteini glivne celične

membrane imajo pomembno vlogo pri pritrjevanju kvasovk nanjo, saj sta natrijev dodecil sulfat in β -merkaptetanol, ki tudi sicer denaturirata te proteine, blokirala pritrditve kvasovk. Kvasovke rodu *Pichia* (*P. anomala*, *P. guilliermondii* in *P. membranifaciens*) zavirajo kalitev spor in podaljševanje konidiofora nitaste glive *B. cinerea* in *Penicillium expansum*. Mikroskopski pregled micelija po 24 urni inkubaciji pokaže koagulacijo njegove protoplazme, mnogo hif je popolnoma praznih. Poskus na *in vitro* z *B. cinerea* okuženi vinski trti pokaže, da rastlina razvije značilne bolezenske simptome in na koncu odmre. Skupina rastlinic, inokuliranih z mešanico nitaste glive in kvasovk, pa se razvije v zdravo rastlino (Masih in sod., 2000; Masih in sod., 2001).

Tudi kvasovka *Candida saitoana* se pritrdi na steno hife nitaste glive *B. cinerea* in povzroči degradacijo njene celične stene. Hife so citološko poškodovane, celična stena je otečena, protoplazma degenerirana (El-Ghaouth in sod., 1998). Poleg omejitve kolonizacije nitaste glive kvasovka *C. saitoana* povzroči tudi strukturne obrambne odzive v jabolčnem tkivu (El-Ghaouth in sod., 1998).

Biokontrolno aktivnost kvasovkam podobne glive *Aureobasidium pullulans* so raziskovali in še raziskujejo številni znanstveniki (Castoria in sod., 1997; Leibinger in sod., 1997; Lima in sod., 1997; Schena in sod., 1999; Castoria in sod., 2001) V eksperimentalnih pogojih je kvasovkam podobna gliva *Aureobasidium pullulans* zmanjšala infekcijo, ki jo povzročajo glive *B. cinerea*, *P. expansum*, *A. niger* in *R. stolonifer* na grozdju in jabolkih. Tekmovanje za hrano in prostor je glavni mehanizem biokontrolnega delovanja te kvasovki podobne glive. Pri dodatku NYDB (ang. nutrient yeast dextrose broth) v rane na površini jabolka, se je odstotek infekcije povečal. V biokontrolno aktivnost najverjetneje nista vpleteni antibiotika ter fizična pritrditve na površino patogene glive (Castoria in sod., 1997).

Kvasovki *Aureobasidium pullulans* in *Candida oleophila* sta bolj biokontrolno aktivni, kadar sta nanesti v času cvetenja kot ob trgatvi. Poleg tekmovanja za hrano in prostor je kot možen način njune biokontrolne aktivnosti omenjena tudi direktna interakcija s patogenom (Lima in sod., 1997). Učinkovitost biokontrolne aktivnosti *A. pullulans* proti *B. cinerea* je bila večja od učinkovitosti uporabe vincozolina, fungicida, ki se uporablja za kontrolo rasti *B. cinerea*. Kvasovki sta pokazali tudi odpornost proti nekaterim fungicidom, kar poveča njune možnosti uporabe v programu integriranega vinogradništva (Lima in sod., 1997). Poleg tega sta obe kvasovki temperaturno občutljivi, temperature višje od 33 °C so zanju letalne, zato kot taki človeku bolj sprejemljivi (Lima in sod., 1997).

Poleg tekmovanja za hrano in prostor ter direktne interakcije pa lahko nekatere kvasovke zavirajo rast nitastih gliv tudi z izločanjem ekstracelularnih molekul. Pri skupni rasti nitaste glive *B. cinerea* in kvasovke *P. membranifaciens* na Petri plošči z gojiščem, se okoli kvasovke ustvari cona inhibicije s premerom 32 mm (Santos in sod., 2004). Podobno se cona inhibicije rasti nitaste glive pojavi tudi ob uporabi očiščenega »killer toksin«-a iste kvasovke. Poleg inhibicije razvoja micelija na Petri plošči, se pojavi tudi pigmentacija micelija. Optimalno razmerje med koncentracijama celic kvasovke *P. membranifaciens* in nitaste glive *B. cinerea* naj bi bilo 1,5 : 2, vsak odmik od tega razmerja v prid kvasovke vodi v popolno inhibicijo bolezni sive plesni na jabolkih (Santos in sod., 2004).

Kvasovka *P. guilliermondii* lahko stimulira proizvodnjo etena v grenivki (Droby in sod., 1991), ali fitoaleksina pri citrusih (Rodov in sod., 1994). Kvasovki *A. pullulans* in *C. saitoana* lahko inducirata akumulacijo glukonaz, hitinaz in peroksidaz v jabolkih (Ippolito in sod., 2000; El Ghaouth in sod., 2003), kar kaže na to, da lahko biokontrolne kvasovke stimulirajo neke vrste obrambne mehanizme gostitelja.

2.5 CILJI RAZISKOVANJA

Namen dela je bil ugotoviti, kakšen vpliv imajo izbrane vrste kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. V ta namen smo testirali 16 različnih vrst kvasovk, naravno prisotnih v ekosistemu trta/grozdje/moš/vino. V raziskovalnem delu smo se osredotočili na spremljanje rasti različnih vrst/sevov kvasovk in nitasto glivo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na trdnih gojiščih *in vitro*. Ugotavljali smo tudi kako različna trdna sintetična gojišča vplivajo na biokontrolno aktivnost kvasovk.

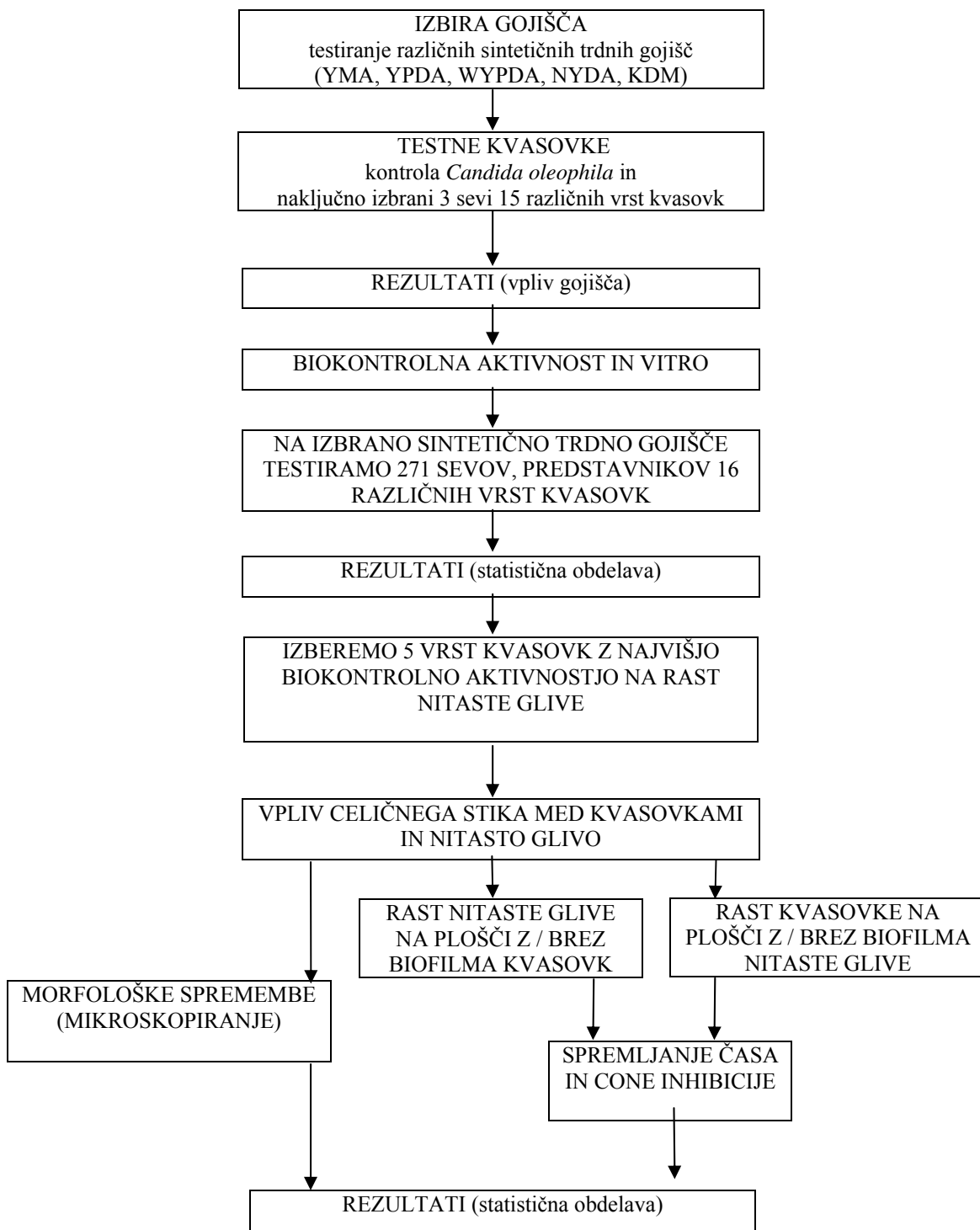
2.6 DELOVNE HIPOTEZE

Hipoteza 1:

Nekatere vrste in/ali sevi kvasovk imajo biokontrolno aktivnost in s tem zavirajo rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.

Hipoteza 2:

Celični stik je eden od mehanizmov biokontrolne aktivnosti, s katero kvasovke zavirajo rast nitaste glive.



Slika 2: Hodogram poteka poskusa ugotavljanja vpliva izbranih vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botrytis cinerea*

3 METODE IN MATERIALI

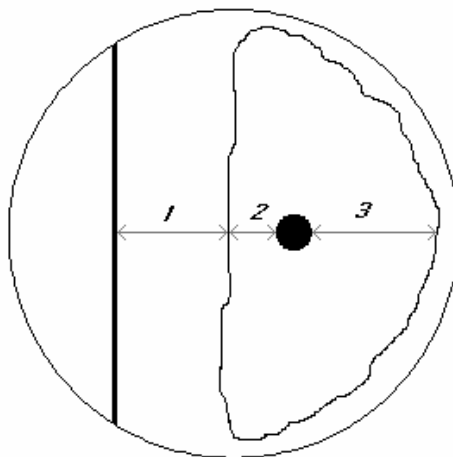
3.1 METODE

3.1.1 Test biokontrolne aktivnosti *in vitro*

Biokontrolno aktivnost izbranih sevov kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) smo testirali na petih trdnih sintetičnih gojiščih (YMA, YPDA, WYPDA, NYDA, KDM). Na Petri plošče premera 90 mm smo podobno kot Spadaro in sod. (2001) v sterilni komori v obliki črte 20 mm od roba plošče nanесли tri do pet dni staro kolonijo kvasovk. Na razdalji 32 mm od kvasovke in 32 mm od roba plošče pa smo s pipeto inokulirali 30 μ l sveže v fiziološki raztopini pripravljene suspenzije spor nitaste glive. Postopek priprave suspenzije glive je opisan v poglavju 3.1.4. Po inkubaciji pri 25 °C smo merili tri razdalje:

- (1) razdaljo med kvasovko in nitasto glivo,
- (2) radialna rast nitaste glive proti kvasovki in
- (3) radialna rast nitaste glive proti robu plošče (slika 3)

Razdalje smo spremljali in merili dnevno do osmega dne in nato še 15. in 30. dan. Rezultate oz. petrijeve plošče smo sedmi in 30. dan tudi skenirali. Poskus smo izvedli v treh paralelkah. Rezultate smo z enačbo 1 in programom Microsoft Excel tudi statistično obdelali (average, stdev).



Slika 3: Spremljanje biokontrolne aktivnosti kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel *in vitro*

Legenda: 1 – biokontrolna rast kvasovke oz. zaviranje rasti micelija nitaste glive v smeri proti kvasovki, 2 - radialna micelija nitaste glive proti kvasovki in, 3 - radialna rast micelija nitaste glive proti robu plošče, debela črta – nanešena posamezna kolonija kvasovk, debela pika – nanešena suspenzija spor nitaste glive.

$$\text{Biokontrolna aktivnost (\%)} = \frac{\text{razdalja1}}{(\text{razdalja1} + \text{razdalja2})} \times 100 \quad \dots(1)$$

3.1.2 Test biokontrolne aktivnosti za določanje vpliva gojišča

Vpliv sestave gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk smo določali s testom opisanim v poglavju 3.1.1. Izmed vseh 271 sevov kvasovk smo naključno izbrali po tri predstavnike – seve iste vrste (preglednica 1) ter kontrolno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher (ZIM 2276).

Določali smo vpliv petih trdnih sintetičnih gojišč, katerih sestava je opisana v poglavju 3.2.3. YMA (ang. yeast-malt agar) oz. sladni agar je osnovno mikrobiološko gojišče za izolacijo in kultivacijo kvasovk in drugih gliv, ki za razliko od ostalih medijev edini vsebuje sladni ekstrakt. Prav tako je YPDA (ang. yeast peptone dextrose agar) splošno uveljavljeno neselektivno gojišče. Medij NYDA (ang. nutrient yeast dextrose agar) smo izbrali zato, ker poleg kvasnega ekstrakta in glukoze vsebuje tudi hranilno juho (ang. nutrient broth), v kateri se nahaja 5g/l NaCl. Ker pa ima grozdje specifično sestavo, smo želeli preveriti tudi gojišči, ki se po sestavi temu najbolj približata. WYPDA (ang. wine yeast peptone dextrose agar) je po sestavi enak YPDA, le da vsebuje 200 g/l glukoze. KDM (kemijsko definiran mošt), pa je kot pove že ime, najbolj podoben sestavi grozdnega soka, saj vsebuje tudi proste amino kisline, vitamine, minerale, kisline in soli. Test smo izvedli v treh paralelkah.

3.1.3 Določanje biokontrolne aktivnosti kvasovk

Na izbranem gojišču smo s testom, opisanim v poglavju 3.1.1, testirali vseh 271 naključno izbranih sevov iz ZIM. Biokontrolno aktivnost kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel smo spremljali tako, da smo merili razdalje (slika 3) sedmi, 15. in 30. dan. Petri plošče smo takrat tudi preslikali z optičnim čitalcem. Poskus smo izvedli v treh paralelkah. Rezultate smo statistično obdelali.

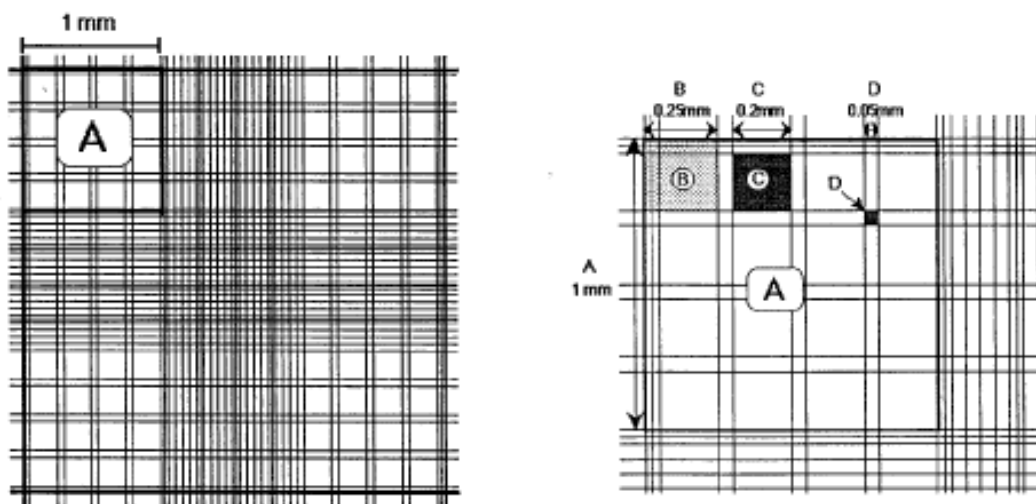
3.1.4 Priprava suspenzij mikroorganizmov z ustrezno koncentracijo

Celice kvasovk in spor nitaste glive smo pripravili v fiziološki raztopini s pomočjo Bürker – Türkov-ega hemocitometra do ustrezne koncentracije celic. Kvasovke smo pripravili do začetne koncentracije celic 10^8 cfu/ml ali 10^6 cfu/ml, začetna koncentracija spor nitaste glive pa je bila 10^4 spor/ml ali 10^3 spor/ml.

Pod mikroskopom smo na Bürker – Türk-ovem hemocitometru prešteli 10 kvadratkov C znotraj kvadrata A (slika 3) in število celic izračunali po naslednji enačbi:

$$N = n_{10} \times 2,5 \times 10^5 \times R \quad \dots(2)$$

N – število celic v 1 ml vzorca; n_{10} – povprečno število celic v 10 kvadratih; R – razredčitev; $2,5 \cdot 10^5$ – Bürker – Türk-ova konstanta



Slika 4: Bürker – Türk-ov hemocitometer (Hemacytometer: Bürker – Türk, 2006: 1)

3.1.5 Vpliv celičnega stika

Vpliv celičnega stika (ang. cell-cell contact) smo ugotavljali na trdnih medijih PDA in NYDA. Po površini trdnega medija smo kot primarni nanos razporedili bodisi kvasovke, bodisi nitasto glivo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Po osušitvi primarnega nanosa pa smo na njegovo površino nanесли še drug organizem (na primarni nanos kvasovk smo nanесли spore nitaste glive in obratno, na primarni nanos nitaste glive smo nanесли celice kvasovk). Plošče smo inkubirali 30 dni pri 25 °C.

3.1.5.1 Primarni nanos kvasovk (test A)

Na označene petrijevke s pripravljenim gojiščem NYDA in PDA smo s pomočjo steklenih kroglic po celotni površini razporedili 0,5 ml pripravljene suspenzije izbranih sevov kvasovk z določeno koncentracijo celic (10^8 ali 10^6 cfu/ml). Odprte petrijevke smo osušili ob ognju v laminariju. Ko se je nanešeni primarni nanos kvasovk posušil, smo na sredino petrijevke s pipeto nanесли 50 μ l pripravljene suspenzije spor nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) z določeno koncentracijo. V tiste petrijevke, kjer je bila koncentracija kvasovk 10^8 cfu/ml, smo nanесли 10^4 spor/ml, v tiste s koncentracijo kvasovk 10^6 cfu/ml pa 10^3 spor/ml in sicer v različnih časovnih intervalih (0, 24, 48 h) od posušitve petrijevke. Poskus smo izvedli v treh paralelkah. Petrijeve plošče smo inkubirali pri 25 °C. Rast nitaste glive ter morfologijo celic kvasovk in nitaste glive smo makro- in mikroskopsko spremljali sedmi, 15. in 30. dan glede na kontrolno ploščo – brez primarnega nanosa. Rezultate smo tudi optično preslikali in fotografirali.

3.1.5.2 Primarni nanos nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (test B)

Poskus smo izvedli tudi obratno. Na označene petrijevke s pripravljenim gojiščem NYDA in PDA smo s pomočjo steklenih kroglic po celotni površini razporedili 0,5 ml suspenzije spor nitaste glive, z določeno koncentracijo spor (10^4 ali 10^3 spor/ml). Odprte petrijevke smo osušili ob ognju v laminariju. Ko se je nanešeni primarni nanos suspenzije spor nitaste glive posušil, smo na sredino petrijevke s pipeto nanесли 50 μ l pripravljene suspenzije izbranih sevov kvasovk z določeno koncentracijo. V tiste petrijevke kjer je bila koncentracija nitaste glive 10^4 spor/ml, smo nanесли 10^8 cfu/ml, v tiste s koncentracijo nitaste glive 10^3 spor/ml pa 10^6 cfu/ml in sicer v različnih časovnih intervalih (48, 72, 96 ur). Rast nitaste glive ter morfologijo celic kvasovk in nitaste glive smo makro- in mikroskopsko spremljali sedmi, 15. in 30. dan glede na kontrolno ploščo - brez primarnega nanosa. Rezultate smo tudi optično preslikali in fotografirali.

3.1.6 Metoda za obdelavo podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software, Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane 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 2086, CO 2276, MP 2055, PG m133, SC 2175), vpliv gojišča (NYDA in PDA), vpliv kombinacije koncentracij ($10^6/10^3$ in $10^8/10^4$) in vpliv časa inokulacije (0, 24 in 48 ur – za kvasovke, ter 48, 72 in 96 ur – za nitasto glivo).

3.2 MATERIALI

Pri raziskovalnem delu smo uporabili biološki in potrošni material ter laboratorijsko opremo iz laboratorija Katedre za biotehnologijo.

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri našem delu smo testirali 271 naključno izbranih sevov (Priloga A), ki pripadajo 16 različnim vrstam kvasovk ter nitasto glivo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58).

Kvasovke so bile izolirane iz naravnega ekosistema trta/grozdje/moš/vino, identificirane in shranjene v ZIM (Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2007). Uporabili smo tudi kontrolno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher (1976) NRRL Y-2317, pridobljeno iz mikrobne zbirke ARS Culture Collection.

Iz zbirke ZIM smo seve kvasovk revitalizirali tako, da smo jih nacepili na agarške plošče YM in inkubirali 3-5 dni v inkubatorju pri 25 °C. Po revitalizaciji smo kvasovke hranili na agarških ploščah z gojiščem YMA (ang. yeast-malt agar) v inkubatorju pri 25 °C. Vitalnost kvasovk smo ohranjali s precepjanjem kulture na sveže gojišče YMA vsake 3-5 dni.

Sev nitaste glive smo prav tako revitalizirali, vendar smo uporabili agarške plošče PDA. Vitalnost nitaste glive smo ohranjali tako, da smo košček micelija s spori vsake 2 – 3 tedne precepili na sveže plošče PDA.

Preglednica 1: Izbrani sevi posamezne vrste kvasovk za določanje vpliva gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk

IME	ZIM
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2059 2098 k126
<i>Bulleromyces albus</i>	645 646 s202
<i>Candida glabrata</i>	510 1990 2005
<i>Candida stellata</i>	2049 2111 2121
<i>Cryptococcus magnus</i>	m202 o308 s120
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	2025 2120 o/1152/401
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2040 2080 o102
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	622 2016 2055
<i>Pichia guillermondii</i>	624 m133 m142
<i>Pichia kluyveri</i>	2053 2090 2108
<i>Pichia membranifaciens</i>	o/1152/404 o/1152/410 o/2112/401
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	2052 2102 s207
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2045 2101 o101
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2145 2180 s/432/405
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	k225 m209 o130

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva celičnega stika

Nitasta gliva	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel. (ZIM F58)
Kvasovke	<i>Aureobasidium pullulans</i> (ZIM 2086) <i>Candida oleophila</i> (ZIM 2276) <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (ZIM 2055) <i>Pichia guilliermondii</i> (ZIM m133) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ZIM 2175)

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Gojišče YMA (ang. yeast-malt agar), (Atlas in Parks, 1993)

0,3 % kvasni ekstrakt	(Biolife, Italija)
0,3 % sladni ekstrakt	(Biolife, Italija)
0,5 % pepton	(Oxoid, Anglija)
1,0 % glukoza	(Kemika, Hrvaška)
2,0 % agar	(Biolife, Italija)

Vse sestavine smo zatehtali in raztopili v ustrezni količini destilirane vode s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Tako raztopljeno gojišče smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min).

Gojišče PDA (ang. potato dextrose agar)

PDA gojišče je komercialno dostopno. Pripravimo ga po navodilih proizvajalca.

3,9 % PDA	(Merck, Nemčija)
-----------	------------------

Sestava komercialno dostopnega PDA:

0,4 % krompirjev nalivek (potatoes infusion)
2,0 % D(+) glukoza
1,5 % agar

Po navodilih proizvajalca zatehtamo ustrezno količino PDA in jo raztopimo v ustrezni količini destilirane vode s segrevanjem v vodni kopeli. Tako raztopljeno gojišče steriliziramo v avtoklavu (121 °C, 15 min).

3.2.3 Testna gojišča

Na testnih gojiščih smo testirali vpliv gojišča in biokontrolno aktivnost kvasovk na rast nitaste glive. Gojišča smo pripravili po sledečih recepturah ter jih sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min).

Gojišče NYDA (ang. nutrient yeast dextrose agar), (Atlas in Parks, 1993)

0,5 % kvasni ekstrakt	(Biolife, Italija)
0,8 % hranilna brozga	(Oxoid No.2, Anglija)
1,0 % glukoza	(Kemika, Hrvaška)
1,5 % agar	(Biolife, Italija)

Gojišče PDA (ang. potato dextrose agar)

Postopek priprave in sestava gojišča je enaka kot v točki 3.2.2.

