مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (6) 2012
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (6) 2012

عزل بعض الفطريات الدعامية Basidiomycetes ودراسة تأثير أوساط مغذية مختلفة في نموها الإعاشي (في الزجاج)

الدكتورة ميساء يازجي*

(تاريخ الإيداع 31 / 5 / 2012. قبل للنشر في 14 / 10 / 2012)

□ ملخّص □

اختبرت قدرة ثلاثة عشر نوعاً من الفطريات الدعامية هي: *Lepista nuda, Omphaletus olearius, Tricholoma terreum, Tscalpturatum, Coprinus micaceus, Armillaria mellea, Pleurotus ostreatus, Amanita ovoidea, Volvaria gloiocephala, Russula paludosa, Lactarius deliciosus, Boletus granulatus, B.luridus* على النمو الإعاشي وتشكيل المشائج، وذلك بزراعة نسيج القبعة وأبواغ هذه الفطريات، في الزجاج، على أربعة أوساط مغذية مختلفة هي: خلاصة البطاطا (P.D.A)، خلاصة الشعير (M.EA)، Lima bean و Sabouraud.

أظهرت النتائج قدرة تسعة أنواع منها على النمو وإعطاء مشائج اختلفت بصفاتها الفيزيولوجية وبسرعة نموها، وذلك باختلاف الوسط المغذي أو الجزء المزروع من الفطر، كما اختلفت المتطلبات الغذائية لهذه الأنواع.

كان الوسطان P.D.A و M.E.A أكثر ملاءمة لتشكيل مشائج كثيفة، سريعة النمو مقارنة مع مشائج الأنواع النامية على الأوساط الأخرى وتميّز النوع *Omphaletus olearius* بأنه أعطى نمواً كاملاً على الأوساط M.E.A، P.D.A و Sabouraud بعد 15، 17 و20 يوماً على التوالي، في حين أعطى النوع *Lepista nuda* نمواً كاملاً فقط على الوسط Lima bean بعد 5 أسابيع من بدء النمو، وذلك اعتباراً من الزراعات النسيجية، أما النوع *Boletus granulatus* فقد أعطى نموا كاملاً فقط على الوسط P.D.A بعد 4 أسابيع اعتباراً من الزراعات البوغية.

بيّنت النتائج إمكانية النمو الإعاشي وتشكيل مشائج من بعض أنواع الدعاميات على الوسط Sabouraud.

الكلمات المفتاحية: فطريات دعامية، أوساط مغذية، زراعات نسيجية، زراعات بوغية، نمو إعاشي.

* **أستاذ مساعد – كلية العلوم– قسم علم الحياة النباتية– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (6) 2012
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (6) 2012

Isolation of some Basidiomycetes and studying the effect of different nutritive media on their vegetative growth (in vitro)

Dr. Maysa Yaziji*

(Received 31 / 5 / 2012. Accepted 14 / 10 /2012)

□ ABSTRACT □

The capacity of thirteen species of Basidiomycetes:

Lepista nuda, Omphaletus olearius, Tricholoma terreum, T.scalpturatum, Coprinus micaceus, Armillaria mellea, Pleurotus ostreatus, Amanita ovoidea, Volvaria gloiocephala, Russula paludosa, Lactarius deliciosus, Boletus granulatus, B.luridus on the vegetative growth and formation of mycelia are tested by the, in vitro, culture of pileus tissue and spores of these fungi on four different nutritive media: Potato extract (P.D.A), Malt extract (M.E.A), Lima bean and Sabouraud.

The results demonstrated the capacity of nine species on the growth and production of mycelia were different from their physiologic characters and growth rate, depending on the nutritive media or the planted fragment of the fungi, and the nutritive requirement for these species were differ.

The two media, M.E.A and P.D.A, were the most suitable for the formation of mycelia dense and fast growth in comparison with the mycelia of species are growing on the other media. The species *Omphaletus olearius* giving complete growth on M.E.A, P.D.A and sabouraud media after 15, 17, 20 days respectively. While the species *Lepista nuda* gave complete growth only on Lima bean medium after 5 weeks of tissue culture, whereas the species *Boletus granulatus* gave complete growth only on P.D.A medium after 4 weeks of spores culture.

The results indicated that the vegetative growth and formation of mycelia from some Basidiomycetes is possible on Sabouraud medium.

Key words: Basidiomycetes, nutritive media, tissues culture, spores culture, vegetative growth.

***Associate professor, Department of plant biologie, faculty of sciences, Tishreen university, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تنمو الفطريات في بيئات متنوعة جداً في جميع مناطق العالم، وتؤثر بشكل مباشر أو غير مباشر على حياة الإنسان. وحالياً تحتل الفطريات الدعامية (Basidiomycetes) مكانة واسعة من حيث أهميتها البيئية والغذائية والطبية. فهي تعد محللات ومفككات فعّالة جداً خاصة للمركبات الأشدّ تعقيداً الموجودة في البيئة، كما أنها غنية بالعديد من المواد ذات الفوائد الغذائية العالية، وتحتوي الأجسام الثمرية والمشائج المزروعة على أوساط جامدة أو ضمن أوساط سائلة للعديد من الفطريات الدعامية القبعية، ومنها أنواع تابعة للأجناس *Armillaria*، *Pleurotus*، *Agaricus*، *Lentinus*، *Grifola*، وغيرها، على سكريات متعددة ذات فعالية بيولوجية مهمة جداً كمضادات للأورام ومقوية لمناعة الجسم، وقد تم عزل العديد منها وتنقيته وتحديده (Wasser, 2002; Chun Lee *et al*., 2003; Manjunathan and Kaviyarasan, 2010; Sulkowska–Ziaja *et al*., 2011) وقد استخدم الطب التقليدي، في الدول الآسيوية، هذه الفطريات لمعالجة العديد من الأمراض، وتبين فيما بعد احتوائها على الكثير من المركبات المضادة للأورام، الفيروسات ،الجراثيم والفطريات الممرضة (Lindequist *et al*., 2005; Hirasawa *et al*., 1999)، كما بينت بعض الأبحاث، فاعلية مضادة للجراثيم الممرضة، للأجسام الثمرية البرية لبعض أنواع الـ *Lycoperdon* والـ Tricholoma (Jonathan and Fasidi, 2003, 2005).

