

پیشنهاد (پروپوزال) انجام طرح پژوهشی

الف) کلیات طرح

۱- عنوان طرح:

به فارسی: استفاده از باکتری ها و قارچ های اندوفیت مولد مواد شبه جیبرلین برای تولید متابولیت های استویا (*Stevia rebaudiana* L.)

Title: The use of the endophyte bacteria and fungi producing gibberellin-like substance for increase of stevia (*Stevia rebaudiana* L.) metabolites

۲- مجری مسئول طرح:

دانشکده مستقر:

نام و نام خانوادگی: مجتبی کریمی

مرتبه علمی و سمت: استادیار

۳- اعتبار کل طرح: ۸۵۰۰۰۰۰۰ ریال اعتبار معادل طرح (حق التحقیق، هزینه پرسنلی و مسافرت): ریال

۴- زمان اجرای طرح به ماه: ۱۲ شروع: اسفند ۱۳۹۵ خاتمه: اسفند ۱۳۹۶

۵- محل اجرای طرح: دانشگاه شهرکرد و دانشگاه پیزا

۶- منابع تأمین کننده بودجه:

۷- مؤسساتی که با طرح همکاری خواهند داشت (نحوه همکاری):

دانشگاه پیزا، پیزا، ایتالیا

۸- خلاصه طرح (حداکثر ۵ سطر):

There are some bacteria and fungi which are capable to produce gibberellins or gibberellin-like substance. Moreover, the supportive role of these fungi and bacteria has been also demonstrated. The Stevia (*Stevia rebaudiana* L.) metabolites especially steviol glycosides are produced from a shared biosynthetic pathway with gibberellins. The steviol glycosides are natural sweeteners, which are highly sweeter than sucrose while do not absorb by the human body. So, these natural compounds can be used as a sucrose alternative in the human diet and also can use safely for diabetic patients. In this research, the

Stevia will inoculate with many of the fungi and bacteria producing gibberellins and gibberellin-like substance. Thereafter, the Stevia secondary metabolites (mainly steviol glycosides) will be analyzed in order to find on the microbial main effects on the steviol glycosides biosynthesis in the leaves. The main objective of this research is the metabolites biosynthesis induction by fungi and bacteria in the Stevia, propelling the increase the natural sweeteners in the Stevia leaves.

ب) مشخصات مجری و همکاران طرح:

۱- مجری مسئول طرح:

الف) نام و نام خانوادگی: مجتبی کریمی مرتبه علمی: استادیار نوع استخدام: پیمانی تاریخ استخدام: ۱۳۹۵/۰۶/۲۰

محل خدمت: دانشکده کشاورزی تلفن محل کار:

ب) نشانی منزل: شهرکرد خیابان سعدی کوچه ۱۱ پلاک ۳۰

ج) به طور متوسط، چند ساعت در هفته به این پروژه اختصاص می دهید؟ ۱۵

د) سایر طرح های در دست اجرا:

ه) مدارج تحصیلی و تخصصی (در حد کارشناسی و بالاتر):

سال دریافت	مؤسسه - کشور	رشته تحصیلی / تخصصی	درجه تحصیلی / تخصصی
۱۳۸۵	دانشگاه شهرکرد	زراعت و اصلاح نباتات	کارشناسی
۱۳۸۷	دانشگاه گیلان	زراعت	کارشناسی ارشد
۱۳۹۲	دانشگاه تهران	زراعت/فیزیولوژی گیاهان زراعی	دکتری

و - فعالیت های تحقیقاتی، پایان یافته، در حال اجرا و تألیفات در ارتباط با موضوع طرح:

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Angelini, L.G., ۲۰۱۴. Effect of two plant growth retardants on steviol glycosides content and antioxidant capacity in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Acta Physiologiae Plantarum* ۳۶, ۱۲۱۱-۱۲۱۹.

Karimi, M., Hashemi, J., Ahmadi, A., Abbasi, A., Esfahani, M., ۲۰۱۴. Study on the bioactivity of steviol and isosteviol in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Acta Physiologiae Plantarum* ۳۶, ۳۲۴۳-۳۲۴۸.

Karimi, M., Hashemi, J., Ahmadi, A., Abbasi, A., Pompeiano, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L., Angelini, L.G., ۲۰۱۵. Opposing Effects of External Gibberellin and Daminozide on Stevia Growth and Metabolites. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. ۱۷۵(۲): ۷۸۰-۷۹۱.

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Angelini, G. A. And Guglielminetti, L. ۲۰۱۵. The effect of soil moisture depletion on Stevia: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scienica horticulture*. ۱۸۳:۹۳-۹۹.

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Angelini, G. A. And Guglielminetti, L. ۲۰۱۵. The positive role of steviol glycosides in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress condition. *Plant biosystems*. DOI: ۱۰.۱۰۸۰/۱۱۲۶۳۵۰۴۲۰۱۵.۱۰۵۶۸۵۷.

Karimi M., Hashemi J., Ahmadi A., Angelini L.G., (۲۰۱۳). Effect of Soil Moisture Variation and Nitrogen Fertilization on Stevia *rebaudiana* Bertoni Yield, Glycosides Content and Antioxidant Properties. *Proceeding of the ۷th Symposium of European Society of Stevia (EUSTAS), Toulouse (France), June ۲۴-۲۶, ۲۰۱۳, pp. ۱۰۵-۱۰۶. ISBN: ۹۷۸-۹۰-۷۴۲-۵۳۲۷۷.*

Karimi, M., Hashemi, J. Ahmadi, A. and Abbasi. ۲۰۱۳. A. Effect of drought stress on growth and Steviol glycosides content of Stevia (*Stevia rebaudiana*). *Iranian journal of crop science*. ۴۴(۴):۶۹۳-۷۰۲.

