



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *BOTRYTIS*
CINEREA

Κωνσταντίνα Ψιλιώτη Δουρμούση

ΑΜ: 171141

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Γκίζη Δανάη

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

BACHELOR THESIS

Study of the effect of commercial yeasts on the fungus *Botrytis cinerea*

Konstantina Psilioti Dourmousi

Registration Number: 171141

Supervisor: Gkizi Danai

Athens, February 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3ου Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ψιλιώτη Δουρμούση Κωνσταντίνα του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 171141 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 10/07/2024 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση της επιβλέπουσας καθηγήτριας Γκίζη Δανάης.

Η Δηλούσα



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Ο μύκητας <i>Botrytis cinerea</i>	9
1.1.1. Συμπτώματα.....	10
1.1.2. Καταπολέμηση του μύκητα <i>B. cinerea</i> και φυσικοί εχθροί.....	11
1.1.3. Μηχανισμός μόλυνσης του φυτικού ξενιστή από τον μύκητα <i>B. cinerea</i> και η αντίδραση του ξενιστή	13
1.2. Ανταγωνιστικές ιδιότητες των ζυμομυκήτων οινοποίησης	14
1.3 Ένζυμα των ζυμομυκήτων.....	18
1.4. Οι πτητικές ενώσεις των ζυμομυκήτων ως ανασταλτικός παράγοντας στη δράση του μύκητα <i>B. cinerea</i>	19
1.5. Ο ρόλος των μεταβολιτών των ζυμομυκήτων	19
1.6. Πλεονεκτήματα αποικιών ζυμομυκήτων στα φυτά.....	20
2. Σκοπός της μελέτης	21
3. Υλικά και μέθοδοι	21
3.1. Βιολογικό υλικό.....	21
3.2. Πειράματα <i>in vitro</i>	22
3.2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών.....	22
3.2.2 Πειράματα <i>in vitro</i> παρουσία κυττάρων ζυμομυκήτων.....	23
3.2.3. Πείραμα <i>in vitro</i> παρουσία μεταβολιτών των ζυμομυκήτων	24
3.2.4. Πείραμα <i>in vitro</i> παρουσία πτητικών ενώσεων των ζυμομυκήτων.....	25
3.3. Πείραμα <i>ex vivo</i> σε σταφύλια	25
3.4. Στατιστική Ανάλυση	26
4. Αποτελέσματα	27
4.1. Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> παρουσία κύτταρων ζυμομυκήτων	27
4.2. Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> παρουσία μεταβολιτών των ζυμομυκήτων.....	28
Σχήμα 2: Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea in vitro</i> , παρουσία μεταβολιτών	29
4.3. Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> παρουσία πτητικών ενώσεων ζυμομυκήτων	30
4.4. Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> σε σταφύλια	32
5. Συμπεράσματα και συζήτηση.....	37
Βιβλιογραφία.....	39

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Προσβολή από μύκητα <i>B.cinerea</i> σε βότρυ επιτραπέζιου σταφυλιού Thompson Seedless /Χιλή.....	16
Εικόνα 2: Κονίδια του μύκητα <i>B.cinerea</i> σε ράγες σταφυλιού.....	19
Εικόνα 3: Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα <i>B. cinerea</i>	22
Εικόνα 4: Σχέδιο εμβολισμού τρυβλίου για συγκαλλιέργεια του μύκητα <i>B. cinerea</i> με κύτταρα από ζυμομύκητες.....	30
Εικόνα 5: Τρυβλία από το πείραμα συγκαλλιέργειας κυττάρων ζυμομυκήτων με τον μύκητα <i>B. Cinerea</i>	31
Εικόνα 6. Συμπτώματα του μύκητα <i>B. cinerea</i> σε ράγες των εφαρμογών του πειράματος ex vivo...41	

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Στοιχεία εμπορικών ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.....	28
--	----

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1: Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> παρουσία κυττάρων ζυμομυκήτων.....	29
Σχήμα 2: Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> in vitro, παρουσία μεταβολιτών ζυμομυκήτων.....	31
Σχήμα 3: Κονίδια του μύκητα <i>B. cinerea</i> in vitro παρουσία μεταβολιτών ζυμομυκήτων.....	32
Σχήμα 4: Ανάπτυξη του μύκητα <i>B. cinerea</i> in vitro, παρουσία πηκτικών ενώσεων ζυμομυκήτων..	33
Σχήμα 5: Κονίδια μύκητα <i>B. cinerea</i> παρουσία πηκτικών ενώσεων ζυμομυκήτων.....	34
Σχήμα 6: Ποσοστό μολυσμένης επιφάνειας ραγών από τον μύκητα <i>B. cinerea</i>	36
Σχήμα 7: Ποσοστό μολυσμένων ραγών ανά εφαρμογή.....	37
Σχήμα 8: Συγκέντρωση κονιδίων του μύκητα <i>B cinerea</i> σε ράγες σταφυλιών.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία μελέτησε την επίδραση εμπορικών ζυμομυκήτων οиноποίησης στην ανάπτυξη και την κονιδιογένεση του παθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Λόγω του μύκητα *B. cinerea*, σημαντικό μέρος της παραγωγής καταστρέφεται ετησίως, καθώς προσβάλλει και υποβαθμίζει ποιοτικά τις ράγες των σταφυλιών στον αμπελώνα, δημιουργώντας την τεφρή σήψη. Πλησιάζοντας προς την ωρίμανση και τη συγκομιδή των σταφυλιών, οι ράγες είναι περισσότερο επιρρεπείς στη μόλυνση από τον συγκεκριμένο μύκητα. Κατά συνέπεια, η αντιμετώπισή του κρίνεται δυσκολότερη αφού σε εκείνο το διάστημα δεν είναι δυνατή η χρήση χημικών σκευασμάτων. Υπολείμματα αυτών, είναι επικίνδυνο να εμφανιστούν και στο τελικό προϊόν. Επιπλέον, πολλές φορές ο συγκεκριμένος μύκητας παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα χημικά σκευάσματα, γεγονός που αναγκάζει τους παραγωγούς να εναλλάσσουν τα σκευάσματα συχνά, δυσκολεύοντας την εφαρμογή. Έτσι, πολλοί ερευνητές εξετάζουν την εφαρμογή βιολογικής αντιμετώπισης, έναντι της χρήσης χημικών σκευασμάτων στους αμπελώνες. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* δοκιμές συγκαλλιέργειας εμπορικών ζυμομυκήτων με τον μύκητα *Botrytis cinerea* αλλά και *ex vivo* πειράματα παθογένειας σε κομμένες ράγες. Για τη μελέτη επιλέχθηκαν πέντε διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων τόσο *Saccharomyces* όσο και *non-Saccharomyces*. Διεξήχθησαν τέσσερα διαφορετικά πειράματα, εκ των οποίων τα τρία *in vitro*, και εξετάστηκαν (1) η επίδραση της συγκαλλιέργειας με κυττάρα ζυμομυκήτων, (2) η επίδραση των μεταβολιτών των ζυμομυκήτων και (3) η επίδραση των πτητικών ενώσεων των ζυμομυκήτων στην ανάπτυξη του και την κονιδιογένεση του μύκητα *B. cinerea*. Οι *ex vivo* δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ράγες της επιτραπέζιας ποικιλίας *Crimson seedless*, οι οποίες αφού εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα με υγρές καλλιέργειες των ζυμομυκήτων εμβολιάστηκαν τοπικά με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* με σκοπό να μελετηθεί η αποτελεσματικότητά τους στη μείωση της ασθένειας

Λέξεις κλειδιά: *Botrytis cinerea*, σήψεις σταφυλιών, ζυμομύκητες οиноποίησης, βιολογική καταπολέμηση, Βοτρώτης, *Crimson seedless*,

ABSTRACT

This thesis studied the effect of commercial winemaking yeasts on the growth and conidiogenesis of the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Due to *B. cinerea*, many productions are destroyed annually, as it attacks and degrades the quality of the grape vines in the vineyard, creating ash rot. As the grapes approach ripening and harvest, the berries are more susceptible to infection by *Botrytis cinerea*. Consequently, its treatment is considered more difficult since during that period it is not possible to use chemical pesticides. Residues of these might appear in the final product. In addition, *B. cinerea* often develops resistance to chemical formulations, which forces producers to change the products frequently, making the application difficult. Thus, many researchers are considering the application of biological treatment, against the use of chemical pesticides in the vineyards. In the present study, in vitro tests of commercial wine yeasts with the fungus *Botrytis cinerea* as well as ex vivo pathogenicity experiments on detached berries were carried out. Five different species of both Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts were selected for the study. Four different experiments, three of which were in vitro, were conducted and examined (1) the effect of yeast cells, (2) the effect of yeast metabolites and (3) the effect of yeast volatile organic compounds on fungal growth and conidiogenesis. The ex vivo tests were carried out on grapes of the table variety Crimson seedless, which after being immersed in solutions with liquid yeast cultures, were locally inoculated with a suspension of *B. cinerea* conidia.

Keywords: *Botrytis cinerea*, grapevine bunch rot, winemaking yeasts, biological control, Crimson seedless,

1. Εισαγωγή

1.1. Ο μύκητας *Botrytis cinerea*

Ο μύκητας *B. cinerea* είναι παθογόνος μικροοργανισμός που προσβάλλει πολλά είδη του φυτικού βασιλείου ανά τον κόσμο με ποικίλα συμπτώματα (Millan A. F. S., et al., 2022). Οι καταστροφές έχουν παρατηρηθεί κατά κύριο λόγο σε δικοτυλήδονους ξενιστές, ενώ έντονη προτίμηση δείχνει σε γερασμένους ή ώριμους φυτικούς ιστούς (Williamson B. et al., 2007). Ωστόσο, από τους ξενιστές δε λείπουν και μονοκοτυλήδονα φυτά, αφού υπάρχουν και συγκεκριμένα στελέχη του *B. cinerea* που τα προτιμούν (Williamson B. et al., 2007).

Χαρακτηριστικό του μύκητα είναι οι πολλοί και διαφορετικοί τρόποι επιμόλυνσης των φυτών και των καρπών τους, και κατά συνέπεια η δυσκολία στην αποφυγή και αντιμετώπισή του (Parafati, L., et al, 2015). Το παθογόνο έχει την ιδιότητα να επιβιώνει ακόμη και σε δυσμενείς για εκείνο συνθήκες υπό τη μορφή κονιδίων, μυκηλίων ή και σκληρωτίων- “μικρά, μαύρα και σκληρά σωματίδια, πολύ ανθεκτικά στις αντίξοες συνθήκες του χειμώνα” (I. X. Ρούμπος, 2016). Στο αμπέλι, η ασθένεια προκαλεί σήψεις στους βότρυες, νεκρώνει βλαστούς, φύλλα και ταξιανθίες. Το παθογόνο διαχειμάζει σε νεκρωμένους φυτικούς ιστούς (όχι μόνο σταφυλιών) πάνω στο φυτό ή και στο έδαφος, με τη μορφή ανθεκτικών κατασκευών που ονομάζονται σκληρώτια, με αποτέλεσμα την άνοιξη, όπου οι κλιματολογικές συνθήκες είναι οι κατάλληλες, να επαναμολύνονται τα τρυφερά μέρη του φυτού, όπως οι βλαστοί και τα φύλλα (Elmer, P. A.G. et al, 2006). Οι παρατεταμένες υγρές περιόδους κατά τις τελευταίες μέρες της καλλιεργητικής περιόδου ενθαρρύνουν την εξάπλωση του μύκητα. Οι ράγες κατά την περίοδο της ωρίμανσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες, με αποτέλεσμα σημαντικές απώλειες καλλιεργειών στον τρύγο (Elmer, P. A.G. et al, 2006). Επίσης, η ασθένεια είναι γνωστή και με το όνομα “τεφρή σήψη” (Ρούμπος X.I., 2016).

Όταν οι κλιματολογικές συνθήκες σταθούν κατάλληλες, δηλαδή σε πιο ψυχρά κλίματα, παρουσιάζεται στους βότρυες των σταφυλιών το φαινόμενο της “ευγενούς σήψης”, που παράγει κατόπιν οίνους με ιδιαίτερα και εκλεκτά χαρακτηριστικά (Γερμανία, Γαλλία, Ουγγαρία) (Ρούμπος X.I., 2016).

Ο μύκητας έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται κάτω από ποικίλες συνθήκες όπως στην ύπαιθρο, σε φυτικούς ιστούς τροφίμων κατά την αποθήκευσή τους ή/και στο εμπόριο, ακόμη και μετά την αγορά τους από τον καταναλωτή, δηλαδή μετασυλλεκτικά (Parafati, L., et al, 2015). Σε αποθηκευμένα επιτραπέζια σταφύλια, όπου εκλείπουν οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του

παθογόνου, τα συμπτώματα λοιμώξεων ξεκινούν με την εμφάνιση μικρών νεκρώσεων στην επιδερμίδα των ραγών, οι οποίες διευρύνονται και μετατρέπονται σε καφέ κηλίδες (Williamson B. et al., 2007). Σε αυτές τις επιμολυσμένες περιοχές, ο μύκητας παράγει ένζυμα κάτω από την επιδερμίδα της ράγας και κατόπιν, σε αυτά τα σημεία αρχίζει να αναπτύσσεται λευκό επίχρισμα από κονίδια (Williamson B. et al., 2007).

Πληγές στην επιφάνεια των ραγών λειτουργούν ως πύλες εισόδου και εκτεθειμένοι χυμοί ως θρεπτικό υπόστρωμα για τον μύκητα *B. cinerea*. Παρόλα αυτά, το παθογόνο είναι ικανό να διεισδύσει και σε υγιείς φυτικούς ιστούς, εκκρίνοντας β-γλυκοσιδάση, μεθυλεστεράση πηκτίνης, πολυγαλακτουρονάσες και ασπαραγική πρωτεϊνάση, ένζυμα που καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού ξενιστή (Kowalska, J., et al., 2022).

Ο μύκητας *B. cinerea* μπορεί να εκκρίνει εξωένζυμα που συμβάλλουν στην παθογένεια του μύκητα (Goetz, G. et al., 1999). Ως παθογόνος μικροοργανισμός μπορεί να απελευθερώσει, για παράδειγμα, ένζυμα λακάσες, μερικές από τις οποίες οξειδώνουν τα στυλβένια των σταφυλιών. Με αυτό τον τρόπο, αναστέλλουν την ενζυμική άμυνα των σταφυλιών δημιουργώντας ένα ελεύθερο πεδίο στο παθογόνο να διεισδύσει στα κύτταρα του ξενιστή (Goetz, G. et al., 1999).

