Indol acetic acid (IAA) production from dry bakery yeast (*Saccharomyces cereviciae*) and its role in improving rooting response of pepper cuttings

أنتاج أندول - حامض الخليك من خميرة الخبز الجافة *Saccharomyces cereviciae* ودراسة تاثيره في تحسين أستجابة التجذير في عقل الفلفل

م.د. خالد علي حسين
كلية العلوم / جامعة كربلاء

م.م. جواد كاظم عبيد الحجيري
مديرية تربية كربلاء / وزارة التربية

الخلاصة :

تمحورت هذه الدراسة حول أختبار قابلية خميرة الخبز الجافة *Saccharomyces cereviciae* على أنتاج أندول حامض الخليك ، وتم تحديد بعض الظروف المثلى للأنتاج مثل فترة و درجة حرارة الحضن والرقم الهيدروجيني لوسط الأنتاج وفحص تأثير Indole acetic acid (IAA) المنتج من قبل الخميرة في أستجابة تجذير عقل الفلفل وبدلالة عدد الجذور العرضية المتكشفة وأطوالها . أظهرت النتائج قابلية خميرة الخبز على أنتاج الـ IAA وقد أمكن الحصول على أعلى أنتاجية للـ IAA بأستعمال فترة حضن 48 ساعة بدرجة حرارة 30م ورقم هيدروجيني 6.5 والتي سببت زيادة في نسبة تجذير عقل الفلفل قدرها 135.84 %) مقارنة بالسيطرة كما سببت انخفاضا في أطوال الجذور بنسبة 56.88% مقارنة بالسيطرة .واعداد الجذور الاعلى وجد عند معاملة العقل بالاوكسين الصناعي .

Abstract:

The present study included investigation of *Saccharomyces cereviciae* ability in Indole acetic acid (IAA) production. The study was also carried out to determine some of the optimal conditions for IAA production from it, and to examine the impact of IAA produced by Saccharomyces cereviciae in rooting response of pepper cuttings in terms of adventitious roots formation and root length. The results revealed that, maximum IAA production was obtained from inoculating at 30 C^o for 48 hrs in medium pH 6.5. IAA produced by dry bread *S.cereviciae* was significantly enhanced the average of root number/cutting to its levels in control treatment and , which caused an increase in the percentage of rooting pepper cuttings (135.84%) compared to control and decreased root length in the percentage 56.88 compared to control. The highest root number/cutting was found in synthetic auxin treatment. It can be concluded that *S.cereviciae* auxin can be used to improve rooting response pepper cuttings easly way and not costly method compared with synthetic hormones.

المقدمة :Introduction

تعد الأحياء المجهرية التي تستعمر جذور النبات في كثير من الحالات مفيدة لنمو وتطور وأنتاجية النبات [1]وتصنيع الهورمونات (أوكسينات ، جبرلينات وسايتوكاينينات) بواسطة مثل هذه الاحياء المجهرية يعتقد بأنه واحد من الاشكال الرئيسة للتداخل ما بين النبات والكائن المجهري وقابلية الانتاج قد وجدت في أنواع مختلفة من البكتريا (الممرضة والمتعايشة وكذلك الحرة غير مشتركة مع النبات) والفطريات و الطحالب والخمائر وقليل من البروتوزوا والنيماتودا [2] وأن الاحياء المجهرية تصنع وتحرر كميات كبيرة من IAA كنواتج ايض ثانوي[3]. وأندول حامض الخليك هو من عائلة الأوكسينات التي تسيطر على كثير من العمليات الفسلجية المهمة مثل أنقسام الخلية وأستطالتها وتمايز الخلايا والأنسجة [4] وتحفيز تكوين الجذور الجانبية والعرضية من التأثيرات الاكثر وضوحاً لهذا الهرمون [5].