۲- سایر مجریان طرح:

نام و نام خانوادگی	درجه تحصیلی	رشته تحصیلی	مرتبۀ علمی	محل کار	میزان مشارکت مالی
اول					

۲- همکاران:

نام و نام خانوادگی	درجه تحصیلی	رشته تحصیلی	مرتبۀ علمی	محل کار	نوع همکاری	میزان همکاری (ساعت)
اول Luciana G. Angelini	PhD.	Crop ecology	Prof.	University of Pisa	مشاوره	۲۸۰
دوم Silvia Tavarini	PhD	Plant biology	Post Doc	University of Pisa	همکاری در انجام آزمایشات	۲۸۰

ج) اطلاعات تفصیلی طرح

۱- عنوان و نوع طرح پژوهشی

عنوان به فارسی: استفاده از باکتری ها و قارچ های اندوفیت مولد مواد شبه جیبرلین برای تولید متابولیت های استویا (*Stevia rebaudiana L.*)
به انگلیسی:

The use of the endophyte bacteria and fungi producing gibberellin-like substance for increase of stevia (*Stevia rebaudiana L.*) metabolites

نوع طرح: بنیادی (گسترش مرزهای دانش) کاربردی (در چارچوب اولویت های پژوهشی/حل مسئله)

۲- تشریح جزئیات طرح:

تعریف مسئله: دیابت هفتمین علت مرگ و میر در دنیاست و مرگ و میر ناشی از دیابت بیشتری از سایر بیماری ها نظیر ایدز است. این در حالی است که بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۵۰ درصد مبتلایان به دیابت از بیماری خود مطلع نیستند. رژیم غذایی عامل اصلی در دیابت نوع دوم است که شامل ۹۵ درصد بیماران دیابتی می باشد. استفاده از شیرین کننده ها یکی از راههای مقابله با شیوع دیابت در جامعه جهانی تغذیه مناسب و کم کردن مصرف مواد قندی در رژیم غذایی است. شیرین کننده های غیر قندی می تواند جایگزین مناسبی برای منابع قندی در رژیم غذایی باشد و به نظر می رسد شیرین کننده های طبیعی گزینه مناسب تری نسبت به نوع شیمیایی باشند. گلیکوزیدهای استویول ترکیباتی بسیار شیرین هستند که در برگ استویا تولید می شوند. این ترکیبات حدود ۴۰۰ برابر شیرین تر از قند معمولی بوده و به دلیل فرم شیمیایی قابلیت عبور از دیواره روده را ندارند. بنابراین این نوع شیرین کننده ها برای بیماران دیابتی و افراد در معرض خطر دیابت بسیار مفید می باشند. این ترکیبات در برخی از کشورهای دنیا جایگزین ساکارز در رژیم غذایی شده است. گلیکوزیدهای استویول از مسیر مشترک با جیبرلین ها در سلول های گیاهی سنتز می شوند. به عبارتی جیبرلین ها و گلیکوزیدهای استویول دارای پیش ساز های مشترک هستند. مطالعات نشان داده است برخی از قنارچها و باکتری های اندوفیت توان تولید پیش سازهای جیبرلین و خود جیبرلین در گیاه را دارند. در این طرح تلاش بر این است تا با استفاده از باکتری ها و قارچ های اندوفیت بیوسنتز و تولید گلیکوزیدهای استویول در برگ استویا را بیشتر کرد. در این طرح آزمایشات مقدماتی و برداشت و تهیه نمونه آزمایشگاهی در دانشگاه شهرکرد و سپس کلیه آنالیزهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، شیمیایی و متابولیتی در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه پیزای ایتالیا انجام خواهد شد.

Relevance and impact

Scientific relevance

It is expected that endophyte microorganisms using in this research will increase the Stevia metabolites and consequently helps the produce of the natural sweeteners. We are looking for find the suitable microorganism for this purpose .

After the doing, the results will be publish as an article in a validate journal.

Broader impact

Since the diabetic patients are increasing in the world, find an alternative source of sweeteners can remarkably prevent the diabetes relevance among the people. In our idea, the steviol glycosides from Stevia have the potential to be a suitable alternative for sucrose in the human diets, especially in diabetic patients. Therefore, trying to increase the steviol glycosides in the stevia would be useful, especially through agronomic practices. The use of the endophyte microorganisms in plant has been frequently done and many useful effects have been noted. It is expected that the endophyte microorganisms be useful regarding to produce the secondary metabolite in Stevia. If microorganism induced stevia to produce the most natural sweeteners, these results will reduce the risk of the diabetic in the world, in an equal ratio.

روش و تکنیک‌های اجرایی:

این تحقیق در دانشگاه شهرکرد (ایران) و دانشگاه پیزا (ایتالیا) و در سال ۱۳۹۶ (۲۰۱۷) انجام خواهد شد. آزمایشات اولیه (کاشت گیاهان و تهیه نمونه گیاهی) در دانشگاه شهرکرد انجام خواهد گرفت و سپس کلیه آنالیزهای شیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیتی در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه پیزا ایتالیا انجام خواهد گرفت. گیاهچه های استویا به صورت گلدانی و در گلخانه پرورش داده خواهند شد. در طی رشد استویا، گیاهان با باکتری ها و قارچ های اندوفیت تلقیح خواهند شد. جمعیت میکروبی مورد استفاده تعیین خواهد شد و باکتری های درون بافت برگی تزریق خواهند شد و قارچ ها در سطح برگ، ریشه و خاک اسپری خواهند شد.