1.1.1. Συμπτώματα

Γενικά, ο παθογόνος αυτός μύκητας είναι υπεύθυνος για ένα πολύ ευρύ φάσμα συμπτωμάτων και καταστροφών σε φυτά και καρπούς, που μπορεί να διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό (Williamson B. et al., 2007). Όταν πρόκειται για την άμπελο, η προσβολή του μύκητα *B. cinerea* στα ελάσματα των φύλλων εμφανίζεται με κυκλικές ή ακανόνιστες κηλίδες στις άκρες των φύλλων, που άμεσα νεκρώνονται (I. X. Ρούμπος, 2016). Οι νεαροί βλαστοί επίσης είναι πιθανό να προσβληθούν υπό ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα, δηλαδή με αρκετή υγρασία, όπου σε αυτή την περίπτωση, οι νεκρώσεις ξεκινούν από την κορυφή τους. Στην περίοδο της άνθισης, οι ταξιανθίες είναι δυνατό να προσβληθούν ολοκληρωτικά ή σε τμήματά τους (I. X. Ρούμπος, 2016). Η τάξη μεγέθους της προσβολής αυτής είναι άμεσα συνδεδεμένη με την υγρασία της ατμόσφαιρας, καθώς υψηλή υγρασία κατά την άνοιξη προκαλεί σοβαρές καταστροφές. (Nair, N. G., et al., 1988, Elmer, P. A.G. et al, 2006).



Εικόνα 1: Προσβολή από τον μύκητα *B.cinerea* σε βότρυ επιτραπέζιου σταφυλιού Thompson Seedless/ Χιλή. (Latorre, B. A., et al., 2015)

Το πιο καταστροφικό, όμως στάδιο της προσβολής από τον μύκητα *B. cinerea* είναι το στάδιο της καρποφορίας, όπου μολύνονται οι ράγες των σταφυλιών με αποτέλεσμα τη σήψη τους και την καταστροφή της παραγωγής (Williamson B. et al., 2007). Χαρακτηριστικό των προσβεβλημένων ραγών είναι η τεφρή εξάνθιση από την οποία καλύπτονται, που αποτελείται από καρποφορίες του παθογόνου μύκητα (Ι. Χ. Ρούμπος, 2016). Έχουν σημειωθεί, επίσης, και σήψεις στη βάση των νεαρών βλαστών σε ορισμένες οινοποιήσιμες ποικιλίες όπως ο Ροδίτης. (Ι. Χ. Ρούμπος, 2016)

Ιδιαίτερη ευαισθησία στην μόλυνση έχουν οι ώριμες ράγες σε σχέση με τις άγουρες (Kelloniemi et al., 2015). Στη δεύτερη περίπτωση παρατηρείται λανθάνουσα μόλυνση, δηλαδή χωρίς συμπτώματα (Holz G. et al, 2003)

Ο μύκητας μολύνει επιφάνειες φυτικών ιστών ευκολότερα παρουσία υγρασίας συγκριτικά με ξηρές συνθήκες. Μελέτες έχουν δείξει πως σε ξηρές συνθήκες το παθογόνο δεν μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα. (Holz G. et al, 2003)

1.1.2. Καταπολέμηση του μύκητα *B. cinerea* και φυσικοί εχθροί

Πολλοί μη παθογόνοι μικροοργανισμοί αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτικών παθογόνων μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά, της ενεργοποίησης της άμυνας του φυτού, της

παραγωγής ανασταλτικών μεταβολιτών και/ή παρασιτισμού, περιορίζοντας έτσι φυσικά τις ασθένειες των φυτών στο περιβάλλον (Margaritoroulou, T., et al., 2020). Πολυάριθμες μελέτες έχουν περιγράψει την απομόνωση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών με σκοπό την εκμετάλλευσή τους για βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών (Florian M. Freimoser, et al., 2019). Ωστόσο, παρά τις πολλές αναφορές επιτυχούς βιολογικής αντιμετώπισης του μύκητα *B. cinerea* σε εργαστηριακές συνθήκες, μόνο ένα μικρό ποσοστό βιολογικών παραγόντων έχει επιδείξει αποτελεσματικότητα πεδίου και ένα ακόμη μικρότερο υποσύνολο έχει αναπτυχθεί σε εμπορικά προϊόντα (Elmer P. A.G. et al, 2006). Οι βιολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης από μόνες τους, πολλές φορές δεν μπορούν να αποτρέψουν ή να περιορίσουν την ασθένεια σε αμπελουργικές περιοχές, επομένως αναγκαία και απαραίτητη κρίνεται η εφαρμογή χημικών/συμβατικών μεθόδων καταπολέμησης (Kowalska J. 2022).

Μεταξύ των διαφορετικών βιολογικών προσεγγίσεων, η χρήση των μικροβιακών ανταγωνιστών όπως ζυμομύκητες, μύκητες και βακτήρια είναι πολλά υποσχόμενη μέθοδος και κερδίζει ολοένα και περισσότερη παγκοσμίως δημοτικότητα (Kowalska J. 2022). Γενικά, οι ράγες του σταφυλιού είναι πιο επιρρεπείς στο στάδιο της ωρίμανσης, αφού η χρήση μυκητοκτόνων υπόκειται σε αυξανόμενους περιορισμούς για την αποφυγή χημικών υπολειμμάτων στα σταφύλια και στους οίνους (Gkizi D. et. al., 2021). Έτσι, τόσο η παραγωγή, όσο και η ποιότητα του τελικού προϊόντος κινδυνεύει να χαθεί, προκαλώντας οικονομικό πρόβλημα στους παραγωγούς (Gkizi D. et. al., 2021). Το γεγονός ότι ο μύκητας *B. cinerea* έχει την ικανότητα να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα, σε συνδυασμό με την ανάγκη ελαχιστοποίησης των αρνητικών επιπτώσεων των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, έχει οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη βιολογικών εφαρμογών (Gkizi D. et. al., 2021).

Ειδικότερα, οι ζυμομύκητες εμφανίζουν μερικά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν κατάλληλους για βιολογική αντιμετώπιση (Florian M. Freimoser, et al., 2019). Κάποια από αυτά είναι οι διατροφικές απαιτήσεις τους, η ικανότητα αποικισμού τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η γρήγορη ανάπτυξη και εξάπλωσή τους σε προσιτά, οικονομικώς υποστρώματα, αλλά και η αδυναμία τους να παράγουν αλλεργιογόνα σπόρια ή μυκοτοξίνες. (Kowalska, J. 2022).

Πολλά στελέχη ζυμομυκήτων έχουν διερευνηθεί ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης έναντι διαφορετικών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου του μύκητα *B. cinerea* (Calvo-Garrido, C., et al., 2013). Ποικίλα προϊόντα με βάση στελέχη ζυμομυκήτων έχουν φτάσει σε προχωρημένα στάδια εξέλιξης και κατόπιν εμπορευματοποίησης όπως το *Aspire* (με βάση το είδος *Candida oleophila*), που εντοπίζεται στο εμπόριο των Ηνωμένων Πολιτειών και στο Ισραήλ. Οι τρόποι δράσης του περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό θρεπτικών συστατικών, και του χώρου, αλλά και τον άμεσο μυκοπαρασιτισμό (Droby, S., et al., 2002). Άλλο σκεύασμα είναι το *Shemer*, (με βάση το είδος *Metschnikowia pulcherrima*), το οποίο κυκλοφορεί σε Αργεντινή, Κολομβία, Αίγυπτο, Αιθιοπία,

Γερμανία, Ελλάδα, κλπ. και δρα με αντίστοιχο τρόπο (Pitt JI, Miller MW, 1968). Ακόμη και σήμερα όμως τέτοιου είδους προϊόντα είναι υπό διερεύνηση και κατά συνέπεια περιορισμένα στο εμπόριο, αφού η απόδοσή τους κρίνεται αβέβαιη και η ζήτησή τους προς το παρόν είναι περιορισμένη (Marsico A. D. et al., 2021).

1.1.3. Μηχανισμός μόλυνσης του φυτικού ξενιστή από τον μύκητα *B. cinerea* και η αντίδραση του ξενιστή

Κατά την μόλυνση, ο μύκητας *B. cinerea* έχει την ιδιότητα να διατρυπά το περικάρπιο των ραγών, εκκρίνοντας λυτικά ένζυμα και φυτοτοξίνες (Elmer, P. A.G. et al 2006). Έτσι, συσσωρεύονται ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) στην πλασματική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων του ξενιστή, πυροδοτώντας οξειδωτική αντίδραση, που νεκρώνει τα κύτταρα. Ουσιαστικά, το παθογόνο διασπά τα επιδερμικά κύτταρα, εκκρίνοντας ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος. Τα ένζυμα αυτά, ονομάζονται πηκτινάσες (Elmer, P. A.G. et al 2006).

Χαρακτηριστικά ένζυμα που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παθογόνο δράση του μύκητα είναι η λυάση της πηκτίνης και η υδρολάση της ραμνογαλακτουρνάνης, που δρουν στους φυτικούς ιστούς του σταφυλιού, καταστρέφοντάς τους (Synan AbuQamar, et al., 2017). Κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες είναι μη πηκτινολυτικά ένζυμα, που παίζουν ρόλο στο μηχανισμό παθογένεσης, αποδομώντας με τη σειρά τους το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Άλλα ένζυμα, όπως οι πρωτεάσες και οι λακάσες, εμπλέκονται επίσης δυνητικά στην παθογένεια. (Williamson, B. et al. 2007).

Τα φυτά από μόνα τους, έχουν κάποιες αμυντικές ιδιότητες, καθώς ενεργοποιούνται μηχανισμοί ανοσολογικών προστατευτικών οδών. Αρχικά, οι υποδοχείς αναγνώρισης του παθογόνου από τον ξενιστή σηματοδοτούν το ανοσοποιητικό σύστημα του φυτού (Goetz, G. et al., 1999). Κατά τη διαδικασία αυτή εκκρίνονται ένζυμα, που ως ένα στάδιο μπορούν να αντισταθούν στην προσβολή. Για παράδειγμα, σε μερικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί πως η υπερέκφραση της πηκτίνης, έδωσε στο φυτό ανθεκτικότητα στο παθογόνο (Pezet, Pont & Hoang-Van, 1991).

Οι φυτικές ορμόνες, όπως το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET), ρυθμίζουν κυρίως την άμυνα των φυτών σε διάφορα παθογόνα και παράσιτα, που κατά περιόδους προσβάλλουν τα φυτά (Elmer, P. A. G., et al., 2006). Έχει παρατηρηθεί πως το σαλικυλικό οξύ (SA), παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι βιοτροφικών και ημι-βιοτροφικών παθογόνων, ενώ το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) συμμετέχουν ενεργά στην άμυνα κατά των φυτοφάγων εντόμων και των νεκροτροφικών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένου του μύκητα *B. cinerea* (Elmer, P. A. G., et al., 2006). Άλλες φυτοορμόνες, όπως το αβισικό οξύ (ABA) και τα βρασινοστεροειδή (BRs), ρυθμίζουν επίσης την ανοσία των φυτών κυρίως αλληλοεπιδρώντας με

μεταγραφικούς παράγοντες (TFs), ή μέσω βιοσύνθεσης καμαλεξίνης και εναπόθεσης καλόζης (Elmer, P.A.G., et al., 2006). Επιπλέον, μελέτες έχουν παράσχει συγκεκριμένα στοιχεία για την αλληλεπίδραση των SA, JA και ET με άλλες ορμόνες στη ρύθμιση των αμυντικών αποκρίσεων των φυτών στον μύκητα *B. cinerea* (Elmer, P. A. G., et al., 2006, Margaritoroulou, T., et al., 2020).



Εικόνα 2: Εξάνθηση από κονίδια του μύκητα *B.cinerea* σε ράγες σταφυλιού

1.2. Ανταγωνιστικές ιδιότητες των ζυμομυκήτων οινοποίησης

Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, αυτό σημαίνει πως διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα, στο εσωτερικό του κυττάρου, που περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη. Ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων (κυρίως στο φύλλο Ascomycota και σπανιότερα Basidiomycota) (Kowalska J., et al. 2022). Ως ετερότροφοι, μονοκύτταροι οργανισμοί, έχουν την ανάγκη κατανάλωσης ποσοτήτων άνθρακα και αζώτου, που αποτελούν τα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωσή του (Kowalska J., et al. 2022). Υπό αερόβιες συνθήκες, οι ζύμες αφομοιώνουν τους υδατάνθρακες για να παράγουν CO₂ και H₂O, και υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπουν τους υδατάνθρακες σε αλκοόλ μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης (Kowalska J., et al. 2022).

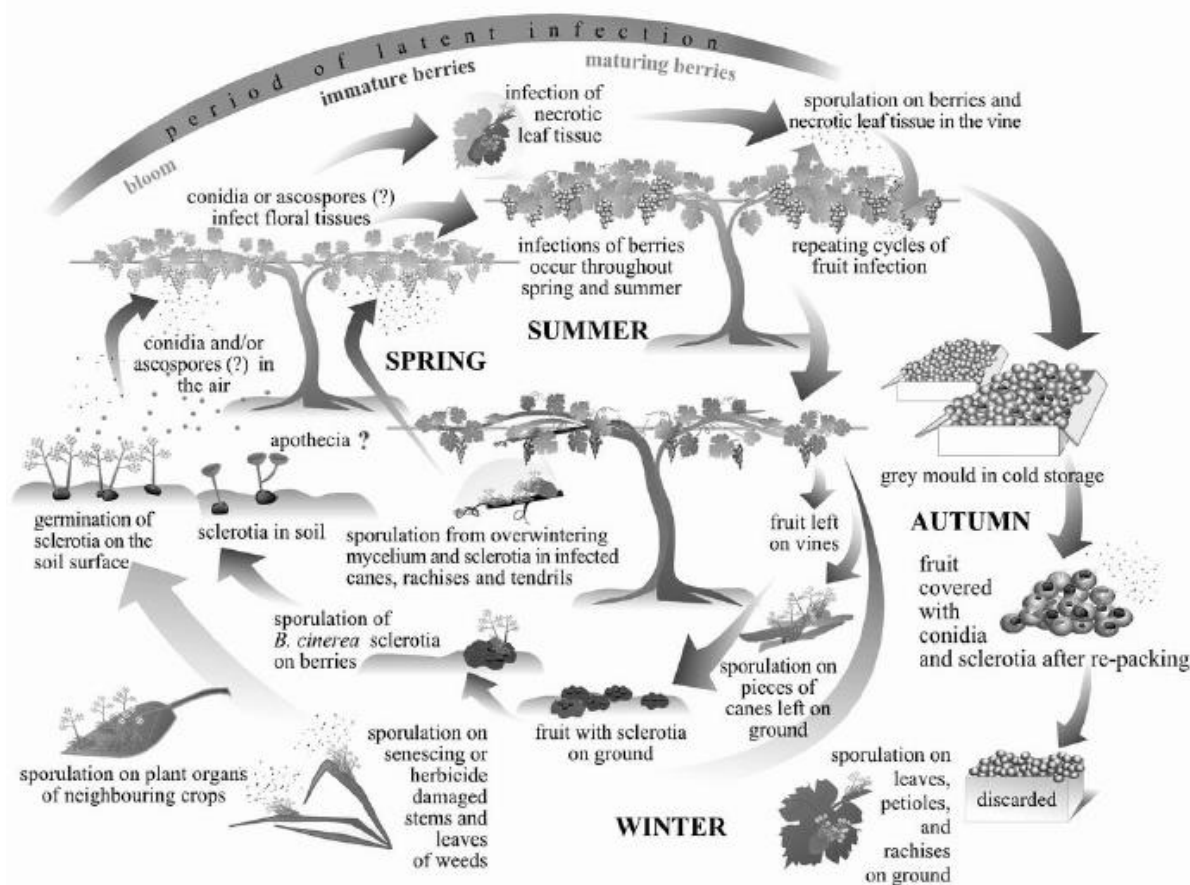
Τα κύτταρά τους, που έχουν στρογγυλό, ελλειψοειδές, οβάλ ή κυλινδρικό σχήμα, δημιουργούν αποικίες που ποικίλλουν μορφολογικά ανάλογα με το στέλεχος (Chen P. et al., 2018). Το σχήμα και το μέγεθός τους, είναι άμεσα εξαρτημένα από το είδος, την κατάσταση της καλλιέργειας, αλλά και την ηλικία της αποικίας (Chen P. et al., 2018). Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχουν μεγέθη που κυμαίνονται από 3 έως 10 μm σε μήκος και 2 έως 7 μm σε πλάτος, ενώ είναι δυνατό να είναι απλοειδείς, διπλοειδείς ή πολυπλοειδείς (Kowalska J., et al. 2022). Σημαντικό χαρακτηριστικό τους ως μονοκύτταροι οργανισμοί, είναι η ιδιότητά τους να προσκολλώνται σε φυτικούς ιστούς και με τις αποικίες τους να σχηματίζουν βιοφίλμ (Kowalska J., et al. 2022). Αυτό το χαρακτηριστικό, συμβάλει στην ικανότητά τους να επιβιώνουν στο περιβάλλον ευκολότερα, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την έντονη ανταγωνιστικότητά τους (Chen P. et al., 2018).

