

酵母菌於番石榴採後病害防治效果評估¹

羅佩昕²、郭建志³、廖君達³

摘 要

採後病害(postharvest disease)之防治，已逐漸朝向使用微生物製劑取代化學藥劑。本研究由環境中分離並篩選拮抗酵母菌，測試其對番石榴採後病害之防治效果。本研究篩選9株具有抑制番石榴瘡痂病菌菌絲生長之拮抗酵母菌，於溫度測試結果顯示，6株酵母菌可生長於4℃，3株酵母菌可生長於44℃，其中以TCY20菌株可生長之溫度範圍最大，可生長於0℃-44℃。而於番石榴果實上進行瘡痂病之防治試驗，結果顯示處理TCY12菌株後可達71.0%之防治率，而TCY70菌株與TCY14菌株分別具67.0%與56.0%的防治率，此3株菌株經由分子生物學鑑定，於LSU rDNA序列片段比對，與*Aureobasidium pullulans*具有100%之相似度。*A. pullulans*為黑酵母菌，結果顯示其對番石榴採後病害之防治潛力，未來將持續進行防治試驗及進行量產發酵配方評估。

關鍵詞：採收後病害、拮抗酵母菌、黑酵母菌

前 言

採後病害(postharvest diseases)多由真菌所引起，如*Penicillium*、*Botrytis*、*Monilinia*、*Colletotrichum*等病原菌，當採前、後處理不當造成傷口、運輸或儲藏環境不佳時，均可能造成採收後病害之發生，如柑橘青黴病、草莓灰黴病等病害⁽¹⁷⁾。採後病害之防治方法，包括物理防治(physical treatment)、化學防治(chemical treatment)及生物防治(biological control)⁽¹³⁾。物理防治即是以調控貯藏環境之溫度與濕度、放射線照射(irradiation)、熱處理(heat treatment)等，抑制病原菌之發展或達到殺菌效果；化學防治則是以化學藥劑於貯藏前進行施用，而達到預防及除滅病原菌之效果，此方式雖為控制病害較基本的方法，但對於化學藥劑的使用規範越趨嚴格，且消費者對食品安全之意識抬頭，因此，國內外研究學者朝向可替代化學藥劑之生物防治法進行研究⁽¹³⁾。於生物防治，目前國外已有微生物製劑針對採收後病害進行防治，如：*Shemer (Metschnikowia fructicola)*、*Candifruit (Candida sake)*、*Boniprotect (Aureobasidium pullulans)*等，其中商品多以酵母菌為主成分⁽¹⁰⁾。

酵母菌(yeast)被歸類為子囊菌或擔子菌，以出芽生殖(budding)或斷生(fission)方式進行繁殖。目前已有約1,500種酵母菌已被鑑定⁽¹²⁾，由於其對營養需求簡單，可廣泛利用單糖和寡糖

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0948 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

³ 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。

等碳水化合物，並可生長於植物、動物、土壤、水、空氣等自然環境。酵母菌普遍被利用於麵包與啤酒發酵等食品工業上，亦可用於醫療衛生產業、環境科學、生醫研究等⁽²³⁾。於採收後病害防治之研究繁多，第一個於市面販售之酵母菌製劑為Aspire，主成分為*Candida oleophila*，*Candida*屬酵母菌之防治效力備受重視，而後*Candida sake*則發展為商品Candifruit，應用於蘋果、梨及葡萄採後病害之防治⁽²¹⁾。Shemer則為最成功之酵母菌製劑，主成分為*Metschnikowia fructicola*，被推薦應用於多種蔬果之採前(pre-harvest)與採後(post-harvest)處理，如：柑橘、葡萄、桃、辣椒、草莓及地瓜⁽²¹⁾。類酵母菌*Aureobasidium pullulans*，又稱為黑酵母菌，於德國地區發展為微生物製劑Boniprotect，於採前應用於蘋果上，防治儲藏期間病原菌經由傷口所造成之危害，亦有研究開發類酵母菌應用於蘋果青黴病、灰黴病、草莓炭疽病之防治^(16, 22)。拮抗酵母菌於病害之防治機制，包括：(1)與病原菌競爭營養與空間，酵母菌可於傷口處與病原菌競爭有限的養分並快速纏據，進而達到抑制病原菌的效果，為酵母菌最主要之防治機制，如*A. pullulans*已證明具有營養競爭之能力^(6, 13)；(2)誘發寄主植物產生誘導抗病反應⁽⁷⁾；(3)分泌真菌細胞自分解酵素，*Pichia guilliermondii*可產生 β -(1-3) glucanase分解灰黴病菌(*Botrytis*)之菌絲^(5, 25)；(4)與病原菌競爭鐵，*Metschnikowia*屬酵母菌可藉由嵌鐵，競爭鐵元素，進而抑制真菌，達拮抗多種真菌之目的⁽¹⁹⁾。

