

استخلاص وتنقية منظم النمو حامض الاندول خليك المنتج من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

عصام فاضل الجميلي* نجوى شهاب أحمد* علي عبيس عبد الشمري*

تاريخ قبول النشر 2007/11/7

الخلاصة

تم تنقية منظم النمو (IAA) المنتج من العزلة *F. oxysporum* (F2) باستخدام عدة تقنيات شملت الاستخلاص باستعمال خلاص الاثيل وكروماتوغرافيا عمود الفصل باستعمال هلام السايكا وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .PTLC

تم التأكد من نقاوة منظم النمو (IAA) المنتج من العزلة *F. oxysporum* (F2) باختبار الامتصاصية على مدى من الطول الموجي (200 – 300) نانوميتر وقد اظهر اعلى امتصاصية عند الطول الموجي 229 نانوميتر وكذلك استخدمت كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) في فحص النقاوة وقد اوضحت النتائج ظهور قمة واحدة عند الدققة 3.882.

المقدمة

استخدام تقنية كروماتوغرافيا عمود الفصل باستعمال المبادل الايوني-DEAE Cellulose(diethylaminoethylcellulose) في تنقية حامض الاندول خليك ، وبعدها مرر المستخلص المنقى جزئيا على عمود Sephadex LH-20 باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي. اشار Cohen وجماعته [11] الى تنقية منظم النمو IAA باستخدام تقنية Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) بعد استخلاصه بخلات الاثيل اذ تم الحصول على نقاوة عالية بالمقارنة مع منظم النمو IAA القياسي.

هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص تنقية منظم النمو حامض الاندول الخليك (IAA) المنتج من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* باستخدام بعض التقنيات الحديثة من الكروماتوغرافيا عمود الفصل و PTLC .

المواد وطرائق العمل

تم انتاج حامض الاندول خليك من العزلة المحلية *F.oxysporum* F2 باستخدام الوسط الزراعي المكون من السكر بنسبة 4.5% ومستخلص الخميرة بنسبة 0.6% و 0.3 غرام من فوسفات احادي البوتاسيوم KH_2PO_4 و 0.05 غرام كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ و تم تلقيح الوسط بـ 10^6 بوغ / مليلتر عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 8.5 بعد حضن لمدة 10 ايام في الظلام وفي درجة حرارة 28 م بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة / دقيقة .

يعد حامض الاندول خليك من منظمات النمو الطبيعية التي تصنع من قبل النبات [1]، يتالف من حلقة الاندول الاروماتية مع سلسلة جانبية من حامض الخليك ، وهو من المركبات غير ثابتة التي تتأكسد ضوئيا وانزيميا ولها القابلية على الارتباط مع مركبات عضوية مكونة مركبات الاوكسين المرتبط الذي يحمي نفسه من الهدم بالاكسدة الضوئية والانزيمية [2].

أن اول من عزل حامض الاندول خليك IAA من النباتات هو Kogi وآخرون [3] ، كما استخدم Tillberg [4] الكحول الميثيلي البارد في استخلاص IAA من بذور نبات الحنطة والباقلان، واستخدما Kingman and Moore [5] الكحول الميثيلي البارد في استخلاص IAA من الفطريات ، بينما اشار Chen وجماعته [6] الى استعمال كحول الايزوبروبانول البارد في استخلاص IAA من انسجة نبات الشوفان . استعمال خلاص الاثيل البارد في استخلاص IAA من بويضات نبات القطن بعمر ثمانية ايام وتم الحصول على منظم النمو IAA من مرحلة الغسيل الاولى بخلات الاثيل بعد سحق البويضات بالهاون [7 و 8].

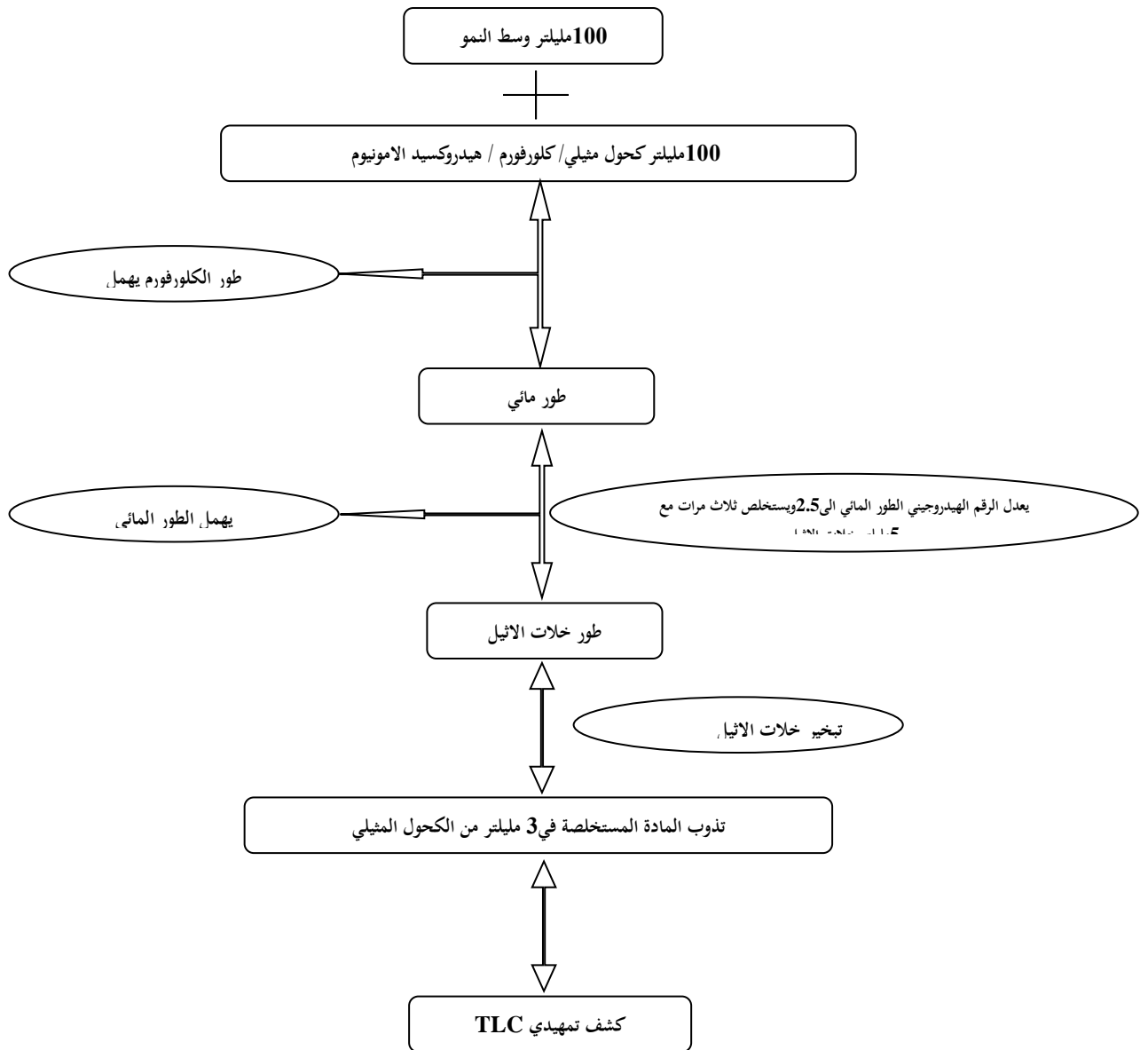
استعمل Uedo and Banduski [9] كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G10 ، في تنقية حامض الاندول خليك وبعدها تم الكشف عن القمة الحاوية على IAA باستعمال كاشف سالوسكي ، اما الكشف التاكيدي عن المستخلص فقد استخدمت تقنية (Thin Layer Chromatography (TLC .

