

تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين المنتج من طرف الأكتينوبكتيريا سكاروثريكس أجريانسيس على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان.

Influence of thiolutin antibiotique produced by the actinobacterium Saccharothrix algeriensis on vascular wilt of flax Linum usitatissimum

مروش ربيعة¹، يوسف خيرة¹، مكات عتيقة¹، زيتوني عبد الغني¹
مخبر بيولوجيا الأنظمة البيئية، المدرسة العليا للأساتذة، القبة القديمة، الجزائر
البريد الإلكتروني: rabiamerrouche@gmail.com

Doi 10.5281/zenodo.7990831

تاريخ القبول: 25 نوفمبر 2021

تاريخ الإرسال: 23 مارس 2021

الملخص (Abstract):

تقوم سلالة من الأكتينوبكتيريا *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (SA) المعزولة من تربة صحراوية، بإنتاج معقد من المضادات الحيوية النشطة بيولوجيا ذات الفاعلية القوية المثبطة للكائنات الدقيقة وخاصة الفطريات. ينتمي معقد المضادات الحيوية هذا إلى مجموعة ثنائي كبريت البيروول (Dithiolopyrrolones) ويتكون من الثيولوتين (Thiolutin) (مضاد حيوي رئيسي) وجزيئات أخرى مشابهة تم التعرف على بنيتها في دراسات سابقة. يهدف هذا العمل إلى دراسة مدى تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان الذي يسببه فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني (*Fusarium* (FOL) oxysporum f. sp. Lini).

نقوم في البداية بإنتاج المضاد الحيوي الثيولوتين، ثم تنقيته بواسطة كروماتوغرافيا الفصل بالطبقة الثخينة (Thick-layer chromatography) (TLC)، والتأكد من طبيعته باستعمال دراسة الطيف فوق البنفسجي. يتم تحديد النشاط التصادي الحيوي لمركب الثيولوتين بتقنية (Antibiography). ثم نقوم بعدها بدراسة تأثير هذا المضاد الحيوي (المضاف بتركيز 2 ملغ أو 5 ملغ لكل غرام تربة جافة) على تطور العامل الممرض (سلالة FOL) في التربة ودراسة تأثيره على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان.

أظهرت النتائج أن إضافة المضاد الحيوي الثيولوتين بتركيز 5 ملغ/100 غ تربة جافة، كان له تأثير قوي في خفض تكاثر العامل الممرض سلالة FOL وخفض حدة مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان في تربة رملية. حيث سجل انخفاض في كثافة العامل الممرض بـ 15 مرة وانخفاض معدل مرض نباتات الكتان بـ 84 % وذلك مقارنة بالشاهد (غياب المضاد الحيوي الثيولوتين).

الكلمات المفتاحية: الأكتينوبكتيريا، *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137، المضادات

الحيوية ثنائي كبريت البيروول، الثيولوتين، مرض الذبول الوعائي، فوزاريوم أوكسيسبوروم ليني، نبات الكتان.

Résumé

Une souche d'actinobactérie *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (SA) d'origine saharienne, produit un complexe d'antibiotiques à activité fortement antifongique et appartenant au groupe des dithiopyrrolones. Ce complexe d'antibiotique est constitué par la thiolutine (antibiotique principal) et d'autres molécules apparentées identifiées dans des études antérieures. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la thiolutine sur l'expression de la fusariose vasculaire du lin causée par l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (FOL).

La souche de *Saccharothrix algeriensis* est cultivée sur milieu liquide agité pendant 06 jours. L'antibiotique est extrait du filtrat par du dichlorométhane, évaporé à sec et purifié par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice G60. La réalisation du spectre UV a permis de confirmer son identification à la thiolutine, antibiotique hétérocyclique soufré. L'activité inhibitrice de la thiolutine contre l'agent pathogène FOL est déterminée par antibiographie. L'effet de la thiolutine (ajoutée à raison de 2 mg ou 5 mg/100 g de sol sec) sur l'évolution de l'agent pathogène dans un sol sableux et sur l'expression de la fusariose vasculaire du lin a été également étudié.

Incorporée dans un sol saharien, à raison de 5 mg pour cent grammes de sol, la thiolutine fait baisser la population de l'agent pathogène FOL, de 15 fois par rapport au témoin. A la même dose, la thiolutine fait nettement diminuer la fusariose du lin. Cette efficacité (% de réduction de la maladie) peut atteindre 84% dans le sol sableux.

Mot clés : Actinobactérie, *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, Antibiotiques dithiopyrrolones, Thiolutine, Fusariose vasculaire, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, Le lin.

1-المدخل (Introduction):

يعتبر مرض الذبول الوعائي أحد أكثر أمراض النباتات انتشاراً، حيث يصيب العديد من النباتات الزراعية ويتسبب في خسائر كبيرة في محاصيل الخضر والفواكه ومحاصيل الحبوب. تبدأ أولى أعراض المرض بظهور شحوب، ثم اصفرار على مستوى الأوراق السفلى وتمتد تدريجياً للأوراق العليا تذبل الأوراق وتنحني ثم تجف وتموت. ينتشر المرض عبر الأوعية الخشبية، حيث عند القيام بمقطع طولي على مستوى الجذر الرئيسي أو الساق، يلاحظ لون بني داكن في منطقة الحزم الوعائية. عند وضع جزء من المقطع في وسط غذائي مناسب، ينمو على سطحه نمواً فطرياً أبيض اللون والمتمثل في ميسيليوم فطر الفوزاريوم أوكسيسبوروم.

يعتبر الفوزاريوم أوكسيسبوروم من أنواع الفطريات الممرضة الشائعة والتي تسبب أعراض الذبول الوعائي لمختلف النباتات التي تصاب بها، حيث تتوزع على نطاق واسع في أنواع مختلفة من التربة وفي جميع أنحاء العالم [1]. تصيب العديد من الأشكال الخاصة (Formae specialis) (f. sp.) لفطر الفيزاريوم أوكسيسبوروم عائلات نباتية محددة، مثل الفيزاريوم أوكسيسبوروم (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) (FOL) الذي يسبب مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان. تسبب السلالات الممرضة من الفيزاريوم أوكسيسبوروم (*Fusarium oxysporum*) ضرراً شديداً وخسائر بالغة عبر مجموعة واسعة من العائلات النباتية، بما في ذلك العديد من

أنواع المحاصيل المهمة اقتصاديًا مثل الطماطم والحمص والعدس [2-4]. يمكن أن يعيش العامل الممرض في التربة لعدة سنوات من خلال إنتاج أبواغ مقاومة، والمعروفة بالكلاميدوسبور (chlamydospores) وبالتالي يصعب السيطرة عليه [5].

