المجلة الليبية لوقاية النبات، 2014، (4) :7 1- 28

استخدام الزيت المعدني في حفظ الفطريات

أمينة عبدالسلام القمودي، عيسى صالح فرج؛ حفصة عمر حسونة وأحلام عبد السلام عقيلة

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس، ليبيا.

e-mail: amina_a_g@yahoo.com

الملخص

هدفت هذه الدراسة لاختبار حيوية وإمراضية 28 عزلة فطرية ضمن المجموعة الفطرية بمختبرات قسم وقاية النبات بكلية الزراعة جامعة طرابلس، والمحفوظة تحت الزيت المعدني لمدة زمنية (من 5-6سنوات). أوضحت النتائج أن 12عزلة فطرية فقط تمت استعادتها ولا زالت محتفظة بحيويتها، بينما فقدت 16عزلة من الفطريات حيويتها. وفي اختبار القدرة الامراضية لهذه العزلات (12) المحتفظة بحيويتها بتلقيح أجزاء نباتية مختلفة كعوائل (نبتات كاملة وبذور أو ثمار)، أوضح أن نسبة الإصابة تتراوح ما بين (0-100 %). وتمت إعادة حفظ هذه العزلات الحية بطرائق مختلفة مشتملة الحفظ تحت الزيت المعدني وفى تربة معقمة وبالنقل الدوري.

الكلمات المفتاحية : فطريات، الحفظ، الزيت المعدني، اختبارات الإحيائية و الامراضية.

المقدمة

تحفظ الفطريات بطرق عدة، أحدهما طريقة الحفظ تحت الزيت المعدني(mineral oil)، حيث تتم تنمية المزارع الفطرية على وسط غذائي (PDA) في أنابيب حفظ (سعة 15 و 30 مل). بعد فترة التحضين وعند إكتمال النمو في هذه الأنابيب تغمر المزارع الفطرية النامية بالزيت المعدني " البارافين الطبي " لمنع فقد الماء من هذه المزارع وتقليل النمو والنشاط الحيوي للعزلات وذلك من خلال تخفيض استهلاك الأكسجين (9،11،13،15،19،21،22). وقد أجريت أول دراسة لحفظ الفطريات بهذة الطريقة بواسطة(Sherf, 1943) (17) حيث قام بحفظ 4 أنواع من *Fusarium* spp. وعزلة من فطر *Alternaria* sp. وأكد أن هذه الفطريات تحتفظ بحيويتها عند تخزينها تحت الزيت المعدني لمدة تصل إلى 6 أشهر. وتعتبر طريقة الحفظ تحت الزيت المعدني من ضمن أساليب حفظ الفطريات المتبعة فى المعهد الدولى للفطريات (IMI)، وذلك بتغطية المزارع الفطرية النقية بالزيت المعدني (8،10،13،15،16،20،22). الدراسات التى أجريت بمعهد IMI بينت أن استخدام هذه الطريقة للحفظ قد حافظت على حيوية بعض الفطريات مثل:

Aspergillus , Penicillium،Phythium و*Phythophthora* لمدة 40 سنة (21،19). Wernham و Miller (22) أثبتا ان ممرضات الذرة *Helminthosporium maydis*،.sp *Diplodia* و *Gibberella* .spاحتفظت بحيويتها وقدرتها الامراضية بعد ثلاث سنوات من الحفظ تحت الزيت المعدنى، كما أكد كلا من Buell و Weston(8) إن حفظ الفطريات تحت الزيت المعدني يمنع فقد الماء من النموات الفطرية و يقلل من نشاطها و نموها لمدة سنتين. و قام Fennel (11) بحفظ العديد من الأجناس الفطرية باستخدام عدة طرائق من بينها الحفظ تحت الزيت المعدني بنجاح، كما قام بتوضيح أهم الخطوات اللازم إتباعها أثناء الحفظ تحت الزيت المعدني المعقم، وعند استرجاع النمو ينقل جزء من المزرعة المحفوظة تحت الزيت المعدنى الى بيئة لا تختلف عن البيئة المستخدمة فى التخزين. وأثبت كلا من Haenseler و cappellini (9) أن 16 عزلة من أصل 32 عزلة من.spp *Helminthosporium* احتفظت بحيويتها وبقدرتها على تكوين الأبواغ وذلك بعد أن حُفظت تحت الزيت المعدني لمدة 7 سنوات. وأوضح Braverman (7) أن الأنواع التابعة للفطر .spp *Stemphylium* احتفظت بحيويتها وقدرتها الامراضية بعد حفظها تحت الزيت المعدني لمدة تتراوح من 5–12سنة. وأكد كلا من Little و Gordan (14) على النتائج التي تحصل عليها Braverman (7) في دراسة آجراها على 202 مزرعة فطرية حيث وجدا ان المدة الزمنية لبقائها حية عند حفظها تحت الزيت المعدني تتراوح ما بين 6–12سنة.وفى السنوات الأخيرة اثبتت العديد من الدراسات ان تقنية الحفظ تحت الزيت المعدني من الطرائق الناجحة لحفظ الفطريات، حيث قام Cavalcanti (10) بدراسة على 64مزرعة فطرية تضم 47 نوعا من الفطريات البازيدية وأكد نجاح عملية الحفظ تحت الزيت المعدني لمدة تتراوح من7–34 سنة، وأوضح إن العديد من الفطريات المحفوظة بهذه الطريقة لا تفقدها صفاتها المميزة، ورغم إن بعض المزارع تتعرض للتلف ولتجنب ذلك يتم نقلها باستمرار وبانتظام (22،20،18،15). كما أن طريقة الحفظ تحت الزيت المعدني بالرغم من بساطتها، وعدم تكلفتها إبقائها على حيوية العينات المحفوظة لمدة طويلة (22،21،20،18،8). الا انها تسبب تأخيرا في نمو المزارع المحفوظة عند إعادة نموها (20،17،15،8) و بالرغم من ذلك فالحفظ تحت الزيت المعدني يوصى به لتخزين الفطريات في المعامل ذات الإمكانيات والمعدات المحدودة (22،20،18). ,وفى دراسة للقمودي (3) لاختبار حيوية وامراضية 52 عينة فطرية محفوظة بطريقة التجفيذ لمدة تتراوح من 26 –28 سنة، من معهد الدولي للفطريات (IMI) ومعرفة للنوع. أظهرت الأختبارات أن 28 عينة فطرية فقط تم استرجاع حيويتها وأعيد حفظها بعدة طرائق ومنها الحفظ تحت

الزيت المعدني. وقد هدفت هذه الدراسة لإعادة اختبار حيوية واثبات القدرة الأمراضية للعينات الفطرية المحفوظة تحت الزيت المعدني (زيت البارافين) لمدة 5 – 6 سنوات عند درجة حرارة 4–5 م° للاستعانة بها في تعريف العزلات الفطرية المستجدة بالقسم ثم إعادة حفظها بطرائق الحفظ المختلفة.

مواد وطرق البحث

أجريت هذه الاختبارات في معامل قسم وقاية النباتات بكلية الزراعة – جامعة طرابلس سنة 2002 وذلك لاختبار حيوية العينات الفطرية. حيث تم إعادة تنمية العينات "28" الفطرية والمحفوظة تحت الزيت المعدني لمدة تتراوح من 5 – 6 سنوات، وتشمل فطريات تابعة للفطريات الاسكية Ascomycota والفطريات الناقصةDeuteromycota والفطريات الزيجية (Zygomycota جدول: 1). أجريت عملية النقل من زجاجات الحفظ إلى إطباق الوسط المغذي(PDA)، تحت ظروف معقمة بمعدل ثلاث مكررات لكل عينة، وضعت الأطباق المحقونة في الحضانة عند (24 ± 2 م°) وخلال فترة زمنية تراوحت بين 1–4 أسابيع سجلت نتائج اختبار الحيوية وذلك بملاحظة نمو الفطريات (20،23). فحصت كل عينة فطرية نامية وذلك بتحضير شريحة لفحصها تحت المجهر، للتأكد من تعريف الفطر حسب ما ورد فى بطاقة التعريف من (IMI) وذلك من خلال الصفات المورفولوجية للعينة النامية ومقارنتها بالصفات المذكورة فى المراجع والكتب المتخصصة في تقسيم الفطريات والتأكد من عدم حصول تلوث للعينة بكائنات دقيقة أخرى.