Gojišče YMA (ang. yeast-malt agar), (Difco, USA) (Atlas in Parks, 1993)

Postopek priprave in sestava gojišča je enaka kot v točki 3.2.2.

Gojišče YPDA (ang. yeast peptone dextrose agar)

0,5 % kvasni ekstrakt	(Biolife, Italija)
1,0 % pepton	(Oxoid, Anglija)
1,0 % glukoza	(Kemika, Hrvaška)
2,0 % agar	(Biolife, Italija)

Gojišče WYPDA (ang. wine yeast peptone dextrose agar), (modificiran po Nissen in Arneborg, 2003)

0,5% kvasni ekstrakt	(Biolife, Italija)
1,0 % pepton	(Oxoid, Anglija)
20,0 % glukoza	(Kemika, Hrvaška)
2,0 % agar	(Biolife, Italija)

KEMIJSKO DEFINIRAN MOŠT (KDM) (Henschke in Jiranek, 1992)

Sestava kemijsko definirane mošta je podana v Prilogi B1. Predhodno smo pripravili založne raztopine posameznega minerala in vitaminov (Priloge B2 in B3). Založne raztopine mineralov in vitaminov smo sterilizirali v avtoklavu.

Vse ostale sestavine smo zatehtali in raztopili v ustrezni količini destilirane vode s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Tako raztopljeno gojišče smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min). Po sterilizaciji smo aseptično dodali ustrezne količine založnih raztopin mineralov in vitaminov.

3.2.4 Raztopine

FIZIOLOŠKA RAZTOPINA

Uporabili smo jo pri določanju števila celic za razredčevanje po Kochu.

Priprava založne fiziološke raztopine:

KH ₂ PO ₄	34 g
NaOH	1 ali 3 M

KH₂PO₄ smo raztopili v 500 ml čaši z destilirano vodo in jo nevtralizirali z NaOH do vrednosti pH 7,2. Raztopino v merilni bučki smo dopolnili z destilirano vodo do oznake 1000 ml.

Koncentrat za fiziološko raztopino hranimo v hladilniku in ga redčimo pred uporabo v razmerju 1,25 : 1000 ml destilirane vode. Sledi sterilizacija v avtoklavu (121 °C, 20 min).

3.2.5 Laboratorijska oprema

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

- avtoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- avtomatske pipete (Gibson, Francija)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122VA, Slovenija)

- digestorij (Iskra, Slovenija)
- fotoaparati Canon, PowerShot S400 (Canon, Tokyo, Japonska)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- inkubator (Sutjeska, Jugoslavija)
- magnetno mešalo (Rotamix 550 MM, Tehnica, Slovenija)
- mikroskop (Leica DMLB, Nemčija)
- mikrovalovna pečica (Turbo Chef, Candy, Italija)
- pH meter (Mettler Toledo, ZDA)
- optični čitalec (Hewlett Packard, Scan Jet 5P, ZDA)
- spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000, ZDA)
- sušilnik (Sutjeska, Jugoslavija)
- števne ploščice Bürker-Türk (Brand, Nemčija)
- tehtnice (Exacta 1200EB, Tehnica, Slovenija; Sartorius-analitic, GMBH, Nemčija; Sartorius-exelence, GMBH, Nemčija)
- vodna kopel (HETO, Danska)
- vrtinčnik (Vibromix 104 EV, Tehnica, Slovenija)

Uporabili smo tudi:

- pincete
- plastične eze
- škarje
- milimetrski papir
- 70 % etanol (Merck, Nemčija)
- imerzijsko olje za mikroskopiranje (Kemika, Hrvaška)

4 REZULTATI

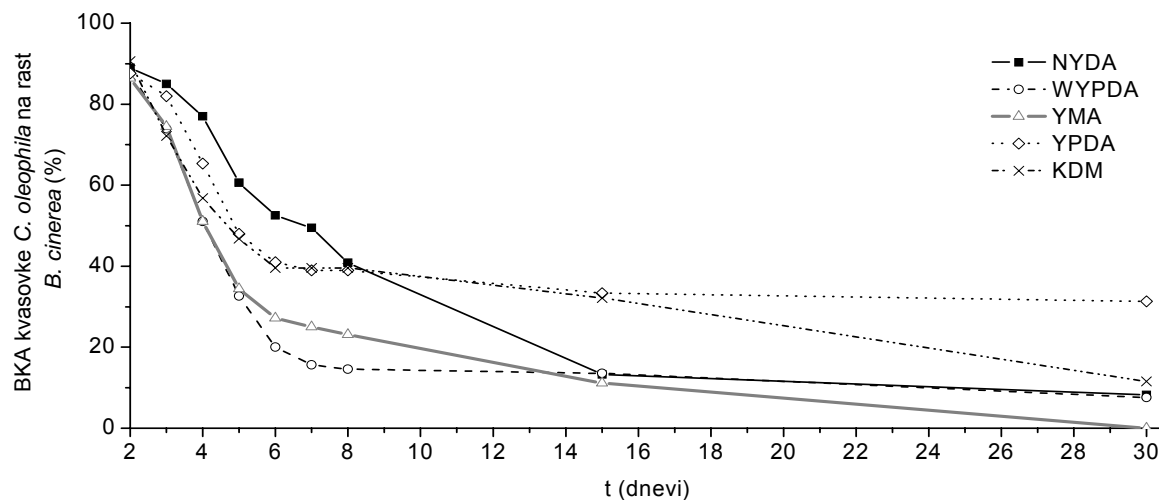
Ker nas je zanimal vpliv izbranih vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, smo iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) testirali 271 sevov različnih vrst in rodov kvasovk (priloga A). Poiskovali smo ugotoviti, ali prihaja do interakcij med kvasovkami in nitasto glivo v neposrednem stiku na trdnem gojišču. Rezultate smo v tem poglavju predstavili v 45 slikah. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v 784 urah laboratorijskega dela med majem 2005 in januarjem 2006.

4.1 VPLIV GOJIŠČ NA BIOKONTROLNO AKTIVNOST KVASOVK

Biokontrolno aktivnost kvasovk smo testirali na petih trdnih sintetičnih gojiščih; YMA, YPDA, WYPDA, NYDA in KDM (sestava gojišč opisana v poglavjih 3.2.2 in 3.2.3). Različne vrste kvasovk (trije naključno izbrani sevi iste vrste) ter kontrolna kvasovka *Candida oleophila* Montrocher NRRL Y-2317 so na različnih trdnih gojiščih pokazale različno biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58). Vsi poizkusi so bili narejeni v treh paralelkah.

4.1.1 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Candida oleophila* Montrocher

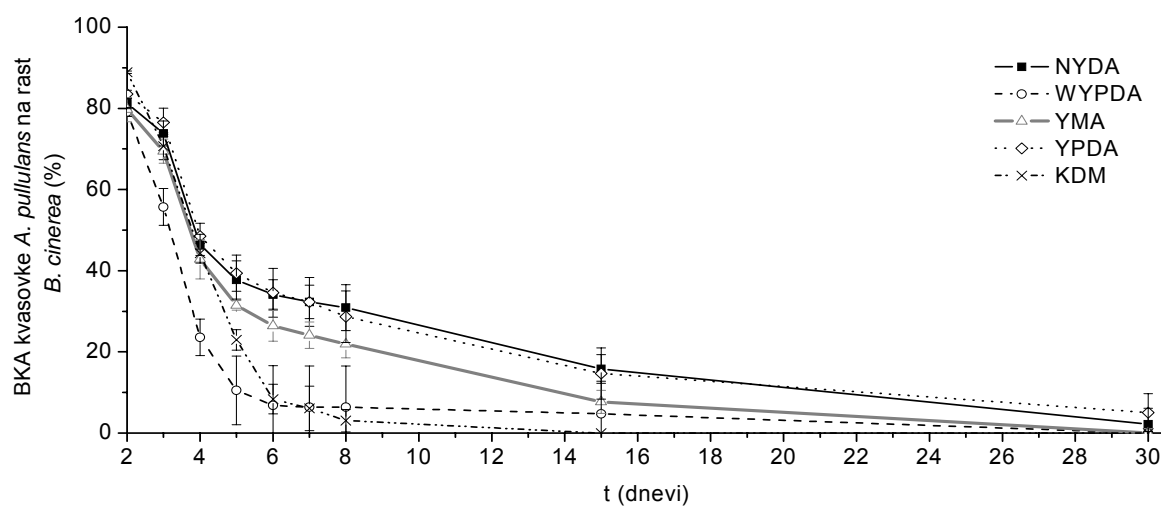
Kvasovka *Candida oleophila* Montrocher je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA (61 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (33 %). Biokontrolna aktivnost kvasovke je bila po sedmih dneh na gojišču YPDA 39 % in se do 30. dne skoraj ni zmanjšala (31 %). Na gojiščih NYDA in KDM je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 49 % in 40 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 8 % in 11 %. Na gojiščih YMA in WYPDA je sedmi dan kvasovka kazala 25 % in 16 % biokontrolno aktivnost, ki se je do 30. dne znižala na 0 % in 1 % (slika 5).



Slika 5: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Candida oleophila* Montrocher na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.2 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Aureobasidium pullulans*

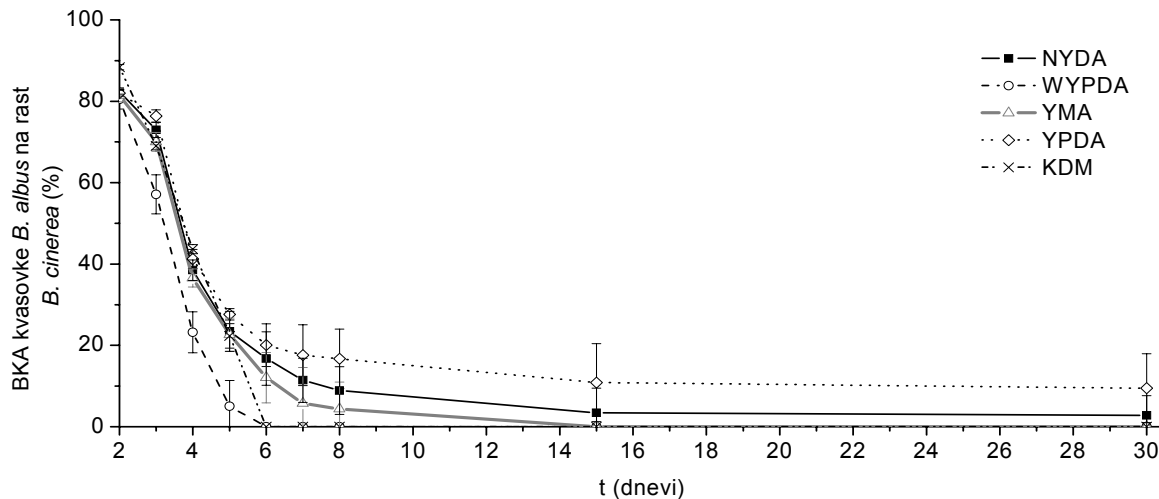
Kvasovki podobna gliva *Aureobasidium pullulans* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (39 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (10 %). Po sedmih dneh inkubacije je kvasovki podobna gliva najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojiščih NYDA in YPDA (32 %), najslabšo pa na gojišču KDM (6 %). Najboljšo biokontrolno aktivnost je po osmih dneh inkubacije kvasovki podobna gliva dosegla na gojišču NYDA (31 %), najslabšo pa na gojišču KDM (3 %). Po 15 dneh inkubacije je kvasovki podobna gliva najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA (16 %), najslabšo pa na gojišču KDM (0 %). Do konca inkubacijske dobe (30. dan) je kvasovki podobna gliva najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (5 %), najslabšo pa na gojiščih WYPDA, YMA in KDM (0 %), kjer je že izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 6).



Slika 6: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Aureobasidium pullulans* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.3 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Bulleromyces albus*

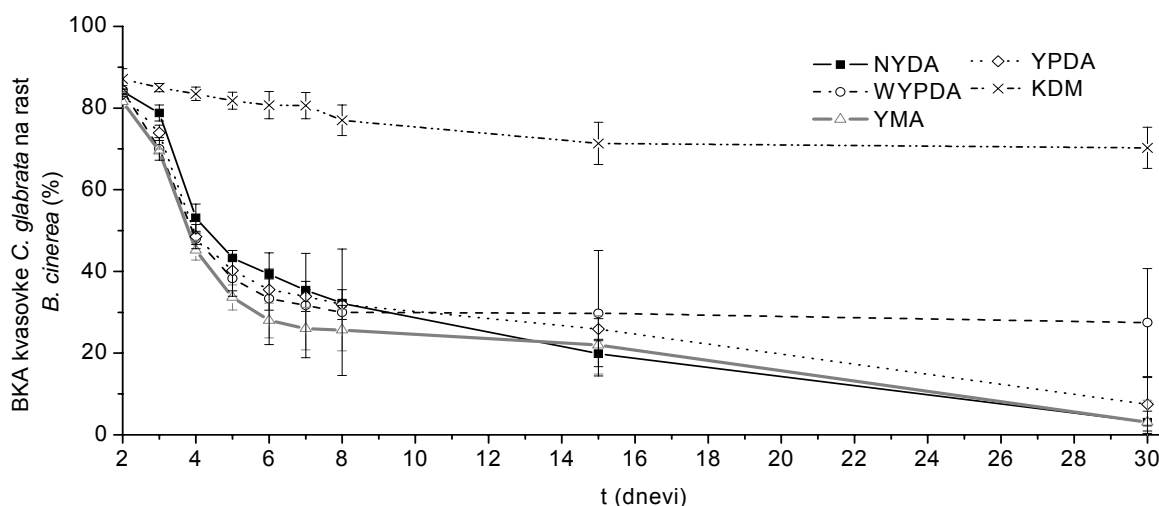
Vpliv različnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovke *Bulleromyces albus* kaže, da kvasovke zelo hitro izgubijo svojo biokontrolno aktivnost. Ta je bila po petih dneh inkubacije najvišja na gojišču YPDA (28 %), najnižja pa na gojišču WYPDA (5 %). Po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (18 %), najslabšo pa na gojiščih WYPDA in KDM (0 %). Prav tako je po osmih dneh inkubacije kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (17 %), najslabša pa je ostala na gojiščih WYPDA in KDM (0 %). Na gojišču NYDA je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 11 % vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 3 %. Po 15 dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (11 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 9 %. Najslabšo biokontrolno aktivnost pa je po 15 in 30 dneh kazala na gojiščih WYPDA, YMA in KDM (0 %), kjer je že izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 7).



Slika 7: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Bulleromyces albus* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.4 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Candida glabrata*

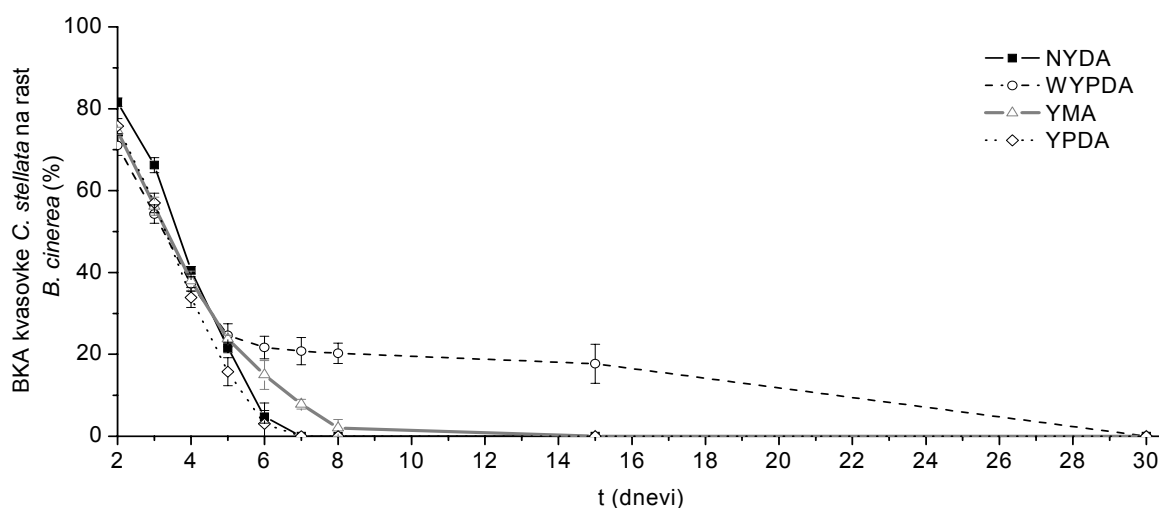
Kvasovka *Candida glabrata* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (82 %), najslabšo pa na gojišču YMA (34 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (81 %), ki je osmega dne padla na 77 %, najslabšo pa na gojišču YMA, ki je tako sedmi kot osmi dan znašala 26 %. Na gojišču YPYDA je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 33 % vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 7 %. Po 15 dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (71 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 70%. Najslabšo biokontrolno aktivnost je kvasovka po 15 dneh kazala na gojišču NYDA (20 %), po 30 dneh pa na gojiščih NYDA in YMA (3 %) (slika 8).



Slika 8: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Candida glabrata* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.5 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Candida stellata*

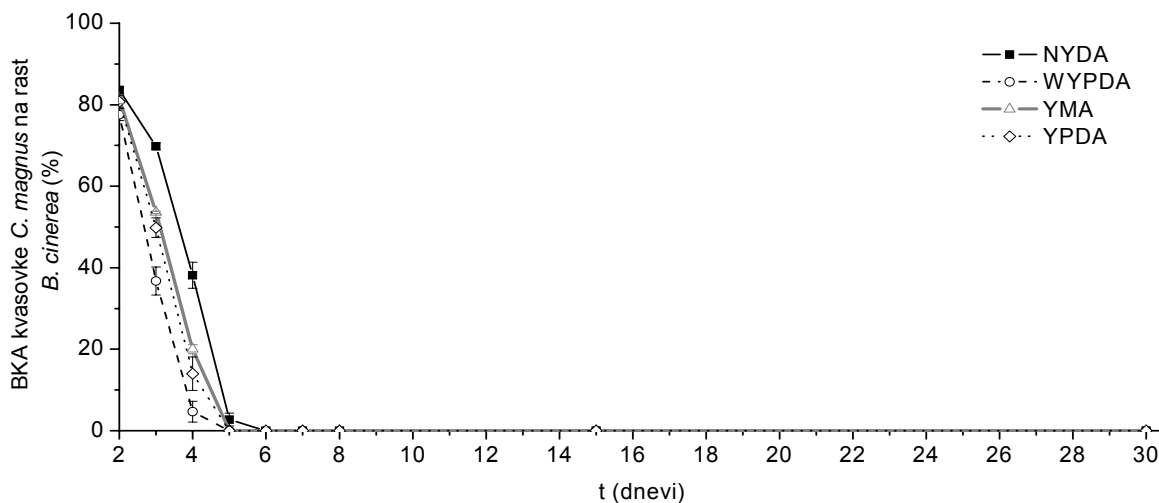
Kvasovka *Candida stellata* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču WYPDA (25 %), najslabšo pa na gojišču YPDA (16 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču WYPDA (21 %), ki je do 15. dne padla na 18 %. Na gojiščih NYDA in YPDA je kvasovka že po sedmih dneh izgubila biokontrolno aktivnost (0 %). Po 30 dneh inkubacije kvasovka na nobenem od gojišč ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 9).



Slika 9: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Candida stellata* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.6 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Cryptococcus magnus*

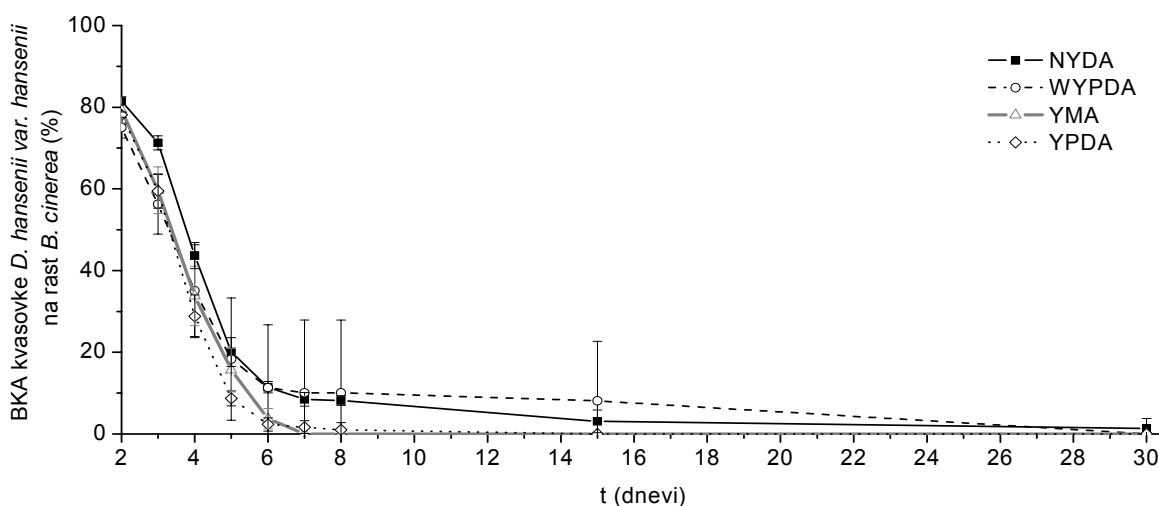
Kvasovka *Cryptococcus magnus* je po petih dneh inkubacije kazala biokontrolno aktivnost le na gojišču NYDA (3 %). Na ostalih gojiščih pa je kvasovka že po petih dneh inkubacije izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 10).



Slika 10: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Cryptococcus magnus* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.7 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*

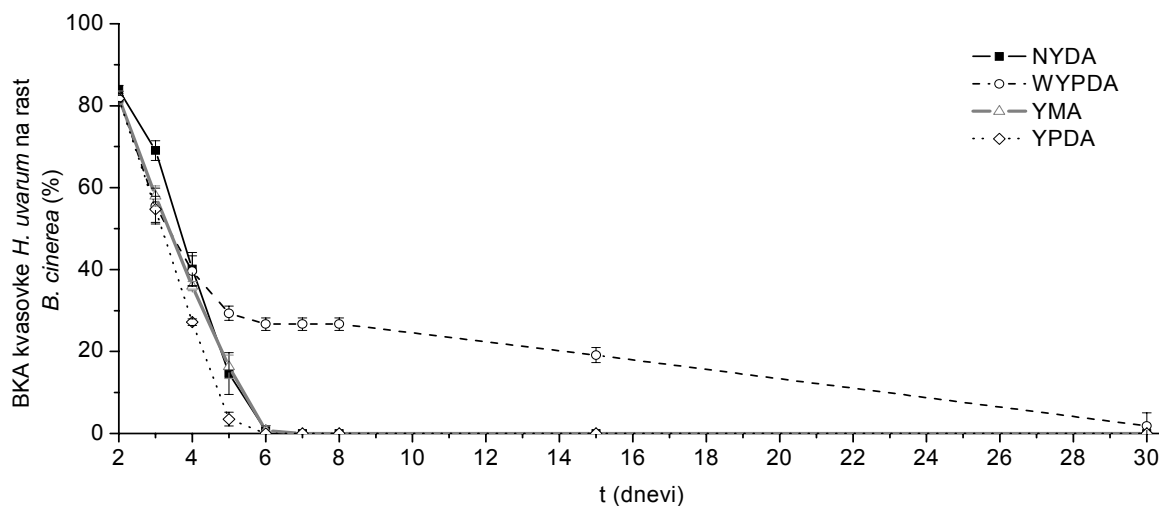
Kvasovka *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA (20 %), najslabšo pa na gojišču YPDA (9 %). Po sedmih in prav tako po osmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču WYPDA (10 %), najslabšo pa na gojišču YMA (0 %). Po 15 dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost dosegla na gojišču WYPDA (8 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) izgubila biokontrolno aktivnost (0 %). Po 30 dneh je kvasovka biokontrolno aktivnost kazale le na gojišču NYDA (1 %) (slika 11).