من بين الاستراتيجيات المتبعة في السيطرة على العديد من الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة عملية تناوب المحاصيل والتي أثبتت فاعليتها في العديد من التجارب، ولكن بسبب قدرة معظم هذه العوامل الممرضة للعيش لفترة طويلة من الزمن (10-15 سنة)، فإن فعالية دوران المحاصيل تصبح محدودة بمجرد حدوث نقشي المرض [6]. تعتبر عملية تطهير التربة باستخدام المواد الكيميائية المختلفة [7] أيضًا ممارسة تقليدية لكنها تخلف أضرارًا كثيرة على البيئة وصحة الإنسان.

أصبح في السنوات الأخيرة استعمال مكافحة البيولوجية ضد مسببات الأمراض النباتية بديلاً واعداً عن استعمال المواد الكيميائية وذلك من أجل السيطرة على الأمراض المنقولة بالتربة [8، 9]. أظهرت العديد من الدراسات انخفاضاً في الإصابة بالأمراض في المحاصيل المختلفة بعد إضافة كائنات دقيقة للتربة مثل

(*Pseudomonas*, *Bacillus* و *Trichoderma*) أو إضافة المواد الكيميائية الحيوية المنتجة من قبل هذه الكائنات الدقيقة [10، 11]. من بين الآليات التي تستعملها الكائنات الحية الدقيقة في مكافحة ضد مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة المنافسة *competition* والتضاد (*Antibiosis*) والتطفل (*Parasitism*) وتحريض مقاومة النبات للمرض (*resistance Induction of plant disease*) [12]. من بين هذه الكائنات الحية الدقيقة، أظهرت الأكتينوبكتيريا قدرة عالية على مكافحة البيولوجية ضد العديد من الفطريات التي تنتقل عبر التربة مثل الأنواع المتعددة لفطر الفيوزاريوم (*Fusarium spp.*) [4]. ترتبط قدرة الأكتينوبكتيريا على مكافحة البيولوجية ارتباطاً وثيقاً بخصائصها التضادية وإفرازها للمضادات الحيوية [13، 14]. في الواقع، تنتج العديد من الأكتينوبكتيريا عدة مركبات مضادة للفطريات وغيرها من المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجياً [15، 16]، من بينها الأنواع المنتمية لجنس الستراتوميساس (*Streptomyces spp.*) التي تمتلك قدرة كبيرة على إنتاج مضادات حيوية فعالة، حيث تم تسويق نوعين من مبيدات الفطريات الحيوية، المستخلصة أساساً من جنس الستراتوميساس وهي الميكوستوب (*Mycostop*) (سلالة *Streptomyces griseoviridis* K61) والأكتينوفات (سلالة *Streptomyces lydicus* WYEC108) وتستخدم لمعالجة البذور للسيطرة على مرض الذبول الوعائي بشكل رئيسي والذي يسببه فطر الفيوزاريوم المنقول بالتربة [17، 18].

تمت دراسة أجناس أخرى من الأكتينوبكتيريا بدرجة أقل مثل جنس السكروتريكس (*Saccharothrix*) ومن بينها سلالة السكروتريكس المعزولة من تربة صحراوية جزائرية (*Saccharothrix algeriensis*) (SA)، والمعروفة بإفرازها لمضادات حيوية تنتمي إلى مجموعة ثنائي كبريت البيروول (*dithiolopyrrolones*)، وتمتاز هذه المجموعة باحتوائها على حلقة بيروول مع جزيئي كبريت، وتختلف أنواعها المتعددة في الطبيعة الكيميائية للسلسلة الجانبية المتصلة بحلقة البيروول [19-21]. تمتاز هذه المضادات الحيوية بفاعلية كبيرة ضد مجال واسع من الكائنات الدقيقة التي تضم البكتيريا موجبة وسالبة الغرام، الفطريات والخمائر. من بين هذه

المضادات الحيوية مركب الثيولوتين (Thiolutine) الذي سنقوم من خلال دراستنا بتقييم مدى تأثيره على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان والذي يسببه فطر الفيوزاريوم أوكسسبوروم لينى FOL.

2- المواد والطرائق (Materials and methods) :

1. تنقية وحفظ سلالات الكائنات الدقيقة (SA و FOL):

تم تنقية سلالات الكائنات الدقيقة بعد زرعها على شكل خطوط متباعدة، وذلك على الوسط الزراعي ISP2 (International Streptomyces Project 2) (4 غ مستخلص الخميرة، 10 غ مستخلص المالت، 4 غ جلوكوز، 20 غ آجار، 1000 مل ماء، pH 7) بالنسبة لسلالة الأكتينوبكتيريا SA وعلى الوسط الزراعي (PDA) (Potato Dextrose Agar) (20 غ من مستخلص البطاطا، 20 غ جلوكوز، 20 غ آجار، 1000 مل ماء، pH 6) بالنسبة لسلالة فطر FOL. تم فيما بعد زراعة السلالات النقية على أوساط زراعية مائلة داخل أنابيب (نفس الأوساط؛ ISP2 للأكتينوبكتيريا و PDA للفطر)، والتي تم تحضينها في درجة حرارة 30°م لمدة 10 أيام، ثم حفظها في ثلاجة عند 4°م.

2. اختبار القدرة التضادية للأكتينوبكتيريا SA اتجاه سلالة فطر FOL:

تم اختبار القدرة التضادية للأكتينوبكتيريا SA اتجاه سلالة فطر FOL بطريقة الخطوط المتقاطعة (Streak method)، حيث تم زراعة الأكتينوبكتيريا على سطح الوسط الغذائي الصلب بشكل خط أفقي، ثم تم زراعة الفطر بطريقة عمودية على الأكتينوبكتيريا. بعد الحضان لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30°م، تم تسجيل منطقة تثبيط نمو سلالة الفطر FOL.

3. انتاج، استخلاص وتنقية المضاد الحيوي الثيولوتين: Thiolutin

3.1 الحصول على ما قبل المزارع Pre-cultures للأكتينوبكتيريا SA:

يتم انطلاقا من مزارع ناضجة لسلالة الأكتينوبكتيريا SA والنامية في وسط زراعي ISP2 صلب لمدة 10 أيام، أخذ كمية من الأبواغ وزراعتها في ظروف معقمة في أنابيب اختبار تحتوي على 3 مل من الوسط الغذائي ISP2 السائل. بعد المزج لمجانسة المحتوى، تم تحضين الأنابيب في درجة حرارة 30°م لمدة يومين في الحضان.

3.2 الحصول على مزارع الأكتينوبكتيريا SA: يتم تحريك محتوى الأنابيب السابقة بشدة لمدة 5

دقائق، ثم يوضع محتوى كل أنبوب في دورق إيلنماير (Erlenmeyers) يحتوي على 100 مل من الوسط الغذائي ISP2 السائل. تحضن الدوارق في درجة حرارة 30°م لمدة 6 أيام وذلك في جهاز الشيك Shaker الذي يضمن التحريك المتواصل للأوساط الغذائية بمقدار 240 دورة في الدقيقة.