حقن لقاح كل عينة فطرية فى زجاجات حفظ تحتوى على وسط (PDA) وبعد تنميتها فى حضان عند درجة حرارة 2±24م° لمدة أربع أسابيع غمرت المزارع الفطرية بالزيت المعدني (زيت البارفين الطبي)، ثم حفظت فى الثلاجة عند درجة حرارة4– 5 م(8، 12،22). ولاختبار القدرة الإمراضية للفطريات النامية استخدمت نباتات متنوعة كعوائل اصلية للفطريات المختبرة ومنها الكاملة كالبرسيم والفول السودانى،أو اجزاء نباتية استخدمت في التجربة كبذور: الذرة و الشعير و الفول السوداني و البازلاء و البرسيم، أو ثمار: كالبرتقال، والطماطم، والليمون، أما الخبز والجبن فاستخدمت كعوائل للفطريات المترممة. بالنسبة للفطريات التى تصيب الثمارجهز معلق الأبواغ الفطرية بتركيز 100% ولقحت العوائل الأصلية للفطريات المراد اختبار إمراضيتها. أخذت الثمار المستخدمة كعائل للفطر وعقمت سطحيا وتم احداث جروح بسيطة فى سطح الثمارتم غمرت في معلق الفطر في كؤوس زجاجية معقمة بواقع ثمرة واحدة فى كل كأس تحتوي على ورق ترشيح معقم و مشبع بالماء

المعقم لتوفير الرطوبة اللازمة لنمو الفطر بواقع 3 مكررات لكل تجربة، مع استخدام ثمرة مجروحة وغير مجروحة وغير معاملة بالمعلق الفطري كشاهد. وغطئت كل الكؤوس بإحكام بورق الألومونيوم وحفظت المعاملات عند 24±2 م° سجلت النتائج بعد أسبوعين اي مع ظهور الإصابة على الثمار.اما البذور فعقمت سطحياً في بمعلق الفطر ووزعت البذور في أطباق معقمة بها ورق ترشيح معقم و مشبع بالماء المعقم بمعدل 20 بذرة في كل طبق مع عمل 4 مكررات لكل تجربة، بالإضافة إلى مكرر بدون معاملة كشاهد ووضعت الأطباق في درجة حرارة المعمل مع توفير الرطوبة اللازمة عند الاحتياج ويتم ملاحظة وتسجيل النتائج يوميا. أما بالنسبة لممرضات المجموع الجذري فإنه تم تعقيم التربة مرتين في المعقم عند درجة حرارة 121 م0 و ضغط 15 رطل / بوصة مربعة لمدة ساعة ونصف، تؤخذ الشتول المراد استخدامها كعائل، وبعد تعقيمها سطحيا بالكحول 70%، ثم غسلت الجذور بماء مقطر ومعقم لازالة تأثير الكحول، وعمل جروح بسيطة فى جذور النباتات باستخدام أبرة معقمة، ثم غمرت الشتلات في معلق الفطر(3،8،16،22) زرعت النباتات في أصص تحتوي على التربة المعقمة بمعدل 3 مكررات مع ترك شتلات معقمة ومعاملة بماء معقم كشاهد وتم ري النباتات حسب الحاجة و تركت في درجة حرارة وإضاءة الغرفة. تركت النباتات لتدوين النتائج، وبعد ظهور الإصابة على العوائل عزل المسبب من العوائل المتنوعة (بذور، ثمار، وشتلات)كلا على حدة وتم التأكد من شكلها الظاهري ومقارنتها بصفات العينات الفطرية الأصلية ومقارنتها بما هو وارد فى المراجع المختصة بتقسيم الفطريات (2،6،11،15،18،20). وقد أجريت أخر مرحلة لهذة الدراسة وهى حفظ العينات الفطرية النامية بأربع طرق مختلفة :النقل الدوري، وفى التربة المعقمة، وتحت الزيت المعدنى، وفى الماء المعقم(3).