وقد استطاع Rosa *et al*., (2003) و Teoh and Mashitah (2012) الحصول على خلاصات من الزراعات المشيجية على أوساط جامدة وسائلة للعديد من أنواعها التابعة لأجناس مختلفة مثل *Agaricus*، *Coprinus*، *Ganoderma*، *Lentinus*، *Lepiota*، *Pleurotus*، *Schizophyllum*، *Trametes*، *Tricholomopsis*، وغيرها وبيّنوا أنها تحتوي مضادات للعديد من الخمائر والجراثيم الممرضة للإنسان وبعض الفطريات المخرّبة للأخشاب. في حين تحتوي خلاصات مشائج الفطر *Pleurotus ostreatus* والفطر *Lentinula edodes* المزروعة ضمن أوساط سائلة أنزيمات ومركبات مختلفة، تملك فاعلية عالية في تثبيط نمو العديد من الجراثيم والفطريات الممرضة للإنسان والنبات (Pacumbaba *et al*., 1999; Okamoto *et al*., 2002; Prasad *et al*., 2006).

وقد تبين في دراسات سابقة، أن خلاصات مختلفة (مائية وكحولية) للفطريات *Lactarius sp*. , *Omphaletus olearius, Lepista nuda* تملك فاعلية مضادة لبعض الفطريات الجلدية والممرضة للنباتات (يازجي وسعود 2007،2008).

في حين بيّن Zhou *et al* (2011) أن خلاصات الكلوروفورم والميتانول للفطر *Lactarius deliciosus* تحتوي مواد دسمة ومركبات هيدروكربونية وستيروئيدات مهمّة بيولوجياً، وقد تم عزل بعضاً منها وتحديده من الأجسام الثمرية لهذا الفطر.

يعد عزل الفطريات المشكلة للميكوريزا الخارجية وغيرها من الدعاميات على أوساط مغذية ، وذلك اعتباراً من الأجسام الثمرية لها، واختيار الأوساط المناسبة لنموها وحفظها بشكل زراعات نقية يتم تجديدها باستمرار، ذا أهمية كبيرة من أجل تحضير اللقاح المشيجي اللازم لعمليات الاستخلاص ودراسة المركبات الفعالة بيولوجياً أو طبياً، وعادة تستخدم تقنية زراعة نسيج القبعة أو الأبواغ للحصول على المشائج (Barros *et al*., 2007; Bitew, 2010; Ahmed *et al*. , 2011).

هذا وقد أجريت بعض الدراسات بهدف الحصول على مشائج العديد من أنواع الفطريات القبعية على أوساط مغذية في المختبر، اعتباراً من نسيج القبعة أو الأبواغ، ومن ثم تم تجريب فاعليتها ضد بعض الأحياء الدقيقة (Kalmis and Kalyoncu 2006; 2005 ؛ جهار Dighe and Agata 2000).

كما تمت دراسات أخرى هدفت إلى تحديد أفضل الأوساط الغذائية المناسبة لنمو ميسيلوم الفطر المحاري *P. Ostreatus* من حيث اكتمال وسرعة نموها (Kasouha *et al*., 2009 Nasim *et al*., 2001).

يتم حالياً عزل العديد من أنواع الدعاميات المهمة بيولوجياً في المختبرات، وتزرع بشكل نقي على أوساط جامدة مائلة ضمن أنابيب وتحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

أهمية البحث وأهدافه:

تشكل الفطريات القبعية المنتشرة في مناطق الساحل السوري، مورداً طبيعياً مستمراً لأحياء ذات أهمية غذائية، بيئية وطبية عالية. وتعد مادة أساسية مهمة يمكن استخدامها في العديد من الأبحاث العلمية، وبما أنه لا يمكننا الحصول على جميع أنواعها في أي وقت من العام، بسبب نمو الكثير منها خلال أشهر محددة منه، لذلك يعد عزل هذه الفطريات وحفظها بشكل زراعات نقية ومعرفة الظروف الإستنباتية المناسبة لنموها، مُهِّماً جداً لإجراء أبحاث لاحقة عليها، وكما أنه لم يتم حتى الآن أي بحث يهتم بزراعة الفطريات القبعية البرية المنتشرة في الساحل السوري لذلك انحصر هدف البحث في:

1- جمع الأجسام الثمرية للفطريات الدعامية خلال فصول السنة .
2- زراعة بعض أنواع الفطريات القبعية على أوساط عدة مغذية جامدة في المختبر.
3- مقارنة الزراعات والمشائج الناتجة عن النسيج أو الأبواغ على الأوساط المختلفة.
4- تحديد الأوساط الأكثر ملاءمة للنمو المشيجي للفطريات المدروسة.

طرائق البحث ومواده:

I- العينات الفطرية:

تم جمع /13/ نوعاً من الفطريات الدعامية من مناطق عدة من الساحل السوري، والتي تعد من الفطريات المتوفرة بغزارة في هذه المناطق، وهي:

Lepista nuda, Omphaletus olearius, Tricholoma terreum, T.Scalptoratum, Coprinus micaceus, Armillaria mellea, Pleurotus ostreatus, Amanita ovoidea, Volvaria gloiocephala, Russula paludosa, Lactarius deliciosus, Boletus granulatus, B.luridus تنمو هذه الفطريات في أشهر مختلفة من السنة، وقد تم جمعها خلال العام 2010.

أحضرت العينات إلى مخبر الأبحاث في قسم علم الحياة النباتية /كلية العلوم/ جامعة تشرين، وحددت وفقاً لمعايير مورفولوجية ومجهرية تتعلق بصفات الجسم الثمري، صفات النسيج، طريقة توضع الصفائح وألوانها، أشكال الأبواغ وأحجامها، والبصمة البوغية وذلك بالاعتماد على بعض المفاتيح التصنيفية العالمية (Romagnesi, 1962; Loiseau 1975 ;Nonis 1982).

II- أوساط الزراعة:

تم تنمية الفطريات المدروسة على أربعة أوساط غذائية صلبة مختلفة هي:

-وسطP.D.A : خلاصة البطاطا – دكستروز – آغار

-وسط M.E.A: خلاصة الشعير – آغار

-وسط Sabouraud: ببتون – غلوكوز – آغار.

-وسط Lima bean: خلاصة الفاصولياء – دكستروز – آغار.

حضرت الأوساط، كلٌ على حدة، بأخذ كمية مناسبة من المسحوق الجاهز لكل منها، ووضعها في 1 ليتر ماء مقطر، وبعد غليها ضبتت الـ pH على الدرجة 5.5 وعقمت في جهاز التعقيم (أوتوغلاف) بالدرجة 121 م° لمدة 20 دقيقة، ثم يضاف إليها المضاد الحيوي Chloramphenicol بالنسبة 200 µg/L لمنع نمو الجراثيم وتلوث الوسط وذلك ضمن غرفة العزل الخاصة، وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام.

III- زراعة الفطريات:

تمت زراعة الفطريات المدروسة على جميع الأوساط الغذائية المستخدمة، كل على حدة، حيث أذيبت الأوساط الجامدة المحضرة مسبقاً، ضمن حمام مائي بدرجة الغليان، ثم صبّت ضمن أطباق بتري قطر 9 سم، وتركت لتبرد.

