تقدير مستوى هرموني اندول حامض الخليك IAA وحامض الجبريليك GA₃ في خميرة الخبز
العادية الجافة *Saccharomyces cerevisiae*

Estimation levels of Indol acetic acid (IAA) and Gibberellic acid
(GA₃) from dry bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae*

اروى عبد الكريم توفيق

كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

Arwa A Tawfiq

Baghdad University/College of Science for Women

المستخلص

اختبرت في هذه الدراسة قابلية خميرة الخبز العادية الجافة على انتاج منظمات النمو النباتية اندول حامض الخليك IAA وحامض الجبريليك GA₃ بشكليهما الحر والمرتبطة. تم استخدام جهاز المطياف الضوئي لتحديد مستوى هذين الهرمونين. اظهرت النتائج قابلية خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* على انتاج الـ IAA و GA₃ وبتراكيز بلغت 29.86 مايكروغرام / مل و 198 مايكروغرام / مل للـ IAA عند الطولين الموجيين 222 نانوميتر و 280 نانوميتر و 799 مايكروغرام / مل للـ GA₃ عند الطول الموجي 254 نانوميتر.

Abstract

The level of endogenous free, bound and total auxin (Indol-3-acetic acid, IAA) and gibberellic acid (GA₃) were examined in dry bakery yeast. For determination of the levels of these plant growth regulators level, used spectrophotometer. The results show that *Saccharomyces cerevisiae* was produced IAA and GA₃. IAA level was 29.86 µg/ml, 198 µg/ml at 222nm and 280nm wavelengths respectively and GA₃ level was 799 µg/ml at 254nm.

المقدمة

تعمل الهرمونات النباتية التي توجد بتراكيز قليلة على التحكم في نمو وتطور النبات ، كما تسيطر على معظم الفعاليات الحيوية كانقسام الخلايا واستطالتها وتمايزها وعلى تكوين الاعضاء والانبات و السبات وسقوط الاوراق والثمار وغيرها [1] ، ومن هذه الهرمونات الاوكسينات والجبريلينات ، توجد هذه الهرمونات في النباتات الراقية والحزازيات والسرخسيات [2] كذلك تم ملاحظتها في البكتريا [3 و 4] والطحالب والاشنات [5] والفطريات [6, 7, 8].

ان الجبريلينات GA والاكسينات من مركبات الايض الثانوي وتعد من منتجات التكنولوجيا الحيوية المهمة والتي تنتج تجاريا من قبل الفطريات لاغراض الزراعة والبستنة [9]. تتفاوت كمية الاوكسين الحر الموجودة في الاعضاء المختلفة للنبات حسب اطوار النمو والفصول ، ويتناقص المحتوى كلما تقدم النبات بالعمر ، وتوجد اعلى كمية للاوكسين في القمم النامية ، اما الجبريلينات فانها تستكون في جميع اعضاء النبات ، تحتوي البذور النامية على كمية اكبر من الجبريلينات مقارنة بالاعضاء الخضرية ولكن تتناقص كمية الجبريلينات كلما اقتربت البذور من النضج [2]. تم التعرف على 126 نوع من الجبريلينات في النباتات والفطريات والبكتريا [10] حيث يشير هذا المصدر الى اكثر المصادر الطبيعية التي يوجد فيها الـ GA₃ اذ يوضح في جداول وجوده في 128 نوع من النباتات و 7 انواع من الفطريات و 7 انواع من البكتريا . ان بعض هذه الاحياء المجهرية المترافقة مع النبات بإمكانها ان تنتج منظمات النمو مثل الـ IAA و GA₃ والتي بدورها قد تسهم في زيادة وتحسين حاصل هذه النباتات [11] ، وبالامكان زيادة انتاج الـ IAA عند اضافة التريبتوفان الى الوسط الزراعي اذ وجد ان بكتريا *Bacillus subtilis* بإمكانها ان تضاعف انتاج IAA (6.1 – 31.5) مرة عند اضافة L-Tryptofan بتركيز (0.1 – 1) ملغم / لتر الى وسط تنميتها . كما وجد ان الخمائر وبعض الفطريات لها القابلية على تصنيع هذا الهرمون بتراكيز عالية قد تتجاوز ما هو موجود في النبات [12] .