3.3 استخلاص المركبات الفعالة: اعتمد على استخلاص المركبات الفعالة على طريقة (Bouras et

al. [22]). تم في البداية تصفية المزارع السائلة، بواسطة ورق واتمان (Whatman n°1)، وذلك للتخلص من كتلة الميسيليوم التي لا تحتوي على المركبات الفعالة [21]. تم استخلاص المركبات الفعالة من المرشح المتحصل عليه بواسطة المذيب العضوي ثنائي كلور الميثان (Dichloromethane)، وذلك بمزج حجم متساوي من المرشح والمذيب العضوي. تم الحصول على المركبات الفعالة ذات اللون الأصفر وذلك

بإمرار الجزء العضوي من المستخلص عبر ورق واتمان المحتوي على حبيبات سلفات الصوديوم اللامائي (anhydroussodium sulfate) الذي يمنع مرور بقايا جزيئات الماء عبر ورق الترشيح. تم تبخير المستخلص العضوي عند درجة الحرارة 40°م بواسطة جهاز مبخر دوار (Rotavapor) للحصول على المسحوق المستخلص الخام.

4.3 تنقية مركب الثيولوتين: تمت تنقية مركب الثيولوتين باستعمال كروماتوغرافيا الفصل بالطبقة الثخينة Thick-layer chromatography، حيث أوضحت أبحاث (Merrouche et al.) [19] أن هذه التقنية تسمح بتنقية الثيولوتين بنسبة 90%. تم في البداية تحضير صفائح جال السيليكا (Silica gel)، حسب الطريقة التالية: تم مزج 45 غ من جال السيليكا (Merck) G60 مع 100 مل ماء مقطر داخل دورق سعته 250 مل. بعد عملية التحريك الشديد للمحتوى، تم توزيعه بطريقة سريعة ومتجانسة على شكل طبقة ثخينة (0,5 سم) فوق صفائح زجاجية (20 X 20 سم أو 10 X 20 سم) موضوعة فوق جهاز يساعد على توزيع جال السيليكا يسمى Etaloir of Desaga. توضع الصفائح في فرن باستور في درجة حرارة 100°م لمدة ساعة، بعد تبريدها، يتم وضع 300 ميكرو لتر من المستخلص الخام على شكل خط متواصل (شريط) على مستوى صفائح السيليس. توضع بعدها الصفائح في حاويات كروماتوغرافيا زجاجية (Glass Tank for chromatography) مشبعة لمدة ساعتين بنظام من المذيبات العضوية المتكون من الأسيتات إثيل والميثانول (Ethyl acetate/methanol) (15-100 حجم/حجم) [21]. بعد هجرة المركبات الفعالة إلى نحو 2 سم من الحافة العلوية للصفائح، يتم سحب الصفائح الزجاجية وتجفيفها. يتم تحديد وإحاطة الشرائط صفراء اللون الخاصة بمركب الثيولوتين عن بقية المركبات الأخرى، يتم كشطها ووضعها في دورق يحتوي على الميثانول. يتم تحريك محتوى الدورق لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة، ثم يتم التخلص من السيليس بتصفيته في ظروف الفراغ التام. يكون المرشح الميثانولي الذي يحتوي على مركب الثيولوتين ملونا باللون الأصفر، حيث يتم تبخيره حتى الجفاف التام، ثم اذابته في 1 مل من الميثانول (Methanol) وذلك لإجراء اختبار النشاط المضاد الحيوي (Antibiography).

4. التعرف على مركب الثيولوتين باستعمال الطيف فوق البنفسجي: يتم التأكد من طبيعة مركب الثيولوتين

بإجراء الطيف فوق البنفسجي (Ultra violet spectrum) ومقارنته بالطيف البنفسجي لهذا المضاد الحيوي المذكور في المراجع. يتم إذابة مركب الثيولوتين المبخر سابقا بإضافة 1 مل من الميثانول، يتم تسجيل الطيف بين 200 و 500 نانومتر بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer Shimatzu U.V.) (260). يتم استعمال الميثانول النقي من أجل ضبط خط القاعدة (Base line).

5. النشاط المضاد الحيوي لمركب الثيولوتين: تم اختبار النشاط المضاد الحيوي لمركب الثيولوتين بتقنية (Antibiography) باستعمال أقراص ورقية بقطر 6 مم، واستعمل الفطر فوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL ككائن دقيق مستهدف. تم إذابة 2 ملغ من المضاد الحيوي الثيولوتين في 2 مل من ثنائي كلور الميثان (Dichloromethane)، تمت عملية تشريب أقراص ورقية بقطر 6 ملم بتركيز محددة من المضاد الحيوي

بمقدار: 5، 10، 15، و 20 ميكروغرام/ميكرو لتر $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، يتم قياس منطقة التثبيط بعد التحضين لمدة 48 ساعة عند درجة 30°م.

6. تأثير الثيولوتين على تطور سلالة فطر FOL في التربة:

1.6 تحضير محلول الثيولوتين: يتم إدخال المضاد الحيوي الثيولوتين إلى التربة بشكل محلول، حيث يتم تحضيره بالطريقة التالية: يتم إضافة 6 ملغ من مركب الثيولوين إلى 1 مل ميثانول داخل أنبوب اختبار. يستوجب التركيز المرتفع للثيولوتين تسخين خفيف لمحتوى الأنبوب من أجل ضمان الذوبان الكلي للمضاد الحيوي، يتم بعدها إضافة 5 مل من الماء المعقم إلى المحلول السابق. التركيز النهائي لمركب الثيولوتين هو 1 ملغ/مل.

2.6 انجاز التجربة في التربة:

1.2.6 إضافة الثيولوتين إلى التربة:

استعمل في الدراسة تربة رملية مأخوذة من منطقة أدرار.

- تم تقسيم التربة إلى ثلاث مجموعات، حيث تحتوي كل مجموعة على 120 غرام.
- تم إضافة فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL إلى التربة بتركيز 10^4 كونيديا/مل.
- يضاف مركب الثيولوتين إلى التربة بتركيز 2 أو 5 ملغ لكل 100 غرام من التربة الجافة.
- يتم التحريك الجيد
- للترية للمجانسة بين مكوناتها، وتضبط درجة رطوبة التربة عند 15%.
- يتم تقسيم كل مجموعة من التربة على دوارق، بمقدار 45 غ لكل دورق.
- يتم غلق الدوارق بالقطن المعقم وتوضع في الحضان في درجة 30°م. يتم ضبط درجة الرطوبة كل أربعة أيام عند 15%.

تم تحقيق التجارب التالية (مع تحقيق 3 تكرارات للتجربة الواحدة):

- التربة الرملية (شاهد).
- التربة + فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL.
- التربة + فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL + 2 ملغ أو 5 ملغ من الثيولوتين.