زرعت الفطريات ضمن غرفة العزل على الأوساط الموجودة في الأطباق بطريقتين مختلفتين حسب Nasim *et al.*, (2001) مع بعض التعديلات.

أ- زراعة نسيج القبعة:

أزيلت القشرة الخارجية لقبعة الجسم الثمري بوساطة ملقط معقم جيداً على اللهب، ثم قطع الجسم بمشرط معقم إلى قسمين وأخذت قطعة صغيرة نحو 0.5 سم^3 من النسيج الداخلي للقبعة ووضعت على سطح الوسط المغذي في الأطباق.

ب- الزراعات البوغية:

أخذت مسحة بوغية عن صفائح كل جسم ثمري من الفطريات المدروسة بوساطة إبرة تلقيح معقمة جيداً، ووضعت في منتصف كل طبق بتري حاوٍ على الوسط المغذي.

قمنا بإجراء /5/ مكررات من الأطباق لكل نوع فطري على كل وسط زرعي على حدة وذلك لكل من الزراعات النسيجية والبوغية.

حضنت الأطباق جميعها بالدرجة 25 م°والملائمة لنمو الفطريات المدروسة ، وتركت فترات زمنية تم خلالها قياس نمو المشائج (قطر المستعمرات) يومياً حتى توقف المستعمرة عن النمو(وهو وصول المستعمرة إلى قطرٍ معين لاتنمو بعدها).

حددت سرعة النمو على الأوساط المختلفة لكل من زراعات النسيج والزراعات البوغية وذلك حسب الزمن الذي استمر فيه النمو ومن ثم توقفه، كما درست بعض الصفات المورفولوجية للمستعمرات النامية على الأوساط مثل : لون المشيجة من الناحية العلوية والسفلية ،كثافتها وثخانتها .

النتائج والمناقشة:

تم دراسة /13/ نوعاً من الفطريات الدعامية تابعة لرتبة Agaricalles، توزعت في /11/ نوعاً صفائحياً تابعة لـ /10/ أجناس، ونوعان من الفطريات ذات الأنابيب تابعان للجنس Boletus. إن أغلب هذه الفطريات صالحة للاستهلاك الغذائي، وهي متعايشة، رميّة أو طفيلية (Romagnesi, 1962) ، ويبين الجدول (1) هذه الأنواع والفصائل التابعة لها.

جدول 1. يبين الأنواع الفطرية المدروسة والفصائل التابعة لها

الأنواع الفطرية	الفصيلة
1. *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) cook	Tricholomaceae
2. *Omphaletus olearius* (Dc. ex Fr.) Sing	
3. *Tricholoma Terreum* (Schaeff. ex Fr.) Kumm.	
4. *T.scalpturatum* (Bull.) Gillet.	
5. *Coprinus micaceus* (Pers. ex Fr.) Gray.	Coprinaceae
6. *Armillaria mellea* (Vahl.ex Fr.) Kumm	Tricholomaceae
7. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm	Pleurotaceae
8. *Amanita ovoidea* (Bull. ex Fr.) Quèl	Amanitaceae
9. *Volvaria gloiocephala* (D. C. ex Fr.)	Volvariaceae
10. *Russula paludosa* Britz.	Russulaceae
11. *Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) Gray.	
12. *Boletus granulatus* L. ex Fr.	Boletaceae
13. B. *luridus Schaeff*. ex Fr.	

1-الزراعة على الأوساط المغذية:

بيّنت نتائج الزراعات التي تمت على الأوساط المستخدمة في هذا البحث، تبايناً في قدرة الأنواع المختلفة على النمو الإعاشي تبعاً للوسط النامي عليه وكذلك تبعاً للجزء المستنبت من الجسم الثمري إذا كان نسيج قبعة أو أبواغ (جدول 2).

جدول 2. نمو الأنواع الفطرية المدروسة على الأوساط المختلفة

الأوساط المغذية / الأنواع الفطرية	P.D.A		M.E.A		Lima bean		Sabouraud	
	النسيج	الأبواغ	النسيج	الأبواغ	النسيج	الأبواغ	النسيج	الأبواغ
L. nuda	+	+	+	+	+	–	–	–
O. olearius	+	+	+	+	–	–	+	–
T. Terreum	+	+	+	+	+	+	–	–
T.scalpturatum	–	–	+	+	+	+	–	–
C. micaceus	–	–	+	+	+	+	–	–
A. mellea	–	–	–	–	–	–	+	–

P. ostreatus	–	–	–	–	–	–	+	–
A. ovoidea	–	–	–	–	–	–	–	–
V. gloiocephala	–	–	–	–	–	–	–	–
R. paludosa	–	–	–	–	–	–	–	–
L. deliciosus	–	–	–	–	–	–	–	–
B. granulatus	–	+	–	+	–	–	–	+
B. luridus	+	+	–	–	–	–	–	+

+ : نمو –: عدم نمو

يبين الجدول 2، عدم نمو الزراعات النسيجية والبوغية، على أي من الأوساط المغذية وذلك للأنواع الآتية: *A. ovoidea*، *R. paludosa*، *L. deliciosus* و*V. gloiocephala* ، وقد يكون ذلك إما بسبب عدم ملاءمة هذه الأوساط للنمو الإعاشي لهذه الأنواع التي ربما تحتاج إلى أوساط نوعية تحوي مركبات معينة لتحفيز نموها، وإما بسبب طريقة حياتها المتعايشة، حيث تعد الأنواع الثلاثة الأولى من الفطور المشكّلة للميكوريز مع جذور النباتات الراقية، ونخص بالذكر *R. paludosa* الإجباري التعايش، والتي يكون عادة من الصعب الحصول عليها وحفظها بشكل زراعات نقية (على أوساط مغذية) في المختبر (Lanier *et al*., 1978).

وقد بينت بعض الأبحاث أن الفطريات المشكلة للميكوريز تحتاج إلى الآزوت لتحفيز نموها، كما أنها تعطي كتلة مشيجية أكبر على الأوساط الحاوية على منابع آزوت عضوي مقارنة بمنابع الآزوت اللاعضوي (Keller, 1996 ; He and Suzuk, 2003).

2 – وصف المشائج الفطرية النامية على الأوساط المغذية :

2 – 1 – الزراعة على وسط P.D.A:

يبين الجدول (3) الأنواع الفطرية النامية على الوسط P.D.A، سرعة نموها وصفات المستعمرات النامية اعتباراً من الزراعات النسيجية والبوغية.

جدول (3) مشائج الأنواع الفطرية النامية على الوسط P.D.A

الأنواع الفطرية	الوسط P.D.A	
	الزراعات النسيجية	الزراعات البوغية
L. nuda	نمو بطيء، يبدأ اعتباراً من اليوم الثالث للزراعة، ويستمر حتى اليوم 15 من بدء النمو، حيث تشغل المستعمرة 3.5 سم من الطبق، ثم يتوقف النمو بعدها. تكون المشيجة ضعيفة، بيضاء إلى شاحبة أكثر كثافة في وسط المستعمرة (شكل 1) .	نمو بطيء، يبدأ في اليوم الثالث بعد الزراعة، وتشغل المشيجة 3 سم من الطبق بعد 15 يوماً من بدء النمو ثم يتوقف النمو.
O. olearius	نمو سريع، يبدأ في اليوم الثالث، وتغطي المشيجة الطبق بعد 17 يوماً من بدء النمو. المشيجة ثخينة، تتصبغ باللون الأصفر والبرتقالي (دوائر متحدة المركز متناوبة) بشكل	نمو سريع ممّاثل لما هو عليه بالنسبة للزراعات النسيجية، لكن تتميز المستعمرات هنا بأن التصبغ

أقوى وأشد كثافة بحيث يتصبغ الوسط بالكامل باللون البرتقالي. كما يبدأ إفراز القطيرات بعد 10 أيام وتكون أغزر ممّا هي عليه في الزراعات النسيجية.	كثيف، ثم تبدأ بإفراز قطيرات هلامية بعد 10 أيام من بدء النمو، وهي إشارة لبداية تشكل البداءات الثمرية.	
نمو ممّاثل لما هو عليه في الزراعات النسيجية.	نمو ضعيف جداً، تتشكل مستعمرة قليلة الكثافة صغيرة لا تتجاوز 2 سم بعد أسبوع، ثم يتوقف النمو.	*T. Terreum*
يبدأ النمو اعتباراً من اليوم الثالث، تتشكل مشيجة بيضاء متوسطة الكثافة تستمر بالنمو وتغطي كامل سطح الطبق بعد شهر من بدء النمو.	-	*B. granulatus*
يبدأ النمو اعتباراً من اليوم الثالث تتشكل مشيجة لبادية كثيفة نوعاً ما. تبلغ 4 سم بعد 10 أيام من بدء النمو ثم تتوقف.	النمو بطيء ويبدأ بعد 10 أيام من الزراعة، تتشكل مشيجة يبلغ قطرها 3 سم بعد شهر من بدء النمو، وهي مشيجة قطنية ضعيفة قليلة الكثافة شاحبة اللون.	*B. luridus*

شكل (1) مشيجة الفطر *Lepista nuda* على وسط P. D. A (زراعة نسيجية)

لوحظ نمو 5 أنواع فقط من الفطريات المدروسة، على هذا الوسط، وتم الحصول على مستعمرات مختلفة القياس من جميع الزراعات النسيجية والبوغية عدا زراعات نسيج القبعة للنوع *B. granulatus* التي لم تُبدِ أي نمو، في حين كان نمو الزراعات البوغية لهذا النوع الأخير كاملاً لكنه بطيء، حيث غطى سطح الطبق (9 سم) بعد شهر من الزمن. وبالمقابل تميز النوع *O. olearius* بنمو سريع منذ البداية واكتمل بعد 17 يوماً فقط.

أظهرت نتائج هذه الدراسة تماثلاً في نمو مشائج الفطر *T. Terreum* الناتجة عن الزراعات النسيجية والبوغية له، وذلك على الوسط P.D.A، وكان نمواً بطيئاً، أعطى مشيجة ضعيفة، قليلة الكثافة وبلغ قطر المستعمرة 2 سم بعد

أسبوع. وهذا لا يتوافق مع ما وجده Kibar and Peksen (2011) بأن الوسط P.D.A كان مناسباً أكثر من غيره من الأوساط لنمو مشيجة هذا النوع ويكتمل النمو ويعطي مشيجة كثيفة خلال 7 أيام من الزراعة، على الرغم من تشابه الشروط الأخرى من حيث درجة الحرارة ودرجة الـ pH بين دراستنا وهذه الدراسة الأخيرة حيث كانت الحرارة 25 م° والـ pH تعادل 5.5 .

والجدير بالذكر أن الوسط P.D.A كان مناسباً لإنتاش ونمو أبواغ الفطريات ذات الثقوب المدروسة هنا، أكثر من نمو نسيج القبعة (جدول 3)، حيث أعطت نمواً كاملاً غطى سطح الطبق بالكامل بعد شهر عند النوع *B. granulatus*، في حين أعطت مستعمرة قطره 4 سم بعد /10/ أيام لدى النوع *B. Luridus* وهي أفضل من المستعمرة الناتجة عن زراعة نسيج القبعة للفطر ذاته.

يتبين من هذه النتائج أن هناك اختلافاً في إمكانية نمو الأنواع المختلفة وإعطائها مشائج كاملة النمو على الوسط P.D.A، ممّا يدل على التباين في المتطلبات الغذائية بين هذه الأنواع ، لكن الاحتياجات الغذائية اللازمة لإنتاش الأبواغ ومن ثم النمو المشيجي لها فيما بعد هي ذاتها بالنسبة للأنواع النامية على الوسط P.D.A ، كما هو مبين في الجدول (3)، وهذا يتوافق مع Kalmis and Kalyoncu (2006) الذي بيّن أن الوسط P.D.A كان مناسباً لإنتاش أبواغ الفطر *L.edodes* ولنموه المشيجي في الوقت ذاته.

2 – 2 – الزراعة على وسط M.E.A:

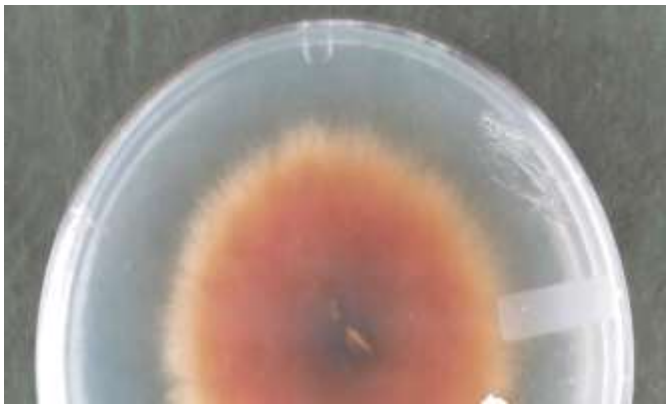
يبين الجدول (4) صفات مشائج الأنواع الفطرية والبالغ عددها /6/ أنواع، النامية على الوسط المغذي M.E.A، وسرعة نموها.

جدول (4) مشائج الأنواع الفطرية النامية على الوسط M.E.A

الأنواع الفطرية	الوسط M.E.A	
	الزراعات النسيجية	الزراعات البوغية
L. nuda	النمو بطيء، يبدأ في اليوم الثالث بعد الزراعة، وتتشكل مستعمرة صغيرة قطرها 2 سم بعد 10 أيام من بدء النمو، ثم يتوقف النمو بعد ذلك. المشيجة ضعيفة، قليلة الكثافة، تكون أكثر ثخانة وغزارة في مركز المستعمرة من حوافها. تكون في البداية بيضاء اللون، ثم تتصبغ باللون البنفسجي بعد أسبوع من النمو. يكون اللون شديداً وكثيفاً في وسط المستعمرة، ويصبح أقل شدة على أطرافها. ثم يتحول اللون إلى البني الشاحب بعد الجفاف.	النمو في البداية أسرع ممّا هو عليه في الزراعات النسيجية، لكنها تعطي مستعمرة يصل قطرها إلى 2.5 سم بعد 15 يوماً ثم يتوقف عن النمو. تأخذ المشيجة صفات مشابهة لتلك الناتجة عن الزراعات النسيجية.
O. olearius	يبدأ النمو في اليوم الثالث من الزراعة، وتتشكل مستعمرة صغيرة بيضاء اللون تنمو بسرعة وتغطي سطح الطبق بكامله بعد 15 يوماً من بدء النمو. المشيجة لبادية المظهر، كثيفة مرتفعة في المركز وتقل كثافتها باتجاه المحيط،	النمو ممّاثل لما هو عليه بالنسبة لزراعات نسيج القبعة، والتصبغ ممّاثل أيضاً، لكنها تتميز عنها بأن القطيرات الهلامية أغزر، أصغر حجماً وأدكن لوناً.

	تتلون باللون الأصفرو البرتقالي بعد أسبوع وهو لون ممّاثل للون الجسم الثمري الطبيعي، ويتدرج اللون بشكل مناطق دائرية متحدة المركز. تتميز هذه الزراعات بإفراز قطيرات برتقالية داكنة، أو سوداء محمرّة وذلك بعد أسبوع من بدء النمو خاصة في المناطق الكثيفة من المستعمرة (شكل 2).أما الناحية السفلية للمستعمرة فتتصبغ بلون برتقالي داكن متجانس (شكل 3)	
النمو ضعيف، لكن تتشكل مستعمرة تبلغ 2 سم بعد أسبوع ثم تتوقف عن النمو خلال الأسبوع الثاني من بدء النمو	يبدأ النمو في اليوم الثالث، ويكون ضعيفاً جداً. تتشكل مستعمرة صغيرة لا تتجاوز 1 سم في القطر، ثم تتوقف عن النمو بعد أسبوع.	*T. Terreum*
النمو مشابه تماماً لما هو عليه في الزراعات النسيجية.	نمو بطيء وضعيف جداً، يبدأ في اليوم الثالث من الزراعة، وتتشكل مستعمرة صغيرة جداً لا تتجاوز 0.5 سم في القطر، ثم تتوقف عن النمو بعد أسبوع من بدء النمو.	*T. scalpturatum*
النمو بطيء، يبدأ في اليوم الثالث، وتتشكل مستعمرة صغيرة قطرها 1 سم بعد أسبوع من بدء النمو. المشيجة ضعيفة هشة، سمراء اللون.	يبدأ النمو في اليوم الثالث، يكون سريعاً في البداية وتتشكل مستعمرة قطرها 2 سم خلال الأسبوع الأول ثم تتوقف عن النمو. تكون المشيجة ضعيفة، بيضاء اللون.	*C. micaceus*
ينمو الفطر اعتباراً من اليوم الثالث بعد الزراعة، تتشكل مستعمرة سريعة النمو في البداية وبعد أن تبلغ 2 سم في القطر تتوقف عن النمو بعد أسبوعين	-	*B. granulatus*

شكل (2) مشيجة الفطر *Omphaletus olearius* على وسط M.E.A بعمر 7 أيام (الوجه العلوي . زراعة نسيجية) .



شكل (3) مشيجة الفطر *Omphaletus olearius* على وسط M.E.A بعمر 7 أيام (الوجه السفلي . زراعة نسيجية) .

كما هو الحال بالنسبة للزراعات على الوسط P.D.A، فإن مستعمرات الأنواع النامية على وسط M.E.A مختلفة القياس، وتم الحصول عليها ابتداءً من الزراعات المشيجية والبوغية لجميع هذه الأنواع عدا النوع *B. granulutus* الذي لم تُبدِ زراعاته النسيجية أي نمو.

لقد تميز النوع *O.olearius* بنمو كامل على الوسط M.E.A، غطى الطبق بعد 15 يوماً، وتشكلت مشيجة مميزة أخذت اللون الأصفر و البرتقالي المميز للجسم الثمري الطبيعي (صورة 3)، وقد تماثل النمو سواءً في الزراعات النسيجية أو البوغية لهذا النوع.

أما النوع *L.nuda* فقد أعطى مستعمرة صغيرة قليلة الكثافة على هذا الوسط، لكنها تميزت عن المستعمرات النامية على الوسط P.D.A بلونها البنفسجي الممّاثل للون الجسم الثمري الطبيعي. لقد لاحظنا توقف نمو هذه المستعمرة بعد 10 أيام من بدء النمو، في حين وجد جهار (2005) أن النوع ذاته يستمر في نموه حتى اليوم 30 ويعطي نمواً كاملاً على طبق 9 سم، وبذلك اعتبر أن هذا الفطر متوسط النمو على الوسط M.E.A، أما Dighe and Agate (2000) فقد وجدا أن نمو هذا النوع يكون سريعاً على هذا الوسط حيث يعطي مستعمرة يصل قطرها إلى 8 سم خلال 10 أيام فقط من الزراعة وذلك في الدرجة 25 م˚ وpH تعادل 5.2، وهي شروط ممّاثلة تقريباً للشروط المطبقة في بحثنا هذا، لكن الاختلاف في النمو قد يعود إلى اختلاف العزلات الفطرية المستخدمة في الزراعة في هذه الأبحاث والتي قد تختلف عن بعضها في خواصها الفيزيولوجية، حيث بيّن Jayasinghe. *et al.*, (2008) اختلافاً واضحاً في الشروط الفيزيائية والأوساط الزرعية الملائمة لنمو 10 سلالات مختلفة من النوع *Ganoderma Lucidum*، حيث تراوحت درجات الحرارة المثلى لها بين 25–30 م˚، والـ pH بين 5–9 وذلك على 10 أوساط مختلفة.

أما بالنسبة للنوع *T.Terreum* فقد لاحظنا أن نموه على الوسط M.E.A كان ضعيفاً وبطيئاً وتوقف بعد أسبوع من بداية النمو، وذلك بعد أن أعطى مستعمرة صغيرة لم تتجاوز 1 سم في القطر، على الرغم من أن Kibar and Peksen (2011) كانا قد وجدا أن هذا الوسط يعد منبعاً للآزوت مناسباً جداً لنمو سريع وكثيف لهذا الفطر.

بشكل عام كان النمو على الوسط M.E.A مختلفاً باختلاف الأنواع ، لكن Teoh and Mashitah (2012) وجدا أن نمو أربعة أنواع مختلفة من الجنس *Trametes* على هذا الوسط كان متقارباً جداً لكنه يبقى في جميع الحالات وسطاً غير مناسب بشكل جيد للنمو الإعاشي مقارنة مع الأوساط الأخرى المستخدمة في بحثهما.

2-3 - الزراعة على وسط Lima bean:

يبين الجدول (5) صفات مشائج الأنواع الفطرية (والبالغ عددها 4) النامية على الوسط Lima bean، وسرعة نموها.

جدول (5) مشائج الأنواع الفطرية النامية على الوسط Lima bean

الأنواع الفطرية	الوسط Lima bean	
	الزراعات النسيجية	الزراعات البوغية
L. nuda	يبدأ النمو في اليوم الثالث بعد الزراعة، يكون سريعاً نوعاً ما في البداية، وتتشكل مستعمرة قطرها 5.5 سم بعد 15 يوماً من بدء النمو، ثم يستمر النمو حتى يغطي كامل سطح الطبق بعد 5 أسابيع من بدء النمو. تكون المستعمرة في البداية بيضاء اللون، ثم تتصبغ باللون البنفسجي بعد أسبوع من نموها، يكون اللون أكثر وضوحاً وشدة في المركز، في حين يكون فاتحاً نوعاً ما على المحيط.	-
T. Terreum	يكون النمو ضعيفاً جداً، وتتشكل مستعمرة صغيرة لا يتجاوز قطرها 0.4 سم، ثم تتوقف عن النمو في الأسبوع الثاني.	النمو مشابه لما هو عليه في الزراعات النسيجية لهذا النوع.
T. Scalpturatum	نمو بطيء، يبدأ اعتباراً من اليوم الثالث ويعطي مشيجة ضعيفة البنية، تشغل حيزاً صغيراً لا يتجاوز 0.3 سم ثم تتوقف عن النمو في الأسبوع الثاني.	النمو مشابه لما هو عليه في الزراعات النسيجية لهذا النوع.
C. micaceus	يبدأ النمو في اليوم الثالث، يعطي مشيجة هوائية مرتفعة عن سطح الوسط، بيضاء اللون، تكون كثيفة نوعاً ما، تشغل المستعمرة 3.5 سم من الطبق بعد 2 أسبوع من بدء النمو.	نمو بطيء يبدأ في اليوم الثالث، وتتشكل مشيجة ضعيفة، سمراء اللون، هشّة، تتوقف عن النمو بعد 2 أسبوع

نلاحظ من الجدول (5) نمواً مختلفاً لنسج وأبواغ ثلاثة أنواع من الفطريات المدروسة على الوسطLima bean، في حين أن النوع الرابع النامي على هذا الوسط وهو *L. nuda*، فقد أعطى مشائج من زراعاته النسيجية فقط، ولم تعط زراعات أبواغه أي نمو. وقد كان هذا النمو مميزاً مقارنة مع نموه على الأوساط السابقة الذكر (M.E.A , P.D.A) حيث تشكلت مستعمرة كثيفة غطت الطبق بالكامل، وأخذت اللون البنفسجي المميز للون الجسم الثمري الطبيعي، ممّا يدل على أن هذا الوسط كان ملائماً لنمو هذا النوع أكثر من الأوساط الأخرى المستخدمة ، بالرغم من أنه وسطاً ليس شائعا" جدا" لزراعة الفطريات القبعية ، كذلك الأمر بالنسبة للزراعات النسيجية للنوع *C. micaceus* والتي بينت نمواً أفضل على الوسط Lima bean مقارنة مع نموه على الأوساط الأخرى ، ممّا يؤكد أهمية تجريب هذا الوسط لزراعة أنواع أخرى من الفطريات الدعامية.

2 – 4 – الزراعة على وسط Sabouraud:

يظهر الجدول (6) الأنواع الفطرية النامية على وسط Sabouraud وصفات مشائجها وسرعة نموها.

جدول (6) مشائج الأنواع الفطرية النامية على الوسط Sabouraud

الأنواع الفطرية	الوسط Sabouraud	
	الزراعات النسيجية	الزراعات البوغية
O olearius .	نمو بطيء جداً ويبدأ بعد أسبوع من الزراعة ثم يتسارع قليلاً وتتشكل مشيجة تغطي كامل الطبق بعد 20 يوماً. تكون المشيجة ضعيفة، قليلة الثخانة والكثافةة رمادية اللون، ولا يلاحظ التصبغ البرتقالي المميز لها عند زراعة هذا النوع على الأوساط السابقة.	–
A. mellea	يبدأ النمو في اليوم الثالث ويكون بطيئا" وتتشكل مستعمرة قطرها 3 سم بعد 2 أسبوع ، ثم تتوقف عن النمو.	–
P. ostreatus	نمو بطيء، يبدأ اعتبارا من اليوم الثالث. المشيجة ضعيفة جداً، قليلة الكثافة، وتشغل 2 سم من الطبق بعد 2 أسبوع ثم تتوقف عن النمو بعدها.	–
B. granulatus	–	يبدأ النمو اعتباراً من اليوم الثالث ويكون بطيئاً، تتشكل مشيجة ضعيفة جداً، لا تتجاوز 1 سم في القطر بعد أسبوعين.
B. luridus	–	يبدأ النمو في اليوم الثالث بعد الزراعة، تتشكل مستعمرة تشغل 1 سم من الطبق بعد 10 أيام من بدء النمو، وتكون المشيجة ضعيفة جداً.

تميزت الزراعات على وسط Sabouraud بأن النوعين *A. mellea* و*P. ostreatus* واللذين لم يبديا أي نمو على الأوساط المغذية الأخرى ، قد أعطيا نمواً اعتباراً من الزراعات النسيجية وشكلا مستعمرات بلغت 3 سم و2 سم في القطر لهذين النوعين على الترتيب، وقد كان النمو بطيئاً واستمر حتى نهاية الأسبوع الثاني بعد بدء النمو ثم توقف. ولم تتوافق هذه النتيجة مع نتائج Nasim *et al.* (2001) و Kasouha *et al.*, (2009) وذلك فيما يتعلق بالنوع *P.ostreatus* الذي أعطى نموا" بطيئا" على الوسط P.D.A (حيث تم تسجيل أطول مدة لاكتمال النمو مقارنة مع الأوساط الأخرى المستخدمة في تجاربهم)، في حين كانت نسبة النمو أفضل وأسرع على الوسط M.E.A، وقد عزا الباحثون هذه النتائج إلى فقر الوسط P.D.A نسبيا" بالمواد الآزوتية الداعمة للنمو، في حين تدعم البروتينات المغذية للمشيجة الموجودة في الوسط M.E.A النمو بشكل أفضل.

يبين نمو الفطر *A.mellea* على الوسط Sabouraud فقط من بين جميع الأوساط الأخرى حاجة هذا النوع إلى مصدر أزوتي بالإضافة إلى مصدر كربوني لكي ينمو إعاشياً، وقد توافق هذا مع Pentland (1967) الذي

لاحظ أن هذا الفطر قادر على تشكيل مشيجة مميزة على وسط مغذٍ أساسه أحد السكريات (خاصة الغلوكوز) كمنبع كربوني، وحمض أميني أو ملح أمونيوم كمصدر آزوتي.

أما فيما يتعلق بالنوع *O. olearius* الذي نما بشكل جيد وسريع على الوسطين P.D.A وM.E.A وشكل مشائج مميزة وكثيفة تتلون باللون الأصفر أو البرتقالي، فقد كان نموه على الوسط Sabouraud بطيئا"، والمشيجة ضعيفة وقليلة الكثافة ولا تعطي اللون المميز لها، ممّا يدل على أن هذا الوسط الأخير أقل ملاءمة لنمو هذا الفطر مقارنة مع الوسطين الأخرين، كما أن له تأثيراً في بعض الصفات الشكلية وبعض الخواص الفيزيولوجية للفطر والمتعلقة بشكل المشيجة وتصبغها.

وبشكل عام يعد الوسط سابورود الوسط المغذي الأساسي الأكثر استخداماً في علم الفطريات الطبية، وذلك لعزل وزراعة وحفظ أغلب الفطريات الممرضة الشائعة لدى الإنسان والحيوان خاصة الفطريات الجلدية (Odds, 1991)، لكن على الرغم من ذلك، يستخدم هذا الوسط حالياً لعزل وزراعة العديد من الأنواع الفطرية الأخرى المسببة للعفن أو الممرضة للنباتات (Botton *et al.*, 1990) ، ويؤكد نمو بعض الفطريات القبعية عليه في هذا البحث، على إمكانية استخدامه في أبحاث تتعلق بهذا النوع، أوتجريب زراعة أنواع أخرى عليه، هذا وقد بينت بعض الأبحاث حاجة بعض الفطريات القبعية إلى الغلوكوز والبيبتون بشكل أساسي لكي تنمو بشكل جيد، فقد وجد Lai *et al.* (2011) أن الوسط الأمثل لنمو الفطر *Lignosus rhinoceros* هو وسط الغلوكوز – بيبتون مقارنة مع أوساط أخرى تم استخدامها منها P.D.A وM.E.A والتي كان نمو هذا الفطر ضعيفاً عليها.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1-اختلفت المتطلبات الغذائية للأنواع المدروسة في هذا البحث والتي بدت من خلال التباين في قدرة هذه الأنواع على النمو وإعطاء مشائج باختلاف الأوساط المستخدمة.

2-كان الوسطان P.D.A وM.E.A هما الأمثل لاعطاء مشائج من الأنواع المدروسة أكثر كثافة وأسرع نمواً، يأتي بعدها الوسط Lima bean ثم الوسط Sabouraud .

3-اختلفت أبواغ الفطريات المدروسة في قدرتها على النمو وذلك تبعاً للأوساط.

4- كان الوسطان P.D.A وM.E.A مناسبين لانتاش أبواغ جميع الفطريات النامية عليهما، ومن ثم إعطاء مشائج مختلفة في صفاتها.

5-إمكانية نمو كلٍ من *B.granulatus* , *P.ostreatus* , *A.mellea* , *O.olearius* و *B.luridus* على الوسط Sabouraud والمستخدم عادة لزراعة وحفظ الفطريات الممرضة للإنسان والحيوان.

التوصيات:

1-اختبار زراعة الأنواع الدعامية المدروسة على عددٍ أكبر من الأوساط المغذية ودراسة تأثير ظروف إستنباتية أخرى في نموها .

2-دراسة الفاعلية المضادة للأحياء الدقيقة الممرضة لمشائج الفطريات النامية على هذه الأوساط.

3-عزل وتحديد بعض المركبات الفعالة التي تنتجها هذه المشائج.

4-تحديد الأوساط والظروف الإستنباتية الأمثل لإعطاء النسبة الأفضل للفاعلية تجاه الممرضات.

المراجـــع:

1- جهار، عبد الله ، 2005 – عزل أورمات فطرية من أجسام ثمرية فطرية سامة وأخرى صالحة للأكل واختبار قدرتها على إنتاج الصادات الحيوية ضد جراثيم ممرضة فوق الأوساط الأغارية الجامدة، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة حلب، 175.

2- يازجي، ميساء؛ سعود، راميا. 2007 – دراسة الفعالية الصادية لثلاثة فطريات دعامية (Basidiomycetes) ضد بعض الأحياء الدقيقة في الزجاج (in vitro). مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (29) العدد (5)، 95 – 110.

3- يازجي، ميساء؛ سعود، راميا، 2008 – دراسة الفعالية المضادة للفطريات لخلاصات مختلفة للفطر *Lactarius* sp. تجاه بعض الفطريات الممرضة . مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية. المجلد (30) العدد (2). 91- 104.

3- AHMED,S.; ANWAR,A.; HAIDER,A.; SAEED,M.A.; NADEEM,M.; NASREEN,Z. and BAIG, S. Selection of culture medium for exopolysaccharides production by *coriolus versicolor*. Pak.J. Phytopatho., Vol.23, N˚.1, 2011, 1-4.

4- ASGHAR,R.; TARIQ,M. and REHMAN,T. Propagation of *Pleurotus Sajor-caju* (Oyster mushroom) Through tissue culture. Pak.J.Bot., Vol.39, N˚.4, 2007, 1383-1386.

5- BARROS,L.; BAPTISTA,P.; ESTEVINHO,L.M. and FERREIRA,I.C.F.R. Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different Nitrogen sources. Food chemistry, Vol.105, 2007, 179-186.

6- BITEW,A. Antibacterial and antifungal activities of culture filtrate extract of *pyrofomes demidoffii* (Basidiomycete). World Appl. Sci.J., Vol.10, N˚.8, 2010, 861-866.

7- BOTTON,B.; BRETON,A.; FEVRE,M.; GAUTHIER,S.; GUY,Ph.; LARPENT,J.P.; REYMOND,P.; SANGLIER,J.J.; VAYSSIER,Y. and VEAU,P. Moisissure utiles et nuisibles, importance industrielle. 2^{e} ēdition, Masson, Paris, 1990.

8- DIGH, S. and AGATE, A. D. Antibacterial activity of Some Indian mushrooms. Int. J. Medi. Mush. Vol. 2,2000, p. 141 – 150.

9- HE, X.M. and SUZUKI, A. Effect of Nitrogen resources and pH on growth and fruit body formation of *coprinopsis phlyctidospora*. Fungal Diversity. Vol.12, 2003, 35-44.

10- HIRASAWA, M., SHOUJI, N., NETA, T., FUKUSHIMA, K., TAKADA, K.,Three Kinds of antibacterial substances from *lentinus edodes* (berk) Sing. (Shiitake, an edibles mushroom). Int. J. Antim. Age. Vol. 11,1999, p. 151 – 157.

11- JANAINA DUARTE, B.; SIANNAH MARIA, M. D.; SABRINA, M. V.P.; AYRES, F. M. M. and AGENOR, F. Jr. F. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *pycnoporus sanguineus*. ISSN 1983 – 4209, vol. 2, N$^{\circ}$. 2, 2008, 11 – 15.

12- JAYASINGHE,C.; IMTIAJ,A.; HUR,H.; LEE,G.W.; LEE,T.S. and LEE,U.Y. Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. Mycobiology, Vol.36, N˚.1, 2008, 28-33.

13- JONATHAN, S. G. and FASIDI, I . O., Antimicrobial activities of some Selected Nigerian mushroom. Afri. J. Biomed. Res. Vol. 8(2),2005, p. 83 – 87.
14- JONATHAN, S. G. and FASIDI, I. O ., Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro Fungi – *lycoperdon pusilum* (Bat. Ex) and *lycoperdon giganteum* (pers). Afri. J. Biomed. Res. Vol.6 ,2003, p. 85 – 90.
15- KALMIS, E. and KALYONCU, F. Variation in The isolates obtained From Basidiospores of commercial Mushroom *Lentinula edodes* (shiitake). Internaional journal of science & technology. Vol. 1, N°. 22, 2006, 99 – 103.
16- KASOUHA, L.; OLABI, M. M.; KALHOUT, A.; YABRAQ, M. M. and AHMAD, A. M. Effect of different nutrient media on the production of primary mycelium by the mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fries) P. Kummer. 4th conference on recrnt on recent technologies in Agriculture, 2009, 616 – 623.
17- Keller, G. Utilization of inorganic and organic Nitrogen resources by high-sub-alpine ectomycorrhizal fungi of pinus cembra in pure culture. Mycological Research. Vol.100, 1996, 989-998.
18- KIBAR, B .and PEKSEN, A. Nutritional and environmental requirements for vegetative growth of edible ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma Terreum*. Zemdirbyste= Agriculture. Vol. 98, N°. 4, 2011, 409 – 414.
19- LAI,W.H.; MURNI,M.J.S.; FAUZI, D.; MAZNI,O.A. and SALEH, N.M. Optimal culture conditions for mycelial growth of *Lignosus rhinocerus*. Mycobiology, Vol.39, N°.2, 2011, 92-95.
20- LEE, B.C.; BAE, J.T; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J. and YUN, J.W. Biological activities of The polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycetes *Grifola frondosa* . Enzyme and Microbial technology, Vol. 32, 2003, 574 – 581.
21- LINDEQUIST, U., NIEDER MEYER, T. H. J. and JULICH, W. D. The pharmacological potential of Mushrooms. e CAM, Vol. 2(3), 2005, 285 – 299.
22- LOISEAU, J. Cheur de champignons vol I. Les champignons Supérieurs à Lames Paris: agaricales et astérosporales, vigot frers, Paris 6.1975,1-309.
23- MANJUNATHAN,J. and KAVIYARASAN,V. Biotechnological applications of *Lentinus tuberregium* (Fr).; A south Indian edible mushroom. EJBS. Vol.4, N°.1, 2010, 28-31.
24- NASIM, G.; HAMEED MALIK, S.; BAJWA, R.; AFZEL, M. and WAJID MIAN, S. Effect of Three different culture media on mycelial growth of oyster and Chinese Mushrooms. Online Journal of Biological Sciences. Vol. 1, N°. 12, 2001, 1130 – 1133.
25- NONIS, U., 1982 – Mushrooms toadstools, a colour Field guide. David and Charles, London.
26- ODDS,F.C. Sabourau (’S) agar. Journal of Medical and Veterinary Mycology, Vol.29, 1991, 355-359.
27- OKAMOTO, K., CHIMORI, M., IWANAGA, F., HATTORI, T., and YANASE, H., Production of y-lactones by the Brown-Rot basidiomycete *Piptoporus soloniensis* . J. bioscience and bioengineering, vol. 94(2),2002, 182 – 185.
28- PACUMBABA, R. P., BEYL, C. A., and PACUMBABA, R. O., - Shiitake Mycelial Leachate Suppresses growth of Some Bacterial Wilt of tomato and Lima Bean in vitro. Plant Disease, vol. 83 (1),1999, 20 – 23.

29- PENTLAND,G.D. Ethanol produced by *Aureobasidium pullulans* and its effect on the growth of *Armillaria mellea*. Can.J.Microboil. Vol.13, N˚.12, 1967, 1631-1639.

30- ROMAGNESI, H. petite atlas des champignons Tome I – II. Bordas, France, Paris,1962.

31- Rosa, L. H., MACADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., and ZANI, C. L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. Mem. Inst. Oswaldo cruz, rio de janeiro, vol. 98(7),2003, p. 967 – 974.

32- SULKOWSKA-ZIAJA, K.; KARCZEWSKA, E.; WOJTAS, I.; BUDAK, A.; MUSZYNSKA, B. AND EKIERT, H. Isolation and biological activities of polysaccharide Fractions From mycelium of *Sarcodon imbricatus* L. P. KARST. (Basidiomycota) Cultured in vitro. Acta poloniae pharmaceutica – Drug Research. Vol. 68, N°. 1, 2011, 143 – 145.

33- TEOH, Y.P. and MASHITAH,M.D. Screening of antifungal activities from genera Trametes against growth of selected wood-degrading fungi from Malaysia. Aust.J. Basic & Appl. Sci. Vol.6, N˚.1, 2012, 79-85.

34- THULASI,E.P.; THOMAS,P.D.; RAVICHANDRAN,B. and MADHUSUDHANAN,K. Mycelial culture and spawn production of tow Oyster mushrooms, *Pleurotus florida* and *Pleurotus eous* on different substrates. Intern.J.Biol.Technol., Vol.1, N˚.3, 2010,39-42.

35- WASSER, S.P.,– Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Bioechnol. Vol. 60 ,2002, 258 – 274.

36- ZHOU,Z.U.; TAN,J.W. and LIU,J.K. Tow new polyols and a new phenylpropanoid glycoside from the Basidiomycete *Lactarius deliciosus*. Fitoterapia, Vol.82, 2011, 1309-1312.