Μεταξύ των μικροοργανισμών που είναι πιθανοί ανταγωνιστές για τους παθογόνους μικροοργανισμούς των φυτών, οι ζυμομύκητες πληρούν όλες τις προϋποθέσεις για έναν αποτελεσματικό ανταγωνιστή κατά των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Kowalska, J., et al. 2022):

- Αναπαράγονται αγενώς. Το πρώτο είδος της αγενούς αναπαραγωγής σε ζυμομύκητες, δηλαδή η εκβλάστηση, απαιτεί τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, που είναι η θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών ώστε να πραγματοποιηθεί. Ο συγκεκριμένος τρόπος αναπαραγωγής είναι χαρακτηριστικό ειδών των γενών *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* και *Rhodotorula*. Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από την αναπαραγωγή αυτή είναι πανομοιότυπα με τα γονικά κύτταρα, με τη μόνη διαφορά πως είναι μικρότερα σε διαστάσεις. Τα νέα αυτά κύτταρα αποκολλώνται από το μητρικό και σχηματίζουν έναν ανεξάρτητο οργανισμό ή σε ορισμένες περιπτώσεις, συσσωματώνονται με αυτόν και σχηματίζουν το λεγόμενο “ψευδομυκήλιο”. Ο δεύτερος τύπος αναπαραγωγής, είναι η διχοτόμιση. Κατά αυτή την περίπτωση, το κύτταρο αναπτύσσεται επιμηκνόμενο προς μία πλευρά, με τα θυγατρικά κύτταρα να έχουν το ίδιο μέγεθος αυτή τη φορά, με το μητρικό κύτταρο (Kowalska, J., et al. 2022).
- Ένα άλλο χαρακτηριστικό που κάνει τις ζύμες ιδανικούς μικροοργανισμούς για ανταγωνιστικές συνθήκες, είναι πως σε περιπτώσεις περιβαλλοντικής καταπόνησης, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οι ζυμομύκητες υφίστανται το φαινόμενο της σπορίωσης, δημιουργούν δηλαδή σπόρια, που διαθέτουν υψηλότερες αντοχές επιβίωσης σε σχέση με τα απλά κύτταρα. Το σχήμα των σπορίων είναι χαρακτηριστικό κάθε είδους ζύμης. Κατά αυτό τον τύπο αναπαραγωγής, τα απλοειδή σπόρια συζευγνύονται, σχηματίζοντας διπλοειδή σπόρια. (Kowalska, J., et al. 2022)

- Ακόμα, μια ευρεία ποικιλία ειδών ζυμομυκήτων, με εξαίρεση τα στελέχη του είδους *S. cerevisiae*, στερούνται πλασμιδίων, γεγονός που αποκλείει τον κίνδυνο παθογένειας και τοξίνης με βάση το πλασμίδιο. (Kowalska, J., et al. 2022)
- Χαρακτηριστικό που συμβάλει στη χρήση των ζυμών στη βιοτεχνολογία είναι ο άμεσος αποικισμός τους σε φυτικές επιφάνειες, και η εκμετάλλευση/ αξιοποίηση θρεπτικών συστατικών από τις πηγές αυτές. Όταν γίνεται λόγος για χρήση τους σε τρόφιμα, σημαντικό είναι πως δεν παράγουν επικίνδυνους μεταβολίτες και δεν έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στο τελικό προϊόν διατροφής.
- Τέλος, μπορούν να καλλιεργηθούν σχετικά εύκολα και να συλλεχθούν οι μεταβολίτες τους, οι οποίοι έχουν έντονη δραστηριότητα, γεγονός που καθιστά δυνατή την επιλογή εκείνων των ειδών και στελεχών ζύμης που μπορεί να χρησιμοποιηθούν και ως βιομυκητοκτόνα (Kowalska, J. 2022).

Η ιδιότητα των ζυμομυκήτων να ανταγωνίζονται άλλους, ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς για τον ζωτικό χώρο και τα θρεπτικά στοιχεία, είναι ο κύριος τρόπος δράσης τους όσον αφορά στη βιολογική αντιμετώπισης (Vadasz, A S., et al., 2002). Μεταξύ των διαφόρων τρόπων δράσης τους, η πρόκληση διασυστηματικής αντοχής (systemic resistance) είναι εκείνη με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και τα πιο αποδοτικά αποτελέσματα (Millan, A., et al., 2022) καθώς μειώνει την ασθένεια, αλλά ταυτόχρονα προσφέρει στο φυτό ένα σχετικά υψηλό επίπεδο αντοχής έναντι ενός ευρέος φάσματος παθογόνων, χωρίς την ανάγκη άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ τους (Gkizi, D. et. al., 2021). Αν και σε προηγούμενες μελέτες διάφορες εφαρμογές ανέστειλαν πλήρως την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως οι μύκητες *A. carbonarius* και *B. cinerea* στα σταφύλια, προς το παρόν η βιολογική αντιμετώπιση δεν μπορεί να φτάσει τα επίπεδα φυτοπροστασίας που μπορούν τα χημικά σκευάσματα (Gkizi, D. et. Al., 2021).



Εικόνα 3: Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *B. cinerea* (Elmer, P. A. G., & Michailides, T. J., 2007)

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι ζυμομύκητες δρουν εναντίον των παθογόνων των φυτών ποικίλουν, με μερικούς όπως η ανταγωνιστική ιδιότητα, η παραγωγή ενζύμων, τοξινών, πτητικών ενώσεων που εκλύουν, αλλά και ο μυκοπαρσιτισμός, να θεωρούνται θεμελιώδεις παράγοντες για τη χρησιμότητά τους αυτή (Kowalska, J., et al. 2022). Σε γενικές γραμμές, οι μηχανισμοί αυτοί αποτελούν ακόμη ένα ανεξερεύνητο πεδίο ερευνών, που ωστόσο υπόσχονται πολλά για την κυκλοφορία σκευασμάτων με βάση ζυμομύκητες ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα στο εμπόριο.

Κάθε οργανισμός που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως δραστικό συστατικό σε ένα προϊόν βιολογικής φυτοπροστασίας πρέπει να είναι αποτελεσματικός έναντι της νόσου-στόχου αλλά και δευτερεύουσες ιδιότητες, όπως θέματα βιοασφάλειας, επιβίωση στις εκάστοτε συνθήκες και απαιτούμενος εξοπλισμός για την εφαρμογή του, είναι εξίσου ή και πιο σημαντικές (Vadasz, A S., et al., 2002).

Ο σχηματισμός βιοφίλμ μπορεί επίσης να θεωρηθεί μεγάλο πλεονέκτημα και εξαιρετικά επιτυχημένη στρατηγική για τον ανταγωνισμό- κυρίως χώρου μεταξύ των μικροοργανισμών (Millan A., et al., 2021). Τα βιοφίλμ είναι μικροβιακές αποικίες/ κοινότητες, που δημιουργούνται και αναπτύσσονται σε επιφάνειες φυτικών ιστών και μπορούν να αποτελούνται από ένα μόνο είδος

ζυμομύκητα ή να αποτελούν ένα σύμπλεγμα πολλαπλών ειδών ζυμομυκήτων (Kowalska, J. 2022). Τα βιοφίλμ μπορεί να παρουσιάζουν πολλαπλές και διαφορετικές ιδιότητες συγκριτικά με ελεύθερα επιπλέοντα κύτταρα και θεωρούνται λοιμογόνος παράγοντας για παθογόνους μικροοργανισμούς (Kowalska J. 2022).

1.3 Ένζυμα των ζυμομυκήτων

Τα ένζυμα που εκλύουν οι ζυμομύκητες κατά την ανάπτυξή τους, παίζουν έναν επιπλέον πρωταρχικό ρόλο στην φυτοπροστατευτική τους ιδιότητα. Η έκκριση ενζύμων που αποδομούν τα κυτταρικά συστατικά είναι ένα χαρακτηριστικό που συναντάται σε όλα τα είδη αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου και γι' αυτό το λόγο έχει μελετηθεί επανειλημμένα (Kowalska J. 2022). Όταν γίνεται λόγος για τέτοιου είδους ένζυμα, συνήθως πρόκειται για ρυθμιστές των θρεπτικών στοιχείων που προσλαμβάνει το κύτταρο από τον ιστό του ξενιστή (π.χ. πηγές άνθρακα, αμινοξέα). Τα εκκρινόμενα ένζυμα όπως οι χιτινάσες, οι γλυκανάσες ή οι πρωτεάσες αναφέρονται τακτικά και επισημαίνονται ως χαρακτηριστικά σε ανταγωνιστικούς ζυμομύκητες που εμπλέκονται στην βιολογική τους δράση στη φυτοπροστασία (Millan A., et al., 2021).

- i) Οι χιτινάσες επιτρέπουν την αποτελεσματική αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων μυκήτων. Η δράση τους αυτή, έχει καταγραφεί σε είδη ζυμομυκήτων των γενών *Candida*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Pichia* και *Saccharomyces*. Η κατηγορία ενζύμων αυτή, μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ενδογενών μηχανισμών άμυνας των φυτών, καθώς αποδομώντας τη χιτίνη, παράγονται χιτοολιγοσακχαρίτες (Kowalska, J. 2022).
- ii) Οι λιπάσες είναι ένζυμα που χαρακτηρίζονται από την αλληλεπίδρασή τους με μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα (Kowalska, J. 2022). Συναντώνται κυρίως στα γένη ζυμομυκήτων *Candida* και *Cryptococcus* (Millan A., et al., 2021) .
- iii) Οι βήτα-γλυκάνες είναι απαραίτητα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμομυκήτων, που ευθύνονται για την κυτταρική προσκόλληση και την ανθεκτικότητά τους στις τοξίνες (Millan A., et al., 2021).
- iv) Η β-1,3-γλυκανάση, η οποία παράγεται από ζυμομύκητες του γένους *Candida* είναι αποτελεσματική στη μείωση της ανάπτυξης παθογόνων, αφού παρουσιάζει έντονο ανταγωνισμό για την κατανάλωση σιδήρου, ένα από τα κύρια στοιχεία θρέψης για τους μικροοργανισμούς. (Kowalska, J. 2022).

1.4. Οι πτητικές ενώσεις των ζυμομυκήτων ως ανασταλτικός παράγοντας στη δράση του μύκητα *B.cinerea*

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις παράγονται από μικροοργανισμούς όπως οι μύκητες, βακτήρια και ζυμομύκητες κατά τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό τους (Contarino R., et al., 2019). Πρόκειται για ενώσεις που μπορούν να εμπλακούν στη διακυτταρική ανταλλαγή ουσιών, περιορίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (Kowalska J. 2022). Οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) είναι μικρά μόρια με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και υψηλή τάση ατμών (Kowalska J. 2022). Τέτοιες ενώσεις καλύπτουν μια πληθώρα κατηγοριών, αφού μπορεί να εμφανίζονται με τη μορφή υδρογονανθράκων, αλκοολών, αλδεϋδών, κετονών, κυκλοεξανίων, ετεροκυκλικών ενώσεων, φαινολών, αλλά και παράγωγα βενζολίου (Kowalska J. 2022). Η χημική σύσταση των πτητικών ενώσεων που παράγει κάθε ζυμομύκητας κατά τον μεταβολισμό του διαφέρει και αποτελεί χαρακτηριστικό του, ενώ σημαντικό ρόλο στη σύσταση αυτή έχει το είδος του μικροοργανισμού που ανταγωνίζεται (Kulakiotu E, et al., 2004).

Μελέτες έχουν αποδείξει πως οι πτητικές ενώσεις των ζυμομυκήτων μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων (Kulakiotu E., et al., 2004; Contarino A., et al., 2019), συμπεριλαμβανομένων των μετασυλλεκτικών παθογόνων, αλλά και μύκητες που κατά την ανάπτυξή τους, δημιουργούν μυκοτοξίνες (Millan A., et al., 2021).

Η δράση ζυμομυκήτων, που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ή και σε γεωργικά προϊόντα, όπως οι *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* και *A. pullulans*, εναντίον του μύκητα *B. cinerea* in vitro, ή σε αποθηκευμένα προϊόντα, όπως μήλα, σταφύλια ή και ντομάτες), αποδόθηκε σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή των πτητικών ενώσεων (Fernandez-San Milan et al., 2021, Freimose M F, 2019).