النتائج والمناقشة

من خلال النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة في اختبارات استعادة العزلات لحيويتها أتضح أن 12 عزلة احتفظت بحيويتها من أصل 28 عزلة فطرية تم حفظها تحت الزيت المعدني لمدة تتراوح من 5 – 6 سنوات فأستعيد نمو ما يعادل 43 % من العزلات كما هو موضح (بالجدول:2). الذي يبين أن فطراً واحداً يتبع الفطريات الزايجية Zygomycetes تمكن من استعادة نموه، و 4 فطريات اسكية Asccomycetes و7 فطريات تابعة لصف الفطريات الناقصةDeuteromydetes. من خلال هذة الدراسة تبث ان الكثير من الفطريات لا تفقد صفاتها الخاصة او المميزة من حيث الغزل الفطرى وشكل الأبواغ حيث ثم

فحص العينات الفطرية "12" وذلك بأستخدام المجهر ومقارنتها بالمراجع والكتب المتخصصة فى تقسيم الفطريات(2،6)وهذا ما تؤكدة نتائج الدراسة التى قام بها Fennel(11). كما لوحظ أن هذة الطريقة تسبب تأخير فى نمو المزارع المحفوظة عند اعادة نموها وهذا يتفق مع دراسات سابقة (8،15،18،20) وذلك خلال الفترة الزمنية من أسبوع إلى 5 أسابيع (جدول رقم 2). أما العزلات التي فقدت القدرة على استعادة النمو فكان عددها 16 فطراً وأعيد تنميتها أكثر من مرة للتأكد من حيويتها لم نتحصل على أي نموات، كما حدث أيضاً تغيرات مورفولوجية على بعض العينات مثلما لوحظ على عزلة *Aspergillus flavus* حيث فقدت اللون الطبيعي للمستعمرة فتغير من اللون الأخضر الزاهي إلى اللون الأسود وهذا يتفق مع دراسات سابقة (15،18،21،22). و أظهرت نتائج اختبارات الامراضية أن أغلب الفطريات التي احتفظت بقدرتها على النمو لا زالت تحتفظ بقدرتها على إصابة عوائلها، فقد بلغت نسبة الإصابة للعوائل تتراوح ما بين 0 – 100 % كما هو موضح (الجدول رقم 3). وتمت إعادة لحفظ الفطريات التي لا تزال تحتفظ بحيويتها بعد مدة تخزين تتراوح من 5 – 6 سنوات و ذلك باستخدام طرائق مختلفة للحفظ منها طريقة النقل الدوري، الحفظ تحت الزيت المعدني، الحفظ في الماء المعقم، الحفظ في التربة المعقمة، وتخزينها و حفظها في درجة حرارة " 4 – 5 م0 " كماأجريت مقارنة بين نتيجة إختبار الحيوية 28 عزلة فطرية محفوظة تحت الزيت المعدني و نتائج اختبار الحيوية لنفس العينات المحفوظة بطريقة النقل الدوري(4) وفي تربة معقمة(5) لدراسات أخرى اجريت في نفس الوقت كما في الجدول رقم " 4 ". و نستنتج من الجدول حسب النتائج المتحصل عليها أن طريقة الحفظ بالنقل الدوري أفضل طريقة لحفظ الفطريات من طريقة الحفظ بالزيت المعدني والحفظ في التربة المعقمة وهذه النتائج تتفق مع دراسات اجريت فى IMI (18،20،21)، حيث حافظت طريقة النقل الدوري على حيوية 15 فطراً من أصل 28 عزلة فطرية أي ما يعادل 54 %، أما الحفظ تحت الزيت المعدني احتفظ 12 فطراً بحيويته أي ما يعادل 43 % من العينات، و الحفظ في التربة معقمة تمكنت 8 فطريات فقط من النمو أي ما يعادل 29 % من العزلات فقط.ولكن ذلك لا يمنع من تبنى أسلوب الحفظ تحت الزيت المعدنى لتحزين الفطريات فى المعامل ذات الأمكانيات والمعدات المحدودة ولمدة طويلة تتروح ما بين 1 – 34 سنة بناء على نتائج دراسات سابقة (7،10،18،20). ونتائج هذة الدراسة حيث خزنت العينات الفطرية لمدة 5–6 سنوات، وتمكن العزل من الحصول عليها وتنميتها، مع الأحتفاظ بقدرتها الأمراضية. هذة الطرائق تعتبر ذات مردود علميا جيدا لما لها من أهمية فى الحفاظ على بعض العزلات النادرة لاجراء دراسات معمقة عليها مستقبلا.

جدول (1). قائمة الفطريات المحفوظة تحت الزيت المعدني حسب معهد الفطريات (IMI)(3).

ر. م	رقم IMI	الفطريات
الفطريات الزيجية Zygomycetes		
15	082707	*Zygorhynchus moellen*
22	057762	*Rhizopus stoloinfer*
24	045772	*Cunnighamella echinulata*
48	121212	*Choanephora cucurbitarum*
50	132640	*Mucor plumbeus*
الفطريات الاسكية Ascomycetes		
4	068202	*Melanospora zamiae*
9	016203	*Chaetomium golbosum*
11	132026	*Peziza atrovinsa*
12	134278	*Pyrenophora avenae*
17	126287	*Chrysosporium xerophila*
20	021944	*Neurospora sitophila*
23	076761	*Hypomyces solani*
32	129499	*Cephalosporium coccorum*
36	049781	*Cochlioblus geniculus*
الفطريات الناقصة Deuteromycetes		
2	017454	*Aspergillus niger*
5	061536	*Cylindrocarpon radicicola*
6	017454	*Curvularia cymbopogonis*
7	073101	*Helminthosporium satirum*
8	113135	*Trichoderma viride*
18	131021	*Aspergillus fumigates*
19	089717	*Aspergillus flavus*
29	072324	*Fusarium moniliforme*
27	ii057832	*Penicillium griseofulvum*
33	129056	*Fusarium solani*
34	ii 049948	*Phoma violacea*
38	29425	*Trichothecium roseum*
39	068344	*Phomopsis ancostoma*
49	026211	*Penicillium chrysogenum*

جدول (2). اختبارات الحيوية للعينات المحفوظة تحت الزيت المعدني.

ر. م	رقم MIM	الفطريات الزيجية Zygomycetes	معدل النمو	ملاحظات
15	082707	*Zygorhynchus moellen*	+++	*
22	057762	*Rhizopus stolonifer*	_	**
24	045772	*Cunnighamella echinulata*	_	**
48	121212	*Choanephora cucurbitarum*	_	**
50	132640	*Mucar plumbeus*	_	***
		الفطريات الاسكية Asccomycetes		
4	068202	*Melanospora zamiae*	_	**
9	016203	*Chaetomium globosum*	+++	***
11	132026	*Peziza atrovinsa*	++	**
12	134278	*Pyrenophora avenae*	_	**
17	126287	*Chrysosporium xerophila*	+++	***
20	021944	*Neurospora sitophila*	_	***
23	076761	*Hypomyces solani*	_	**
32	129499	*Cephalosporium coccorum*	+++	***
36	049781	*Cochlioblus geniculus*	_	**
		الفطريات الناقصة Deuteromycetes		
2	017454	*Aspergillus niger*	+++	***
5	061536	*Cylindrocarpon radicicola*	_	**
6	134162	*Curvularia cymbopogonis*	_	*
7	073101	*Helminthosporium satirum*	_	*
8	113135	*Trichoderma viride*	+++	***
18	131021	*Aspergillus fumigates*	+++	***
19	089717	*Aspergillus flavus*	+++	***
29	072324	*Fusarium moniliforme*	_	*
27	ii057832	*Penicillium griseofulvum*	++	**
33	129056	*Fusarium solani*	_	*
34	ii 049948	*Phoma violacea*	+	*
38	29425	*Trichothecium roseum*	_	*
39	068344	*Phomopsis ancostoma*	_	*
49	026211	*Penicillium chrysogenum*	++	**

جدول (3). اختبارات القدرة الامراضية للفطريات المحتفظة بحيويتها على بعض عوائلها (1،2،6).

ر.م	رقم IMI	الفطريات	العائل	الأمراض التي تسببها	%نسبة
الفطريات الزيجية Zygomycetes					
15	082702	*Zygorhynchus*	البازلاء	عفن البذور	93
الفطريات الاسكية Asccomycetes					
11	132026	*Peziza atrovinsa*	الخبز	مترمم	0
17	126287	*Chrysosporium*	الجبن	ينمو على المواد	0
32	129499	*Cephalosporium*	الشعير	عفن البذور	83
الفطريات الناقصة Deuteromycetes					
2	017454	*Aspergillus niger*	الفول	اعفان البذور المخزونة	96
6	134162	*Curvularia*	الشعير	عفن البذور	20
8	113135	*Trichoderma viride*	الليمون	العفن الأخضر	100
18	131021	*Aspergillus fumigates*	الدرة	عفن البذور	66
19	089717	*Aspergillus flavus*	الفول	العفن الأسود	56
27	057832	*Penicillium*	البرتقال	عفن الثمار	100
34	049948	*Phoma violacea*	البرسيم	عفن البذور، الجذور و	90
49	026211	*Penicillium*	الطماطم	عفن الثمار	100

جدول (4). مقارنة نتائج اختبارات الحيوية للفطريات المحفوظة بعدة طرائق لمدة " 5 – 6 سنوات.

ر.م	رقمIMI	الفطريات	طرائق الحفظ		
			تحت	في تربة	النقل الدوري
الفطريات الزيجية Zygomycetes					
15	082707	*Zygorhynchus moellen*	+++	_	+++
22	057762	*Rhizopus stolonifer*	_	_	_
24	045772	*Cunnighamella echinulata*	_	_	++
48	121212	*Choanephora cucurbitarum*	_	_	_
50	132640	*Mucar plumbeus*	_	_	+++
الفطريات الاسكية Asccomycetes					
4	068202	*Melanospora zamiae*	_	_	+
9	016203	*Chaetomium globosum*	+++	_	+++
11	132026	*Peziza atrovinsa*	++	_	+++
12	134278	*Pyrenophora avenae*	_	_	++
17	126287	*Chrysosporium xerophila*	+++	_	+++
20	021944	*Neurospora sitophila*	_	_	_
23	076761	*Hypomyces solani*	_	_	_
32	129499	*Cephalosporium coccorum*	+++	+++	_
36	049781	*Cochlioblus geniculus*	_	_	_

تابع جدول 4

ر.م	رقمIMI	الفطريات	طرائق الحفظ		
الفطريات الناقصة Deuteromycetes					
2	017454	*Aspergillus niger*	+++	+++	+++
5	061536	*Cylindrocarpon radicicola*	_	_	+
6	134162	*Curvularia cymbopogonis*	_	_	_
7	073101	*Helminthosporium satirum*	_	_	++
8	113135	*Trichoderma viride*	+++	_	_
18	131021	*Aspergillus fumigates*	+++	+++	+++
19	089717	*Aspergillus flavus*	+++	++	+++
27	072324	*Penicillium griseofulvum*	++	++	_
29	ii075832	*Fusarium moniliforme*	_	++	_
33	129056	*Fusarium solani*	_	+++	_
34	ii 049948	*Phoma violacea*	+	–	++
38	29425	*Trichothecium roseum*	_	_	_
39	068344	*Phomopsis ancostoma*	_	_	_
49	026211	*Penicillium chrysogenum*	++	+	++

(–) يدل على النمو، (+) نمو بطيء جداً، (++) نمو بطيء، (+++) نمو جيد.

Using of mineral oil in the maintenance of fungi

Amina A. Gamudi, Isa S. Faraj, Hafsah O. Hassounah and Ahlam A. Akeelah.

Plant protection department, Faculty of Agriculture, Tripoli University, Libya

e-mail: amina_a_g@yahoo.com

Abstract

This study aimed to test the viability and pathogenicity of 28 isolates in group of plant pathogenic fungi preserved under sterile mineral oil (for 5-6 years) in plant Protection Department, College of Agriculture - University of Tripoli, Libya. Results showed that only 12 isolates could be recovered and found viable while 16 fungal isolates were non-viable. The pathogenicity tests of 12 viable isolates on different

plant hosts parts (whole plants, seeds or fruits), where the percentage of infection was was ranged from 0-100%. Viable isolates were successfully re-preserved using different methods including periodical transferring, under mineral oil and, sterile soil.

Keywords: Fungi, preservation, mineral oil, viability and pathogenicity.

المراجع

1-**ابو غنية، عبد النبي محمد. (1986)**. أمراض المحاصيل البستانية. مطبوعات جامعة طرابلس، 272 صفحة.

2-**جريوس، جورج. (1984)**. امراض النبات. ترجمة محمود موسى ابو عرقوب، منشورات جامعة قاريونس، 995 صفحة.

3-**لقمودي، امينة عبد السلام. (1997)**. بقائية و امراضية عزلات فطرية محفوظة بطريقة التجفيد و اعادة حفظها بطرائق مختلفة. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة. 60 صفحة.

4-**القمودى، امينه عبد السلام، خديجه فرج العربى وعياد محمد العبانى. (2010)**. اختبار حيوية وامراضية بعض الفطريات المحفوظة بطريقة النقل الدورى واعادة حفظها. المجلة الليبية للعلوم الزراعية، 15 (2): 3-9

5-**القمودى، امينه عبد السلام، عيس صالح فرج وعصام الدين عثمان الوحيدى . (2013)**. اختبار حيوية وامراضية عزلات من الفطريات المحفوظة فى التربة. مجلة وقاية وأمراض النبات، جامعة المنصورة، مصر.(6):553-4560.

6-**نيفال، روبرت. (1991)**. امراض المحاصيل الحقلية. ترجمة عيسى صالح فرج و عبد النبي محمد ابو غنية. 1119 صفحة.

7-**Braverman, S. W. (1970)**. Longevity and pathogenicity of several isolates of *Stemphylium* species stored under mineral oil. Plant disease reporter, 54:580-582

8-**Buell, C. B. and Weston, W. H. (1947).** Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungus cultures. The American Journal of Botany, 34 : 555 – 561.

9-**Cappellini, R. A. and haenseler, C. M. (1958).** Longevity of some graminicolous species of *Helminthosporium* under mineral oil. Phytopatology 48 : 695 – 696.

10-**Cavalcanti, M. A ,deQ. (1990).** Viability of cultures of Basidiomycotina preserved in mineral oil. Revista Latinoamericana de Microbiolologia 32:265-268.(Abstr. In Rev. pl.path. 71(11):824p.1992

11-**Fennel, D. I. (1960).** Conservation of fungus cultures. The Botanical Review, 26 : 79 – 141.

12-**Fergus, C. L. and H. Cole, Jr. (1955).** Longevity of the oak wilt fungus stored under mineral oil. Phytopathology, 45: 405.

13-**Heckley, R. J. (1978).** Preservation of microorganisms. Advances in Applied Microbiology 24: 1-53.

14- **Little, G. N. and Gordan, M. A. (1967).** Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. Mycologia 59 : 723-736.

15-**Martin, S. M. (1964).** Conservation of microorganisms. Ann.Rev. Microbiol.18:1– 16.

16-**Onions, A. H. S. (1971).** Preservation of fungi. pp. 113-151, In: Methods In Microbiology4,Booth(Ed.). London & New York, Academic press.

17-**Sherf, A. F. (1943).** A method for maintaining phytomonas sepedonica in culture for long periods without transfer. Phytopathology 33 : 330 – 332

18-**Smith, D. (1990).** Notes on the preservation of fungi. CAB, International Mycological Institute, 1 - 31.

19-Smith, D. and Onions, A. H. S. (1983). A Comparison of some preservation techniques for fungi. Trans. Br, Mycol. Soc. 81 : 535 – 540

20- Smith, D. and Onions, A .S .H. (1994). The preservation and maintainance of living fungi 2nd.edition, CABI, International Mycological Institute , 1 – 122.

21-Smith, D., lewis, H. F. H and Ferjus, C. L. (1970). Long-term preservation of Botryosphaeria and Dibotryon morbosum.Plant Dis.Reptr.55(3):217-218.

23-Tuite, J. (1969). Plant pathological methods: Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company Minnesota, USA.

22- Wernham, C. C. and Miller, H. J. (1948). Longevity of fungus under mineral oil. Phytopathology 38 : 932 – 934.