2.2.6 تعداد سلالة فطر FOL: يتم تعداد سلالة الفطر FOL باستعمال تخفيف المعلق (

suspension-dilution) للترية في الأوقات: 0، 1، 3، 6، و 10 يوم من التحضين. يتم اعتبارا من كل دورق أخذ 1 غ من التربة ووضعها في أنبوب اختبار يحتوي على 10 مل ماء. تجرى تخفيفات متتالية بأخذ 1 مل من الأنبوب الأول ووضعها في 9 ملل من الأنبوب الثاني، ثم 1 مل من الأنبوب الثاني ووضعها في 9 مل من الأنبوب الثالث... وهكذا.

الوسط الغذائي المستعمل من أجل التعداد هو الآجار المغذي (Nutrient agar)، والذي يتم تعقيمه في الأوتوكلاف (Autoclave) عند درجة حرارة 120°م لمدة 20 دقيقة. يتم تبريد الوسط الغذائي وتضاف إليه المضادات الحيوية (50 ملغ/ل كلورومفينيكول (Chloramphenicol) + 25 ملغ/ل كاناميسين)

Kanamycin) +10 ملغ/ل سترابتيوميسين (Streptomycin)، حيث تسمح بالتخلص من بكتريا التربة. يؤخذ من كل معلق تربة مخفف بطريقة معقمة 0,1 مل ويوضع في علبة بيتري المحتوية على الوسط الغذائي، يتم بعد ذلك وضع علب بيتري في الحضان في درجة حرارة 30°م وتقرأ النتائج بعد 48 ساعة.

7. تأثير الشيولوتين على مرض الذبول الوعائي:

1.7 مراحل التجربة:

- تم تقسيم التربة الرملية إلى ثلاث مجموعات، حيث تحتوي كل مجموعة على 400 غرام.
- تم إضافة فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL إلى التربة بتركيز 10⁴ كونيديا/مل.
- تم تحقيق التجارب التالية (مع تحقيق 3 تكرارات للتجربة الواحدة):
- التربة الرملية (شاهد)؛
- التربة + فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL؛
- التربة + فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL + 2 ملغ أو 5 ملغ من الشيولوتين؛
- يتم تحريك جيد للتربة للمجانسة بين مكوناتها، وتضبط درجة رطوبة التربة عند 15%؛
- يتم تقسيم كل مجموعة من التربة على 4 أصص، بمقدار 110 غ لكل أصص، يتم زرع بذور الكتان (*Linum usitatissimum*) عمق 1 سم بمقدار 15 بذرة في كل أصص، يكون المجموع 60 نبتة في كل تجربة.

2.7 ظروف التجربة:

- يتم وضع الأصص في الظلام لمدة 3 أيام لتحفيز الإنبات، ثم توضع في بيت زراعي مع تناوب الفترات الضوئية والظلامية، وذلك بتحقيق إضاءة بمقدار 8000 لوكس ودرجة حرارة 24-25°م لمدة 12 ساعة ثم بعدها درجة حرارة 18-20°م في الظلام لمدة 12 ساعة أخرى.

3.7 قراءة النتائج:

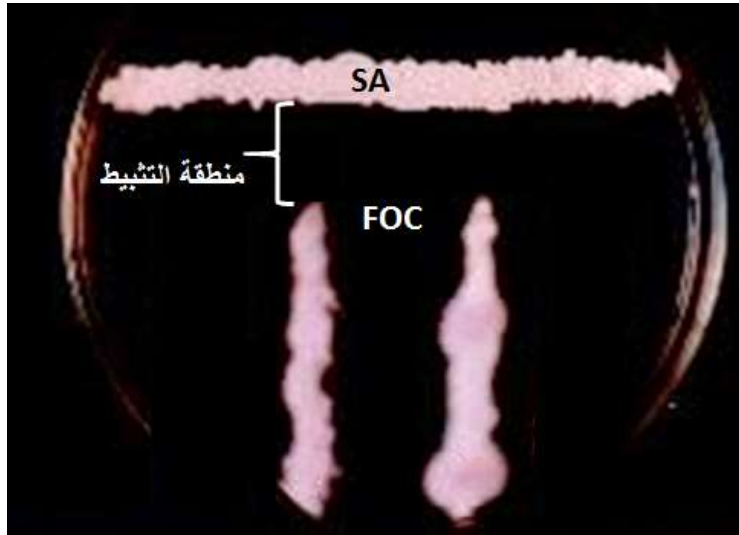
يتم متابعة التجربة إلى غاية 9 أسابيع من تاريخ الزرع، حيث يتم خلال هذه الفترة حساب عدد النباتات التي أصيبت بمرض الذبول الوعائي. تتمثل أعراض مرض الذبول الوعائي في اصفرار وذبول الأوراق من أسفل النبات نحو الأعلى والذي يؤدي في النهاية إلى موت النبات.

من أجل عزل سلالة فطر FOL من النبات المريض، يتم تنظيف سطحي لبعض فروع النباتات المصابة بالذبول الوعائي بمحلول الإيثانول (95°)، ثم غسلها بالماء المعقم وتقطيعها إلى قطع صغيرة بطول 1-2 سم ووضعها على سطح علبة بيتري تحتوي على الآجار المغذي و50 ملغ/ل من المضاد الحيوي الستراپتومييسين (Streptomycin). تحضن علب بيتري في درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة. نمو سلالة فطر FOL يسمح بالتأكد من إصابة النبات بالمرض.

3-النتائج (Results) :

1. اختبار القدرة التضادية لسلالة الأكتينوبكتيريا SA اتجاه سلالة فطر FOL:

أظهرت نتائج تجربة اختبار القدرة التضادية لسلالة الأكتينوبكتيريا SA اتجاه فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL باستعمال طريقة الخطوط المتقاطعة بظهور منطقة تثبيط معتبرة بمقدار 12 مم (الشكل 1).



الشكل 1: النشاط التضادي لسلالة الأكتينوبكتيريا SA اتجاه سلالة فطر FOL باستعمال طريقة الخطوط المتقاطعة.