1.5. Ο ρόλος των μεταβολιτών των ζυμομυκήτων

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μεταβολίτες που έχουν ανασταλτική δράση προς παθογόνους μικροοργανισμούς, είναι οι λεγόμενες τοξίνες killer (Millan, A.F.S. et al., 2022). Ο μεταβολισμός των ζυμομυκήτων είναι η βιοχημική αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών, και κατόπιν η παραγωγή ενέργειας (Millan, A.F.S. et al., 2022). Συγκεκριμένα, είναι αναγωγικές και οξειδωτικές αντιδράσεις του αναβολισμού και του καταβολισμού του κυττάρου αντίστοιχα, όπου μεσολαβούν τα ένζυμα αφυδρογονάσης χρησιμοποιώντας κυρίως NADP και NAD, που παίζουν τον ρόλο των οξειδοαναγωγικών συν-ενζύμων (Millan, A.F.S. et al., 2022). Με τον σχηματισμό NADH και την

οξειδωση σε NAD επιτυγχάνεται μια συνεχής ισορροπία στο κύτταρο, ενθαρρύνοντας την ταχύτητα της διαδικασίας της γλυκόλυσης (Larnbrechts, M. G., 2000). Οι μεταβολίτες που παράγονται από την δράση των ζυμομυκήτων, μπορεί να είναι εστέρες, λιπαρά οξέα, εστέρες λιπαρών οξέων και ανώτερες αλκοόλες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του κυττάρου (Larnbrechts, M. G., 2000).

Οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, πολλές φορές, ενεργοποιούν πλήθος γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών από τους ζυμομύκητες, που υπό άλλες συνθήκες, όπως σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας δεν εκφράζονται ή εκφράζονται ασθενώς, παράγοντας έτσι νέες χημικές ουσίες όπως αντιμικροβιακές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βελτιωτικά γεύσης και αρώματος για ποτά και τρόφιμα (Millan, A. F. S. et al., 2022) ή ακόμα στη φυτοπροστασία.

1.6. Πλεονεκτήματα αποικιών ζυμομυκήτων στα φυτά

Οι ζυμομύκητες που αποικίζουν τα φυτά μπορούν επίσης να βελτιώσουν ορισμένες λειτουργίες στην άμπελο, αλλά και να μεσολαβήσουν στη δέσμευση θρεπτικών στοιχείων. Δηλαδή, οι αποικίες των ζυμομυκήτων στα φυτά αποτελούν ένα “τονωτικό” των φυτικών ιστών, που προωθεί την ανάπτυξη και παραγωγή θρεπτικών συστατικών, όπως άζωτο, φώσφορο και κάλιο, που δεσμεύονται από το αμπέλι προάγοντας κατά αυτό τον τρόπο την αντοχή του φυτού σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Kowalska, J., et al. 2022). Άλλωστε, η χαμηλή διαθεσιμότητα αζώτου (N) αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες αιτίες μειωμένης απόδοσης παραγωγής στους αμπελώνες. (Kowalska, J., et al. 2022)

Οι ζυμομύκητες επίσης, μπορούν να παράγουν επιπλέον φυτικές ορμόνες όπως αυξίνες ή κυτοκινίνες, που έχουν ζωτικής σημασίας αντίκτυπο στη ρύθμιση των φυσιολογικών διεργασιών των φυτών, αλλά και στην ομαλή ανάπτυξή τους (Kowalska, J., et al. 2022). Μεταξύ των μικροοργανισμών οι περισσότεροι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την πρόσληψη αζώτου από τα φυτά είναι τα βακτήρια, χωρίς όμως να εκλείπουν και παραδείγματα με επιλεγμένα είδη ζυμομυκήτων όπως *A. pullulans*, *C. oleophila*, *M. fructicola* και *S. cerevisiae* (Kowalska, J., et al. 2022).

Επιπλέον η παρουσία αποικιών ζυμομυκήτων στα φυτικά όργανα έχει βρεθεί ότι αυξάνει την περιεκτικότητά τους σε θρεπτικές ουσίες όπως το ασβέστιο, ο σίδηρος, το μαγνήσιο, το θείο και ο ψευδάργυρος. Το φαινόμενο αυτό, συνήθως προκαλείται από αύξηση της οξύτητας στο ριζικό σύστημα, καθώς οι αποικίες των ζυμομυκήτων παράγουν οργανικά οξέα, όπως οι ζυμομύκητες *Williopsis californica* και *S. Cerevisiae* (Kowalska, J., et al. 2022).

2. Σκοπός της μελέτης

Στις μέρες μας, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για ανάπτυξη βιοπαρασιτοκτόνων βασισμένων σε μικροοργανισμούς με αντιμικροβιακή δράση (Millan, A. F.), με σκοπό τη μείωση της χρήσης χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τον περιορισμό της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις δραστικές ουσίες από τα παθογόνα, που μειώνει την αποτελεσματικότητα των φυτοφαρμάκων (Gkizi, D. et al 2021). Ειδικότερα, ο μύκητας *B. cinerea* αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικότητα σε δραστικές ουσίες (Gkizi, D. et 2021), ενώ συχνά παρατηρούνται υπολείμματα χημικών σκευασμάτων στα τελικά προϊόντα, καθώς ο χρόνος από τη στιγμή της εφαρμογής τους έως τη συγκομιδή είναι σύντομος (Gkizi, D. et 2021). Γίνονται προσπάθειες από ερευνητές παγκοσμίως για την ανεύρεση μικροοργανισμών που να ανταγωνίζονται ικανοποιητικά τον μύκητα *B. cinerea*, και οι ζυμομύκητες διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά, που τους καθιστούν κατάλληλους για τη χρήση αυτή. Μερικά από αυτά είναι η ανταγωνιστική τους δράση για χώρο και θρεπτικά συστατικά, οι πτητικές ενώσεις που εκλύουν, και οι ιδιαίτεροι μεταβολίτες τους που έχει παρατηρηθεί πως έχουν ανασταλτική δράση εναντίον του μύκητα. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της δράσης ορισμένων στελεχών ζυμομυκήτων οινοποίησης του εμπορίου στην ανάπτυξη και κονιδιογένεση του παθογόνου μύκητα *B. cinerea* τόσο σε συνθήκες *in vitro* όσο και σε κομμένες ράγες σταφυλιού. Συγκεκριμένα για να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης τους μελετήθηκε τόσο η δράση ζωντανών κυττάρων ζυμομυκήτων όσο και των μεταβολιτών αλλά και των πτητικών ενώσεων που παράγουν.

3. Υλικά και μέθοδοι

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν στο εργαστήριο Αμπελουργίας και Βιολογίας Φυτών του τμήματος Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Οι πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω έλαβαν χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.1. Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος του μύκητα *B. cinerea* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προέρχεται από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθήνας. Αρχικά, αποψύχθηκε υλικό από τους -80°C το οποίο εμβολιάστηκε σε τρυβλία με αποστειρωμένο θρεπτικό

υπόστρωμα πατάτας και επώαστηκε για δύο εβδομάδες, έως ότου να αναπτυχθούν τα κονίδια του μύκητα. Τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, προέρχονται από τα εμπορικά σκευάσματα που αναφέρονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Στοιχεία εμπορικών ζυμομυκήτων

<i>Είδος Ζυμομύκητα</i>	<i>Στέλεχος</i>	<i>Εταιρεία</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>ES181</i>	<i>Enartis</i>
<i>S. pastorianus</i>	<i>KBG6</i>	<i>Fermentis</i>
<i>S. bayanus</i>	<i>BCS 103</i>	<i>Fermentis</i>
<i>Lachancea thermotolerans</i>	<i>Omega</i>	<i>Laffort</i>
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Biodiva TD291</i>	<i>Lallemand</i>

3.2. Πειράματα *in vitro*

3.2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών

Ο μύκητας *B. cinerea* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα καλλιεργήθηκε σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA).

Για την παρασκευή 1 λίτρου PDA ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Βράσιμο ψιλοκομμένης και ξεφλουδισμένης πατάτας σε απιονισμένο νερό, με αναλογία 200gr/lit, για 45' και συλλέγεται το εκχύλισμα
- Μετά το πέρας του βρασμού προστίθενται 20g/ lit άγαρ και 20g/lit γλυκόζη και το διάλυμα ογκομετρείται ώστε να προσαρμοστεί κατάλληλα ο όγκος του.
- Στη συνέχεια αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο κλίβανο στους 120°C και μετά το πέρας της αποστείρωσης και όταν φτάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία το θρεπτικό υλικό, στρώνεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri.

Τα στελέχη των ζυμομυκήτων που είχαν απομονωθεί από εμπορικά σκευάσματα και φυλάσσονταν επίσης στους -80°C, ενεργοποιήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό YPD Agar. Μονόσπορες καλλιέργειες εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό YPD και επώαστηκαν για 2 ημέρες στους 28°C έως ότου η συγκέντρωση των κυττάρων φθάσει τα 10⁶ κύτταρα/ml. Για την παρασκευή

του θρεπτικού υλικού YPD απαιτούνται 10 g/L Yeast extract, 20 g/L Bacteriological peptone, 20 g/L Dextrose και για την παρασκευή στερεού YPD προστίθενται 20 g/L Agar.

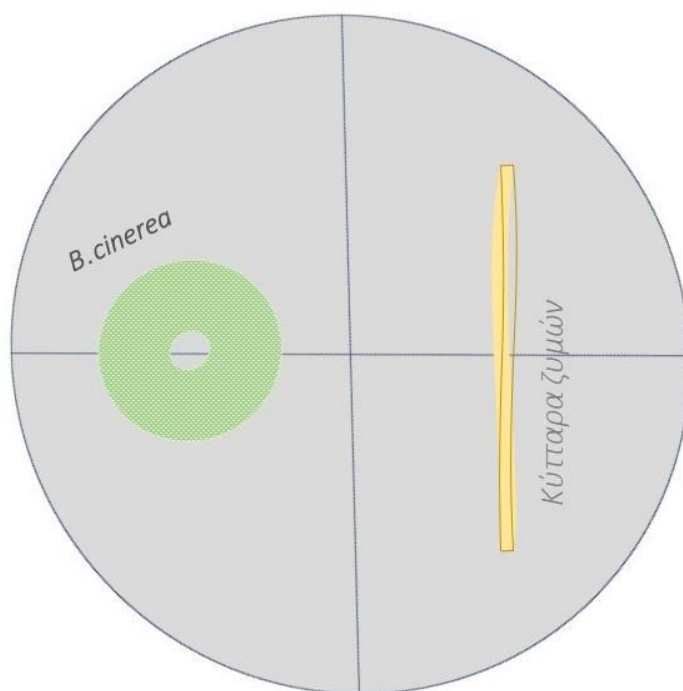
3.2.2 Πειράματα in vitro παρουσία κυττάρων ζυμομυκήτων

Για τα εργαστηριακά πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* ES18, *S. pastorianus* KBG6, *S. bayanus* BCS10, *Lachancea thermotolerans* Omega, *Torulaspota delbrueckii* Biodiva TD29 (Πίνακας 1). Με τα ίδια στελέχη πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια και τα υπόλοιπα πειράματα.

Οι υγρές καλλιέργειες των ζυμομυκήτων, φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 στροφές, για 10 λεπτά, χωρίς ψύξη, ώστε να διαχωριστούν οι μεταβολίτες από τα κύτταρα της υγρής καλλιέργεια σε δύο διακριτές φάσεις. Απομακρύνθηκε η υγρή φάση και τα κύτταρα ζυμομυκήτων, επαναιωρήθηκαν σε ίσο όγκο αποστηρωμένου απιονισμένου νερού σε σωληνάριο τύπου erpendorf, που αναδεύτηκε ελαφρά για λίγα δευτερόλεπτα.

Κονίδια του μύκητα συλλέχθηκαν από τη στερεή καλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες και δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 10^6 κονίδια/ml σε αποστηρωμένο απιονισμένο νερό.

Σε τρυβλία petri με θρεπτικό υλικό PDA εμβολιάστηκαν, από τη μια μεριά του τρυβλίου 10μl αιώρημα κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* και από την άλλη υδατικό αιώρημα κυττάρων από τις υγρές καλλιέργειες των ζυμομυκήτων, όπως φαίνεται στην εικόνα 4:



Εικόνα 4: Σχέδιο εμβολισμού τρυβλίου για συγκαλλιέργεια του μύκητα *B. cinerea* με κύτταρα από ζυμομύκητες

Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε στέλεχος (3 τρυβλία). Με χάρακα μετρήθηκαν οι διαστάσεις των καλλιέργειών του μύκητα *B. cinerea* στις τρεις και στις έξι ημέρες μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων.

3.2.3. Πείραμα *in vitro* παρουσία μεταβολιτών των ζυμομυκήτων

Για την εφαρμογή αυτή, απαραίτητο ήταν να διαχωριστούν τα κύτταρα ζυμομυκήτων από τις υγρές καλλιέργειες, ώστε να μελετηθεί μόνο η επίδραση των μεταβολιτών του κάθε στελέχους στην ανάπτυξη και την κονιδιογένεση του μύκητα *B. cinerea*, χωρίς την παρουσία κυττάρων. Φυγοκεντρήθηκε 1,5 ml από την κάθε καλλιέργεια των στελεχών στους 4°C, στις 12.000 στροφές/min, για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο πέρασε από υδρόφιλο φίλτρο (Membrane Solutions) με μέγεθος πόρων 0,22μm και διάμετρο 13mm, ώστε κανένα κύτταρο να μην περάσει στο διάλυμα. Η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των κυττάρων από το υπερκείμενο επιβεβαιώθηκε με επίστρωση του καθαρού υπερκείμενου σε τρυβλία petri όπου δεν παρατηρήθηκε τις επόμενες μέρες

ανάπτυξη ζυμομυκήτων. Από το διάλυμα των μεταβολιτών 0,5 ml απλώθηκε ομοιόμορφα πάνω από το θρεπτικό υλικό των τρυβλίων. Με μικροπιπέτα τοποθετήθηκαν 10μl αιώρηματος κονιδίων του μύκητα όπως στο προηγούμενο πείραμα , αλλά αυτή τη φορά στο κέντρο του τρυβλίου. Μετρήθηκαν με χάρακα οι διαστάσεις των αποικιών μετά από τρεις και έξι ημέρες επώασης στους 25°C.

Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα κονίδια του μύκητα. Για την μέτρηση αυτών, αφαιρέθηκε ένας ομοιόμορφος κύκλος διαμέτρου 0,5 cm από το κέντρο της αποικίας του μύκητα, τοποθετήθηκε σε 1ml απιονισμένο νερό και αναδεύτηκε σε vortex για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να αποκολληθούν τα κονίδια. Με μικροπιπέτα, αντλήθηκαν 15μl από το αιώρημα κονιδίων του μύκητα και τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο Neubauer improved bright-line 0,0025mm² (η οποία και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα κατόπιν πειράματα) ώστε να μετρηθούν τα κονίδια στο οπτικό μικροσκόπιο και να υπολογιστεί η συγκέντρωση των κονιδίων στο διάλυμα. με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή

3.2.4. Πείραμα *in vitro* παρουσία πτητικών ενώσεων των ζυμομυκήτων

Για να μελετηθεί αν οι πτητικές ενώσεις των στελεχών των ζυμομυκήτων επηρεάζουν την ανάπτυξη και την κονιδιογένεση του μύκητα *B. cinerea*, επαναλήφθηκε το πείραμα 1, όμως αυτή τη φορά διαχωρίζοντας το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου στα δύο, αφαιρώντας λωρίδα υποστρώματος, με τη βοήθεια νυστεριού, ώστε να μην έχουν επαφή οι δύο καλλιέργειες. Μετρήθηκαν με χάρακα οι αποικίες του μύκητα στις τρεις και έξι μέρες και στο τέλος του πειράματος μετρήθηκαν τα κονίδια με τη χρήση πλακιδίου Neubauer όπως περιγράφεται παραπάνω.

3.3. Πείραμα *ex vivo* σε σταφύλια

Για το πείραμα αυτό ράγες της ποικιλίας Crimson seedless (με τον ποδίσκο τους) τοποθετήθηκαν σε διαλύματα 10% χλωρίνης για 10' και 70% αιθανόλης για 5' υπό ανάδευση ώστε να απολυμανθούν και ακολούθησε ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό για 10', πάντα σε συνεχή ανάδευση σύμφωνα με τη μέθοδο των Gkizi et al., 2021. Μετά την απολύμανσή τους, οι ράγες απλώθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν.

Μονόσπορες καλλιέργειες των ζυμομυκήτων είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί σε υγρό θρεπτικό υλικό YPD, και μετά από επώαση 2 ημερών στους 25°C, οι υγρές καλλιέργειες των ζυμομυκήτων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως, στα οποία εμβαπτίστηκαν οι ράγες. Σε κάθε καλλιέργεια ζυμομύκητα εμβαπτίστηκαν 24 ράγες (3 επαναλήψεις, 8 ράγες/επανάληψη). Στη συνέχεια

με αποστειρωμένη λαβίδα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά κουτιά, με τρυβλία διαμέτρου 1,5 cm ως πλαστικές βάσεις για την κάθε ράγα ώστε να διατηρούνται όσο το δυνατόν πιο σταθερές. Τα πλαστικά κουτιά για να απολυμανθούν, εμβαπτίστηκαν για μια νύκτα σε πυκνό διάλυμα χλωρίνης. Οι διαστάσεις των πλαστικών κουτιών ήταν 19cm x 28cm, ενώ συνοδεύονταν από καπάκια που επέτρεψαν την αεροστεγή σφράγιση των κουτιών. Στο κάτω μέρος των κουτιών, τοποθετήθηκαν δύο αποστειρωμένα φύλλα διηθητικού χαρτιού ενυδατωμένου με 8 ml αποστειρωμένου νερού για να δημιουργηθούν και να διατηρηθούν συνθήκες υγρασίας.

Οι ράγες, τρυπήθηκαν προσεκτικά με αποστειρωμένη βελόνα και εμβολιάστηκαν με 10μL από αιώρημα κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* συγκέντρωσης 10^6 κονίδια/ml, ακριβώς στην πληγή, ώστε να προκληθεί η επιθυμητή μόλυνση. Όλη η διαδικασία έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα κουτιά σφραγίστηκαν και ακολούθησε επώαση για 15 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αναπτυχθεί ο μύκητας *B. cinerea*. Μετά το πέρας των 15 ημερών λήφθηκαν φωτογραφίες οι οποίες αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού ImageJ, όπου μετρώντας την παρασιτισμένη επιφάνεια (pixels) κάθε ράγας, υπολογίστηκε το ποσοστό εξάπλωσης του μύκητα *B. cinerea* για κάθε εφαρμογή. Η αντιστοιχία σε cm^2 έγινε με βάση το γνωστό εμβαδό του κάθε κουτιού. Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων του μύκητα στο συγκεκριμένο πείραμα, εμβαπτίστηκαν 3 μολυσμένες, τυχαίες ράγες από κάθε εφαρμογή σε ποτήρι ζέσεως με 20mL απιονισμένο νερό. Ύστερα από καλή ανάδευση με vortex για την αποκόλληση των κονιδίων του μύκητα, τοποθετήθηκαν 15μL από το αιώρημα στο πλακίδιο Neubauer. Παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο το πλήθος των κονιδίων και υπολογίστηκε η συγκέντρωση με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

3.4. Στατιστική Ανάλυση

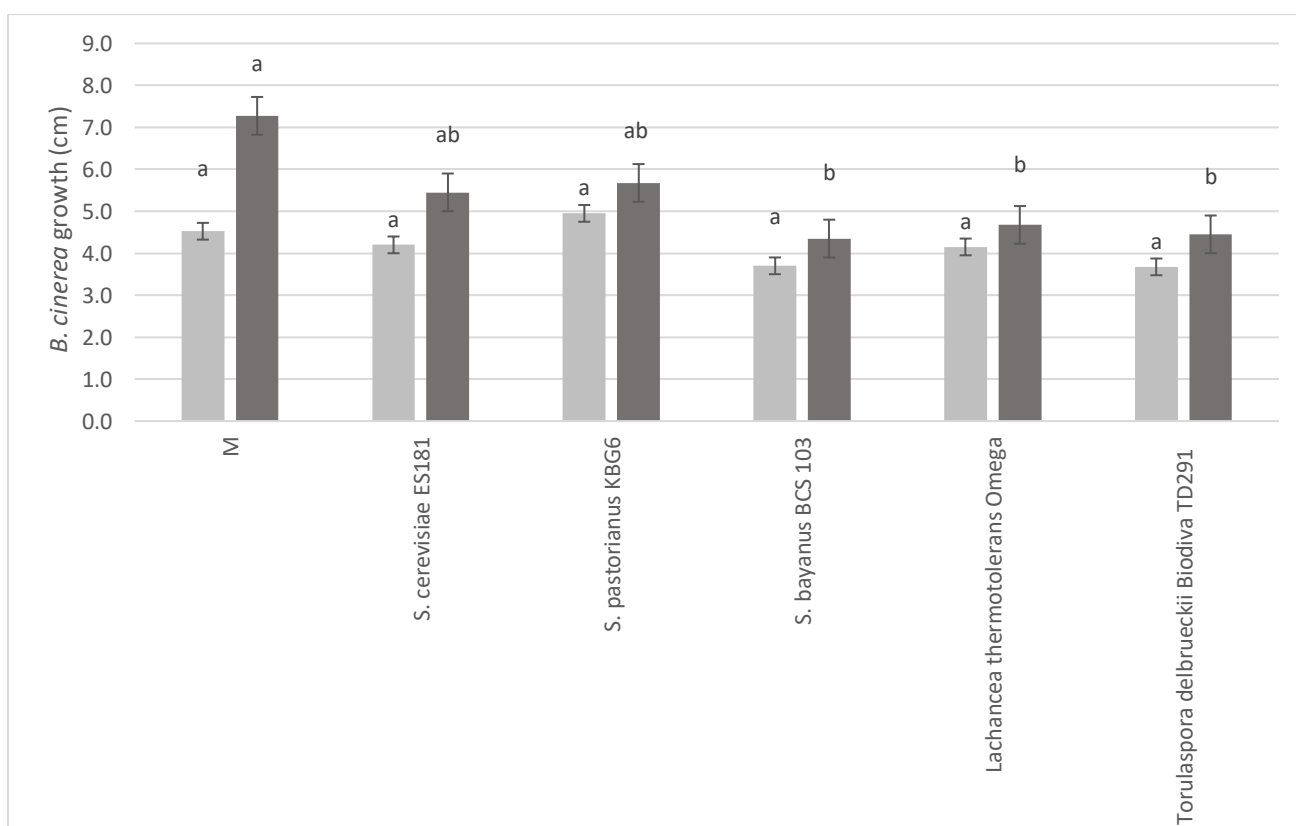
Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων από όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και όπου υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων με τη μέθοδο LSD. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού SGWIN (STATGRAPHICS Plus v2.1).

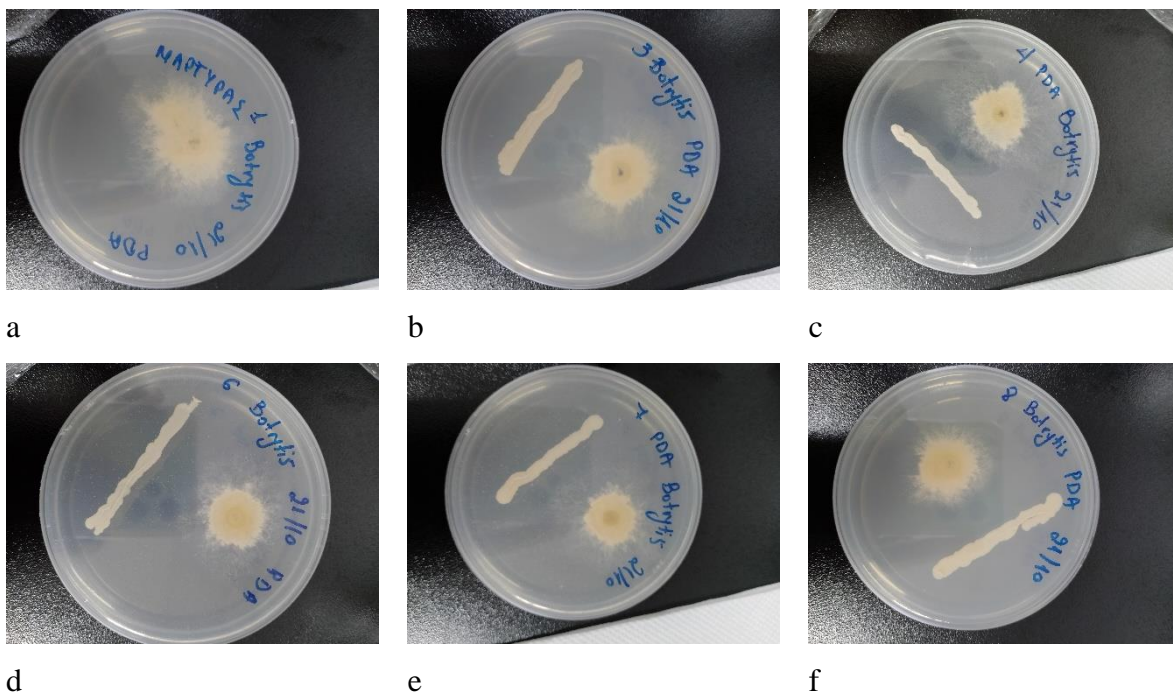
4. Αποτελέσματα

4.1. Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* παρουσία κύτταρων ζυμομυκήτων

Στο πείραμα συγκαλλιέργειας του μύκητα με κύτταρα ζυμομυκήτων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Κατά την δεύτερη μέτρηση, δηλαδή στις έξι μέρες από τους εμβολιασμούς, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* στον μάρτυρα, με διάσταση καλλιέργειας 7,3 cm, ενώ οι μεγαλύτερες διαστάσεις που σημειώθηκαν ήταν στα στελέχη *S. cerevisiae* ES181 και *S. pastorianus* KBG6 με διάσταση κατά 2 περίπου cm μικρότερη του μάρτυρα. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις 6 μέρες στις εφαρμογές *S. bayanus* BCS 103, *L. thermotolerans* Omega και *T. delbrueckii* Biodiva TD291. Η μικρότερη ανάπτυξη κατά τη δεύτερη μέτρηση σημειώθηκε στην εφαρμογή *S. bayanus* BCS 103 (Σχήμα 1).

Σχήμα 1: Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* παρουσία κυττάρων ζυμομυκήτων



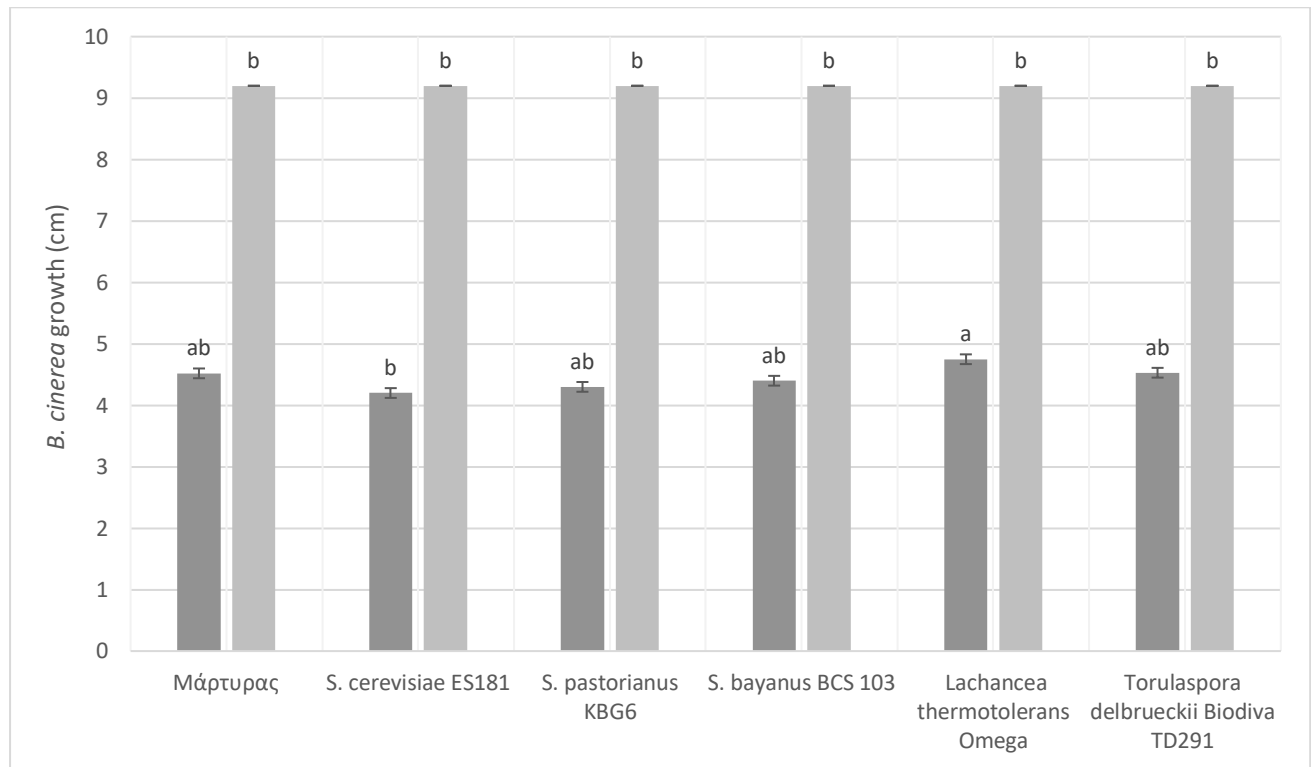


Εικόνα 5: Τρυβλία από το πείραμα συγκαλλιέργειας κυττάρων ζυμομυκήτων με τον μύκητα *B. cinerea*/ Μάρτυρας (a), *S. cerevisiae* ES181 (b), *S. pastorianus* KBG6 (c), *S. bayanus* BCS 103 (d), *Lachancea thermotolerans* Omega (e), *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291(f)

