

Evaluation of the effects of *Serendipita indica* on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in three maize hybrids under heat stress

Edris Sayadian 

MSc Graduate, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran. Email address: edris.sayadian@gmail.com

Mohammad Farkhari 

*Corresponding Author: Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran. Email address: farkhari@asnrukh.ac.ir

Babak Pakdaman Sardrood 

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran. Email address: bpakdaman@asnrukh.ac.ir

Abstract

Objective

The endophytic fungus *Serendipita indica* (formerly *Piriformospora indica*) can establish symbiotic relationships with various plants, including maize. Numerous studies have highlighted its positive effects on plant growth and enhancing tolerance to biotic and abiotic stresses. This study aimed to evaluate the impact of *S. indica* on catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPO) enzyme activities and lipid peroxidation levels in various maize hybrids under heat stress during the flowering stage. The potential interaction between plant genotype and fungal symbiosis, which is important in plant breeding, was also investigated.

Materials and Methods

The experiment used a factorial arrangement based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications. Treatments consisted of two factors: maize hybrids (drought- and heat-tolerant single-cross Karun 701, single-cross AS71, and common single-cross 704) and fungal inoculation (inoculated and non-inoculated with *S. indica*) under two planting dates (early

summer and summer). Heat stress was induced by early summer planting, which exposed maize hybrids to high temperatures during August and September in Khuzestan Province, coinciding with the pollination stage.

Results

Combined analysis revealed that *S. indica* inoculation significantly reduced malondialdehyde (MDA) levels and enhanced CAT and GPO enzyme activities in inoculated plants compared to non-inoculated controls. However, maize genotypes responded differently to the fungal symbiosis, indicating a significant genotype $\times$ fungus interaction. Among the hybrids, Karun 701 showed the most effective symbiotic relationship with *S. indica*, exhibiting the highest enzyme activity and the lowest MDA content under stress and non-stress conditions.

Conclusion

The findings suggest that response of maize plant to *S. indica* is genotype-dependent. Integrating this fungus into maize breeding programs can contribute significantly to developing hybrids tolerant to abiotic stresses, provided that genotype $\times$ fungus interaction on important agronomic traits in maize is confirmed.

Keywords: Antioxidant enzymes, Heat stress, Malondialdehyde, *Piriformospora indica*, *Zea mays*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Sayadian E, Farkhari M, Pakdaman Sardrood B (2024) Evaluation of the effects of *Serendipita indica* on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in three maize hybrids under heat stress. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 1 (3), 89-106.

Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (3), 89-106.

DOI: 10.22103/gpb.2024.4854

Received: July 17, 2024.

Received in revised form: September 20, 2024.

Accepted: September 21, 2024.

Published online: September 28, 2024.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society.



© the authors

بررسی اثر قارچ *Serendipita indica* بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدها در سه هیبرید مختلف ذرت تحت تنش گرمایی

ایدریس صیادیان 

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران. رایانامه: edris.sayadian@gmail.com

محمد فرخاری 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران. رایانامه: farkhari@asnruk.ac.ir

بابک پاکدامن سردرود 

استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران. رایانامه: bpakdaman@asnruk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷ تاریخ دریافت فابل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱

چکیده

هدف: قارچ اندوفیت *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) قابلیت همزیست شدن با گستره وسیعی از گیاهان از جمله ذرت را دارا است. گزارش‌های زیادی از تاثیر مثبت این قارچ بر روی افزایش رشد گیاه و نیز افزایش تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارد. در این تحقیق تاثیر قارچ *S. indica* بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و نیز میزان پراکسیداسیون لیپیدها در سه هیبرید مختلف ذرت در پاسخ به تنش گرمایی در مرحله گلدهی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین وجود یا عدم وجود اثر متقابل بین ژنوتیپ گیاه و قارچ که از لحاظ به نژادگران با اهمیت است، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار شامل دو فاکتور رقم (هیبرید سینگل کراس کارون ۷۰۱ مقاوم به خشکی و گرما، رقم سینگل کراس AS71 و رقم سینگل کراس ۷۰۴) و قارچ (تلقیح و عدم تلقیح با قارچ) که در دو تاریخ کشت (کشت تابستانه و کشت زودهنگام تابستانه) اجرا گردید. برای اعمال تنش گرما از کشت زودهنگام

تابستانه استفاده شد تا هیبریدهای ذرت در هنگام گرده‌افشانی با تنش گرمایی ماه‌های مرداد و شهریور در استان خوزستان برخورد کنند.

نتایج: در مجموع بر اساس نتایج حاصل از تجزیه مرکب، قارچ *S. indica* سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان تلقیح نشده گردید. اما واکنش ژنوتیپ‌های مختلف ذرت در همزیستی با این قارچ یکسان نبود که حاکی از اثر متقابل بین قارچ و ژنوتیپ گیاه است. بر پایه فعالیت دو آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز، ژنوتیپ مقاوم به گرما و خشکی کارون نسبت به دو ژنوتیپ دیگر همزیستی موثرتری را با قارچ ایجاد کرد. از میان ارقام مورد بررسی رقم کارون دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود و کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید را در هر دو شرایط تنش و غیرتنش دارا بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان اثر *S. indica* بر گیاه ذرت تحت تأثیر ژنوتیپ می‌باشد. چنانچه اثر متقابل قارچ و ژنوتیپ بر صفات زراعی مهم ذرت تأیید شود، ادغام این قارچ در برنامه‌های به‌نژادی ذرت می‌تواند به‌طور موثری در بهبود توسعه هیبریدهایی با تحمل بالاتر نسبت به تنش‌های غیرزیستی کمک کند.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش گرما، ذرت، قارچ اندوفیت، مالون‌دی‌آلدئید.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صیادیان ایدریس، فرخاری محمد، بابک پاکدامن سردرود (۱۴۰۳) بررسی اثر قارچ *Serendipita indica* بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدها در سه هیبرید مختلف ذرت تحت تنش گرمایی. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۱(۱)، ۸۹-۱۰۶.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society