Slika 11: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.8 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Hanseniaspora uvarum*

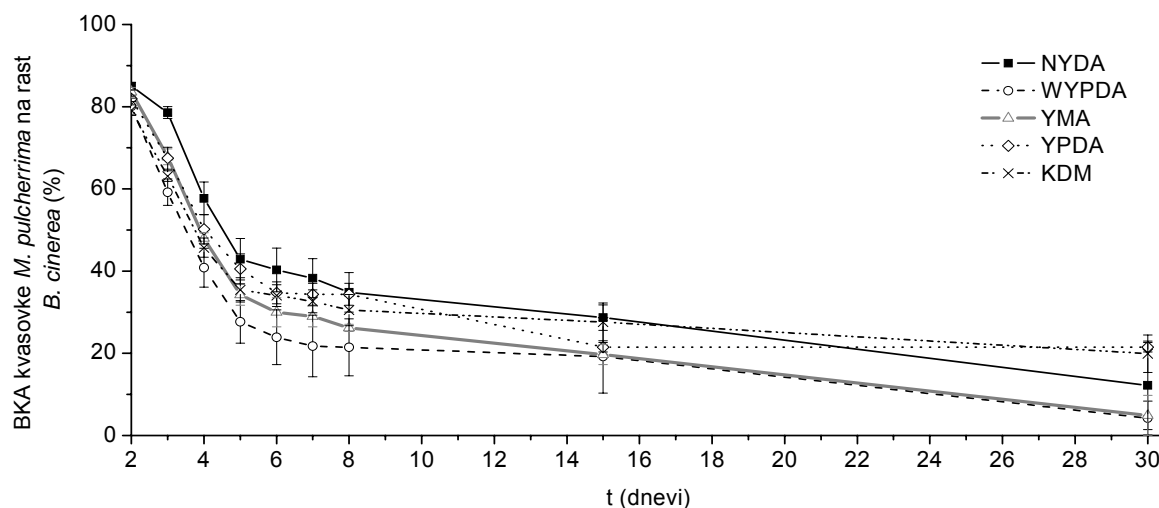
Kvasovka *Hanseniaspora uvarum* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču WYPDA (29 %), najslabšo pa na gojišču YPDA (3 %). Po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču WYPDA (27 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 2 %. Na gojiščih NYDA, YMA in YPDA pa je kvasovka že po sedmih dneh izgubila biokontrolno aktivnost (0 %) in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 12).



Slika 12: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Hanseniaspora uvarum* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.9 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Metschnikowia pulcherrima*

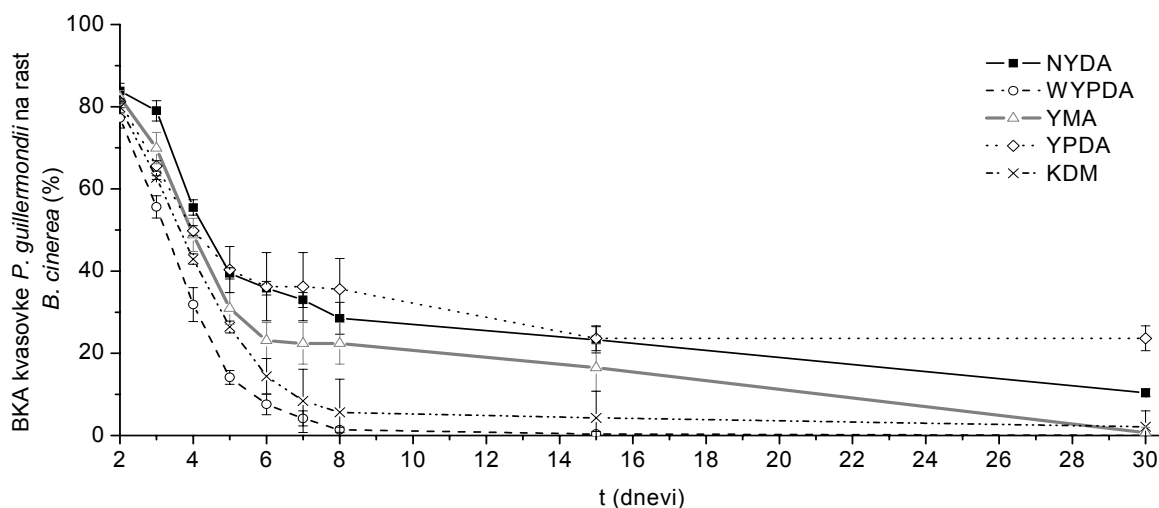
Kvasovka *Metschnikowia pulcherrima* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA (43 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (28 %). Tudi po sedmih (38 %), osmih (35 %) in 15 dneh (29 %) inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA, najslabšo pa na gojišču WYPDA, ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 4 %. Na gojiščih KDM in YMA je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 33 % in 29 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 20 % in 5 %. Po 30 dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (21 %) (slika 13).



Slika 13: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Metschnikowia pulcherrima* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.10 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Pichia guilliermondii*

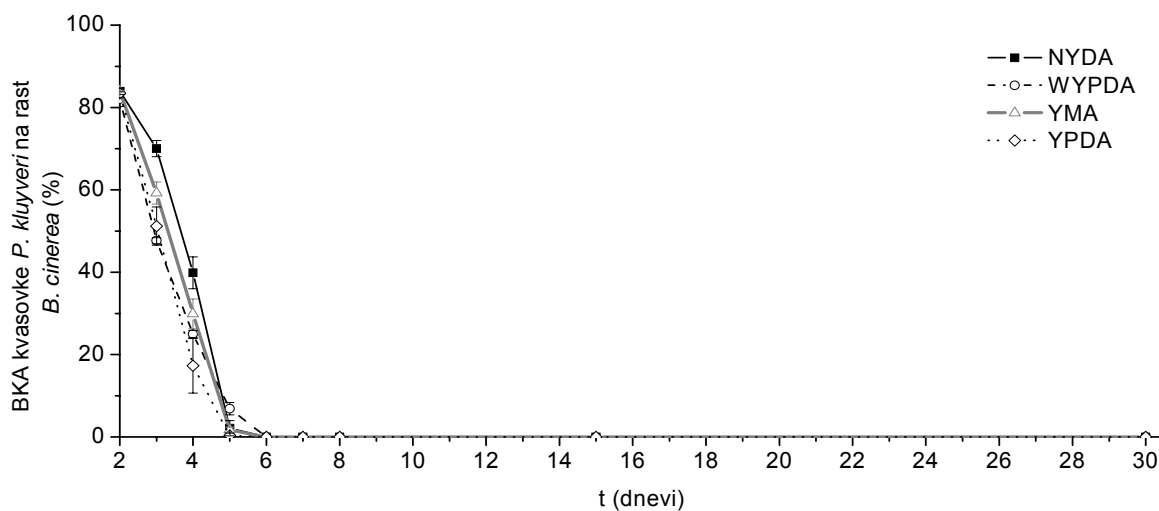
Kvasovka *Pichia guilliermondii* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (40 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (14 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YPDA (36 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 24 %, najslabšo pa na gojišču WYPDA (4 %), kjer je do konca inkubacijske dobe (30. dan) izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Na gojiščih NYDA, YMA in KDM so bile vrednosti sedmi dan za vsako gojišče posebej 33 %, 22 % in 8 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 10 %, 1 % in 2 % (slika 14).



Slika 14: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Pichia guilliermondii* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.11 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Pichia kluyveri*

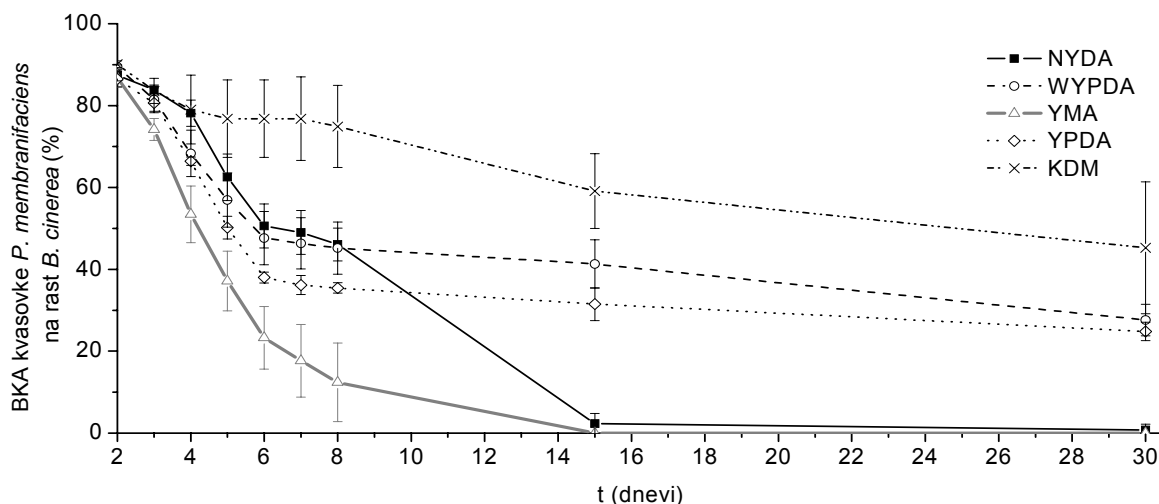
Vpliv različnih gojišč na biokontrolno aktivnost kvasovke *Pichia kluyveri* kaže, da kvasovka na vseh gojiščih zelo hitro izgubi svojo biokontrolno aktivnost. Po petih dneh inkubacije je najboljšo biokontrolno aktivnost kvasovka kazala na gojišču WYPDA (7 %), najslabšo pa na gojišču YPDA (0 %). Po sedmih dneh inkubacije ni kvasovka na nobenem od gojišč inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 15).



Slika 15: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Pichia kluyveri* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.12 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Pichia membranifaciens*

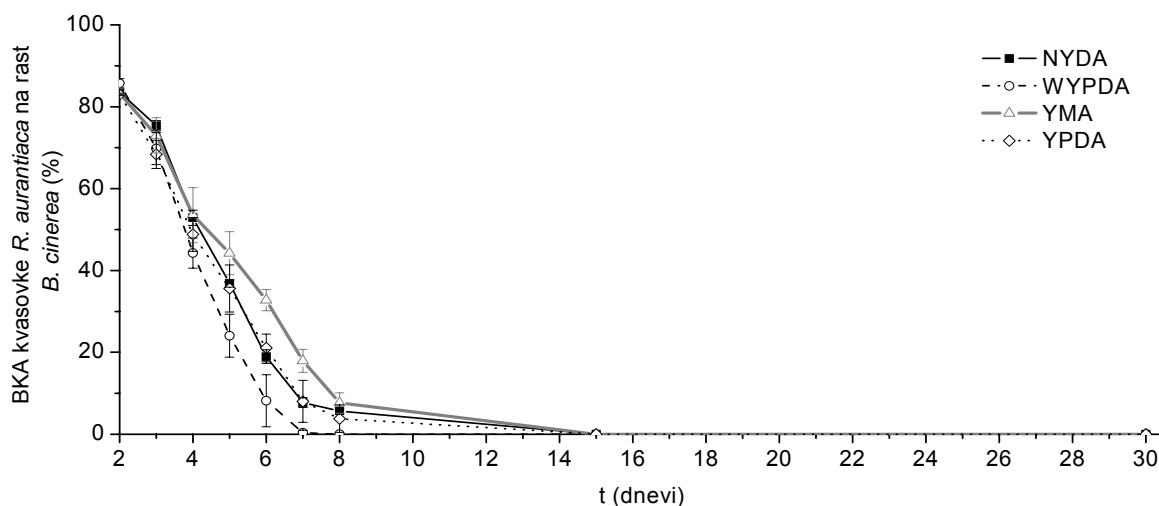
Kvasovka *Pichia membranifaciens* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (77 %), najslabšo pa na gojišču YMA (37 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (76 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 45 %, najslabšo pa na gojišču YMA (18 %), kjer je po 15 dneh izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Na gojiščih WYPDA, YPDA in NYDA so bile vrednosti sedmi dan za vsako gojišče posebej 46 %, 36 % in 49 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 27 %, 25 % in 1 % (slika 16).



Slika 16: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Pichia membranifaciens* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.13 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Rhodotorula aurantiaca*

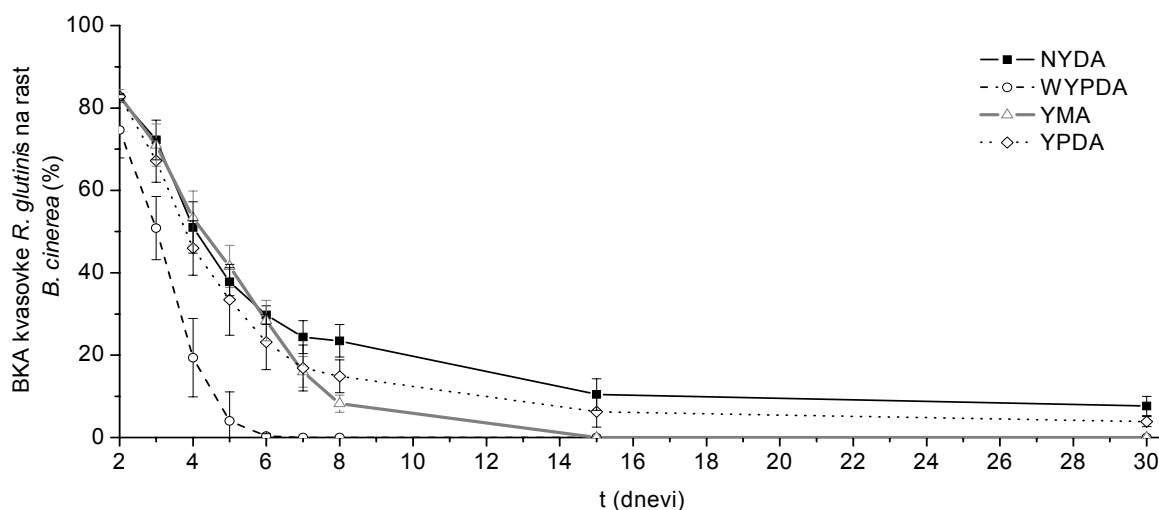
Kvasovka *Rhodotorula aurantiaca* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YMA (44 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (36 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YMA (18 %), ki je osmi dan padla na 8 %, najslabšo pa na gojišču WYPDA (0 %). Na gojiščih NYDA in YPDA je bila sedmi dan biokontrolna aktivnost 7 % in 8 %. Po 15 dneh inkubacije ni kvasovka na nobenem od gojišč inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 17).



Slika 17: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Rhodotorula aurantiaca* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.14 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Rhodotorula glutinis*

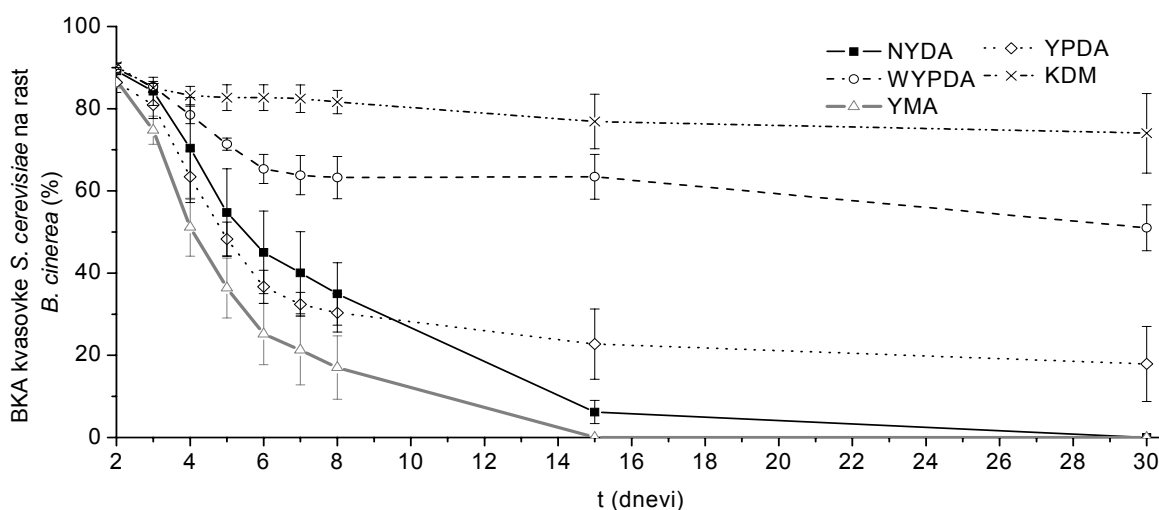
Kvasovka *Rhodotorula glutinis* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču YMA (41 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (4 %). Po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojiščih NYDA (24 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (0 %). Najboljšo biokontrolno aktivnost je tudi po osmih dneh inkubacije kvasovka dosegla na gojišču NYDA (23 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 8 %. Biokontrolna aktivnost kvasovke je bila po sedmih dneh na gojišču YPDA 17 % in se je do 30. dne zmanjšala na 4 %. Na gojiščih WYPDA in YMA je kvasovka po 15 dneh izgubila biokontrolno aktivnost (0 %) in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 18).



Slika 18: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Rhodotorula glutinis* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.15 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

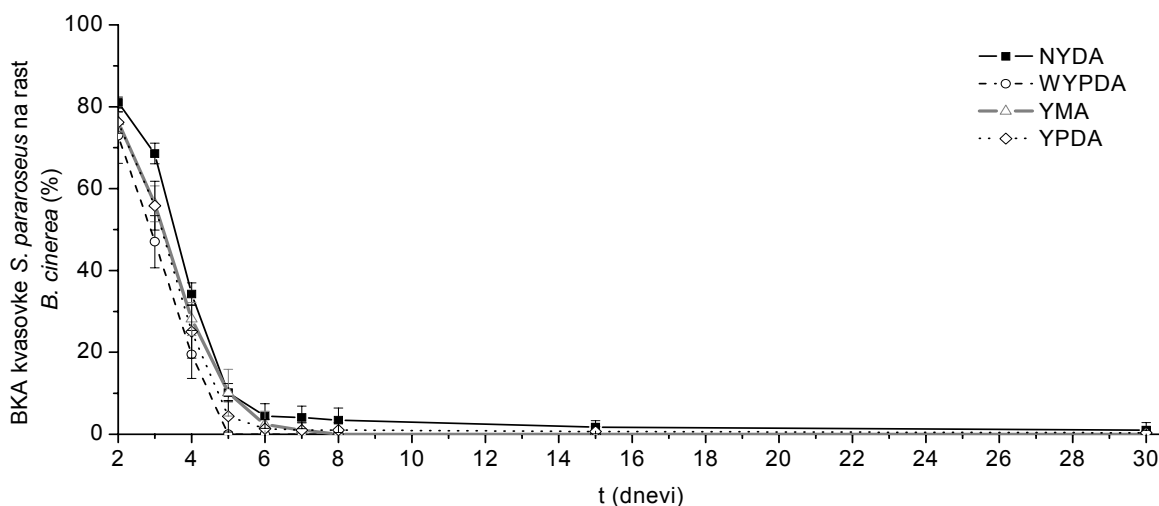
Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (83 %), najslabšo pa na gojišču YMA (36 %). Tudi po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču KDM (82 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 74 %, najslabšo pa na gojišču YMA (21 %), kjer je po 15 dneh izgubila biokontrolno aktivnost in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Na gojiščih WYPDA, YPDA in NYDA so bile vrednosti sedmi dan za vsako gojišče posebej 64 %, 32 % in 40 %, vendar se je vrednost do 30. dne znižala na 51 %, 18 % in 0 % (slika 19).



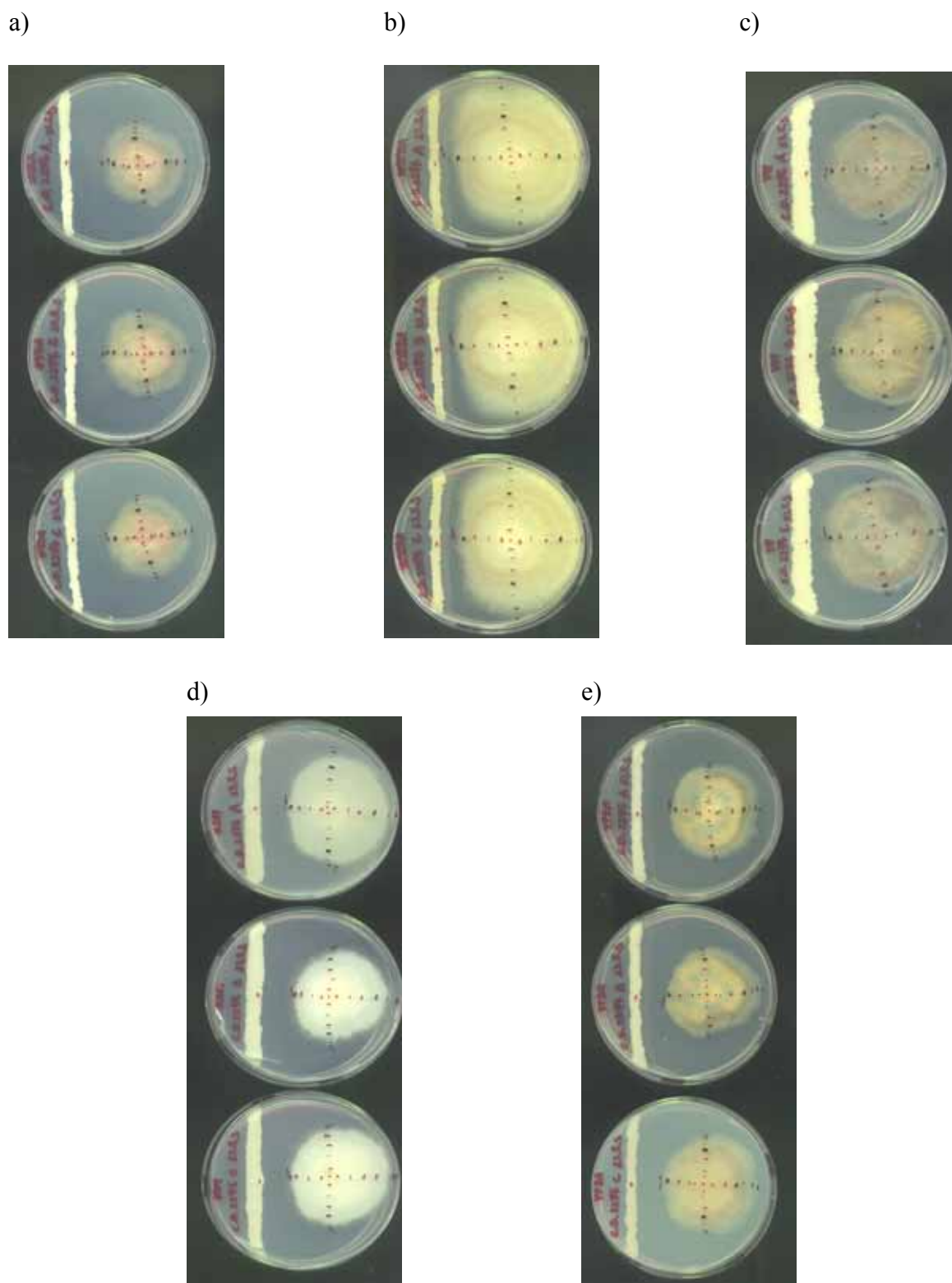
Slika 19: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)

4.1.16 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk vrste *Sporidiobolus pararoseus*

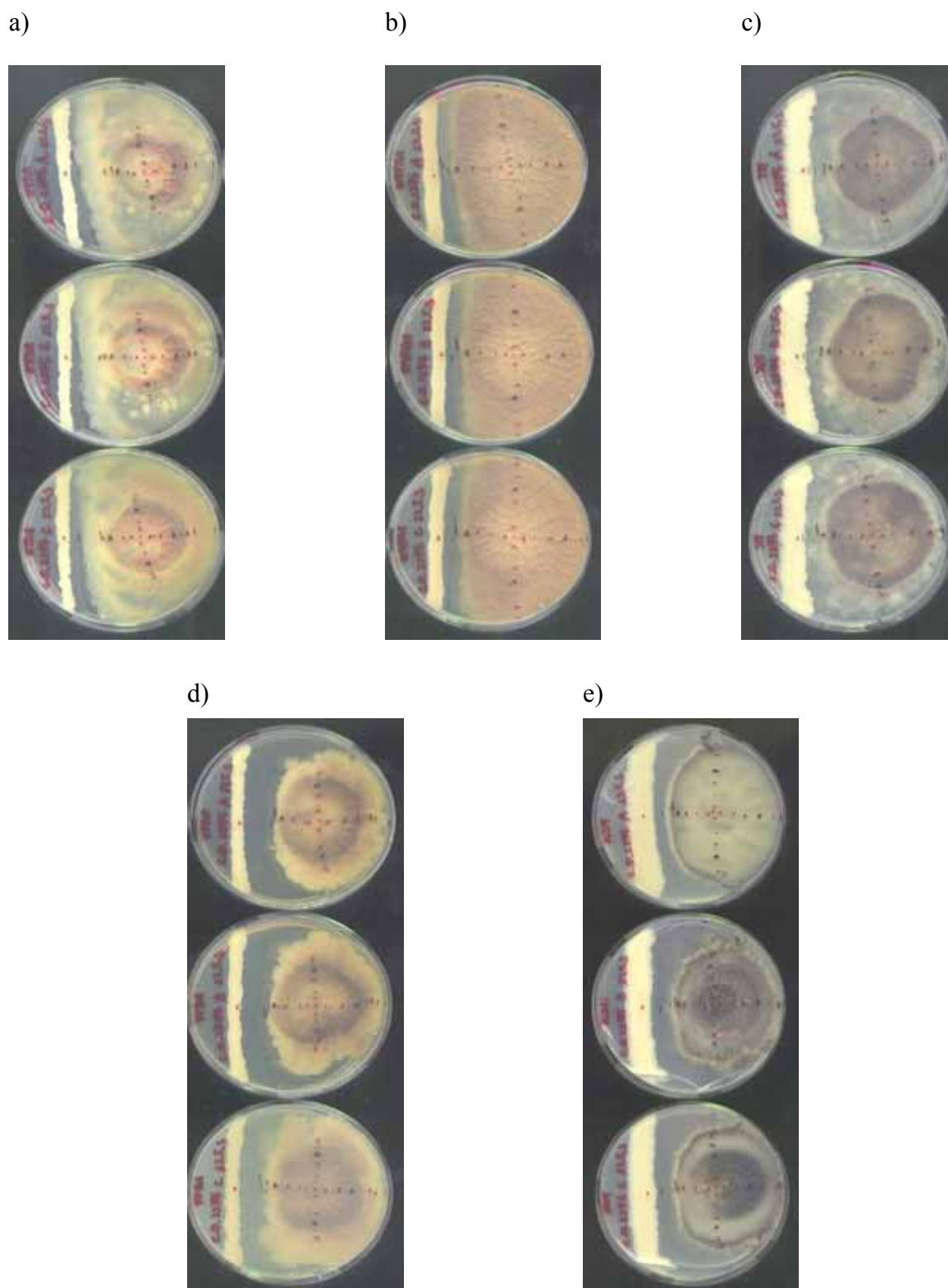
Kvasovka *Sporidiobolus pararoseus* je po petih dneh inkubacije najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojiščih NYDA in YMA (10 %), najslabšo pa na gojišču WYPDA (0 %). Po sedmih dneh inkubacije je kvasovka najboljšo biokontrolno aktivnost kazala na gojišču NYDA (4 %), ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 1 %. Po 15 dneh inkubacije je kvasovka tudi na gojišču YMA izgubila biokontrolno aktivnost (0 %) in ni več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 20).



