

Epifitik Mayaların *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* Hiflerine Hiperparazitik Etkisi¹

Mehlika Benli²

Özet

Antagonizm mekanizmalarından biri olan hiperparazitizm üzerinde önemle durulan bu çalışmada hiperparazitizm mekanizması ışık ve elektron mikroskopisi ile açıklanmıştır. Çalışmalarda, 44 epifitik maya izolatının *Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum* hifleri üzerine tutunma yetenekleri araştırılmıştır. *B. cinerea* hiflerine tutunma yeteneği olan 32 maya ve *P. expansum* hiflerine tutunma yeteneği olan 12 maya izolatu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Maya, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, Antagonizm

Giriş

Depolarda yaygın olarak görülen fungal hastalıklar, elmalarda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hasat sonrası fizyoloji ve bu husustaki bilgi eksikliği, hasat sonrası depo koşullarının uygun olmaması gibi nedenler kayıpları daha fazla artırmaktadır (1). Meyvelerde hasat sonrası kaliteyi düşüren ve raf ömrünü bitiren en önemli hastalık etmenleri funguslardır. Yaş meyveler bol miktarda su ve besin maddesi içerdiğinden hasattan sonra patojen saldırısına uğrarlar. Enfekte ürünlerde etilen sentezi, solunum ve ısı üretimi artarak olgunlaşma hızlanır. Hastalanan ürünler sağlam olanları da enfekte ederek kayıpların hızla artmasına neden olurlar. Hasat sonrası hastalık etmenleri olan *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* elmalarda en etkili patojenlerdir. Bunlardan *Penicillium expansum* meyve kabuğunun yaralanması ile ürün içine girebilen, *Botrytis cinerea* ise doğal açıklıklar olan stoma ve lentisellerden giren yara patojenleridir. Her iki patojen de olgunluğa paralel olarak, uygun ortamda çimlenir ve hastalığa neden olur (1). Depo hastalıklarıyla mücadelede pek çok fungusit kullanılmaktadır. Son yıllarda etkili fungusitlere dahi dayanıklı suşların

¹ Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Prof. Dr. Lütfü Çakmakçı danışmanlığı altında Mehlika Benli tarafından yapılan ve 2000 yılında tamamlanan "Elmalarda Hasat Sonrası Bozulmaların Antagonistik Mikroorganizmalarla Biyolojik Kontrolü" adlı Doktora tezinin bir bölümüdür.

² Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beşevler Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi benli@science.ankara.edu.tr

ortaya çıkması ile fungusitler yetersiz kalmıştır (2). Bunun üzerine bilim adamları biyolojik mücadeleye yönelmişler ve etkili sonuçlar elde etmişlerdir (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Biyolojik mücadelede, biyoajanlar içinde patojenlerin, besin ve ortam isteklerine en yakın olan mikroorganizmalar tercih edilmiştir. Daha çok mayalar üzerinde durulmuştur (6, 7, 8, 9, 10).

Biyokontrol ajanları olarak kullanılan mikroorganizmaların patojen inhibisyon mekanizmaları tam olarak açıklanamamaktadır. Yapılan araştırmalar ışığında, birçok bilim adamının birleştiği nokta; biyoajanların yer ve besin rekabeti, konukçunun patojene karşı direncinin artırılması, antibiyosis ve hiperparazitizm yollarından bir veya birkaçını kullanarak antagonistik etki gösterdikleri yolundadır (11, 12, 13, 14, 15, 16).