4.2. Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* παρουσία μεταβολιτών των ζυμομυκήτων

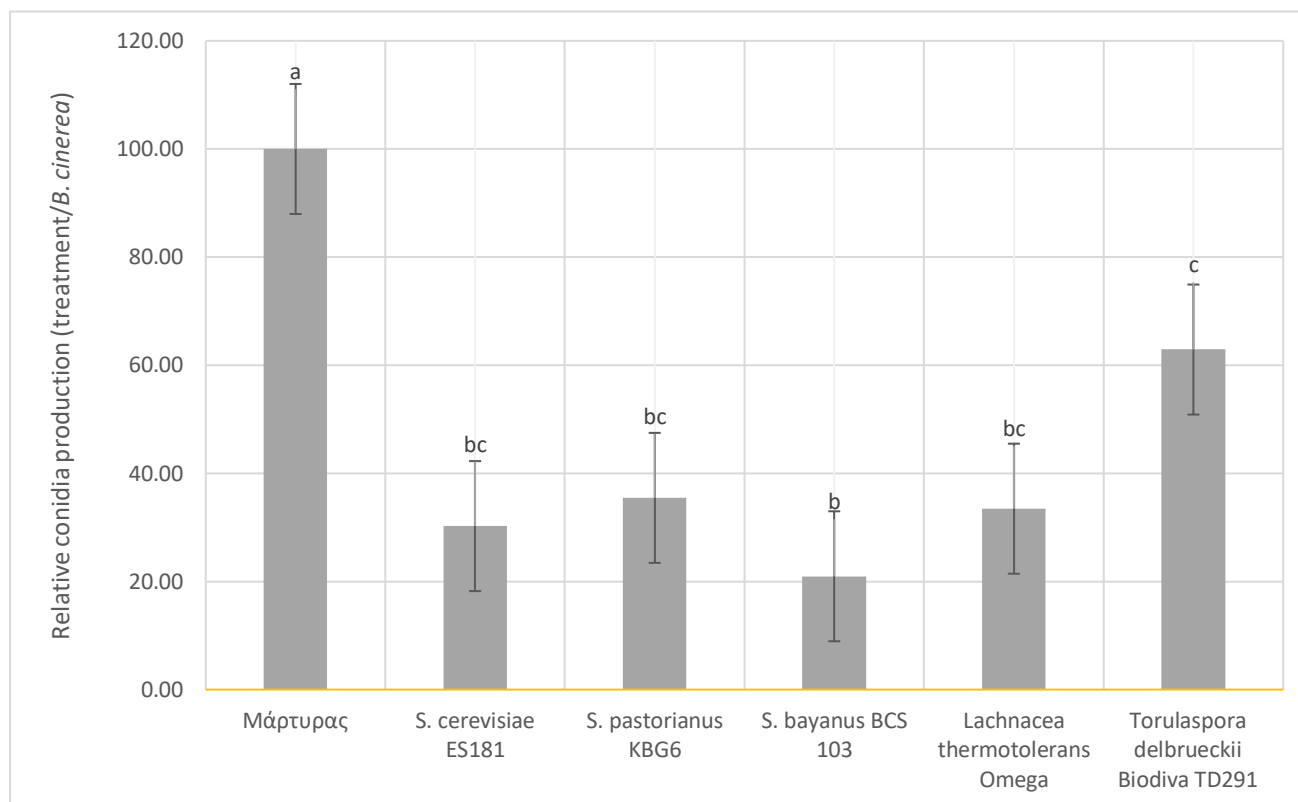
Κατόπιν των αποτελεσμάτων από το πρώτο *in vitro* πείραμα, έλαβε χώρα αντίστοιχη δοκιμασία σε τρυβλία, αλλά αυτή τη φορά μόνο με τους μεταβολίτες των ζυμομυκήτων. Με αυτό το πείραμα έγινε μελέτη της επίδρασης των μεταβολιτών των ζυμών εμπορίου στην ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea*. Οι αποικίες του μύκητα, δεν φάνηκαν να επηρεάζονται από την παρουσία των μεταβολιτών που ενσωματώθηκαν στο θρεπτικό υλικό. Συγκεκριμένα, στην πρώτη μέτρηση, δηλαδή, την τρίτη ημέρα ανάπτυξης, οι διαστάσεις τόσο του τρυβλίου μάρτυρα όσο και των τρυβλίων με τους μεταβολίτες δεν εμφάνισαν αισθητές διαφορές, ενώ στην έκτη μέρα, οι αποικίες του μύκητα *B. cinerea* είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.

Σχήμα 2: Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* *in vitro*, παρουσία μεταβολιτών



Από την άλλη, οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων των κονιδίων που υπολογίστηκαν στις έξι ημέρες από τους εμβολιασμούς, έδειξαν πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα, καθώς εμφάνισαν κατακόρυφη πτώση των κονιδίων στα τρυβλία με τους μεταβολίτες σε όλες τις εφαρμογές συγκριτικά με αυτά του μάρτυρα.

Σχήμα 3: Συγκέντρωση κονιδίων *in vitro* πειράματος παρουσία μεταβολιτών

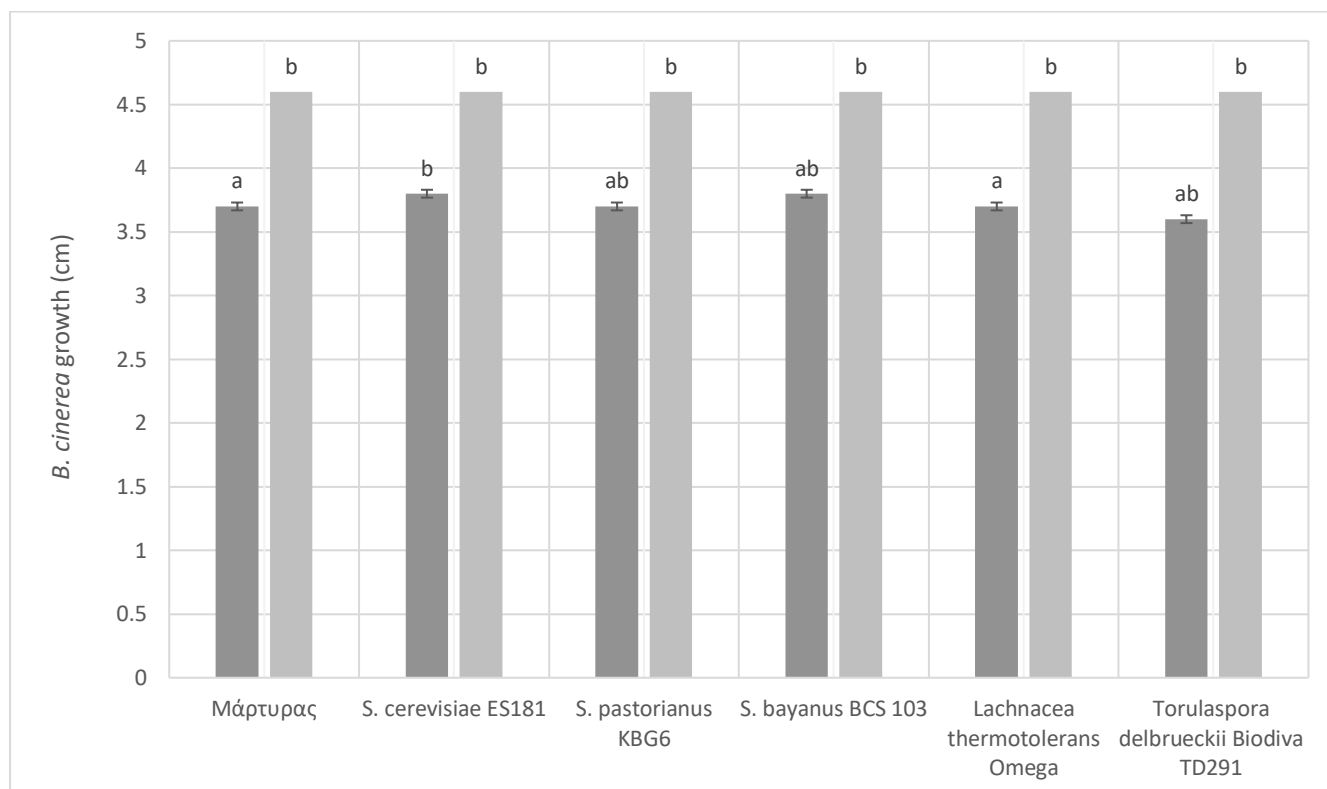


Μια έντονη διαφορά σε σχέση με το πείραμα 1 είναι η συγκέντρωση κονιδίων που εμφάνισε το στέλεχος *S. bayanus* BCS 103, που στα αποτελέσματα, δείχνει να περιορίζεται στο $C_{BCS103} = 20,96\%$ κονίδια/ml, την ίδια στιγμή που στο μάρτυρα, η συγκέντρωση των κονιδίων ήταν $C_M = 100\%$ κονίδια/ml. Αντιθέτως, το στέλεχος *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291 στη δεύτερη περίπτωση έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κονιδίων κατόπιν του μάρτυρα (Σχήμα 4).

4.3. Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* παρουσία πτητικών ενώσεων ζυμομυκήτων

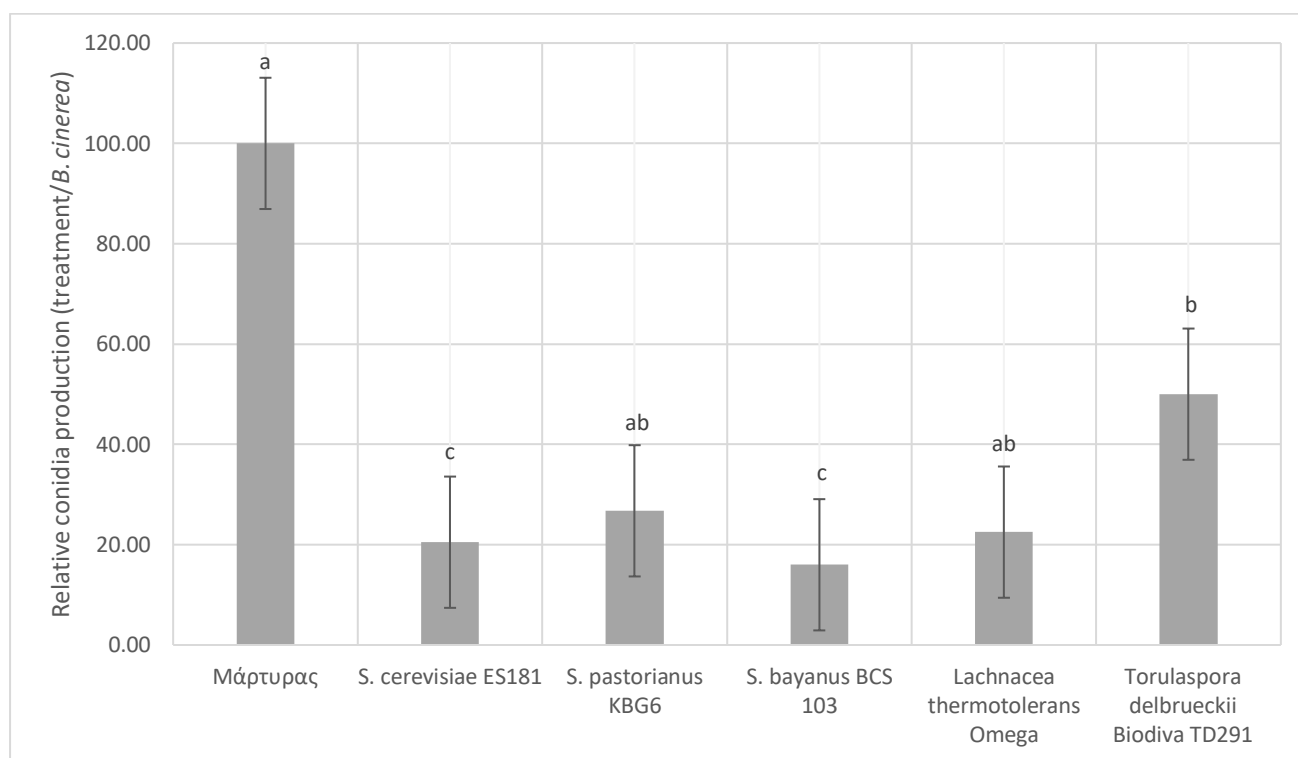
Για να μελετηθεί η επίδραση πτητικών ενώσεων των ζυμομυκήτων στον μύκητα, παρατηρήθηκε η επιρροή που είχαν οι πτητικές ουσίες των μελετούμενων στελεχών *S. cerevisiae* ES18, *S. pastorianus* KBG6, *S. bayanus* BCS10, *Lachancea thermotolerans* Omega, *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291 στην ανάπτυξη και κονιδιογένεση του μύκητα *B. cinerea*.

Σχήμα 4: Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* *in vitro*, παρουσία πτητικών ενώσεων ζυμομυκήτων



Στο διάγραμμα που δημιουργήθηκε, η ανάπτυξη του μύκητα στα τρυβλία με τις πτητικές ενώσεις ζυμομυκήτων παρουσίασε τις ίδιες τιμές με τον μάρτυρα στην πρώτη μέτρηση, ενώ στη δεύτερη και τελευταία μέτρηση, όλα τα τρυβλία του πειράματος ήταν καλυμμένα από την αποικία του βοτρυτί (Σχήμα 5). Σε αντίθεση με την ανάπτυξη του μύκητα, η παραγωγή κονιδίων βρέθηκε και πάλι μειωμένη στις εφαρμογές με τις πτητικές ενώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα (Σχήμα 6).

Σχήμα 5: Κονίδια του μύκητα *B. cinerea* παρουσία πηκτικών ενώσεων ζυμομυκήτων



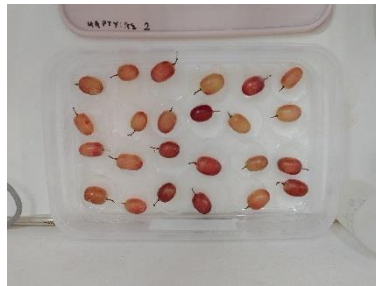
Χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσίασε και πάλι το στέλεχος *S. bayanus* BS103 αλλά και το *S. cerevisiae* ES181 ακολούθησε με ελάχιστα μεγαλύτερη συγκέντρωση κονιδίων.