لا توجد بحوث حالية تشير الى انتاج هرموني ال- IAA و GA_3 او كمياتها في خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* ولكن يشار الى ان الخميرة تعد مصدرا طبيعيا للسايتوكاينينات ولها تأثيرات محفزة للنمو في النبات [13] ، لذا تمت هذه الدراسة لتحديد وجود ومستوى هذين الهرمونين فيها لغرض الاستفادة منهما في الاغراض الزراعية والمختبرية بعد تنقيتهما نظرا لرخص ثمن هذه الخميرة وتوفرها بالشكل المجفف في الاسواق.

المواد وطرق العمل

استخدمت خميرة الخبز العادية الجافة المتوفرة في الاسواق المحلية والتي تمثل *Saccharomyces cerevisiae*.

تم استخلاص وتحديد مستوى هرموني IAA و GA_3 حسب الطريقة المتبعة في [5] والمحورة اصلا عن [7] كما هو موضح في المخطط رقم (1) ، اخذ 1 غم من الخميرة الجافة و اضيف الى 60 مل من محلول الاستخلاص المكون من ميثانول : كلوروفورم : هيدروكسيد الامونيوم (2N) بالنسب (12 : 5 : 3) مل على التوالي ، وحفظ مجمدا تحت درجة حرارة -60 م لحين اجراء التحليلات اللاحقة .

اضيف لهذا المزيج 25 مل من الماء المقطر ، وعندها فصل الى طبقتين سفلى مكونة من الكلوروفورم (اهملت لعدم احتوائها على هذين الهرمونين) وعليا تمثل الطور المائي (ماء – ميثانول) اجريت عليها العمليات التالية : عدل الاس الهيدروجيني (pH) الى 2.5 بواسطة اضافة 1N NaOH أو 1N HCl ثم استخلص ثلاث مرات بخلات الايثيل (15 مل) ، في كل مرة تجمع الطبقة العليا التي تمثل خلات الايثيل (تحتوي على IAA و GA_3 بالشكل الحر) ، اما بالنسبة للطبقة المائية السفلى فعدّل pH لها الى 7 واستخلصت ثلاث مرات بخلات الايثيل ، أخذ الطور المائي السفلي وعدّل pH له الى 11 ثم حلل مائيا لمدة ساعة وبدرجة 70 م .

أخذ الطور المائي وعدّل pH له الى 7 واستخلص ثلاث مرات بخلات الايثيل ، أهمل الطور العلوي وأخذ الطور المائي السفلي ، عدّل pH له الى 2.5 واستخلص ثلاث مرات بخلات الايثيل ، أخذ الطور العلوي الذي يمثل خلات الايثيل (يحتوي على IAA و GA_3 بالشكل المرتبط) ، أهمل الطور المائي السفلي .

أخذت طبقة خلات الايثيل الحاوية على الهرمونين بالشكل الحر والحاوية عليهما بالشكل المرتبط وتم تبخيرها لغرض الحصول على راسب يمثل هذه الهرمونات ، اضيف لكل منهما 3 مل ميثانول واجريت عليهما عملية الفحص بجهاز المطياف الضوئي UV-VIS Spectrophotometer لغرض قياس كميتاهما .

تم قياس IAA بالطولين الموجية 222 و 280 نانوميتر اما ال- GA_3 فتم قياسه بالطول الموجي 254 نانوميتر وحسب تركيز منظمي النمو في المستخلص بالرجوع الى المنحني القياسي لاندول حامض الخليك وحامض الجبرليك شكل (1) اجريت هذه التجربة بخمس مكررات وتم تقدير الكمية الكلية لكل هرمون من حاصل جمع كمية الهرمون الحر والمرتبطة .

مخطط (1) : طريقة استخلاص IAA و GA_3 الحر والمرتبط

(b)

(a)

(c)

شكل (1): المنحني القياسي لهرمون
(a) IAA عند الطول الموجي 222 نانوميتر
(b) IAA عند الطول الموجي 280 نانوميتر
(c) GA3 عند الطول الموجي 254 نانوميتر

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج وجود نسب جيدة من منظمي النمو IAA و GA_3 في خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* مما يدل على قابليتها على انتاج هذين الهرمونين وبشكليهما الحر والمرتبطة شكل (2). بلغ تركيز IAA الحر 15.68 و 85.4 مايكروغرام/مل والمرتبطة (16.02، 112.6) مايكروغرام/مل عند الطولين الموجية (222, 280) نانوميتر على التوالي ، اما التركيز الكلي فبلغ 31.7 مايكروغرام/مل عند الطولين الموجية 222 و 280 نانوميتر على التوالي شكل (a , b 2). بالنسبة لتركيز الـ GA_3 كان الحر 382 مايكروغرام/مل والمرتبطة 417 مايكروغرام/مل والكلي 799 مايكروغرام/مل عند الطول الموجي 254 نانوميتر شكل (2 C).

(b) (a)

(c)

شكل (2): تركيز الهرمون مايكروغرام / مل لـ
 IAA (a) عند الطول الموجي 222 نانوميتر
 IAA (b) عند الطول الموجي 280 نانوميتر
 GA₃ (c) عند الطول الموجي 254 نانوميتر

تم قياس كمية اندول حامض الخليك IAA عند الطولين الموجية (222, 280) نانوميتر حيث يعتمد الباحثون على القياس في حدود هذه الاطوال الموجية وقد ذكر ان اعلى قمة امتصاص لهذا الهرمون تكون عند الطول الموجي (222, 282) نانوميتر [14].

لاتوجد دراسات حديثة تشير الى نسب وجود هذه الهرمونات في الخميرة ولكن اشارت احدى المصادر القديمة [15] الى وجود كميات من الاوكسين تطرحها الخميرة في وسط تنميتها (William's medium) وان هذه الكميات الموجودة في الوسط تفوق الكميات التي تم استخلاصها من خلايا الخميرة مباشرة. وان كميات الاوكسين هذه تزداد مع زيادة تركيز السكر في الوسط وتنخفض بزيادة تركيز الببتون وان اعلى نسبة للاوكسين بلغت 1000 وحده اوكسين/مل عند وجود السكر بتركيز 10% ، اما اضافة الببتون فانها ادت الى زيادة معدل تضاعف الخلايا وقلة معدل انتاج الاوكسين اي ان العلاقة عكسية بين تركيز الاوكسين ومعدل تضاعف الخلايا ، وان اعلى معدل لانتاج الاوكسين حدث عندما كان الوسط خالي من الببتون . كما اشارت هذه الدراسة الى ان وجود الاوكسين بتركيز عالية في وسط نمو الخميرة ادى الى تغير شكل وحجم الخلايا من صغيرة الحجم مستديرة الى خلايا كبيرة متطاولة وقد يبلغ قطرها اضعاف حجمها الاصلي [15] .

ان انتاج الاوكسين من قبل خلايا الخميرة يشابه ما لوحظ في كائنات اخرى مثل *Rhizobium* و *Rhizopus* التي تطرح اوكسينات في الاوساط الزرعية لها [15] ، هذا وان بكتريا الرايزوبيوم هي اول المجاميع البكتيرية التي عزيت اليها القابلية على انتاج وطرح الـ IAA الذي بإمكانه ان يحفز النمو والامراضية في النبات [4] ، ان بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من جذور وعقد نبات الـ *Sesbania* لها القابلية على تصنيع الـ IAA وبتركيز تصل الى 30.2 مايكروغرام/مل ، وان هذا التركيز ازداد الى 42 مايكروغرام/مل بوجود التربتوفان في وسط

النمو بتركيز 2.5 - 3 ملغم/مل [16] ووجد في عزلات طبيعية لبكتريا *Azotobacter* و fluorescent *Pseudomonas* المعزولة من الترب المحيطة بجذور النباتات ان انتاج IAA تراوح بين (7.3 - 32.8) ملغم/مل في عزلات الـ *Azotobacter* وبين 41 - 53.2 ملغم/مل في عزلات الـ *Pseudomonas* وهذا كان عند وجود الترتوفان في الوسط بتركيز 5 ملغم/مل [15]. ولوحظ وجود الاوكسين حتى في الترب الصبغة الحاوية على المخلفات النباتية المتحللة وبنسب تراوحت بين (124.4 - 210) مايكروغرام/كغم في الترب الغنية بهذه المخلفات العضوية و (57.9 - 134.3) مايكروغرام/كغم في الترب الفقيرة بالمخلفات العضوية [17].

كما ان بكتريا الـ *Pseudomonas* المعزولة من مخلفات تصنيع الزيتون لها القابلية على تكوين الـ GA_3 وبلغت اقصى كمية لانتاجه 285.06 ملغم/مل بعد 72 ساعة تنمية في الاوساط الزرعية. ويعد انتاج الجبرلين من هذه البكتريا افضل من انتاجه من الفطر *Gibberellafujicuroi* الذي يعطي افضل انتاجية له بعد (-12(18) يوم [18].

ان الفطريات لها القابلية على انتاج منظّمات النمو وقد اشار [19] الى ان جمع العزلات الفطرية من جنس *Fusarium* لها القدرة على انتاج الـ IAA والـ GA_3 ، بينما العزلات التابعة للجناس الاخرى مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و الـ *Rhizopus* و *Emericella* ليس لها القدرة على انتاج الـ IAA ولكنها تستطيع انتاج الجبريلينات. وفي دراسة شملت عدة عزلات من *Fusariumoxysporum* وجد ان انتاجيتها من IAA تراوحت بين 0.11 - 5.79 مايكروغرام/مل وان هذه الانتاجية ازدادت في العزلة الاكفا F2 من 5.79 مايكروغرام/مل الى 19.64 مايكروغرام/مل عند زيادة تركيز السكروز في الوسط الى 4.5 % ، كما ان اضافة مستخلص الخميرة الى الوسط كمصدر نايتروجيني قد ساهم في زيادة تركيز الهرمون الذي بلغ 27.34 مايكروغرام/مل عند تركيز مستخلص الخميرة 0.6 % [8].

تعد الطحالب والاشنات مصدرا جيدا للـ IAA والـ GA_3 وفي دراسة على عدد كبير منها وجد ان طحلب *Homalotheciumsericeum* اعطى اعلى انتاجية لهذين الهرمونين بلغت (33.68, 119.82) مايكروغرام/مل للـ IAA عند الطولين الموجيين (280,222) نانوميتر على التوالي والـ GA_3 بلغ 58977.07 مايكروغرام/مل ، وفي الاشنات كان اعلى مستوى للـ IAA في *Usnea* sp. بلغ (216.01, 494.23) مايكروغرام/مل عند (222, 280) نانوميتر على التوالي والـ GA_3 كان اعلى مستوى له هو 102678.16 في *Pseudeverniafurfuracea* [5].

هذه الدراسة هي الاولى التي تشير الى انتاج هرموني الـ IAA و GA_3 من قبل خميرة الخبز *Saccharomycescereviceiae* ، فيما ذكر سابقا انها مصدر طبيعي للساييتوكاينينات التي تحفز انقسام الخلايا وتوسعها وكذلك تصنيع البروتين والاحماض الامينية والكلوروفيل [20, 21, 22].

المصادر

1. Davis PJ (1995). Plant Hormones: PHysiology, Biochemistry and Molecular Biology, second ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-12.
2. كرشنا مورثي ، هـ. ن . (1987) . مواد النمو النباتية واستعمالاتها في الزراعة. ترجمة محمد ميلود خليفة. معهد الالتقاء العربي بيروت - لبنان.
3. Patten CL, Glick BR (1996). Bacterial biosyntheses of indol-3- acetic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42(3):207-220.
4. Mandal SM, Mondal KC, Dey S, Pati BR (2007). Optimization of cultural and nutritional conditions for Indol-3- Acetic Acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. Isolated from root nodules of Vingamungo (L.) Hepper. Res. J. Microbial., 2:239-246.
5. Ergün N, Topcuoglu SF, Yildiz A (2002). Auxin (Indole-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA_3), Absciscic Acid (ABA) and Cytokinin (Zeatin) Production by Some Species of Mosses and Lichens. Turk J Bot., 26:13-18.

6. Tuomi T, Laakso S, Rosenqvist H (1995). Plant hormones in Fungi and Bacteria from malting barley. J. Inst. Brew. 101:351-357.
7. Ünyayar S, Topcuoğlu F, Ünyayar A (1996). A modified method for extraction and identification of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and zeatin produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME 446. Bulg J Plant Physiol., 22 (3- 4): 105-110.
8. السامرائي ، نجوى شهاب احمد (2004) . استخلاص وتنقية منظم النمو حامض الاندول خليك IAA المنتج من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* ودراصة الظروف المثلى للإنتاج . رسالة ماجستير . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية – جامعة بغداد.
9. Deacon JW (1984). Introduction to modern mycology. In: Wilkinson JF (ed). Blackwell Sci. Publ., Oxford, London, Edinburgh.
10. MacMillan J (2002). Occurrence of gibberellins in vascular plants, Fungus and Bacteria. Plant growth regulators, 20:387-442.
11. Swain MR, Naskar SK, Ray RC (2007). Indol -3- acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) Minisette by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung Microflora. Polish J. of Microbiology. 56(2): 103-110.
12. Yurekli F, Geckil H, Topcuoglu F (2003). The synthesis of indol -3- acetic acid by the industrially important white – rot fungus *Lentinus sajor – caju* under different culture conditions. Mycological Research. 107(3):305-309.
13. Amer SSA (2004). Growth, green pods yield and seeds yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by active dry yeast, salicylic acid and their interaction. J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 29(3): 1407-1422.
14. Bandurski RS, Schulze A (1974). Concentration of indole-3-acetic acid and its ester in *Avena* and *Zea*. Plant Physiology., 54:257-262.
15. Robinson TW , Stier TJB (1941). Formation of Auxin in Yeast Culture. General Physiology., 24: 765-769.
16. Sridevi M, Mallaiah (2008). Production of Indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. Plant Science Research, 1(1): 13-16.
17. Szajdak L, Maryganova V (2007). Occurrence of IAA auxin in some organic soil. Agronomy Research 5(2):175-187.
18. Karakoc S, Aksoz N (2006). Some optimal cultural parameters for Gibberellic acid biosynthesis by *Pseudomonas* sp. Turk J. Biology., 30:81-85.
19. Hasan HAH (2002). Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Rostlinná výroba., 3: 101-106.
20. Castelfranco, PA, Beale SI (1983). Chlorophyll biosynthesis recent advances and areas of current interest. Ann. Rev. Plant Physiol., 34: 241-278.
21. Spencer TFT, Dorothy SM, Smith ARW (1983). Yeast genetics fundamental and applied aspects. pp: 16-18. Springer-Verlag, New York, USA.
22. Fathy, ESL, Farid S (1996). The possibility of using vitamin Bs and yeast to delay senescence and improve growth and yield of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 21(4): 1415-1423.