Konukçunun direnci biyokimyasal yapı ve fizyolojik durumu ile belirlenir. Niteliği tam olarak bilinmeyen ve dokularda var olan veya sonradan sentezlenen maddelerin patojenlere direnmede etkili olduğu sanılmaktadır. Saponinler, fenol ve fenol glikozitleri hidrolize olarak, konukçuya antifungal aktivite kazandırır. Genellikle fazla miktarda fenolik madde ve fenol oksidaz içeren yapılar oksidasyon sonucu esmerleşerek, patojenlere direnirler. Direnç sağlayan bu maddeler patojen fungusların enzimlerini etkileyerek inaktive ederler. Bu bölgelerde hiflerin önünü kallosa ile keserler, fenolik maddeler ve lignin sentezleyerek fitoaleksini oluştururlar. Fitoaleksinler: Patojen fungus ile karşılaşan dokunun sentezlediği fungitoksik maddelerdir. Konukçunun bileşiminde bulunan asitler, özellikle askorbik asit, bazı eterik yağlar patojen spor gelişimini ve fungal gelişmeyi engeller. Ayrıca ortamda mekanik direnç sağlayan pektik maddeler; selüloz, hemiselüloz, lignin ve mineral maddeler; özellikle protopektin ve kalsiyum önemlidir (14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Doğal ortamda patojen ve antagonist aynı ekolojik çevrede bulunurlar. Besin gereksinimleri ve optimal çevre koşulları bakımından benzerlik göstermeleri nedeniyle sınırlı bir bölgede sınırlı besin ortamında rekabet ederler. Bu konuda bakteri ve mayalar funguslara kıyasla daha şanslıdır. Hızla besini tüketerek ortamı kaplarlar. Bu şekilde patojenlerin gelişimine engel olurlar. Biyolojik savaşta patojenlerin gelişmesini önleyebilmek için hızla gelişen ve yara çevresini saran antagonistler seçilmelidir (14). Ortamdaki O₂, CO₂, ortamın pH'ı veya besin maddelerinin değiştirilmesi ve ortama CaCl₂, KCl₂, CaCO₃ gibi bazı maddelerin ilavesi ile patojen gelişimi engellenebilir (24, 25, 26, 27, 28).

Antagonizm mekanizmalarından en çok araştırılan konulardan biri de antibiyosistir. Özellikle bakterilerle girişilen; biyolojik mücadelede rapor edilen birçok antifungal bileşik vardır (29, 30, 31, 32, 33).

İnsan sağlığına ve ekolojik dengeye tahrip yeteneği olabileceği düşünülen, antibiyotik üreten kontrol ajanları pek uygun görülmemektedir. Ayrıca patojen fungusların bir süre sonra antibiyotiklere direnç kazanabileceği düşünülürse, farklı mekanizmalarla çalışan antagonistler üzerinde çalışmak daha doğru olacaktır (16, 24).

Antagonist organizmaların direk etkileşimleri sonucu patojen gelişimini parazitik yolla inhibe etmesi olarak tanımlanan ve antagonizm mekanizmalarının en etkili şekli olan hiperparazitizm, henüz tam olarak açıklanamayan bir mekanizmadır (24, 34, 35, 36).

Hiperparazitizm üzerindeki bu çalışmada, elma yaprak, çiçek, meyve yüzeylerinden izole edilmiş 44 maya izolatının *P. expansum* ve *B. cinerea* hifleri üzerine tutunma yeteneği araştırılmış ve hiperparazitizm mekanizması irdelenmiştir.

Materyal ve Metot

Isparta Eğirdir bölgesinde, 1994 Şubat ayından başlayarak Kasım sonuna kadar birer aylık periyotlar halinde, dört elma bahçesi ve bir depodan yaprak, çiçek, meyve örnekleri toplanmıştır. Alınan örneklerden maya izolasyonu yapılmış ve 123 maya izole edilmiştir. Morfolojik olarak, koloni yapıları ve renkleri farklı 44 maya seçilerek patojen hiflere tutunma yeteneği bakımından denenmiştir.

Maya İzolasyonu

Elma ağaçlarından toplanan yaprak ve çiçek örnekleri ayrı erlenler içinde fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yarım saat 150 d/d hızla çalkalanmıştır. Bu yıkama suyundan Potato Dextrose Agar (PDA) plaklarına ekimleri yapılarak 4 gün 24 °C'de inkübe edilerek maya izolasyonları yapılmıştır (37). Depo ve bahçeden alınan elmalardan swap kültür yöntemiyle FTS içine alınan örneklerin yaprak ve çiçek örneklerinde olduğu gibi maya izolasyonları yapılmıştır (9, 38, 39).

Işık Mikroskopisi

Bu amaçla %10 zayıflatılmış PDA kullanılmıştır. %10 zayıflatılmış PDA, 100 ml patates ekstraktı, 2 g toz şeker, 18 g agar ve 900 ml distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Stok saf *P. expansum* ve *B. cinerea* kültürlerinden PDA üzerine nokta ekimler yapılarak, 22 °C'de 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda NYDB (Nutrient Yeast Dextrose Broth) besiyerinde geliştirilmiş 48 saatlik kültürden 10⁸ kob/ml olacak şekilde gelişen patojen hiflerin uç kısımlarına damlatılmış ve 24 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir deneme için üç paralel kullanılmıştır. Patojen maya karşılaşmasının olduğu bölgeler işaretlenerek, steril su ile iyice yıkanmıştır. Besiyerinde karşılaşmanın olduğu bölgelerden bistüri yardımıyla kare şeklinde parçalar kesilerek, lam üzerine konulmuş ve ışık mikroskopunda incelenmiştir (40, 41).

Scaning Electron Mikroskopisi (SEM)

Işık mikroskopisinde olduğu gibi maya ve patojenler karşılaştırılmış, karşılaşmanın olduğu bölgelerden agar parçaları alınarak fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanmış % 3'lük Guluteralehit ile ön fiksasyonu yapılmış, fosfat tamponunda hazırlanmış % 1'lik Osmium tetroksit (OsO₄) içinde +4 °C'de, post fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Tampon çözeltisi ile yıkanan numunelerin dehidrasyonu yapıldıktan sonra, Propilen oxide alınarak dehidrasyon işlemi tamamlanmıştır. Numuneler, steril petrilere alınmış ve etüvde kurumaya bırakılmıştır. Staplar üzerine yapıştırılan numuneler altın ile kaplanarak Scaning Electron Mikroskopunda incelenmiştir (34). SEM çalışmalarında TPAO kurumu olanaklarından yararlanılmıştır.

Bulgular

Mayaların antagonistik etki mekanizmalarından hiperparazitimin aydınlatılması amaçlanan çalışmada, elma yaprak, çiçek ve meyve yüzeylerinden izole edilmiş 44 maya izolatu kullanılmıştır.

In vivo ve *in vitro* koşullarda test edilen maya izolatlarından *B. cinerea* ve *P. expansum* üzerinde antagonistik etkileri saptanmıştır. Mayaların etki mekanizmalarını araştırmak amacı ile antibiyosis ve tutunma denemeleri yapılmıştır.

Antibiyosis denemelerinde *in vitro* koşullarda maya ve patojen küflerin karşılaştırılması sonucunda, üç farklı oluşuma rastlanmıştır. Bunlardan birincisi kırmızı pigmentli zon oluşumudur. Bu zon maya izolatlarında 3 tanesinde her iki patojene karşı gözlenmiştir. İkinci oluşum inhibisyonudur. İzolatlardan 7 tanesinde gözlenmiş ve patojenlerle karşılaştıkları bölgelerde antibiyosis zonu oluşmuştur. Üçüncü oluşum ise çöküntü oluşumudur. Bu oluşum sadece *B. cinerea* hifleriyle karşılaşan 16 adet maya izolatında rastlanmıştır. Denemelerde *B. cinerea* hifleri maya disklerine kadar ilerleyerek gelişmiştir. Ancak, üç günün sonunda maya disklerinin etrafında maya hif karşılaşmasının olduğu bölgelerde zon oluşturacak şekilde çöküntü meydana getirdiği gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *B. cinerea* hiflerinin maya diskleri etrafında meydana gelen çöküntü

Hiflerin geliştikten sonra mayalarla karşılaşarak çöküntüye uğraması; hiperparazitizm ile ilgisinin olabileceğini düşündürmüştür. Mayaların hiperparazitik olarak patojen hifleri yıkıma uğratabilmesi için öncelikle hiflere tutunma yeteneğinin olması gerektiği düşüncesi ile maya izolatlarının tutunma yeteneği araştırılmıştır. Hiperparazitizm üzerinde durulan ve hiflerin tutunma yeteneklerinin test edilen çalışmada, *P. expansum* hiflerine tutunma yeteneğinin çok zayıf olduğu, yer yer birkaç maya hücresi ile tutunmanın olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). Çalışılan 44 maya izolatu içinde, 12 izolatta çok zayıf tutunma yeteneği gözlenirken, diğer 32 mayada tutunma yeteneğine rastlanmamıştır.

Mayaların *B. cinerea* hiflerine tutunma yeteneği *P. expansum* hiflerine oranla daha fazladır. *B. cinerea*, ışık mikroskopisi denemelerinde mayaların kümeler halinde adeta hifleri sararcasına sıkı sıkı tutundukları görülmüştür (Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5). Patojen hiflere tutunma yeteneği denenen epifitik 44 mayadan 32 tane izolatta *B. cinerea* hiflere çok kuvvetli bir şekilde tutunma gözlenmiştir.

Tutunma yeteneği kuvvetli olduğu saptanan 4 maya izolatu Scanning Electron Mikroskopunda incelenmiş ve dört izolata da *B. cinerea* hiflerine sıkı bir tutunmanın

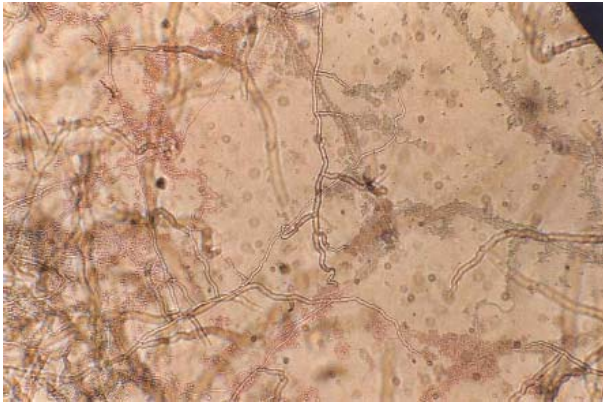
olduğu ve tutunmanın olduğu bölgelerde çukurlukların meydana gelerek hif duvarlarının yıkıma uğradığı gözlenmiştir (Şekil 6, Şekil 7).



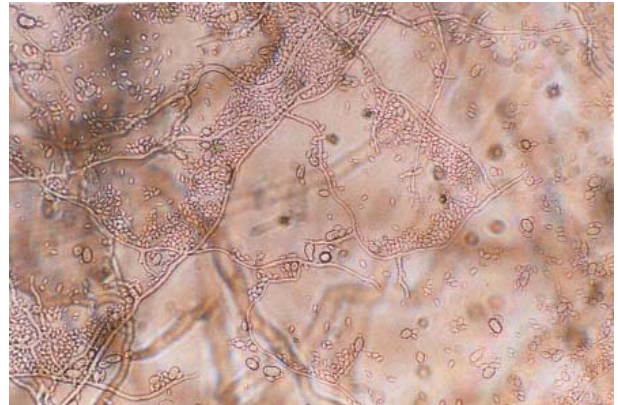
Şekil 2. *P. expansum* hiflerine yer yer tutunmuş 36 nolu maya izolatının ışık mikroskop görüntüsü



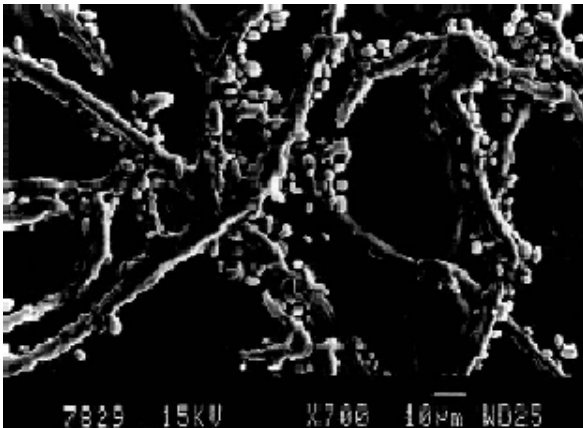
Şekil 3. 33 nolu maya izolatının *B. cinerea* hiflerine tutunması



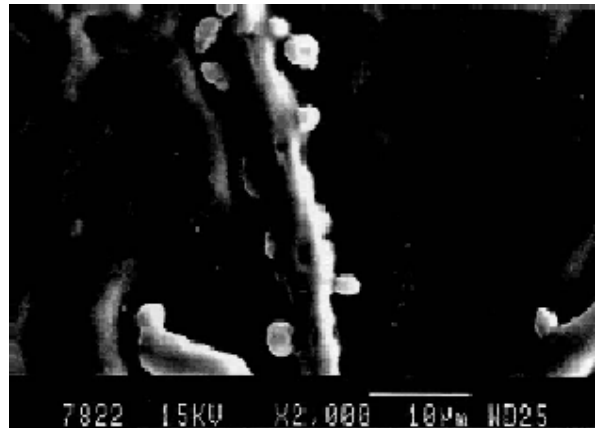
Şekil 4. 27 nolu maya izolatının *B. cinerea* hiflerine tutunması



Şekil 5. 279 nolu maya izolatının *B. cinerea* hiflerine tutunması



Şekil 6. SEM mikrograflarında 75'nolu mayanın *B. cinerea* hiflerine tutunması



Şekil 7. SEM mikrograflarında 75 nolu maya izolatının *B. cinerea* hiflerine tutunması ve hif üzerinde meydana gelen çukurluklar

Sonuç ve Tartışma

Biyolojik mücadelenin hız kazandığı günümüzde biyolojik ajan olarak kullanılan mikroorganizmaların patojen inhibisyon mekanizmalarının açıklanması tam olarak yapılamamaktadır. Yapılan araştırmalar ışığında birçok bilim adamının birleştiği nokta biyoajanların yer ve besin rekabeti, konukçu direncinin artırılması, antibiyosis ve hiperparazitizm yollarından bir veya birkaçını kullanarak antagonistik etkiyi gösterdikleri yolundadır (11,12,13,14,15,16).

Antagonistik etki mekanizmalarından en çok araştırılan antibiyosis olmuştur. Fakat insan sağlığını ve ekolojik dengeyi tahrip yeteneği olabileceği düşünülen antibiyotik ve benzeri maddelere karşı patojenlerin kısa süre içinde direnç kazanabilecekleri düşünülürse bu mekanizma ile çalışan antagonistlerle yapılacak mücadele etkili ve kalıcı olmayacaktır (16, 24).

Çalışmalarda antibiyosis zonu veren ve antifungal bileşik ürettiği düşünülen 7 tane maya izolatına rastlanmış, fakat analizleri yapılmamıştır. Antifungal bileşiklere patojenlerin direnç kazanabileceği düşünüldüğünden üzerinde fazlaca durulmamıştır.

Antagonist organizmaların patojenlerle direkt etkileşimleri ile gerçekleşen hiperparazitik inhibisyon mekanizması antagonizm mekanizmaları içinde en etkili ve en kalıcısı olarak düşünülmekte ve halen araştırılmaktadır (14).

Çalışmalarda patojen gelişimini tam ve kesin olarak kontrol altına alan hiperparazitizm mekanizması üzerinde durulmuştur. *In vitro* ve *in vivo* denemeler sonucunda etkili bulunan maya izolatlarından hiperparazitik yolu kullanarak inhibisyonu gerçekleştiren maya izolatlarını tespit etmek amacı ile elma yaprak, çiçek ve meyve yüzeylerinden izole edilmiş maya izolatlarından seçilen 44 tane maya *P. expansum* ve *B. cinerea* hiflerine tutunma yetenekleri bakımından denenmiştir.

Yapılan denemelerde epifitik mayaların *P. expansum* hiflerine tutunma yeteneklerinin çok zayıf olduğu gözlenmiş, 44 maya içinden 12 tanesinde patojen hiflere birkaç maya hücrelerinin tutunduğu görüntülenmiştir. Hiperparazitizmi ifade edecek tam bir tutunmaya rastlanmamıştır.

Epifitik mayaların *B. cinerea* hiflerine tutunma yeteneği *P. expansum* hiflerine olan tutunmaya oranla daha belirgin ve daha kuvvetli olarak gözlenmiştir. Yapılan ışık mikroskopisi çalışmalarında 44 maya izolatından 32 tanesinde tutunma yeteneği saptanmıştır. Mikrograflarda, maya hücrelerinin *B. cinerea* hiflerine sıkıca tutunduğu ve hifleri sararak kümeler oluşturduğu görülmüştür.

Maya izolatları içinde en yoğun tutunma gözlenen 4 maya izolatı seçilerek *B. cinerea* hiflerine tutunmaları ayrıntılı olarak elektron mikroskopunda incelenmiştir. SEM mikrograflarında; mayaların *B. cinerea* hiflerine tutunduğu ve tutunma bölgelerinde çukurluklar meydana getirdiği gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda elma ağacı kısımlarından izole edilen mayaların içinde *B. cinerea* hiflerine tutunma yeteneği ve tutundukları bölgelerde meydana getirdikleri çöküntülerle hif hücre duvarlarını yıkıma uğrattıkları ve hiperparazitik yolla patojen hiflerini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Benzer çalışmalara literatürde de rastlanmıştır. *B. cinerea* üzerinde tutunma yeteneği tespit edilen *Pichia guilliermondii* ve *Debaryomyces hansenii* ile çalışan bilim adamları yaptıkları SEM analizlerinde, *P. guilliermondii* etkisiz bulurken, *D. hansenii*, *B. cinerea* hiflerine sıkıca tutundukları ve bu bölgelerde çukurluklar oluşturarak hifleri çöktükleri gözlenmiştir (34).

Mayalar ekstraselüler matriks maddeleriyle tutunma sağlamakta ve fungal hücre duvarlarını hidrolize etmektedirler. Maya hücreleri β glukorinaz üretme yeteneğindedir. Antagonistik etkisi kanıtlanmış *Candida albicans* üzerinde yapılan bir çalışmada glukorinaz aktivitesinin varlığı ortaya konulmuştur (35).

Elma *B. cinerea* patojenine karşı antagonistik etkisi saptanan *Pichia anomala* 'da exo-beta 1, 3 glukonaz aktivitesi gözlenmiştir (36).

Bu konu ile ilgili elektron mikroskopisi çalışmalarımız halen devam etmektedir.

Kaynaklar

1. JONES, A.L., ALDWINCKLE, H.S. "Compendium of Apple and Pear Diseases" APS Press, USA, 100, (1990).
2. BIONDI, G., BRIGATI, S. and FOSCHI, F." Penicillium control in citrus fruits after harvesting" XV International congress of refrigeration., Italy, 1-9, (1979).
3. OMOIFO, C. and I. KOTUN, T. "Inhibition of growth of some Plant pathogens by antagonistic microorganisms" J. Basic. Microbiology, 27(9); 515-519, (1987).
4. McLAUGHIN, R.J., WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C.L., CHALUTZ, E. "Biocontrol of Postharvest Rots of Peach and Apple with the Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Debaryomyces hansenii*" Phytopathology, 79(10); 1187, (1989).
5. McLAUGHIN, R.J., WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C.L., CHALUTZ, E. "Biocontrol of Postharvest Rots of Peach and Apple with the Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Debaryomyces hansenii*" Phytopathology, 79(10); 1187, (1989).
6. JANISIEWICZ, PETERSON, D.L., BORS, R. "Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*" Plant Disease, 78(5); 466-470, (1994).
7. ROBERTS, R.G. "Postharvest Biological Control of Gray Mold of Apple by *Cryptococcus laurentii*." Phytopathology, 80; 526-530, (1990).
8. KAMPP, J. "Biological Control of Postharvest Diseases of Apples and Pears" Acta Horticulturae, Denmark, 368; 69-77, (1994).
9. LIMA, G., CURTIS, F.-de, CASTORIA, R., CICCIO, V.-de, " Activity of the Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits" Biocontrol Science and Technology. 8(2); 257-267, (1998).
10. GULLINO, ML, BENII, D., ALOI, C, TESTONI, A., GARIBALDI, A., VERHOEFF, K., (ed): MALATHRAKIS, N.E., WILLIAMSON, B., "Biological control of Botrytis rot of Apple" International Botrytis Symposium, Greece 197-200, (1992).
11. CHALUTZ, E., DROBY, S. and WILSON, C.L. "Microbial Protection Against Postharvest Disease of Citrus Fruit" Phytoparasitica, Israel, 16, 2, 195-196, (1988).
12. CHALUTZ, E., COHEN, L., WEISS, B. and WILSON, C.L. "Biocontrol of Postharvest Disease of Citrus Fruit by Microbial Antagonists. Proceedings of the Sixth International Citrus Congress, Israel, 1467-1470, (1988).

13. ISAAC, S. "Fungal–Plant Interactions" Chapman Hall, London ,418, (1992).
14. KARAÇALI, İ. "Bahçe Ürünlerinin Muhafaza ve Pazarlaması." Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, No: 494, (1993).
15. WILSON, C.L. and WISNIEWSKI, M.E., "Biological control of postharvest diseases theory and practice" CRC press, USA, 182, (1994).
16. BORA, T. and ÖZAKTAN, "H. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş" Ege Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü, İzmir, 205, (1998).
17. HUANG, Y., DEVERALL, B.J. and MORRIS, S.C. "Effect of *Pseudomonas cepacia* on postharvest biocontrol of infection by *Penicillium digitatum* and on wound responses of citrus fruit. Australasian" Plant Pathology., Sydney, 22, 3, 84-93, (1993).
18. FILONOW, AB. "Yeasts reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the germination of *Botrytis cinerea* conidia" Journal Omical Ecology, 25(7); 1555–1565, (1999).
19. QADIR, A., HEWETT, E.W., LONG, P.G. "Ethylene production by *Botrytis cinerea*" Postharvest Biology and Technology, 11; 85-91, (1997).
20. AFEK, U. and SZTEINBERG, A. "Accumulation of Scoparone, a Phytoalexin Associated with Resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*" Phytopathology, Israel, 78, 1678-1682, (1998).
21. BARMORE, C.R. and NGUYEN, T.K. "Polygalacturonase Inhibition in Rind of Valencia Orange Infected with *Diplodia natalensis*" Phytopathology, Florida, 75, 446-449, (1985).
22. HERSHENHORN, J., MANULİS, S. and BARASH, I. "Polygalacturonases Associated with Infection of Valencia Orange by *Penicillium italicum*" Phytopathology, Israel, 80, 1374-1376, (1990).
23. DERRICK, K.S., LEE, R.F., BRLANSKY, R.H., TIMMER, L.W., HEWITT, B.G. and BARTHE, G.A. "Proteins Associated with Citrus Blight" Plant Dis., 74, 168-170, (1990).
24. WILSON, C.L. and WISNIEWSKI, M.E., "Biological control of postharvest diseases theory and practice" CRC press, USA, 182, (1994).
25. PIANO, S., NEYROTTI, V., MIGHELI, Q, GULLINO, M.L." Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple" Postharvest Biology and Technology , 11(3); 131–140, (1997).
26. McLAUGHLIN, R.J., WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C.L., CHALUTZ, E. "Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Postharvest Diseases of Apple with *Candida* sp." Phytopathology, U.S.A., 80, 456-461, (1990).
27. GULLINO, M.L., ALOI, C., PALITTO, M., BENZI, D., GARIBALDI, A. "Attempts at biological control of postharvest diseases of apple" Mededelingen–van–de–Faculteit–Landbouwwet enschoppen, Italy, 56(2): 195–202, (1991).
28. FLOROS, J.D., DOCK, L.L., NIELSON, P.V. "Biological control of *Botrytis cinerea* growth on apples stored under modified atmosphere" Journal of food production. 61(12); 1661–1665, (1998).
29. PUSEY, Y., WILSON, C.L., "Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*" Plant Diseases, 68, 753, (1984).
30. GUELDNER, R.C., REILLY, C.C., PUSEY, P.L., COSTELLO, C.E., ARRENDALE, R.F., HIMMELSBACH, D.S., CRUMLEY, F.G., CULTER, H.G. "Isolation and identification of Iturin as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*" Journal Agriculture Food Chemistry, 36; 366, (1988).

31. McKEEN, C.D., REILL, C.C., PUSEY, P.L. "Production and partial characterization of antifungal substances against *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*" *Phytopathology*, 76; 136, (1986).
32. PHAE, C.G., SASAKI, M., SHODA, M., KUBOTA, H. "Characteristics of *Bacillus subtilis* Isolated from Composts Suppressing Phytopathogenic Microorganisms. *Soil & S. Plant Nutr.*, 36(4); 575-586, (1990).
33. MOUSSAIF, M., JACQUES, P., SCHAARWACHTER, P., BUOZEKIWICZ, H., THONART, P. "Cyclosporin-C is the main antifungal compound produced by *Acremonium luzulae*" *Applied and Environmental Microbiology*, 1739-1743, (1997).
34. WISNIEWSKI, M., BILES, C., DROBY, S., McLAUGHLIN, R., WILSON, C., CHALUTZ, E. "Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia quilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*" *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(4); 245-258, (1991).
35. NOTARIO, V., "α-glucanase from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall components" *Journal Genetic Microbiology*, 128; 747, (1982).
36. GREVESSE, C., JIJAKLI, M.H., LEPOIVRE, P., "Study of exo-beta. 1,3-glucanase activity production by the yeast *Pichia anomala* in relation to its antagonistic properties against *Botrytis cinerea* on postharvest apples." *Twelfth forum for applied biotechnology*, Belgium, 63, (1998).
37. SCHIEWE, A., MENDGEN, K. "Identification of antagonists for biological control of the postharvest pathogens *Pezizula malicorticis* and *Nectria galligena* on apples" *Journal of Phytopathology*, 134(3); 229-237, (1992).
38. LEIBINGER, W., BREUKER, B., HAHN, M., MENDGEN, K. "Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field" *Phytopathology*, 87(11); 1103-1110, (1997).
39. ANDERSON, J.A., FILONOW, A.B., VISHNIAC, H.S., "*Cryptococcus homicola* inhibits development of lesions in "Golden Delicious" apples" *HortScience*, 32(7) 1235-1236, (1977).
40. CAMPBELL, I., DUFFUS, J.H., "Yeast a practical approach" IRL PRESS, Oxford-Washington. 283, (1991).
41. MCGINNIS, M.R. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*, Academic Press, New York, 661, (1980).