4.4. Ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* σε σταφύλια

Στο *ex vivo* πείραμα τα αποτελέσματα ήταν περισσότερο αισθητά. Το ποσοστό των προσβεβλημένων ραγών του μάρτυρα ήταν σχεδόν 100%, ενώ στις εφαρμογές με τους ζυμομύκητες ήταν πολύ λιγότερες, και σε ορισμένα στελέχη, μηδαμινές. Αντίστοιχα και η ένταση της προσβολής ήταν σημαντικά μειωμένη σε όλες τις εφαρμογές με ζυμομύκητες. Για παράδειγμα, οι ράγες εμβαπτισμένες με τη ζύμη *Lachancea thermotolerans* Omega, εμφάνισαν ποσοστό μολυσμένης επιφάνειας 6,38%, τη στιγμή που ο μάρτυρας είχε 54,33%. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή, και το στέλεχος *S. bayanus* BCS10 έδειξε πολύ καλή αποτελεσματικότητα (15,92%) στη μείωση της σήψης ακολουθούμενο από το *T. delbrueckii* Biodiva TD291 (18,68%) (Σχήμα 7). Απαραίτητο να σημειωθεί, πως τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε μολυσμένη επιφάνεια ραγών σταφυλιού σε σχέση με ολόκληρη της επιφάνειας της ράγας.



a



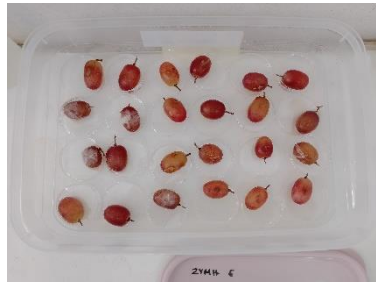
b



c



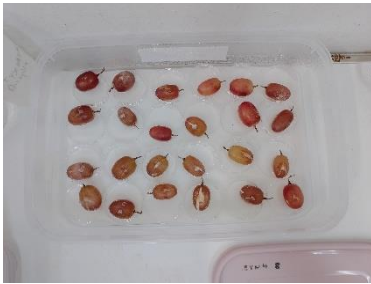
d



e



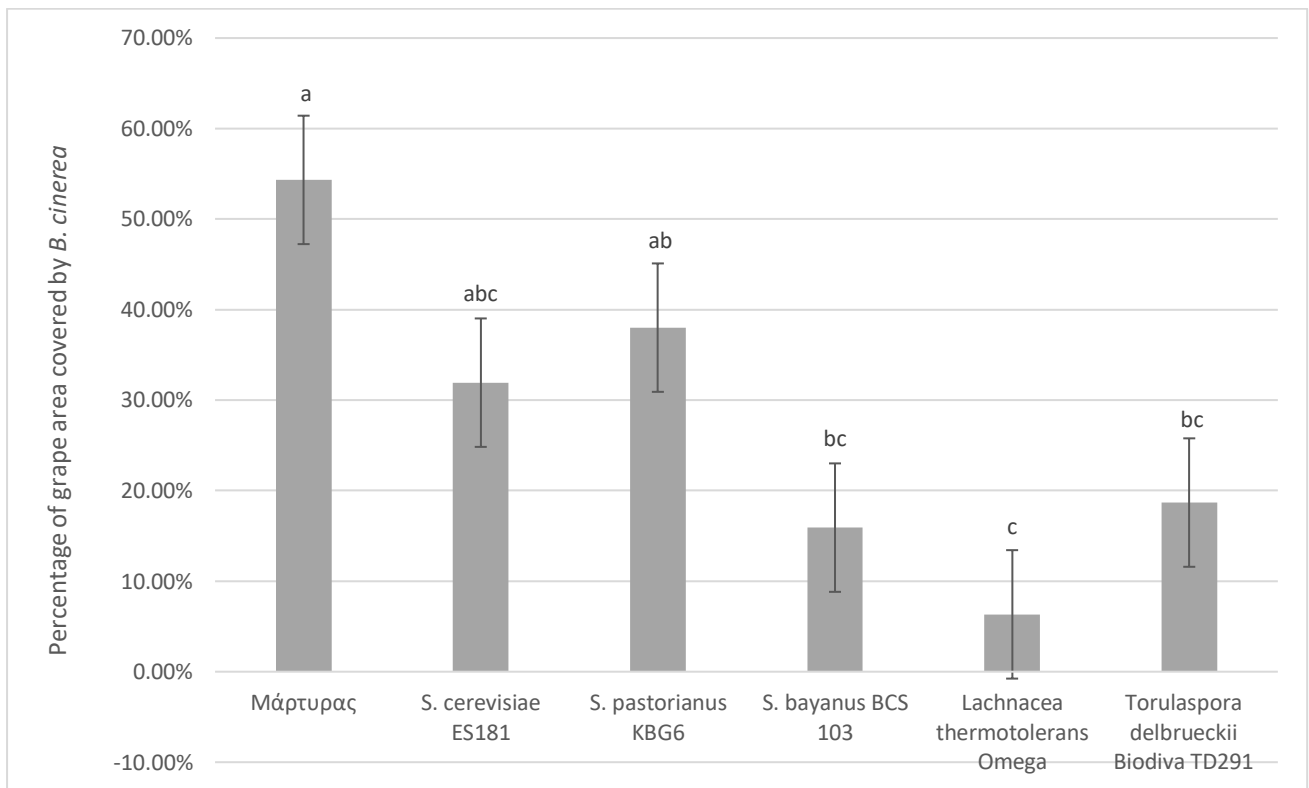
f



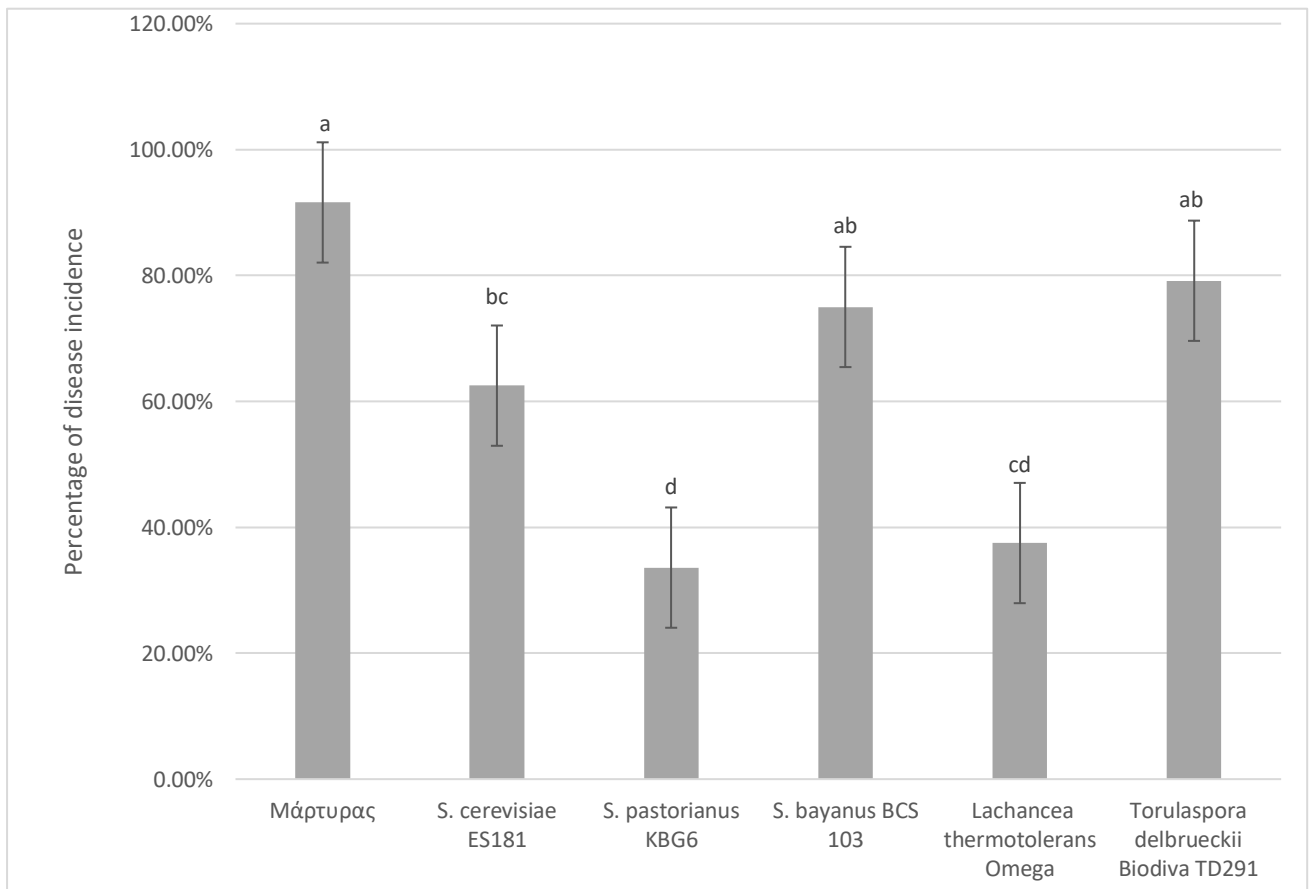
g

Εικόνα 6. Συμπτώματα του μύκητα *B. cinerea* σε ράγες των εφαρμογών του πειράματος *ex vivo*. Μη μολυσμένες ράγες (a), ράγες μολυσμένες μόνο με τον Μύκητα (b), ράγες εμβαπτισμένες σε κύτταρα *S. cerevisiae* ES181 (c), *S. pastorianus* KBG6 (d), *S. bayanus* BCS 103 (e), *Lachancea thermotolerans* Omega (f), *Tolulaspora delbrueckii* Biodiva TD291 (g)

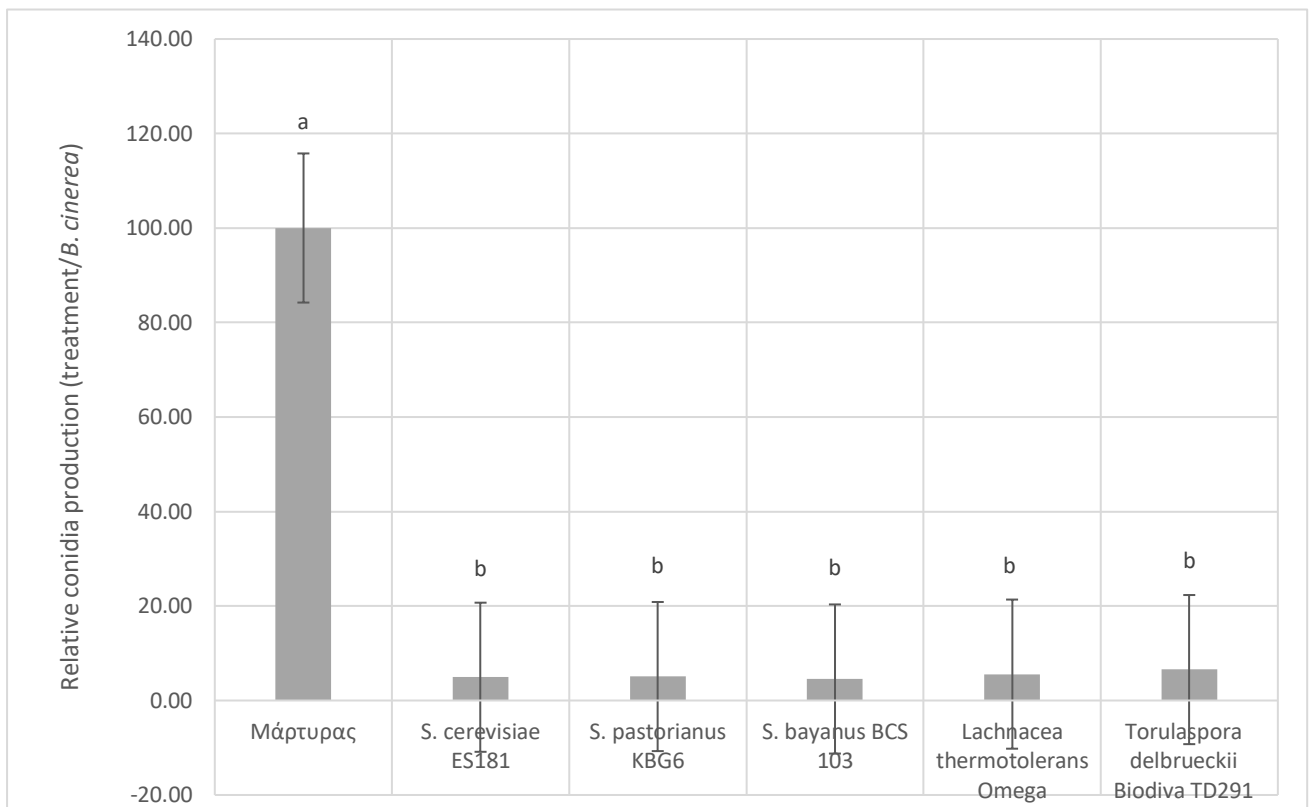
Σχήμα 6: Ποσοστό μολυσμένης επιφάνειας ραγών από τον μύκητα *B. cinerea*



Σχήμα 7: Ποσοστό μολυσμένων ραγών ανά εφαρμογή



Σχήμα 8: Συγκέντρωση κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* σε ράγες σταφυλιού



Τη στιγμή που η συγκέντρωση των κονιδίων στις ράγες του μάρτυρα ήταν $C_M = 100\%$ κονίδια/ml, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις των ζυμομυκήτων ήταν μόλις κάτω από 7% κονίδια/ml.

5. Συμπεράσματα και συζήτηση

Με την ανησυχία που επικρατεί για την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *B. cinerea*, την περιβαλλοντική μόλυνση από υπολείμματα χημικών προϊόντων φυτοπροστασίας, τη ζήτηση των καταναλωτών για βιολογικά προϊόντα, αυξάνονται ολοένα και περισσότερο οι έρευνες για χρήση βιολογικών μεθόδων φυτοπροστασίας. Όσον αφορά στο αμπέλι, στο σταφύλι και κατά συνέπεια στο κρασί που φτάνει στο ποτήρι του καταναλωτή, τα χημικά σκευάσματα για την προστασία τόσο των καρπών και κατ' επέκταση του ίδιου του κρασιού ολοένα και περιορίζονται. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, διερευνήθηκε η ικανότητα ζυμομυκήτων οиноποίησης του εμπορίου να αναστείλουν την εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *B. cinerea in vitro* και σε ράγες σταφυλιού..