Slika 20: Biokontrolna aktivnost (%) kvasovke *Sporidiobolus pararoseus* na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih (25 °C)



Slika 21: Biokontrolna aktivnost kvasovke *Candida oleophila* Montrocher NRRL Y-2317 na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih: a) NYDA, b) WYPDA, c) YMA, d) YPDA, e) KDM, posneta z optičnim čitalcem, sedmi dan inkubacije



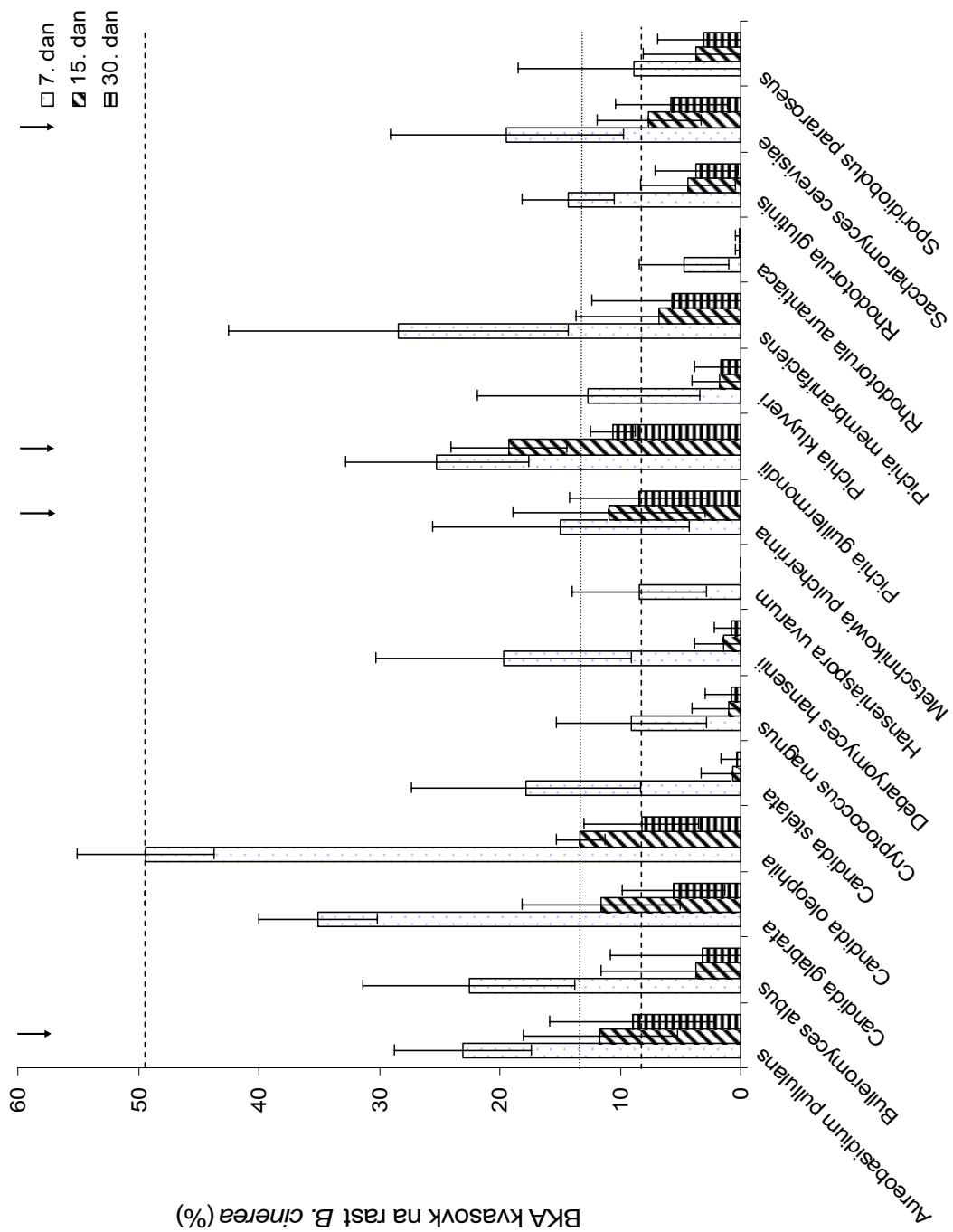
Slika 22: Biokontrolna aktivnost kvasovke *Candida oleophila* Montrocher NRRL Y-2317 na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel na različnih trdnih sintetičnih gojiščih: a) NYDA, b) WYPDA, c) YMA, d) YPDA, e) KDM, posneta z optičnim čitalcem, 30. dan inkubacije

4.2 BIOKONTROLNA AKTIVNOST POSAMEZNIH SEVOV KVASOVK

Na izbrano NYDA gojišče smo po postopku, ki je opisan v poglavju 3.1.1, testirali vseh 271 naključno izbranih sevov iz ZIM (Zbirka industrijskih mikroorganizmov), ki obsega 1260 sevov različnih vrst kvasovk. Nekatere vrste in nekateri sevi posamezne vrste kvasovke so pokazale višjo biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel od biokontrolne kvasovke *Candida oleophila* Montrocher NRRL Y-2317 (ZIM 2276). Biokontrolno aktivnost posameznega seva smo izrazili kot odstotek inhibicije rasti nitaste glive (enačba 1) in nato izračunali povprečno vrednost biokontrolne aktivnosti za posamezno vrsto (slika 23).

Na sliki 23 vidimo, da je najvišjo inhibicijo rasti nitaste glive sedmi dan dosegla kontrolna kvasovka *Candida oleophila* (49 %). Njena biokontrolna aktivnost je 15. dan padla na 13,3 %, ter 30. dan na 8,2 %. Rezultati kažejo, da je imela kvasovka *Pichia guillermondii* (19,3 %) 15. dan višjo biokontrolno aktivnost od kvasovke *Candida oleophila*. Višjo biokontrolno aktivnost od kontrolne kvasovke so 30. dan imele tri vrste kvasovke *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* (9 %, 8,5 % in 10,6 %). Te tri vrste kvasovk smo uvrstili med izbrane vrste, med katerimi smo iskali tiste seve, ki imajo znotraj vrste najvišjo biokontrolno aktivnost. Biokontrolno aktivnost sevov smo preverili tudi pri vrsti *Saccharomyces cerevisiae*.

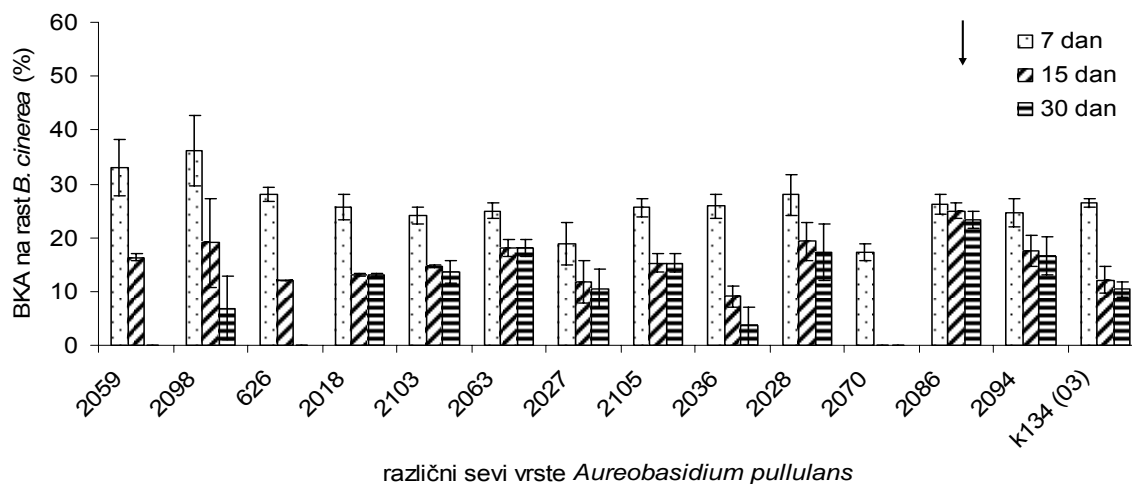
Vrste *Cryptococcus magnus*, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Hanseniaspora uvarum* in *Rhodotorula aurantiaca* so imele dokaj nizko biokontrolno aktivnost že po sedmih dneh, po 30 dneh pa praktično niso zavirale rasti nitaste glive (slika 23).



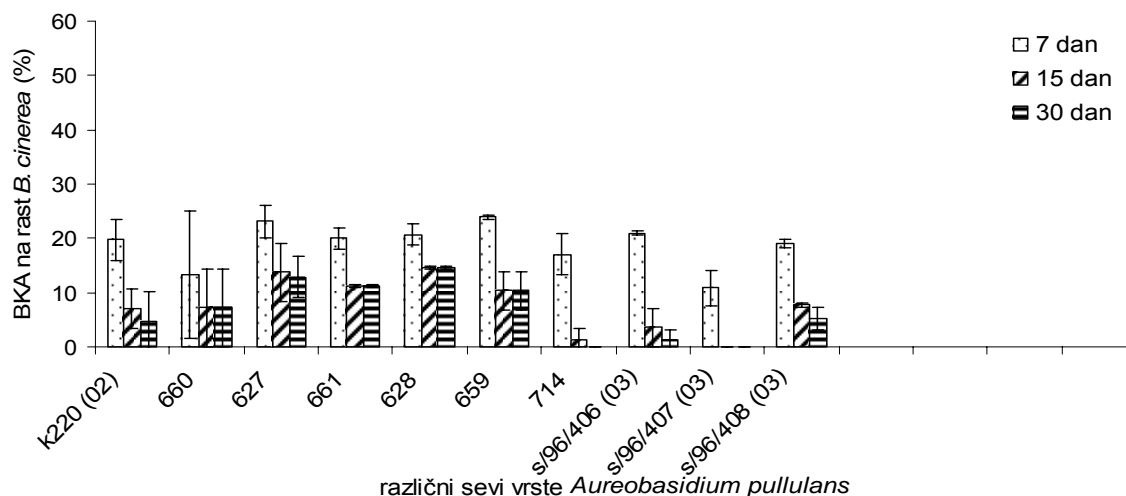
Slika 23: Biokontrolna aktivnost (%) posameznih vrst kvasovk na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* v primerjavi s kontrolno kvasovko *C. oleophila*

4.2.1 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Aureobasidium pullulans*

Vrsto *Aureobasidium pullulans* predstavlja 24 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je imela po sedmih dneh inkubacije biokontrolno aktivnost višjo od 20 %. Po 15 dneh inkubacije je imel sev *A. pullulans* ZIM2086 biokontrolno aktivnost 25%, ki je do konca inkubacijske dobe (30. dan) padla na 23,2 %. 30. dan je bila razdalja oz. inhibicija rasti med omenjenim sevom in nitasto glivo 7 mm. Večina sevov je imela biokontrolno aktivnost po 15 dneh ali 30 dneh inkubacije nad 25 %. Dva seva te vrste po sedmih dneh inkubacije začela izgubljeti biokontrolno aktivnost in 15. dne nista več inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 24a, 24b).



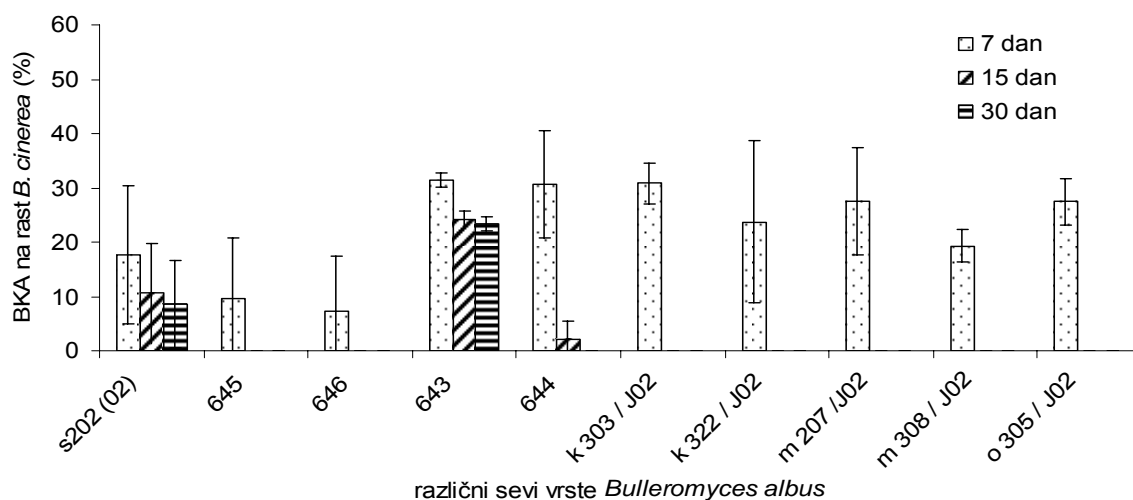
Slika 24a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Aureobasidium pullulans*



Slika 24b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Aureobasidium pullulans*

4.2.2 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Bulleromyces albus*

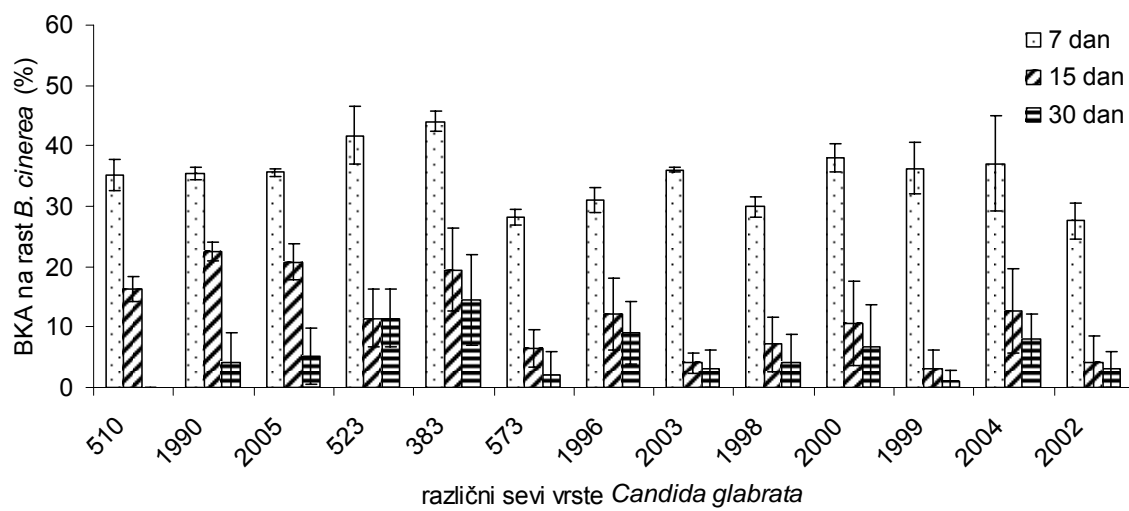
Vrsto *Bulleromyces albus* predstavlja 10 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 25).



Slika 25: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Bulleromyces albus*

4.2.3 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Candida glabrata*

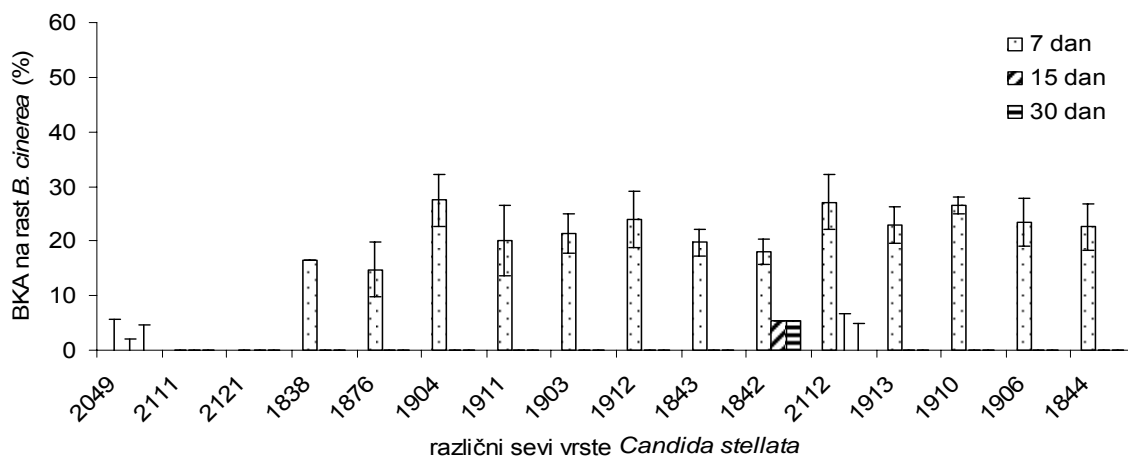
Vrsto *Candida glabrata* predstavlja 13 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je imela po sedmih dneh inkubacije biokontrolno aktivnost višjo od 35 %. 15. dan so še vsi sevi te kvasovke ohranili biokontrolno aktivnost, do konca inkubacijske dobe pa pa ni inhibiral rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel le en sev (slika 26).



Slika 26: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Candida glabrata*

4.2.4 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Candida stellata*

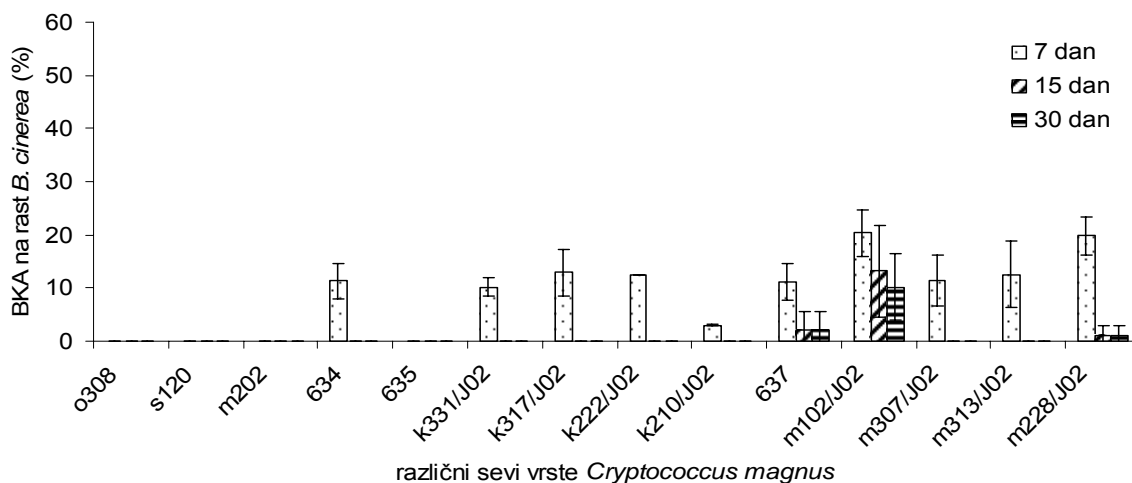
Vrsto *Candida stellata* predstavlja 16 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je imela biokontrolno aktivnost le po sedmih dneh inkubacije in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 27).



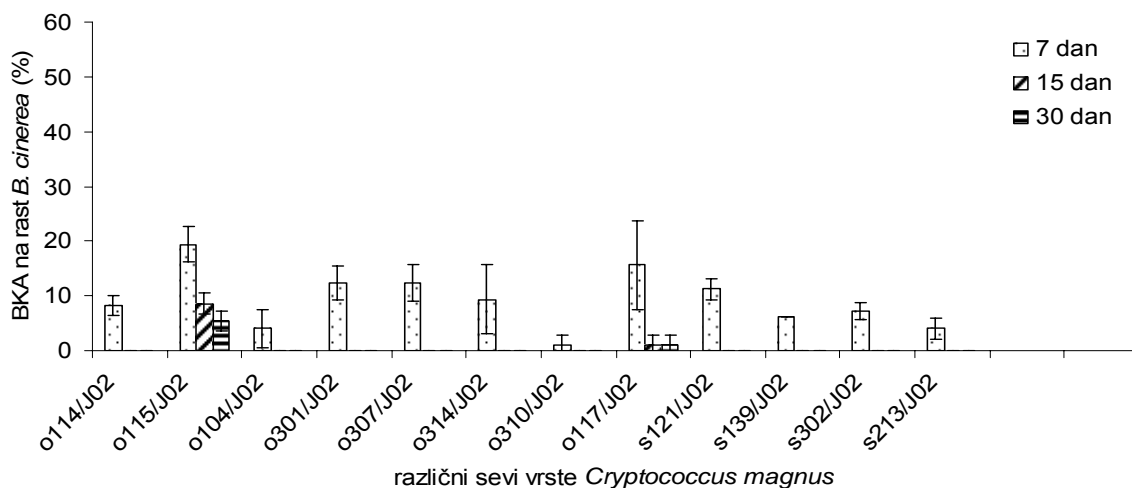
Slika 27: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Candida stellata*

4.2.5 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Cryptococcus magnus*

Vrsto *Cryptococcus magnus* predstavlja 26 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in ni inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 28a, 28b).