أندول حامض الخليك المنتج من قبل البكتريا يعمل باقتران مع الاوكسين النباتي الداخلي لتحفيز توالد الخلايا وأنقسامها ويشجع أخذ المغذيات من الوسط [6] أن البادى الرئسي لتخليق IAA في النباتات والاحياء المجهرية هو الحامض الأميني تربتوفان وأضافته الى وسط النمو ينتج عنه في جميع الحالات انتاج عالي للـ IAA [7] .

أن الأوكسين يحفز أستجابة سريعة في النباتات [8] والأوكسين المايكروبي يلعب دور في تداخل النبات مع الأحياء المجهرية وفي الآونة الأخيرة أزداد دور أندول حامض الخليك المايكروبي عند تداخل النباتات مع الأحياء المجهرية مثل البكتريا[9] والفطريات [10] والخمائر [11] .

IAA يعمل كجزيئة أشارة وعند تداخل النبات مع الأحياء المجهرية له تأثيرات مهمة في نمو النبات وصحته وكذلك يؤثر على عدد الشعيرات الجذرية والجذور الجانبية وقصر في اطوال الجذور ونَسَبْ هذه التغيرات الى تأثير الاوكسين المنتج من قبل البكتريا . الجذور هي الاعضاء الاكثر حساسية والتي تستجيب الى تغيرات مستويات IAA من خلال أستطالة الجذور الأولية وتكوين الجذور العرضية والجذور الجانبية [5] والهرمون المنتج من قبل الخمائر يمكن أن يستخدم كعلاقة مهمة ما بين الخمائر والنبات [12] ، وعموماً هورمونات التجذير الصناعية تستعمل بشكل واسع في التكثير الخضري للعقل الساقية والتي تظهر تغاير في نسب التجذير . لذا كان الهدف الرئسي لهذه الدراسة هو توظيف قدرة خميرة الخبز الجافة . في أنتاج IAA في وسط النمو مع دراسة بعض الظروف المثلى للانتاج من قبل الخميرة ولمعرفة دور IAA المايكروبي في أستجابة تجذير عقل الفلفل وبالتالي تحسين قابلية عقل الفلفل على التجذير بأستخدام طريقة سهله نسبياً وغير مكلفة .

المواد وطرائق العمل Materials and methods :

تجديد الظروف المثلى **لانتاج أندول حامض الخليك** من الخميره S. cereviciae

أستخدمت خميرة الخبز العادية الجافة المتوفرة في الاسواق المحلية Saccharomyces cereviciae

1 - تأثير فترة الحضن في أنتاج أندول حامض الخليك.

لقح وسط Potato dextrose broth المدعم بالحامض الاميني تريبتوفان1mg/ml trytophan بـ 100 مايكروليتر/10 مل من الوسط الزرعي من الخميرة المنشطة وحضنت الأوساط في 35 م° لمدة تراوحت بين (24 و 48 و 96 و 120 و196) ساعة ، لتحديد مدة الحضن المثلى للإنتاج من خلال كمية IAA المنتج .

قدر تركيز إندول حامض الخليك بالطريقة اللونية وذلك بإتباع طريقة [13] حيث أخذ وسط النمو Potato dextrose broth المدعم بتربتوفان وأزيلت الخميرة من الوسط السائل بأستعمال جهاز الطرد المركزي centrifuge (5000 دورة /دقيقة) ثم قدرت كمية الاوكسين في الراشح بأستعمال كاشف سالكاوسكي Salkowski reagent ($FeCl_3$1ml , $HClO_3$ 35m) وقراءت الأمتصاصية عند طول موجي 530nm وحسب تركيز إندول حامض الخليك بأستخدام المنحنى القياسي للأوكسين الذي تم تحضيره بتراكيز بين (5-50) مايكروغرام /مل .

2 - تأثير درجة حرارة الحضن في أنتاج أندول حامض الخليك

تم تنمية خميرة الخبز *Saccharomyces cereviciae* لمدة 48 ساعة على الدرجات الحرارية (25 , 30 ، 35 ، 40 ، 45) م° وذلك لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأوكسين ومن ثم قدر ت كمية IAA في راشح الخميرة .