由於蔬果外銷輸入國對於農藥殘留標準不一，及消費者對於安全農產品之意識抬頭，因此，本研究自環境中分離並篩選具拮抗效果之酵母菌，為了解拮抗酵母菌可生長之最高與最低溫度，以利採後應用環境評估，進行酵母菌生長溫度範圍測試，並於番石榴果實上測試其對番石榴瘡痂病之防治效果。

材料與方法

一、酵母菌分離與保存

自番石榴、葡萄、紅龍果及咖啡等果實與果實傷口邊緣、果皮或蔬果葉片等部位分離酵母菌，將材料分成小塊放入9 ml之無菌水中，再以震盪器(Vortex-Genie 2, US)震盪1 min將酵母菌洗下，並進行系列稀釋後，塗佈至YM (yeast malt agar, Difco)平板上，於室溫(25~28°C)培養3天後，以移植環取單一菌落更新至YM平板上，繼代3次。於菌株之保存，則以移植環刮取菌落並保存於2 ml甘油管中(YM: 20%甘油=1:1)，經overnight培養後，將菌株保存於-30°C。

二、篩選拮抗酵母菌 (病原菌菌絲生長抑制測試)

於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar, PDA, Difco)培養基進行對峙試驗，將分離純化後之酵母菌以劃線方式培養於距離培養基一端1.5 cm處，並於PDA平板中間放置已培養7天之番石榴瘡痂病菌*Pestalotiopsis* sp. (PDS1-2)菌落邊緣切下直徑0.5 cm之菌絲圓盤。於室溫(25~28°C)培養10天後，記錄其對酵母菌之抑制情形，每處理3重複。

三、拮抗酵母菌生長溫度測試

為測試拮抗酵母菌可生長之溫度，將酵母菌繼代培養5天之拮抗酵母菌，以消毒過之移植環劃線於YM平板，並置於0°C、4°C、16°C、32°C、36°C、40°C及44°C之恆溫培養箱，無光照培養7天後觀察並記錄菌落之生長狀態，以“+”表示菌株可生長於該溫度，以“-”表示菌株無法生長於該溫度，每處理3重複。

四、番石榴上拮抗酵母菌防治瘡痂病效果測試

- (一)拮抗酵母菌懸浮液之製備：將於培養基上具病原菌菌絲生長抑制效果之拮抗酵母菌，培養於YM培養基平板3天後，以移植環刮取1移植環加入YPD (yeast extract peptone dextrose, Difco)培養液中，於28°C下以130 rpm搖瓶培養48 hr後，以離心機(Centrifuge Z326K, Hermle, Germany) 4,000 rpm離心5 min，再以無菌水漂洗2次後，以無菌水懸浮配製為 2×10^7 spores/ml之酵母菌懸浮液。
- (二)番石榴瘡痂病菌(PDS1-2)懸浮液之製備：將培養於PDA斜面，置於室溫(25~28°C) 7~10天，待其產孢後，以0.05%之tween 20 (Sigma)將其分生孢子洗下，並配製為 2×10^5 spores/ml之孢子懸浮液供接種用。
- (三)番石榴果實(珍珠拔)先以浸漬75%酒精之脫脂棉花球，進行果實表面消毒，並放置待酒精揮發。以針頭於果實赤道、赤道與果頂間及赤道與果臍間表面製造深3 mm之傷口後，將刺傷口浸漬酵母菌孢子懸浮液10~15 sec。風乾後，將番石榴置於20 L保鮮盒內，並以沾溼紙巾置於盒內保溼，放置1天後，以5 μ l之瘡痂病菌孢子懸浮液接種於傷口處，置於25°C下之恆溫培養箱中，經12 hr光照循環培養10天後觀察其發病情形，量測其病斑直徑並計算其病害抑制率，每處理4重複。防治計算方式為：
防治率(inhibition rate, %)=(對照組病斑直徑-處理組病斑直徑)/對照組病斑直徑 \times 100%