The research will be conducted in the Shahrekord Universit, Chaharmahal Bakhtiari Province, Iran, and also in the University of Pisa, Pisa, Italy, during ۲۰۱۷. The greenhouse trial will be done in Shahrekord University in Iran and thereafter the metabolites analysis will be done at the University of Pisa in Italy. The Stevia seedling will grow in the pot under greenhouse condition. Thereafter, the following endophyte bacteria and fungi will provide and will inoculate to Stevia. Some of the bacteria need a wound to entire the plant tissue, which will prepare for them. The fungi will spray on the leaves, root and soil surfaces.

باکتری های مورد استفاده عبارت خواهند بود:

The bacteria using in this research will be included:

Bacillus licheniformis

Rhizobium meliloti.

Acinetobacter calcoaceticus

Bacillus pumilus

قارچ های مورد استفاده عبارت خواهند بود:

The fungi using in this research will be included:

Cladosporium sphaerospermum

Fusarium oxysporum

Fusarium fujikuroi

Paecilomyces formosus

Chaetomium globosum

Penicillium funiculosum

Penicillium citrinum

پس از تلقیح گیاهان با قارچ و باکتری، قبل از گلدهی گیاهان برداشت خواهند شد. نمونه تازه از برگ گیاهان در دمای مناسب نگهداری و سپس بقیه اندام های گیاهی در آون خشک خواهند شد. برگ آنها پودر شده و سپس با استفاده از HPLC گلیکوزیدهای استویول (استویوزاید، ربودیوزاید، A، F و C و دالکوزاید A) موجود در برگ آنها اندازه گیری خواهد شد. در ادامه مقدار استویول سنتز شده در برگ خالص سازی شده و مقدار و خلوص آن با استفاده از GC/MS اندازه گیری خواهد شد.

After inoculation of Stevia with bacteria and fungi, the plant will grow until finishing the vegetative phase and will harvest before flowering stage. The plant leaves will dry and powdered for further analysis. The SVglys content and compositions (stevioside, reb A, reb C, Dulcoside A) will assay according to our previous method (Karimi et al. ۲۰۱۵) in the faculty of agriculture at the University of Pisa, Italy. The SVglys yield (SVglys production in plant leaves) will be calculated. Thereafter, the steviol will be purified and its quantity will be determined using GC/MS.

سایر صفات مورد اندازه گیری در این طرح:

The following traits will be also assessed:

Plant growth characteristics, including: plant height (cm), fresh weight of stem and leaf (g/plant), dry weight of stem and leaf (g/plant), leaf area index (%), lateral shoots, leaf area (cm^۲), flower induction period (day after planting).

The microorganism population in the stevia tissue will be counted and then the microorganism growth inside the stevia tissue will be calculated.

Fresh shoot dry weight the endophyte benefit (%) and Endophytes dependency will calculated as below (Waqas et al. ۲۰۱۲):

$$\text{Endophyte Benefit (\%)} = \frac{\text{Control} - \text{incubated}}{\text{control}} \times 100$$

$$\text{Endophyte Dependency (ED)} = \frac{\text{Endophyte} - \text{Plant at stress}}{\text{Non} - \text{Endophyte plant at the stress}} \times 100$$

منابع:

Ahmad, N., Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Lee, I.-J. and Shin, D.-H. (۲۰۱۰) Gibberellin-producing endophytic fungi isolated from *Monochoria vaginalis*. Journal of microbiology and biotechnology ۲۰(۱۲), ۱۷۴۴-۱۷۴۹.

- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. and Sandberg, G. (1988) Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* 174(4), 532-538.
- Bashan, Y. and Holguin, G. (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30(8), 1225-1228.
- Brandle, J. and Telmer, P. (2007) Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68(14), 1855-1863.
- Cacciari, I., Lippi, D., Pietrosanti, T. and Pietrosanti, W. (1989) Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. *Plant and soil* 115(1), 151-153.
- Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R. and Piccoli, P.N. (2009) Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87(5), 455-462.
- Gamalero, E. and Glick, B.R. (2011) *Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management*, pp. 17-46, Springer.
- Glick, B.R. (2012) *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. *Scientifica* 2012.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D. (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria, *World Scientific*.
- Goyal, S. and Goyal, R. (2010) *Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.
- Gregersen, S., Jeppesen, P.B., Holst, J.J. and Hermansen, K. (2004) Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53(1), 73-76.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Ahmad, N., Tang, D.-S., Kang, S.-M., Na, C.-I., Sohn, E.-Y., Hwang, Y.-H., Shin, D.-H. and Lee, B.-H. (2009a) *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(4), 627-632.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, M.A., Khan, A.L., Kang, S.-M., Kim, S.-K., Joo, G.-J. and Lee, I.-J. (2009b) Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(10), 1785-1792.
- Hasan, H. (2002) Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinna vyroba* 48(3), 101-106.
- Hedden, p. and Kamiya, Y. (1997) *Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 431-460.
- Hedden, P. and Thomas, S.G. (2016) *Annual Plant Reviews, The Gibberellins*, John Wiley & Sons.
- Joo, G.-J., Kim, Y.-M., Lee, I.-J., Song, K.-S. and Rhee, I.-K. (2004) Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology letters* 26(6), 487-491.
- Kang, S.-M., Joo, G.-J., Hamayun, M., Na, C.-I., Shin, D.-H., Kim, H.Y., Hong, J.-K. and Lee, I.-J. (2009) Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology letters* 31(2), 277-281.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L. and Angelini, L.G. (2015) The effect of soil moisture depletion on *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae* 183, 93-99.
- Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H. and Mitsuhashi, H. (1996) *The practical application of Stevia and research and development data*. Tokyo. ISU Co. 447p.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H., Jung, H.-Y., Lee, J.-H. and Lee, I.-J. (2012a) Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC microbiology* 12(1), 1.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Kim, Y.-H., Kang, S.-M., Lee, J.-H. and Lee, I.-J. (2011) Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH2 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process biochemistry* 46(2), 44-47.
- Khan, A.L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A. and Lee, I.-J. (2015) Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical reviews in biotechnology* 35(1), 62-74.
- Khan, A.L. and Lee, I.-J. (2013) Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL6 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. *BMC plant biology* 13(1), 1.
- Khan, A.L., Shinwari, Z.K., Kim, Y.-H., Waqas, M., Hamayun, M., Kamran, M. and Lee, I.-J. (2012b) Role of endophyte *Chaetomium globosum* Ik4 in growth of *Capsicum annum* by production of gibberellins and indole acetic acid. *Pak. J. Bot* 44(5), 1601-1607.