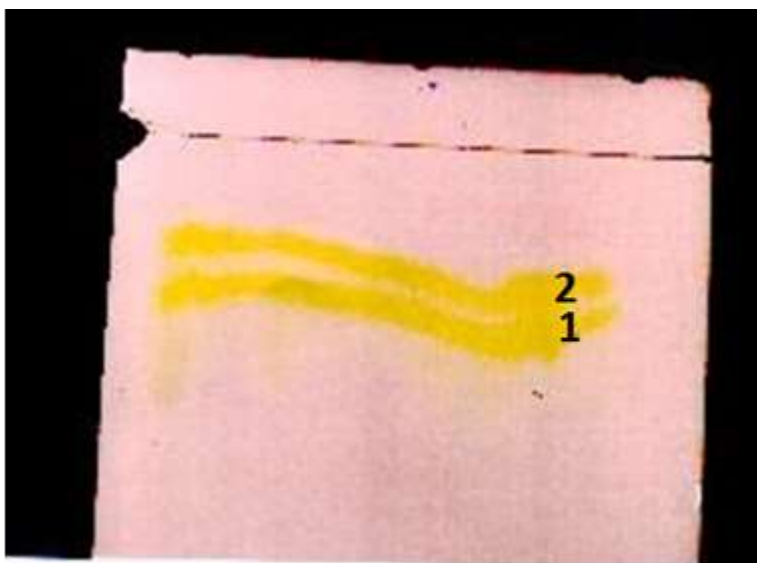
2. إنتاج واستخلاص المركبات الفعالة (المستخلص الخام):

تم تنمية الأكتينوبكتيريا في وسط سائل ISP2 في شروط تجريبية خاصة (30°م، حركية بسرعة 240 دورة في الدقيقة). أثناء مدة الحضان تحول لون الوسط الغذائي من البني الفاتح إلى الأصفر الفاقع وذلك بعد انتاج المركبات ذات اللون الأصفر. أظهر مرشح الوسط الغذائي نشاطا عاليا اتجاه فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم ليني FOL. تم استخلاص المركبات الفعالة من مرشح الوسط الغذائي وذلك في اليوم السادس من التحضين، باستعمال حجم مساو من المذيب العضوي ثنائي كلور الميثان (Dichloromethane). تم الحصول على مستخلص ذي لون أصفر فاقع، والذي تم تجفيفه للحصول في النهاية على مسحوق أصفر متمثل في المستخلص الخام.

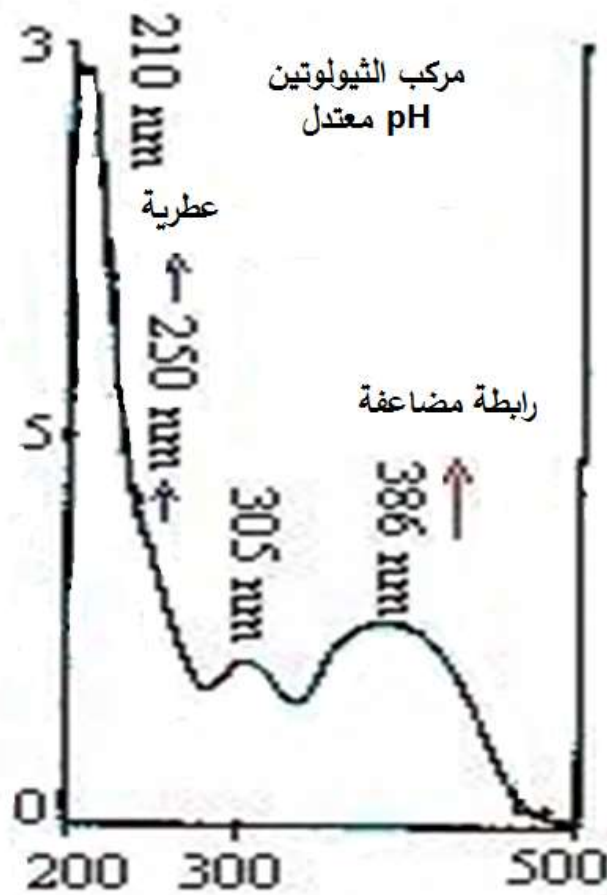
3. تنقية مركب الثيولوتين: أكدت الأبحاث السابقة لـ (Merrouche *et al.*) إمكانية تنقية مركب الثيولوتين باستعمال كروماتوغرافيا الفصل بالطبقة الثخينة [19].

عند وضع المستخلص الخام على شكل خط متواصل (شريط) على مستوى صفائح السيليس. بعد هجرة المركبات باستعمال نظام المذيبات العضوية المتكون من الأسيتات إيثيل والميثانول (100-15 حجم/حجم)، تم الحصول على شريطين بلون أصفر (الشكل 2)، حيث يمثل الشريط الأسفل (الشريط رقم 1) مركب الثيولوتين الذي يسهل تمييزه عن طريق حساب النسبة بين مكان بداية وضع المركب ونهاية

هجرة المذيب (جبهة المذيب) وهذا ما يعرف بـ (retention facteur) (RF) والذي يساوي 0,52 [20]، أما الشريط العلوي (RF = 0,59) فيتكون من معقد من المركبات الفعالة التي تم التعرف على طبيعتها وبنيتها في أعمال بحث أخرى [19-25].
تم كشط مادة السليس (شريط السليس) المحتوية على مركب الثيولوتين ووضعها في دورق به الميثانول (Methanol)، تم تحريك هذا المحتوى لمدة ساعة ثم تصفيته وتجفيفه.



- الشكل 2: تنقية مركب الثيولوتين باستعمال كروماتوغرافيا الفصل بالطبقة الثخينة، 1: مركب ثيولوتين، 2: معقد من المركبات الفعالة.
4. الطيف فوق البنفسجي لمركب الثيولوتين: يظهر الطيف فوق البنفسجي لمركب الثيولوتين على مستوى الشكل 3. سجلت أطوال الموجة القصوى للامتصاص في درجة أس هيدروجيني pH معتدل، حامضي وقاعدي وكانت كالتالي:
- pH معتدل: 210، 305 و 386 نانومتر (مع تسجيل انحناء عند 250 نانومتر).
 - pH حامضي: 207، 306 و 388 نانومتر (مع تسجيل انحناء عند 250 نانومتر).
 - pH قاعدي: 219، 387 و 398 نانومتر.
- تطابق الطيف فوق البنفسجي لمركب الثيولوتين المتحصل عليه مع ذلك المذكور في المراجع [21].



الشكل 3: الطيف فوق البنفسجي لمركب الثيولوتين.

5. النشاط التضادي الحيوي لمركب الثيولوتين:

أجريت تجربة النشاط التضادي الحيوي لمركب الثيولوتين (Antibiography) ضد فطر الفوزايوم أوكسيبوروم ليني FOL، أظهرت النتائج الموضحة في الجدول 1، الفاعلية القوية لهذا المضاد الحيوي اتجاه سلالة الفطر FOL. تم توضيح نتائج هذه التجربة أيضا على مستوى الشكل 4.

الجدول 1: النشاط التضادي الحيوي لمركب الثيولوتين ضد فطر الفوزايوم أوكسيبوروم ليني FOL.