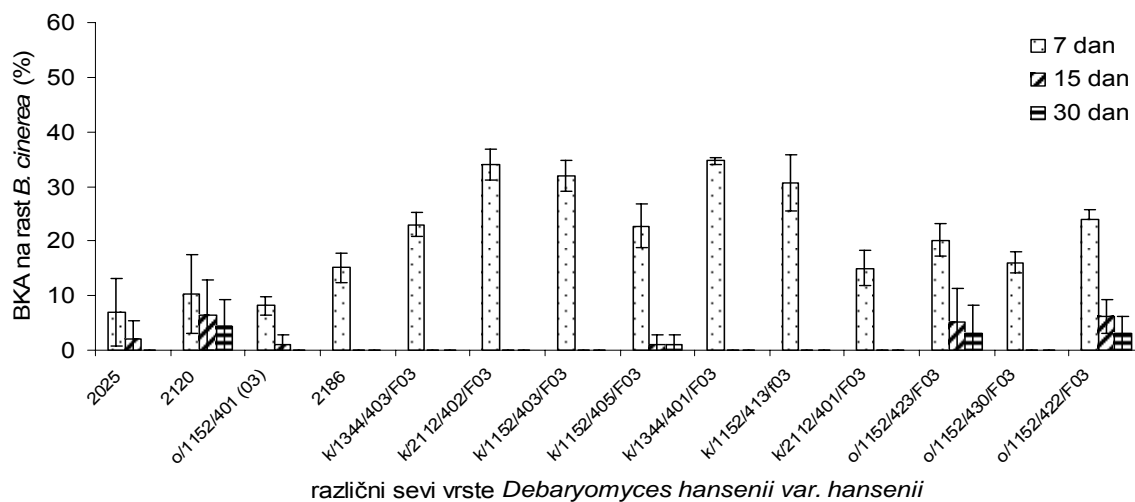
Slika 28a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Cryptococcus magnus*



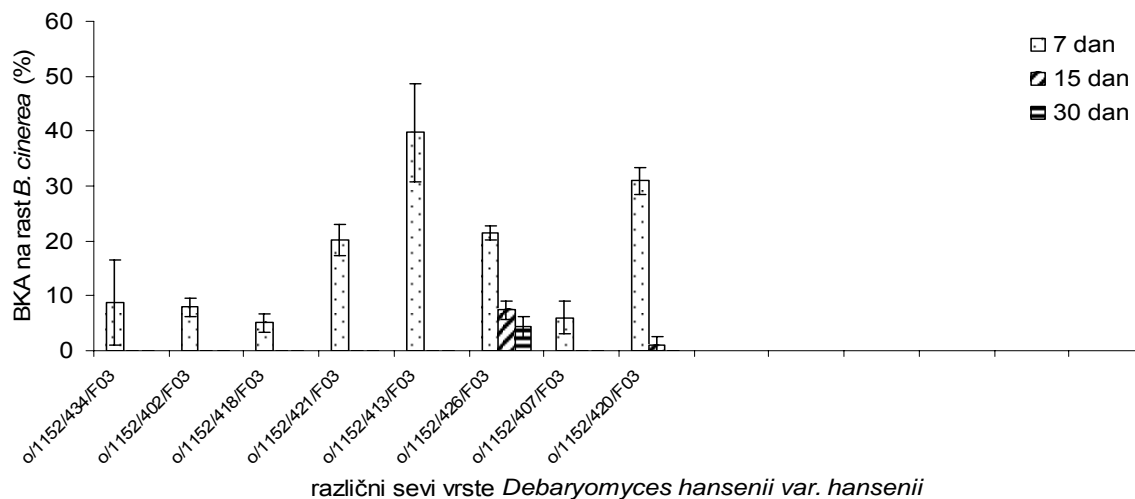
Slika 28b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Cryptococcus magnus*

4.2.6 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*

Vrsto *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* predstavlja 22 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in ni inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 29a, 29b).



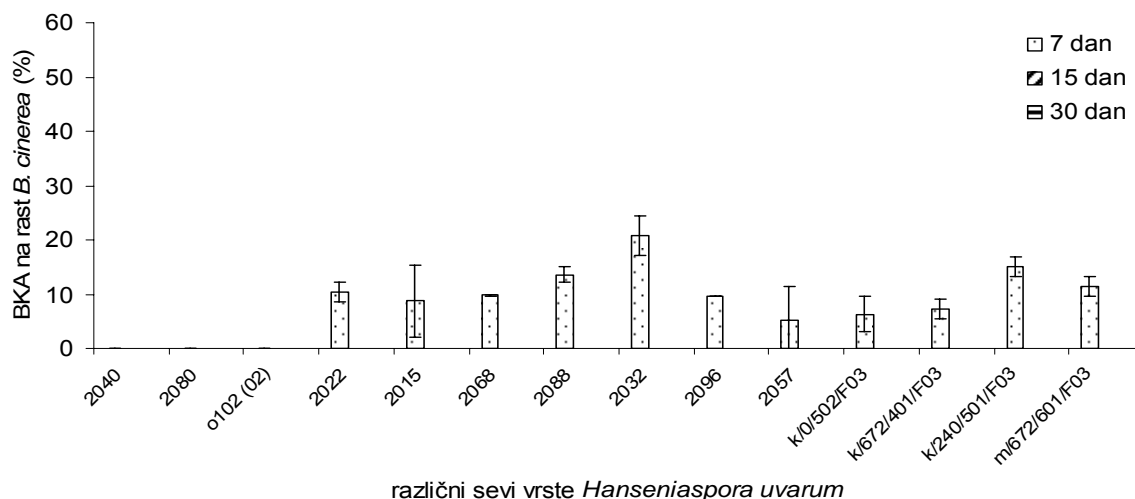
Slika 29a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*



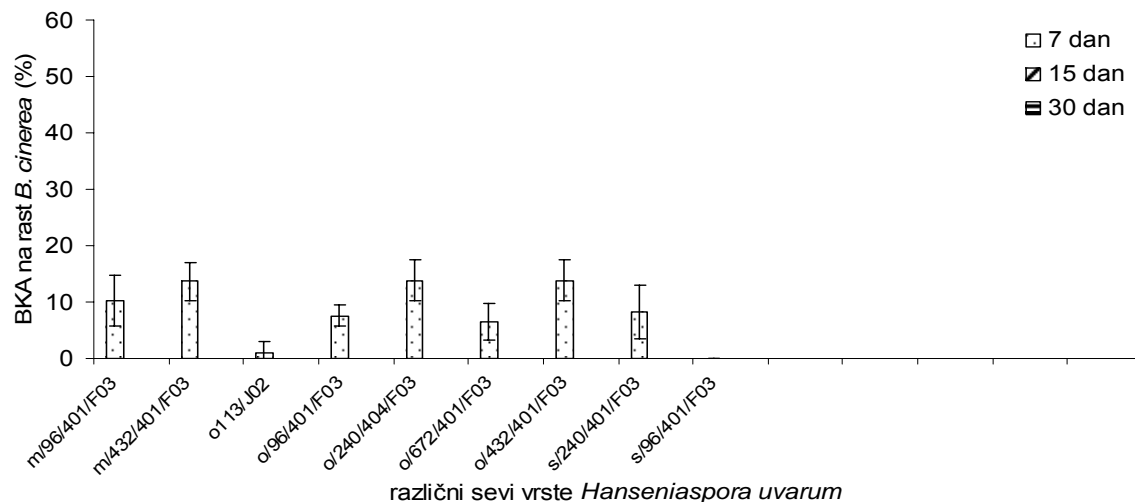
Slika 29b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*

4.2.7 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Hanseniaspora uvarum*

Vrsto *Hanseniaspora uvarum* predstavlja 23 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in ni inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 30a, 30b).



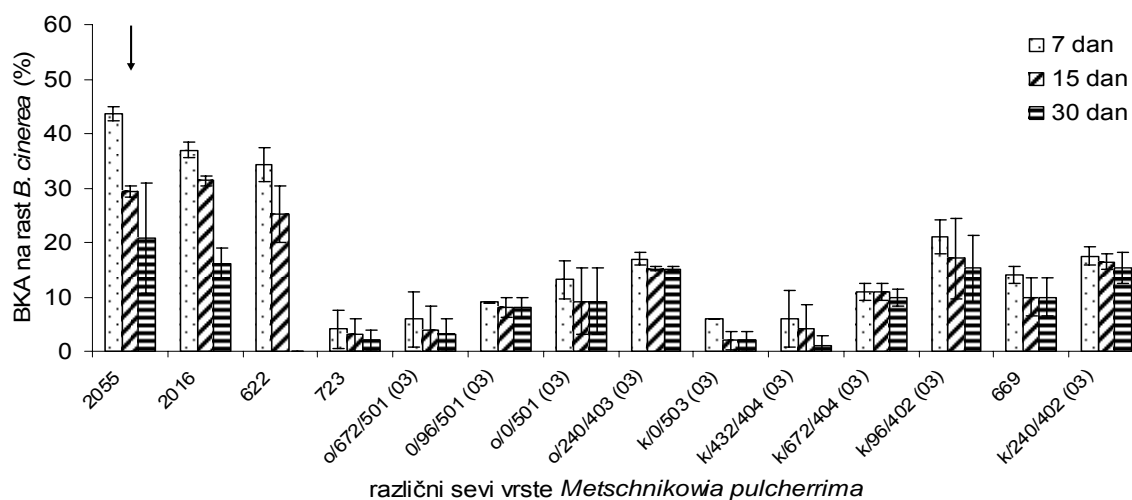
Slika 30a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Hanseniaspora uvarum*



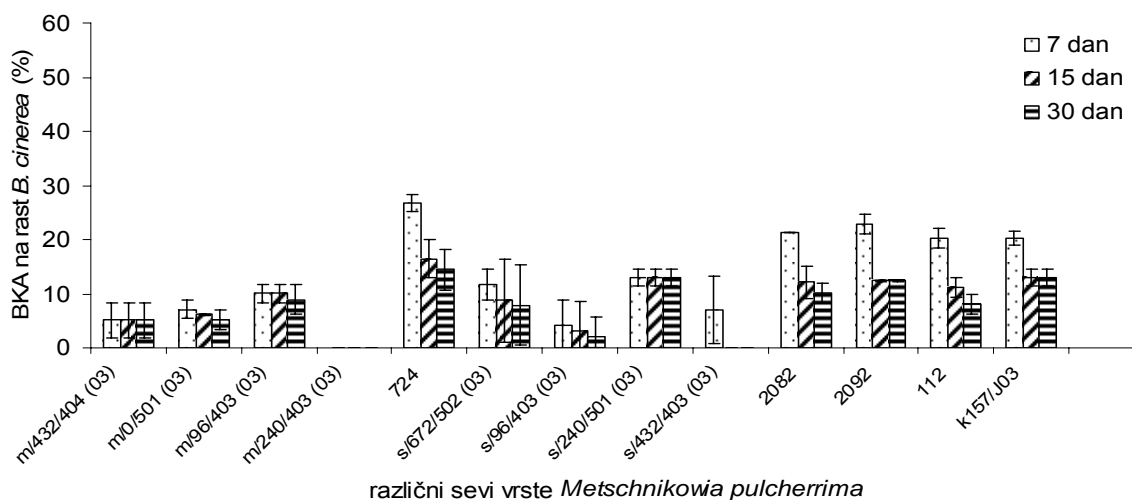
Slika 30b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Hanseniaspora uvarum*

4.2.8 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Metschnikowia pulcherrima*

Vrsto *Metschnikowia pulcherrima* predstavlja 27 sevov (priloga A). Nekateri sevi so po sedmih dneh dosegli visoko biokontrolno aktivnost, najvišjo je imel sev *Metschnikowia pulcherrima* ZIM2055 (43,6 %), ki je po 15 dneh znašala 29,4 %. 30. dan je bila povprečna razdalja oz. inhibicija rasti med omenjenim sevom in nitasto glivo 6 mm, kar znaša 20,8 % biokontrolne aktivnosti. En sev te vrste po sedmih dneh inkubacije ni več inhibiral rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 31a, 31b).



Slika 31a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Metschnikowia pulcherrima*



Slika 31b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Metschnikowia pulcherrima*

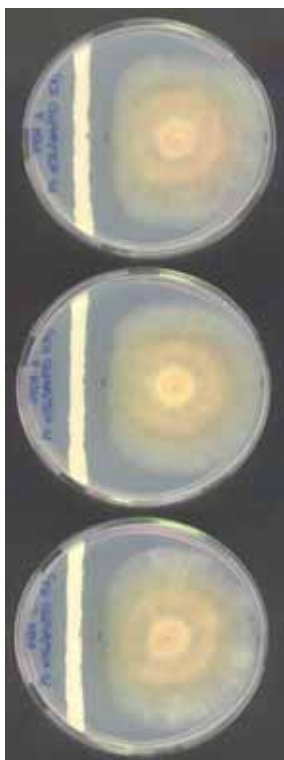
4.2.9 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Pichia guillermondii*

Vrsto *Pichia guillermondii* predstavlja 7 sevov (priloga A). Najboljšo biokontrolno aktivnost je po 30 dneh pokazal sev *Pichia guillermondii* ZIM o/96/404, ki je sedmi dan znašala 43,3 % (11 mm), 15. dan 25,5 % (8 mm) in 30. dan 11,3 % (4 mm) (slika 32, 33).

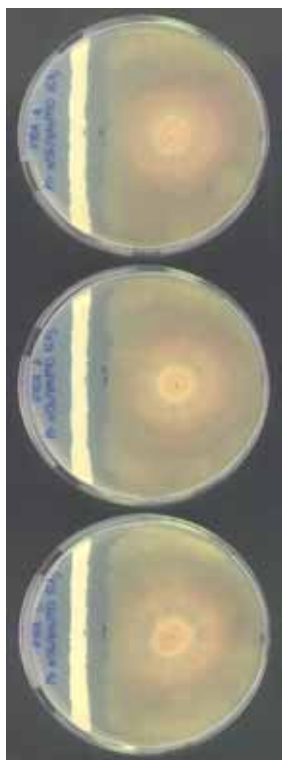


Slika 32: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Pichia guillermondii*

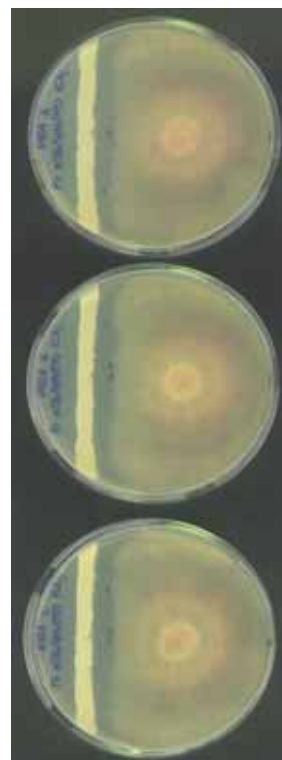
a)



b)



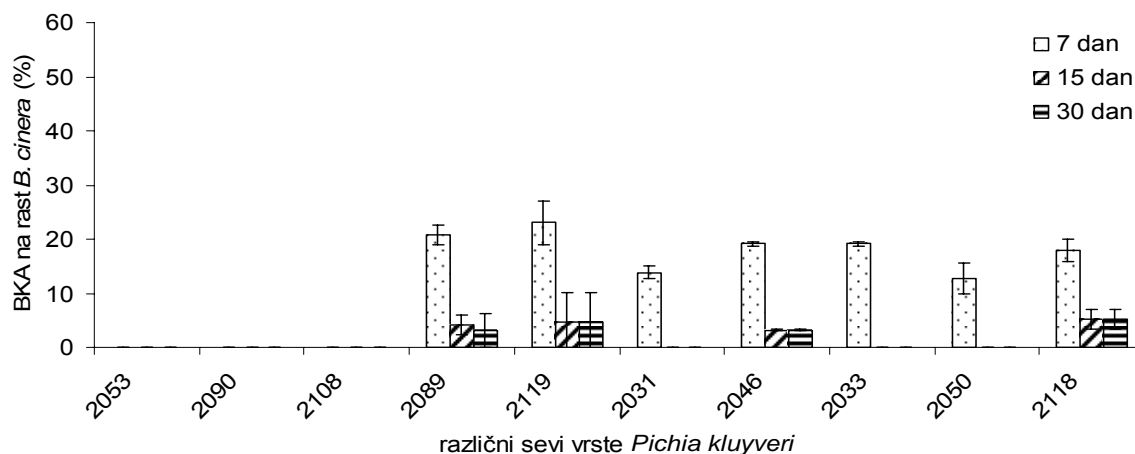
c)



Slika 33: BKA vrste *Pichia guillermondii* sev o/96/404 na rast *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel trdnem gojišču NYDA posneto z optičnim čitalcem a) 7. dan, b) 15. dan in c) 30. dan inkubacije

4.2.10 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Pichia kluyveri*

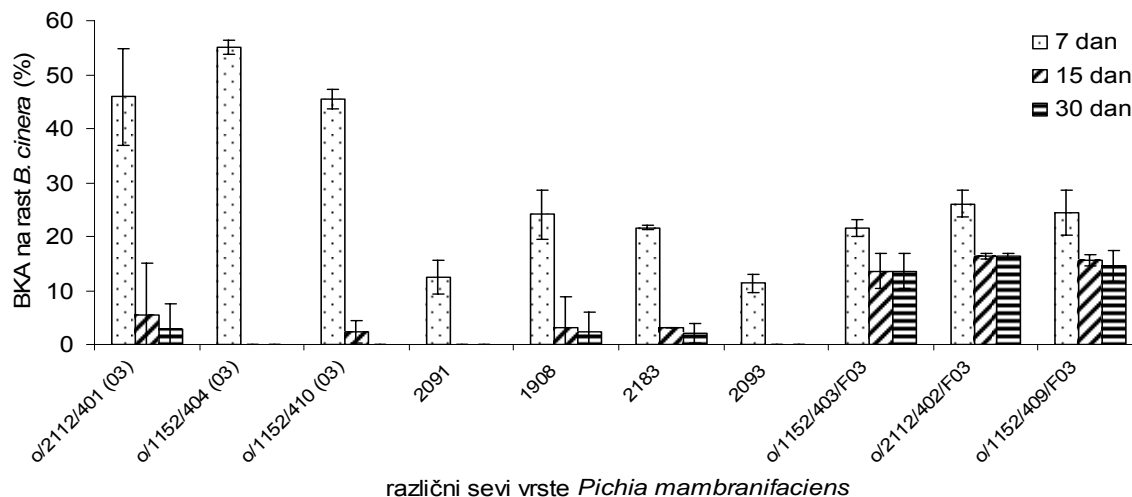
Vrsto *Pichia kluyveri* predstavlja 10 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in ni inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 34).



Slika 34: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Pichia kluyveri*

4.2.11 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Pichia membranifaciens*

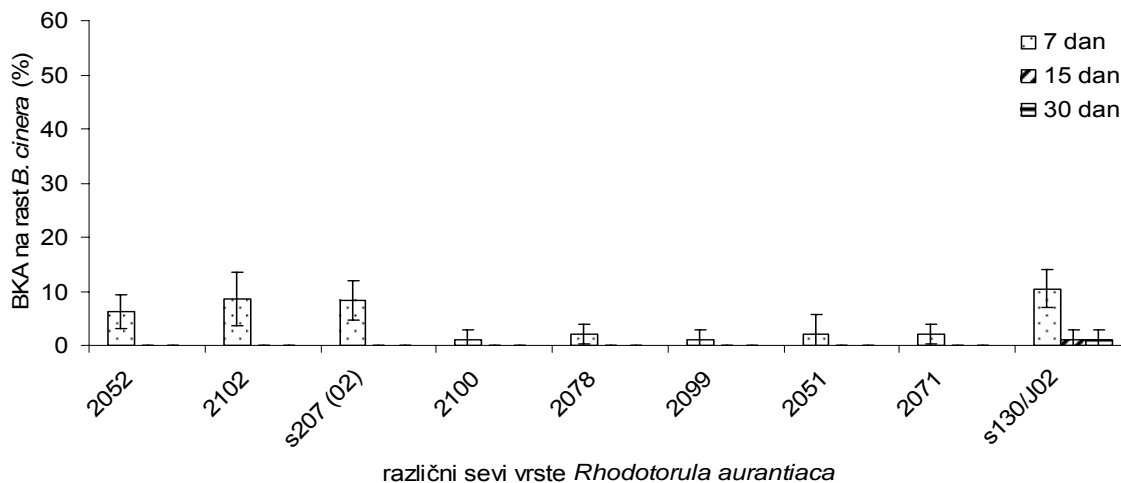
Vrsto *Pichia membranifaciens* predstavlja 10 sevov (priloga A). Trije sevi so sedmi dan pokazali visoko biokontrolno aktivnost nad 45 %. 15. dan pa so večinoma že izgubili vso biokontrolno aktivnost in niso inhibirali rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 35).



Slika 35: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Pichia membranifaciens*

4.2.12 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Rhodotorula aurantiaca*

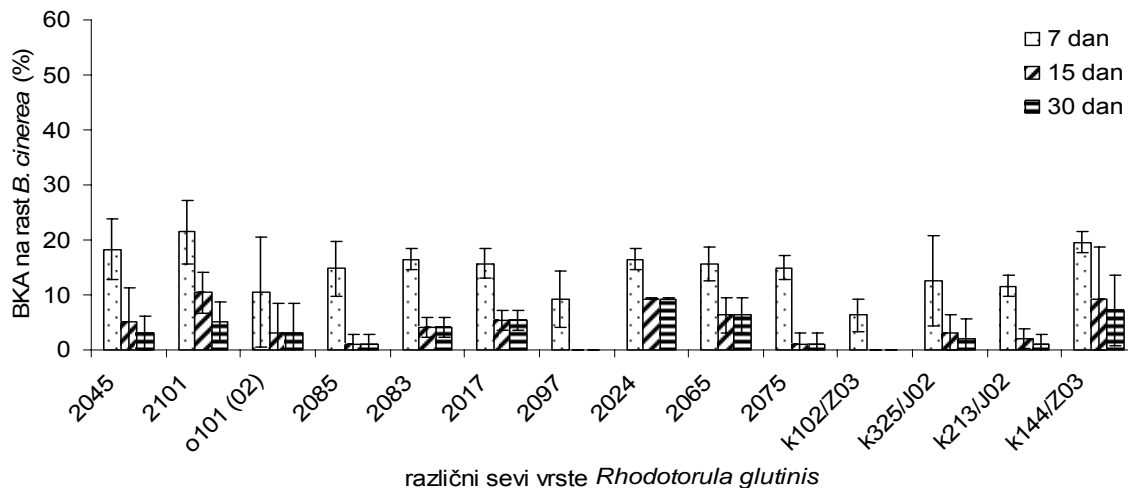
Vrsto *Rhodotorula aurantiaca* predstavlja 9 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je kazala minimalno biokontrolno aktivnost samo 7. dan in je 15. dan izgubila že vso biokontrolno aktivnost in ni inhibirala rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 36).



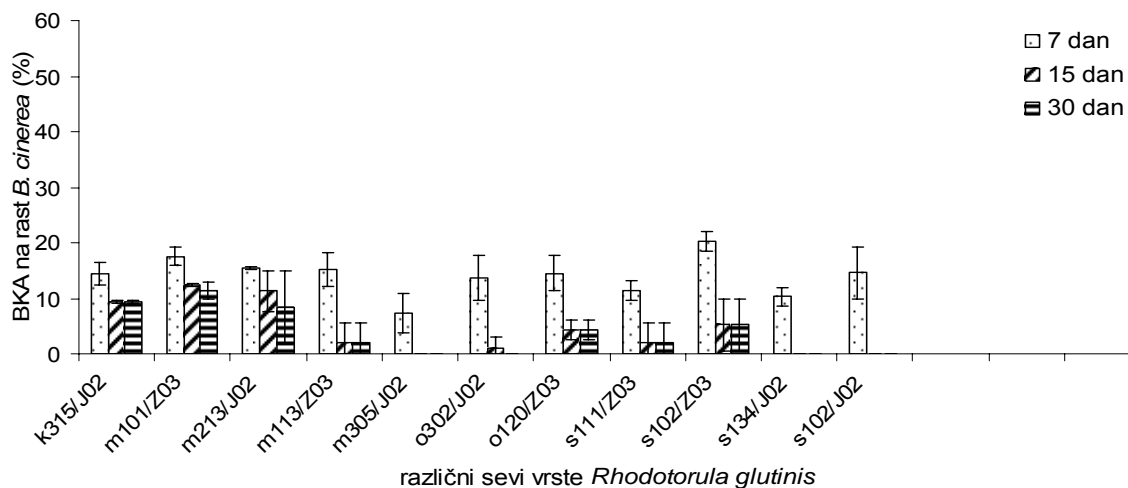
Slika 36: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Rhodotorula aurantiaca*

4.2.13 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Rhodotorula glutinis*

Vrsto *Rhodotorula glutinis* predstavlja 25 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je imela po sedmih dneh inkubacije biokontrolno aktivnost višjo od 10 %. 15. dan pa jih je veliko izgubilo vso biokontrolno aktivnost in niso inhibirali rasti nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 37a, 37b).



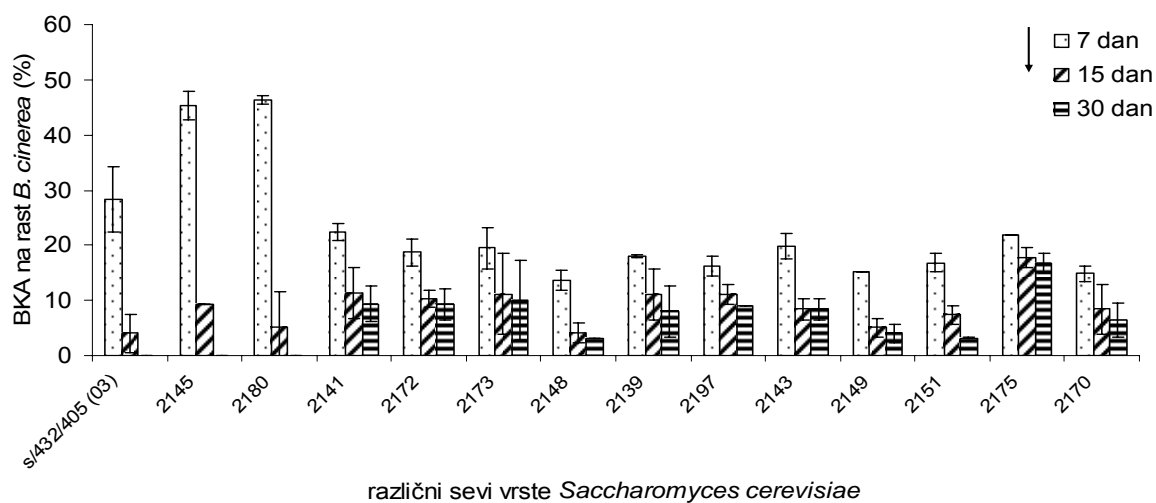
Slika 37a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Rhodotorula glutinis*



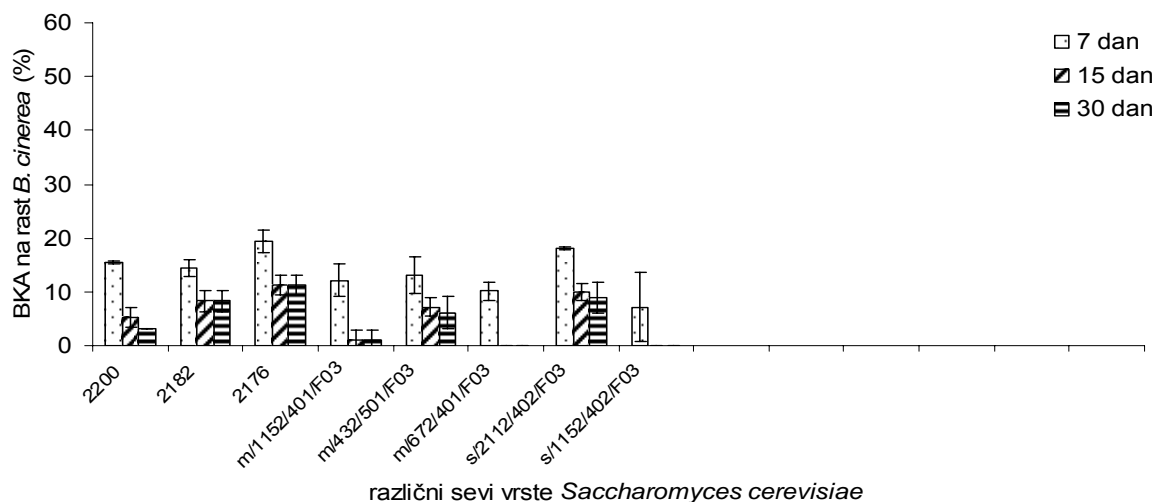
Slika 37b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Rhodotorula glutinis*

4.2.14 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Vrsto *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja 22 sevov (priloga A). Analizirali smo jo zaradi njene vloge pri alkoholni fermentaciji. Biokontrolna aktivnost je bila le pri dveh sevih višja od 45 %. Po 30. dneh pa so nad vrednostjo 10 % ostale le trije sevi. Sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2175 je imel po sedmih dneh inkubacije 21,9 %, po 15. dneh 17,7 % in po 30. dneh 16,7 % biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (slika 38a, 38b).



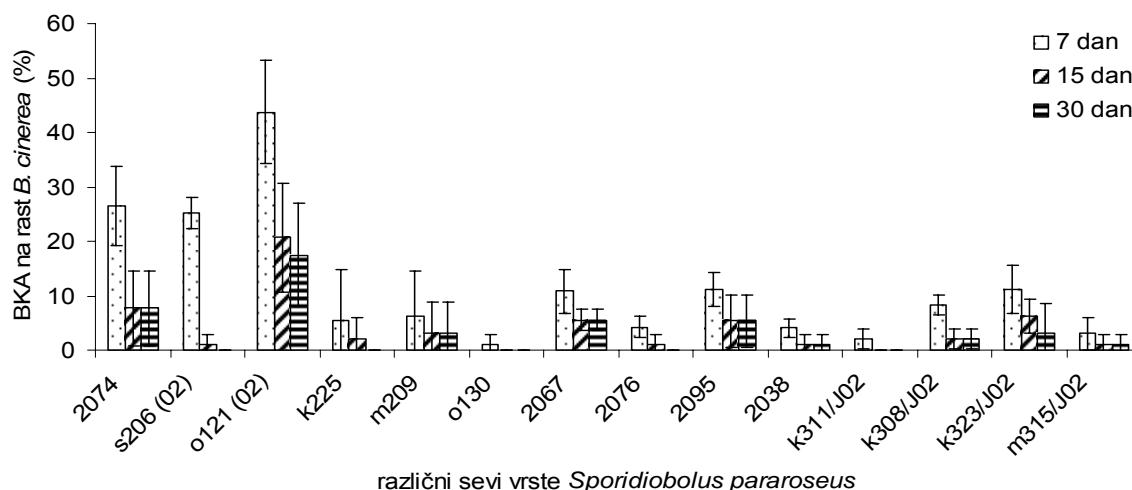
Slika 38a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Saccharomyces cerevisiae*



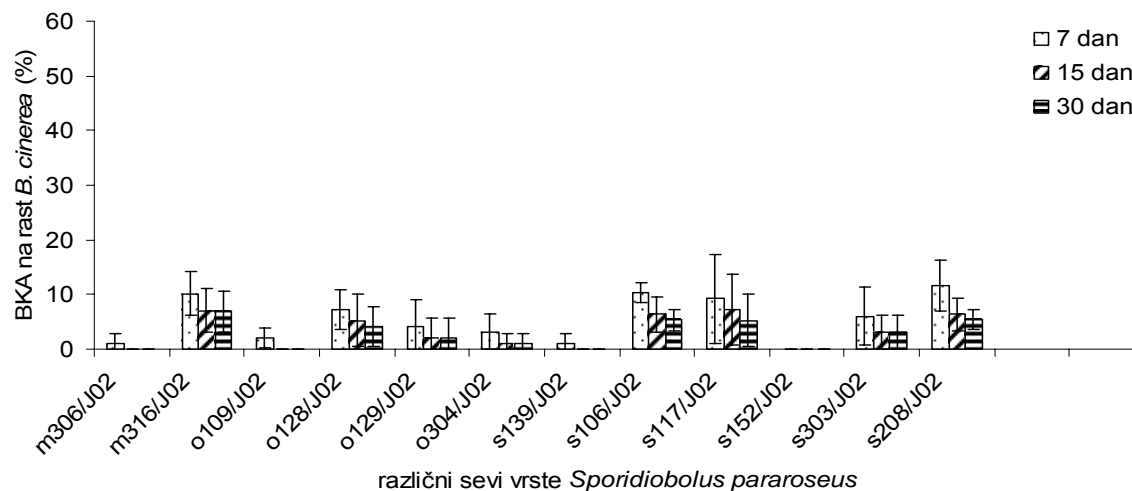
Slika 38b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.15 Biokontrolna aktivnost sevov vrste *Sporidiobolus pararoseus*

Vrsto *Sporidiobolus pararoseus* predstavlja 26 sevov (priloga A). Večina testiranih sevov je imela po sedmih dneh inkubacije nizko biokontrolno aktivnost pod 10 %. Po 15 dneh pa se je biokontrolna aktivnost še znižala ali pa je ni bilo več. Le nekaj sevov je še ohranilo nizko biokontrolno aktivnost po 30 dneh (slika 39a, 39b).



Slika 39a: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Sporidiobolus pararoseus*



Slika 39b: Porazdelitev biokontrolne aktivnosti (%) posameznih sevov iz vrste *Sporidiobolus pararoseus*

4.3 VPLIV CELIČNEGA STIKA

4.3.1 Vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo

Vpliv celičnega stika med kvasovkami in nitasto glivo smo spremljali na trdnih gojiščih PDA (razmeroma bogat medij za rast gliv) in NYDA. Po postopku, ki je opisan v poglavju 3.1.5, smo pri testu A kot primarni nanos nanесли ustrezno koncentracijo celic izbranih sevov kvasovk (preglednica 2, na str. 26), pri testu B pa smo kot primarni nanos nanесли ustrezno koncentracijo spor nitaste glive. Rast na plošči s primarnim nanosom enega mikroorganizma smo spremljali v primerjavi s kontrolno ploščo brez primarnega nanosa in rezultate statistično ovrednotili.

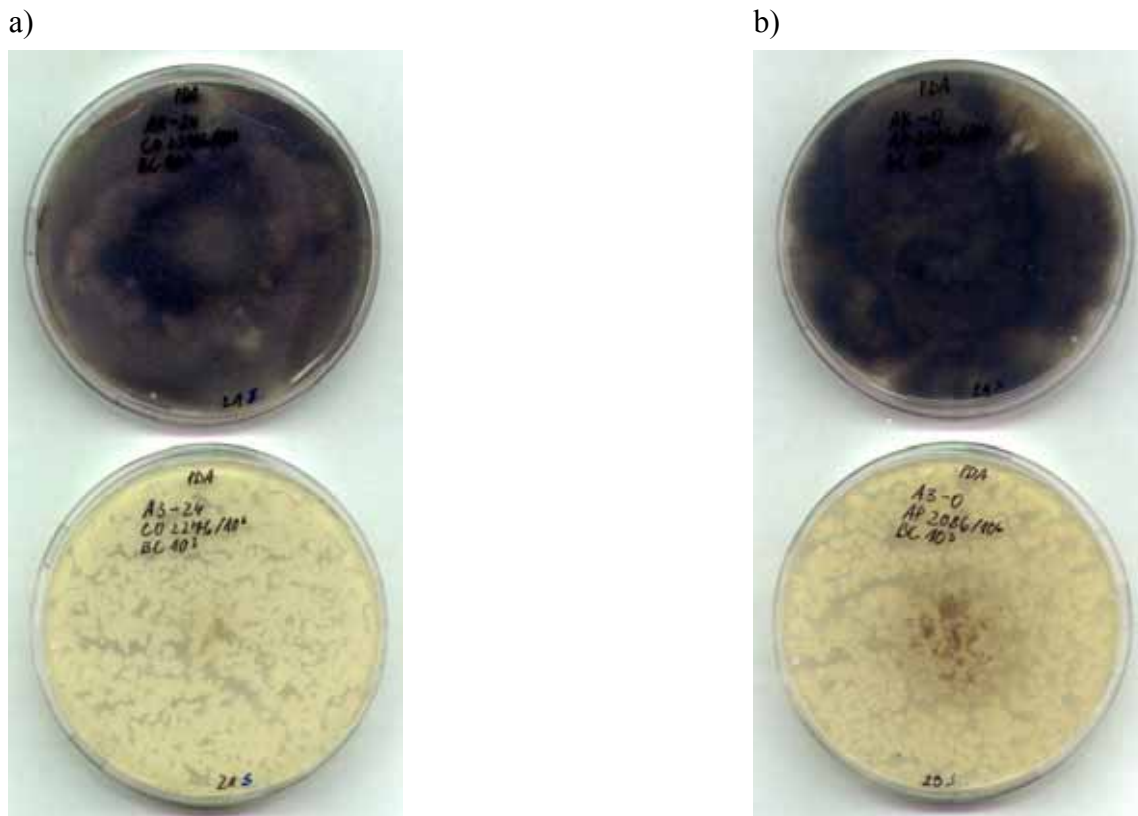
4.4.1.1 Test A – primarni nanos kvasovk

Rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) 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 (preglednica 3).

Pri rasti nitaste glive na plošči s primarnim nanosom kvasovk pa je nitasta gliva *B. cinerea* rasla bolj počasi. Po petih do sedmih dneh smo zaznali začetek rasti micelija. Plošče smo inkubirali naprej in 15. ter 30. dan ponovno ocenili prisotnost rasti. S statistično obdelavo podatkov (priloge D1, D2, D3 in D4) 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 (preglednica 3), kar pomeni, da če kvasovka s celičnem stikom doseže biokontrolno aktivnost proti nitasti glivi, jo tudi ohrani.

Testirani sevi kvasovk *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guilliermondii* na gojišču NYDA popolnoma zavirajo rast nitaste glive *B. cinerea*. Na gojišču PDA pa je rast nitaste glive prisotna na ploščah, kjer smo kvasovko in nitasto glivo nanесли hkrati ob času 0 ur oz. ob posušitvi plošč. Tudi kvasovka *Candida oleophila* zavira rast nitaste glive na gojišču NYDA. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* dopušča rast

nitaste glive na gojišču PDA. Ugotovili smo tudi, da posamezne vrste kvasovk različno močno zavirajo rast nitaste glive (preglednica 3).



Slika 40: Rast seva nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) po 30 dneh skupne inkubacije na plošči brez primarnega nanosa kvasovke (kontrola – zgornji plošči) ter na plošči s primarnim nanosom kvasovke a) *C. oleophila*; in b) *A. pullulans*

Preglednica 3: Rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk

TEST A		kontrola rasti (ocena 0-3)		
<i>Aureobasidium pullulans</i> 2086	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^8/10^4$	0	3	3	3
	24	3	3	3
	48	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	0	3	3	3
	24	3	3	3
	48	0	0	0

Nadaljevanje preglednice 3: Rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk

<i>Candida oleophila</i> 2276	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^8/10^4$	0	3	3	3
	24	0	0	0
	48	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	0	3	3	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	0	3	3	3
	24	2	2	2
	48	0	0	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 2055	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^8/10^4$	0	3	3	3
	24	3	3	3
	48	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	0	3	3	3
	24	3	3	3
	48	0	0	0
<i>Pichia guillermondii</i> m133	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^8/10^4$	0	3	3	3
	24	0	0	0
	48	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	0	3	3	3
	24	0	0	0
	48	0	0	0

Nadaljevanje preglednice 3: Rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58) na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom različnih vrst in koncentracij kvasovk

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2175	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	0	0	0	1
	24	0	2	2
	48	0	0	2
PDA $10^8/10^4$	0	3	3	3
	24	0	3	3
	48	0	3	3
NYDA $10^6/10^3$	0	0	1	2
	24	0	0	3
	48	0	1	3
PDA $10^6/10^3$	0	3	3	3
	24	3	3	3
	48	0	3	3

Legenda:

0 – ni rasti na nobeni plošči

1 – rast na eni paralelki

2 – rast na dveh paralelkah

3 – rast na vseh treh paralelkah

t(h) – čas nanosa nitaste glive na primarni nanos kvasovke po posušitvi plošč

$10^8/10^4$, $10^6/10^3$ – koncentracijsko razmerje med konc. celic kvasovk (cfu/ml) in konc. suspenzije spor nitaste glive (spor/ml)

4.4.1.2 Test B – primarni nanos nitaste glive

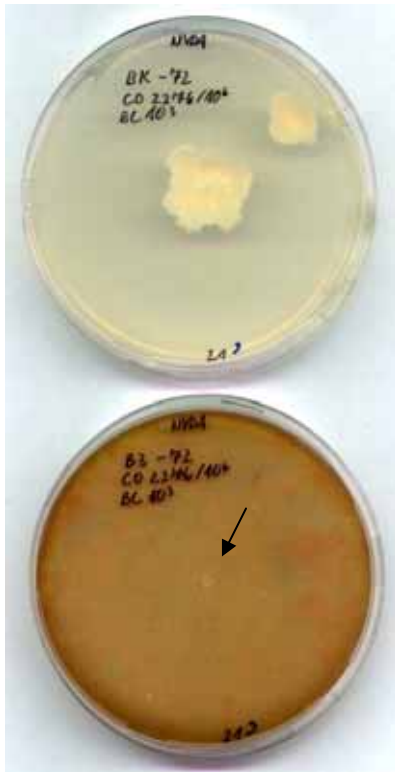
S testom B smo ugotovili, da kvasovke vrst *Candida oleophila* Montrochter, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guillermondii* zrastejo na površini gojišča NYDA s primarnim nanosom nitaste glive *Botrytis cinerea* ne glede na koncentracijo celic in čas zamika inokulacije. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je ob času primarnega nanosa 48 ur po posušitvi plošč zrastle na površini NYDA gojišča ne glede na koncentracijo celic, medtem ko je ob času primarnega nanosa 72 ur zrastle samo pri nižji koncentraciji ($10^6/10^3$) (preglednica 4).

Na gojišču PDA s primarnim nanosom nitaste glive *Botrytis cinerea* se rast kvasovk *Candida oleophila* Montrochter, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guillermondii* pojavi v koncentracijskem razmerju $10^6/10^3$ ob inokulaciji 48 ur po posušitvi plošč. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je ob času primarnega nanosa 48 ur po posušitvi plošč

zrastla na površini PDA gojišča ne glede na koncentracijo celic, medtem ko je ob času primarnega nanosa 72 ur zrastla samo pri nižji koncentraciji ($10^6/10^3$) (preglednica 4).

Kvasovka *Aureobasidium pullulans* zraste na ploščah obeh gojišč s primarnim nanosom nitaste glive *Botrytis cinerea* le v koncentracijskem razmerju $10^6/10^3$ (preglednica 4).

a)



b)



Slika 41: Rast kvasovk na površini trdnega gojišča z (spodaj) in brez (zgoraj) primarnega nanosa nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel po 30 dneh a) *C. oleophila*; in b) *M. pulcherrima*

Preglednica 4: Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58)

TEST B		kontrola rasti (ocena 0-3)		
<i>Aureobasidium pullulans</i> 2086	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
PDA $10^8/10^4$	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	48	3	3	1
	72	0	0	0
	96	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	0	0	0
	96	0	0	0
<i>Candida oleophila</i> 2276	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^8/10^4$	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^6/10^3$	48	1	1	1
	72	0	0	0
	96	0	0	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 2055	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^8/10^4$	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	0	0	0
	96	0	0	0

Nadaljevanje preglednice 4: Rast različnih kvasovk na trdnem gojišču NYDA ali PDA s primarnim nanosom nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58)

<i>Pichia guillermondii</i> m133	t(h)	7. dan	15. dan	30. dan
NYDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	0	0	0
	96	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	3	3	3
PDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	0	0	0
Saccharomyces cerevisiae 2175				
NYDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	0	0	0
	96	0	0	1
PDA $10^8/10^4$	48	3	3	3
	72	0	0	0
	96	0	0	0
NYDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	0	0	0
PDA $10^6/10^3$	48	3	3	3
	72	3	3	3
	96	0	0	0

Legenda:

0 – ni rasti na nobeni plošči

1 – rast na eni paralelki

2 – rast na dveh paralelkah

3 – rast na vseh treh paralelkah

t(h) – čas nanosa kvasovke na primarni nanos suspenzije spor nitaste glive po posužitvi plošč

$10^8/10^4$, $10^6/10^3$ – koncentracijsko razmerje med konc. celic kvasovk (cfu/ml) in konc. suspenzije spor nitaste glive (spor/ml)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V skladu z delovnimi hipotezama (poglavje 2.6) smo prišli do ugotovitev, katere kvasovke imajo biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel in da je celični stik eden od mehanizmov v delovanju biokontrolne aktivnosti kvasovk. Ugotavljali smo tudi vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost kvasovk.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv gojišča na biokontrolno aktivnost

Vpliv petih sintetičnih trdnih gojišč na pojav biokontrolne aktivnosti kvasovk smo ugotavljali s testom biokontrolne aktivnosti. V test so bili vključeni trije naključno izbrani sevi vsake od 15 različnih vrst kvasovk (preglednica 1), dodatno pa še kontrolna kvasovka *Candida oleophila* Montrocher.

Izbrane kvasovke so na posameznem gojišču izražale različno biokontrolno aktivnost (slike 5 – 20). Najbolj stabilno biokontrolno aktivnost so kvasovke izražale na gojišču NYDA, kjer sta sedmi dan najvišjo biokontrolno aktivnost pokazala kvasovki *Pichia membranifaciens* in *Candida oleophila* (49 %). Podobne rezultate so sedmi dan dosegale tudi na gojišču YPDA, kjer je najvišjo vrednost dosegla kvasovka *C. oleophila* (39 %). Gojišči YPDA in NYDA imata podobno sestavo, zato podobne vrednosti niso presenetljive. Razlika med njima je verjetno zaradi prisotnosti 2 g/l NaCl v gojišču NYDA (gojišče YPDA ne vsebuje NaCl). Najslabšo biokontrolno aktivnost so kvasovke pokazale na gojišču YMA, kjer smo 15. dan zaznali padec vrednosti BKA pod 23 %. To gojišče vsebuje sladni ekstrakt, katerega nitasta gliva s svojimi encimi lažje izkorišča kot kvasovke, zato na tem gojišču tudi bolje raste in je biokontrola kvasovk manjša. Rezultati so pokazali tudi, da sevi vrste *M. pulcherrima* zavirajo rast nitaste glive *B. cinerea* po petih dneh inkubacije na gojišču NYDA za 43 %, na gojišču YPDA za 41 %, na gojišču YMA pa za 34 %, medtem ko so Spadaro in sodelavci (2002) za svoje seve določili vrednosti BKA na gojišču NYDA od 12,5 do 14,6 %, na gojišču YPDA od 6,3 do 8,3 %, na gojišču YMA pa je niso zaznali (0 %). Tudi na gojišču KDM (35 %) in WYPDA (28 %) so sevi *M. pulcherrima* pokazali visoko BKA (slika 13).

Gojišči KDM in WYPDA, ki sta po sestavi podobni vsebini grozdne jagode v času zrelosti, vsebujeta obe 200 g/l glukoze in se razlikujeta v vsebnosti ostalih makro- in

mikroelementov (poglavje 3.2.3, str. 27), je najbolje izkoristila kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*. Po 30 dneh je zavirala rast nitaste glive za 51 % na gojišču WYPDA ter 74 % na KDM. Na gojišču NYDA biokontrolne aktivnosti po 30 dneh ni bilo več zaznati (slika 19). Zaradi visoke ugotovljene BKA kvasovke *S. cerevisiae* na mediju, po sestavi podobnem grozdju oz. moštu, to predstavlja pomembno odkritje, saj kot vodilna kvasovka fermentacije s tem odpira veliko možnosti uporabe.

5.1.2 Vpliv biokontrolne aktivnosti kvasovk *in vitro*

Med 15. vrstami kvasovk smo iskali tiste, ki kažejo najboljšo biokontrolno aktivnost proti nitasti glivi *B. cinerea* in jih primerjali s komercialno dostopno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher. Rezultate smo odčitavali 7., 15., 30. dan. Vse vrste kvasovk so 7. dan (slika 23) kazale biokontrolno aktivnost. Sklepamo, da je razlog v tem, da vsa hranila še niso bila izčrpana. 15. dan, ko je *B. cinerea* povsod dosegla rob plošče smo lahko videli, katere vrste kvasovk lahko s svojim mehanizmi delovanja ohranijo biokontrolno aktivnost. Tiste kvasovke, ki so tudi po 30. dnevu ohranile biokontrolno aktivnost, so se pokazale kot željeni biokontrolni agenti. Ugotovili smo, da rast nitaste glive *B. cinerea* nekatere vrste kvasovk zavirajo bolj kot kontrolna kvasovka *C. oleophila* (slika 23). Vseeno je sedmi dan kontrolna kvasovka dosegla najvišjo biokontrolno aktivnost (49 %). Po 30 dneh je rast nitaste glive zavirala 8,2- odstotno. Višjo končno povprečno biokontrolno aktivnost na gojišču NYDA so imele vrste *Pichia guilliermondii* (10,6 %), *Aureobasidium pullulans* (9 %) ter *Metschnikowia pulcherrima* (8,5 %). Ti podatki so primerljivi z literaturo, kjer so Spadaro in sod. (2002) za štiri seve kvasovke *M. pulcherrima* ugotovili, da zavirajo rast nitaste glive *B. cinerea*.

Zadovoljivo biokontrolno aktivnost so pokazale vrste *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* ter *Sporidiobolus pararoseus* (slika 23). Masih in sodelavci (2001) so ugotovili, da vrsta *P. membranifaciens* na plošči z nitasto glivo *B. cinerea* tvori majhno cono inhibicije. Kvasovka *S. cerevisiae* je rast nitaste glive sedmi dan zavirala za 19,4 %, vendar je njena biokontrolna aktivnost do 15. dne padla na 7,6 % in je 30. dan znašala 5,7 % (slika 23). Castoria in sodelovci (1997) navajajo vrsto *R. glutinis* kot biokontrolno, vendar naši sevi tega niso potrdili (slika 37a, 37b). Nizko biokontrolno aktivnost so že po sedmih dneh pokazale vrste *Bulleromyces albus*, *Candida stellata*, *Cryptococcus magnus*, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* in *Rhodotorula aurantiaca*, do konca inkubacijske

dobe (30. dan) pa je bila biokontrolna aktivnost ali zelo nizka ali pa je praktično ni bilo več moč zaznati (slika 23).

Znotraj posamezne biokontrolne aktivne vrste kvasovk so se pokazale razlike med sevi. Pri vrstah z nizko povprečno biokontrolno aktivnostjo so razlike v biokontrolni aktivnosti posameznih sevov večje (slike 24-39). Zato je vse več raziskovalcev prepričanih, da je ta lastnost sevno specifična (Suzzi in sod., 1995; Lima in sod., 1997; Castoria in sod., 2001; Spadaro in sod., 2002; Santos in sod., 2004).

Vpliv celičnega stika

Opazovali smo vpliv celičnega stika med kvasovko in nitasto glivo *B. cinerea* na trdnem sintetičnem gojišču. Iz rezultatov, predstavljenih v preglednici 3, lahko sklepamo, da je celični stik pomemben dejavnik, ki vpliva na biokontrolno aktivnost posamezne vrste oz. seva kvasovke. Kvasovke vrst *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guilliermondii* popolnoma inhibirajo rast nitaste glive *B. cinerea* na gojišču NYDA.

Iz rezultatov, predstavljenih v preglednici 4, lahko sklepamo, da si kvasovke vrst *Candida oleophila* Montrocher, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guilliermondii* na gojišču NYDA s primarnim nanosom nitaste glive izborijo prostor in hrano za rast. Po 30 dneh inkubacije smo lahko opazili razlike v velikosti kolonij na ploščah s primarnim nanosom nitaste glive v primerjavi z velikostjo kolonij kvasovk na kontrolnih ploščah. To si lahko razlagamo na ta način, da je zaradi sočasne rasti nitaste glive in kvasovke na isti plošči po 30 dneh inkubacije zmanjkalo hranil in prostora, saj je kolonija kvasovk po 30 dneh skupne inkubacije dosegla isto končno velikost ne glede na to, ali smo jo nanegli 48, 72 ali pa 96 ur po posušitvi plošče (slika 41).

Piano in sod. (1997) so ugotovili, da se *M. pulcherrima* pritrja na hife nitaste glive *B. cinerea* in omejuje njeno proliferacijo. Zgodnejše študije so tudi pokazale, da se je izolat kvasovke *P. guilliermondii* trdno pritrtil na hife *B. cinerea* kljub spiranju vzorcev z destilirano vodo (Wisniewski in sod., 1991). V naši raziskavi smo ugotovili, da so v *in vitro* pogojih izbrane kvasovke (preglednica 2, str. 26) pokazale različne sposobnosti pritrjenja na hife nitaste glive (priloge C1 – C6). Kvasovke *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guilliermondii* so se na obeh gojiščih pritrjale na hife tako čvrsto, da so bile hife skoraj nevidne pod mikroskopom. Opazovanja so pokazala, da je bila *S. cerevisiae* v kontaktu s

hifami bolj redko, medtem ko med *C. oleophila* in *B. cinerea* ni bilo opaziti pritrjenja. Iz mikroskopskih fotografij (priloge C1 – C6) izbranih sevov kvasovk in nitaste glive *B. cinerea* lahko sklepamo, da kvasovke za zaviranje rasti nitaste glive uporabljajo različne mehanizme biokontrole in da pritrjanja na hife kot eden od mehanizmov delovanja ni odločilen za visoko biokontrolno aktivnost kvasovke. Castoria in sod. (1997) so v svojih študijah opazili, da se je eden od dveh izolatov kvasovk, ki je kazal manjšo biokontrolno aktivnost pritrdil na hifo patogena, medtem ko se veliko bolj učinkovit izolat ni.

5.1 SKLEPI

- ✓ Nekaterе vrste kvasovk imajo močno biokontrolno aktivnost na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ZIM F58). Vrste kvasovk, ki so pokazale visoko biokontrolno aktivnost so *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Pichia guillermondii*.
- ✓ Biokontrolna aktivnost je sevno specifična lastnost. Med kvasovkami (vrstami, navedenimi v prvem sklepu) smo izbrali seve z najvišjo biokontrolno aktivnostjo: *Aureobasidium pullulans* ZIM 2086, *Metschnikowia pulcherrima* ZIM 2055 in *Pichia guillermondii* ZIM m133.
- ✓ Na biokontrolno aktivnost vpliva sestava gojišča. Medija KDM in WYPDA, ki sta po sestavi podobna vsebini grozdne jagode v času zrelosti, vplivata na biokontrolno aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✓ Celični stik je eden od mehanizmov, ki vpliva na biokontrolno aktivnost posamezne vrste oz. seva kvasovke. Primarni nanos kvasovk vrst *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* na trdno gojišče NYDA popolnoma inhibira rast nitaste glive *B. cinerea*. Obratno pa si, na gojišču NYDA s primarnim nanosom glive, testirane kvasovke *C. oleophila*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* izborijo prostor in hrano za rast.

6 POVZETEK

Botrytis cinerea ali siva grozdana plesen sodi med najpomembnejše parazite vinske trte in zato povzroča veliko gospodarsko škodo. Čeprav so botriticidi drastično zmanjšali incidenco gliv, imajo ti negativen vpliv na okolje. Ena od potencialnih nenevarnih alternativ glede na uporabo fungicidnih sredstev je biokontrola. Kvasovke se kažejo kot najbolj obetavni biokontrolni agenti, zaradi njihovega tekmovanja za hranila, direktne interakcije s patogenom in indukcije obrambe gostitelja, ki se kažejo kot njihovi glavni načini delovanja.

V nalogi smo najprej ugotavljali biokontrolno aktivnost kvasovk *in vitro* na petih trdnih sintetičnih gojiščih (YMA, YPDA, WYPDA, NYDA, KDM). Izmed 15 različnih vrst kvasovk smo naključno izbrali po tri iz vsake vrste (preglednica 1) in dodatno kontrolno kvasovko *Candida oleophila* Montrocher. Po inkubaciji pri 25 °C smo merili tri razdalje (slika 3, str. 19). Na izbranem gojišču (NYDA) smo nato testirali biokontrolno aktivnost vseh 271 naključno izbranih sevov kvasovk iz ZIM na rast nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Prav tako smo po inkubaciji pri 25 °C merili tri razdalje (slika 2). Poskus smo nadaljevali z ugotavljanjem vpliva celičnega stika na PDA in NYDA trdnih medijih. Po površini trdnega medija smo kot primarni nanos razporedili bodisi kvasovke, bodisi nitasto glivo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Po posušitvi primarnega nanosa pa smo na njegovo površino nanесли še drug organizem (na primarni nanos kvasovk, smo nanесли spore nitaste glive in obratno, na primarni nanos nitaste glive smo nanесли celice kvasovk).

Ugotovili smo, da so rast nitaste glive *B. cinerea* nekatere kvasovke po 30 dneh zavirale bolj kot kontrolna kvasovka *C. oleophila* Montrocher. Med posameznimi sevi znotraj iste vrste kvasovk so se pokazale razlike v biokontrolni aktivnosti. Najvišjo biokontrolno aktivnost so pokazali izbrani sevi vrst *A. pullulans* ZIM 2086, *M. pulcherrima* ZIM 2055, *P. guillermondii* ZIM m133 in *S. cerevisiae* ZIM 2175. Na biokontrolno aktivnost je vplivala tudi sestava sintetičnega hranilnega gojišču. Preučevanje celičnega stika oz. interakcije med kvasovkami in nitasto glivo v njem je pokazalo, da je primarni nanos kvasovk vrst *A. pullulans*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* na trdnem gojišču NYDA popolnoma inhibiral rast nitaste glive *B. cinerea*. Obratno pa so si, na gojišču NYDA s primarnim nanosom glive *B. cinerea*, testirane kvasovke *C. oleophila*, *M. pulcherrima* in *P. guillermondii* izborile prostor in hrano za rast.

7 VIRI

- Atlas R. M., Parks L. C. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press:1079 str.
- Barkai-Golan R., Phillips D. J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Disease*, 75: 1085-1089.
- 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.
- 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. (eds). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 29-52.
- Beh A. L., Fleet G. H., Heard G. M. 2003. The interaction of *Aureobasidium pullulans* with microorganisms occurring on wine grapes. V: *Interactions between yeasts and other organisms: book of abstracts: ISSY 23, 2003 Budapest / 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, 26-29 august, 2003, Budapest, Hungary*. Budapest, Diamonds Congress: 166-176.
- Blakeman J.P., Brodie I. D. S. 1977. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 10: 29-42.
- Boekhout T., Phaff H. J. 2003. Yeast biodiversity. V: *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing; Boca Raton, CRC Press: 1-38.
- Boonyakiat D., Chen P. M., Spotts R. A., Richards D. G. 1987. Effect of harvest maturity on decay and postharvest life of d'Anjou pear. *Scientia Horticulturae*, 31: 131-139.
- Bui K., Galzy P. 1990. Food yeasts. V: *Yeast technology*. Spencer J. F. T., Spencer D. M. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 241-265.
- Cabras P., Angioni A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4: 967-973.

- Campbell R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge, Cambridge University Press: 211 str.
- 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 against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 12: 293-300.
- Chalutz E., Wilson C. L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74: 134-137.
- 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.
- Coertze S., Holz G. 2002. Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: Wound infection by dry, airborne conidia. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23: 72-77.
- Coertze S., Holz G., Sadie A. 2001. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 85: 668-677.
- 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.
- 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: 27-40.
- Demain A. L., Phaff H. J., Kurtzman C. P. 1998. The industrial and agricultural significance of yeasts. V: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Kurtzman C. P., Fell J. W. (eds.) Amsterdam, Elsevier: 13-19.
- Dequin S., Salmon J. M., Nguyen H. V., Blondin B. 2003. Wine yeasts. V: Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing; Boca Raton, CRC Press: 389-412.
- Doneche B. J. 1993. Botrytized wines. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G. H. (ed.). Philadelphia, Harwood Academic Publishers: 327-351.

- Doss R. P., Potter S. W., Soeldner A. H., Shristain J. K., Fukunaga L. E. 1995. Adhesion of germings of *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 206-265.
- Droby S., Chalutz E., Horev B., Cohen L., Gaba V., Wilson C. L., Wisniewski M. E. 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathology, 42: 418-424.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L. 1991. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. Postharvest News and Information, 2: 169-173.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L., Wisniewski M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Canadian Journal of Microbiology, 35: 794-800.
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., 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.
- Eckert J. W. 1991. Role of chemical fungicides and biological agents in postharvest diseases control. V: Proceeding of biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables workshop. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service: 14-30.
- El-Ghaouth A., Charles L., Wilson L., Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Biological Control, 88, 4: 282-291.
- El Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology, 93: 344-348.
- Elad Y., Malathrakis N. E., Dik A. J. 1996. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crop. Crop Protection, 15, 3: 229-240.

- Elad Y., Steward A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. V: *Botrytis*: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 223-241.
- Elad Y., Kohl J., Fokkema N. J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 315-336.
- Ellis M. A., Converse R. H., Williams R. N., Williamson B. 1997. Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects. 2nd ed. St. Paul, APS Press: 100 str.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337.
- Filonow A. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 243-256.
- Fleet G. H. 1993. The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. V: *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet G. H. (ed.). Camberwell, 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. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11-22.
- 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.). Kerala, Research Signpost: 1-17.
- Fugelsang K. C. 1997. *Wine microbiology*. New York, Chapman & Hall: 68-116.
- Hemacytometer: Bürker–Türk. 2006. Tokyo, The University of Tokyo, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology. http://biochem2.urnin.jp/contents/Manuals/manual95/B_Turk_P.jpg (28. maj 2006): 1 str.

- Henschke P. A., Jiranek V. 1992. Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G. H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 77-165.
- 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. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 9-28.
- Hussein H. S., Mackie R. I., Merchen N. R., Baker D. H., Parsons C. M. 1996. Effects of oleaginous yeast on growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. *Bioresource Technology*, 55: 125-130.
- Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 265-272.
- Irtwange S. V. 2006. Application of biological control agents in pre- and postharvest operations. *Makurdi, Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, 3, 8: 1-12.
[http://cigr-ejournal.tamu.edu/submissions/volume8/Invited%20overview%20Irtwange\(1\)%2027Feb2006.pdf](http://cigr-ejournal.tamu.edu/submissions/volume8/Invited%20overview%20Irtwange(1)%2027Feb2006.pdf) (18. januar 2007)
- Jackson R. S. 2003. Grapes. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition: vol. 5*. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas P. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 2957-2967.
- Janisiewicz W. J. 1988. Biological control of diseases of fruit. V: *Biocontrol of plant diseases*. Mukerji K. G., Grag K. L. (eds). Boca Raton, CRC Press, 2: 153-165.
- Janisiewicz W. J. 1994. Enhancement of biocontrol of blue mold with nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2671-2676.

- Janisiewicz T. J., Tworkoski 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. *Biological Control*, 90, 11: 1196-2000.
- Jijakli M. H., Lepoivre P. 1998. Characterization of an exo- β -glucanase produced by *Pickia anomala* K., antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88: 335-343.
- Leibinger W., Breuker B., Hahn M., Mendgen K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87: 1103-1110.
- 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.
- Mannazzu I., Clementi F., Ciani M. 2002. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. V: Biodiversity and biotechnology of wine yeasts. Ciani M. (ed.). Kerala, Research Signpost: 19-33.
- Mauch-Mani B., Metraux P. P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82: 535-540.
- 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 the grape-vine be controlled by yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 223-237.

- Masih E. I., Slezack-Deschaumes S., Marmaras I., Barka E. A., 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.
- McLaughlin R. L., Wilson C. L., Droby S., Ben-Arie R., Chalutz E. 1992. Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Disease*, 76: 470-473.
- McLaughlin R. J., Wisniewski M. E., Wilson C. L., Chalutz E. 1990. Effects of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology*, 80: 456-461
- Mercier J., Wilson C. L. 1995. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of grey mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 9-15.
- Mortimer R., Polsinelli M. 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150: 199-204.
- Nair N. G., Emmett R. W., Parker F. E. 1988. Some factors predisposing grape berries to infection by *Botrytis cinerea*. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 16: 257-263.
- Nair N. G., Hill G. K. 1992. Bunch rot of grapes caused by *Botrytis cinerea*. V: *Plant diseases of international importance. Vol 3: Diseases of fruit crops.* Kumar J., Chaube H. S., Singh U. S., Mukhopadhyoy A. N. (eds.). Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall: 147-169.
- Nair N. G., Parker F. E. 1985. Midseason bunch rot of grapes: an unusual disease phenomenon in the Hunter Valley, Australia. *Plant Pathology*, 34: 302-305.

- Pajk P. 2006. Mednarodni standardi o vnosu in uporabi organizmov za biotično varstvo rastlin. V: Biotično varstvo rastlin pred škodljivimi organizmi – predstavitev metod in možnosti njihovega vključevanja v obstoječe sisteme pridelave živeža v Sloveniji. Delavnica, Ljubljana, 1 jun. 2006. Ljubljana, Fitosanitarna uprava Republike Slovenije: 1-52.
- Paulitz T. C., Belanger R. R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology, 39: 103-133.
- Peng G., Sutton J. C. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. Canadian Journal of Plant Pathology, 13: 247-257.
- 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., 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.
- Pucheu-Plante B., Mercier M. 1983. Etude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. Canadian Journal of Botany, 61: 1785-1797.
- Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija, osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 69-95.
- 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.
- Reed G., Nagodawithana T. 1991. Yeast technology. 2nd ed. New York, AVI: 454 str.
- Roberts R. G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology, 80: 526-530.

- Rodov V., Ben-Yehoshua S., Fang D., D'hallewin G., Castia T. 1994. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. *Acta Horticulturae*, 381: 517-523.
- Rosini G., Federici F., Martini A. 1982. Yeast flora on grape berries during ripening. *Microbiology Ecology*, 8: 83-89.
- Rosslenbroich H. I., Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19: 557-561.
- Saligkarias I. D., Gravanis F. T., Epton H. A. S. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. *Biological Control*, 25: 143-150.
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. (eds.). (2000). Introduction to food- and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 389 str.
- Santos A., Sanchez 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.: Software
- 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.
- Singleton P., Sainsbury D. 1996. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed. Chichester, Wiley-Interscience Publication: 1019 str.
- Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M. L. 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.). Chur, Harwood Academic Publishers. 395-420.

- Spotts R. A., Holz G. 1996. Adhesion and removal of conidia of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* from grape and plum fruit surfaces. *Plant Disease*, 80: 688-691.
- Stringer D.A. 1982. Industrial development and evaluation of new protein sources: microorganisms. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 41: 289-300.
- Sugar D., Roberts R. G., Hilton R. J., Reghetti T. L., Sanchez E. E. 1994. Integration of cultural methods with yeast treatment for control of postharvest decay in pear. *Plant Disease*, 78:791-795.
- Suzzi, G., Romano, P., Pontii, I. and Mountuschi, C., 1995. Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 304-308.
- 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.
- Vero S., Mondino P., Burgueno J., Soubes M., Wisniewski M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26: 91-98.
- Whitesides S. K., Daoust R. S., and Gouger R. J. 1994. Commercialization of biological control agents: an industry perspective. V: *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Theory and practice*. Wilson C. L., Wisniewski M. E. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 182 str.
- Wilson C. L., Wisniewski M. E. 1994. *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Theory and practice*. Boca Raton, CRC Press: 182 str.
- Wisniewski M., Biles C., Droby S., MacLaughlin R. J., Wilson C., Chalutz E. 1991. Mode of action of postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis Cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 245-258.
- Wisniewski M. E., Droby S., Chalutz E., Eilam Y. 1995. Effects of Ca⁺ and Mg⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology*, 44: 1016-1024.

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

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.

ZIM, Collection of Industrial Microorganisms. 2007. Ljubljana, University of Ljubljana, Biotechnical faculty. Ljubljana, Slovenia.

<http://www.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/chair/CIM.htm> (januar, 2007).

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju prof. dr. Petru Rasporju za izziv in priložnost, da sem svoje diplomsko delo lahko pripravljaj na področju biotehnologije.

Posebna zahvala gre delovni mentorici dr. Damjani Miklič Milek za pomoč pri iskanju literature in oblikovanju diplomske naloge.

Zahvalil bi se recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovni pregled diplomske naloge.

Za pomoč pri delu v laboratoriju bi se zahvalil osebju Katedre za biotehnologijo.

Gospe Ivici Hočevar bi se zahvalil za pomoč pri pregledu in urejanju literature.

Hvala vsem kolegom in kolegicam, ki sem jih spoznal tekom študija in so name naredili poseben, nepozaben vtis.

Največja zahvala pa gre moji družini, predvsem pa staršema, za moralno in finančno podporo v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana) ter njihova biokontrolna aktivnost (%) na rast nitaste glive *Botrytis cinerea* na trdnem gojišču NYDA po 7, 15 in 30 dneh inkubacije

	IME	ZIM	BKA (%) 7. dan	BKA (%) 15. dan	BKA (%) 30. dan
1	<i>Candida oleophila</i>	2276	49,40	13,29	8,24
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2018	25,75	13,05	13,05
2		2027	18,80	11,74	10,59
3		2028	27,97	19,29	17,31
4		2036	25,86	9,08	3,57
5		2059	33,03	16,32	0,00
6		2063	24,98	18,16	18,16
7		2070	17,25	0,00	0,00
8		2086	26,13	24,98	23,23
9		2094	24,65	17,58	16,60
10		2098	36,16	19,09	6,90
11		2103	24,07	14,64	13,58
12		2105	25,57	15,28	15,28
13		659	23,87	10,34	10,34
14		k220	19,74	7,06	4,76
15		660	13,32	7,23	7,23
16		661	19,99	11,25	11,25
17		626	27,99	12,12	0,00
18		k134	26,52	12,17	10,39
19		627	23,17	13,81	12,89
20		628	20,72	14,64	14,64
21		714	17,02	1,23	0,00
22		s/96/406	20,94	3,53	1,19
23		s/96/407	10,90	0,00	0,00
24		s/96/408	19,01	7,70	5,23
1	<i>Bulleromyces albus</i>	643	31,50	24,19	23,39
2		s202	17,69	10,58	8,60
3		644	30,65	2,02	0,00
4		k303	30,83	0,00	0,00
5		k322	23,65	0,00	0,00
6		645	9,59	0,00	0,00
7		m207	27,60	0,00	0,00
8		m308	19,33	0,00	0,00
9		646	7,29	0,00	0,00
10		o305	27,42	0,00	0,00
1	<i>Candida glabrata</i>	383	44,08	19,47	14,57
2		510	35,28	16,36	0,00
3		523	41,73	11,45	11,45
4		573	28,24	6,49	2,15
5		1990	35,34	22,44	4,17
6		1996	31,02	12,07	9,09
7		1998	29,89	7,13	4,07
8		1999	36,29	3,06	1,04
9		2000	38,08	10,64	6,65
10		2002	27,56	4,02	3,04
11		2003	36,07	4,11	3,06
12		2004	37,10	12,61	7,91
13		2005	35,65	20,80	5,11

Nadaljevanje priloge A: (Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana))

	IME	ZIM	BKA (%) 7. dan	BKA (%) 15. dan	BKA (%) 30. dan
1	<i>Candida stellata</i>	2049	0,00	0,00	0,00
2		2111	0,00	0,00	0,00
3		2112	27,15	0,00	0,00
4		2121	0,00	0,00	0,00
5		1876	14,75	0,00	0,00
6		1903	21,40	0,00	0,00
7		1904	27,43	0,00	0,00
8		1906	23,42	0,00	0,00
9		1910	26,50	0,00	0,00
10		1911	20,19	0,00	0,00
11		1912	24,01	0,00	0,00
12		1913	22,93	0,00	0,00
13		1838	16,38	0,00	0,00
14		1842	17,94	10,55	5,31
15		1843	19,70	0,00	0,00
16		1844	22,58	0,00	0,00
1	<i>Cryptococcus magnus</i>	634	11,30	0,00	0,00
2		s120	0,00	0,00	0,00
3		s121	11,24	0,00	0,00
4		s139	6,25	0,00	0,00
5		s213	4,07	0,00	0,00
6		s302	7,20	0,00	0,00
7		635	0,00	0,00	0,00
8		k210	3,03	0,00	0,00
9		k222	12,50	0,00	0,00
10		k317	12,95	0,00	0,00
11		k331	10,20	0,00	0,00
12		m102	20,36	13,16	10,13
13		m202	0,00	0,00	0,00
14		m228	19,79	1,04	1,04
15		m307	11,46	0,00	0,00
16		m313	12,50	0,00	0,00
17		637	11,21	2,02	2,02
18		o104	4,04	0,00	0,00
19		o114	8,33	0,00	0,00
20		o115	19,35	8,60	5,38
21		o117	15,61	1,01	1,01
22		o301	12,37	0,00	0,00
23		o307	12,40	0,00	0,00
24		o308	0,00	0,00	0,00
25		o310	1,01	0,00	0,00
26		o314	9,37	0,00	0,00
1	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	2025	6,95	1,96	0,00
2		2120	10,35	6,38	4,27
3		2186	15,13	0,00	0,00
4		o/1152/401	8,14	1,01	0,00
5		o/1152/402	7,99	0,00	0,00
6		o/1152/407	6,03	0,00	0,00
7		o/1152/413	39,75	0,00	0,00
8		o/1152/418	5,09	0,00	0,00
9		o/1152/420	30,94	0,98	0,00
10		o/1152/421	20,15	0,00	0,00
11		o/1152/422	23,96	6,25	3,12
12		o/1152/423	20,15	5,08	3,03
13		o/1152/426	21,48	7,43	4,30
14		o/1152/430	16,01	0,00	0,00
15		o/1152/434	8,85	0,00	0,00
16		k/1152/403	31,92	0,00	0,00
17		k/1152/405	22,74	1,07	1,07
18		k/1152/413	30,74	0,00	0,00
19		k/1344/401	34,74	0,00	0,00
20		k/1344/403	23,02	0,00	0,00
21		k/2112/401	15,03	0,00	0,00
22		k/2112/402	33,95	0,00	0,00