- Khan, A.L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Al-Hosni, K., Kim, M.-J., Adnan, M. and Lee, I.-J. (۲۰۱۴a) Endophytes *Aspergillus caespitosus* LK۱۲ and *Phoma* sp. LK۱۳ of *Moringa peregrina* produce gibberellins and improve rice plant growth. *Journal of Plant Interactions* ۹(۱), ۳۱-۳۷.
- Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S.-M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L. and Jung, H.-Y. (۲۰۱۴b) Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK۱۱ produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology* ۵۲(۸), ۶۸۹-۶۹۵.
- Kim, K.K., Sawa, Y. and Shibata, H. (۱۹۹۶) Hydroxylation of ent-Kaurenoic Acid to Steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni-Purification and Partial Characterization of the Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ۳۳۲(۲), ۲۲۳-۲۳۰.
- MacMillan, J. (۲۰۰۱) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* ۲۰(۴), ۳۸۷-۴۴۲.
- Paleg, L. (۱۹۶۵) Physiological effects of gibberellins. *Annual Review of Plant Physiology* ۱۶(۱), ۲۹۱-۳۲۲.
- Pharis, R.P. and King, R.W. (۱۹۸۵) Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology* ۳۶(۱), ۵۱۷-۵۶۸.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R. and Bottini, R. (۲۰۱۱) An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A_۱ and A_۳ and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant growth regulation* ۶۴(۲), ۲۰۷-۲۱۰.
- Pimenta Lange, M. and Lange, T. (۲۰۰۶) Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biology* ۸(۳), ۲۸۱-۲۹۰.
- Probanza, A., Garcia, J.L., Palomino, M.R., Ramos, B. and Mañero, F.G. (۲۰۰۲) *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT ۵۱۰۶ and *B. pumilus* CECT ۵۱۰۵). *Applied Soil Ecology* ۲۰(۲), ۷۵-۸۴.
- Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A.E. and Redman, R. (۲۰۰۹) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* ۱۸۲(۲), ۳۱۴-۳۳۰.
- Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E. (۲۰۰۶) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* ۱۹(۸), ۸۲۷-۸۳۷.
- Schulz, B. and Boyle, C. (۲۰۰۵) The endophytic continuum. *Mycological research* ۱۰۹(۰۶), ۶۶۱-۶۸۶.
- Sharma, M., Thakral, N.K. and Thakral, S. (۲۰۰۹) Chemistry and in vivo profile of ent-kaurene glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni: An overview. *Nat. Prod. Rad* ۸, ۱۸۱-۱۸۹.
- Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T.-a., Sonoke, S., Kim, K.K. and Yoshioka, M. (۱۹۹۵) Steviol and Steviol-Glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni-purification and partial characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ۳۲۱(۲), ۳۹۰-۳۹۶.
- Singh, S. and Rao, G. (۲۰۰۵) *Stevia*: The herbal sugar of ۲۱st century. *Sugar Tech* ۷(۱), ۱۷-۲۴.
- Starratt, A.N., Kirby, C.W., Pocs, R. and Brandle, J.E. (۲۰۰۲) Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* ۵۹(۴), ۳۶۷-۳۷۰.
- Sumida, T. (۱۹۶۸) Reports on *Stevia rebaudiana* Bertoni M. introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. *Misc. Publ. Hokkaido Natl. Exp. Sta* ۲, ۶۹-۸۳.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. (۲۰۰۱) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports* ۱۸(۴), ۴۴۸-۴۵۹.
- Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H. and Lee, I.-J. (۲۰۱۲) Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* ۱۷(۹), ۱۰۷۵۴-۱۰۷۷۳.
- Williams, P. and De Mallorca, M.S. (۱۹۸۲) Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*. *Plant and soil* ۶۵(۱), ۱۹-۲۶.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. (۲۰۰۶) Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports* ۲۳(۵), ۷۵۳-۷۷۱.
- Zhao, J., Shan, T., Mou, Y. and Zhou, L. (۲۰۱۱) Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini reviews in medicinal chemistry* ۱۱(۲), ۱۵۹-۱۶۸.