تركيز مركب الثيولوتين (ميكروغرام/ميكرو لتر)	قطر منطقة تثبيط نمو سلالة فطر FOL (مم)
5	8
10	10
15	12
20	20

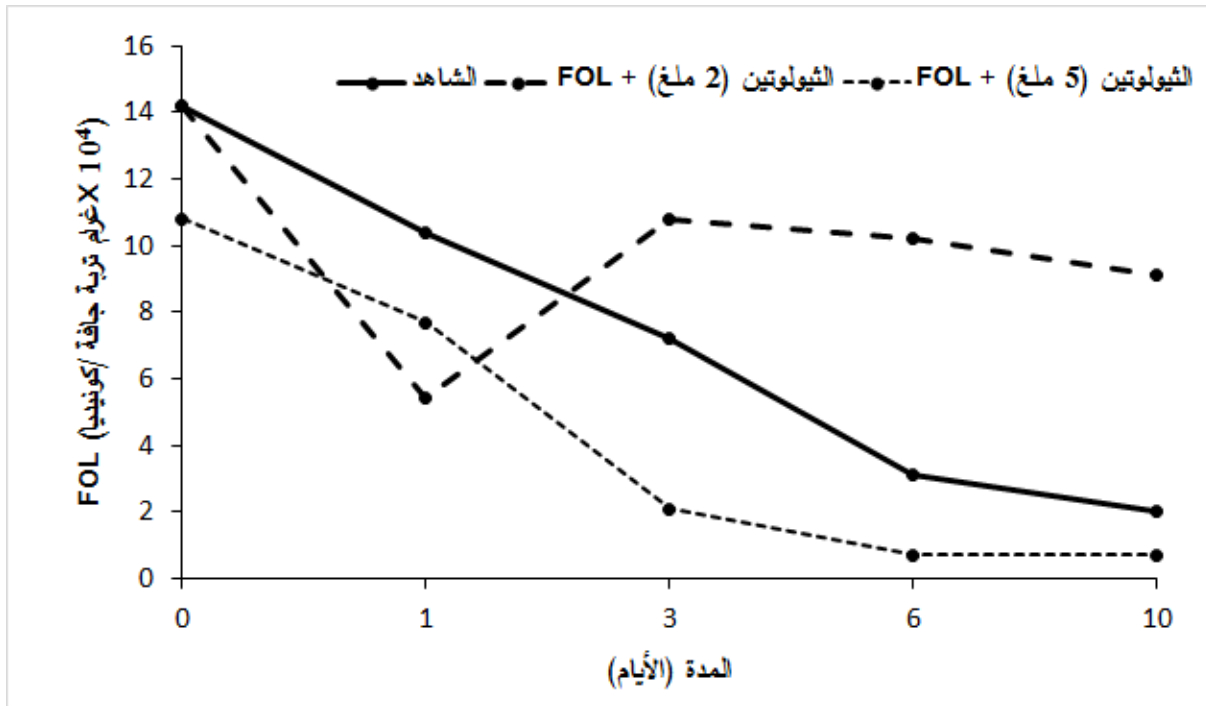


الشكل 4: النشاط التضاوي لمركب الثيولوتين ضد فطر الفوزاريوم أوكسيبوروم ليني FOL.

1، 2، 3، 4 تمثل التراكيز 5، 10، 15، و 20 ميكروغرام/ميكرو لتر $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ على التوالي.

6. تأثير الثيولوتين على تطور سلالة فطر FOL في التربة:

تظهر نتائج تطور فطر الفيوزاريوم أوكسيبوروم ليني FOL في تربة رملية في وجود المضاد الحيوي الثيولوتين الذي أضيف بتركيز 2 ملغ أو 5 ملغ لكل 100 غ تربة جافة على مستوى الشكل 5. يوضح الشكل 5 أنه في غياب المضاد الحيوي الثيولوتين، سجل انخفاضاً في كثافة سلالة فطر FOL، وذلك 7 مرات مقارنة بالكثافة الأولية (الموضوعة اليوم الأول). كما لوحظ أنه في وجود المضاد الحيوي بتركيز 2 ملغ/100 غ تربة جافة، فقد انخفضت كثافة الفطر إلى حوالي النصف خلال اليوم الأول، لترتفع من جديد في اليوم الثاني وتنخفض مجدداً تدريجياً بحوالي مرة ونصف مقارنة بالكثافة الأولية. أما في وجود المضاد الحيوي بتركيز 5 ملغ/100 غ تربة جافة، فقد حدث انخفاض تدريجي في كثافة فطر الفيوزاريوم أوكسيبوروم ليني FOL ليصل إلى حوالي 15 مرة أقل من التركيز الأولي وذلك بعد 10 أيام من التحضين.

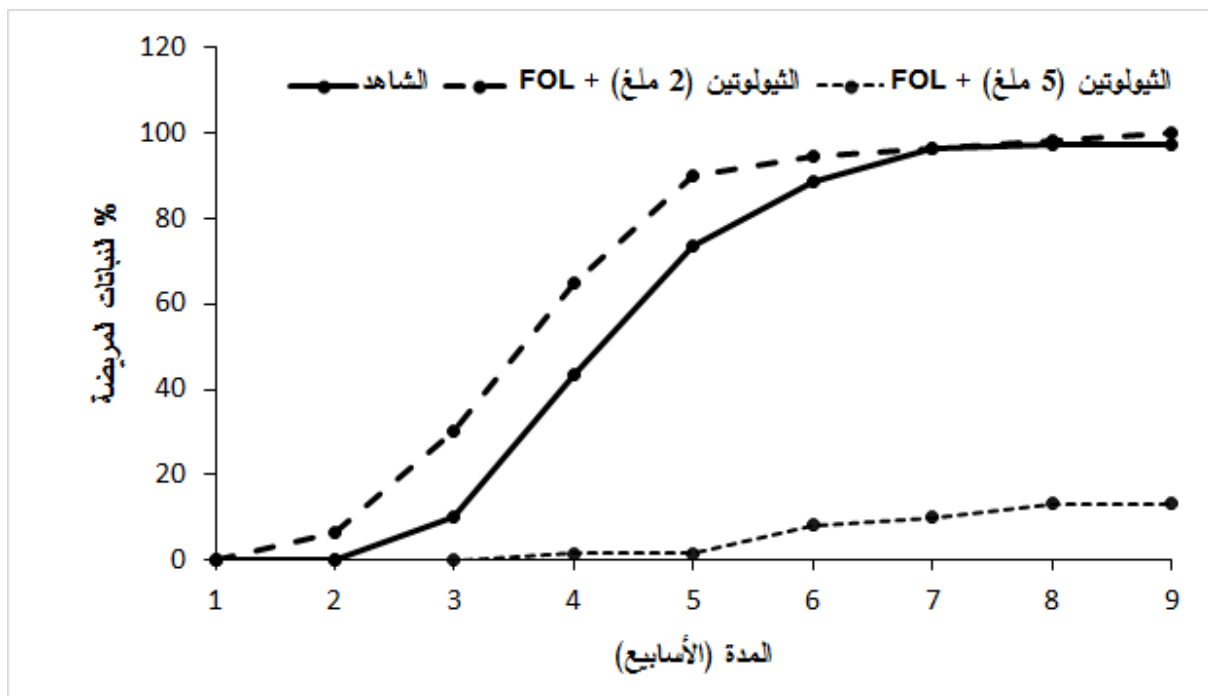


الشكل 5: تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين بتركيز 2 ملغ و 5 ملغ لكل 100 غ تربة جافة على تطور سلالة فطر FOL في تربة رملية.