五、拮抗酵母菌鑑定

以移植環刮取於培養5天之拮抗酵母菌，刮取1移植環至1.5 ml之離心管內，並以DNA抽取試劑套組(Quick-DNA™ Miniprep Kit, Zymo)進行酵母菌DNA之萃取。將所萃取之酵母菌DNA進行聚合酵素連鎖反應(Sensoquest Labcycler, Germany)，增幅rDNA Large subunit (LSU) D1/D2區域片段核苷酸序列，PCR反應液中加入10 μ M引子對0.5 μ l、17 μ l H₂O、5 μ l PCR master mix和2 μ l 樣本 DNA 模板，總體積為25 μ l。LSU D1/D2序列引子對為NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')/NL4 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')⁽¹⁸⁾。序列反應條件為：以95°C 1 min；55°C 1 min；72°C 2 min，進行30個循環，最後以72°C反應10 min。將所增幅PCR產物以1.5% (w/v) TAE (tris acetate-EDTA)瓊脂凝膠進行電泳分析，將確定有DNA條帶之PCR產物送至源資國際生物科技股份有限公司定序。將所得序列切除含有引子之核苷酸序列，輸入美國生物科技技術中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)利用BLAST與基因庫中的序列進行比對。

結果與討論

一、拮抗酵母菌之分離與篩選

自不同蔬果之果實、葉片及枝條分離酵母菌，經由拮抗測試結果，共得到153株具拮抗番石榴瘡痂病菌(PDS1-2)菌絲生長抑制效果之拮抗酵母菌。拮抗酵母菌可抑制病原菌菌落生長，無法跨越酵母菌生長至培養基邊緣，並挑選其中9株具較明顯病原菌菌絲生長抑制效果之酵母菌，可抑制菌落生長並產生抑制圈，菌株代號分別為TCY05、TCY12、TCY14、TCY20、TCY38、TCY70、TCY97、TCY98、TCY102，後續試驗以此9株拮抗酵母菌作為試驗材料。

二、拮抗酵母菌生長溫度測試

將9株對拮抗效果較顯著之拮抗酵母菌進行溫度測試，所有拮抗酵母菌菌株皆可生長於32℃，於低溫生長試驗中，菌株TCY05、TCY12、TCY20、TCY70、TCY97及TCY98可生長於4℃，其中以菌株TCY12、TCY20可生長於0℃；於高溫測試中，僅菌株TCY38無法生長於36℃，其餘8株菌株皆可生長，而4株菌株TCY05、TCY20、TCY97及TCY102皆可生長於40℃，以菌株TCY05、TCY20及TCY102更可生長於44℃。其中，以菌株TCY20可生長之溫度範圍最廣，可生長於0℃-44℃，而TCY38可生長之溫度範圍較窄(表一)。

表一、拮抗酵母菌可生長之溫度測試

Table 1. The temperature test of antagonistic yeast

Isolate	Temperature						
	0℃	4℃	16℃	32℃	36℃	40℃	44℃
TCY05	-	+ ¹	+	+	+	+	+
TCY12	+	+	+	+	+	-	-
TCY14	-	- ²	+	+	+	-	-
TCY20	+	+	+	+	+	+	+
TCY38	-	-	+	+	-	-	-
TCY70	+	+	+	+	+	-	-
TCY97	+	+	+	+	+	+	-
TCY98	+	+	+	+	+	-	-
TCY102	-	-	+	+	+	+	+

¹+ means yeast can grow in that temperature.

²- means yeast can't grow in that temperature.

三、拮抗酵母菌於番石榴上之防治效果測試

於番石榴上測試拮抗酵母菌對番石榴瘡痂病之防治效果，菌株TCY12、TCY70及TCY14對番石榴瘡痂病菌之防治率皆可達50%以上，防治率分別為71.0%、67.0%及56.0%，以菌株TCY12之防治效果最佳，菌株TCY102之防治率最低(表二)。

表二、拮抗酵母菌於番石榴上對番石榴瘡痂病之防治效果測試

Table 2. Inhibition efficiency of the antagonistic yeast against to *Pestalotiopsis* sp. PDS1-2 on guava

Isolate	Inhibition rate (%)
TCY05	34.1 c ¹
TCY12	71.0 a
TCY14	67.0 ab
TCY20	31.5 cd
TCY38	35.9 c
TCY70	56.0 b
TCY97	20.5 d
TCY98	36.3 c
TCY102	20.1 d

¹ Means followed by the same letter in the column are not significantly different at $p < 0.05$ according to LSD test.