۳- کلمات کلیدی: استویا، گلیکوزید استویول، جیبرلین، استویوزاید، ربودیوزاید.

Key words: *Stevia*, Steviol glycosides, gibberellins, stevioside, rebaudioside.

توضیحات:

- طرح بنیادی، پژوهشی است که عمدتاً در جهت گسترش مرزهای دانش بدون در نظر گرفتن استفاده عملی خاص برای کاربرد آن انجام می‌گیرد. اگرچه ممکن است این کاربرد در آینده تعریف شود.

- طرح کاربردی، پژوهشی است که استفاده عملی خاص برای نتایج حاصل از آن در نظر گرفته می‌شود و غالباً جنبه تجربی دارد.

۴- سایر توضیحات لازم:

۴-۱- دلایل ضرورت و توجیه انجام طرح

افزایش بی‌رویه بیماری دیابت در کشور باعث ایجاد نگرانی در بین جوامع جهانی شده است به طوری که بیماری دیابت را هفتمین عامل مرگ و میر در دنیا می‌دانند. به همین خاطر دستیابی به یک رژیم غذایی امن و مطلوب می‌تواند باعث مهار شدن تشدید دیابت در دنیا شود. یکی از روش‌های مناسب استفاده از شیرین کننده‌های طبیعی است و در این راستا گیاه استویا بسیار مستعد می‌باشد. استویا ترکیباتی را در بره نام گلیکوزیدهای استویا در برگ‌هایش تولید می‌کند که حدود ۴۰۰ برابر شیرینتر از قند معمولی بوده اما جذب بدن نمی‌شود به همین خاطر هیچ گونه خطری برای تغییر مقدار گلوکز خون (بیماری دیابت) ندارد. از لحاظ کشاورزی، هرگونه عملیات زراعی و فیزیولوژیکی که بتواند از دید ترکیبات مذکور در برگ استویا را باعث شود می‌تواند به امنیت غذایی کمک کند. یکی از این راهکارها استفاده از میکروارگانیسم‌های مولد جیبرلین است چرا که جیبرلین و گلیکوزیدهای استویول به لحاظ بیوسنتزی دارای یک منشا هستند. در این تحقیق از قارچ‌ها و باکتری‌های اندوفیت برای تحریک متابولیت‌های استویا استفاده خواهد شد.

The increasing rate of diabetes has caused some concern among the world's societies because the diabetes is considered to be the seventh cause of death in the world. According to this, it seems that achieving a safe and desirable diet can help prevent diabetes from escalating in the world. The use of the natural sweeteners is one of the ways for control of diabetes and regarding to this, Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is candidate plant. Stevia produces some sweet compounds named steviol glycosides which are ۴۰۰ times sweeter than sucrose, while did not absorb by the human body. So, these compounds do not change the blood glucose concentration. In agricultural aspect, any cropping and physiological manipulation enabling to produce more steviol glycosides in stevia can help food safety in the world. It seems that the use of the microorganism producing gibberellin could be a reasonable method because the gibberellins are produced from a shared biosynthesis pathway with steviol glycosides. In this research, the endophyte microbes will be used to induce the stevia for more steviol glycosides in their leaves.

۲-۴- نتایج طرح پاسخگوی کدامیک از نیازهای علمی - صنعتی جامعه می‌باشد؟ فراهم شدن شیرین کننده‌های طبیعی برای بیماران دیابتی

۳-۴- چه مؤسسه‌ای می‌تواند از نتایج طرح استفاده نمایند؟ (در صورت نیاز توضیح دهید)
شرکت‌های کشاورزی، دانشگاهها، کارخانه‌های داروسازی و کارخانه‌های صنعت غذایی

۴-۴- سابقه علمی طرح و پژوهش‌های انجام شده با ذکر مأخذ به ویژه در ایران؟

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a perennial plant belongs to *Astraceae* family. *Stevia* is found as growing wild in the Paraguay (Katayama et al. ۱۹۷۶, Sumida ۱۹۶۸). *Stevia* produces some high sweet compounds well-known as steviol glycosides (SVglys) in its leaves. Several types of SVglys are produced in *Stevia* leaves which are included: Steviolmonoside, Steviolbioside, Stevioside, Rebaudioside A, C, F and Dulcoside A. Among SVglys compositions, Stev and Reb A are most important

which commercially are produced from stevia leaves. The Stev quantitatively is the highest SVgly, while Reb A is sweeter than other SVglys (Sharma et al. 2009).

The SVglys are sweeter than sucrose and have been approved for use as sweeteners in many countries, including the USA, Canada, Australia, New Zealand, China, Japan, and South Korea as well as Europe. In the past decades, the SVglys consumption trend has been sharply increased in the world (Singh and Rao 2000). The SVglys is the natural herbal sweetener with no calories and is over 100-300 times sweeter than table sugar (Goyal and Goyal 2010) which can be used for diabetic patients. The positive effect of stevioside in reducing the glucose levels in type 2 diabetic patients has been reported (Gregersen et al. 2004).