© the authors

مقدمه

با توجه به گرمایش جهانی، مواجهه با دمای بالا به یک پدیده رایج در بسیاری از نقاط در جای جای جهان تبدیل شده است (Distéfano et al. 2024). افزایش نرخ وقوع دماهای بسیار بالا باعث کاهش عملکرد محصولات و تهدیدی برای کشاورزی پایدار شده است (Janni et al. 2024). هنگامی که گیاه تحت انواع تنش‌های غیرزنده قرار می‌گیرد، توازن بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS, Reactive oxygen species) و حذف آن از طریق مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدانی برهم می‌خورد. تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن توسط مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی که یکی براساس آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و دیگری براساس مواد

آنتی اکسیدانی است، صورت می پذیرد. مواد آنتی اکسیدانی شامل هر دو دسته آنتی اکسیدان های محلول در آب (گلوکاتینون، آسکوربات و غیره) و محلول در چربی (آلفاتوکوفرول و بتاکاروتن) می باشند. مهمترین آنزیم های آنتی اکسیدانی که برای هم ایستایی گونه های فعال اکسیژن (ROS homeostasis) ضروری است، شامل آسکوربات پراکسیداز (APX, Ascorbate peroxidase)، سوپراکسیداز دیستمتاز (SOD, Superoxide dismutase)، کاتالاز (CAT, Catalase) و گلوکاتینون ردوکتاز (GR, glutathione reductase) هستند (Mishra et al. 2023). آنزیم SOD اولین لایه دفاعی گیاه در مقابل تنش است. این آنزیم O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می کند. سپس پراکسید هیدروژن توسط آنزیم هایی نظیر CAT، APX و GPX به H_2O تبدیل می شود (Hasanuzzaman et al. 2020). آنزیم های CAT و GPX مستقیماً به تجزیه پراکسید هیدروژن می پردازند، در حالی که آنزیم هایی مانند APX و GR در مسیرهای چرخه ای پیچیده تری از دفاع آنتی اکسیدانی مشارکت دارند. از این رو، سنجش فعالیت آنزیم های CAT و GPX معمولاً ساده تر بوده و در مطالعات فیزیولوژیکی گیاهان کاربرد بیشتری دارد.

پراکسیداسیون لیپیدها یکی از مهم ترین پیامدهای فیزیولوژیکی تنش های غیرزنده مانند تنش گرمایی، شوری، خشکی و سمیت فلزات سنگین در گیاهان است. این فرآیند عمدتاً ناشی از تجمع بیش از حد گونه های فعال اکسیژن است که به ساختارهای غشایی آسیب می زنند. لیپیدهای غشای سلولی به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع، به دلیل داشتن پیوندهای دوگانه، در برابر حمله ROS بسیار آسیب پذیر هستند. پراکسیداسیون این لیپیدها منجر به کاهش انعطاف پذیری غشاء، نشت الکترولیت ها و تولید ترکیبات سمی مانند مالون دی آلدئید (MDA) می شود که خود به عنوان شاخصی برای پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تحت تنش شناخته می شود (Gill & Tuteja 2010; Hasanuzzaman et al. 2020). مطالعات نشان داده اند که افزایش میزان MDA در گیاهان تحت تنش، نشان دهنده آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی است. به همین دلیل، اندازه گیری MDA یکی از شاخص های رایج برای ارزیابی شدت تنش اکسیداتیو در گیاهان محسوب می شود. از این رو، بررسی سطح پراکسیداسیون لیپیدها در کنار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز و پراکسیداز، می تواند درک بهتری از پاسخ دفاعی گیاهان به تنش ها فراهم آورد.

یکی از راهکارهای مطرح برای مقابله با تنش های محیطی، استفاده از قارچ های اندوفیت است. این قارچ ها به طور طبیعی در درون بافت های گیاهی زندگی می کنند و می توانند با ایجاد تعاملات مثبت با گیاه، به بهبود رشد و مقاومت آن در برابر تنش های مختلف کمک کنند (Lata et al. 2018; Verma et al. 2022; Morales-Vargas et al. 2024). یکی از این قارچ های همیار، قارچ اندوفیت *Serendipita indica* می باشد. این قارچ مقاوم به شرایط سخت محیطی از جمله شوری، خشکی و دمای بالا است و اولین بار از کویر ثار (Thar) هند جداسازی شد (Waller et al. 2005). این قارچ در گذشته *Piriformospora indica* نامیده می شد. با این حال در حال حاضر در برخی از گزارش های جدید نیز پژوهشگران همچنان از نام قدیمی این قارچ بهره می برند. این قارچ قابلیت همزیست شدن با گستره وسیعی از گیاهان از جمله گیاهان تک لپه ای چون برنج و ذرت و نیز گیاهان دولپه ای چون آرابیدوسیس دارد (Qiang et al. 2012). *S. indica* دارای دامنه میزبانی بسیار گسترده است (Qiang et al. 2012). توانایی کشت مستقل از میزبان، آن را به گزینه ای مناسب برای کاربردهای زیستی در کشاورزی پایدار تبدیل کرده است.