Έτσι, στη μελέτη αυτή, έγινε μια σειρά πειραμάτων *in vitro* αλλά και *ex vivo*. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε στελέχη ζυμομυκήτων και εξετάστηκε η ανασταλτική για τον μύκητα *B. cinerea* δράση των κυττάρων, των πτητικών τους ενώσεων και των μεταβολιτών τους. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των συγκεκριμένων ζυμομυκήτων στην εμφάνιση σήψης από τον μύκητα σε ράγες επιτραπέζιου σταφυλιού.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον έδειξαν τα αποτελέσματα του *ex vivo* πείραματος, σε ράγες σταφυλιών Crimson seedless, όπου παρατηρήθηκε μεγάλος περιορισμός του παθογόνου μύκητα σε σχέση με τις ράγες του μάρτυρα, κυρίως από τα στέλεχη *Lachancea thermotolerans* Omega, *Saccharomyces bayanus* BCS103 και *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291. Στη μέτρηση των συγκεντρώσεων των κονιδίων, από την άλλη, όλα τα στελέχη εμπορικών ζυμομυκήτων προκάλεσαν με μεγάλη διαφορά- μεγάλη μείωση των κονιδίων του μύκητα, κάτι που πιθανόν να οδήγησε στη σημαντική μείωση των συμπτωμάτων. Σε τάξη μεγέθους, οι ράγες που είχαν εμβαπτιστεί στα διαλύματα ζυμομυκήτων εμφάνισαν μείωση κονιδίων κατά περίπου 80%. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση είχε το στέλεχος του *Saccharomyces bayanus* BCS103 χωρίς όμως να υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των υπολοίπων στελεχών.

Σχετικά με τα *in vitro* πειράματα, το πρώτο που πραγματοποιήθηκε, ήταν εκείνο με τη συγκαλλιέργεια των κυττάρων ζυμομυκήτων με τον μύκητα *B. cinerea*. Στο συγκεκριμένο πείραμα, παρατηρήθηκε ένας μικρός περιορισμός στην ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea*. Στα δύο *in vitro* πειράματα που επακολούθησαν τα αποτελέσματα όσον αφορά στην ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* ήταν παρόμοια. Την πρώτη χρονικά στιγμή εμφανίστηκαν μικρές διαφοροποιήσεις (στατιστικά αμελητέες) μεταξύ των εφαρμογών. Και στις δύο περιπτώσεις, η αποικία του μύκητα, στις 6 ημέρες

μετά τον εμβολιασμό του τρυβλίου με τον μύκητα, είχε καλύψει πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου, με αποτέλεσμα οι ζυμομύκητες να μην προβάλλουν κανένα περιορισμό στην εξέλιξη του παθογόνου.

Ωστόσο, όσον αφορά στις συγκεντρώσεις των κονιδίων παρουσία μεταβολιτών και πτητικών ενώσεων τα αποτελέσματα στάθηκαν πιο ενδιαφέροντα και αποδοτικά. Στην περίπτωση των μεταβολιτών, η ανάπτυξη των κονιδίων περιορίστηκε αρκετά, ειδικά στο στέλεχος *S. Bayanus* BCS 103, με επακόλουθα τα στέλεχη *S. cerevisiae* ES181 και *Lachancea thermotolerans* Omega. Η συγκέντρωση των κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* παρουσία μεταβολιτών στα τέσσερα από τα πέντε στελέχη του πειράματος (*S. bayanus* BCS, *S. Pastorianus* KBG6, *Lachancea Thermotolerans* Omega και *S. cerevisiae* ES181), περιορίστηκε κάτω από το 50% της τιμής του μάρτυρα, αποτέλεσμα αρκετά αισιόδοξο για την βιολογική καταπολέμηση. Στην εφαρμογή με τον ζυμομύκητα *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291, παρουσία μεταβολιτών, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των κονιδίων.

Η ανασταλτική δράση στελεχών του είδους *S. cerevisiae* έχει παρατηρηθεί πολλαπλές φορές σε ερευνητικές μελέτες ανά τον κόσμο. Για παράδειγμα, σε έρευνα του πανεπιστημίου της Washington, το 2018, παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση εναντίον του μύκητα *B. cinerea* από μεταβολίτες στελεχών *S. cerevisiae* σε *in vitro* πειράματα (Wang, X. et al., 2018). Επιπλέον, σε δημοσιευμένη των A. Fernandez-San Millan et al, 2021, στην Ισπανία, στελέχη *S. cerevisiae* εμφάνισαν ανασταλτικές ιδιότητες εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε *in vitro* εφαρμογές. Επίσης, σε δημοσίευση του Raspor et al. (2023), παρατηρήθηκαν στελέχη *S. cerevisiae*, που πρόβαλαν αποτελεσματικότερη βιολογική άμυνα απ'ότι ο ζυμομύκητας *Candida oleophila*.

Τέλος, στο πείραμα με τις πτητικές ενώσεις, και πάλι, όλα τα στελέχη περιορίσαν σε σημαντικό βαθμό την κονιδιογένεση (*S. bayanus* BCS103, *S. pastorianus* KBG6, *Lachancea thermotolerans* Omega και *S. cerevisiae* ES181, *Torulaspora delbrueckii* Biodiva TD291). Και πάλι, το στέλεχος *S. bayanus* BCS103 είχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, με επόμενο το *S. cerevisiae* ES181, γεγονός αναμενόμενο, καθώς και άλλα στελέχη του *S. cerevisiae* έχουν δείξει να περιορίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* (Comuzzo P. et al. 2006, Parafati, L. et al. 2015). Οι τιμές των *S. bayanus* BCS103, *S. pastorianus* KBG6, *Lachancea thermotolerans* Omega και *S. cerevisiae* ES181 ήταν χαμηλότερες από την τιμή του μάρτυρα κατά τουλάχιστον 60%, ενώ και στο πέμπτο στέλεχος του *Lachancea thermotolerans* Omega η συγκέντρωση των κονιδίων παρέμεινε κάτω από το 50% σε σχέση με τον μάρτυρα. Γενικά, έχουν αναφερθεί και στο παρελθόν οι ανασταλτικές ιδιότητες των πτητικών ενώσεων ζυμομυκήτων για την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* (Kulakiotu E. K. et al. 2004, Kowalska J., et al., 2022), ιδιαίτερα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. ωστόσο δεν βρέθηκαν αντίστοιχες αναφορές για τα υπόλοιπα είδη γεγονός που καθιστά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εξαιρετικά σημαντικά.

Γενικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνουν σημαντική μείωση της κονιδιογένεσης του παθογόνου αλλά και μείωση των συμπτωμάτων στις ράγες. Παρόλα αυτά οι εφαρμογές τέτοιου είδους χρήζουν ακόμη διερεύνηση. Ένα πλεονέκτημα για τις εργαστηριακές αυτές μελέτες είναι πως στο εργαστήριο, οι μικροοργανισμοί αυτοί που μπορούν να καταστούν ωφέλιμοι για μια βιολογική πρακτική μπορούν να διατηρηθούν ανεξάρτητα από τις συνθήκες παραγωγής του αγρού. Πολύ σημαντικό επίσης, είναι να εξετάζεται η συμβατότητα των μικροοργανισμών αυτών με το κάθε είδος φυτού- στο παρόν πεδίο- με την ποικιλία του αμπελιού.

Τα παραπάνω, αποτελούν μερικές από τις προκλήσεις που καλούνται οι ερευνητές να αντιμετωπίσουν ώστε η απόδοση των εργαστηριακών πειραμάτων να μην αποκλίνει ιδιαίτερα από αυτή στην πράξη. Για την υλοποίηση τέτοιων πρακτικών με αποδοτικά αποτελέσματα, απαραίτητη είναι η ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής καταπολέμησης με βάση τους πιθανούς ωφέλιμους ζυμομύκητες, τις καλλιεργητικές συνθήκες και τις γεωργικές πρακτικές (Kowalska J. et al., 2022). Επιπλέον, απαραίτητη κρίνεται και η προσαρμογή των τεχνικών συστημάτων, κανονισμών και αγορών, ώστε να καταστούν αυτά κατάλληλα για τις νέες μεθόδους βιολογικών πρακτικών (Kowalska J. et al., 2022). Παρά τις δυσκολίες που συναντώνται στις προσπάθειες αυτές, είναι μεγάλη η ανάγκη που υπάρχει για την ανάπτυξη βιολογικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι δυνατότητες χρήσης ζυμομυκήτων για την φυτοπροστασία αποτελούν έναν ελπιδοφόρο άξονα τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο (Kowalska J. et al., 2022).

Βιβλιογραφία

- 1) Wang, X., Glawe, D. A., Kramer, E., Weller, D., & Okubara, P. A. (2018). Biological control of botrytis cinerea: interactions with native vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology*, 108(6), 691–701.
- 2) Chen, P. H., Chen, R. Y., & Chou, J. Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of Botrytis cinerea on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33–46.
- 3) Comuzzo, P., Tat, L., Tonizzo, A., & Battistutta, F. (2006). Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chemistry*, 99(2), 217–230.

- 4) Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, 85–92.
- 5) Ιωάννης Χ. Ρούμπος, 2016, Ασθένειες και εχθροί της αμπέλου, ΣΤ΄ έκδοση, Αθήνα, εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε. και Ρούμπος Ι. - Ρούμπου Α.
- 6) Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 561–580).
- 7) Elmer, P. A. G., & Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. In *Plant Pathology* (Vol. 55, Issue 2, pp. 155–177).
- 8) AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. P. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 262–274). Taylor and Francis Ltd.
- 9) Gabler, F. M., Smilanick, J. L., Mansour, M., Ramming, D. W., & Mackey, B. E. (2003). Genetics and Resistance Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to *Botrytis cinerea* (Vol. 93, Issue 10).
- 10) Goetz, G., Fkyerat, A., Meâ, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., & Pont, V. (n.d.). Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase.
- 11) Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Muñoz, C. J., Combina, M., Toro, M. E., de Figueroa, L. I. C., & Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 40–48.
- 12) Marsico, A. D., Velenosi, M., Perniola, R., Bergamini, C., Sinonin, S., David-vaizant, V., Maggiolini, F. A. M., Hervè, A., Cardone, M. F., & Ventura, M. (2021). Native vineyard non-saccharomyces yeasts used for biological control of *botrytis cinerea* in stored table grape. *Microorganisms*, 9(2), 1–17.
- 13) Holz, G., Gütschow, M., & Coertze, S. (2003). Occurrence of *Botrytis cinerea* and Subsequent Disease Expression at Different Positions on Leaves and Bunches of Grape.
- 14) Gkizi, D., Poulaki, E. G., & Tjamos, S. E. (2021). Towards biological control of *aspergillus carbonarius* and *botrytis cinerea* in grapevine berries and transcriptomic changes of genes encoding pathogenesis-related (Pr) proteins. *Plants*, 10(5).
- 15) Kulakiotu, E. K., Thanassouloupoulos, C. C., & Sfakiotakis, E. M. (2004). Biological Control of *Botrytis cinerea* by Volatiles of “Isabella” Grapes.

- 16) Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., & Rossi, V. (2015). Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *Phytopathology*, 105(8), 1090–1096.
- 17) Nair, N. G., Emmett, R. W., & Parker, F. E. (1988). Some factors predisposing grape berries to infection by *Botrytis cinerea*. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 16(3), 257–263.
- 18) Kowalska, J., Krzywińska, J., & Tyburski, J. (2022). Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091404>
- 19) Calvo-Garrido, C., Elmer, P. A. G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., & Teixidó, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, 62(3), 510–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02684.x>
- 20) Droby, S., Wisniewski, M., Ghaouth, A. el, & Wilson, C. (n.d.). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. www.elsevier.com/locate/postharvbio
- 21) Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 35, Issue 10). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- 22) Vadasz, A. S., Franken, D. B., Govender, B. L., Jagganath, D. B., Govenderl, P., Ariatti, M., Pretorius, I. S., & Gupthar, A. S. (n.d.). Properties of a Wine Yeast Antagonist, *Saccharomyces cerevisiae* T206. A Review.
- 23) Millan, A. F. S., Gamir, J., Larraya, L., Farran, I., & Veramendi, J. (2022). Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis. *Biological Control*, 174.
- 24) Larnbrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (n.d.). Yeast and its Importance to Wine Aroma-A Review.
- 25) Costa-Orlandi, C.B.; Sardi, J.C.; Pitangui, N.S.; De Oliveira, H.C.; Scorzoni, L.; Galeane, M.C.; Mendes-Giannini, M.J.S. Fungalbiofilms and polymicrobial diseases. *J. Fungi*2017,3, 22
- 26) Pezet+, R., Pontt, V., & Hoang-Van+, K. (1991). Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. In *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- 27) Margaritopoulou, T., Toufexi, E., Kizis, D., Balayiannis, G., Anagnostopoulos, C., Theocharis, A., Rempelos, L., Troyanos, Y., Leifert, C., & Markellou, E. (2020). *Reynoutria sachalinensis*

- extract elicits SA-dependent defense responses in courgette genotypes against powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii*. *Scientific Reports*, 10(1), 3354.
- 28) Fernandez-San Millan, A., Larraya, L., Farran, I., Ancin, M., & Veramendi, J. (2021). Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*, 160.
- 29) Latorre, B. A., Elfar, K., & Ferrada, E. E. (2015). Pudrición gris, causada por *Botrytis cinerea*, limita la producción de vid en Chile. In *Ciencia e Investigacion Agraria* (Vol. 42, Issue 3, pp. 305–330). Pontificia Universidad Catolica de Chile, Facultad de Agronomia e Ingenieria Forestal.
- 30) Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., & Shachnai, A. (1998). Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus 1.
- 31) Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.008>
- 32) Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., & Porat, R. (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila* (Vol. 92, Issue 4).
- 33) Pitt JI, Miller MW. Sporulation in *Candida pulcherrima*, *Candida reukauffii* and *Chlamydozoma* species: their relationships with *Metschnikowia*. *Mycologia* 60: 663-685, 1968.
- 34) Synan AbuQamar, Khaled Moustafa & Lam Son Tran (2017) Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:2, 262-274, DOI: 10.1080/07388551.2016.1271767
- 35) Elmer, P. A. G., & Michailides, T. J. (2007). Epidemiology of *botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 243–272). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14
- 36) Raspor, Peter; Miklič-Milek, Damjana; Avbelj, Martina; Čadež, Neža. 2010. Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by *Botrytis cinerea* with Autochthonous Wine Yeasts. *Food Technology & Biotechnology*. 48: 336-343.
- 37) Kelloniemi, J.; Trouvelot, S.; Héloir, M.-C.; Simon, A.; Dalmais, B.; Frettinger, P.; Cimerman, A.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Baulande, S.; et al. Analysis of the Molecular Dialogue between Gray Mold (*Botrytis cinerea*) and Grapevine (*Vitis vinifera*) Reveals a Clear Shift in Defense Mechanisms During Berry Ripening. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2015**, 28, 1167–1180.