The SVglys are diterpene compounds and are produced in the shared biosynthesis pathway with gibberellins (Brandle and Telmer 2007). The divergence between SVglys and gibberellin is begun from (-)-kaurenoic acid and is dependent on the hydroxylation site of (-)-kaurenoic acid. The hydroxylation of (-)-kaurenoic acid at C-13 position gives GAs (Hedden and Kamiya 1997), while hydroxylation at C-13 position results in the steviol production (Kim et al. 1996). GAs formation is started with GA₁₉ production (Pimenta Lange and Lange 2006) and thereafter several types of GAs are produced. In another branch, the glucose units are transferred to steviol by several glycosyltransferases (UGTase), which result in various SVglys, dependent on bond type and glucose unit numbers (Shibata et al. 1990). The SVglys are transported to vacuoles and may accumulate up to 2% of the leaf dry matter, dependent on many factors (Starratt et al. 2002).

Endophytic microorganisms are bacteria or fungi that live inside plant tissues at any moment of their life cycle, without causing damage or disease symptoms to their hosts (Schulz and Boyle 2000). Endophytes seem promising to increase crop yields, remove contaminants, inhibit pathogens, and produce fixed nitrogen or novel substances (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006). Endophytes can produce some secondary metabolites such as phytohormones which could be useful for plants (Merzaeva and Shirokikh 2010, Waqas et al. 2012). Phytohormones play vital roles in the plant life. Gibberellin is one of the main phytohormones. Gibberellins are a large class of phytohormones which can have many actions in the plants. The main biological effects of gibberellins are included: cell division, induction of seed germination, stimulation of florescence and activation of amyolytic enzymes (Hedden and Thomas 2016, Paleg 1960, Pharis and King 1980). Naturally, gibberellins are produced in the bacteria and fungi as well as in plants. The gibberellins hormone can regulate the plant lives and those responses to environmental variables (Cohen et al. 2009, Khan et al. 2010). There are many evidences showing that

endophytes are capable to produce gibberellins and gibberellins-like substances (Ahmad et al. ۲۰۱۰, Hamayun et al. ۲۰۰۹b, Khan et al. ۲۰۱۲a, Khan et al. ۲۰۱۱, Khan and Lee ۲۰۱۳, Khan et al. ۲۰۱۲b, Khan et al. ۲۰۱۴a, Khan et al. ۲۰۱۴b, Piccoli et al. ۲۰۱۱, Waqas et al. ۲۰۱۲).

Plant endophytic fungi are defined as the fungi which spend the whole or part of their lifecycle colonizing inter and/or intra-cellularly inside the healthy tissues of the host plants, typically causing no apparent symptoms of disease. They are important components of plant micro-ecosystems (Rodriguez et al. ۲۰۰۹, Zhang et al. ۲۰۰۶, Zhao et al. ۲۰۱۱). There are fungi that can improve the plant growth and are called plant growth-promoting fungi (PGPF). Some studies have shown that fungi are capable to produce gibberellins-like substance, which could be a phytohormone potential especially for plants. Regarding to this, it has been observed that *Cladosporium sphaerospermum* IJL۰۷ (Hamayun et al. ۲۰۰۹a), *Aspergillus fumigatus* (Hamayun et al. ۲۰۰۹b) are able to produce gibberellins compounds. In a research, it was found that some of the fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Penicillium funiculosum* were capable to produce gibberellins compound (Hasan ۲۰۰۲). It has been also reported that endophytic *Chaetomium globosum* produced various physiologically active and inactive GAs in its culture medium (Khan et al. ۲۰۱۲b).

Many fungal endophytes have been reported to either secrete GAs in their culture medium or have an active GAs biosynthesis pathway. These include *Aspergillus fumigatus* (Khan et al. ۲۰۱۱), *Fusarium fujikuroi* (Khan et al. ۲۰۱۲b), *Penicillium funiculosum* (Khan and Lee ۲۰۱۳), *Penicillium citrinum* (Khan and Lee ۲۰۱۳). It has also been reported that *Paecilomyces formosus* was able to produce gibberellins-like substance (Khan et al. ۲۰۱۲a). Gibberellin production by *Chaetomium globosum* has been reported (Khan et al. ۲۰۱۲b).

The bacteria promoting plant growth, that is PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) (Bashan and Holguin ۱۹۹۸), include those that are free-living, those that form specific symbiotic relationships with plants (e.g., *Rhizobia* spp. and *Frankia* spp.), bacterial endophytes that can colonize some or a portion of a plant's interior tissues, and cyanobacteria (Glick ۲۰۱۲). The plants can positively affect by PGPB through increase the plant tolerance to stress, modification of root development and rhizosphere, mineral nutrition improvement, and suppression of soil diseases (Glick et al. ۱۹۹۹). The bacterial positive effect can be mentioned as include nitrogen fixation, phosphate solubilization, iron sequestration, synthesis of phytohormones, modulation of plant ethylene levels, and control of phytopathogenic microorganisms (Gamalero and Glick ۲۰۱۱).

There are many scientific reports demonstrating that bacteria can produce gibberellins-like substances. The gibberellins-like substances producing by bacteria has been reported in the *Rhizobium* (Williams and De Mallorca 1982). One of the first report relating to gibberellin presence in the bacteria was by Atzorn et al. (Atzorn et al. 1988) who demonstrated the presence of GA₁ and GA₂₀, GA in gnotobiotic cultures of *Rhizobium meliloti*. The effect of three bacteria species (*Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*) on red pepper has been evaluated and the beneficial effect of these bacteria was observed. The positive effects of these bacteria were attributed to GA_s (GA₉, GA₁₁, GA₁₆, GA₁₉, GA₂₂, and GA₂₄) production of red pepper (Joo et al. 2004). It has been reported that *Arthrobacter giacomelloi* and *Azospirillum brasilense* formed greater amounts of gibberellins than control treatment (Cacciari et al. 1989). Four GAs (GA₁, GA₃, GA₄, and GA₇) from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus* have been identified (MacMillan 2001). It has been also reported that inoculation with *Bacillus licheniformis* and *B. pumilus* enhanced growth of *Pinus pinea* plants, presumably by bacterial gibberellin production (Probanza et al. 2002). Gibberellin production by *Acinetobacter calcoaceticus* has been reported (Kang et al. 2009).