7. تأثير الثيولوتين على مرض الذبول الوعائي:

تظهر نتائج تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين الذي أضيف بتركيز 2 ملغ أو 5 ملغ لكل 100 غ على تربة جافة على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان في تربة رملية على مستوى الشكل 6. يبدأ ظهور المرض في غياب الثيولوتين (الشاهد) وبوجود الثيولوتين بتركيز 2 ملغ بعد الأسبوع الثاني من الزرع. يتطور المرض في كلتا الحالتين بنسب متقاربة ليصل إلى نسبة 100% في الأسبوع السابع. يبدأ ظهور المرض في وجود الثيولوتين بتركيز 5 ملغ بنسبة طفيفة بعد الأسبوع الرابع من الزرع، ويتطور ليصل إلى نسبة 13% بعد 9 أسابيع من الزرع، حيث كانت نسبة انخفاض المرض مقارنة بالشاهد 84%.

يظهر الشكل 7 أعراض مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان مع عزل سلالة فطر FOL من جزء من ساق الكتان.



الشكل 6: تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين بتركيز 2 ملغ أو 5 مع لكل 100 غ تربة جافة على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان في تربة رميلة.



الشكل 7: أعراض مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان وعزل سلالة فطر FOL من جزء من ساق الكتان.

4- المناقشة (Discussion) :

أظهرت نتائج النشاط التصادي الحيوي للأكتينوبكتيريا (*Saccharothrix algeriensis*) فاعلية قوية ضد فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم لينيني (*Fusarium oxysporum* f. sp. lini). تم الحصول على نتائج مماثلة لأنواع أخرى من جنس الساكاروثريكس (*Saccharothrix*) ضد فطريات ممرضة للنباتات مثل: (*Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, *F. equisiti*, *Ascochyta fabae*, *Penicillium expansum*) [26]. تعرف سلالة الأكتينوبكتيريا SA بقدرتها على إنتاج أنواع كثيرة من المضادات الحيوية التي تنتمي إلى مجموعة ثنائي كبريت البيروول (Dithiolopyrrolones) [19-25]، وأظهرت العديد من الأبحاث أن كائنات دقيقة أخرى منتجة لهذا النوع من المضادات الحيوية مثل (*Streptomyces* و *Xenorhabdus*) تمتلك خصائص تصادفية قوية اتجاه كثير من الفطريات الممرضة للنباتات [28].

بالنظر إلى الفاعلية التصادفية الحيوية القوية لسلالة الأكتينوبكتيريا SA المنتجة لجزيئات عديدة من المضادات الحيوية ثنائي كبريت البيروول (Dithiolopyrrolones)، فقد تم دراسة تأثير إحدى هذه الجزيئات المتمثلة في جزيئة الثيولوتين (Thiolutin) على فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم لينيني FOL في التربة وعلى مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان. أضيف المضاد الحيوي الثيولوتين بتركيزين مختلفين (2 ملغ و 5 ملغ لكل 100 غ تربة جافة) إلى التربة الرملية. أظهرت النتائج انخفاضاً في كثافة فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم لينيني FOL في العينة الشاهد (في غياب المضاد الحيوي) وذلك 7 مرات مقارنة بالكثافة الأولية (الموضوعة اليوم الأول) (الشكل 5). أفاد العديد من الباحثين أن الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في التربة قد تشارك في الحد من تكاثر الفيوزاريوم في التربة بعدة طرق مثل المنافسة على استعمال الكربون (for carbon Competition).

واستعمال القدرة التصادفية الحيوية (antibiosis) [29]. تأثير الكائنات الدقيقة بواسطة القدرة التصادفية الحيوية هي ظاهرة معروفة ويتم ذلك عن طريق إنتاج العديد من مواد الأيض الثانوي الفعالة وقد وضفت هذه الظاهرة من أجل مكافحة البيولوجية ضد كثير من العوامل الممرضة باستعمال كائنات دقيقة متعددة مثل (*Streptomyces* spp. و *Trichoderma* spp.).

أظهرت النتائج أيضاً أن إضافة الثيولوتين بتركيز 5 ملغ/100 غ على تربة جافة، سمح بانخفاض أكبر لكثافة فطر الفيوزاريوم أوكسيسبوروم لينيني FOL في التربة مقارنة بالتركيز 2 ملغ وذلك بحوالي 7 مرات (الشكل 5). وهذا يدل على ضرورة استعمال المضاد الحيوي بتركيز كاف من أجل القضاء على العامل الممرض، كما أن استعمال المضاد الحيوي بتركيز غير كاف يسمح بالقضاء على جزء من عشيرة الفطر، من جهة أخرى بإمكان الجزء المتبقي من خلايا الفطر الحية أن تستعمل الخلايا الميتة لاستعادة نشاطها وتكاثرها من جديد. أشار كثير من الباحثين أن معالجة التربة بتركيز غير كافية وغير مضبوطة من المركبات الكيموحيوية يكون له تأثير ضار، حيث يسمح يتكاثر سريع للعوامل الممرضة [30].

كما أظهرت النتائج أيضاً أن تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين على مرض الذبول الوعائي يكون مرتبطاً بالتركيز، حيث أن إضافة الثيولوتين بتركيز 5 ملغ/100 غ على تربة جافة سمح بانخفاض كبير في نسبة

النباتات المريضة وصل إلى 84% مقارنة بالشاهد (غياب الثيولوتين). في حين سجل تقارب النتائج بعد إضافة الثيولوتين بتركيز 2 ملغ/100 غ على تربة جافة وفي غياب الثيولوتين (الشاهد)، حيث تطور مرض الذبول الوعائي بسرعة ووصل إلى ما يقارب 100% من النباتات المريضة في غضون 7 أسابيع. أوضحت كثير من الدراسات التأثير الفعال لسلاسل الأكتينوبكتيريا والمضادات الحيوية المنتجة من طرفها في مكافحة البيولوجية ضد الفطريات الممرضة للنباتات، حيث سجل (Toumatia et al. [31]) أن استعمال المضاد الحيوي الأكتينوميسين د (Actinomycin D) (المفرز من طرف سلالة IA1 (*Streptomyces* sp.)) المعزولة من تربة صحراوية أدى إلى انخفاض مرض الذبول الوعائي بنسبة 60%.

يتوجب تأكيد النتائج المتحصل عليها في هذا البحث، وذلك بتوسيع مجال الدراسة بإجراء تجارب مكافحة البيولوجية لمرض الذبول الوعائي لنبات الكتان والذي يسببه سلالة فطر FOL باستعمال سلالة الأكتينوبكتيريا SA أو مضادها الحيوي الثيولوتين على مستوى البيوت البلاستيكية والحقول.

5-الخلاصة (Conclusion):

استعمل في هذه الدراسة سلالة من الأكتينوبكتيريا (*Saccharothrix algeriensis*) المعروفة بنشاطها التضادي الحيوي القوي اتجاه الكائنات الدقيقة خصوصا الفطريات الممرضة للنباتات. باستعمال طريقة الخطوط المتقاطعة (Streak method)، وتم الحصول على منطقة تثبيط اتجاه فطر الفوزاريوم أوكسيبوروم ليني (*Fusarium oxysporum* f. sp. Lini) بمقدار 12 ملم.

تمت عملية انتاج المضاد الحيوي الثيولوتين (Thiolutin) من طرف سلالة الأكتينوبكتيريا SA وذلك بعد زرعها في وسط غذائي وتحضيرها لمدة 6 أيام عند درجة حرارة 30°م في جهاز الشيك (Sheaker) (240 دورة في الدقيقة). تم استخلاص الثيولوتين بواسطة المذيب العضوي ثنائي كلور الميثان

(Dichloromethane) وتنقيته باستعمال كروماتوغرافيا الفصل بالطبقة الخينة Thick-layer (chromatography).

درس تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين على كثافة وتطور سلالة فطر FOL في تربة رملية باستعمال تركيزين مختلفين (2 ملغ و 5 ملغ/100 غ على تربة جافة)، حيث أظهرت النتائج كفاءة التركيز 5 ملغ من الثيولوتين وسجل انخفاض في كثافة سلالة فطر FOL بمقدار 15 مرة مقارنة بالشاهد (غياب الثيولوتين).

درس أيضا تأثير المضاد الحيوي الثيولوتين باستعمال تركيزين مختلفين (2 ملغ و 5 ملغ/100 غ على تربة جافة) على مرض الذبول الوعائي لنبات الكتان، حيث أظهرت النتائج أيضا كفاءة التركيز 5 ملغ من الثيولوتين وسجل انخفاض في نسبة النباتات المريضة بنسبة 84% مقارنة بالشاهد (غياب الثيولوتين).

نستخلص من هذا البحث الفاعلية التضادية القوية لسلالة الأكتينوبكتيريا SA ومضادها الحيوي الثيولوتين اتجاه الفطر الفيوزاريوم أوكتيسبوروم لينى FOL المسبب لمرض الذبول الوعائي لنبات الكتان. كما نستخلص أن إضافة هذا المضاد الحيوي بتركيز 5 ملغ/ 100 غ على تربة جافة إلى التربة لمعالجتها قبل زرع البذور يؤدي إلى انخفاض كبير في كثافة الفطر وفي نسبة التّبات المريضة.

6-المراجع (References):

1. Fravel, D. R., Olivan, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157, 493–502.
2. El-Hassan, S. A., & Gowen, S. R. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *J. Phytopathol.* 154, 148–155.
3. Van der Does, H. C. Lievens, B., Claes, L., Houterman, P., M., Cornelissen, B.J., & Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environ. Microbiol.* 10, 1475–1485.
4. Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya, M. S., Deepthi, K., & Rupela, O. (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Prot.* 30, 1070–1078.
5. Alabouvette, C., & Steinberg, C. (2008). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: Eilenberg, J., Hokkanen, H.M.T., Eilenberg, J. (eds.) *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*, pp. 123–144. Springer, Dordrecht (2006) 6. King, S.R.; Davis, A.R.; Liu, W.; Levi, A.: Grafting for disease resistance. *HortScience* 43, 1673–1676.
7. Fravel, D. R., Deahl, K. L., & Stommel, J. R. (2005). Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. *Biol. Control* 34, 165–169.
8. Kemal, S. A., Abang, M., Imtiaz, M., & Nader, A. (2015). Effect of integrated management on *Fusarium* wilt progression and grain yield of chickpea in Syria. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 1551–1560.
9. Huang, X. Q., Chen, L. H., Ran, W., Shen, Q. R., & Yang, X. M. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by themycoparasitism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 741–755.
10. Singh, R., Singh, B. K., Upadhyay, R. S., Rai, B., & Lee, Y. S. (2002). Biological control of *Fusarium* wilt disease of pigeonpea. *Plant Pathol. J.* 18, 279–283.
11. Akrami, M., Golzary, H., & Ahmadzadeh, M. (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2653–2658.
12. Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrhi, A., & Mathieu, F. (2012). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Biol. Control*, 58, 435–455.
13. Yekkour, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Errakhi, R., Mathieu, F., & Lebrhi, A. (2012). Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 427–435.
14. Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., & Zitouni, A. (2015). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J. Basic Microbiol.* 55, 221–228.
15. Igarashi, Y. (2004). Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetologica*, 18, 63–66.

16. Khamna, S., Akira, Y., & Peberdy, J. F. (2009). Lumyong, S.: Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *Int. J. Integr. Biol.* 6, 143–147.
17. Lahdenperä, M. L., Simon, E., & Uoti, J. (1991). Mycostop—a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. In: Beemster, A. B. R., Bollen, G. J., Gerlagh, M., & Ruissen, M. A. (eds.) *Biotic Interactions and Soil-Borne Disease*, pp. 258–263. Elsevier, Amsterdam.
18. Yuan, W.M.; & Crawford, D.L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3119–3128.
19. Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C. Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2010). Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.* 73, 1164–1166.
20. Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2011). New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett.* 318, 41–46.
21. Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., & Lebrihi, A. Lefebvre, G., Seguin, E., Tillequin, F. (2002). Newdithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 55, 696–701.
22. Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2008). Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.* 43, 1244–1252.
23. Merrouche, R., Yekkour, A., Coppel, Y., Bouras, N., Lamari, L., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2019). Effective biosynthesis of benzoyl-pyrroline dithiolopyrrolone antibiotic by cinnamic acid-precursor addition in culture of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Lett Appl Microbiol.* 68, 165–172.
24. Merrouche, R., Yekkour, A., Coppel, Y., Bouras, N., Zitouni, A., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2019). A new dithiolopyrrolone antibiotic triggered by a long fermentation of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 in sorbic acid-amended medium. *Lett in Appl Microbiol.* 69, 294–301.
25. Merrouche, R., Yekkour, A., Coppel, Y., Bouras, N., Lamari, L., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2019). Effective biosynthesis of benzoyl-pyrroline dithiolopyrrolone antibiotic by 2 cinnamic acid-precursor addition in culture of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Lett in Appl Microbiol.* 68, 165–172.
26. Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.* 168, 223–230.
27. Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2005). *Nocardopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.* 156, 984–993.
28. Chen, G., Dunphy, G. B., & Webster, J. M. (1994). Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biol. Control.* 4, 157–162.
29. Getha, K., & Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 303–310.
30. Coutaudier, Y., & Alabouvette, C. (1985). Lutte biologique contre la fusariose de la tomate. Résultats en serre de production. *Agronomie*, 5, 151–156.
31. Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., & Zitouni, A. (2015). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J. Basic Microbiol.* 55, 221–228.