

مقاله تحقیقی

بررسی تنوع زیستی و کارایی مخمرهای اپی فیت انگور در کنترل زیستی بیماری کپک خاکستری

لاچین مختارنژاد^۱، شهرام نعیمی^۲، محسن فرزانه^۳

۱- استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳- دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: لاچین مختارنژاد، ایمیل: l.mokhtarnejad@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

۸۱-۶۳(۱)۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

چکیده

بیماری کپک خاکستری خوشه انگور ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* از عوامل مهم پوسیدگی و کاهش کمیت و کیفیت محصول در مراحل قبل و پس از برداشت انگور است که مصرف قارچ‌کش‌های شیمیایی را اجتناب‌ناپذیر کرده است. با توجه به نگرانی‌های زیست محیطی مرتبط با مصرف بی‌رویه قارچ‌کش‌های شیمیایی و مضرات آن برای سلامتی انسان و محیط زیست، بکارگیری فرآورده‌هایی از عوامل زیستی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. در این بین، برخی مخمرها با دارا بودن فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ‌های بیمارگر، جایگزین مناسبی برای مصرف آفتکش‌های شیمیایی هستند. مطالعه حاضر با هدف شناسایی مخمرهای اپی فیت انگور با فعالیت آنتاگونیستی علیه *B. cinerea* در مرحله پس از برداشت در شرایط آزمایشگاه صورت گرفته است. در مجموع ۶۷ جدایه مخمر از سطح میوه‌های انگور برداشت شده از تاکستان‌های استان آذربایجان غربی جداسازی شد. براساس مطالعات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی ناحیه 26S rDNA D1/D2، جدایه‌ها به ۲۱ گونه و ۱۱ جنس متعلق بودند که *Aureobasidium pullulans* به عنوان گونه غالب فلور انگور شناخته شد. توانایی آنتاگونیستی ۶۷ جدایه مخمری علیه *B. cinerea* با استفاده از روش کشت متقابل بررسی شد. بطور کلی، ۱۶ جدایه متعلق به هفت جنس، موفق به مهار رشد *B. cinerea* شدند. مطالعه کارایی ۱۶ جدایه منتخب در مهار پوسیدگی خاکستری روی حبه‌های انگور در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. جدایه‌های *Metschnikowia pulcherrima* (G54) و *Rhodotorula glutinis* (G54) به ترتیب با ۹۲/۵۹، ۹۱/۳۷ و ۹۰/۱۵ درصد مهار پوسیدگی، موثرترین جدایه‌ها در کاهش بیماری روی حبه‌ها بودند. بررسی مکانیسم‌های دخیل در کنترل زیستی نشان داد که ۱۲ جدایه قادر به تولید پروتاز، شش جدایه قادر به تولید پکتیناز و ۱۲ جدایه آمیلاز تولید کردند. همچنین مشخص شد که ۱۲ جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم و هشت جدایه قادر به تولید سیدروفور بودند. بنابراین، فلور انگور دارای تنوع بالایی از مخمرها است و جدایه‌های برتر (G9، G54، G30) به کمک مکانیسم‌های مختلف همچون آنتی بیوز، تولید پروتاز، آمیلاز و سیدروفور، از کارایی بالایی در مهار پوسیدگی خاکستری انگور در شرایط آزمایشگاه برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های پس از برداشت، شناسایی مخمرها، مخمرهای آنتاگونیست، مکانیسم اثر، *Botrytis cinerea*

مقدمه

زندگی خود به صورت مخمری زندگی می‌کنند. لازم به ذکر است که اگر چه مرحله تک سلولی اغلب به عنوان یک خصوصیت تاکسونومیکی مخمرهای واقعی شناخته شده است، ولی تعدادی از مخمرهای حقیقی یا آسکومیستی راسته ساکارومیستال، میسلیم هم تولید می‌کنند (Alexopoulos *et al.*, 1996).

به طور کلی، نحوه عملکرد چندگانه عوامل کنترل بیولوژیکی (BCAs) احتمال ایجاد مقاومت در جمعیت بیمارگرها را ناممکن می‌سازد (Wallace *et al.*, 2018) و به خصوص، مخمرها دارای ویژگی‌هایی هستند که آن‌ها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک قوی مطرح می‌کنند. از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به نیازهای غذایی ساده، رشد و تکثیر سریع، تحمل نسبت به برخی آفت‌کش‌ها، قابلیت کلونیزه کردن و زنده ماندن در سطوح میوه برای مدت طولانی اشاره کرد (Spadaro *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013). فعالیت کنترل زیستی مخمرهای آنتاگونیست می‌تواند به مکانیسم‌های مختلفی از جمله قابلیت چسبیدن به بخش‌های خاصی از بافت‌های گیاه میزبان و بیمارگر، رقابت با بیمارگرهای قارچی بر سر مواد مغذی یا فضا، پارازیتسم، ترشح آنزیم‌های لیتیک (لیزکننده) و مواد ضد میکروبی، تولید ترکیبات آلی فرار (VOCs)، تشکیل بیوفیلم بر روی سطح داخلی زخم، تولید پروتئین‌های خارج سلولی ضد میکروبی و القای مقاومت میزبان مرتبط باشد (Spadaro *et al.*, 2016). در میان این مکانیسم‌ها، به نظر می‌رسد رقابت برای مواد مغذی و فضا، مکانیسم عمل رایج بسیاری از مخمرها باشد (Sharma *et al.*, 2009). بیشتر مخمرهای با فعالیت آنتاگونیستی متعلق به جنس‌های *Candida*، *Pichia*، *Debaryomyces* و *Aureobasidium Metschnikowia* هستند (Grzegorzczuk *et al.*, 2015) که توانایی آن‌ها در کاهش رشد و بیماری‌زایی قارچ‌های *B. cinerea*، *C. acutatum*، *Rhizopus stolonifer*، *Aspergillus niger*، *P. italicum* و *P. digitatum*، *P. expansum*، در مطالعات متعددی گزارش شده است (Calvente *et al.*, 1999; Sansone *et al.*, 2005; Sezai *et al.*, 2014). مخمرها بخشی از فلور طبیعی سطح گیاه هستند (Droby *et al.*,

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از محصولات مهم کشاورزی در سراسر جهان به شمار می‌آید و کشت آن عمدتاً تحت تأثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرد که در این میان خسارت عوامل بیماری‌زای پس از برداشت بسیار قابل توجه است. خسارت مستقیم ناشی از بیماری‌های پس از برداشت موجب کاهش ۲۰ تا ۵۰ درصدی بازدهی کشاورزی در جهان می‌گردد (Kwasiborski *et al.*, 2014; Savary *et al.*, 2012). کپک‌ها معمول‌ترین بیماری‌های پس از برداشت هستند که تولید میوه‌ها و سبزیجات را تحت تأثیر قرار می‌دهند. کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های پس از برداشت انگور می‌باشد و می‌توان گفت یکی از مشکلات اصلی برای تولید و صادرات انگور در سراسر جهان به شمار می‌آید (Esterio *et al.*, 2021). در حال حاضر مدیریت پوسیدگی خاکستری بر اساس اقدامات پیشگیرانه، نگهداری در سردخانه و ضدعفونی با قارچ‌کش‌های شیمیایی صورت می‌پذیرد (La Spada *et al.*, 2021). جدا از عوارض جانبی بر سلامت انسان و زیست محیطی، استفاده مکرر از قارچ‌کش‌های شیمیایی منجر به تکثیر جمعیت مقاوم قارچ به قارچ‌کش‌ها گردیده و در نتیجه موجب کاهش اثربخشی قارچ‌کش‌ها در کنترل بیماری شده است (Sanchez-Torres & Tuset, 2011). معایب قارچ‌کش‌های شیمیایی، محققان را بر آن داشته است تا به دنبال روش‌های جایگزین ایمن‌تر برای کنترل پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ها باشند (Usall *et al.*, 2016; Elshafie *et al.*, 2020). اخیراً استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست و مخمرها که بخشی از فلور طبیعی سبزیجات و میوه‌ها می‌باشند، به عنوان جایگزین امیدوارکننده‌ای برای قارچ‌کش‌های شیمیایی معرفی شده‌اند (Morales Bazioli *et al.*, 2019).

واژه مخمر منعکس کننده موقعیت تاکسونومیکی تعریف شده‌ای نمی‌باشد و یک فرم رشدی را در سلسله قارچ‌ها تداعی می‌نماید. مخمرهای واقعی در شاخه‌های آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا واقع شده و در سراسر چرخه

کلکسیون قارچ‌های زنده ایران، بخش رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد و بر روی محیط کشت PDA در لوله مورب نگهداری گردید. جدایه مذکور در محیط کشت PDA رشد داده شد و جهت اثبات آزمون بیماری‌زایی روی میوه انگور آزمایش شد (Etebarian *et al.*, 2005).

شناسایی جدایه‌های مخمر

گروه‌بندی اولیه جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ و شکل پرگنه و همچنین خصوصیات میکروسکوپی انجام پذیرفت. به منظور بررسی خصوصیات ماکروسکوپی شامل رنگ و شکل پرگنه، جدایه‌های مخمر روی محیط کشت GYP آگار (glucose 20 g/L, peptone 10 g/L, Yeast extract 10 g/L, Agar 20 g/L) کشت گردیدند.

شناسایی مولکولی مخمرها

استخراج DNA با استفاده از روش Boulano *et al.* (2001) انجام گرفت. شناسایی مخمرها براساس تعیین توالی ناحیه 26S rDNA D1/D2 حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگرهای (5'-GGT CCG TGT TTC AAG AC-3') و V9 با توالی 5'-TGCGTTGAT TAC GTC CCT GC-3') انجام شد (Libkind *et al.*, 2003). فرآیند تکثیر (PCR) در شرایط: دو دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۴ چرخه در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، یک دقیقه در ۵۵ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله پایانی، پنج دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گردید. نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت توپازژن ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). زیرهم‌چینی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 11 انجام شد. درخت فیلوژنتیک نیز با نرم‌افزار MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2011) و به روش پیوست‌همسایه ترسیم و روابط خویشاوندی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت حصول اطمینان از گروه‌بندی ایجادشده، شاخص بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار اعمال و ارزش عددی آن به صورت درصد در بالای گروه‌ها ذکر گردید. توالی جدایه‌های منتخب در بانک ژن (National

Pretorius *et al.*, 1999) و می‌توان گفت تغییر در جمعیت آن‌ها می‌تواند بر روی وقوع بیماری تاثیرگذار باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بهترین منبع برای انتخاب سویه‌های آنتاگونیست، محیط‌های طبیعی خودشان که در آن استراتژی‌هایی برای کلونیزه کردن، دسترسی به مواد مغذی و فضا و مهار سایر میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت (از جمله بیمارگرهای اپی‌فیتیک) ایجاد کرده‌اند، باشد که تضمین کننده بقای آن‌ها می‌باشد (Parafati *et al.*, 2015; Pretscher *et al.*, 2018; Pereyra *et al.*, 2021).

در این تحقیق، مخمرهای اپی‌فیت میوه‌های انگور جداسازی و شناسایی گردید و پس از بررسی توانایی آنتاگونیستی آن‌ها علیه بیمارگر *B. cinerea*، مکانیسم‌های کنترل زیستی آن‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی جدایه‌های مخمر

در مرداد ماه سال ۱۴۰۱ تعداد ۲۳ نمونه از میوه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه از باغات مختلف انگور واقع در استان آذربایجان غربی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای ضدعفونی سطحی، جبهه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲٪ غوطه‌ور گردیده و سپس دو بار با آب استریل شستشو داده شدند و نهایتاً به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۹۰ درصد غوطه‌ور گردیدند. پس از ضدعفونی سطحی جبهه‌ها، ۱۰ گرم از هر نمونه درون ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نمک فیزیولوژیک (NaCl, 0.9%) قرار داده شده و پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و تهیه سری رقت، یک میلی‌لیتر از محلول حاصل روی محیط کشت Dichloran Rose Bengal chloramphenicol (DRBC) Agar (رزبنگال آگار) پخش گردید. تشک‌های پتری به مدت یک تا دو هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Rabosto *et al.*, 2006).

تهیه قارچ بیمارگر

جدایه بیمارگر *B. cinerea* با شماره کلکسیونی IRAN 4282C (جداسازی شده از *V. vinifera* در سال ۲۰۰۹) از

در دمای پنج درجه سلسیوس ساعت جبه‌ها با ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 1×10^4 اسپور در میلی‌لیتر محلول ۰.۵٪، توئین ۸۰ تلقیح شدند. آزمایش در چهار تکرار انجام شد و هر تکرار حاوی نه واحد آزمایشی (جبه‌انگور) بود. تیمار شاهد فقط با سوسپانسیون اسپور بیمارگر و بدون مخمر تلقیح گردید. بعد از هفت روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس بروز پوسیدگی (درصد آلودگی) با استفاده از فرمول زیر مورد بررسی قرار گرفت (Vero *et al.*, 2002).

$$100 \times (\text{تعداد کل جبه‌ها} / \text{تعداد جبه‌های آلوده هر تیمار}) = \text{درصد آلودگی}$$

مکانیسم‌های بیوکنترلی

تولید ترکیبات فرار ضدقارچی

اثر ترکیبات فرار تولید شده مخمرهای با خاصیت ضد قارچی روی محیط کشت NYDB ارزیابی گردید. بدین صورت که در تشتک پتری حاوی NYBD یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت جوان قارچ بیمارگر کشت گردید و در تشتک پتری دیگری با کشت دو روزه بر روی محیط کشت جامد PDA مخمر منتخب مایه‌زنی گردید. سپس دو تشتک روبروی هم قرار گرفته و توسط پارافیلیم جهت جلوگیری از خروج ترکیبات فرار محکم پوشانده شدند (Podgórska *et al.*, 2022). در تیمار شاهد به جای مخمر از آب مقطر استفاده گردید. پس از ۱۰ روز نگهداری تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، قطر پرگنه قارچ بیمارگر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رشد بیمارگر توسط ترکیبات آلی فرار مخمر در مقایسه با شاهد محاسبه شد (Etebarian *et al.*, 2005). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

تولید آنزیم‌های خارج سلولی

توانایی جدایه‌های مخمر برای ترشح آنزیم‌های لیتیک (پروتئاز، پکتیناز و آمیلاز) که با فعالیت بیوکنترلی مخمرها مرتبط می‌باشد، با قرار دادن سه میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر (۱۰^۷ سلول در میلی‌لیتر) تهیه شده از کشت ۴۸

(NCBI Center for Biotechnology Information) ثبت گردید.

غربالگری مخمرها براساس مهار قارچ بوتریتیس

برای ارزیابی توانایی مخمرهای جداسازی شده از سطح میوه انگور از روش کشت متقابل استفاده گردید. بدین منظور یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از کشت جوان (پنج روزه) قارچ *B. cinerea* در یک طرف تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و در سمت دیگر مخمرهایی که به مدت ۴۸ ساعت بر روی محیط کشت NYDA (Nitrogen Yeast Dextrose agar) رشد کرده بودند، به صورت نواری کشت گردید. تشتک‌های پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند و سپس هاله بازدارندگی اندازه‌گیری گردید. آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت (Sanzani *et al.*, 2006). پس از اینکه پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد تمام تشتک پتری را پر کرد، میزان رشد قطری پرگنه اندازه‌گیری و در نهایت درصد کاهش رشد مسیلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر ارزیابی گردید (Etebarian *et al.*, 2005).

$$n = (a - b) / a \times 100$$

n = درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری

a = اندازه قطر پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری شاهد

b = اندازه قطر پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری تیمار

بررسی قابلیت بیوکنترلی مخمرها بر علیه کپک خاکستری انگور در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)

در این آزمایش جدایه‌هایی که در مهار رشد مسیلیوم‌های قارچ در کشت متقابل موثر واقع شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا جبه‌های انگور (رقم سفید بی‌دانه) به نحوی که دم جبه بر روی آن باقی بماند، از ساقه جدا گردیدند. زخم‌هایی به قطر قطر سه میلی‌متر روی جبه‌های انگور ایجاد گردید و سپس جبه‌ها به مدت پنج دقیقه درون سوسپانسیون مخمر با غلظت 1×10^9 میلی‌لیتر که با استفاده از لام هماسیتومتر تنظیم گردیده بود، غوطه‌ور شدند (Parafati *et al.*, 2015). بعد از ۲۴ ساعت نگهداری

مخمر تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. از آب سیب سترون به عنوان شاهد سالم استفاده گردید. پس از پایان دوره نگهداری، چاهک‌ها خالی شدند و با آب مقطر سترون شستشو داده شده و در دمای اتاق خشک شدند. لایه بیوفیلم تشکیل شده با محلول کریستال ویوله یک درصد (w/v) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و سپس با آب شسته شده و در دمای اتاق خشک شدند. میزان رنگ تثبیت شده در هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ شسته شد. میزان جذب نوری هر چاهک با دستگاه پاورویو میکروپلیت اسپکتوفوتومتر مدل ایکس اس ۲ ساخت شرکت بیوتک آمریکا (PowerWave XS2 Microplate spectrophotometer, Bio-Tek Inc, USA) در طول موج ۶۲۰ نانومتر ارزیابی گردید. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تشکیل بیوفیلم در چاهک‌هایی که میزان جذب از (O.D. > 0.1) بالاتر بود، مثبت در نظر گرفته شد (Ruzicka *et al.*, 2007).

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از محیط کشت کروم آزارول سولفات آگار (CAS) استفاده شد (Schwyn & Neilands, 1987). مخمرها بر روی محیط کشت شدند و به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ارزیابی تولید سیدروفور به صورت کیفی و با تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مشخص گردید (Baakza *et al.*, 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه یا چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1.3) و مقایسه میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری احتمال یک درصد صورت گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Excel ver. 2010) ترسیم شدند. همبستگی بین نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS (26) ارزیابی شد.

ساعت، روی محیط جامد حاوی سوبستراهای آنزیمی خاص ارزیابی شد.

برای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim Milk agar (Casein-peptone 5gr + Dextrose 1 gr + Yeast extract 2.5 gr + skimmed milk powder 28 + agar 15gr) استفاده شد. تشکیل یک هاله روشن در اطراف کلنی‌ها پس از نگهداری به مدت پنج روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، نشان دهنده فعالیت آنزیمی بود (Strauss *et al.*, 2001).

فعالیت آمیلاز با استفاده از یک محیط سترون انتخابی حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم نشاسته و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر و با pH برابر با ۵ ارزیابی شد. پس از پنج روز نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سطح محیط با ۱۰۰ میکرولیتر محلول لوگول (محلول یدید پتاسیم ۲٪) پوشانده شدند و فعالیت آمیلاز با وجود یک هاله لزج روشن در اطراف کلنی‌ها تشخیص داده شد، در حالی که بقیه محیط بنفش باقی ماند، زیرا محلول رنگی، نشاسته غیرهیدرولیز شده را رنگ آمیزی می‌کند (Pretscher *et al.*, 2018).

فعالیت پکتینولیتیک (لیزکنندگی پکتین) با استفاده از یک محیط انتخابی حاوی ۱۲/۵ گرم پلی گالاکتورونیک اسید، ۶/۸ گرم فسفات پتاسیم، ۶/۷ گرم YNB (Yeast Nitrogen Base)، ۱۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر مورد آزمایش قرار گرفت. پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز، کلنی‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس با ۰/۱ درصد (w/v) روتینوم قرمز رنگ آمیزی شدند. کلنی‌هایی که هاله بنفش را نشان دادند مثبت تلقی شدند (Strauss *et al.*, 2001).

تشکیل بیوفیلم

توانایی تشکیل بیوفیلم بر اساس آزمون چسبندگی توصیف شده توسط Ruzicka *et al.* (2007) ارزیابی گردید. روش کار به طور خلاصه بدین صورت می‌باشد که از کشت دو روزه مخمر، سوسپانسیونی با غلظت 1×10^8 تهیه گردید. ۱۸۰ میکرولیتر آب سیب سترون داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی ریخته شد و با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

نتایج

شناسایی مولکولی مخمرها

در مجموع ۶۷ جدایه از میوه‌های انگور جداسازی و شناسایی گردید. بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی در ناحیه (D1/D2) با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI GeneBank، ۲۱ گونه مخمری شناسایی گردید (جدول ۱).

این ۲۱ گونه مخمری جداسازی شده متعلق به ۱۲ جنس شامل جنس‌های *Aureobasidium* با ۱۲ جدایه، *Rhodotorula* با ۱۱ جدایه، *Candida* با نه جدایه، *Filobasidium* با هفت جدایه، *Metschnikowia* با هفت

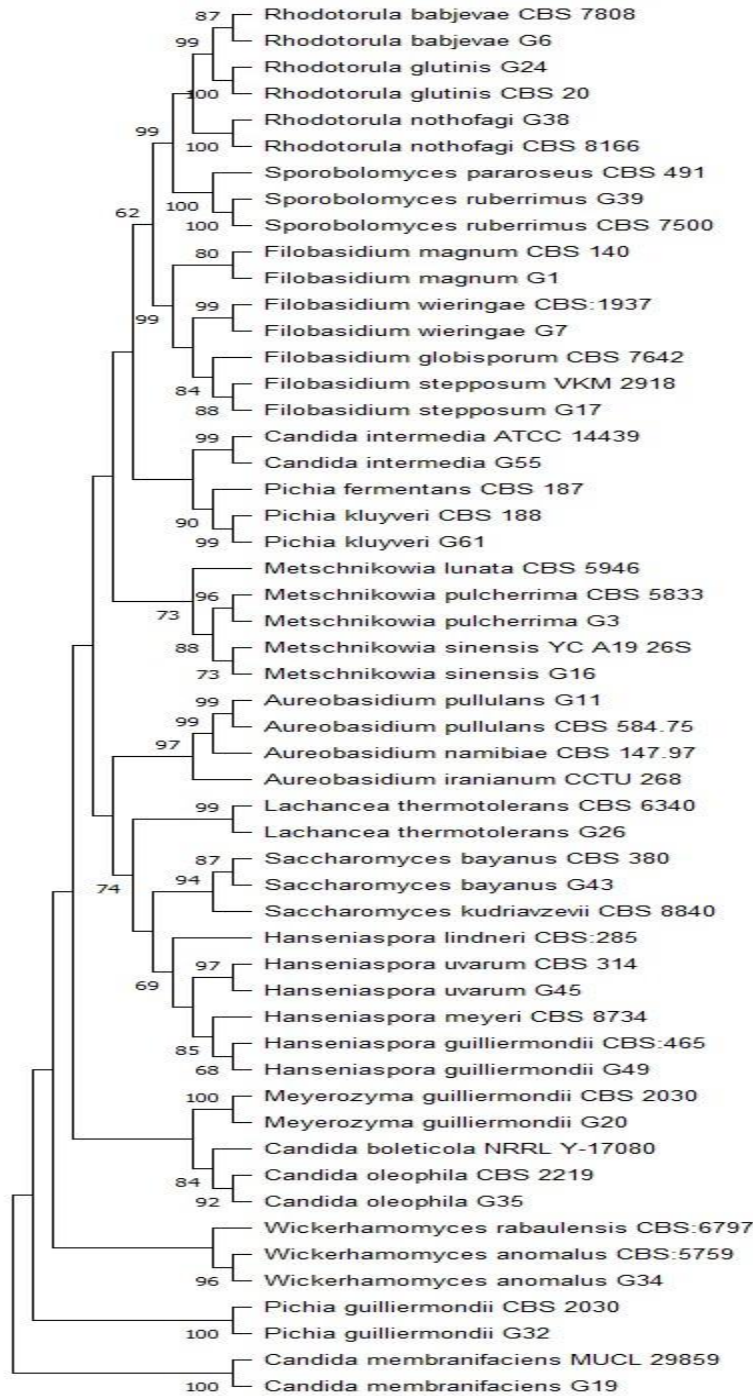
جدایه، *Meyerozyma* با شش جدایه، *Hanseniaspora* با چهار جدایه، *Wickerhamomyces* با دو جدایه، *Sporobolomyces* با دو جدایه، *Pichia* با چهار جدایه، *Lachancea* با دو جدایه و *Saccharomyces* با یک جدایه می‌باشد. شبه مخمر *Aureobasidium pullulanse* با بیشترین جدایه، بیشترین فراوانی را در بین گونه‌های جداسازی شده داشت که می‌توان گفت گونه غالب فلور انگور در این بررسی می‌باشد. *Saccharomyces bayanus* نیز با یک جدایه، کمترین فراوانی را در بین گونه‌ها داشت.

جدول ۱: جدایه‌های شناسایی شده بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی آنالیز توالی‌یابی ناحیه D1/D2 زیر واحد بزرگ ریپوزومی

Table 1. Identification of yeast isolates based on morphological characteristics sequencing analysis of the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene

Species	Strain	microscopic characteristics	macroscopic characteristics
<i>Aureobasidium pullulans</i>	G11, G23, G2, G56, G63, G29, G15, G50, G14, G13, G36, G33	One-celled, and variable in shape and size, Hyphae are hyaline, smooth, and thinwalled, with transverse septa.	Yeast-like colonies covered with a slimy mass of spores. Older colonies change to black due to chlamyospore production
<i>Candida membranifaciens</i>	G59, G57, G46, G31, G19,	The cells are ovoid, and occur singly and in clusters	Colony is off-white to chalky, dull, powdery, dry and partly wrinkled with a hyphal border
<i>Candida intermedia</i>	G55, G58	The cells are ovoid, occur singly and in pairs	Colony is white to cream colored, smooth to slightly wrinkled and soft
<i>Candida oleophila</i>	G35 G47	a few cells are spherical, but most are ovoid or long-ovoid to elongate, occur singly, in pairs and in short branched and unbranched chains	growth is off-white, dull, both smooth and delicately wrinkled and the margin is usually entire with a few tufts of pseudohyphal growth
<i>Filobasidium stepposum</i>	G17, G48, G18	Cells spherical to elongated oval, budding is single polar	Pinkish white colony, flat
<i>Filobasidium magnum</i>	G1, G22	Cells usually spherical, budding is single polar	Colony is pinkish white, smothy
<i>Filobasidium wieringae</i>	G7, G60	Cells spherical to elongated oval, budding is single polar	Colony is white to pink, smoth
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	G4, G49	The cells are apiculate, ovoid or elongate, or occasionally longer, and single or in pairs	Colony is white to cream colored, smooth, glossy,
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	G10, G45	The cells are apiculate, spherical to ovoid, or	Colony is white to creamy, smooth, glossy, and slightly

		elongate, and occur singly or in pairs.	raised at the center
<i>Lachancea thermotolerans</i>	G27, G26	the cells are spherical to ellipsoidal and occur singly, in pairs or in short clusters	Growth is butyrous, glossy and cream colored, Pseudohyphae may be formed
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	G8, G51, G52, G40, G20, G30	the cells are ovoid to elongate and occur singly, in pairs, or in short chains	Colony is smooth to wrinkled and tannish–white in color
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	G9, G67, G3, G53	the cells are globose to ellipsoid, multilateral budding	Colony is cream colored, or if pulcherrimin pigment is produced, reddish–brown the surface is smooth
<i>Metschnikowia sinensis</i>	G16, G21, G41	Cells are globose to ovoid, occur singly or in pairs, and show multilateral budding. Spherical chlamydo-spore	colonies are butyrous, brownish–cream, smooth
<i>Pichia kluyveri</i>	G61, G62	cells are Spherical, moderately well branched pseudohyphae	Colony is tannish–white, dull, sometimes almost powdery, Margins are entire to finely serrate.
<i>Pichia guilliermondii</i>	G32, G5	Cells are Spherical to ovoid, bipolar budding	Dark pink and smooth colony
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	G37, G38, G12	cells are subglobose to ellipsoid and budding is predominantly polar	Streak cultures are pale orange, flat, smooth,
<i>Rhodotorula babjevae</i>	G25, G6, G28	cells are subglobose to ellipsoid and budding is predominantly polar	Colonys are pale orange, smooth,
<i>Rhodotorula glutinis</i>	G44, G66, G24, G42, G54	cells are Spherical, Pseudohyphae are usually absent or poorly developed	The streak culture is coral–red to salmon or slightly orange, smooth
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	G64, G39	The cells are ovoid or elongate, Buds are ovoid or reniform.	the colony is whitish or orange, slightly wrinkled, flat with a lobate margin
<i>Saccharomyces bayanus</i>	G43	the cells are globose, ovoid or elongate, and usually occur singly, but may occur in groups	Colony is butyrous and light cream colored. The surface is smooth
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	G65, G34	the cells are spherical to elongate, and occur singly, in pairs or in small clusters	Growth is butyrous and faintly tans in color.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده در مقیاس 0.05 با استفاده از روش نزدیکترین پیوست همسایه براساس توالی ناحیه D1/D2 زیرواحد بزرگ DNA ریوزومی.

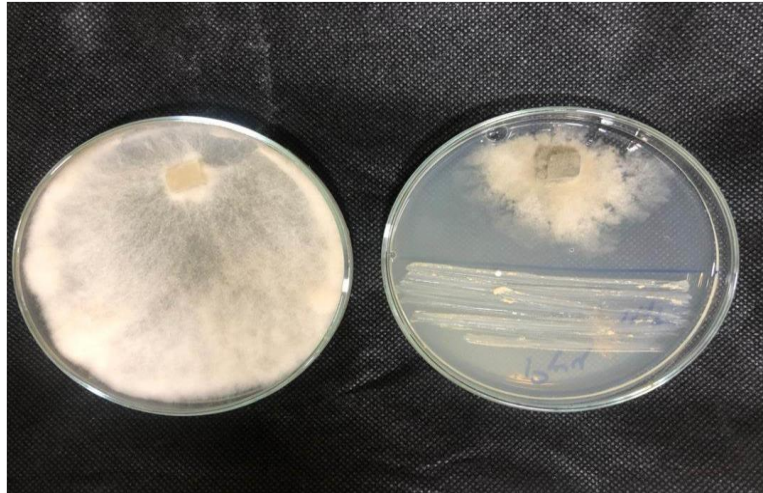
Fig. 1: Phylogenetic Neighbor-joining based tree on the D1/D2 rDNA region sequences in the scale of 0.05

C. membranifaciens (G46, G19) *P. kluyveri*
M. pulcherrima (G9, G53) *H. uvarum* (G10, G45)،
Rh. و *Meyerozyma guilliermondii* (G8, G30, G52)
glutinis (G66, G54) بودند، قادر به ایجاد هاله بازدارنده

غربالگری مخمرها براساس مهار قارچ بوتریتیس در
 شرایط آزمایشگاه
 از میان ۶۷ جدایه مخمری، ۱۶ جدایه که متعلق به
 گونه‌های (*A. pullulans* (G11, G63, G33, G36)، *A.* (G61)

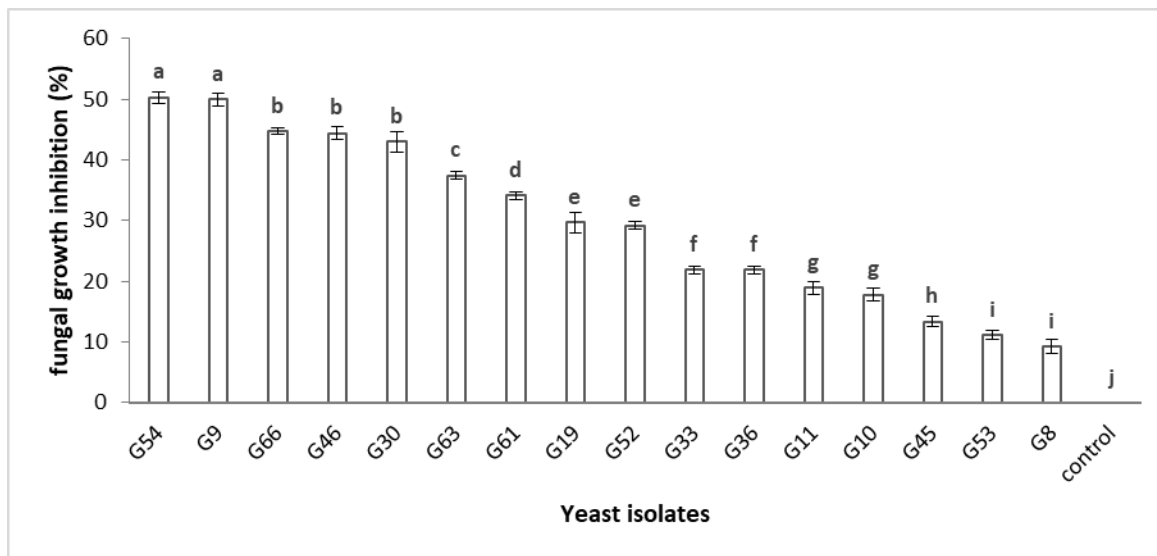
شاهد برابر با ۹ سانتیمتر بود. جدایه‌های G9 و G54 به ترتیب با میانگین بازدارندگی برابر با ۵۰/۳۳ و ۵۰/۰ درصد، بیشترین بازدارندگی از ریشه *B. cinerea* ایجاد کردند (شکل ۱). در پایان ۱۶ جدایه برتر برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

در برابر *B. cinerea* بودند و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (جدول ۲). در بین ۱۶ جدایه آنتاگونیست در سطح احتمال یک درصد تفاوت بسیار معنی‌داری از نظر مهار رشد قارچ بوتریتیس توسط ترکیبات غیرفرار مخمر (آنتی بیوز) وجود دارد. قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری



شکل ۲- تاثیر مهارکنندگی جدایه G9 مخمر آنتاگونیست *Metschnikowia pulcherrima* در تقابل با بیمارگر *Botrytis cinerea* در آزمون کشت متقابل پس از هفت روز نگهداری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی.

Fig. 2. The inhibitory effect of antagonistic yeast isolate *Metschnikowia pulcherrima* G9 against the pathogen *Botrytis cinerea* in the dual culture test after 7 days incubation 26 °C in dark conditions.



شکل ۳- درصد بازدارندگی بازدارندگی ترکیبات غیرفرار جدایه‌های مخمری علیه *Botrytis cinerea* در کشت متقابل پس از هفت روز، ستون‌های دارای حرف مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0.05$). تفاوت معنی‌داری ندارند.

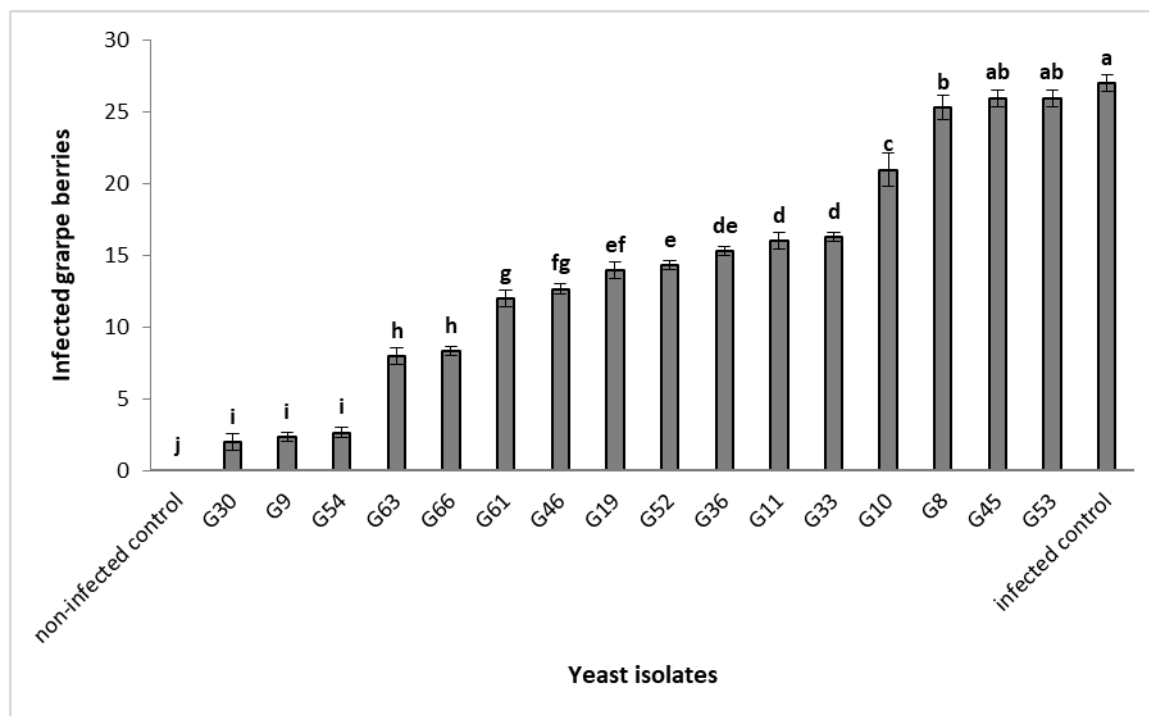
Fig. 3. Comparison between the percentage inhibition of yeast isolates against *Botrytis cinerea* in dual culture assays after seven days. The mean diameter of fungal colony in different treatments was compared using nDuncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.

جدایه G30، G9 و G54 بیشترین فعالیت بیوکنترلی را بر علیه *B. cinerea* از خود نشان دادند. این جدایه‌ها به ترتیب ۹۲/۵۹، ۹۱/۳۷ و ۹۰/۱۵ درصد به‌روز کپک خاکستری را کاهش دادند (شکل ۴).

بررسی قابلیت جدایه‌های مخمری منتخب در مهار

کپک خاکستری میوه انگور در شرایط *In vitro*

بین کارایی جدایه‌های مخمر از نظر مهار کپک خاکستری روی جبهه‌های انگور تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود (جدول ۲). از ۱۶ جدایه مخمر بررسی شده سه



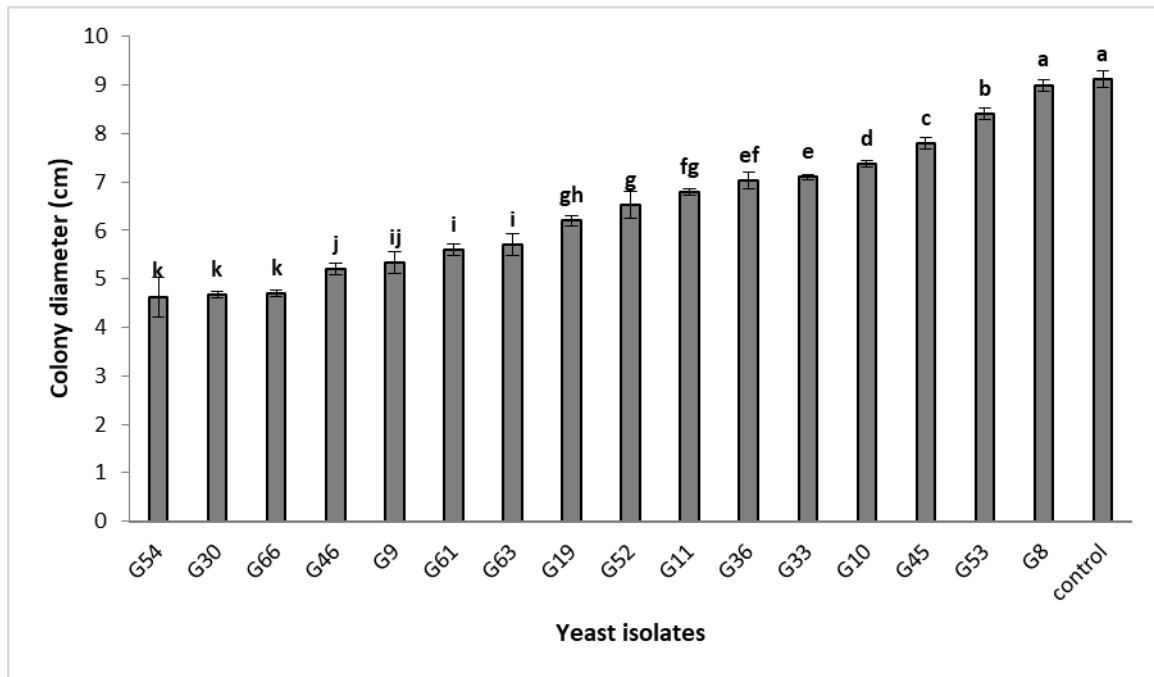
شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر جدایه‌های مخمری بر میزان شیوع کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* در جبهه‌های انگور
Fig. 4. The average effect of yeast isolates on the incidence of the grapes grey rot caused by *Botrytis cinerea*

قادر به مهار معنی‌دار بیمارگر شدند و با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. جدایه‌های *M. guilliermondii* (G30) و *R. glutinis* (G66) به ترتیب با ۴۹/۲۹، ۴۸/۸۵ و ۴۸/۵۲ درصد مهار بیمارگر، بیشترین تاثیر را در مهار رشد *B. cinerea* از خود نشان دادند (شکل ۵).

بررسی سایر مکانیسم‌های بیوکنترلی

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

از نظر مهار پرگنه قارچ بوتریتیس توسط ترکیبات فرار مخمر، بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد (جدول ۲). بر اساس نتایج، ترکیبات فرار ۲ جدایه هر ۱۶ جدایه به جز جدایه *M. guilliermondii* (G8)



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین ترکیبات فرار تولید شده به وسیله جدایه‌های مخمیری بر رشد پرگنه *Botrytis cinerea* پس از ۱۰ روز، ستون‌های دارای حرف مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 5. Comparison between the inhibiting effects of volatile compounds released by yeast isolates on growth of *Botrytis cinerea* after ten days. The mean diameters of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.

جدول ۲. همبستگی پیرسون ($P < 0.01$) بین فعالیت ضد قارچی ترکیبات غیر فرار مخمر (Non-VOC)، فعالیت ضد قارچی ترکیب فرار مخمر (VOC) و قابلیت مخمر در کنترل بیماری کپک خاکستری روی جبه انگور.

Table 2. Pearson correlations ($P < 0.01$) among antifungal activity of yeast non-volatile compound (non-VOC), antifungal activity of yeast volatile compound (VOC), and grey mould disease control on grape.

	grape grey mould disease inhibition	antifungal activity of Non-VOC	antifungal activity of VOC
grape grey mould disease control	1	0.936**	0.928**
antifungal activity of Non-VOC	0.936**	1	0.959**
antifungal activity of VOC	0.928**	0.959**	1

**همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۱

**Correlation is significant at the 0.01 level.

مهار پوسیدگی خاکستری روی انگور بیشترین تاثیر را نشان داده بودند، قادر به تولید پروتاز و آمیلاز بودند. جدایه‌های G19 و G46 از گونه *C. membranifaciens* و جدایه‌های G53 و G9 از گونه *M. pulcherrima* قادر به تولید هیچ کدام از آنزیم‌های مورد بررسی، نبودند (جدول ۳).

تولید آنزیم‌های خارج سلولی

از بین جدایه‌های بررسی شده دو جدایه G61 و G36 که به ترتیب متعلق به گونه‌های *P. kluyveri* و *A. pullulans* بودند قادر به تولید هر سه آنزیم پروتاز، پکتیناز و آمیلاز بودند. سه جدایه برتر (*M. guilliermondii* (G30) و *M. pulcherrima* (G9) و *Rh. glutinis* (G54) که در

جدول ۳- تولید سیدروفور در محیط CAS، تشکیل بیوفیلم توسط مخمرها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و پروفایل آنزیم‌های ترشح شده توسط جدایه‌های مخمرها

Table 3. Siderophore production in CAS medium, biofilm formation by yeasts at 25 °C and enzymatic profile of yeast strains

Isolates	Protease	Pectinase	Amylase	Siderophore Production	Biofilm formation
<i>pullulans</i> (G11) <i>Aureobasidium</i>	+	+	-	+	-
<i>pullulans</i> (G63) <i>Aureobasidium</i>	+	-	+	+	-
<i>pullulans</i> (G33) <i>Aureobasidium</i>	+	+	-	-	+
<i>pullulans</i> (G36) <i>Aureobasidium</i>	+	+	+	+	-
<i>Candida membranifaciens</i> (G46)	-	-	-	-	-
<i>Candida membranifaciens</i> (G19)	-	-	-	+	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (G10)	+	-	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (G45)	+	-	-	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (G9)	+	-	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (G53)	-	-	-	-	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (G8)	+	+	-	+	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (G52)	-	+	+	-	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (G30)	+	-	+	-	+
<i>Pichia kluyveri</i> (G61)	+	+	+	-	+
<i>Rhodotorula glutinis</i> (G54)	+	-	+	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i> (G66)	+	-	+	+	-

طبیعی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بر روی میوه انگور، امکان استفاده از آن‌ها را در کنترل زیستی بیمارگرها فراهم می‌کند. در حال حاضر کنترل زیستی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی به منظور کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات در نظر گرفته می‌شود (Pusey *et al.*, 2009).

تعداد قابل توجهی گزارش از فعالیت آنتاگونیستی چندین سویه از گونه‌های مخمری در برابر قارچ‌های بیمارگر گیاهی، موجود می‌باشد (Zhang *et al.*, 2020; Di Canito *et al.*, 2021). با این وجود تعداد مخمرهای تجاری موجود در بازار برای استفاده به‌عنوان قارچ‌کش علیه قارچ‌های بیمارزای گیاهی در مراحل قبل و یا پس از برداشت محدود می‌باشد (Palmieri *et al.*, 2022). بر اساس داده‌های موجود در پایگاه داده آفت کش‌های اتحادیه اروپا تا ۱۳ ژانویه ۲۰۲۳ فقط دو محصول تجاری مبتنی بر مخمر وجود دارد. این محصولات شامل *Julieta*® (*Sac.cerevisiae*LAS02) و *Shemer*® (Met.)

تولید بیوفیلم

بر اساس نتایج (جدول ۳) مشخص گردید که ۹ جدایه از ۱۶ جدایه قادر به تشکیل تولید بیوفیلم و ایجاد چسبندگی به دیواره چاهک‌ها (O.D. > 0.1) بودند که شامل جدایه‌های G30، G52، G53، G59، G45، G10، G33، G66 و G61 می‌باشند.

تولید سیدروفور

در ارزیابی تولید سیدروفور با استفاده از محیط CAS، تشکیل هاله‌های نارنجی در اطراف کلنی‌های جدایه‌های G30، G52، G53، G59، G45، G10، G33، G66 و G61 مشاهده گردید (جدول ۳).

بحث

امروزه، تقاضای فزاینده‌ای برای جایگزینی شیوه‌های دوستدار محیط زیست در اکوسیستم‌های کشاورزی با هدف کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی، وجود دارد (Wilson & Wisniewski, 1989; Pertot *et al.*, 2017).

و *B. cinerea* در شرایط انبار موثر می‌باشد (Mokhtarnejad, 2015).

مخمرهای آنتاگونیست دارای مکانیسم‌های کنترلی متعددی مانند رقابت (کلونیزه کردن سطح میوه و ایجاد رقابت بر سر فضا و غذا)، آنتی‌بیوز و تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی می‌باشند (Punja & Utkhede, 2003; Tian *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2012). یکی از مکانیسم‌هایی که مخمرها به واسطه آن موجب کاهش رشد قارچ بیمارگر می‌شوند تولید ترکیبات فرار می‌باشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته، مشخص شده است که مخمرها چندین گروه از متابولیت‌هایی با خاصیت مهار رشد قارچ تولید می‌کنند که عبارتند از الکل‌ها، استرها، آلکان‌ها، آلکن‌ها، آرن‌ها، اسیدهای آلی، کتون‌ها، آلدئیدها و آمین‌ها (Contarino *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2011). به نظر می‌رسد محل اصلی عمل این ترکیبات در غشای پلاسمایی است، جایی که تجمع آن‌ها می‌تواند بر سازماندهی و پایداری دو لایه لیپیدی تأثیر بگذارد. الکل‌ها نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند و انتشار غیرفعال یون‌ها و متابولیت‌ها را تسریع می‌کنند (Fialho *et al.*, 2010). بر اساس نتایج، میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر توسط جدایه‌های مختلف مخمری متفاوت بود. چندین جدایه بازدارندگی بالای ۵۰ درصد از خود نشان دادند. به طور کلی جدایه‌های متعلق به گونه‌های *Rh. glutinis* و *A. pullulans* قوی‌ترین جدایه‌ها با این مکانیسم کنترلی بودند. مطالعات نشان داده که مخمر *M. pulcherrima* با تولید ترکیبات فرار به طور قابل توجهی از جوانه‌زنی اسپور قارچ *Penicillium* جلوگیری می‌کند (Sipiczki, 2006). مواد فرار تولید شده توسط *A. pullulans* در کاهش رشد و بیماری‌زایی *B. cinerea*، *P. digitatum*، *P. expansum*، *C. acutatum* و *P. italicum* هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در گیاهان ثابت شده است (Di Francesco *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر همبستگی مثبت معنی‌داری بین فعالیت ضد قارچی ترکیبات فرار و غیرفرار مخمرها با میزان مهار بیماری کپک خاکستری روی حبه‌های انگور مشاهده شد.

می‌باشند که هر دو اختصاصاً *B. cinerea* را مورد هدف قرار می‌دهند (Esteves *et al.*, 2023).

در مطالعه حاضر ۶۷ جدایه مخمر جداسازی گردید و قابلیت بیوکنترلی ۱۶ جدایه برتر مورد بررسی قرار گرفت. وجود تنوع بالا در مخمرهای فلور انگور (۲۱ گونه و ۱۱ جنس) و معرفی مخمرهای اپی‌فیت با قابلیت کنترل زیستی به دلیل جداسازی از اکوسیستم خود انگور که موجب سازگاری با شرایط محیطی و در نتیجه پایداری بیشتر و کنترل موثر بیمارگرهای انگور می‌شوند، بسیار ارزشمند می‌باشد (Pretscher *et al.*, 2018; Pereyra *et al.*, 2021). کاربرد جدایه‌های مخمری منتخب روی حبه های انگور نشان داد که از بین آن‌ها سه جدایه G9، G30 و G54 بیشترین قابلیت را داشتند. به طور کلی این جدایه‌ها به ترتیب متعلق به گونه‌های *M. pulcherrima*، *M. guilliermondii* و *R. glutini* بودند. بسیاری از گونه‌های جداسازی شده در این بررسی شامل آنتاگونیست‌هایی می‌باشد که قبلاً به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی انگور گزارش شده است (Bueso Cordero *et al.*, 2017; Pretscher *et al.*, 2018; Reyes-bravo *et al.*, 2019).

اسپارادو و همکاران در سال ۲۰۰۲ چهار جدایه از مخمر *M. pulcherrima* را علیه *B. cinerea*، عوامل بیماری‌زای پس از برداشت سیب و انگور به کار بردند که کنترلی مشابه تیابندازول حاصل شد (Spadaro *et al.*, 2002). به طور مشابه مخمر *R. glutinis* جدا شده از ریزوسفر، تولید یک سیدروفور (siderophore) به نام اسید رودوتورولیک می‌کند، که آهن فریک را جدا می‌کند، در نتیجه جوانه‌زنی اسپور قارچ *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* را مهار می‌کند (Calvente *et al.*, 2005; 1999). بر اساس مطالعه انجام شده بر روی مخمرهای جداسازی شده از محیط‌های افراطی یا فراترمال (extreme environment)، مخمر *M. guilliermondii* در کنترل پوسیدگی ناشی از *P. expansum*

مخمر *Metschnikowia andauensis* و تولید آمیلاز رابطه مستقیمی وجود دارد (Horváth et al., 2021).

در بررسی حاضر ۹ جدایه توانایی تولید بیوفیلیم از خود نشان دادند. در مطالعات متعددی توانایی تشکیل بیوفیلیم در مخمرهای *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* و *A. pullulans* گزارش شده است (Giobbe et al., 2007; Gattlen et al., 2011; Klein & Kupper, 2018; Zajc et al., 2020). در واقع تولید بیوفیلیم به چسبیدن، کلونیزه کردن و رشد آنتاگونیست روی میوه کمک می‌کند و موجب افزایش توانایی آنتاگونیست برای جذب مواد غذایی می‌گردد (Yang et al., 2021). این ویژگی به توانایی سلول‌ها در چسبیدن به سطوح مختلف بستگی دارد. این چسبندگی توسط پروتئینی به نام adhesines ایجاد می‌شود که به آمینو اسیدها و باقیمانده قند سایر سلول‌ها می‌چسبند و تولید سد مکانیکی بین زخم و بیمارگر می‌کند (Di Francesco et al., 2016). نتایج این بررسی نشان داد که نه جدایه مخمری که دارای قابلیت بیوکنترلی بر علیه *B. cinerea* بودند، قادر به تولید بیوفیلیم نیز بودند.

تولید سیدروفور در هشت جدایه مشاهده گردید که دو جدایه *M. pulcherrima* (G9) و *Rh. Glutinis*(G54) که در تست‌های *In vitro* موثرترین جدایه‌ها در مهار رشد قارچ بودند نیز در بین آن‌ها هستند. گزارش شده است سویه‌هایی از مخمر *A. pullulans* قادر به تولید سیدروفور می‌باشد (Wang et al., 2019). این جدایه‌های مخمری تولید مولکول‌هایی از نوع hydroxamate می‌کنند که زمانیکه بر روی محیط حاوی غلظت پایین آهن رشد می‌کنند، همانند سیدروفور عمل می‌کنند (Saravanakumar et al., 2008). دانه‌های انگور حاوی مقدار کمی یون آهن می‌باشد (Nally et al., 2015) بنابراین مخمرهای موثر با تولید سیدروفور در محل زخم و از دسترس خارج نمودن عنصر آهن که ضروری برای جوانه زدن کنیدی‌های قارچ *B. cinerea* می‌باشد، از ایجاد آلودگی جلوگیری می‌نمایند (Sansone et al., 2005).

در تحقیق حاضر، ۱۲ جدایه قادر به تولید پروتئاز، ۶ جدایه قادر به تولید پکتیناز و ۱۲ جدایه قادر به تولید آمیلاز بودند. در واقع یکی دیگر از مکانیسم‌های بیوکنترلی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد. مشخص شده است که پکتیناز موجب فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه و القای مقاومت می‌گردد که ممکن است به دلیل انتشار قطعات پکتینی که احتمالاً به عنوان محرک‌های داخلی عمل می‌کنند باشد. این آنزیم در جلوگیری آلوده شدن گیاه به بیمارگرها و در نتیجه تقویت رشد گیاه نقش دارد (Reetha et al., 2014). بر اساس نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ انجام شده، تحریک تولید پکتیناز توسط مخمر *S. cerevisiae* موجب افزایش قدرت کنترل کنندگی آن در مقابل کپک‌های پس از برداشت سیب و مرکبات گردیده است (El Gamal et al., 2018).

بطور قابل توجهی هر سه جدایه برتر *M. pulcherrima* (G9)، *R. Glutinis*(G54) و *M. guilliermondii* (G30) قادر به تولید پروتئاز و آمیلاز بودند. اگرچه پروتئاز یک فاکتور کنترلی مهم در قارچ‌های بیمارگر حشرات و مایکوپارازیت‌ها به حساب می‌آید اما نقش آن در قابلیت بیوکنترلی مخمرها به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. ترکیب alkaline serine protease Alp5 ترشح شده توسط مخمر *A. pullulans* جوانه‌زنی اسپور و طول لوله تندش را در *Penicillium expansum*، *Monillia fruticola* و *B. cinerea* کاهش داد و با آزمایش بر روی سیب مشخص گردید که میزان بازدارندگی از رشد این قارچ‌ها به جمعیت مخمر بستگی دارد (Banani et al., 2014; Zhang et al., 2012). همچنین فعالیت پروتئازی در جنس‌های *Pichia*، *Wickerhamomyces*، *Metschnikowia* (Pretscher et al., 2018). علاوه بر این عوامل کنترل زیستی با تولید آمیلاز و کلونیزه کردن محیط خود، در دسترس بودن فضا و منابع غذایی را برای بیمارگرهای گیاهی محدود می‌کند که باعث مهار بیمارگرها و در نتیجه کاهش خسارت ناشی از بیماری‌های گیاهی می‌شود. نتایج یک مطالعه نشان داده است که بین فعالیت آنتاگونیستی

ضروری می‌باشد. فعالیت بازدارندگی جدایه‌های مخمری به واسطه تولید متابولیت‌های ضد میکروبی است که برای بیمارگرهای قارچی کشنده و محدود کننده رشد می‌باشد و نشان دهنده پتانسیل بیوکنترلی آنهاست (Di Francesco *et al.*, 2021). لازم است مطالعات بیشتری برای بررسی نقش عوامل محیطی مانند pH، دما و منابع کربنی که انتظار می‌رود بر روی خواص بیوکنترلی مخمرها موثر باشد، صورت پذیرد. این مطالعه نشان می‌دهد که مخمرهای اپی‌فیت انگور می‌توانند به عنوان عامل بیوکنترل قارچ بیمارگر *B. cinerea* در مرحله پس از برداشت انگور مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از شماره طرح ۴۰۰۰۵۴۲ انجام شده است.

بر اساس مطالعه حاضر، جدایه‌های مخمری G9 و G54 متعلق به دو گونه *M. pulcherrima* و *Rh. glutinis* (احتمالا با چهار مکانیسم آنتی‌بیوز و ترشح پروتئاز، آمیلاز و سیدروفور) و جدایه G30 متعلق به گونه *M. guilliermondii* (به احتمال با سه مکانیسم آنتی‌بیوز، پروتئاز و آمیلاز)، گزینه‌های مناسبی در جهت استفاده به عنوان عوامل بیوکنترلی و کاهش استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی می‌باشند. با این حال مکانیسم‌های بیوکنترلی مخمرها بر علیه بیمارگرهای قارچی نیاز به مطالعه بیشتری دارد، زیرا همیشه نتایج حاصل از شرایط *In vitro* به شرایط *In vivo* و به ویژه شرایط مزرعه ای قابل تعمیم نمی‌باشد. هرچند تولید متابولیت‌های سمی خطرناک (برای انسان) توسط مخمرها گزارش نشده است (Kowalska *et al.*, 2022) با این وجود برای اینکه از طرف سازمان‌های نظارتی به عنوان یک روش ارزشمند برای کاربرد در مقیاس وسیع در نظر گرفته شوند، آگاهی کامل از مکانیسم‌های بیوکنترلی آنها

References

- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2014. Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *International Journal of Food Microbiology*, 182– 183:1–8.
- Baakza, A., Vala, A.K., Dave, B.P. & Dube, H.C. 2004. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311: 1–9.
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L. & Restuccia, C. 2019. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82: 70–74
- Di Canito, A., Mateo-vargas, M.A., Mazzieri, M., Cantoral, J., Foschino, R. & Cordero-Bueso, G. 2021. The role of yeasts as biocontrol agents for pathogenic fungi on postharvest grapes: a review. *Foods*, 10: 1–15.
- Di Francesco, A., Di Foggia, M., Corbetta, M., Baldo, D., Ratti, C. & Baraldi, E. 2021. Biocontrol activity and plant growth promotion exerted by *Aureobasidium pullulans* strains. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1233–1244.
- Di Francesco, A., Martini, C., Mari, M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: How many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*, 145: 711–717.
- Droby, S., Lschinski, S., Cohen, L., Daus, A., Chand-Goyal, T., Eckert, J.W. & Manulis, S. 1999. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biological Control*, 16: 27–34.
- Nadia, G., Sherien, M.M., Atalla, El-mougy, N.S. & Abdel-Kader, M.M. 2018. Production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* and its application as biocontrol agent against navel orange and apple fruits decay. *Bioscience Research*, 2218–3973.
- Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C. & Sayler, R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 51: 591–598.
- Elshafie, H.S., Caputo, L., De Martino, L., Grul'ová, D., Zheljzkov, V.Z., De Feo, V. & Camele, I. 2020. Biological investigations of essential oils extracted from three *Juniperus* species and evaluation of their antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. *Journal of Applied Microbiology*, 129: 1261–1271.
- Esteves, M., Lage P., Sousa, J., Centeno, F., Teixeira, M.F., Tenreiro, R. & Mendes-Ferreira, A. 2023. Biocontrol of wine yeasts against four grape phytopathogenic fungi disclosed by time-course monitoring of inhibitory activates. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1146065.

- Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F. & Pascholati S.F. 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 925–932.
- Gattlen, J., Zinn, M., Guimond, S., Körner, E., Amberg, C. & Mauclair, L. 2011. Biofilm formation by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: process, repeatability and cell attachment in a continuous biofilm reactor. *Biofouling*, 27: 979–991.
- Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V.L., Budroni, M. & Migheli, Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Reserch*, 7: 1389–1398.
- Grzegorzczak, M., Szalewicz, A., Żarowska, B., Połomska, X., Wątopek, W., Wojtatowicz, M. & Drobnoustroje, w. 2015. biologicznej ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Scientific Biotechnology*, 14: 19–42.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H. & Huang, H.C. 2011. Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101: 859–869.
- Horváth, E., Dályai, L., Szabó, E., Barna, T., Kalmár, L., Posta, J., Sipiczki, M., Csoma, H. & Ida Miklós. 2021. The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors. *Nature Profilo*, 11: 10593.
- Kowalska, J., Krzymińska, J. & Tyburski, J. 2022. Yeasts as a potential biological agent in plant disease protection and yield improvement – A short review. *Agriculture*, 12(9): 1404.
- Kwasiborski, A., Bajji, M., Renaut, J., Delaplace, P. & Jijakli, M.H. 2014. Identification of metabolic pathways expressed by *Pichia anomala* Kh6 in the presence of the pathogen *Botrytis cinerea* on apple: new possible targets for biocontrol improvement, *PLoS ONE* 9(3): e91434.
- La Spada, F., Aloï, F., Coniglione, M., Pane, A. & Cacciola, S.O. 2021. Natural biostimulants elicit plant immune system in an integrated management strategy of the postharvest green mold of orange fruits incited by *Penicillium digitatum*. *Front Plant Science*, 12: 1149.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M. & Sampaio, P. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84: 313–322.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. 2013. A review, Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal disease control. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 153–160.
- Mokhtarnejad, I. 2015. Investigating of biodiversity and phylogeny of yeasts in the soils of Lake Urmia and the biological control of grape cluster diseases using species of the genus *Pichia*. pp. 187
- Moraes Bazioli, J.M., Belinato, J.R., Costa, J.H., Akiyama, D.Y., de Pontes, J.G.M., Kupper, K.C., Augusto, F., de Carvalho, J.E. & Fill, T.P. 2019. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins*, 11: 460.
- Nally, M.C. Pesce, V.M. Maturano, Y.P. Muñoz, C.J. Combina, M. Toro, M.E. de Figueroa, L.C. & Vazquez, F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64: 40–48.
- Nally, M., Pesce, V., Maturano, Y., Assaf, L.R., Toro, M., de Figueroa, L.C. & Vazquez, F. 2015. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*, 204: 91–100.
- Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F. & Castoria, R. 2022 Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae*, 8: 577.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. & Cirvilleri, G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47: 85–92.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. & Cirvilleri, G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47: 85–92.
- Pereyra, M.M., Díaz, M.A., Soliz-Santander, F.F., Poehlein, A., Meinhardt, F. & Daniel, R. 2021. Screening methods for isolation of biocontrol *Epiphytic* yeasts against *Penicillium digitatum* in lemons. *Journal of Fungi*, 7: 166.
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V. & Mugnai, L. 2017. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97: 85–93.
- Pretschner, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S. & Schlander, M. 2018. Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, 4–31.

- 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 and Viticulture*, 20: 61–69.
- Punja, Z.K. & Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology*, 21: 400–407.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O. & Mazzola, M. 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 99: 571–581.
- Podgórska-Kryszczuk, I., Solarska E. & Kordowska-Wiater, M. 2022. Biological Control of *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* by Antagonistic Yeasts. *Pathogens*, 11: 86: 1–16.
- Rabosto, X., Carrau, M., Paz, A., Boido, E., Dellacassa, E. & Carrau, F.M. 2006. Grapes and Vineyard Soils as Sources of Microorganisms for Biological Control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 332–338.
- Reyes-bravo, P., Acuña-fontecilla, A., Rosales, I.M.I. M. & Godoy, L. 2019. Evaluation of native wine yeast as biocontrol agents against fungal pathogens related to postharvest diseases. *Journal of Agronomy & Agricultural Science*.
- Ruzicka, F., Hola, V., Votava, M. & Tekkalov_a, R. 2007. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol*, 52: 209–214.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Annual Biochemistry*, 60: 47–56.
- Sánchez-Torres, P. & Tuset, J.J. 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 59: 159–165.
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D. & de Tosetti, M.I.S. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 245–251.
- Saravanakumar, D., Ciavorella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 121–128.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.N. & Hollier, C. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4): 519–537.
- Sanzani, S.M., De Girolamo, A., Schena, L., Solfrizzo, M., Ippolito, A. & Visconti, A. 2009. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. *European Food Research Technology*, 228: 381–389.
- Sharma, R.R. Singh, D. & Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists. *Biological Control*, 50: 205–221.
- Sipiczki, M. 2006. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6716–6724.
- Spadaro, D. & Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Science and Technology*, 47: 39–49.
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. & Van Rensburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 182–190.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. & MEGA, A. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Tian, Y.Q., Li, W., Jiang, Z.T., Jing, M.M. & Shao, Y.Z. 2018. The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism. *Food Science and Biotechnology*, 27: 95–105.
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M. & Neri, F. 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 30–40.
- Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N. & Tapia, M. 2012. Isolation and Selection of Epiphytic Yeast for Biocontrol of *Botrytis cinerea* Pers. on Table Grapes. *Chil. Journal of Agriculture Research*, 72: 332–337.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, 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.
- Wallace, R.L., Hirkala, D.L. & Nelson, L.M. 2018. Mechanisms of action of three isolates of *Pseudomonas fluorescens* active against postharvest grey mold decay of apple during commercial storage. *Biological Control*, 117: 13–20.
- Wang, W., Chi, Z., Li, J. & Wang, X. 2009. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresource Technology*, 100: 2639–2641.

- Wilson, C.L. & Wisniewski, M. 1989. Biological control of post harvest diseases offruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 425–441.
- Yang, H., Wang, L., Li, S., Gao, X., Wu, N., Zhao, Y. & Sun, W. 2021. Control of postharvest grey spot rot of loquat fruit with *Metschnikowia pulcherrima* E1 and potential mechanisms of action. *Biological Control*, 152: 104406
- Zajc, J., Černoša, A., Di Francesco, A., Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Badri, H., Jijakli, H., Ippolito, A., Čar, C.G., Zalar, P., Cimerman N.G. & Janisiewicz W.J. 2020. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolates selected as biocontrol agents against fruit decay pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 10:1–13.
- Zhang, H., Godana, E. A., Sui, Y., Yang, Q., Zhang, X. & Zhao, L. 2020. Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: a review. *Critical Review in Microbiology*, 46: 450–462.
- Zhang, D., Spadaro, D., Valente, S., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2012. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 453–464.
- Zhou, Y., Li, W., Zeng, J. & Shao, Y. 2018. Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control*, 123: 111–119.

Biodiversity and biocontrol activity of grape epiphyte yeasts in control of gray mold disease

Lachin Mokhtarnejad¹, Shahram Naeimi², Mohsen Farzaneh³

1. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran.

2. Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3. Associate professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran.

Corresponding author: Lachin Mokhtarnejad, email: l.mokhtarnejad@gmail.com

Received: Mar., 05, 2024

11(1) 63–81

Accepted: Jun, 10, 2024

Abstract

Grape gray decay disease caused by *Botrytis cinerea* is one of the important factors causing rotting and reducing the quantity and quality of the grapes during the stages before and after harvesting, which makes the use of chemical fungicides inevitable. Considering the environmental issues with the excessive use of chemical fungicides for humans and the environment, the use of products based on biological agents has received special attention. Among biological agents, some yeasts have been shown to possess antagonistic activity against fungi and are considered as safe and sound alternatives for chemical pesticides. The present study aimed to identify grape epiphytic yeasts and investigate their ability against the pathogenic fungus *B. cinerea* in the post-harvest stage. A total of 67 yeast isolates were isolated from the surface of grape fruits in the vineyards of West Azarbaijan province. Based on morphological studies and nucleotide sequence analysis of the D1/D2 domain of the large subunit 26S rDNA gene, the isolates belong to 21 species and 11 genera. *Aureobasidium pullulans* was recognized as the dominant species of grape flora. The ability of 67 yeast isolates to control *B. cinerea* growth by the dual-culture method showed that 16 isolates belonging to 7 genera succeeded in inhibiting the growth of the gray mold, which isolates *Rhodotorula glutinis* G54 and *Metschnikowia pulcherrima* G9 showed the greatest of capability against *B. cinerea*. A significant difference ($P \leq 0.01$) was observed between the 16 selected isolates in terms of inhibition of gray rot on grape berries, as a completely randomized design with four replications. The isolates *Meyerozyma guilliermondii* G30, *Rh. glutinis* G54 and *M. pulcherrima* G9 were the most effective isolates in reducing the disease on grape berries with 92.59, 91.37 and 90.15 percent rot inhibition, respectively. Studies of mechanisms involved in biological control showed that 12 isolates were able to produce protease, 6 isolates were able to produce pectinase and 12 isolates produced amylase. Also, it was found that 9 isolates can form biofilm and 8 isolates produced a siderophore. Finally, it was found that the grape flora has a high diversity of yeasts and the superior yeast isolates including G30, G54 and G9, with various biocontrol mechanisms (such as antibiosis, protease and amylase activities as well as siderophore production), have a high potential to inhibit the gray rot of grape. However, it is necessary to conduct more studies on selected isolates to create practical formulations for biological control or integrated management of fungal diseases of fruits and vegetables.

Keywords: antagonistic yeast, *Botrytis cinerea*, modes of action, post-harvest pathogen, Yeast identification