Since endophytes are able to produce gibberellins and gibberellins-like substance, and gibberellins also are produced from a shared biosynthetic pathway with SVglys in *Stevia*, this research will be conducted to getting help from endophytes microorganism to strengthening the gibberellins and SVglys biosynthesis in *Stevia*. This technique will help *stevia* to produce more SVglys.

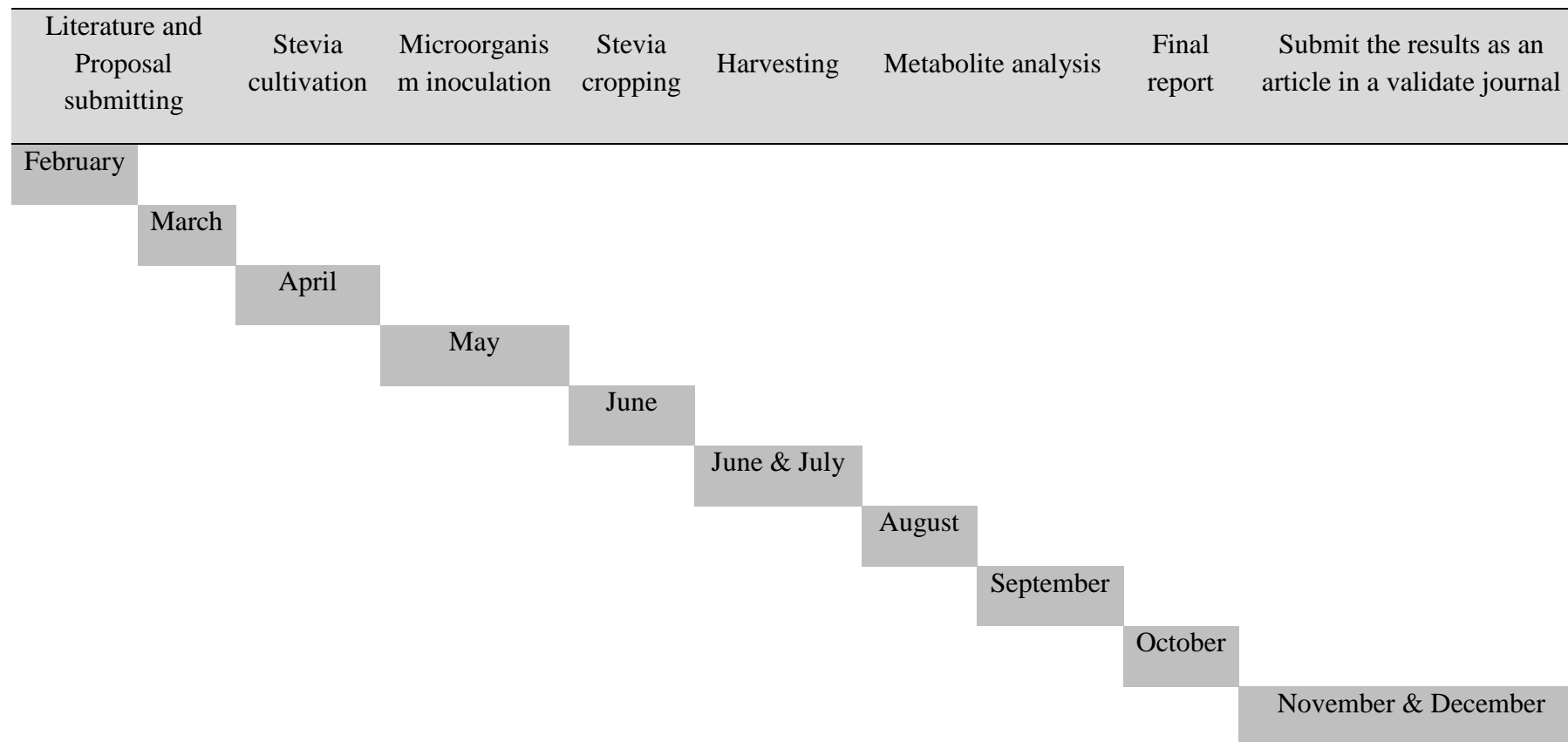
۴-۵- آیا پیشنهاد طرح پژوهشی حاضر ارتباطی با پایان نامه های تحصیلات تکمیلی کارشناسی ارشد/دکتری که با راهنمایی جنابعالی انجام پذیرفته / در حال انجام است دارد؟ بلی خیر

در صورت مثبت بودن پاسخ، ضمن ذکر عنوان پایاننامه های مربوطه لطفاً میزان انطباق را مشخص فرمائید.