Nadaljevanje priloge A: (Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana))

	IME	ZIM	BKA (%) 7. dan	BKA (%) 15. dan	BKA (%) 30. dan
1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2015	8,75	0,00	0,00
2		2022	10,42	0,00	0,00
3		2032	20,83	0,00	0,00
4		2040	0,00	0,00	0,00
5		2057	5,12	0,00	0,00
6		2068	9,78	0,00	0,00
7		2080	0,00	0,00	0,00
8		2088	13,52	0,00	0,00
9		2096	9,68	0,00	0,00
10		o102	0,00	0,00	0,00
11		o113	1,07	0,00	0,00
12		k/0/502	6,32	0,00	0,00
13		o/96/401	7,53	0,00	0,00
14		m/96/401	10,26	0,00	0,00
15		s/96/401	0,00	0,00	0,00
16		o/240/404	13,81	0,00	0,00
17		k/240/501	15,05	0,00	0,00
18		s/240/401	8,33	0,00	0,00
19		o/432/401	13,81	0,00	0,00
20		m/432/401	13,64	0,00	0,00
21		o/672/401	6,52	0,00	0,00
22		k/672/401	7,29	0,00	0,00
23		m/672/601	11,47	0,00	0,00
1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2016	37,01	31,30	16,08
2		2055	43,64	29,37	20,81
3		2082	21,21	12,12	10,10
4		2092	22,92	12,37	12,37
5		112	20,20	11,11	8,08
6		669	13,99	9,98	9,98
7		622	34,37	25,23	0,00
8		k157	20,18	12,98	12,98
9		o/0/501	13,13	9,19	9,19
10		k/0/503	6,06	1,99	1,99
11		m/0/501	7,13	6,12	5,11
12		o/96/501	9,00	8,02	8,02
13		k/96/402	21,02	17,03	15,22
14		m/96/403	10,00	10,00	8,93
15		s/96/403	4,13	3,12	2,08
16		o/240/403	16,97	15,16	15,16
17		k/240/402	17,52	16,48	15,44
18		m/240/403	0,00	0,00	0,00
19		s/240/501	12,98	12,98	12,98
20		723	4,04	3,06	2,05
21		k/432/404	5,97	4,07	1,01
22		m/432/404	5,14	5,14	5,14
23		s/432/403	7,05	0,00	0,00
24		o/672/501	5,88	3,92	3,00
25		k/672/404	10,87	10,87	9,98
26		724	26,80	16,48	14,46
27		s/672/502	11,74	8,71	7,84
1	<i>Pichia guillermondii</i>	624	30,93	19,57	9,37
2		m133	34,30	25,54	11,27
3		m142	33,68	24,81	10,39
4		o/96/404	22,11	21,07	14,02
5		o/240/408	17,91	14,75	11,59
6		o/2112/503	16,64	14,53	9,32
7		o/2112/504	20,83	14,58	8,50

Nadaljevanje priloge A: (Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana))

	IME	ZIM	BKA (%) 7. dan	BKA (%) 15. dan	BKA (%) 30. dan
1	<i>Pichia kluyveri</i>	2031	13,80	0,00	0,00
2		2033	19,15	0,00	0,00
3		2046	19,15	3,19	3,19
4		2050	12,73	0,00	0,00
5		2053	0,00	0,00	0,00
6		2089	20,83	4,17	3,12
7		2090	0,00	0,00	0,00
8		2108	0,00	0,00	0,00
9		2118	17,91	5,27	5,27
10		2119	22,99	4,72	4,72
1	<i>Pichia membranifaciens</i>	2091	12,50	0,00	0,00
2		2093	11,33	0,00	0,00
3		2183	21,65	3,09	2,05
4		1908	24,12	3,23	2,22
5		o/1152/403	21,57	13,60	13,60
6		o/1152/404	55,00	0,00	0,00
7		o/1152/409	24,35	15,51	14,46
8		o/1152/410	45,40	2,30	0,00
9		o/2112/401	45,91	5,56	2,78
10		o/2112/402	26,04	16,32	16,32
1	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	2051	2,08	0,00	0,00
2		2052	6,32	0,00	0,00
3		2071	2,08	0,00	0,00
4		2078	2,05	0,00	0,00
5		2099	1,04	0,00	0,00
6		2100	1,04	0,00	0,00
7		2102	8,54	0,00	0,00
8		s130	10,48	1,04	1,04
9		s207	8,27	0,00	0,00
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	2017	15,74	5,42	5,42
2		2024	16,51	9,28	9,28
3		2045	18,26	5,12	3,09
4		2065	15,62	6,32	6,32
5		2075	14,93	1,15	1,15
6		2083	16,51	4,17	4,17
7		2085	14,78	1,07	1,07
8		2097	9,22	0,00	0,00
9		2101	21,50	10,42	5,24
10		s102	20,20	5,21	5,21
11		s134	10,29	0,00	0,00
12		k213	11,59	2,12	1,07
13		k315	14,47	9,38	9,38
14		k325	12,53	3,16	2,08
15		m213	15,47	11,36	8,30
16		m305	7,32	0,00	0,00
17		o101	10,52	3,12	3,12
18		o302	13,78	1,07	0,00
19		o120	14,53	4,23	4,23
20		k102	6,28	0,00	0,00
21		k144	19,60	9,28	7,20
22		m101	17,52	12,37	11,43
23		m113	15,15	2,08	2,08
24		s102	20,20	5,21	5,21
25		s111	11,46	2,08	2,08

Nadaljevanje priloge A: (Seznam kvasovk (271 sevov) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM, Biotehniška fakulteta, Ljubljana))

	IME	ZIM	BKA (%) 7. dan	BKA (%) 15. dan	BKA (%) 30. dan
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2139	18,00	10,99	7,99
2		2141	22,44	11,30	9,37
3		2143	19,84	8,37	8,37
4		2145	45,39	9,37	0,00
5		2148	13,54	4,17	3,12
6		2149	15,15	5,05	4,04
7		2151	16,83	7,36	3,19
8		2170	14,87	8,38	6,42
9		2172	18,70	10,29	9,25
10		2173	19,47	11,12	10,08
11		2175	21,87	17,71	16,67
12		2176	19,41	11,24	11,24
13		2180	46,40	5,18	0,00
14		2182	14,42	8,27	8,27
15		2197	16,16	11,11	9,091
16		2200	15,47	5,18	3,09
17		m/432/501	13,13	7,13	6,12
18		s/432/405	28,33	4,05	0,00
19		m/672/401	10,10	0,00	0,00
20		m/1152/401	12,12	1,01	1,01
21		s/1152/402	7,16	0,00	0,00
22		s/2112/402	18,00	9,98	8,97
1	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	2038	4,10	1,01	1,01
2		2067	10,83	5,52	5,52
3		2074	26,49	7,67	7,67
4		2076	4,24	1,07	0,00
5		2095	11,17	5,35	5,35
6		s206	25,23	1,07	0,00
7		o121	43,75	20,68	17,53
8		s106	10,32	6,42	5,34
9		s117	9,22	7,29	5,21
10		s139	1,01	0,00	0,00
11		s152	0,00	0,00	0,00
12		s208	11,52	6,35	5,31
13		s303	6,06	3,12	3,12
14		k225	5,38	2,15	0,00
15		k308	8,33	2,12	2,12
16		k311	2,12	0,00	0,00
17		k323	11,17	6,28	3,12
18		m209	6,22	3,23	3,23
19		m306	1,04	0,00	0,00
20		m315	3,06	1,01	1,01
21		m316	10,18	7,08	6,94
22		o109	2,05	0,00	0,00
23		o128	7,26	5,21	4,17
24		o129	4,20	2,08	2,08
25		o130	1,01	0,00	0,00
26		o304	3,19	1,07	1,07

Priloga B1: Sestava kemijsko definiranega mošta (KDM) (Henschke in Jiranek, 1992)

KEMIKALIJA	Proizvajalec	Količina na 1 l (g)
Glukoza	Kemika	200
K tartrat	Merck	5
L- jabolčna kislina	/	3
Citronska kislina	Sigma	0,2
K ₂ PO ₄	Merck	1,14
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Sigma	1,23
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck	0,44
MnCl ₂ x 4H ₂ O	Merck	0,0001982
ZnCl ₂	Fluka	0,0001355
FeCl ₂	Merck	0,0000320
CuCl ₂ x 2H ₂ O	Aldrich	0,0000136
borna kislina	Merck	0,0000057
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	Sigma	0,0000291
Na-molibdat x	Kemika	0,0000242
KJO ₃	/	0,0000108
Mio-inositol	Sigma	0,1
piridoksin x HCl	Aldrich	0,002
nikotinska kislina	/	0,002
Ca-pantotenat	Fluka	0,001
tiamin x HCl	Aldrich	0,0005
P-amino benzojeva	/	0,0002
riboflavin	Sigma	0,0002
Biotin	Fluka	0,000125
folna kislina	Sigma	0,0002
alanin	Merck	0,1
arginin	Aldrich	0,75
aspargin	Sigma	0,15
aspartinska kislina	Sigma	0,35
glutaminska kislina	Sigma	0,5
glutamin	Merck	0,2
glicin	Sigma	0,05
histidin	Sigma	0,15
izolevcin	Merck	0,2
levcin	Sigma	0,3
lizin	Sigma	0,25
metionin	Sigma	0,15
fenilalanin	Sigma	0,15
prolin	Sigma	0,5
serin	Sigma	0,4
treonin	Sigma	0,35
triptofan	Sigma	0,1
tirozin	Aldrich	0,02
valin	Sigma	0,2
AGAR	Biolife	20

Vitamine in minerale smo pripravili v založnih raztopinah (Prilogi 3 in 4), ostale kemikalije pa smo zatehtali v merilno bučko ob pripravi gojišča.

Priloga B2: Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov

KEMIKALIJA	PRIPRAVA	KONC. ZALOŽNE RAZTOPINE (g/l)
MnCl ₂ x 4H ₂ 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
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,0136 g v 100 ml destilirane vode	0,136
borna kislina	0,0057 g v 100 ml destilirane vode	0,057
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,0291 g v 100 ml destilirane vode	0,291
Na-molibdat x 2H ₂ O	0,0242 g v 100 ml destilirane vode	0,242
KJO ₃	0,0108 g v 100 ml destilirane vode	0,108

Opomba: Založne raztopine mineralov smo pripravili posamezno. Dodali smo 100 µl založne raztopine posameznega minerala za 1 liter kemijsko defeniranega mošta.

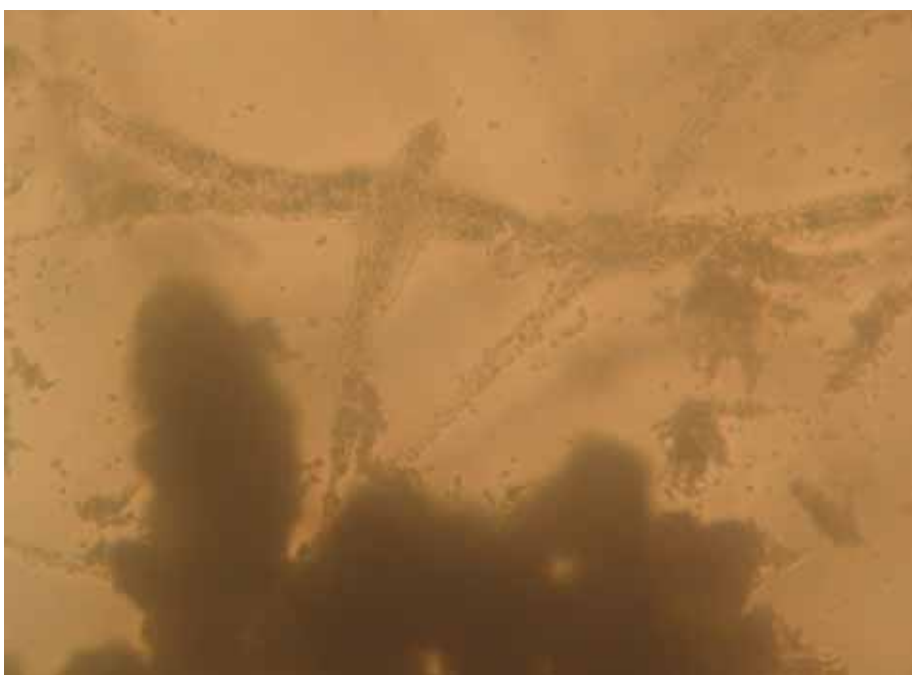
Priloga B3: Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov

KEMIKALIJA	PRIPRAVA	KONC. ZALOŽNE RAZTOPINE (g/l)
Mio-inositol	10 g v 100 ml destilirane vode	100
piridoksin x HCl	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
nikotinska kislina	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
Ca-pantotenat	0,1 g v 100 ml destilirane vode	1
tiamin x HCl	0,05 g v 100 ml destilirane vode	0,5
P-amino benzojeva ksl.	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2
riboflavin	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2
Biotin	0,0125 g v 100 ml destilirane vode	0,125
folna kislina	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2

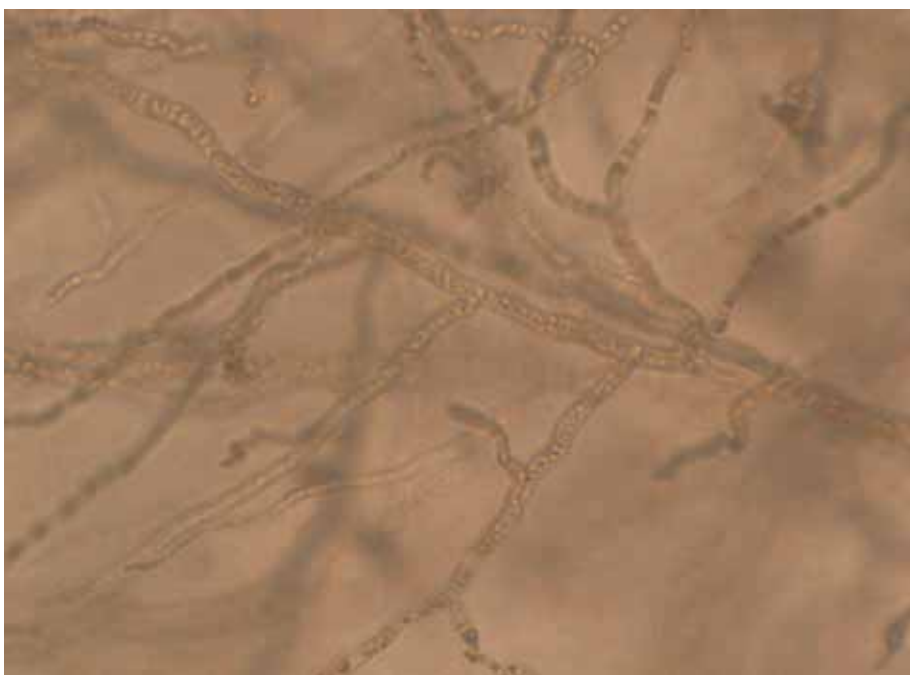
Opomba: Založno raztopino vitaminov smo pripravili skupaj v eni raztopini. Dodali smo 1 ml založne raztopine vitaminov za 1 liter kemijsko defeniranega mošta.



Priloga C1: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (200x povečava) po 30 dneh rasti na gojišču PDA



Priloga C2: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *A. pullulans* ZIM 2086 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA



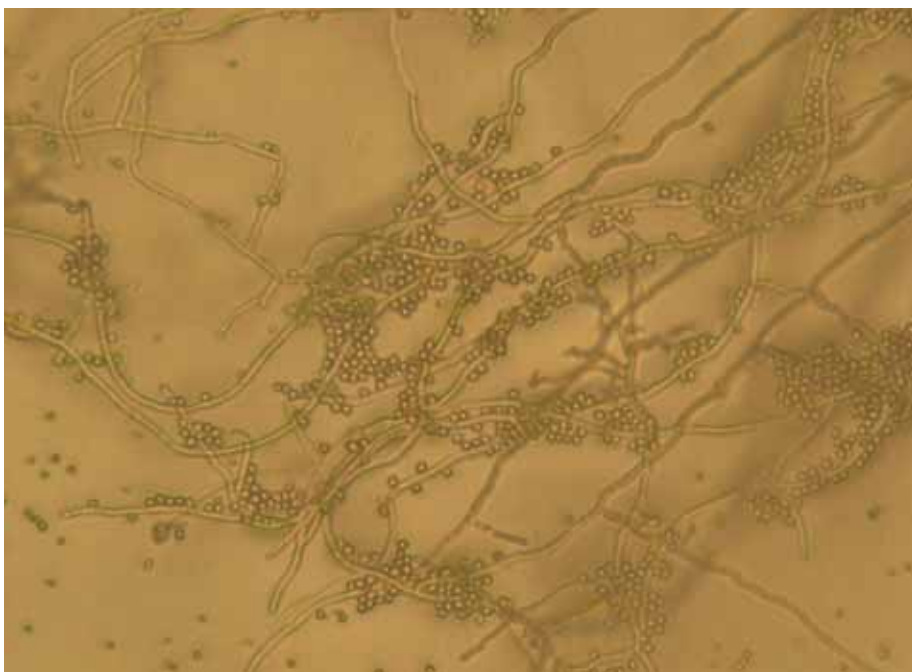
Priloga C3: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *C. oleophila* ZIM 2276 (200x povečava) po 30 dneh rasti na gojišču PDA



Priloga C4: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *M. pulcherrima* ZIM 2055 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA



Priloga C5: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *P. guillermondii* ZIM m133 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA



Priloga C6: Mikroskopska fotografija hif nitaste glive *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel v prisotnosti celic kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2175 (200x povečava) po 15 dneh rasti na gojišču PDA

Priloga D1: Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu A na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36)

čas inokulacije (h)	sev kvasovke					P-vrednost
	AP 2086	CO 2276	MP 2055	PG m133	SC 2175	
0	1,5±1,6 ^a	2,0±1,5 ^a	1,5±1,6 ^a	1,5±1,6 ^a	1,8±1,3 ^a	0,8782
24	1,5±1,6 ^{ab}	0,5±0,9 ^{bc}	1,5±1,6 ^{ab}	0,0±0 ^c	1,8±1,4 ^a	0,0028
48	0,0±0 ^b	0,0±0 ^b	0,0±0 ^b	0,0±0 ^b	1,5±1,5 ^a	<0,0001

N – število obravnavanj v skupini, P≤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≤0,05).

Priloga D2: Vpliv vrste gojišča v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in nitaste glive, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)

kvasovka	čas (h)	0			24			28		
		konc.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA
AP 2086	10 ⁶ /10 ³	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
AP 2086	10 ⁸ /10 ⁴	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	10 ⁶ /10 ³	2,0±1,7	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	2,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	10 ⁸ /10 ⁴	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	10 ⁶ /10 ³	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	10 ⁸ /10 ⁴	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
PG m133	10 ⁶ /10 ³	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
PG m133	10 ⁸ /10 ⁴	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
SC 2175	10 ⁶ /10 ³	1,0±1,0	3,0±0,0	0,0369	1,0±1,7	3,0±0,0	0,1138	1,3±1,5	2,0±1,7	0,6374
SC 2175	10 ⁸ /10 ⁴	0,3±0,6	3,0±0,0	0,0339	1,3±1,2	2,0±1,7	0,3613	0,7±1,2	2,0±1,7	0,2386

N – število obravnavanj v skupini, P≤0,05 – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik.

Priloga D3: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)

kvasovke	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
AP 2086	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
AP 2086	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	NYDA	2,0±1,7	0,0±0,0	0,1138	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	2,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000

Nadaljevanje priloge D3: Vpliv koncentracije inokuluma v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)

kvasovke	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.	$10^6/10^3$	$10^8/10^4$
PG m133	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
PG m133	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
SC 2175	NYDA	1,0±1,0	0,3±0,6	0,3458	1,0±1,7	1,3±1,2	0,8137	1,3±1,5	0,7±1,2	0,4867
SC 2175	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	2,0±1,7	0,3173	2,0±1,7	2,0±1,7	1,0000

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik.

Priloga D4: Vpliv časa inokulacije v poskusu A na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=3)

kombinacija	čas (h)	$10^6/10^3$				$10^8/10^4$			
		gojišče	0	24	48	P-vr.	0	24	48
AP 2086	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
AP 2086	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0357
CO 2276	NYDA	2,0±1,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2500	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	PDA	3,0±0,0	2,0±0,0	0,0±0,0	0,0036	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0036
MP 2055	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0357
PG m133	NYDA	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
PG m133	PDA	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357
SC 2175	NYDA	1,0±1,0	1,0±1,7	1,3±1,5	1,0000	0,3±0,6	1,3±1,2	0,7±1,2	0,6786
SC 2175	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	2,0±1,7	1,0000	3,0±0,0	2,0±1,7	2,0±1,7	1,0000

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik.

Priloga D5: Vpliv vrste oz. seva kvasovke v poskusu B na rast v odvisnosti od časa inokulacije (N=36)

čas inokulacije (h)	sev kvasovke					P-vrednost
	AP 2098	CO 2276	MP 2055	PG 624	SC 2180	
48	1,3±1,5 ^b	1,8±1,4 ^b	2,3±1,4 ^{ab}	3,0±0 ^a	3,0±0 ^a	<0,0001
72	0,0±0 ^b	1,5±1,6 ^a	1,5±1,6 ^a	2,3±1,4 ^a	1,5±1,6 ^a	0,0051
96	0,0±0 ^b	1,5±1,6 ^a	1,5±1,6 ^a	1,5±1,6 ^a	0,0±0 ^b	0,0015

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 D6: Vpliv vrste gojišča v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3)

kvasovka	čas (h)	48			72			96		
		konc.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA	P-vr.	NYDA	PDA
AP 2086	10 ⁶ /10 ³	2,3±1,2	3,0±0,0	0,3173	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
AP 2086	10 ⁸ /10 ⁴	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	10 ⁶ /10 ³	3,0±0,0	1,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
CO 2276	10 ⁸ /10 ⁴	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
MP 2055	10 ⁶ /10 ³	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
MP 2055	10 ⁸ /10 ⁴	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
PG m133	10 ⁶ /10 ³	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
PG m133	10 ⁸ /10 ⁴	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253
SC 2175	10 ⁶ /10 ³	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
SC 2175	10 ⁸ /10 ⁴	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000

N – število obravnavanj v skupini, P≤0,05 – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik.

Priloga D7: Vpliv koncentracije inokuloma v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, časa inokulacije in koncentracije inokuluma (N=3).

kvasovka	čas (h)	gojišče	48			72			96		
			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.
AP 2086	NYDA	2,3±1,2	0,0±0,0	0,0339	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
AP 2086	PDA	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
CO 2276	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	
CO 2276	PDA	1,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
MP 2055	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	
MP 2055	PDA	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
PG m133	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	
PG m133	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
SC 2175	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	
SC 2175	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0253	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000	

N – število obravnavanj v skupini, P≤0,05 – zavrnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik.

Priloga D8: Vpliv časa inokulacije v poskusu B na rast v odvisnosti od kombinacije kvasovke in plesni, gojišča in koncentracije inokuluma (N=2).

kvasovke	čas (h)	$10^6/10^3$				$10^8/10^4$				
		gojišče	48	72	96	P-vr.	48	72	96	P-vr.
AP 2086	NYDA	2,3±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
AP 2086	PDA	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
CO 2276	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000
CO 2276	PDA	1,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
MP 2055	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000
MP 2055	PDA	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0000
PG m133	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,0000
PG m133	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357
SC 2175	NYDA	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357
SC 2175	PDA	3,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0357

N – število obravnavanj v skupini, $P \leq 0,05$ – zavrtnemo ničelno hipotezo, po kateri trdimo, da med testiranimi skupinami ni razlik