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا- جامعة بغداد- بغداد – العراق
-التحري عن قابلية انتاج حامض الاندول خليك

استخلاص حامض الاندول خليك الحر (Free Indole acetic acid):- تم الاستخلاص وفق الطريقة الموصوفة من قبل Ergun وجماعته [13] وذلك بتلقيح 50 مليلتر من الوسط الانتاجي المنتخب السائل بعالق الكونيدي وبتركيز 1×10^6 بوغ /مليلتر وحضنت بدرجة حرارة 28م لمدة 10 ايام في حاضنة هزازة في الظلام لمنع اكسدة حامض الاندول خليك IAA (مخطط 1).

تم التحري عن انتاج منظم النمو IAA بالتقدير الكمي وبالطريقة اللونية باستخدام كاشف سالكوسكي (حضر الكاشف وفق طريقة Gordon and Weber [11]) ، أذ أخذ 1 مليلتر من الوسط الزراعي السائل بعد ازالة الخبوط الفطرية منه بالترشيح وأضيف لها 2 مليلتر من الكاشف بعدها ترك المزيج 30 دقيقة وقرئت الامتصاصية باستخدام جهاز الطيف الضوئي على طول موجي 530 نانوميتر وعمل مكررين لكل عزله.

- محلول كاشف إيهمان Ehmann's reagent
حضر الكاشف وفقاً لطريقة Ehmann [12]

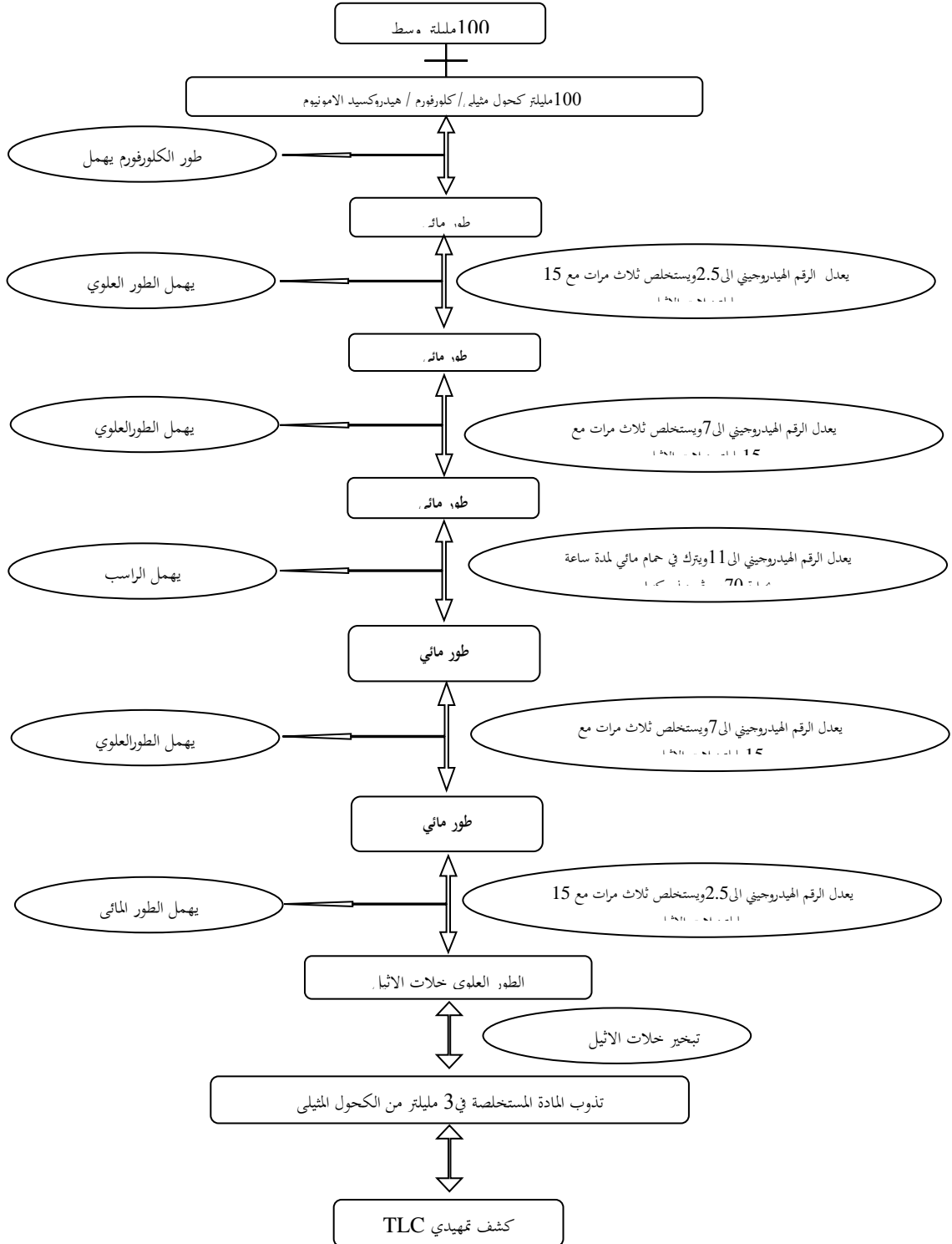


مخطط (1): خطوات استخلاص منظم النمو الحر

وبتركيز $10^6 \times 1$ بوغ /مليتر وحضنت بدرجة حرارة 28م لمدة 10 ايام في حاضنة هزازة في الظلام وذلك لمنع اكسدة منظم النمو (IAA) (المخطط 2).

استخلاص حامض الاندول خليك المرتبط Bound Indole acetic acid :-

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Unyayar وجماعته [14] ، وذلك بتلقيح الوسط الانتاجي المنتخب السائل بعالق الكونيدي



مخطط (2) خطوات استخلاص منظم النمو المرتبط

اتبعت طريقة Ahmed وجماعته [17] باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC باستعمال الواح من الالمنيوم مطلية بطبقة من مادة Silica gel نوع G بأبعاد (20 × 20) سم وسمك (0.25) ملم المجهزة من قبل شركة Fluka ، واستخدم محلول الفصل المتكون من (حامض الفورميك :كلوروفورم : خلات الاثيل) بنسبة (10 : 35 : 55) على التوالي .

2- التشخيص الطيفي بطريقة الفحص بالأشعة فوق البنفسجية

Ultraviolet spectroscopy

تم الفحص حسب ما ورد في Powell [16] و Bandurs and Schulze [10] أذ تم قياس طيف امتصاص منظم النمو (IAA) بالأشعة فوق البنفسجية ضمن مدى طول موجي (300 – 200) نانوميتر بأستعمال جهاز UV-visible spectrophotometer .

3- التشخيص بأستعمال جهاز كروماتوغرافيا

السائل عالي الكفاءة HPLC

High – Performance Liquid Chromatography

تم تشخيص المركب على وفق ما ورد في

Chen وجماعته [6] فقد تم الكشف عن منظم النمو IAA في النموذج المستخلص حسب المخطط (1و2) وفق الظروف الآتية :-

Reversed phase C-18	1- نوع العمود Column
150 × 46 mm/ d	2- ابعاد العمود
1 m/ min	3- معدل الجريان Flow rate
UV 254 nm	4- الطول الموجي Wave length
methanol	5- الطور المتحرك Mobile phase
تم تعينه حسب النتيجة المستحصل عليها	6- وقت الظهور Rotation time

النتائج والمناقشة

تم التعرف على قابليه 13 عزلة فطرية عائدة للجنس الـ *Fusarium spp.* على انتاج منظم النمو (IAA) من خلال استعمال الكاشف اللوني سالكوسكي والذي يعد من الكواشف اللونية الأكثر استخداما في الكشف عن منظم النمو (IAA)، إذ اشار Percival و Bandurski [18] الى انه بالإمكان الكشف عن كميات تقدر بحوالي مايكروغرام واحد من منظم النمو باستعمال هذا الكاشف ، وبيين الجدول (1) قدرة جميع العزلات قيد الدراسة على انتاج منظم النمو (IAA) وهذا يتفق مع ما ذكره Hasan [19] بان جميع العزلات الفطرية العائدة للجنس *Fusarium* لها القدرة على انتاج منظم النمو (IAA) والجبرلينات (GA) ، وكذلك لوحظ بان العزلات التابعة للجنس الاخرى مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Rhizopus* و *Emricella* ليس لها

الكشف التمهيدي عن حامض الاندول خليك Indole (acetic acid) : باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

اتبعت طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC الموصوفة من قبل Maor وجماعته [15] باستعمال الواح من الالمنيوم مطلية بطبقة من مادة هلام السليكا Silica gel نوع G المجهزة من قبل شركة Fluka ، وباستخدام محلول الفصل المتكون من (ماء :كحول مثيلي : كلوروفورم) بنسبة (1 : 15 : 84) على التوالي . فحصت البقع بالأشعة فوق البنفسجية وبعدها تم الكشف عنها وذلك برش اللواح بكاشف ايهمان [12] وتم تحديد مواقع البقع المفصلة .

تقنية منظم النمو حامض الاندول خليك Indole (acetic acid)

1- كروماتوغرافيا العمود بأستخدام هلام السليكا Silica gel :-

حضر هلام السليكا Silica gel (270-300 mesh) بالطريقة الموصوفة من قبل Powell [16]. تمت تعبئة عمود الفصل بهلام السليكا بعد ان تم مزجه بالكحول الايثيلي لتصبح ابعاد العمود (15×2.5 سم) بعدها اضيف المستخلص الناتج من خطوة الاستخلاص الى عمود الفصل ثم اضيف محلول الفصل للعمود والمكون من حامض الفورميك : كلوروفورم : خلات الاثيل بنسبة (10 : 35 : 55) على التوالي وبسرعة جريان 25 مليلتر / ساعة، جمعت اجزاء الفصل بواقع 2 مليلتر / جزء ، تركت الانابيب لتجف ، ثم أذبيت محتويات كل انبوب بـ 2 مليلتر من الكحول الايثيلي ليتم قراءة تركيز IAA في الاجزاء المفصلة بقياس الامتصاصية على طول موجي 225 و بالطريقة اللونية (كاشف سالكوسكي) على طول موجي 530 نانوميتر ثم جمعت الانابيب الحاوية على اعلى تركيز وركزت الى اقل حجم ممكن.

2- استخدام تقنية PTLC Preparative Thin Layer Chromatography

اتبعت هذه الطريقة على وفق ما ذكره Choen وجماعته [7] وذلك لتقنية اكبر كمية ممكن منظم النمو، أذ استعمل صفائح زجاجية بابعاد 20 × 20 سم و المغطاة بالسليكا بسمك (1) ملم ومن نوع (254 60F) واستعمل محلول الفصل المؤلف من (ماء :كحول مثيلي : كلوروفورم) بنسبة (1 : 15 : 84) على التوالي .

الكشف التأكيدي لمنظم النمو

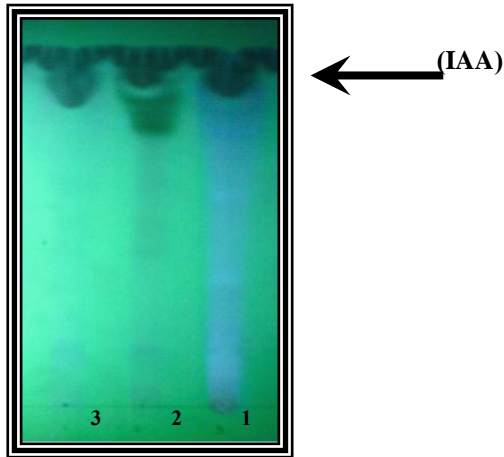
1- استخدام تقنية TLC Thin Layer Chromatography

القدرة على انتاج منظم النمو (IAA) ولكنها تنتج الجبرلينات [20].

جدول (1) قابلية العزلات الفطرية على انتاج منظم النمو

رمز العزلة	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
نتيجة الاختبار	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ ايجابية الكشف



الشكل (1) الكشف التمهيدي لمنظم النمو من الخطوة الاولى من عملية استخلاص منظم النمو الحر (IAA) والمرتبطة (IAA) باستخدام محلول الفصل (ماء : كحول مثيلي : كلوروفورم بنسبة 1:15:84). (1)-المركب القياسي، (2)- منظم النمو الحر، (3)- منظم النمو المرتبط.

تم جمع ناتج استخلاص منظم النمو الحر (IAA) ومنظم النمو المرتبط (IAA) والذي يدعى منظم النمو الكلي وفق ما ذكره [27] ومرر خلال مراحل التنقية اللاحقة.

إذ مرر المستخلص على عمود الفصل هلام السليكا (Silica gel (270-300 mesh)، تم الحصول على (8) أنابيب تحتوي على تركيز عالي لمنظم النمو والتي كانت محددة بين الأنابيب (13-20) والتي تم الكشف عنها بقياس الامتصاصية لجميع الاجزاء المفصولة على جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 225 نانومتر و530 نانومتر كما في الشكل (2) ثم جمعت هذه الاجزاء وركزت ليتم بعدها اجراء تقنية PTLC. جاءت هذه النتائج

متفق مع ما اشار اليه Piskornik و [28] Bandarski الى استخدام كرموتوغرافيا عمود الفصل باستخدام هلام السليكا خطوة من خطوات تنقية منظم النمو (IAA) من بذور الحنطة إذ ظهرت عدة قيم وكانت القيمة الاولى حاوية على (IAA) بعد الكشف عنها بطريقة كاشف سالكاوسكي عند الطول الموجي 530 نانومتر. كما اشار Powell [16] الى استخدام كرموتوغرافيا عمود الفصل باستخدام هلام السليكا في تنقية منظم النمو إذ ظهرت اربع قمم احدها حاوية على (IAA) و استخدم كاشف

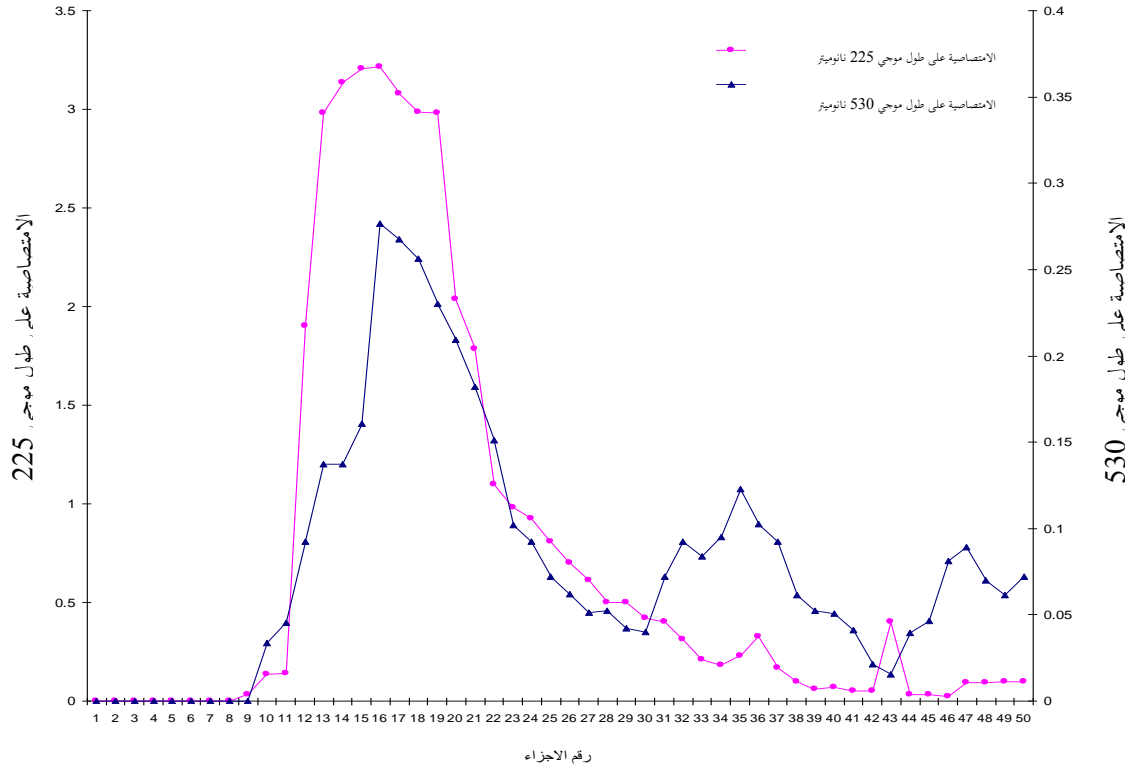
تم استخلاص منظم النمو (IAA) من الوسط الزرعي الفطري المنتحب بواسطة عدة خطوات تمثلت بأضافة خلات الاثيل Ethyl acetate الى الوسط الزرعي، اذ تم الحصول على المستخلص الخام والذي يمثل الخطوة الاولى للاستخلاص والتي تليها خطوات التنقية اللاحقة للحصول على المنظم بصورته النقية.

ان طريقة استخلاص منظم النمو (IAA) الحر بأستعمال خلات الاثيل قد استخدمت من قبل اغلب الباحثين ومن مصادر مختلفة، فأستعمل Guinn وجماعته [21] خلات الاثيل في استخلاص (IAA) من نبات القطن واوراق شجرة التوت وفاكهة العنب و اشار Kingman and Moore [22] الى استعمال خلات الاثيل لاستخلاص (IAA) من طحلب *Ascophyllum nodosum* كما وأستعمل خلات الاثيل في استخلاص (IAA) من بكتريا *Pseudomonas savastoni* [23].

تم أستخلاص منظم النمو (IAA) المرتبط بعدة مراحل والتي تضمنت رفع الرقم الهيدروجيني الى 7 لغرض تحلل (IAA) المرتبط بالاستر (IAA esters-) عند درجة حرارة الغرفة، وبعدها رفع الرقم الهيدروجيني الى 11 في درجة حرارة 70 م لغرض تحلل منظم النمو (IAA) المرتبط بمجموعة الامين لحامض اميني معين وتلتها خطوة خفض الرقم الهيدروجيني الى 2.5 لغرض الحصول على مستخلص حاوي على (IAA) المرتبط (24 و 25)، وتم الكشف التمهيدي عن منظم النمو (IAA) الحر و المرتبط باستعمال تقنية TLC اذ وجد أن المستخلص الخام المستحصل عليه من خطوات الاستخلاص لكل من (IAA) الحر و (IAA) المرتبط يحوي على منظم النمو (IAA) وبالمسافة النسبية للهجرة (R_f) 0.86 و 0.85 على التوالي بالمقارنة مع المسافة النسبية للهجرة (R_f) للمركب القياسي لمنظم النمو (IAA) و البالغة 0.86 الشكل (1) وهذا يتفق مع ما ذكره Robinson وجماعته [26] من خلال مطابقة R_f منظم النمو المستخلص مع R_f المركب القياسي اثناء المقارنة كما ويحتوي المستخلص على مركبات اخرى غير منظم النمو (IAA) كما في الشكل ادناه والتي تم التخلص منها في خطوات التنقية اللاحقة.

Gas (IAA) وأشار الى كفاءة تقنية
Chromatography في تنقية منظم النمو (IAA) من
نبات الذرة.

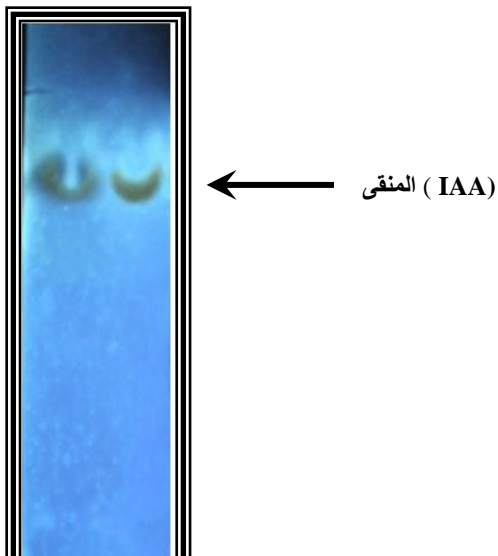
سالكاوسكي للكشف عن القمة الحاوية على (IAA)
ثم تلتها خطوات الكشف عن المنظم بواسطة تقنية
Gas Chromatography والكشف الطيفي كخطوة
اخيرة من خطوات الكشف عن نقاوة منظم النمو



الشكل (2): قيم الامتصاصية للاجزاء المفصولة من عمود هلام السليكا لتنقية منظم النمو (IAA) المستخلص من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

تعد تقنية PTLC من التقنيات الواسعة
الاستعمال في مجال تنقية العديد من المركبات من
المستخلصات الخام ، اذ تم تنقية الاجزاء المتحصل
عليها من عمود الفصل باستخدام تقنية PTLC وتم
الحصول على منظم نمو بنقاوة عالية بالمقارنة مع
المركب القياسي كما في الشكل (3) وهذا يطابق مع
ما حصل عليه [24] عندما استخدم تقنية PTLC في
تنقية منظم النمو (IAA) وحصل على نقاوة عالية
من (IAA) بعد قراءة امتصاصية المركب الناتج من
هذه المرحلة على الطول الموجي 225 نانوميتر بعد
المقارنة مع منظم النمو (IAA) القياسي.

وكما اشار Maor وجماعته [15] الى
استعمال PTLC في تنقية منظم النمو (IAA) بعد
الحصول على المستخلص الخام باستعمال خلات
الاثيل ethyl acetate اذ تم الحصول على نقاوة عالية
من منظم النمو (IAA) بعد الكشف عنها بجهاز
كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC .



الشكل (3) منظم النمو المنقى بخطوة PTLC باستخدام محلول الفصل (ماء :كحول مثيلي : كلوروفورم) بنسبة (1 : 15 : 84).(1-المركب القياسي ،2-الاجزاء المركزة للمنظم المنقى).

بعد الحصول على منظم النمو من خطوات التنقية والتي شملت استخدام هلام السلكا في عمود الفصل واستخدام تقنية PTLC تم التأكد من نقاوة منظم النمو وبشكل نهائي من خلال استعمال تقنية TLC اذ تم الحصول على منظم النمو بنقاوة عالية كما في الشكل (4) مما يشير الى كفاءة عمود الفصل باستعمال هلام السليكا وتقنية PTLC في تقنية المركب [15 و 16] ثم تم التأكد ايضا من نقاوة المركب باستعمال الكشوفات النوعية.

شكل (4) الكشف التأكيدي لمنظم النمو باستعمال تقنية TLC باستخدام محلول الفصل محلول (حامض الفورميك :كلوروفورم : خلات الاثيل) بنسبة (10 : 35 : 55) (1-المركب القياسي ،2- المنظم المنقى)

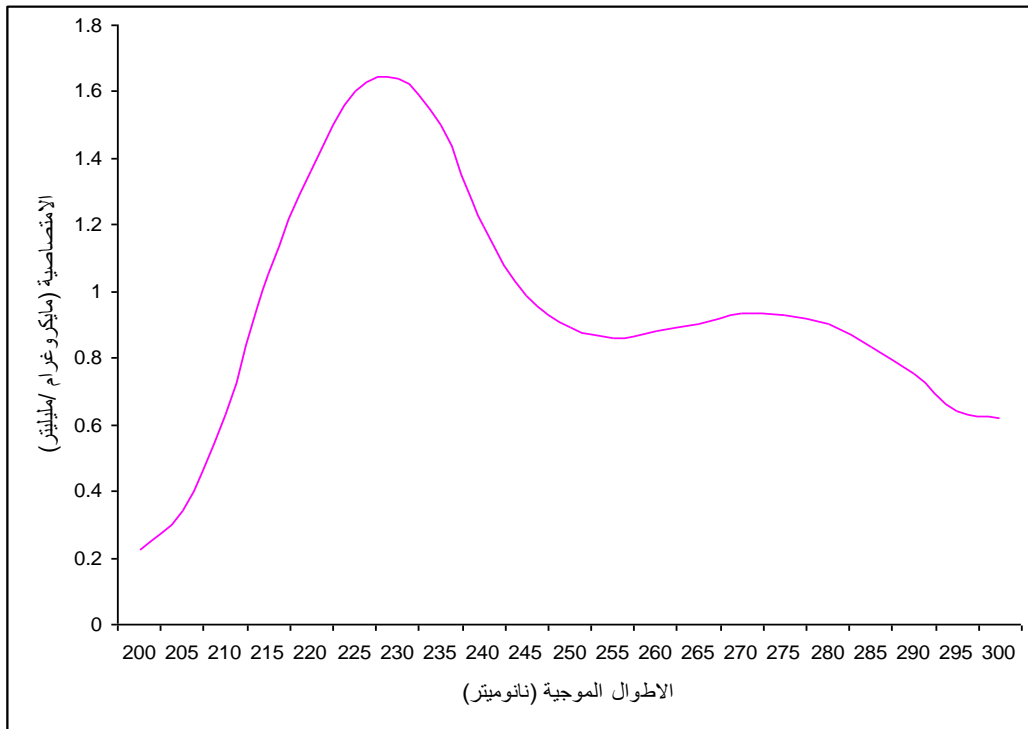
تم قياس طيف امتصاص منظم النمو للاشعة فوق البنفسجية ضمن مدى من الطول الموجي (200- 300) نانوميتر للنماذج التي تم الحصول عليها من خطوات التنقية اذ يبين الشكل (5) اعلى امتصاصية لمنظم النمو (IAA) المنقى كانت عند الطول الموجي 229 نانوميتر وهو مقارب وبشكل كبير لامتصاصية منظم النمو القياسي و التي كانت اعلى امتصاصية له عند الطول الموجي 226 نانوميتر كما في الشكل (6) وهو ما يعطي اشارة الى ان منظم النمو على درجة عالية من النقاوة ومما يشير الى كفاءة طرق الاستخلاص والتنقية المستخدمة في هذه الدراسة.

وتعد هذه الطريقة من الطرائق الكمية والتي تستخدم لتحديد نقاوة المركب واذ يحدد المدى من (200-350) نانوميتر وكان اعلى قمة امتصاص (IAA) عند الطول الموجي 282 نانوميتر . وعند تحديد الكمي للـ (IAA) وجد بان اعلى امتصاصية للمنظم كان عند طول موجي 225 نانوميتر [7 و

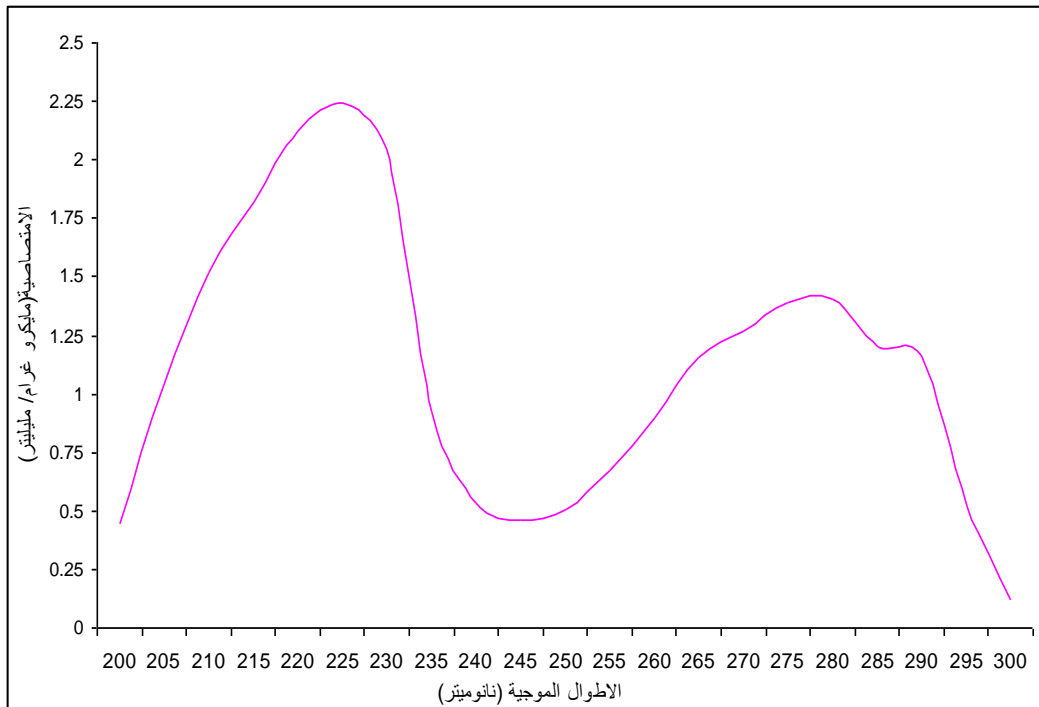
[10



← (IAA) المنقى



شكل (5) قياس طيف امتصاص (IAA) المنتج من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2) للاشعة فوق البنفسجية ضمن مدى من الطول الموجي (300 -200) نانومتر



شكل (6) : قياس طيف امتصاص منظم النمو القياسي للاشعة فوق البنفسجية ضمن مدى من الطول الموجي (300 -200) نانومتر

الشكل (8) امتصاصية منظم النمو المنقى و المركب القياسي للمنظم النمو (IAA) على التوالي و

تم التأكد من نقاوة حامض الاندول خليك المنقى و المستحصل عليه ، اذ بين الشكل (7) و

شكل (7): تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في قياس امتصاصية (IAA) المنقى من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

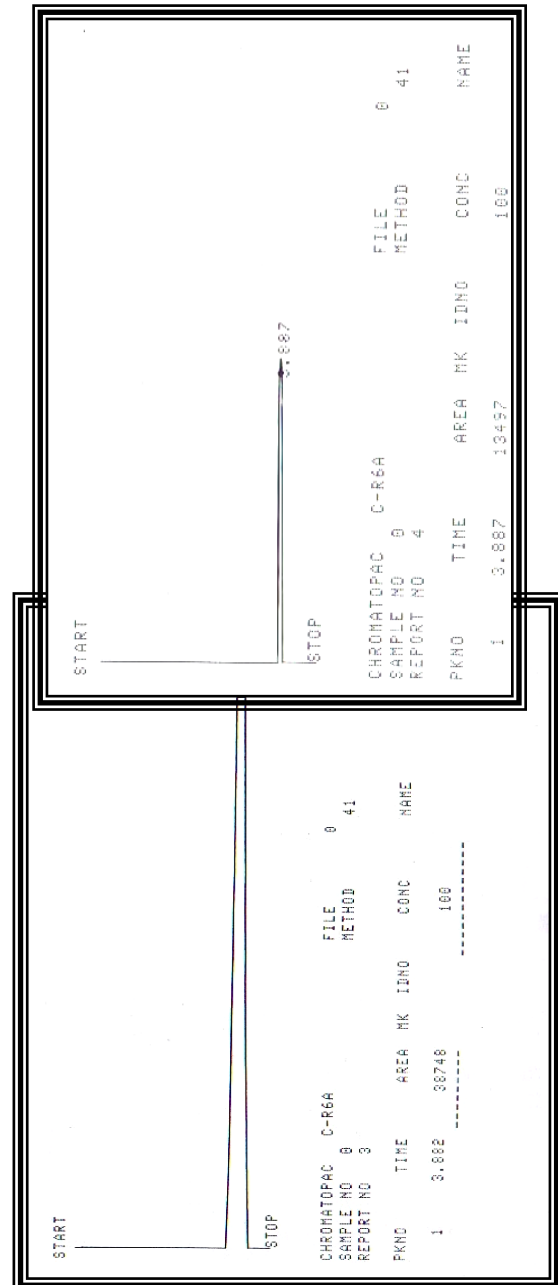
شكل (8): تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في قياس امتصاصية (IAA) القياسي.

المصادر

1. Davies,P.J.(1995):Plant Hormones :Physiology. Biochemist and Mol Biol. Dordrecht:Kluwer.
2. Normanly.J.(1997): Auxin metabolites. Physiology Plant .100:431-442.
3. Kogl,F.; Hangen-Smit, A. and Erxleben, H.(1934). Ueber ein neues Auxin (heteroauxin) aus dem IX mitteilungs. Z.physiol- chem. 228:90.(cited from Jensen and Bandurski , 1994).
4. Tillberg,E.(1977): Indole Acetic Acid levels in phaseolus, zea and pincus during seed germination. Plant Physiol.60:317-319.
5. Kingman,A.R.and Moore,J.(1982).Isolation, purification and quantization of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum*(phaeophyta) xxv.149-153.
6. Chen,K- H.;Miller,A.N.;Paterson,C.W.and Cohen,J.D. (1988): A rapid and simple procedure for purification of Indole 3-Acetic Acid prior to GC-SIM analysis. Plant Physiol.86:822—825.
7. Cohen,B.A.; Amsellem,Z.; Maor,R.; Sharon,A. and Gressel,J.(2002) Transgenically Enhanced Expression of indole-3- acetic acid confers by per virulence to plant pathogens .Phytopathology 92:590-596.
8. Shindy,W.W.and Smith,O.E.(1975):Identification of plant hormones from cotton ovules. Plant Physiol.55:550-554.

التي تبين تطابق منظم النمو المنقى والقياسي من خلال ظهور قمة واحدة لمنظم النمو المنقى مما يشير الى عدم وجود مركبات اخرى معه وكان وقت ظهور منظم النمو (IAA) المنقى عند الدقيقة (3.887) مطابق لوقت ظهور المركب القياسي لمنظم النمو عند الدقيقة (3.882).

ان هذه النتيجة تؤكد الكشف السريعة الخاصة بنقاوة (IAA) لكشف التأكيد و TLC و الكشف النوعي بأستعمال جهاز المطياف الضوئي ونلاحظ ان (IAA) المنقى كان على درجة عالية من النقاوة بالمقارنة مع المركب القياسي ، وهذا ما اكده Maor وجماعته [15] عند مقارنة حامض الاندول خليك المنقى بطريقة PTLC مع حامض الاندول خليك القياسي أذ وجد انه على درجة عالية من النقاوة وبهذه النتيجة يتضح جلياً كفاءة طريقة الاستخلاص وطرق التنقية المستخدمة في هذه الدراسة في الحصول على منظم النمو نقي وهذا ما اكده العديد من الباحثين عند أستخلاص تنقية منظم النمو IAA من مصادر مختلفة .



17. Ahmad , F., Ahmad, I. and Khan, M.S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Zotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan Turk J Biol. 29:29-34.
18. Percival, F. W. and Bandurski, R.S. (1976): Ester of Indole-3 Acetic Acid from Avena seed. Plant Physiology. 58:60-67.
19. Hasan, H. (2002) Gibberellin and Auxin production by plant root fungi and their biosynthesis under Salinity-calcium interaction. Rostlinna vyrobh 48(3):101-106.
20. Hasan, H.A.H. (1994): Production of hormones by fungi Acta. Microbiol. Polon. 43:327-333.
21. Guinn, G.; Brummett, D.L. and Beier, R. (1986) Purification and Measurement of Abscisic acid and indole acetic acid by High performance liquid chromatography. 81:997-102.
22. Kingman, A.R. and Moore, J. (1982). Isolation, purification and quantization of several growth regulating substances in *Ascomyces nodosum* (phaeophyta) xxv. 149-153.
23. Kosuge, T. ; Heskett, M. C. and Wilson, E. E. (1966) Microbial synthesis and degradation of Indole - 3- acetic acid the conversion of L-tryptophan to Indole-3 acetic acid by enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. J. Biological Chemistry 241 :3738-3744.
24. Bialek, K.; and Cohen, J.D. (1989) Quantitation of indole acetic conjugates in bean seeds by direct tissue hydrolysis. Plant physiology. 90:398-400.
25. Baldi, B.G.; Moher, B.R.; Cohen, J.D. (1989): Hydrolysis of Indole 3-Acetic Acid esters exposed to mild alkaline Conditions. Plant Physiol. 91:9-12.
9. Ueda, M. and Bandurski, R.S. (1969): A quantitative estimation of Alkali-Labile Indole 3-Acetic Acid compound in dormant and germination maize kernels. Plant Physiol. 44:1175-1181.
10. Bandurski, R.S. and Schulze, A. (1974) concentrations of indole 3 acetic acid and Its ester in Avena and Zea. Plant physiology. 54:257-262.
11. Gordon, S.A. and Weber, R.P. (1950). colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant physiology 26:192-195.
12. Ehmman, A. (1977) the vanurk-Sakowski reagent a sensitive and specific chromagenic reagent for silica gel thin layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J. chromatogr. 132:267-276.
13. Ergun, N.; Topcuoglu, S.F. and Yldiz, A. (2002) Auxin (indole-3- acetic acid), Gibberellic acid (GA3), Abscisic acid (ABA) and cytokine (Zeatin) production by some species of Mosses and lichens. Turk J. Bot 26:13-18.
14. Unyayar, S.; Topcuoglu, S.F. and Unyayar, A. (1996). A modified method for extraction and identification of indole -3 - acetic acid (IAA), Gibberellic acid (GH3), abscisic acid (ABC) and zeatin produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME446. Bulg. J. plant physiology 22:105-110.
15. Maor, R.; Haskin, S.; Levi-kedmi, H. and Sharon, A. (2004) In planta production of indole -3 acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* applied and environmental microbiology 70:1852-1854.
16. Powell, L.E (1964) preparation of indole extracts from plants for gas chromatography and spectro photo fluorometry plant physiol. 39:836-842.

- analysis of indole 3-acetic acid metabolites Arabidopsis. Plant Physiol.127:1845-1853.
28. Piskornik , Z and Bandarski,R.S.(1972).Purification and partial characterization of Glucan containing indole-3 a acetic acid. Plant Physiol.50:176-182.
26. Robinson,M.;Riov,J.; and Sharon,A.(1998).Indole-3 –acetic acid biosynthesis in *colletotrichum gloeosporioides f.sp.aezschynomene*. Applied and Environmental Microbiology 64:5030-5032.
27. Kowalczyk,M. and Sandberg,G.(2001):Quantitative

Extraction and Purification of Indole acetic acid from locale isolate *Fusarium oxysporum*(F2)

*Essam F. A. Al-Juamily**

*Najwa S.Ahmed**

*Ali O. A. Al-Shimary**

*Biotechnology Dept. Genetic Engineering and Biotechnology Institute-Baghdad University, Iraq

Abstract

Indole acetic acid (IAA) produced from *F. oxysporum* (F2) was purified by several steps included extraction by cold ethyl acetate ; Column chromatography using silica gel and TLC chromatography .

The pure indole acetic acid (IAA) which produce by *F. oxysporum* (IAA) was tested by ultraviolet spectra at (200-300)nm ; and appear that the maximum absorbance at 229nm , the high performance liquid chromatography (HPLC) used to test the purity of the indole acetic acid and the results showed one peak at appearance time 3.822 min.