۵- زمان بندی

مدت زمان لازم برای اجرای طرح (به ماه): ۱۲ تاریخ شروع: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ خاتمه: اسفند ۱۳۹۶ مدت زمان: ۱۲ ماه

جدول مراحل اجرای پروژه و پیش بینی زمان هر مرحله:



۶- برای این طرح از سازمانهای دیگر نیز درخواست اعتبار شده است؟ بلی خیر

در صورت مثبت بودن جواب لطفاً نام سازمان، نوع و میزان همکاری را مرقوم فرمایند؟

۷- هزینه پرسنلی پیش بینی شده با ذکر مشخصات کامل، میزان اشتغال و حق الزحمه:

نوع مسئولیت	میزان ساعت کار	حق التحقیق* و حق الزحمه به ساعت	جمع کل
مجری مسئول	۱۰۰		
جمع			

توضیحات:

*- بر اساس حداکثر تا میزان مقرر در آئین نامه مصوب هیأت وزیران مورد عمل در دانشگاه و مؤسسات آموزش عالی محاسبه و پرداخت خواهد شد.

۸- فهرست وسائل و مواد مورد نیاز طرح که می‌باید از اعتبار طرح از داخل یا خارج کشور خریداری شود (موادی که در ایران مورد نیاز می‌باشد):

نام دستگاه/ مواد	شرکت دارنده و یا فروشنده	کشور سازنده	مصرفی یا غیر مصرفی	آیا در ایران موجود است	تعداد/مقدار	قیمت ریال یا ارز	قیمت کل ریال یا ارز	در چه مرحله از طرح مورد نیاز است؟
قارچ و باکتری	مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی	ایران	مصرفی	بله	۷ گونه قارچ و ۴ گونه باکتری	۱۵۰۰۰۰۰۰ ریال	۱۵۰۰۰۰۰۰ ریال	در ابتدای طرح
گیاهچه استویا و بذر	پژوهشکده گیاهان دارویی	ایران	مصرفی	بله	۵۰۰ گیاهچه	۱۰۰۰۰۰۰۰ ریال	۱۰۰۰۰۰۰۰ ریال	در ابتدای طرح
لوازم گلدانی و گلخانه ایی		ایران	مصرفی			۵۰۰۰۰۰۰۰ ریال	۵۰۰۰۰۰۰۰ ریال	در ابتدای طرح
مواد شیمیایی و آزمایشگاهی						۳۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	۳۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	در همه مراحل طرح
هزینه کارگر و حمل و نقل						۵۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	۵۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	در همه مراحل طرح
هزینه های متفرقه						۱۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	۱۰۰۰۰۰۰۰۰ ریال	در همه مراحل طرح
جمع هزینه‌های وسایل و مواد						۸۵۰۰۰۰۰۰۰		جمع هزینه‌های وسایل و مواد
						به ریال		جمع هزینه‌های وسایل و مواد
						به دلار		

کلیه آنالیزهای آزمایشگاهی و مواد و تجهیزات مورد نیاز در حین آنالیز از طریق دانشکده کشاورزی دانشگاه پیزا (ایتالیا) تامین خواهد شد که طبق برآورد اولیه ۷۵۰۰ یورو میباشد.

توضیحات:

- در صورتیکه این مواد و یا دستگاه در ایران موجود باشد دلایل انتخاب نوع خارجی را ذکر نمایید.
- در صورتی که مواد و یا دستگاهها در دانشکده ها و یا مراکز تحقیقاتی دانشگاه جهت بهره‌گیری در دسترس باشد، دلایل خرید آنرا مشخص کنید.

۱۰- پیش بینی هزینه مسافرت داخل (در صورت لزوم)

مقصد	تعداد مسافرت در مدت اجرای طرح و منظور آن	نوع وسیله نقلیه	تعداد افراد	هزینه به ریال
ایتالیا	۱	هوایما	۱	
اقامت به مدت ۴۰ روز در دانشگاه پیزا				
جمع هزینه‌های مسافرت				

۱۱- هزینه‌های دیگر مربوط به طرح

ریال ۵۰۰۰۰۰۰

۱-۱۱- هزینه‌های چاپ و تکثیر

ریال

۲-۱۱- هزینه‌های تهیه نشریات و کتب لازم

ریال

۱۰۰۰۰۰۰۰

۳-۱۱- سایر هزینه‌ها (لطفاً نام ببرید) پیش بینی نشده

ریال

جمع هزینه‌های دیگر ۱۵۰۰۰۰۰۰

۱۲- کل اعتبار طرح

ارز	ریال	جمع هزینه‌ها
		جمع هزینه‌های پرسنلی
	۸۵۰۰۰۰۰۰	جمع هزینه‌های وسایل و مواد
		جمع هزینه‌های مسافرت
	۱۵۰۰۰۰۰۰	جمع هزینه‌های دیگر
		جمع هزینه‌های سالانه
دلار	ارزی	جمع کل هزینه‌های طرح
ریال	ریالی	
	ریال	ریال

مبلغی که از منابع دیگر کمک خواهد شد و نحوه مصرف آن:

کلیه آنالیزهای آزمایشگاهی و مواد و تجهیزات مورد نیاز در حین آنالیز از طریق دانشکده کشاورزی دانشگاه پیزا (ایتالیا) تامین خواهد شد که طبق برآورد اولیه ۷۵۰۰۰ یورو میباشد.

نام و امضاء مجری مسئول طرح: مجتبی کریمی	امضاء	تاریخ: ۱۳۹۵/۱۱/۵
نام و امضاء مجری (اول) طرح: مجتبی کریمی	امضاء	تاریخ:
نام و امضاء همکار طرح: لوشانا آنجلینی	امضاء	تاریخ:
نام و امضاء همکار طرح: سیلویا تاوارینی	امضاء	تاریخ: