

Monika Kordowska-Wiater<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Drożdże w ochronie owoców i warzyw przed chorobami pochodzenia grzybowego. 3. Zastosowanie drożdży do hamowania fitopatogenów grzybowych pochodzenia glebowego. 4. Mechanizmy antagonistycznego działania drożdży. 4.1. Konkurencja o składniki odżywcze i przestrzeń. 4.2. Produkcja czynników antybiotycznych. 4.3. Produkcja enzymów litycznych. 4.4. Indukcja odporności roślin. 5. Poprawa skuteczności czynników biokontroli. 6. Preparaty ochronne oparte o drożdże. 7. Perspektywy stosowania drożdży antagonistycznych. 8. Podsumowanie

#### Yeasts as biological control agents for plants

**Abstract:** Yeasts can be used for biocontrol of fungal phytopathogens of plants. Antagonistic strains have been selected from different plant niches. The most effective are *Cryptococcus laurentii*, *Candida sake*, *C. oleophila*, *Metschnikowia* spp. and yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*, which are able to reduce or inhibit the growth of fungi such as e.g. *Botrytis*, *Penicillium* and *Rhizopus* causing rots of fruit and vegetables or act on other field phytopathogens. Some yeasts from rhizosphere are able to promote plant growth. Different modes of yeast action have been suggested to be responsible for biological control: competition for nutrients and space on plant organ surfaces, antibiotic production, lytic enzyme (mainly glucanases and chitinases) excretion and induction of plant resistance by specific enzymes and phytohormone production. Since the effectiveness of investigated yeasts is sometimes insufficient, different kinds of biocontrol improvement have been investigated and antagonist mixture, addition of adjuvants, natural substances, mild fungicides or modification of physical agents have been suggested. Formulas of effective biocontrol preparations based on yeasts have been under investigation. Freezing, freeze-drying and vacuum-drying have been proposed to be the best methods of yeasts stabilization. High viability, stability, efficiency of cells and safety during the storage of products have been the goal of investigations. Some commercial preparations have been registered e.g. “Shemer” based on *Metschnikowia fructicola* action, “Candifruit” based on *Candida sake* which can be used for protection of fruit and vegetables. Nowadays, the importance of this kind of protective products is restricted but in the future there is a chance for propagation of biocontrol yeast formulas.

1. Introduction. 2. Yeasts in fruit and vegetable protection against diseases of fungal origin. 3. Application of yeasts for inhibition of fungal phytopathogens of soil origin. 4. Mechanisms of antagonistic action of yeasts. 4.1. Competition for nutrients and space. 4.2. Antibiotic agent production. 4.3. Lytic enzyme production. 4.4 Induction of plant resistance. 5. Improvement of biocontrol agent efficiency. 6. Protective products based on yeasts. 7. Perspectives of antagonistic yeast application. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** antagonizm, biokontrola, drożdże, fitopatogeny

**Key words:** antagonism, biocontrol, yeasts, phytopathogens

### 1. Wstęp

Rośliny uprawne, w tym owoce i warzywa w czasie wzrostu, jak i po zbiorze narażone są na choroby wywoływane mikroorganizmami. Oczywistym efektem występowania chorób jest obniżenie zbiorów i pogorszenie ich jakości. Sumaryczne straty w produkcji roślinnej wywołane przez choroby i szkodniki roślin szacowane są przez Światową Organizację Wyżywienia i Rolnictwa na około 30% rocznie w skali całego świata. Występowanie chorób roślin podnosi również koszty produkcji roślinnej oraz ma skutki estetyczne poprzez obniżanie walorów zdobniczych [48].

Mykozy roślin, choroby powodowane przez grzyby, stanowią najliczniejszą i najistotniejszą z gospodarczego punktu widzenia grupę chorób. Jak wiadomo, do walki z nimi stosuje się fungicydy, które mimo skuteczności i prostoty użycia, nie cieszą się uznaniem ze względu

na zagrożenie bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów spowodowane pozostałościami fungicydów w roślinach, uodparnianie się patogenów na środki chemiczne, redukcję organizmów pożytecznych, a także trudności i duże koszty wynalezienia nowych, bezpiecznych preparatów. Te zastrzeżenia do stosowania fungicydów spowodowały wzrost zainteresowania biologicznymi metodami ochrony roślin [80]. Klasyczna definicja głosi, że biologiczna metoda ochrony polega na ograniczaniu rozwoju organizmów szkodliwych dla roślin za pomocą czynników biologicznych – innych organizmów lub produktów ich metabolizmu [47]. Badania nad czynnikami biologicznymi, służącymi do zwalczania flory patogennej koncentrują się na poszukiwaniu mikroorganizmów antagonistycznych dla patogenów ran, gdyż do infekcji przez zarodniki grzybów dochodzi najczęściej poprzez miejsce zranienia tkanki roślinnej. Dlatego też szybka kolonizacja i wzrost antagonisty w miejscu zranienia

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; tel. 81 462 33 57; e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

decydują o jego skuteczności. Proces infekcji owoców i warzyw odpowiedzialny za ich gnienie może nastąpić w okresie pomiędzy kwitnieniem, a uzyskaniem dojrzałości lub w czasie zbiorów. Użycie mikroorganizmów do kontroli chorób roślin wymaga zakłócenia jakiegoś etapu choroby lub cyklu życia patogenu, zwykle ich działanie dotyczy prewencji infekcji, redukcji kolonizacji tkanek gospodarza lub sporulacji i przeżycia patogenu [71]. Aby skutecznie zapobiegać infekcjom surowców roślinnych przez grzyby fitopatogenne, antagonistą powinien być obecny na ich powierzchni przed wystąpieniem infekcji. Powinien charakteryzować się wysoką zdolnością do kolonizacji powierzchni ran, szybkim wzrostem, zdolnością do wykorzystania składników odżywczych występujących w małych ilościach w miejscach zranienia oraz większą zdolnością do przeżycia i rozwoju niż patogen w szerokim zakresie temperatur, pH i ciśnienia osmotycznego. Powinien być skuteczny nawet w niskich stężeniach oraz mieć szerokie spektrum działania. Powinien być stabilny genetycznie, mieć umiarkowane wymagania odżywcze i nie powinien produkować metabolitów szkodliwych dla zdrowia ludzi oraz nie wywierać szkodliwego działania na surowiec. Powinien również charakteryzować się odpornością na pestycydy [21].

Wiele czynników biokontroli egzystuje naturalnie na liściach roślin, korzeniach i innych strukturach jako epifity lub saprofity wykorzystujące składniki odżywcze w danej niszy ekologicznej. Intensywne badania nad takimi mikroorganizmami trwają od około 25 lat i doprowadziły do komercyjnego użycia zarejestrowanych czynników biologicznych do kontroli chorób roślin. Do grupy drobnoustrojów antagonistycznych zalicza się pożyteczne bakterie, drożdże i grzyby strzępkowe. Dużo uwagi poświęcono też bakteriom antagonistycznym, czego wynikiem są dostępne na rynku preparaty bakteryjne oparte o wykorzystanie aktywnych szczepów [80]. Grzyby strzępkowe są również przedmiotem badań nad wykorzystaniem ich w biokontroli kilka gatunków, zwłaszcza grzybów z rodzaju *Trichoderma*, posłużyło do sporządzenia komercyjnych preparatów do ochrony różnych upraw – patrz publikacje na ten temat [47, 61, 62, 70, 71, 99]. Niniejsza praca koncentruje się na wykorzystaniu drożdży jako czynników ochrony biologicznej, nad którymi prowadzi się w ostatnich latach badania zarówno laboratoryjne, jak i polowe, ale także pojawiają się na rynku środków ochrony roślin preparaty oparte o ich działanie.

## 2. Drożdże w ochronie owoców i warzyw przed chorobami pochodzenia grzybowego

Pierwsze badania dotyczące zastosowania drożdży antagonistycznych w stosunku do grzybów patogennych, atakujących po zbiorze owoce i warzywa koncentrowały

się na zaplikowaniu ich po zbiorze w stabilnym i kontrolowanym środowisku przechowywania, ocenie ich aktywności przeciwgrzybiczej, gdy czynniki biologiczne łatwo stosować na zgromadzone plony [97]. Według innej hipotezy użycie czynników biokontroli przed zbiorem może być bardziej korzystne niż po zbiorze, chociaż wymaga dobrego zrozumienia epidemiologii choroby, biologii, ekologii i dynamiki populacji antagonistów [5, 41].

Stosowanie drożdży po zbiorze owoców przedstawiono w licznych publikacjach, szczególnie z przełomu XX i XXI w. (Tab. I). Filonow i wsp. [31] przebadali 28 izolatów drożdży z rodzaju *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Sirobasidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Tilletiopsis*, *Tremella*, *Trichosporon* i *Yarrowia* pod kątem ich ochronnego działania na jabłka zakażane konidiami *Botrytis cinerea* po zbiorze i stwierdzili najlepszą przydatność drożdży *Cryptococcus humicola* Y1266, *Filobasidium floriforme* Y7454 i *Rhodosporeidium toruloides* Y1091 do ograniczania wielkości i stopnia zaawansowania zgnilizny na jabłkach przechowywanych zarówno w temperaturze pokojowej, jak i chłodniczej. Drożdże szybko kolonizowały miejsca zranień owoców, namnażały się i ograniczały kiełkowanie i wzrost patogenu [31]. Wagnier i wsp. [93] przebadali 18 szczepów drożdży i wyłonili 4 szczepy skutecznie hamujące wzrost *B. cinerea* na jabłkach podczas przechowywania. W doświadczeniu infekcyjnym najwyższy stopień hamowania wzrostu patogenu uzyskano działając drożdżami *Pichia stipitis* CBS 5773 (98,5% po 5 dniach po inokulacji, 52% po 14 dniach), *Candida melibiosica* 2515 (odpowiednio 75% i 25%) oraz *Candida butyri* JCM 1501 i *Candida parapsilosis* DSM 70125 (odpowiednio 70% i 10–13%) [93]. Skuteczne działanie antagonistyczne wobec *B. cinerea* oraz *Penicillium expansum* na jabłkach drożdży *Rhodotorula glutinis* LS11, *Cryptococcus laurentii* LS28 i *Aureobasidium pullulans* LS30 wykazali Lima i wsp. [51] podczas badań przechowalniczych w temp. 3°C i 20°C. Uzyskali oni redukcję zgnilizny o 89–91% stosując szczep LS30, LS28 ograniczył zmiany chorobowe na jabłkach o 86–91% w temp. pokojowej, zaś izolat LS11 był najskuteczniejszy w temp. 3°C dając redukcję zmian o 63–72% [51]. Z kolei Qin i wsp. [72] zastosowali drożdże: *Trichosporon pullulans*, *C. laurentii*, *R. glutinis* i *Pichia membranefaciens* do pozbiorowej ochrony czerśni przed *Alternaria alternata*, *P. expansum*, *B. cinerea* i *Rhizopus stolonifer* i stwierdzili skuteczną ochronę owoców (zmiany gnilne mniejsze niż w kontroli o 73–94%) przez *T. pullulans* w temp. 25°C, zaś przez *R. glutinis* w 0°C. W badaniach laboratoryjnych Schena i wsp. [79] przebadali właściwości antagonistyczne izolatów drożdży z gatunków: *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia* spp. wobec *B. cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* i *R. stolonifer* na owocach winogron, grejpfrutach i pomi-

Tabela I

## Drożdże wykorzystywane w ochronie biologicznej roślin

Drożdże – skuteczni antagoniści	Grzyby fitopatogenne	Rośliny (plony)	Piśmiennictwo
Aplikacja po zbiorze			
<i>Cryptococcus humicola</i> , <i>Filobasidium floriforme</i> , <i>Rhodosporidium toruloides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Jabłka	[31]
<i>Pichia stipitis</i> , <i>Candida melibiosica</i> , <i>C. butyri</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Jabłka	[93]
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[51]
<i>Trichosporon pullulans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Czereśnie	[72]
<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Candida oleophila</i> , <i>Metschnikowia</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Winogrona, grapefruity, pomidory	[79]
<i>Pseudozyma fusiformata</i> , <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Monilinia laxa</i>	Brzoskwinie	[102]
<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	Brzoskwinie nektaryny	[30]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	Morele	[36]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[44]
Aplikacja przed zbiorem			
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , and <i>Pezizula malicorticis</i>	Jabłka	[49]
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Truskawki	[52]
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Epicoecum purpurascens</i>	<i>Monilinia laxa</i>	Czereśnie	[98]
<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[87]
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Winogrona	[41]
<i>Metschnikowia</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	Winogrona	[79]
<i>Candida infirmominatus</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Gruszki	[9]
<i>Candida valida</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Trichosporon asahii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Buraki cukrowe	[28]
<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida slooffiae</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Cephalosporium maydis</i>	Kukurydza	[25]
<i>Saccharomyces unispora</i> , <i>Candida steatolytica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fasola	[26]

dorach. Uzyskali bardzo wysoki poziom redukcji zgnilizn, uzależniony od gęstości zawiesin drożdży, sięgający nawet blisko 100% w przypadku *Botrytis* i *Rhizopus*, a najefektywniejszym szczepem okazał się izolat *Metschnikowia* LS15 [79]. Zhang i wsp. [102] wyizolowali spośród 210 izolatów drożdży i grzybów drożdżopodobnych 3 izolaty zidentyfikowane jako *Pseudozyma fusiformata*, *Metschnikowia* sp. i *A. pullulans*, które dobrze chroniły owoce brzoskwinie przed *Monilinia laxa* po zbiorze ograniczając występowanie zmian gnilnych odpowiednio do 29,3%, 21,3% i 29,3% (stosując gęstość komórek  $1 \times 10^8$ /ml). Badacze wykazali, że żywe komórki antagonistów w znacznym stopniu hamowały kiełkowanie zarodników i wydłużanie strzępek kiełkowych [102]. O działaniu ochronnym *Metschnikowia fructicola*

na owocach brzoskwinie i nektaryny przeciw rozwojowi *Monilinia fructigena* po zbiorze donieśli Ferrari i wsp. [30], a o zastosowaniu *Metschnikowia pulcherrima* przeciw brunatnej zgniliznie moreli pisali Grebenisan i wsp. [36]. Z kolei Janisiewicz i wsp. [44] badali zdolności różnych szczepów wyżej wymienionego gatunku drożdży do hamowania zgnilizny powodowanej przez *P. expansum* na jabłkach i uzyskali zadowalające rezultaty, chociaż zróżnicowanie między szczepami w potencjale biokontrolnym było widoczne.

Druga koncepcja stosowania drożdży do pozbiorowej ochrony owoców i warzyw dotyczy aplikacji tych drobnoustrojów przed zbiorem, jeszcze podczas uprawy. Wiele patogenów właśnie wtedy dostaje się do rośliny (infekcje ukryte i spokojne), a powodowane przez nie

zgnilizny pojawiają się dopiero na dojrzałych owocach [41]. Użycie drożdży na polu, szczególnie przed infekcją patogenem, może wówczas być bardziej efektywne. Oczywiście antagonistą wykorzystywaną do aplikacji polowej powinien być bardziej odporny niż antagonistą stosowany po zbiorze na niskie stężenia składników odżywczych, promieniowanie UV, suszę, gwałtowne zmiany klimatu czy obecność środków chemicznych [41, 49]. Powinien również wykazać się szybko i skuteczną zdolnością kolonizacji powierzchni roślin, zwłaszcza organów docelowych [41]. Drożdże aplikowane przed zbiorem przedstawiono w Tab. I. Gatunki *A. pullulans* oraz *R. glutinis* w badaniach Leibnigera i wsp. [49] po zaaplikowaniu na jabłonie wykazały wysoką adaptację do warunków polowych i przechowywania w chłodni przez okres 6 miesięcy. Stwierdzono, że ochrona kwiatów truskawki, które stanowią wrota infekcji, jest kluczową strategią zapobiegania rozwojowi *B. cinerea* zarówno przez środki biologiczne, jak i chemiczne. Stwierdzono, że grzyby drożdżopodobne *A. pullulans* oraz drożdże *C. oleophila* były bardziej efektywne wobec zgnilizny przechowalniczej *B. cinerea* na truskawkach, gdy były stosowane na polu w porównaniu z użyciem bezpośrednio po zbiorze. Oba drobnoustroje kolonizowały kwiaty i nie dopuszczały do infekcji przez *B. cinerea* [52]. Aplikacja *A. pullulans* i *Epicoccum purpurascens* na kwiaty czereśni redukowała liczbę ukrytych infekcji przez *Monilinia laxa* w zielonych owocach [98]. Dobre rezultaty może dać zastosowanie drożdży tuż przed zbiorem, aby przeciwdziałać rozwojowi patogenów w rankach powstałych podczas uszkodzeń w trakcie zbioru lub po nim. *Candida sake* zaaplikowane 2 dni przed zbiorem skutecznie przeciwdziałały rozwojowi niebieskiej zgnilizny na jabłkach przez 4 miesiące przechowywania [87]. *A. pullulans* zastosowany na truskawki bezpośrednio przed zbiorem redukował zgniliznę *Rhizopus* o 72%, natomiast słabo działał na *Botrytis* [52]. Innym wskazaniem dla aplikacji preparatów drożdżowych przed zbiorem jest specyfika owoców, które posiadają woskowe naloty (winogrona) lub niekorzystny jest ich kontakt z wodą podczas przechowywania (truskawki). Ben-Arie i wsp. [41] badali działanie drożdży *P. guilliermondii* na hamowanie zgnilizny pozbiorowej na winogronach aplikując antagonistę przed i po zbiorze owoców. Stwierdzili skuteczny efekt hamujący w obu przypadkach, lecz preparat aplikowany po zbiorze usunął powierzchniowy nalot, co nie było korzystne dla owoców [41]. Schena i wsp. [79] zastosowali szczep *Metschnikowia* LS15 na owoce winogron przed zbiorem i przy pięciokrotnych opryskach zawieszają antagonisty uzyskali redukcję zmian chorobowych wywołanych *B. cinerea* o 38,2%, jednak populacja drożdży w warunkach polowych szybko zmniejszała się. Drożdże *Cryptococcus infirmominatus*, *C. laurentii* i *R. glutinis* zastosowano 1 dzień lub 3 tygodnie przed zbiorem do hamowania szarej i niebieskiej

zgnilizny na gruszkach. Obiecujące wyniki uzyskano dla *C. infirmominatus*, które po aplikacji przez 3 tygodnie utrzymywały liczebność na wysokim poziomie i kilkakrotnie zmniejszały ogólny stan zmian chorobowych w trakcie przechowywania owoców [9].

### 3. Zastosowanie drożdży do hamowania fitopatogenów grzybowych pochodzenia glebowego

El-Tarabily [28] doniósł o zastosowaniu trzech gatunków drożdży: *Candida valida*, *R. glutinis* i *Trichosporon asahii* z ryzosfery buraka cukrowego, które indywidualnie lub w kombinacji redukowały zgorzel siewek i zgniliznę korzeni buraka cukrowego powodowaną przez *Rhizoctonia solani* AG-2-2. Wykazano, że za aktywność przeciwgrzybową *C. valida* odpowiedzialne są różne mechanizmy: produkcja  $\beta$ -1,3-glukanazy, związków lotnych, metabolitów przeciwgrzybowych, obecność lotnych związków inhibujących stwierdzono u *R. glutinis* a u *T. asahii* wydzielanie metabolitów przeciwgrzybowych. Badane drożdże stosowano również w kombinacji do wzmocnienia działania protekcyjnego buraka cukrowego przed chorobami [28]. El-Mehalawy i wsp. [25] donieśli o zastosowaniu drożdży *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Candida slooffiae*, *Rhodotorula rubra* i *Trichosporon cutaneum* indywidualnie lub łącznie do znacznej redukcji *Cephalosporium maydis*, grzyba powodującego chorobę kukurydzy. Drożdże produkowały dyfuzyjne metabolity antygrzybowe i enzymy degradujące ścianę komórkową [25]. Natomiast drożdże z ryzosfery *Saccharomyces unispora* i *Candida steatolytica* znacznie ograniczały wzrost *Fusarium oxysporum*, przyczynę fuzariozy fasoli, produkując związki antybiotyczne [26] (Tab. I). Sugeruje się, że wydzieliny korzeni odgrywają znaczną rolę w efektywności drożdży w biokontroli [27].

Ważnym zjawiskiem odpowiadającym za skuteczność czynników biokontroli wobec grzybów patogennych pochodzenia glebowego jest zdolność do ochrony nasion i korzeni roślin przejawiająca się szybką kolonizacją powierzchni korzeni przez antagonistę. Zjawisko to nazwano kompetencją ryzosfery [3]. W pracy El-Tarabily [28] stwierdzono, że drożdże *C. valida* oraz *T. asahii* skolonizowały 95% korzeni po 6 dniach od pojawienia się korzeni buraka cukrowego, zaś *R. glutinis* skolonizowała 90% korzeni po 8 dniach. Stwierdzono, że gęstość populacji poszczególnych drożdży zmieniała się w zależności od głębokości w glebie i była największa w pierwszych 4 cm systemu korzeniowego. Jednak badania tego zjawiska u drożdży są nieliczne [26, 28], a warto byłoby wziąć je pod uwagę jako warunek wstępny do skutecznej kontroli biologicznej chorób korzeni. Obserwowany w badaniach brak niezawodnej kontroli może być związany z niepowodzeniami w kolonizacji korzeni przez badane drobnoustroje [27].

Wykazano, że niektóre drożdże pochodzące z ryzo-sfery lub gleby mogą wykazywać właściwości stymulujące wzrost roślin, a więc można je zaliczyć do grupy drobnoustrojów PGP (Plant Growth Promoting), do której należą rhizobakterie oraz grzyby strzępkowe np. z rodzaju *Trichoderma*. Drobnoustroje zaliczane do tej grupy mogą wspomagać wzrost roślin poprzez produkcję fitohormonów (gibereliny, auksyny, cytokininy), witamin, zwiększenie dostępności niektórych pierwiastków biogennych (azot, fosfor), uruchamianie składników pokarmowych z gleby i materii organicznej (np. produkcja sideroforów), zwiększenie intensywności pobierania i przemieszczania składników mineralnych oraz obniżanie aktywności patogenów glebowych [27, 99]. W literaturze można znaleźć kilka doniesień sugerujących, że drożdże wywierają efekt stymulacyjny na wzrost roślin. Peron di i wsp. [67] zastosowali *Sporobolomyces roseus* do zwiększenia wydajności pszenicy o 16–30%, zaś Abd El-Hafez i Shehata [2] użyli drożdży z rodzaju *Rhodotorula* do zwiększenia wzrostu i owocowania pomidorów. Inokulacja gleby wspomnianymi wcześniej drożdżami *C. valida*, *R. glutinis* i *T. asahii* korzystnie wpływała na wzrost buraka cukrowego zarówno w obecności, jak i przy braku patogenu *R. solanii* w próbach szklarniowych. Wykazano, że inokulacja drożdżami spowodowała wzmocniony wzrost korzenia i pędu na skutek aktywności kwasu indolo-3-octowego (IAA), giberelin (GA3) i prawdopodobnie innych regulatorów wzrostu [28]. El-Mehalawy i wsp. [25] zauważyli, że zastosowanie drożdży *C. glabrata*, *C. maltoza*, *C. slooffiae*, *R. rubra* i *T. cutaneum* pojedynczo lub w kombinacji sprzyjało wzrostowi kukurydzy przy nieobecności *C. maydis*. El-Mehalawy [26] zauważył pozytywne działanie drożdży *S. unispora* i *C. steatolytica* na wzrost fasoli wtedy, gdy grzyb *F. oxysporum* był nieobecny.

Obecnie duże nadzieje są pokładane w działaniu drobnoustrojów endofitycznych, czyli bytujących naturalnie w tkankach roślinnych w określonej fazie cyklu życiowego i nie powodujących w nich żadnych uszkodzeń [68, 84]. Oprócz bakterii i grzybów strzępkowych, również niektóre drożdże endofityczne były badane pod kątem aktywności stymulującej wzrost roślin. Nasar i wsp. [64] wykazali, że izolat drożdży *Wiliopsis saturnus* był zdolny do produkcji IAA i kwasu indolo-3-pyrogonowego (IPYA) *in vitro*, na podłożu wzbogaconym w L-tryptofan jako prekursor auksyn. Wprowadzenie tych drożdży do sadzonek kukurydzy poprzez zanurzenie przyciętych korzeni w ich zawiesinie znacznie wzmocniało ich wzrost w warunkach szklarniowych w glebie wzbogaconej tryptofanem lub bez tryptofanu. Uzyskano wzrost suchej masy roślin, wydłużenie korzeni i pędów oraz oznaczono wyższe stężenia IAA i IPYA w porównaniu z roślinami kontrolnymi z tym, że działanie drożdży było wzmocnione obecnością L-tryptofanu w glebie [64]. Oprócz wyżej wspomnianych substancji

IAA i IPYA, stwierdzono zdolność drożdży do wytwarzania takich regulatorów wzrostu jak etylen [54] i GA3 [28]. Istnieją również dowody, że poliaminy: putrescyna, spermidyna i spermina odgrywają pozytywną rolę jako modulatory wzrostu roślin wyższych [33]. Ze względu na obfitość występowania w środowisku nie są one uważane za hormony, lecz tylko za regulatory wzrostu roślin.

#### 4. Mechanizmy antagonistycznego działania drożdży na wzrost grzybów fitopatogennych

Mechanizmy odgrywające znaczną rolę w aktywności biokontrolnej antagonistycznych drożdży wobec grzybów patogennych roślin obejmują: współzawodnictwo o składniki odżywcze i przestrzeń, produkcję enzymów degradujących ścianę komórkową, produkcję metabolitów przeciwgrzybowych i związków lotnych, indukcję odporności gospodarza oraz mykopasożytnictwo [27]. Badania dotyczące mechanizmów oddziaływania drożdży na grzyby patogenne prowadzono na przedstawicielach różnych rodzajów: *Debaryomyces* [77], *Kloeckera* [57], *Sporothrix* [37], *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* [87], *Sporobolomyces* [31, 32, 43], *Metschnikowia* [46, 102], *Tilletiopsis* [65], *Rhodotorula* [50, 74], *Cryptococcus* [4, 31, 50], *Aureobasidium* [12, 42, 102], *Pichia* [55, 76], *Candida* [34, 57, 73], *Pseudozyma* [71, 102]. Skuteczne działanie czynnika biokontroli może być efektem występowania kilku mechanizmów jednocześnie [22]. Według El-Tarabily i Sivasithamparam [27] zrozumienie sposobów działania antagonistycznego drożdży pomoże nie tylko w udoskonaleniu ich aktywności i efektywności jako czynników biokontroli, ale umożliwi również rozwój kryteriów do szybkiego skringu czynników ochrony biologicznej.

##### 4.1. Konkurencja o składniki odżywcze i przestrzeń

Grzyby fitopatogenne dostają się do tkanek rośliny poprzez bezpośrednią penetrację strzępek przez kutikulę i epidermę rośliny (pasożyty obligatoryjne) lub poprzez ranki, uszkodzone tkanki czy naturalne otwory: aparaty szparkowe i przetchlinki (pasożyty względne). W obszarach tych znajduje się wiele składników odżywczych. Czynniki biologicznej ochrony mogą skutecznie współzawodniczyć z patogenem o zajęcie miejsca infekcji i wykorzystując składniki, wypierać patogen poprzez zapobieganie kiełkowaniu lub infekcji [32]. W niektórych badaniach obejmujących obserwacje mikroskopowe autorzy wykazali, że komórki drożdży występują w bliskim związku ze strzępkami lub agregatami grzybni, gdzie pojawiają się wydzieliny grzyba i nie oznacza to tylko istnienia chemoatrakcji komórek drożdżowych w kierunku strzępek znajdujących się na powierzchni liści, korzeni, owoców, ale również jest dowodem na występowanie zjawiska konkurencji

o pokarm i przestrzeń [6, 13]. Stwierdzono, że wcześniejsze (poprzedzające) zajęcie przez drożdże *P. guilliermondii* i *C. oleophila* miejsc infekcji grzyba i wykluczenie w ten sposób patogenu jest jednym z mechanizmów skutecznej ochrony jabłek przed szarą pleśnią [60, 96]. Współzawodnictwo o pokarm było bardzo intensywnie badane również w innych układach drożdże – grzyb patogenny m.in.: *R. glutinis* i *C. laurentii* – *B. cinerea* lub *P. expansum* [13], *D. hansenii* – *P. digitatum* [19], *C. laurentii* i *S. roseus* – *B. cinerea* [31, 32], *P. guilliermondii* – *P. italicum* [6], *C. oleophila* – *P. digitatum* [10], *M. pulcherrima* – *B. cinerea* [69, 83], *A. pullulans* – *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *A. niger* [12], *P. fusiformata*, *Metschnikowia* sp. AP47 i *A. pullulans* – *M. laxa* [102]. Ten rodzaj oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami występuje zwłaszcza na owocach zawierających cukry na zranionych powierzchniach. Szybkie rozmnażanie drożdży pomaga im w eliminacji patogenów grzybowych, np. kiełkowanie zarodników *B. cinerea* było całkowicie zahamowane w czasie wspólnej hodowli *in vitro* z komórkami *M. pulcherrima*, natomiast nie stwierdzono działania hamującego wzrost pleśni podczas użycia komórek autoklawowanych lub filtratów komórkowych [83]. Podobne obserwacje zachowania zarodników *M. laxa* w obecności żywych i inaktywowanych komórek oraz filtratów pochodzących poczynili Z h a n g i wsp. [102].

#### 4.2. Produkcja czynników antybiotycznych

Jest to zjawisko charakterystyczne dla wielu drobnoustrojów efektywnie oddziałujących na inne mikroorganizmy. U drożdży nie jest obserwowane powszechnie. Istnieje kilka doniesień w literaturze wskazujących na ich zdolność do produkcji tego typu metabolitów wtórnych. Drożdże *Pseudozyma*, wytwarzają metabolity o aktywności antymikrobiologicznej. *Pseudozyma flocculosa* wytwarza antybiotyki zawierające kwasy tłuszczowe, które działają na przepuszczalność błony komórkowej organizmu docelowego, hamując jego wzrost [8]. Wykazano, że mutanty *Pseudozyma* nie produkujące glikolipidu flokulozyny działały słabiej na mączniaka [71]. Stwierdzono, że niektóre szczepy *P. fusiformata* wydzielają kwas ustilaginowy, glikolipid aktywny wobec różnych gatunków drożdży i grzybów strzępkowych [102]. Grzyb drożdżopodobny *Sporothrix flocculosa* wytwarza dwa antybiotyki – kwas heptadekanoinowy oraz metyloheptadekanoinowy, które skutecznie redukowały kiełkowanie zarodników oraz wzrost *B. cinerea* i *F. oxysporum* [38]. Urquhart i Punja [92] oczyścili ester kwasu tłuszczowego o aktywności przeciwgrzybowej z *Tilletiopsis pallescens*, który skutecznie ograniczał rozwój mączniaka *Podospheera xanthii*. Był również aktywny wobec patogenów roślinnych pochodzenia glebowego takich jak: *F. oxysporum*, *Phoma* sp., *Pythium aphanidermatum* [92]. Naturalne drożdże winiarskie z rodzaju *Saccharomyces*

i *Zygosaccharomyces* również *in vitro* hamowały wzrost *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* [85]. Natomiast stwierdzono, że *A. pullulans* produkuje aureobazydynę A, przeciwgrzybowy cykliczny depsipeptyd, który hamuje kiełkowanie zarodników, wydłużanie strzępek kiełkowych i wzrost grzybni *Monilinia fructicola* [100].

Badania nad zjawiskiem antybiozy obejmują wspólne hodowle kolonii obu drobnoustrojów na płytkach Petriego na podłożach stałych i pomiary stref inhibicji [83, 85, 94], hamujące działanie filtratów pochodzących na wzrost i kiełkowanie zarodników fitopatogenu *in vitro*, wykrzystanie sztucznie zranionych owoców lub liści, zakażonych antagonistą i patogenem [56, 83]. M a s i h i wsp. [56] wykazali bójcze działanie *P. membranefaciens* wobec *B. cinerea* w doświadczeniach płytkowych (strefy zahamowania wzrostu) oraz w probówkach, w bulionie, gdzie stwierdzono utratę zdolności do kiełkowania i następnie tworzenia kolonii. Obserwacje mikroskopowe wykazały koagulację protoplazmy komórek grzyba w obecności *P. membranefaciens* i utratę jej zawartości [56]. Z kolei P a y n e i wsp. [66] zauważyli, że *S. cerevisiae* i *Debaryomyces* sp. znacznie redukowały wzrost wybranych pleśni na skutek działania związków lotnych.

Wykazano, że drożdże z rodzaju *Candida* i *Rhodotorula* wytwarzają siderofory, chelatory żelaza ze środowiska ubogiego w ten pierwiastek. Kwas rodotorulowy wytwarzany przez *Rhodotorula* miał zdolność hamowania kiełkowania zarodników różnych patogenów m.in. *B. cinerea* [11].

Niektóre doniesienia sugerują, że drożdże wytwarzające tzw. toksynę killerową mogą znaleźć zastosowanie w biologicznej kontroli chorób pochodzenia grzybowego. Toksyny killerowe są białkami lub glikoproteinami wiążącymi struktury polisacharydowe ścian komórkowych drożdży np. (1-6)- $\beta$ -D-glukanu [39]. Zjawisko produkowania toksyny przez drożdże jest przedmiotem badań naukowców od wielu lat, szczególnie pod kątem ich wykorzystania w przemyśle spożywczym i fermentacyjnym [75, 76]. W a l k e r i wsp. [94] wskazali na zdolność drożdży killerowych (m.in. *P. anomala* NCYC 435, *S. cerevisiae* 28, *P. membranefaciens* 333) do hamowania grzybów patogennych z gatunków *Heterobasidion annosum*, *R. solani*, *F. equiseti*, *B. cinerea*. Santos i Marquina [76] i Santos i wsp. [77] prowadzili badania nad toksyną killerową *P. membranefaciens* CYC 1106, która posiada aktywność przeciwgrzybową i przeciwdrożdżową, i wykazali właściwości hamujące wzrost *B. cinerea* CYC 20003 *in vitro* i *in vivo* na sztucznie zakażonych grzybem jabłkach podczas przechowywania. Określili również mechanizm działania toksyny killerowej poprzez wywoływanie zakłóceń gradientów elektrochemicznych błony plazmatycznej, co powodowało wyciek jonów przez nieregulowane kanały jonowe w błonie i śmierć komórek [75].

### 4.3. Produkcja enzymów litycznych

Wydzielanie enzymów hydrolitycznych, zwłaszcza chitynaz i glukanaz jest cechą powszechną u wielu efektywnych czynników kontroli biologicznej. Cecha ta została bardzo dobrze poznana u grzybów strzępkowych *Trichoderma* [71, 99], ale stwierdzono ją również u niektórych drożdży. Zdolność do produkcji  $\beta$ -1,3-glukanazy stwierdzono u *Pichia anomala*, *P. membranaefaciens*, *R. glutinis*, *C. laurentii*, *A. pullulans*, *Tilletiopsis albescens* i *T. pallascens*, *Candida guilliermondii* i *C. oleophila*. Drożdże hamowały wzrost takich patogenów jak: *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *A. niger*, *Sphaerotheca fuliginea*, *P. xanthii* na owocach lub liściach [12, 13, 45, 55, 73, 92]. Natomiast zdolność do produkcji chitynazy stwierdzono u drożdży *Candida saitoana*, *C. guilliermondii*, *C. oleophila*, *T. albescens* i *T. pallascens* oraz *A. pullulans* podczas interakcji odpowiednio z *B. cinerea* [24, 73], *P. xanthii* [92] i *P. expansum* [12], a także u drożdży *Metschnikowia* [78]. Jijakli i Lepoivre [45] badali uzdolnienia drożdży *P. anomala* do wydzielania  $\beta$ -1,3-glukanazy w obecności induktorów takich jak laminaryna i fragmenty ściany komórkowej *B. cinerea* i stwierdzili wyższą produkcję enzymu w obecności fragmentów ściany komórkowej grzyba jako substratu. Oczyszczony enzym z filtratów hodowlanych *P. anomala* wykazał *in vitro* silniejszy efekt inhibujący na strzępki kiełkowe niż na kiełkowanie konidiów i powodował wyciek cytoplazmy i pęcznienie komórek. Obecność enzymu była również wykrywana na jabłkach traktowanych drożdżami *P. anomala* hodowanymi w obecności fragmentów grzybni patogenu, co również potwierdzało słuszność hipotezy o roli  $\beta$ -1,3-glukanazy w biokontroli wzrostu fitopatogennych grzybów [45]. Podobne obserwacje poczynili Castoria i wsp. [13] oraz Masih i Paul [55] podczas hodowli drożdży w obecności ścian komórkowych *B. cinerea* i *P. expansum*. Natomiast Saligkariasi i wsp. [73] w badaniach drożdży *C. guilliermondii* i *C. oleophila* stwierdzili wyższe aktywności dwóch powyższych enzymów w podłożu hodowlanym zawierającym glukozę, zaś niższe, gdy źródłami węgla była laminaryna lub ściany komórkowe grzybni *B. cinerea*. Wielu badaczy obserwowało wraz z produkcją enzymów litycznych silną adhezję i połączenie żywych komórek drożdży do zarodników i strzępek, wskazując na bezpośrednie rozpoznawanie i interakcje pomiędzy antagonistycznymi drożdżami, a patogenami [6, 13, 17, 83, 94]. Arrasi i wsp. [6] zaobserwowali przyłączanie się komórek *P. guilliermondii* do grzybni *P. italicum*, a następnie degradację ściany komórkowej w bezpośredniej bliskości. Podobnie El Ghaouth i wsp. [24] zauważyli poważne uszkodzenia strzępek *B. cinerea* w miejscach bezpośredniego kontaktu z *C. saitoana*. Enzymy degradujące ścianę komórkową patogenu, umożliwiając inwazję hiperparazytów [27].

### 4.4. Indukcja odporności roślin

Rośliny wyższe zdolne są do samodzielnej obrony przed patogenami i szkodnikami poprzez wydzielanie w tkankach różnorodnych związków chemicznych oraz enzymów np. amoniakolizy fenyloalaniny [18], fitoaleksyn (skoparonu, skopoletyny, umbeliferonu) [7, 18], peroksydaz [29] i etylenu [18]. Wojtkowiak-Gębarowska [99] opisała rolę grzybów z rodzaju *Trichoderma* w uruchamianiu mechanizmów odporności roślin w odpowiedzi na atak grzybów patogennych. Droby i wsp. [18] stwierdzili, że takie właściwości posiadają drożdże *Candida oleophila*, a Ippolito i wsp. [40] wskazali na drożdżaka *A. pullulans*. Natomiast Ghaouth i wsp. [35] zaobserwowali po traktowaniu jablek drożdżami *C. saitoana* pojawienie się specyficznych struktur obronnych, takich jak brodawki i zgrubienia w miejscu zranionej tkanki owoców i stwierdzili zbieżność tego zjawiska z produkcją chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy. Zaobserwowano również wzrost aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy w owocach głożyny (jujuby) po aplikacji drożdży *C. laurentii* i indukcję ekspresji genu *Glu-1* w tkance owoców, którego produkt może odgrywać rolę w odpowiedzi rośliny na atak *A. alternata* (Fr.) Keissler i *P. expansum* Link [88, 89]. Owoce pomidora inokulowane *P. guilliermondii* CNM 2.1801 wykazały zachowanie obronne poprzez produkcję peroksydazy, polifenolooksydazy, dysmutazy nadtlenkowej, katalazy, amoniakolizy fenyloalaniny, chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy [103]. Analiza proteomiczna owoców brzoskwini i czereśni wykazała z kolei, że *P. membranaefaciens* Hansen wzmacniała ich odporność przeciwko *P. expansum* Link poprzez indukcję produkcji enzymów antyoksydacyjnych i białek związanych z patogenezą [14, 15]. Badania Nantwana i wsp. [63] na owocach chili inokulowanych drożdżami *P. guilliermondii* R13 i patogenem *Colletotrichum capsici* również potwierdziły indukcję mechanizmów obronnych owoców poprzez wydzielanie fitoaleksyny, kapsidiolu oraz enzymów: amoniakolizy fenyloalaniny, chitynazy i glukanazy przez zranione tkanki. Badacze zaobserwowali również zmiany morfologiczne grzyba [63]. Aktywacja odpowiedzi gospodarza roślinnego na atak patogenów na liściach i owocach jest podobna do aktywacji zachodzącej podczas ataku patogenów infekujących korzenie roślin. Zjawisko to wciąż jest badane, a rola drożdży jest słabo poznana.

### 5. Poprawa skuteczności czynników biokontroli

Czynniki biologiczne posiadają wiele ograniczeń i nie jest zadaniem prostym znaleźć, rozwinąć i wprowadzić w życie praktyczne w zastosowaniu preparaty ochrony biologicznej. Niemniej jednak jest wiele możliwości łączenia różnych czynników biokontroli ze sobą, bądź

z metodami agronomicznymi, fizycznymi lub chemicznymi, co daje efekt synergistyczny [82]. W przypadku stosowania drożdży glebowych, z ryzosfery, skuteczne może być wzbogacanie gleby w składniki odżywcze lub stosowanie specjalnych powłok na nasiona, które powinny pomóc czynnikom biokontroli w przeżyciu i rozmnażaniu w spermosferze i ryzosferze oraz w ich aktywności biologicznej [27]. Już F o k k e m a i wsp. [27] zaobserwowali, że sacharoza i ekstrakt drożdżowy zwiększały gęstość występujących naturalnie lub sztucznie wprowadzanych drożdży na liściach pszenicy przedłużając supresję chorób liści. E l - T a r a b i l y [28] zastosował w swojej pracy otręby sojowe jako bazę odżywczą, zapewniającą dobry wzrost wegetatywny, namnażanie i przeżywalność wprowadzonych drożdży. Natomiast M e d i n a i wsp. [58] wzbogacili glebę w dwa rodzaje odpadów rolniczych zawierających *Yarrowia lipolytica*: suche wytloki z oliwek i wytloki buraczane, i stwierdzili znacznie wyższą efektywność inokulum drożdżowego tylko w glebie wzbogaconej składnikami odżywczymi. Szeroko stosowanym w badaniach adiuwantem jest chlorek wapnia działający pozytywnie na *Candida* sp. i *P. guilliermondii* w kontroli wzrostu *B. cinerea* [57], a także na *P. guilliermondii* i *P. membranefaciens* przeciwko *R. stolonifer* [90]. Działanie chlorku wapnia i dwuwęglanu sodu łącznie z *A. pullulans* na ograniczenie wzrostu *B. cinerea* na czereśniach badali I p p o l i t o i wsp. [42] i stwierdzili ograniczenie zgnilizny owoców o 62–75% podczas stosowania po zbiorze. Dwuwęglan sodu był stosowany również w badaniach S p a d a r o i wsp. [81] nad użyciem *M. pulcherrima* przeciwko niebieskiej zgniliznie na jabłkach oraz *C. oleophila* przeciwko antraknozie papai wywołanej przez *Colletotrichum gloeosporioides* [34]. E l - G h a o u t h i wsp. [23] stosowali drożdże *C. saitoana* z 0,2% roztworem 2-deoksy-D-glukozy o udowodnionych właściwościach przeciwgrzybowych i stwierdzili wyższą skuteczność użytej mieszaniny niż samych drożdży na zgniliznę *B. cinerea* i *P. expansum* podczas stosowania na jabłkach i owocach cytrusowych w przechowalni. Poziom zgnilizny na jabłkach był niższy o 85–95% w porównaniu z kontrolą, zaś użycie samych drożdży ograniczało zgniliznę o 45–85%. Natomiast na owocach cytrusowych obserwowano ograniczenie zgnilizny o 63–75%. Efekt działania mieszaniny drożdży z analogiem glukozy był zbliżony do stosowanych komercyjnie fungicydów [23]. Y u i wsp. [101] zastosowali mieszaninę drożdży *C. laurentii* i chitozanu w stężeniu 0,1% i uzyskali efekt synergistyczny w hamowaniu niebieskiej zgnilizny jabłek. Redukcja wystąpienia zmian chorobowych sięgała ok. 63–86% w zależności od lepkości roztworów chitozanu, natomiast same drożdże ograniczały rozwój pleśni o 52%. Stwierdzono, że chitozan w powyższym stężeniu skutecznie hamował lub spowalniał kiełkowanie zarodników grzyba *P. expansum* i tym samym wspomagał hamujące działanie drożdży [101].

Podjęto również próbę zastosowania liofilizowanego filtratu grzyba *Lentinula edodes* w mieszaninie z *C. laurentii* LS28 do hamowania wzrostu *P. expansum* na jabłkach i wydzielania patuliny. Stwierdzono, że filtrat *L. edodes* hamował kiełkowanie konidiów pleśni i stymulował rozwój drożdży w miejscach zranień jabłek. Podczas użycia 2% w/v roztworu filtratu z zawiesiną drożdży o gęstości  $10^6$  komórek/ml uzyskano całkowitą inhibicję wzrostu *Penicillium* na zranionych jabłkach w warunkach laboratoryjnych oraz nie stwierdzono obecności patuliny [91].

Inną metodą poprawy skuteczności drożdży antagonistycznych jest stosowanie mieszaniny gatunków, które może rozszerzyć spektrum aktywności, może wzmocnić efektywność pozwalając na redukcję częstości aplikacji oraz może pozwolić na kombinację różnych sposobów biokontroli bez uciekania się do inżynierii genetycznej, co potwierdzili L e i b i n g e r i wsp. [49] komponując mieszaninę z 2 szczepów *A. pullulans* i 1 szczepu *R. glutinis*. Z kolei mieszanina saprofitycznych drożdży *C. laurentii* i *C. infimo-miniatus* izolowanych z owoców gruszy skutecznie ograniczała wzrost *P. expansum* Link na gruszkach i jabłkach (odpowiednio o 91 i 84%) w przechowalni [16].

Niektóre drożdże wykazują oporność na stosowane w uprawach pestycydy i takie szczepy mogłyby być włączone w zintegrowane programy kontroli chorób roślin prowadzące do supresji patogenu przy stosowaniu mniejszej ilości fungicydów zarówno podczas uprawy jak i po zbiorze. Zredukowane ilości fungicydu mogą stresować i osłabiać patogen, czyniąc go bardziej podatnym na atak antagonistów. Integracja czynników biologicznych z fungicydami oferuje możliwość redukcji ilości wprowadzanych na produkty roślinne, w tym owoce i warzywa substancji chemicznych [41, 82]. Takie właściwości wykryto u *A. pullulans* i *C. oleophila* [52]. Drożdże *C. infimo-miniatus* w połączeniu z dwukrotnie niższą niż komercyjna, dawką tiabendazolu hamowały w 91% wzrost niebieskiej zgnilizny na jabłkach w przechowalni [16]. Również *A. pullulans* LS30, *C. laurentii* LS28 i *R. glutinis* LS11 mogły być stosowane w połączeniu z niską dawką benomylu dając dobry efekt ochronny jabłek (redukcja zmian o 25–59%) przed *B. cinerea* i *P. expansum* [51].

Badano również możliwość łączenia drożdży ochronnych z warunkami przechowalniczymi owoców np. temperaturą lub kontrolowaną atmosferą. W swoich badaniach Q i n i wsp. [72] zaobserwowali, że kombinacja kontrolowanej atmosfery zawierającej 10% O<sub>2</sub> i 10% CO<sub>2</sub> i drożdży z gatunków *C. laurentii* i *R. glutinis* była bardziej efektywna od działania samych drożdży antagonistycznych w hamowaniu *P. expansum* i *A. alternata* na owocach czereśni. Mechanizm aktywności antagonistycznych drożdży w warunkach kontrolowanej atmosfery nie został dokładnie poznany. Zwiększony poziom CO<sub>2</sub> ma nie tylko wpływ na aktywność patogenu, działa też na tkanki roślinne, utrzymując naturalną odporność



na organizmy chorobotwórcze. Niektóre drożdże również wykazują zdolność do utrzymania normalnego wzrostu w warunkach podwyższonego stężenia CO<sub>2</sub>, np. *C. laurentii* lub *R. glutinis* i one mogą być stosowane w połączeniu z kontrolowaną atmosferą. Rola drożdży jest również bardzo istotna przy zmianie warunków przechowywania owoców [72].

## 6. Preparaty ochronne oparte o drożdże

Krytycznym czynnikiem rozważanym podczas selekcji antagonistów do zastosowania komercyjnego jest możliwość technologii produkcji i stabilizacji komórek, dająca optymalnie skuteczną formę preparatu. Wciąż istnieje potrzeba licznych badań dotyczących praktycznych aspektów produkcji biomasy i odpowiedniej formuły, aby otrzymać produkt stabilny, skuteczny i bezpieczny. Główne wymagania rynku biofungicydów są następujące: opłacalna i wydajna produkcja biomasy mikroorganizmów, ich zdolność do przeżycia procesów dalszej obróbki, stabilność w trakcie przechowywania i odpowiedni okres trwałości produktu końcowego nawet w podwyższonych temperaturach, tolerancja na różne czynniki środowiskowe i stała skuteczność w warunkach aplikacji w komercyjnie ustalonych dawkach [59, 82]. Istotne jest, aby preparat pomimo produkcji biomasy na dużą skalę, zachowywał właściwości kultur laboratoryjnych, odpowiednią czystość, stabilność genetyczną, żywotność, zdolność kolonizacji powierzchni roślinnych oraz mechanizmy działania [22]. Procesy produkcji biomasy drożdży są dobrze poznane i szeroko opisywane w literaturze. Aby były one opłacalne należy wykorzystywać surowce odpadowe jako składniki podłoży hodowlanych, a czas trwania hodowli bioreaktorowych nie powinien przekraczać 24–30 godz. [22]. Natomiast przygotowanie odpowiedniej formuły preparatu handlowego wciąż stanowi problem. Wybór metody utrwalenia komórek, dodatek materiałów objętościowych, emulgatorów, adiuwantów i innych niezbędnych substancji są

wciąż przedmiotem badań. Rozważa się wykorzystanie płynnej zawiesiny komórek, jak i ich utrwalenie różnymi metodami zamrażania bądź suszenia w obecności substancji ochronnych. Melini i wsp. [59] stwierdzili, że skutecznymi metodami przygotowania komórek *P. anomala* jest liofilizacja i suszenie próżniowe, gdyż płynna formuła preparatu drożdżowego niesie ze sobą ograniczenia praktyczne związane z transportem i przechowywaniem, zaś suszenie fluidyzacyjne prowadzi do niszczenia zbyt dużej liczby komórek. Przeżywalność *P. anomala* bezpośrednio po procesie liofilizacji wynosiła ok. 60–75% bez względu na stężenie protektantów (trehalozy, sacharozy) i spadała nieznacznie przez 6 miesięcy przechowywania w temperaturze pokojowej, a po roku drożdże liofilizowane w medium z dodatkiem trehalozy utrzymywały przeżywalność na poziomie ok. 50%. Drobnoustroje zachowały również swoje właściwości antagonizacyjne wobec pleśni na ziarnie zbóż. Autorzy także dość wysoko ocenili przydatność suszenia próżniowego do sporządzenia formuły wysuszonych drożdży [59]. Z kolei Abdias i wsp. [1] prowadzili zamrażanie drożdży *C. sake* w różnych temperaturach i ich liofilizację oraz określali przydatność substancji ochronnych takich jak cukry, poliole, związki azotowe i mleko odtłuszczone. Wysokie przeżywalności komórek (85–89%) uzyskali podczas zamrażania drożdży w mleku w temperaturach –12°C i –20°C. Natomiast po liofilizacji w mleku jako substancji ochronnej przeżywalność komórek wyniosła ok. 29%, a w mieszaninie mleka i laktozy oraz mleka i sacharozy (po 10% w/v) wzrosła do 36–40%. Spośród badanych protektantów najskuteczniejsze działanie oprócz mleka wywierały dwucukry podnosząc przeżywalność o ok. 12% [1]. Natomiast Liu i wsp. [53] dowodzili, że płynna formuła preparatów drożdżowych może być alternatywą dla form mrożonych lub suszonych ze względu na niższe koszty produkcji. Stwierdzili oni, że drożdże *C. laurentii* wykazywały przeżywalność sięgającą powyżej 50% w zawieszynie z dodatkiem trehalozy wzbogaconej kwasem L-askorbinowym, zaś komórki *P. membranefaciens* przeżywały na

Tabela II

Wykaz preparatów drożdżowych do stosowania w ochronie owoców i warzyw

Preparat	Drożdże	Fitopatogen	Producent	Piśmiennictwo
Aspire™	<i>Candida oleophila</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Geotrichum</i>	Ecogen Inc. (USA)	[18, 20, 95]
YieldPlus	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i>	Anchor Yeast (Afryka Pd.)	[18, 20, 95]
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>	AgroGreen (Izrael)	[22, 95]
Nex0101	<i>Candida oleophila</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Botrytis</i>	Bionext (Belgia) [22]	
Inovacoat, Inovacure	<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis</i>	Nova Technologies (Kanada)	[22]
Candifruit*	<i>Candida sake</i>	Różne grzyby patogenne	Sipcam-Inagra S.A. (Hiszpania)	[22, 86]
BoniProtect	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Pezizcula</i> , <i>Nectria</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilinia</i>	BioProtect (Niemcy)	[95]

poziomie 75–82% w zawieszynie zawierającej galaktozę i dodatek kwasu askorbinowego podczas trzymiesięcznego przechowywania w temperaturze 4°C. Niestety przechowywanie w temperaturze pokojowej prowadziło do szybszego wymierania komórek. Drożdże zachowały swoje właściwości antagonistyczne wobec *P. expansum* i w miarę szybko kolonizowały miejsca zranień owoców [53]. Utrzymanie żywotności komórek na wysokim poziomie i ich zdolności do rozmnażania po rehydratacji jest jednym z najważniejszych wymagań podczas tworzenia formuł preparatów komercyjnych [22].

Ze względu na liczne ograniczenia i trudności związane z opracowaniem nowego preparatu i jego komercjalizacją, można podać niewiele przykładów dostępnych na rynku środków biokontroli pozbiorowej owoców i warzyw, opartych o drożdże, co prezentuje Tab. II. Pierwszymi takimi produktami były: *Aspire*<sup>TM</sup> wytwarzany w USA i *YieldPlus* produkowany w Afryce Południowej. *Aspire*<sup>TM</sup> zawierający *C. oleophila* był przeznaczony do pozbiorowej ochrony owoców cytrusowych przed zgnilizną powodowaną przez *Penicillium* oraz *Geotrichum*. Po dokładnym przebadaniu preparatu stwierdzono, że drożdże aplikowane w dawce ok. 10<sup>8</sup> komórek/ml samodzielnie dawały efekt ochronny, ale niewystarczający w porównaniu z komercyjnie stosowanymi fungicydami. Skuteczne działanie, szczególnie wobec *Geotrichum candidum*, zaobserwowano natomiast podczas łączenia *Aspire*<sup>TM</sup> z fungicydem tiabendazolem w 10-krotnie niższym stężeniu niż używane komercyjnie. Uzyskiwane wyniki były zachęcające do stosowania preparatu na skalę przemysłową [20]. Obecnie powyższe preparaty zostały wycofane, zaś dostępny na rynku jest preparat „Shemer” oparty o działanie *Metschnikowia fructicola* i stosowany do kontroli chorób przechowalniczych słodkich ziemniaków, marchwi, truskawek, winogron i cytrusów, aplikowany w warunkach polowych. Z kolei firmy BioNext (Belgia) i Leasaffre International (Francja) opracowują nowy preparat oparty na *C. oleophila*, natomiast Nova Technologies (Kanada) wdraża produkt oparty o *C. saitoana* zawierający dodatek chitozanu („InovaCoat”) lub lizozymu („InovaCure”). W Hiszpanii został zarejestrowany komercyjny preparat o nazwie „Candifruit” bazujący na drożdżach *C. sake* do użycia w ochronie owoców granatu przed różnymi patogenami [22, 86], zaś w Niemczech dostępny jest „BoniProtect” oparty o aktywność *A. pullulans* [95] (Tab. II).

## 7. Perspektywy stosowania drożdży antagonistycznych

Pomimo wielu trudności we wprowadzeniu na rynek i szerszym stosowaniu biopreparatów opartych o działanie drożdży antagonistycznych istnieje duża szansa upowszechnienia się tego typu środków ochrony roślin. Podczas procedury rejestracyjnej nowego preparatu

istotną zaletą jest jego bezpieczeństwo dla człowieka oraz środowiska. Większość drobnoustrojów była pierwotnie izolowana z produktów rolniczych, spożywanych w codziennej diecie ludzi. Wprowadzenie antagonistów na powierzchnię organów roślinnych nawet w dużej liczbie nie powinno być szkodliwe, gdyż mikroorganizmy te zwykle rozwijają się w specyficznych miejscach (zranieniach), a na nienaruszonej powierzchni ich populacja spada do poziomu naturalnej mikroflory [22]. Z tego samego względu brak doniesień o próbach modyfikacji genetycznych potencjalnych czynników antagonistycznych.

Inną ważną kwestią jest skuteczność biopreparatów, która musi być potwierdzona w testach półhandlowych i handlowych, ewentualnie polowych, na dużej ilości roślin lub produktów rolnych, która do tej pory nie zawsze była stabilna w trakcie przechowywania preparatu. Może to wynikać z wciąż jeszcze słabo poznanych interakcji pomiędzy mikroorganizmem antagonistycznym, patogenem i rośliną. Potrzebna jest szersza wiedza o fizjologii, genetyce i molekularnych podstawach kolonizacji, przeżywalności i różnicowaniu czynników biokontroli na tkance roślinnej, a także o wpływie fizjologii gospodarza na aktywność drożdży antagonistycznych. Słabo poznana jest problematyka adhezji drobnoustrojów do powierzchni i tworzenia biofilmów na zranionych tkankach roślinnych, które mogą mieć znaczenie w skutecznej biokontroli wzrostu patogenów grzybowych i na ten temat zaczynają pojawiać się doniesienia w literaturze [22].

Kolejną kwestią jest poszukiwanie odpowiedniej formuły preparatu, która spełniłaby wszystkie stawiane przed nią wymagania, poprawiłaby kolonizację mikroorganizmów na skórcie, przeżywalność w warunkach praktycznych i wzmacniała mechanizmy działania. Biopreparat o wysokiej skuteczności miałby szanse konkurować z komercyjnymi fungicydami dostępnymi na rynku.

## 8. Podsumowanie

Wśród stosowanych metod biologicznej kontroli rozwoju chorób pochodzenia grzybowego na uwagę zasługuje wykorzystanie drożdży. Prowadzone badania dotyczą poszukiwania skutecznych antagonistycznych szczepów, pochodzących z roślinnych nisz ekologicznych. Określono kilka mechanizmów działania antagonistów m.in. konkurencję o składniki pokarmowe i przestrzeń, wydzielanie związków antybiotycznych, produkcję enzymów litycznych lub indukowanie odporności w tkankach rośliny zaatakowanej przez fitopatogeny. Badano wpływ drożdży na hamowanie chorób przechowalniczych owoców i warzyw, a także ich działanie polowe w ochronie roślin uprawnych. Wyselekcjonowano efektywne szczepy drożdży m.in. *C. laurentii*, *C. sake*, *C. oleophila*, *Metschni-*

*kowia* spp. lub drożdżopodobnych grzybów – *A. pullulans*, które wciąż są przedmiotem intensywnych badań nad ochroną przechowalniczą jabłek, winogron i innych owoców przed takimi patogenami jak m.in. *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, powodującymi duże straty ekonomiczne w czasie ich przechowywania. Trwają intensywne badania nad opracowaniem odpowiedniej formuły skutecznego biopreparatu drożdżowego, który spełniałby wszystkie wymagania stawiane tego typu produktom. Sposobem poprawy efektywności wyselekcjonowanych drożdży jest łączenie gatunków ze sobą, ze składnikami naturalnymi np. chitozaniem lub z chemicznymi fungicydami niskiego ryzyka, ale w zmniejszonych dawkach, bezpieczniejszych dla potencjalnych konsumentów lub z czynnikami fizycznymi. Rozwój wiedzy biotechnologicznej i metod molekularnych z pewnością pozwolą na skuteczną identyfikację wyselekcjonowanych organizmów antagonistycznych, wyjaśnienie mechanizmów ich działania, monitorowania rozwoju i efektywności po aplikacji, co z kolei może przyczynić się do przyspieszenia procedur rejestracyjnych biopreparatów. Przy odpowiedniej akceptacji konsumentów oraz uwarunkowaniach prawnych istnieją szanse na zastosowanie w przyszłości organizmów modyfikowanych genetycznie jako czynników biokontroli udoskonalonych pod względem skuteczności lub spektrum aktywności [22].

## Piśmiennictwo

- Abadias M., Benabarre A., Teixido N., Usall J., Vinas I.: Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* **65**, 173–182 (2001)
- Abd El-Hafez A.E., Shehata S.F.: Field evaluation of yeasts as a biofertilizer for some vegetable crops. *Arab. Univ. J. Agric. Sci.* **9**, 169–182 (2001)
- Ahmad J.S., Baker R.: Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* **77**, 182–189 (1987)
- Anderson J.A., Filonow A.B., Vishniac H.S.: *Cryptococcus humicola* inhibits development of lesions in “Golden Delicious” apples. *Hort. Sci.* **32**, 1235–1236 (1997)
- Andrews J.H.: Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 603–635 (1992)
- Arras G., De Cicco V., Arru S., Lima G.: Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **73**, 413–418 (1998)
- Arras G.: Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharv. Biol. Technol.* **8**, 191–198 (1996)
- Avis T.J., Belanger R.R.: Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Res.* **2**, 5–8 (2002)
- Benbow J.M., Sugar D.: Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Dis.* **83**, 839–844 (1999)
- Brown G.E., Davis C., Chambers M.: Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. *Postharv. Biol. Technol.* **18**, 57–65 (2000)
- Calvente V., de Orellano M.E., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M.I.: Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **26**, 226–229 (2001)
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V.: *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharv. Biol. Technol.* **22**, 7–17 (2001)
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., De Cicco V.:  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharv. Biol. Technol.* **12**, 293–300 (1997)
- Chan Z., Qin G., Xu X., Li B., Tian S.: Proteome approach to characterize protein induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *J. Prot. Res.* **6**, 1677–1688 (2007)
- Chan Z., Tian S.: Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvest sweet cherry fruit. *Postharv. Biol. Technol.* **39**, 314–320 (2006)
- Chand-Goyal T., Spotts R.A.: Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control*, **10**, 199–206 (1997)
- Cook D.W.M., Long P.G., Ganesh S., Cheah L.H.: Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*: biological control and scanning electron microscope studies in vivo. *Ann. Appl. Biol.* **131**, 503–518 (1997)
- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Porat R.: Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathol.* **92**, 393–399 (2002)
- Droby S., Chalutz E., Wilson C.L., Wiśniewski M.: Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* **35**, 794–800 (1989)
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M., Shachnai A.: Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control*, **12**, 97–101 (1998)
- Droby S., Wilson Ch.L., Wisniewski M., Ghaouth A.E.: Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables (w) Microbial Food Contamination, red. Ch.L. Wilson, S. Droby, CRC Press LLC, Washington, 2001, s. 187–205
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C.: Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharv. Biol. Technol.* **52**, 137–145 (2009)
- El Ghaouth A., Smilanick J.L., Brown G.E., Ippolito A., Wilson C.L.: Control of decay of apple and citrus fruits in semi-commercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Biolog. Control*, **20**, 96–101 (2001)
- El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M.: Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathol.* **88**, 282–291 (1998)
- El-Mehalawy A.A., Hassainen N.M., Khater H.M., Karam El-Din E.A., Youssef Y.A.: Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int. J. Agric. Biol.* **6**, 599–605 (2004)
- El-Mehalawy A.A.: The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Agric. Biol.* **6**, 310–316 (2004)
- El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K.: Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycosci.* **47**, 25–35 (2006)

28. El-Tarabily K.A.: Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 69–75 (2004)
29. Fajardo J.E., McCollum T.G., McDonald R.E., Mayer R.T.: Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biol. Control*, **13**, 143–151 (1998)
30. Ferrari A., Sicher C., Prodorutti D., Pertot I.: Potential new applications of Shemer, a *Metschnikowia fructicola* based product, in post-harvest soft fruit rots control. *Bull. OILB/SROP*, **30**, 43–46 (2007)
31. Filonow A.B., Vishniac H.S., Andron J.A., Janisiewicz W.J.: Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control*, **7**, 212–220 (1996)
32. Filonow A.B.: Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**, 243–256 (1998)
33. Galston A.W., Kaur-Sawhney R.: Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**, 406–410 (1990)
34. Gamagae S.U., Sivakumar D., Wijesundera R.L.C.: Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. *Crop Prot.* **23**, 575–579 (2004)
35. Ghaouth E.I.A., Wilson L.C., Wisniewski M.: Control of post-harvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathol.* **93**, 344–348 (2003)
36. Grebenisan I., Cornea P., Mateescu R., Cimpeanu C., Olteanu V., Campenu G.H., Stefan L.A., Oancea F., Lupu C.: *Metschnikowia pulcherrima*, a new yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Acta Hort.* **767**, 355–360 (2008)
37. Hajlaoui M.R., Belanger R.R.: Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Sci. Technol.* **3**, 427–434 (1993)
38. Hajlaoui M.R., Traquair J.A., Jarvis W.R., Belanger R.R.: Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**, 229–237 (1994)
39. Hutchins K., Bussey H.: Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)- $\beta$ -D-glucan. *J. Bacteriol.* **154**, 161–169 (1983)
40. Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M.: Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharv. Biol. Technol.* **19**, 265–272 (2000)
41. Ippolito A., Nigro F.: Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Prot.* **19**, 715–723 (2000)
42. Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F.: Control of post-harvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharv. Biol. Technol.* **36**, 245–252 (2005)
43. Janisiewicz W.J., Peterson D.L., Bors R.: Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* **78**, 466–470 (1994)
44. Janisiewicz W.J., Tworzoski T.J., Kurtzman C.P.: Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Biol. Control*, **91**, 1098–1108 (2001)
45. Jijakli M.H., Lepoivre P.: Characterization of an  $\alpha$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathol.* **88**, 335–343 (1998)
46. Karabulut O.A., Tezcan H., Daus A., Cohen L., Wiess B., Droby S.: Control of pre-harvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci. Technol.* **14**, 513–521 (2004)
47. Kornilowicz-Kowalska T.: Oddziaływanie grzybów glebowych (*Micromycetes*) na patogeny oraz szkodniki roślin i jego praktyczny aspekt. *Frag. Agronom.* **2** (66), 135–149 (2000)
48. Kryczyński S.: Podstawy fitopatologii. Fundacja – Rozwój SGGW, Warszawa, 2005.
49. Leibinger W., Breuker B., Hahn M., Mendgen K.: Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathol.* **87**, 1103–1110 (1997)
50. Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V.: Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**, 257–267 (1998)
51. Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V.: Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *Europ. J. Plant Pathol.* **109**, 341–349 (2003)
52. Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M.: Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharv. Biol. Technol.* **10**, 169–178 (1997)
53. Liu J., Tian S.P., Li B.Q., Qin G.Z.: Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *Biocontrol*, **54**, 817–824 (2009)
54. Lynch J.M.: Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil. *Nature*, **240**, 45–46 (1972)
55. Masih E.I., Paul B.: Secretion of beta-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranefaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing mold disease of the grapevine. *Curr. Microbiol.* **44**, 391–395 (2002)
56. Masih E.I., Slezak-Deschaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C., Adholeya A., Paul B.: Characterization of the yeast *Pichia membranefaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 227–232 (2001)
57. McLaughlin R.J., Wilson C.L., Droby S., Ben-Arie R., Chaltz E.: Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Dis.* **76**, 470–473 (1992)
58. Medina A., Vassilev N., Alguacil M.M., Roldan A., Azcon R.: Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. *Soil Sci.* **169**, 260–270 (2004)
59. Melin P., Hakanson S., Schnürer J.: Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1008–1016 (2007)
60. Mercier J., Wilson C.L.: Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biol. Control*, **4**, 138–144 (1994)
61. Meyer G., Bigirimana J., Elad Y., Höfte M.: Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T33 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 279–286 (1998)
62. Monte E.: Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **4**, 1–4 (2001)
63. Nantawanit N., Chanchaichaovivat A., Panijpan B., Ruenwongsa P.: Induction of defence response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biol. Control*, **52**, 145–152 (2010)
64. Nassar A.H., El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K.: Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Wiliopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils*, **42**, 97–108 (2005)

65. Ng K.K., MacDonald L., Punja Z.K.: Biological control of rose powdery mildew with the antagonist yeast *Tilletiopsis pallescens*. *Hort. Sci.* **32**, 262–266 (1997)
66. Payne C., Bruce A., Staines H.: Yeast and bacteria as biological control agents against fungal discoloration of *Pinus sylvestris* blocks in laboratory-based tests and the role of antifungal volatiles. *Holzforschung*, **54**, 563–569 (2000)
67. Perondii N.L., Luz W.C., Thomas R.: Microbiological control of *Gibberella* in wheat. *Fitopatol. Bras.* **21**, 243–249 (1996)
68. Petrini O.: Fungal endophytes of tree leaves (w) Microbial ecology of leaves, red. J.H. Andrews, S.S. Hirano, Springer, New York, 1991, s. 179–197.
69. Piano S., Neyrotti V., Migheli M., Gullino M.L.: Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharv. Biol. Technol.* **11**, 131–140 (1997)
70. Piątkowski J.: Biologiczne preparaty grzybowe w zwalczaniu chorób i szkodników. *Owoce Warzywa Kwiaty*, **17–18**, 22 (2001)
71. Punja Z.K., Utkhede R.S.: Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* **21**, 400–407 (2003)
72. Qin G., Tian S., Xu Y.: Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharv. Biol. Technol.* **31**, 51–58 (2004)
73. Saligkarias I.D., Gravanis F.T., Epton H.A.S.: 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: II a study on mode of action. *Biol. Control*, **25**, 151–161 (2002)
74. Sansone G., Rezza I., Calvente V., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M.I.: Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharv. Biol. Technol.* **35**, 245–251 (2005)
75. Santos A., Marquina D.: Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, **21**, 151–162 (2004)
76. Santos A., Marquina D.: Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiol.* **150**, 2527–2534 (2004).
77. Santos A., Sanchez A., Marquina D.: Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* **159**, 331–338 (2004)
78. Saravanakumar D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as postharvest biocontrol agent. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**, 183–193 (2009)
79. Schena I., Ippolito A., Zahavi T., Cohen I., Droby S.: Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *Europ. J. Plant Pathol.* **106**, 681–691 (2000)
80. Sobiczewski P.: Bakterie jako czynniki biologicznej ochrony roślin przed chorobami. *Post. Nauk Roln.* **6**, 19–31 (1994)
81. Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharv. Biol. Technol.* **33**, 141–151 (2004)
82. Spadaro D., Gullino M.L.: Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* **24**, 601–613 (2005)
83. Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L.: Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharv. Biol. Technol.* **24**, 123–134 (2002)
84. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J.: Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 1–30 (2000)
85. Suzzi G., Romano P., Ponti I., Montuschi C.: Natural wine yeasts as biocontrol agents. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 304–308 (1995)
86. Teixidó N., Usall J., Nuñez C., Torres R., Abadias M., Viñas I.: Preharvest strategies to control postharvest diseases in fruits (w) Postharvest Pathology, red. Dov Prusky, M. Lodovica Cullino, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2010, s. 89–106.
87. Teixidó N., Viñas I., Usall J., Magan N.: Control of blue mould of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopatol.* **88**, 960–964 (1998)
88. Tian S., Wan Y.K., Qin G.Z., Xu Y.: Induction of defense responses against *alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 729–734 (2006)
89. Tian S., Yao H.J., Deng X., Xu X.B., Qin G.Z., Chan Z.: Characterization and expression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathol.* **97**, 260–268 (2007)
90. Tian S.P., Fan Q., Xu Y., Jiang A.L.: Effects of calcium on biocontrol activity of yeasts antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathol.* **51**, 352–358 (2002)
91. Tolaini V., Zjalic S., Reverberi M., Fanelli C., Fabbri A.A., Del Fiore A., De Rossi P., Ricelli A.: *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 243–249 (2010)
92. Urquhart E.J., Punja Z.K.: Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Can. J. Microbiol.* **48**, 219–229 (2002)
93. Wagner A., Kordowska-Wiater M., Hetman B.: Wpływ wybranych szczepów drożdży na rozwój szarej pleśni na owocach jabłoni. *Prog. Plant Prot.* **46**, 625–628 (2006)
94. Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J.: Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 213–222 (1995)
95. Whipps J.M., McQuilken M.P.: Biological control agents in plant disease control (w) Disease Control in Crops. Biological and Environmentally – Friendly Approaches, red. D. Walters, Willey-Blackwell, Singapore, 2009, s. 27–61.
96. Wisniewski M.E., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C.L., Chalutz E.: Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 245–258 (1991)
97. Wisniewski M.E., Wilson C.L.: Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hort. Sci.* **27**, 94–98 (1992)
98. Witting H.P.P., Johnson K.B., Pscheidt J.W.: Effect of epiphytic fungi on Brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Dis.* **81**, 383–387 (1997)
99. Wojtkowiak-Gębarowska E.: Mechanizmy zwalczania fitopatogenów glebowych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. *Post. Mikrobiol.* **45**, 261–273 (2006)
100. Xiaoping L., Jiye W., Ping G., Cungui M., Zhu Z.R., Hongye L.: *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 223–229 (2007)
101. Yu T., Li H.Y., Zheng X.D.: Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 261–266 (2007)
102. Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharv. Biol. Technol.* **55**, 174–181 (2010)
103. Zhao Y., Tu K., Shao X., Jing W., Su Z.: Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharv. Biol. Technol.* **49**, 113–120 (2008)