3 – تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي في أنتاج أندول حامض الخليك.

حضر وسط PD broth ووزع في بيكرات وعدل الرقم الهيروجيني في هذه البيكرات , 6.5 , 7.5 , 8.5) (4, 5.5 بأستخدام 1 N من كل NaOH و HCl وحضنت الأوساط الملقحة بالخميرة بدرجة حرارة مثلى 30 C لمدة يومين ومن ثم قدرت كمية الـ IAA المنتج .

تأثير أندول حامض الخليك في راشح وسط خميرة الخبز في أستجابة تجذير عقل الفلفل .

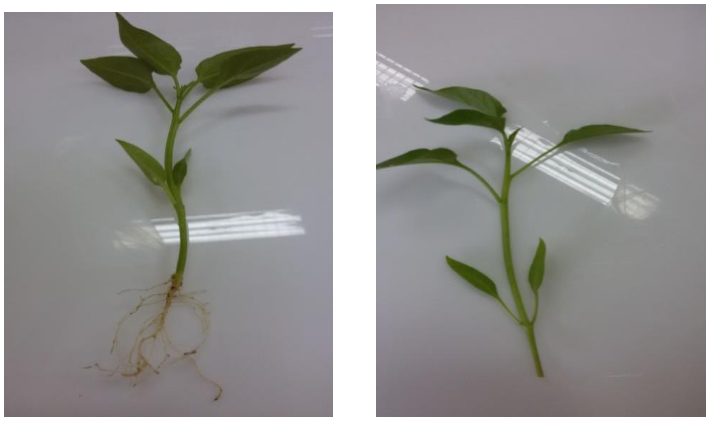
بعد تحديد الظروف المثلى لأنتاج أندول حامض الخليك لكل من فترة ودرجة الحرارة الحضن وارقم الهبدروجيني لوسط الانتاج أختبر تأثيره في تجذير عقل الماش . أستعملت بذور الفلفل الحار من صنف محلي وقد انتخبت البذور الجيدة والمتماثلة مظهرياً لغرض أجراء التجربة . غسلت البذور ونُقعت بماء الحنفية Tap water لمدة ليلة كاملة وزرعت بشكل متجانس في خطوط متوازية على نشارة الخشب المعقم Sterile sawdust كوسط للزراعة ووضعت في غرفة النمو Growth cabinet من نوع Binder KBW Plant Growth Chambers والتي تمتاز بظروف قياسية أضاءة مستمرة وبشدة 1600-1800 لوكس ودرجة حرارة 1±25 ورطوبة نسبية 60-70% . ويضاف الماء بحسب الحاجة لغاية عمر عشرين يوم وأنتخبت البادرات المتماثلة لتهيئة العُقل لإجراءالتجربة صورة 2. كما هيأت العُقل من بادرات متماثلة بعمر عشرين يوم -20 day-old seedlings حسب طريقة [14]التي تمتاز بأحتوائها على بُرعم طرفي صغير Terminal Bud، وزوج من الأوراق الأولية كاملة الأتساع Pair of Fully Expanded Primary Leaves، وسُويقة جنينية فوق الفلق Epicotyl، وسُويقة جنينية تحت الفلق Hypocotyl بطول 3 سم تحت موقع ندب الفلق Cotyledonary Nodes، وذلك بعد إزالة المجموع الجذري صورة 1.

تأثير الـ IAA في راشح وسط خميرة الخبز في أطوال الجذور المتكشفة (ملم).

قيست أطوال الجذور المتكشفة للعقل بأستخدام المسطرة .

التحليل الاحصائي :

حللت البيانات أحصائياً بأستخدام الحاسوب وأعتمدت قيم L.S.D للمقارنة بين متوسطات المعاملات على مستوى أحتمالية 0.05 في جميع التجارب [15].

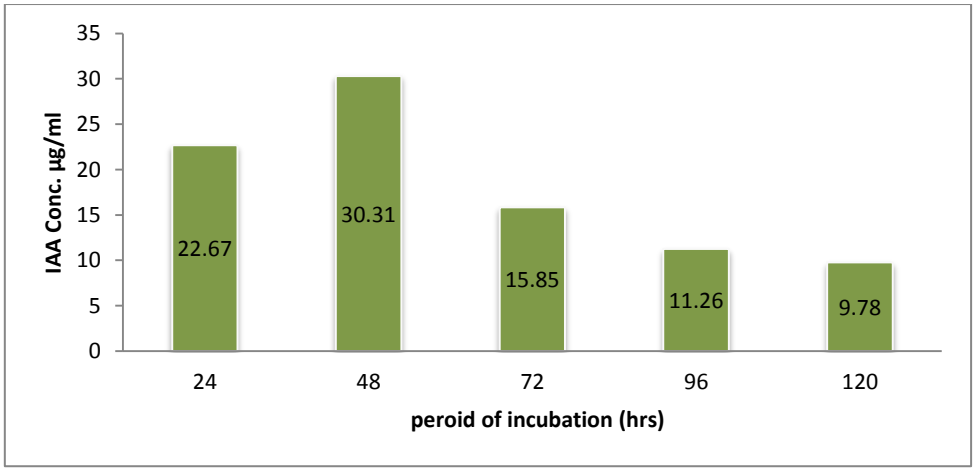


صورة1 :عقل الفلفل المهيئة من البادرات صورة2 : بادرات نبات الفلفل بعمر 20 يوم

النتائج والمناقشة Results and discussion :

1- تاثير مدة الحضن في انتاج اندول حامض الخليك:

تم متابعة إنتاج IAA من قبل خميرة الخبز الجافة في وسط النمو Potato Dextrose broth المدعم بالحامض الأميني (تربتوفان) لمدة خمسة أيام وذلك بسحب نموذج كل 24 ساعة لتقدير IAA المنتج من قبل الخميرة وقد بين الشكل (1) أن إنتاج IAA يبدأ بعد 24 ساعة من الحضن إذ يبلغ إنتاج IAA (22.67) مايكروغرام / مل ثم يرتفع الإنتاج معنوياً ليصل الى أقصاه في اليوم الثاني إذ بلغت كمية IAA فيه (30.31) مايكروغرام . ان انتاج الاوكسين من قبل خلايا الخميرة يشابه مالوحظ في كائنات اخرى مثل Rhizopus و Rhizobium التي تطرح أوكسينات في الاوساط الزرعية لها[16] وأشارت[17] الى قابلية خميرة الخبز الجافة على انتاج IAA . ثم يبدأ بالانخفاض تدريجاً وبفارق احصائي على مستوى أحتمالية 0.05 ليصل الى أدناه في اليوم الخامس بتركيز مقداره (9.78) مايكروغرام/مل لذا أعتمدت فترة الحضن 48 ساعة (اليوم الثاني) في التجارب اللاحقة وأنتاج الاوكسين من قبل الخميرة وصل الى المستوى الأعلى بعد الدخول الخلايا الخميرة في طور الثبوت stationary phase والانتاج مرتبط مع كثافة أعداد الخلايا [18] . والانخفاض في انتاج IAA قد يكون ناشيء من تحرر الانزيمات المحللة لهذا الأوكسين مثل Peroxidase و IAA Oxidase [3] .

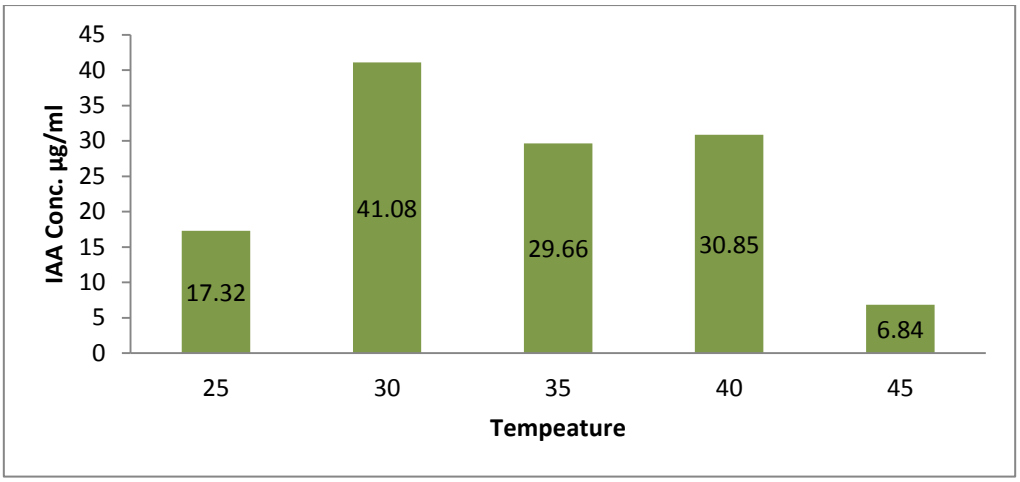


الشكل 1: تأثير فترات الحضن في أنتاج أندول حامض الخليك من خميرة الخبز الجافة *Saccharomyces cereviciae* (L.S.D0.05=3.31)

2- تاثير درجة حرارة الحضن :

تشير النتائج المبينة في الشكل (2) الى أن أعلى إنتاج للـ IAA تحقق بأستعمال درجة الحرارة 30 مئوية إذ بلغ (41.08) مايكروغرام / مل وبعدها حصل أنخفاض في كمية الـ IAA وبشكل معنوي على مستوى معنوية 0.05 ، لذا أعتمدت هذه الدرجة عند الحضن في التجارب اللاحقة .

تباينت الدرجات الحرارية المستخدمة في إنتاج إندول حامض الخليك من الأحياء المجهرية فقد وجد [18] ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الاوكسين من قبل الخمائر هي 28 م°. إن إي تغير في درجة الحرارة المثلى يؤثر على الانزيمات المصنعة لإندول حامض الخليك وبالتالي ينعكس على إنتاج الأوكسين [3].

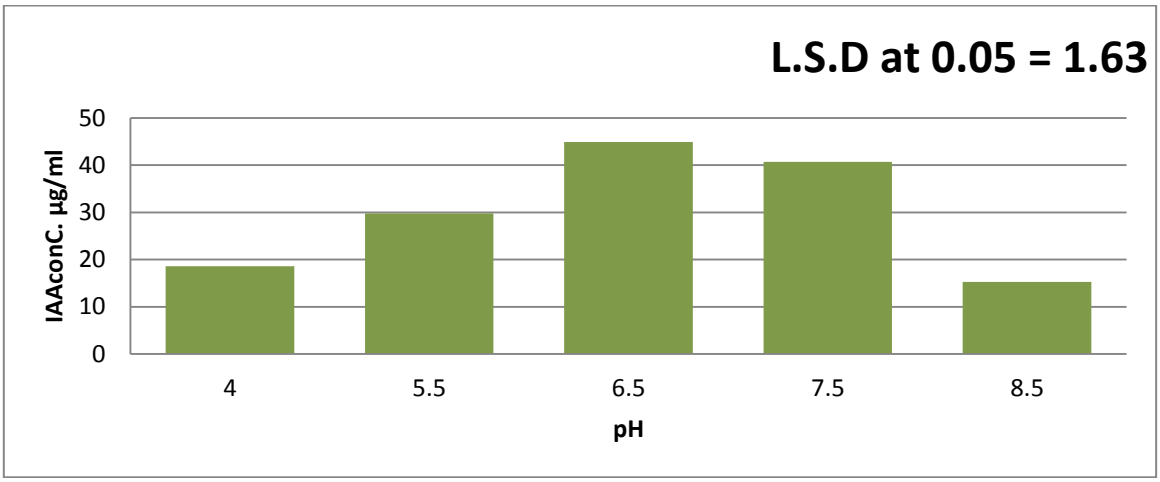


الشكل 2 : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إندول - حامض الخليك من خميرة الخبز الجافة *Saccharomyces cereviciae*
(L.S.D at 0.05 = 5.28)

3 – الرقم الهيدروجيني لوسط الأنتاج :

أستخدمت أرقام هيدروجينة مختلفة في أنتاج IAA من خميرة الخبز الجافة تتراوح بين 8.5 – 4 ولوحظ أن أفضل pH لأنتاج الأوكسين من قبل الخميرة هو 6.5 أذ بلغت كمية الأوكسين المنتج 44.9 مايكرو غرام / مل) . كما توصل [19] الى ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأوكسين من الفطر *Aspergillus niger* بلغ 6 .

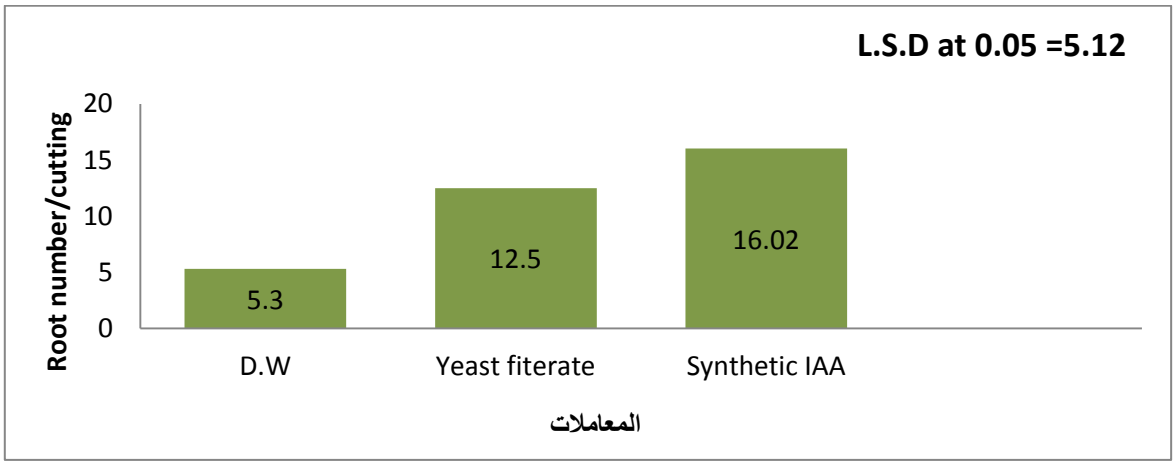
يؤثر الرقم الهيدروجيني في وظيفة الأنظمة الانزيمية وذوبان العديد من المواد الاساسية لحاجة الخميرة لنموها كما أن البيئة الحامضية أو القاعدية العالية تكون غير ملائمة لإنتاج الأوكسين بسبب ضعف قابلية الخميرة على النمو في مثل هذه الظروف[1] .



الشكل 3 : تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إندول - حامض الخليك من خميرة الخبز الجافة

4- تأثير اندول حامض الخليك المنتج من قبل الخميرة في استجابة التجذير لعقل الفلفل :

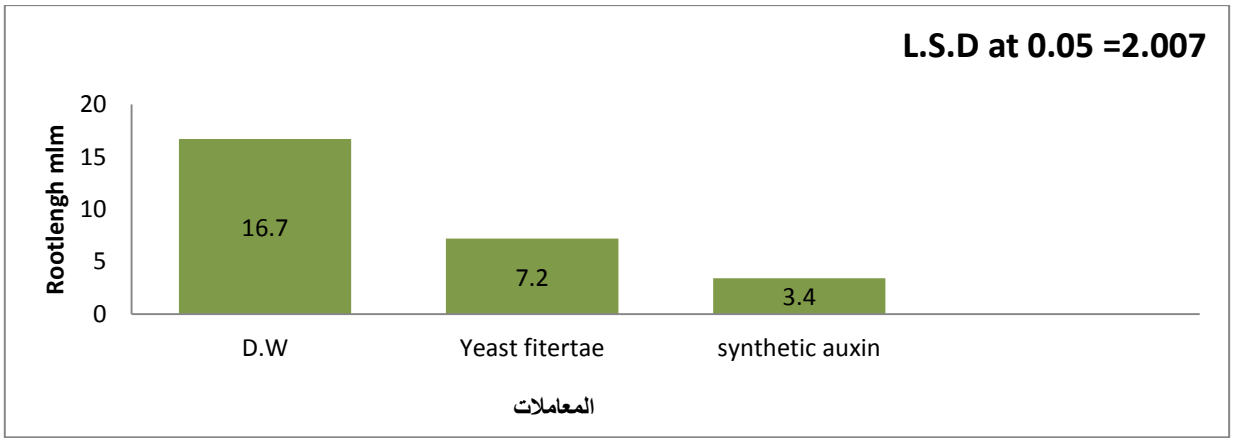
يبين الشكل (4) حصول زيادة معنوية على مستوى أحتمالية 0.05 في أستجابة التجذير لعقل الفلفل وبدلالة عدد الجذور المتكشفة لكل عقلة حيث بلغت (3.5. ، 12.5 ، 17.02) جذر/ عقلة لكل من السيطرة ، الراشح البكتيري ، الاوكسين الصناعي على التوالي . توضح البيانات بأن عدد الجذور العرضية أزداد ضعفين مقارنة بعدد الجذور للعقل المعاملة بالماء المقطر وبنسبة زيادة قدرها 156.47% عند أستعمال راشح الخميرة وتتوافق هذه النتائج مع ما اشار له [20] الذي وجد ان الاوكسين البكتيري المنتج من قبل بكتريا *Bacillus subtilis* قد سبب زيادة معنوي في استجابة تجذير عقل الماش . ويعزى سبب زيادة نسب التجذير في راشح الخميرة الى قدرة الخميرة على أنتاج الاوكسين الذي له أثر فعال في أستجابة التجذير وكثير من الأحياء المجهرية يمكنها أن تتفاعل مع النبات ويمكن أن تنتج هرمونات مشابهة لتلك التي ينتجها النبات كمنظمات للنمو مثل الاوكسينات والجبرلينات والسايتوكاينينات[1] ومن بين هذه الهورمونات والاكثر أهمية في نشوء وتكشف الجذور العرضية هو الأوكسين [21] وتبين نتائج الدراسة أن خميرة الخبز الجافة تنتج منظم النمو IAA وبذلك أثر في نسبة الأستجابة وبالتالي نجاح التجذير حيث أختفت الفوارق الأحصائية على مستوى أحتمالية 0.05 ما بين الأوكسين الصناعي والأوكسين المنتج من قبل الخميرة .



الشكل 4 : تاثير أندول حامض الخليك المنتج من قبل الخميرة في أستجابة التجذير لعقل الفلفل

5 - تأثير اندول حامض الخليك المنتج من قبل الخميرة في أطوال الجذور المتكشفة في العقل

يشير الشكل (5) الى أن معدل أطوال الجذور لعقل السيطرة المعاملة بالماء المقطر 16.7 ملم ومن جانب آخر أن تعريض عقل الفلفل لراشح الخميرة الحاوي على الأوكسين قد سبب في خفض أطوال الجذور الى 7.2 ملم وبنسبة أنخفاض 56.88% مقارنةً عن السيطرة ، أما المعاملة بالأوكسين الصناعي فقد خفضت أطوال الجذور الى (3.4) ملم وبنسبة أنخفاض 79.64% ، 52.77% عن كل من السيطرة والأوكسين المايكروبي على التوالي. اكد [22] ان التراكيز الواطئة من الاوكسين تسبب زيادة اعداد واطوال الجذور المكتشفة في عقل *Pongamia pinnata* لكن التراكيز العالية منه سببت زيادة اعداد الجذور وانخفاض اطوالها .



الشكل 5 : تاثير أندول حامض الخليك المنتج من قبل الخميرة في أطوال الجذور المتكشفة في عقل الفلفل

المصادر:

1- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2016). Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cite this article as Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016. Downloaded from http://cshperspectives.cshlp.org/ on April 4, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

2- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. Nat. Rev. Microbiol., 10: 828–840.

3- Khamna, S., Yokota, A.; Peberdy, J. F. and Lumyong, S.(2010). Indole-3- acetic acid production by *Streptomyces sp.* isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsia. J. Bio.Sci.,4: 23-32.

4- Scarpella, E., Barkoulas, M. and Tsiantis, M. (2010). Control of leaf and vein development by auxin. Cold Spring Harb Perspect Biol., 2: 1511 -1523.

5- Srivastava,H.S. (2012). Plant Physiology and Biochemistry. Rastogi Publications. India.

6- Leveau, J.H.J.and Lindow, S.E. (2005). Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by Pseudomonas putida strain 1290. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2365- 2371.

7- Rifat, H., Safdar, A., Ummay, A., Rabia K. and Iftikhar, A. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann. Microbiol, 60: 579-598.

8- Agamy, R., Hashem, M. and Alamri. S. (2013). Effect of soil amendment with yeasts as bio-fertilizers on the growth and productivity of sugar beet. African Journal of Agricultural Research, 8: 46–56.

9- Radhakrishnan, R., Shim, K.B., Lee, B.W., Hwang, C.D. and Pae, S.B. (2013) IAA-producing Penicillium sp. NICS01 triggers plant growth and suppresses Fusarium sp.-induced oxidative stress in sesame (*Sesamum indicum* L.). J. Microbiol. Biotechnol., 23: 856–863

10- Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M. and Kang, S.M.(2012) .Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules, 17: 10754–10773.

11- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res., 163: 173–181.

12- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W. and Kawasaki, H.(2014) .Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. World J. Microbiol. Biotechnol., 30: 1785–1796.

13- Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal Microbiolgy, 47: 793- 800.

14- Hess, C.E. (1961). The mung bean bioassay for detection of root promoting substances. Plant Physiol.,36(l):suppl. 21

15- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. and Dickie, D.A. (1997). Principles and Procedures of Statistics-a Biometric Approach. 3rd edition. McGraw-Hill Publishing Company. Toronto.

16- Sun, P-F., Fang, W-T., Shin, L-Y., Wei, J-Y. and Fu, S-F. (2014) Indole-3-Acetic AcidProducing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L.. PLoS ONE, 9(12),1-22

17- توفيق، أروى عبد الكريم.(2010). تقدير مستوى هورموني اندول حامض الخليك وحامض الجبريلين في خميرة الخبز العادية الجافة. مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية. المجلد الرابع - العدد الثاني

18- Rao, R.P., Hunter, A., Kashpur, O. and Normanly, J. (2010). Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in Saccharomyces cerevisiae triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. Genetics, 185: 211–220.

19- Bilkay, I.S., Karakoc, S. and Aksoz, N.(2010) . Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. Turk. J. Biol., 34: 313-318.

20- Hussein , K. A ., Kadhum, N.H. and Yasser, Y.K. (2016). The role of bacteria *Bacillus subtilis* in improving rooting response of Mung bean (*Vigna ratiata*) cuttings. (under publ.)

21-Gaudin, V., Vrain, T., and Jouanin, L. (1994). Bacterial genes modifyinghormonal balances in plants. Plant Physiol. Biochem., 32.

22- Kesari, V., Krishnamachari, A. and Rangan, L. (2008). Effect of auxins on adventitious rooting from stem cuttings of candidate plus tree *Pongamia pinnata* (L.), a potential biodiesel plant. Ann. Appl. Biol., 152:357– 404.