四、拮抗酵母菌之分子生物鑑定

以分子生物學鑑定防治率較高之3菌株，以LSU rDNA核酸片段經定序後，至NCBI資料庫比對結果顯示，菌株TCY12、TCY14、TCY70與*Aureobasidium pullulans*具100%之相似度。

討 論

本研究自蔬果表面或傷口周圍分離酵母菌，採集之蔬果來自慣行或粗放之管理方式。而本次於培養基拮抗試驗中，篩選較有效果之9株酵母菌，有5株酵母菌來自粗放之管理栽培，4株來自慣行栽培。根據研究指出，人類活動與栽培管理方式會影響酵母菌於蔬果表面之菌相表現，以葡萄為例，粗放栽培方式可較慣行栽培方式分離到較多種類之酵母菌^(9,15)。國外研究指出，分離與篩選過程將大幅影響生物防治菌的效果與商品的可利用性，因此，於酵母菌的篩選，Wilson等學者(1993)指出，由果實的傷口分離，可快速挑選到可在傷口處快速生長並纏聚之潛力拮抗酵母菌，但其缺點在於此類拮抗酵母菌雖具保護能力，卻可能不具有治療能力⁽²⁴⁾。以人工於果實表面製造傷口之方式，雖可快速篩選有潛力之拮抗酵母菌，但為了提升拮抗酵母菌於商業環境被利用的可行性，因此，拮抗菌的篩選應由多種不同病原菌所造成的傷口上篩選，可增加酵母菌的種類與多樣的病害防治機制⁽¹⁰⁾。而於本研究中，除了從不同病原造成之果實傷口分離外，亦由蔬果表面分離酵母菌，增加所篩選之潛力拮抗酵母菌種類與功能。

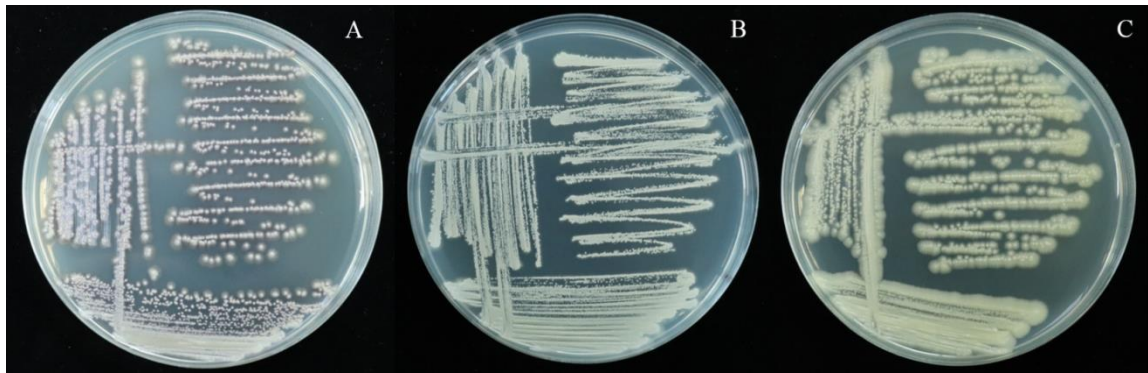
為了解本次篩選具菌絲生長抑制效果之拮抗酵母菌，於貯藏環境及田間之可利用性，進行低溫及高溫測試。貯運過程中為達到蔬果保鮮效果，低溫貯運為常見之方式，而田間則可能達高溫36°C，欲增加酵母菌製劑可利用性，採收前與採收後皆可施用，則拮抗酵母菌必須具備廣泛之溫度生長範圍。於9株拮抗酵母菌中，有6株可生長於4°C，有2株更可於0°C生長，於未來可發展為耐低溫並適合運用於低溫貯運之酵母菌製劑；而於高溫生長試驗中，大部分

之拮抗酵母菌菌株皆可生長於36°C，並有3株可生長至44°C，未來具有於田間應用之優勢。於實驗室或工業上，培養酵母菌之最佳溫度多介於20°C-30°C，部分與溫血動物相關之酵母菌種類，無法在低於24°C-30°C的環境下生長良好，而嗜溫菌(mesophile)則可生長於0°C-48°C⁽²³⁾，本研究中所篩選具拮抗效果之酵母菌皆為嗜溫菌，可生長於此溫度區間。

於測試防治番石榴瘡痂病之效果，以菌株TCY12、TCY14及TCY70為效果較佳之拮抗酵母菌(圖一)，可達到延緩番石榴瘡痂病病斑進展之效果，防治率皆可達到50%以上。3株菌株於YM培養基上之菌落形態略為不同(圖一)，但經分子生物鑑定結果，皆與*Aureobasidium pullulans*具100%相似度。*Aureobasidium pullulans*為具有多種形態之真菌，雖具有類似酵母菌之出芽細胞，但會產生多核之有隔菌絲，為許多作物與果實表面常見之腐生菌，由於具產生黑色素的能力，因此又稱黑酵母菌(black yeast)，分類上迥異於一般子囊菌酵母菌，是屬於座囊菌綱(Dothidiomycetes)，此類菌於蔬果上被分離並應用於拮抗果實病害已廣泛被研究⁽²⁰⁾。許多研究即針對*A. pullulans*於蘋果和桃，於防治灰黴病(*B. cinerea*)與青黴病(*P. expansum*)之效果進行開發^(14,16)。Achbani et al. (2005)由蘋果‘Golden Delicious’表面篩選出對青黴菌與灰黴菌都具顯著拮抗效果之菌株，可抑制青黴菌孢子發芽，對於採收後蘋果之傷口亦具有保護效果⁽²⁾。目前於歐洲市場上，已有*A. pullulans*為主成分之微生物製劑Boniprotect，應用梨與蘋果採前處理，而同一菌株於澳洲地區則發展為微生物製劑Botector，針對草莓、葡萄及番茄灰黴病於採前或採後施用。本研究中所篩選具顯著拮抗效果之菌株亦為*A. pullulans*，由此可見，*A. pullulans*未來極具有開發為製劑之潛力。

根據研究對*A. pullulans*之拮抗效果機制探討，其生物防治活性仍以營養競爭為主，可較病原菌優先抵達果實傷口進行纏聚，以達到保護傷口不受病原菌感染之效果⁽⁶⁾。亦有研究指出，其具有誘導植物產生抗病反應，在未成熟果實表面處理*A. pullulans*可增加果實抗病原菌之能力⁽³⁾，且其可產生多種胞外分解酵素及胞外多醣體pullulan之效果，不僅可增加其抗病效果，更可應用於工業上⁽⁸⁾。另為增加*A. pullulans*防治病害之效果，許多研究將酵母菌結合不同非農藥資材，進行採前或採後施用，如氯化鈣、碳酸氫鈉等，以提升酵母菌之防治效果^(4,11)。微生物製劑之防治效果不如化學藥劑快速，為其一大發展障礙，未來若可結合不同資材進行採後處理，或許可增加其防治效果之呈現。

酵母菌製劑的開發，不僅需考量其所施用的目標於採後處理流程和儲藏環境，更要考量其所施用的包裝場環境皆不盡相同，因此，在量產發酵階段需要審慎評估製劑的防治效果^(1,10)。本研究中所篩選出對番石榴瘡痂病具延緩病斑進展效果之3株菌株，後續將對其他果實病害進行防治效果測試，以發展其應用於不同蔬果之採後處理範圍，並開發其量產配方、量產流程及儲架壽命測試等。



圖一、*Aureobasidium pullulans* 菌株 TCY12 (A)、TCY14 (B) 及 TCY70 (C) 於 YM 培養基上培養 5 天之菌落形態

Fig. 1. Colony morphology of *Aureobasidium pullulans* isolate TCY12, TCY14 and TCY70 cultured on the YM medium for 5 days

參考文獻

1. Abadias, M., N. Teixidó, J. Usall and I. Viñas. 2003. Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *J Appl. Microbiol.* 95: 301-309.
2. Achbani, E. H., R. Mounir, S. El Jaafari, A. Douira, A. Benbouazza and H. Jijakli. 2005. Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70: 143-149
3. Adikaram, N. K., D. C. Joyce and L. A. Terry. 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. *Australas. Plant Path.* 31(3): 223-229.
4. Bastiaanse, H., L. de Lapeyre de Bellaire, L. Lassois, C. Misson and M. H. Jijakli. 2010. Integrated control of crown rot of banana with *Candida oleophila* strain O, calcium chloride and modified atmosphere packaging. *Biol. Control* 53: 100-107.
5. Bar-Shimon, M., H. Yehuda, L. Cohen, B. Weiss, A. Kobeshnikov, A. Daus, M. Goldway, M. Wisniewski and S. Droby. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Curr. Gen.* 45: 140-148.
6. Bencheqroun, S. K., M. Bajji, S. Massart, M. Labhilili, S. El Jaafari and M. H. Jijakli. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biol. Tech.* 46: 128-135.

7. Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy and G.R. Fink. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 5048-5052
8. Chi, Z., F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu and T. Zhang. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82(5): 793-804.
9. Cordero-Bueso, G., N. Mangieri, D. Maghradze, R. Foschino, F. Valdetara, J. M. Cantoral and I. Vigentini. 2017. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. Front Microbiol. 8: 20-25.
10. Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarisin and C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? Postharvest Biol. Technol. 52: 137-145.
11. Ippolito, A., L. Schena, I. Pentimone and F. Nigro. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre-and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. Postharvest Biol. Technol. 36: 245-252.
12. Kurtzman C. P., W. F. Fell and T. Boekhout (ed.). 2011. The Yeasts, a Taxonomic Study 5th ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
13. Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby and Y. Liu. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. Int. J. Food Microbiol. 167: 153-160.
14. Mari, M., C. Martini, A. Spadoni, W. Rouissi and P. Bertolini. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biol Technol. 73: 56-62.
15. Martins, G., J. Vallance, A. Mercier, W. Albertin, P. Stamatopoulos, P. Rey, A. Lonvaud and I. Masneuf-Pomarède. 2014. Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. Int. J. Food Microbiol. 177: 21-28.
16. Mounir, R., A. Durieux, E. Bodo, C. Allard, J. Simon, E. H. Achbani, S. El-Jaafari, A. Douira and M. H. Jijakli. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. Biotechnol Lett. 29: 553-559.
17. Mohajer, S., R. M. Taha, J. S. Yaacob and A. Kumari. Post harvest management of the pests and some important diseases of the fruits. 2015. p. 1-12. In: Kumari A., P. P. Pankaj and P. Baskaran (eds.) Recent Trends in Post Harvest Technology and Management. India.
18. O'Donell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. p. 225-233. In: Reynolds DR & Taylor JW (eds.) The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International, Wallingford, UK.
19. Saravanakumar, D., A. Ciavorella, D. Spadaro, A. Garibaldi and M. L. Gullino. 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. Postharvest Biol. Technol. 49: 121-128.

20. Singh, R., R. Gaur, S. Bansal, P. Biswas, P. K. Pandey, F. Jamal, S. Tiwari and M. K. Gaur. 2015. *Aureobasidium pullulans*-an industrially important pullulan producing black yeast. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4: 605-622.
21. Spadaro, D. and S. Droby. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47: 39-49.
22. Sylla, J., B. W. Alsanus, E. Krüger and W. Wohanka. 2015. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *Eur J. Plant Pathol.* 143: 461-471.
23. Walker, G. M. 1998. Introduction to yeasts. p.1-10. In: Jonh Wiley and Sons (eds.). *Yeast physiology and biotechnology*.
24. Wilson, C. L., M. E. Wisniewski, S. Droby and E. Chalutz. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hortic.* 53: 183-189.
25. Wisniewski, M., C. Biles, S. Droby, R. McLaughlin, C. Wilson and E. Chalutz. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 245-258.

Evaluate the Efficacy of Yeasts on Controlling Postharvest Disease of Guava¹

Pei-Hsin Lo², Chien-Chih Kuo³ and Chung-Ta Liao³

ABSTRACT

Biological control using microbial agents has been used as an alternative approach to chemical fungicides for managing postharvest diseases. This study aims to isolate and screen antagonistic yeasts from the environment, and evaluate the efficacy of the antagonistic yeasts on controlling postharvest diseases of guava. There are 9 isolates showing strong ability to inhibit the mycelium growth of *Pestalotiopsis* sp. PDS1-2. Among the 9 isolates, there are 6 isolates can grow at 4°C, and 3 isolates can grow at 44°C. Especially, isolate TCY20 can grow in the range from 0°C to 44°C. In vivo test on the guava, inhibition rate of isolate TCY12 is 71.0%, TCY70 is 67.0% and TCY14 is 56.0%. The LSU rDNA sequences of isolate TCY12, TCY14, and TCY70 show 100% identity with *Aureobasidium pullulans*, a black yeast species. It is expect that the black yeasts TCY12, TCY14 and TCY70 have the potential to control postharvest diseases in the future.

Key words: postharvest disease, antagonistic yeast, black yeast

¹ Contribution No. 0948 from Taichung DARES, COA.

² Assistant Researcher, Taichung DARES, COA.

³ Associate Researcher, Taichung DARES, COA.