تأثیر تلقیح قارچ *S. indica* در افزایش توده زیستی گیاهانی مانند ذرت (*Zea mays*)، جعفری (*Petroselinum sativum*)، توتون (*Nicotina tabacum*)، ترخون (*Artemisia dracunculus*)، و درخت سپیدار (*Populus alba*) نیز توسط Varma et al. (1999) گزارش شده است. علاوه بر این، تأثیر مثبت این قارچ بر روی افزایش تحمل گیاه در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان مختلف گزارش شده است (Saleem et al. 2022). در مطالعه‌ای قارچ *S. indica* باعث افزایش رشد ریشه و اندام هوایی ذرت تحت شرایط تنش خشکی و بدون تنش گردید. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) و محتوای پرولین در برگ‌های گیاهان تلقیح‌شده افزایش یافته و در مقابل میزان مالون‌دی‌آلدئید کاهش یافت (Xu et al. 2017). در پژوهشی دیگر اثر این قارچ بر تحمل به خشکی در ذرت نشان داد که کلونیزاسیون ریشه‌های ذرت با این قارچ منجر به افزایش طول ریشه، تعداد ریشه‌های اصلی و اندازه برگ‌ها و عملکرد گیاه می‌شود. تعداد ژن‌های پاسخ‌دهنده به قارچ در ریشه‌های ذرت تحت تنش خشکی و بدون تنش به‌ترتیب برابر با ۴۶۴ ژن و ۲۰۳۷ ژن و آنالیزهای ژن‌انتولوژی نشان داد که مسیرهای متابولیکی کربن و گوگرد از اهداف اصلی این قارچ می‌باشد. همچنین، قارچ باعث بهبود سیستم اکسیداتیو در ریشه‌ها و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با هورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید، اکسین، سالیسیلیک اسید و سیتوکینین‌ها گردید (Zhang et al. 2018). در آزمایشی Ji et al. (2022) اثر قارچ *S. indica* را در خشکی و دمای بالا بر روی قلمه‌های *Rosa chinensis*، *Jasminum sambac* و *Rhododendron simsii* بررسی نمودند. این قارچ باعث افزایش بقا قلمه‌ها در شرایط خشک گردید و نیز میزان کلروفیل را افزایش و میزان مالون‌دی‌آلدئید را کاهش داد. همچنین قارچ باعث افزایش بقا کشت بافت *R. simsii* در تنش گرمایی و نیز سبب افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در نمونه‌های تیمار شده گردید. در پژوهشی دیگر نشان داده شد که همیاری قارچ *S. indica* با ریشه گیاه ذرت باعث مقاومت ذرت به بیماری انگلی ریشه ناشی از قارچ *Fusarium verticillioides* می‌شود. در این آزمایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت ریشه تلقیح شده با قارچ به‌طرز معنی‌داری افزایش یافت که باعث بهبود ریشه‌های تلقیح شده با قارچ *S. indica* شد (Kumar et al. 2009).

در این پژوهش، علاوه بر مقایسه هیبریدهای مختلف ذرت از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط تنش گرمایی و شرایط نرمال، تأثیر قارچ *S. indica* بر بهبود این شاخص‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین، تعامل احتمالی بین ژنوتیپ‌های گیاه و قارچ در هر دو شرایط تنش و نرمال ارزیابی شده است؛ موضوعی که تاکنون کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این اثر متقابل، از دیدگاه به‌نژادی حائز اهمیت است و می‌تواند در آینده زمینه‌ساز طراحی برنامه‌های به‌نژادی مبتنی بر بهره‌گیری از این قارچ باشد.

مواد و روش‌ها

محل، نقشه طرح و زمان اجرای طرح: این تحقیق در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی

و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاتانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز و در حاشیه شرقی رودخانه کارون با عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه و طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۵۳ دقیقه با ارتفاع ۵۱ متر از سطح دریا، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در شرایط نرمال و تنش گرمایی در مرحله گرده‌افشانی انجام شد. دو فاکتور شامل فاکتور رقم در سه سطح (رقم مقاوم به خشکی و گرمای سینگل کراس کارون ۷۰۱، رقم سینگل کراس AS71 و رقم سینگل کراس ۷۰۴) و قارچ (تلقیح شده با قارچ و تلقیح نشده با قارچ) بود. کشت زود هنگام تابستانه (در تاریخ ۱۳۹۴/۴/۱) جهت اعمال تنش گرمایی و کشت تابستانه (در تاریخ ۱۳۹۴/۵/۲۰) به عنوان شاهد بدون تنش در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و میزان مالون‌دی‌آلدئید از نزدیک‌ترین برگ به بلال در زمان گرده‌افشانی در دو کشت انجام گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از تجزیه مرکب واکاوی شدند.

هیبرید سینگل کراس کارون ۷۰۱ یک رقم مقاوم به تنش خشکی و گرما است که در مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد خوزستان تولید شده است (Barzegari et al. 2013). رقم سینگل کراس ۷۰۴ رقمی شناخته شده که مدت‌ها است در اکثر نقاط ایران کشت می‌شود و هیبرید سینگل کراس AS71 نیز رقمی متوسط رس (۱۱۵-۱۱۰ روز) می‌باشد.

تکثیر و تولید قارچ *S. indica* در آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام گردید. منبع اولیه تهیه قارچ از دانشگاه مارتین لوتر هاله-ویتنبرگ آلمان توسط نگارنده سوم مقاله به ایران آورده شده است. برای تلقیح قارچ از دانه‌های جو، حامل کلامیدوسپورهای قارچ استفاده گردید. بدین ترتیب که ۶ دانه جو تلقیح شده با قارچ در شرایط آزمایشگاهی که همان مایه تلقیح قارچ هستند را در محل قرارگیری بذره‌های ذرت قرار داده و ۲ بذر ذرت (جهت اطمینان برای سبز شدن حداقل یکی از بذرها) را در بین دانه‌های جو (با عمق کاشت ۶ سانتی‌متر) قرار داده شد تا بیشترین سطح تماس را با دانه‌های ذرت داشته باشند. بعد از کشت، عملیات آبیاری و کوددهی بر اساس روش معمول کشت ذرت انجام شدند. همزیستی ریشه‌ها با قارچ در مرحله سه برگی در هر دو کشت در آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی توسط میکروسکوپ Olympus مدل cx22 بررسی شد.

استخراج عصاره پروتئینی: به منظور استخراج محتوای پروتئینی نمونه‌های گیاهی، از بافر استخراج حاوی ۱۰۰

میلی‌مولار فسفات پتاسیم با pH=۷/۵، ۲ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ درصد PVP (W/V) و ۰/۲ مولار سوکروز استفاده شد. پس از تهیه بافر استخراج، مقدار ۱ گرم از بافت تر گیاهی (ریشه یا اندام هوایی) را در یک هاون از پیش سرد شده ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه ساییده شد تا کاملاً همگن شود. سپس مخلوط حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۶۰۰۰ دور به مدت نیم ساعت، سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصل را به میکروتیوب منتقل شده و در نیتروژن مایع فریز کرده و برای مطالعات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Dazy et al. (2008) انجام شد.

بدین منظور ۲۵۰ میکرولیتر از فسفات پتاسیم به همراه ۲۵۰ میکرولیتر H_2O_2 ۷۰ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر درون کووت منتقل شده و از آن برای شاهد استفاده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی را به مخلوط واکنشی فوق افزوده و منحنی فعالیت آنزیم در مدت ۱۸۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و یادداشت شد، میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=0.28 \text{ mMol-1cm-1}$) و فرمول $A=\epsilon bc$ محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به روش Chance & Maehly

(1955) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (PH=7) با ۲۵۰ میکرولیتر گایاکول ۱۰ میلی‌مولار و ۳۴ میکرولیتر H_2O_2 ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (PH=7) به درون کووت منتقل شد. سپس ۴۶۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل شده به علاوه ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به کووت افزوده و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. از مخلوط واکنش بالا بدون عصاره آنزیمی به عنوان شاهد استفاده گردید. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در ۴۷۰ نانومتر مقدار تترایاکول تشکیل شده محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید: به منظور سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء براساس میزان

مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تولید شده از روش Heath et al. (1968) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت تر گیاهی (ریشه یا ساقه) به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد تری‌کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد. سپس عصاره به دست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت به یک لوله تازه منتقل گردید و سپس ۴ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباریوتیک به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت سرد شدند. بعد از آن، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل با استفاده از تجزیه مرکب و به وسیله نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۴ انجام گرفت و شکل‌ها به کمک نرم‌افزار Excel 2013 ترسیم شدند.

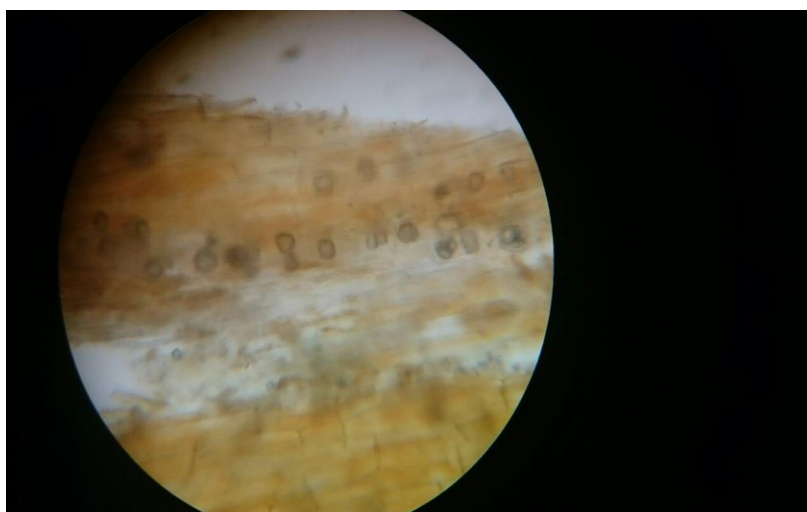
نتایج و بحث

جهت اطمینان از کلونیزاسیون ریشه گیاهان تیمار شده با قارچ، از ریشه گیاهان تحت تیمار در مرحله دو برگی نمونه‌برداری

و زیر میکروسکوپ بررسی و از همزیست شدن قارچ با ریشه گیاهان اطمینان حاصل گردید (شکل ۱).

آنزیم کاتالاز: تجزیه مرکب داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز (جدول ۱) نشان داد که اثرات تاریخ کشت، رقم و

قارچ در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بودند. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط نرمال و تنش به‌ترتیب برابر با ۱۵/۱۳ و ۲۱/۵ میکرومول آب اکسیژنه تجزیه شده به ازای هر دقیقه در هر گرم بافت برگ تازه ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g FW}$) به‌دست آمد. مطابق با مقایسه میانگین اثر رقم (شکل ۲)، رقم کارون دارای بیشترین میزان فعالیت کاتالاز بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تلقیح شده با قارچ نسبت به گیاهان تلقیح نشده به‌ترتیب برابر با ۱۸/۵۶ و ۱۸/۱۲ بود.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی از اسپورهای قارچ در ریشه گیاه

Figure 1. Microscopic view of fungal spores colonizing the plant root

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) همچنین اثرات متقابل دوجانبه (بین تاریخ کاشت و رقم و همچنین بین رقم و قارچ) از لحاظ آماری معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین اثر متقابل بین تاریخ کاشت و رقم (شکل ۳) و اثر متقابل رقم و قارچ (شکل ۴) در سطح ۱ درصد با آزمون دانکن انجام شد. طبق شکل ۳ در تمام ارقام، تنش باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم کارون و محیط با تنش گرمایی رخ داد. براساس شکل ۴، تاثیرپذیری رقم کارون از قارچ، از لحاظ افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، از دو رقم دیگر بیشتر بود. به عبارتی افزایش در میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز در رقم کارون در شرایط همزیستی با قارچ نسبت به بدون همزیستی با قارچ بیشتر و این اختلاف معنی‌دار بود، حال آن که این اختلاف در دو رقم دیگر معنی‌دار نمی‌باشد.

آنزیم گایاکول پراکسیداز: تجزیه مرکب داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در جدول (۱) نشان داد

که اثرات رقم و تاریخ کشت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند و اثر قارچ با آستانه معنی‌داری ۵ درصد فاصله بسیار کمی (۰/۰۵۲)،

داشت. در شرایط کشت نرمال و کشت در شرایط تنش گرما، میانگین فعالیت این آنزیم به‌ترتیب ۲/۷۸ و ۱۰/۸ نانومول تترایاکول تولیدشده در دقیقه بر گرم وزن تازه برگ (nmol/min gr FW) به‌دست آمد. مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ارقام مورد بررسی نشان داد که در مجموع میزان فعالیت این آنزیم در رقم کارون از دو رقم دیگر بیشتر بود (شکل ۵).

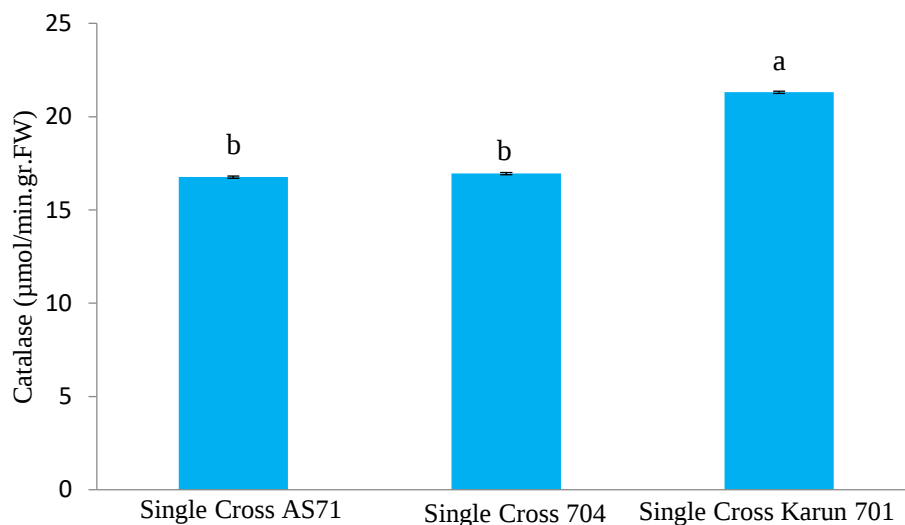
جدول ۱. تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و میزان مالون‌دی‌آلدئید

Table 1. Analysis of variance of Catalase and Guaiacol Peroxidase activity and Malondialdehyde content

Mean of Squares میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
مالون‌دی‌آلدئید Malondialdehyde	گایاکول پراکسیداز Guaiacol Peroxidase	کاتالاز Catalase	Degree of Freedom	Source of Variance
70.8**	577.6**	371**	1	تاریخ کشت Cultivation date
0.09	0.22	0.40	4	خطای اول Error I
12.2 **	9.36**	79.4**	2	رقم Cultivar
1.24*	1.28 ^{ns}	1.73**	1	قارچ Fungus
2.54**	1.28*	26.77**	2	تاریخ کشت×رقم Cultivation date×cultivar
0.06 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.12 ^{ns}	1	تاریخ کشت×قارچ Cultivation date×Fungus
0.11 ^{ns}	1.56*	0.70*	2	رقم×قارچ Cultivar×Fungus
0.19 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.24 ^{ns}	2	تاریخ کشت×رقم×قارچ Cultivation date×Cultivar×Fungus
0.24	0.30	0.18	20	خطای دوم Error II
7.69	8.08	2.37	-	ضریب تغییرات Coefficient of Variation

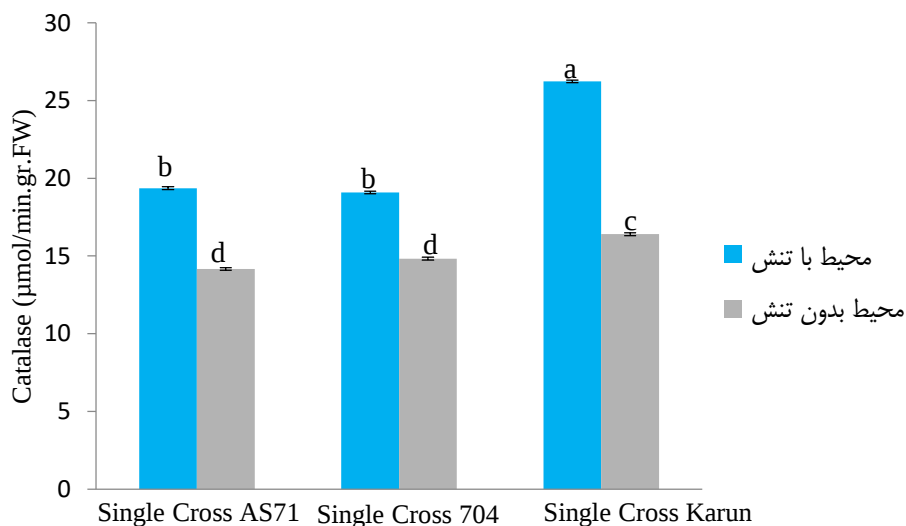
**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد، معنی‌داری در سطح ۵ درصد و عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

**, * and n.s denote significance at the 1% and 5% probability levels, and non-significance at the 5% level, respectively.



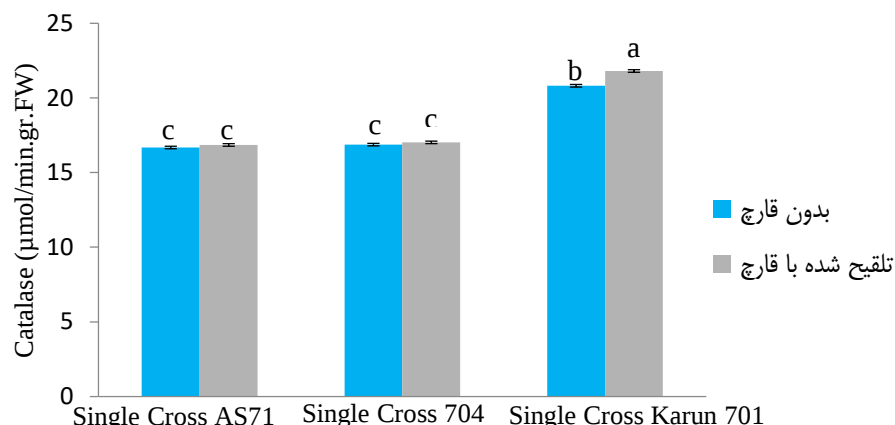
شکل ۲. مقایسه میانگین اثر رقم بر فعالیت آنزیم کاتالاز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 2. Effect of cultivar on catalase activity: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تاریخ کاشت و رقم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 3. Effect of cultivation date and cultivar on catalase activity: Means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر رقم و قارچ بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۵ درصد)

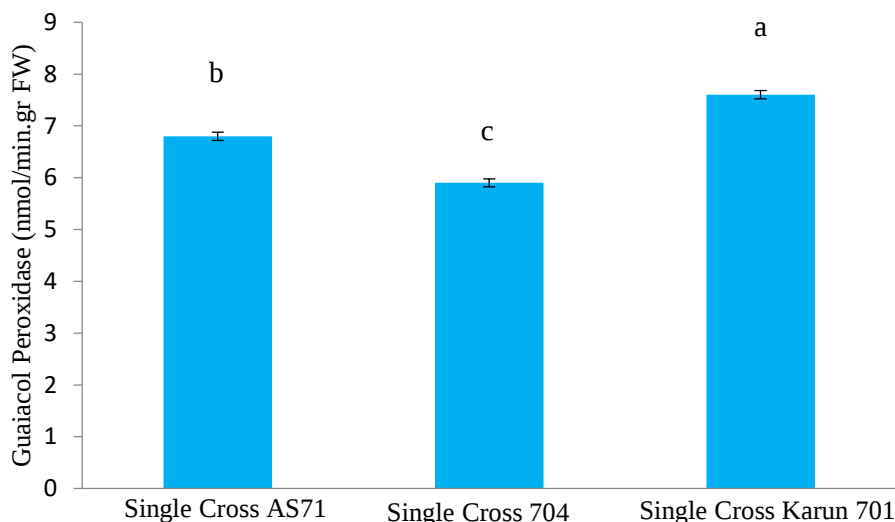
Figure 4. Effect of cultivar and fungus on catalase activity: Means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.05$. Means with the same letter are not significantly different from each other

مشابه با فعالیت آنزیم کاتالاز، در خصوص آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز اثرات متقابل بین تاریخ کشت و رقم و همچنین بین رقم و قارچ معنی‌دار بودند (جدول ۱). طبق شکل ۶ (مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و تاریخ کاشت)، هیبرید کارون در هر دو حالت کشت (نرمال و تنش گرما) حاوی بالاترین فعالیت آنزیمی بود و در هر سه رقم تنش باعث افزایش میزان فعالیت این آنزیم شده است. شکل ۷ مقایسه میانگین اثر متقابل بین رقم و قارچ واکنش متفاوت ارقام ذرت به همزیستی با قارچ را نشان داد. رقم کارون همزیستی موثرتری را در این زمینه با قارچ ایجاد نمود. حال آن که تاثیر قارچ در افزایش میزان فعالیت این آنزیم در دو رقم دیگر (نسبت به حالت شاهد) معنی‌دار نبود. به‌طوری‌که حتی در رقم سینگل کراس ۷۰۴ این اختلاف منفی بود. مطابق با شکل ۶ همزیستی قارچ *S. indica* فقط با رقم کارون مشابه با فعالیت آنزیم کاتالاز، باعث افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز شده است.

مالون‌دی‌آلدئید: تجزیه مرکب داده‌های مربوط به میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (جدول ۱) نشان داد که اثر تاریخ کشت و رقم در سطح آماری ۱ درصد و همچنین اثر قارچ در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش و نرمال به‌ترتیب ۷/۸ و ۵ میکروگرم به‌ازای هر گرم بافت تر برگ ($\mu\text{g/g FW}$) بود. مقایسه میانگین میزان MDA در ارقام نشان داد که رقم ۷۰۴، و رقم کارون به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان MDA بودند (شکل ۸). میانگین میزان MDA برای گیاهان تلقیح شده و نشده با قارچ به‌ترتیب برابر با ۶/۲ و ۶/۶ میکروگرم به‌ازای هر گرم بافت تر برگ بود که نشان‌دهنده اثر مثبت این قارچ در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها است.

تجزیه مرکب برای اثرات متقابل (جدول ۱) نیز نشان داد که تنها اثر متقابل بین تاریخ کشت و رقم معنی‌دار بود و برخلاف

میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، اثر متقابل قارچ در رقم معنی‌دار نگردید. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (شکل ۹) گیاهان مربوط به هر رقم در شرایط تنش بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید را داشتند که مورد انتظار نیز بود. رقم مقاوم به گرما و خشکی کارون در هر دو شرایط برخلاف فعالیت‌های آنزیمی دارای کمترین میزان MDA نسبت به دو هیبرید دیگر بود. میزان افزایش MDA در شرایط تنش در هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ نسبت به دو هیبرید دیگر بیشتر بود.

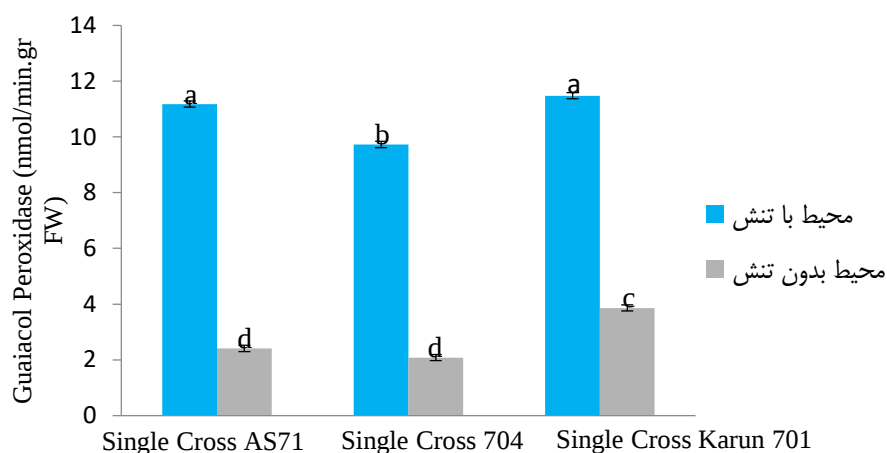


شکل ۵. مقایسه میانگین اثر رقم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 5. Effect of cultivar on Guaiacol Peroxidase activity: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other

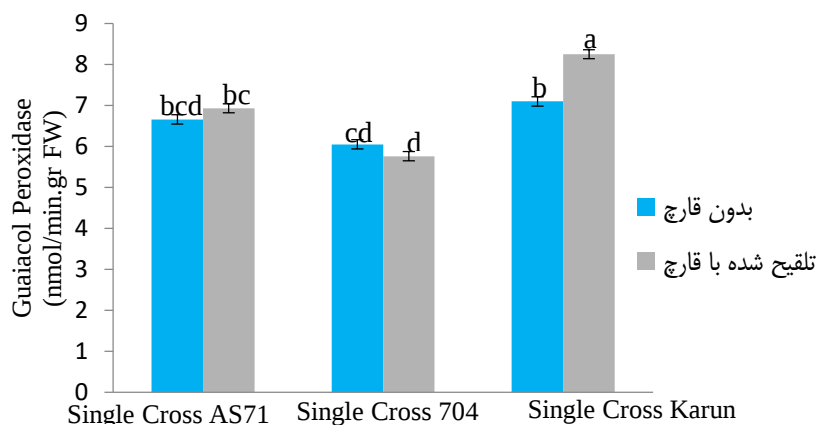
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که قارچ اندوفیت *S. indica* تأثیر قابل توجهی بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در ذرت تحت تنش گرمایی دارد. این نتایج هم‌راستا با یافته‌های Xu et al. (2017) است که گزارش کردند تلقیح ذرت با *S. indica* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش شاخص‌های آسیب اکسیداتیو شد. همچنین مطالعه‌ای بر روی جو توسط Baltruschat et al. (2008) نیز نشان داد که قارچ *S. indica* با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، مقاومت گیاه به تنش شوری را افزایش می‌دهد. در مطالعه Sabeem et al. (2022) نیز این قارچ علاوه بر افزایش بیوماس گیاه و افزایش تحمل گیاه به تنش شوری، باعث افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در هر دو شرایط نرمال و تحت تنش شوری در نخل خرما گردید. گزارش‌های Ji et al. (2024) و Li et al. (2021) نیز افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در نتیجه تلقیح گیاهانی نظیر رز و موز با این قارچ به ترتیب تحت تنش‌های گرما و سرما گزارش کرده‌اند. تأثیر قارچ بر روی ارقام مختلف ذرت بر روی میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکسان نبود. هیبرید کارون که برای تحمل به تنش خشکی و گرما به‌نژادی شده است (Barzegari et al. 2013)،

همزیستی موفق‌تری با قارچ نسبت به دو رقم هیبرید دیگر ذرت داشت. معنی‌دار شدن اثر متقابل ژنوتیپ با قارچ نیز موید این نکته بود و اهمیت بررسی تعامل بین ژنوتیپ گیاه و قارچ را برجسته می‌سازد.



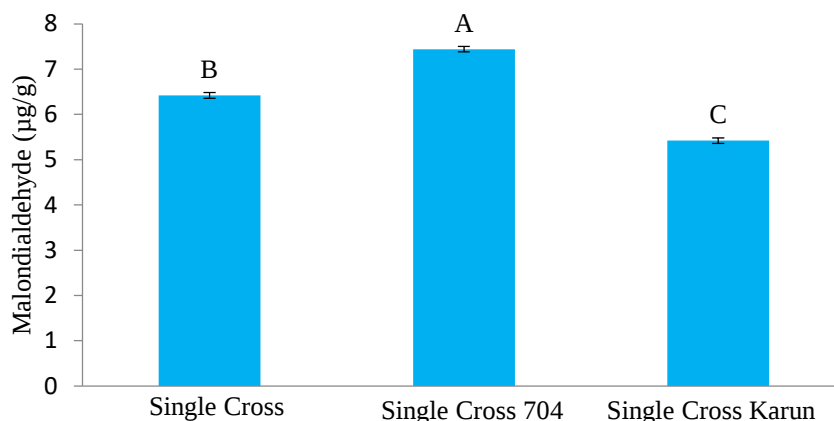
شکل ۶. مقایسه میانگین اثر محیط و رقم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 6. Effect of cultivation date and cultivar on Guaiacol peroxidase activity: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other



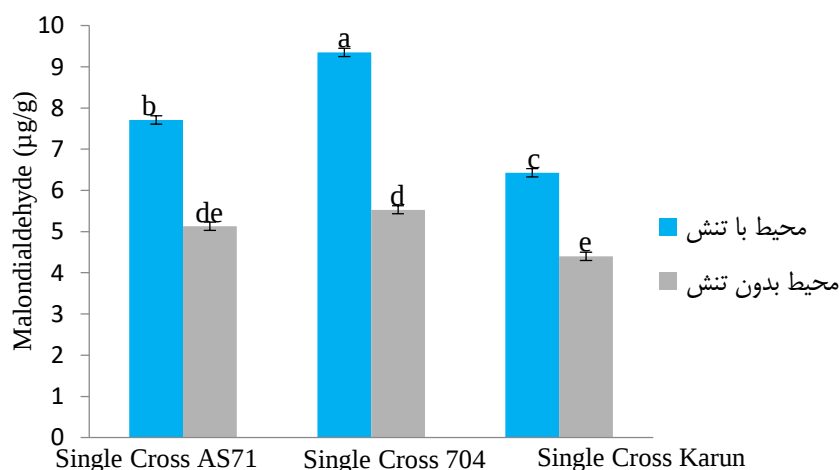
شکل ۷. مقایسه میانگین اثر رقم و قارچ بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 7. Effect of cultivar and fungus on Guaiacol peroxidase activity: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر رقم بر میزان مالون دی آلدئید. میانگین‌ها با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 8. Effect of cultivar on Malondialdehyde content: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر تاریخ کشت و رقم بر میزان مالون دی آلدئید. حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد)

Figure 9. Effect of cultivation date and cultivar on Malondialdehyde content: means comparison by Duncan's test, $\alpha = 0.01$. Means with the same letter are not significantly different from each other

در مطالعه Saddique et al. (2018) اثر قارچ *S. indica* بر روی سه ژنوتیپ مختلف برنج که از لحاظ تحمل به شوری

در سه دسته متحمل، نیمه متحمل و حساس قرار می‌گرفتند، در شرایط تنش خشکی مطالعه و میزان کل فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی آن را بررسی نمودند. آن‌ها نیز اثر متقابل بین قارچ و ژنوتیپ گیاه را گزارش نمودند. مشابه با یافته‌های مطالعه حاضر، ژنوتیپ متحمل در همزیستی با قارچ بالاترین سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد.

نتیجه‌گیری: تاکنون مطالعات اندکی به بررسی اثر متقابل بین قارچ *S. indica* و ژنوتیپ گیاه پرداخته‌اند. با توجه به

اینکه در این پژوهش چنین اثر متقابلی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد، پیشنهاد می‌شود که این تعامل در ارتباط با صفات فنوتیپی و عملکردی گیاه نیز مورد بررسی قرار گیرد. چنانچه اثر متقابل معنی‌داری بین قارچ و ژنوتیپ برای صفات زراعی کلیدی مشاهده شود، انتخاب ژنوتیپ‌هایی با توانایی همزیستی مؤثرتر با قارچ می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد نوین در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی مورد توجه قرار گیرد.

References

- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., ... & Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180(2), 501-510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x>
- Barzegari, M., Choukan, R., Afsharmanesh, G. R., & Ghasemi Ilami, S. (2013). Single-cross corn hybrid Karun 701 with high grain yield and drought stress tolerance. *Research Findings in Agricultural and Horticultural Plants*, 2(2), 155-164 [In Persian]
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1995). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Dazy, M., Jung, V., Féraud, J. F., & Masfaraud, J. F. (2008). Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere*, 74(1), 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.014>
- Distéfano, A. M., Bauer, V., Cascallares, M., López, G. A., Fiol, D. F., Zabaleta, E., & Pagnussat, G. C. (2024). Heat stress in plants: sensing, signalling, and ferroptosis. *Journal of Experimental Botany*, 76(5), 1357-1369. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae296>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>

- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Janni, M., Maestri, E., Gulli, M., Marmioli, M., & Marmioli, N. (2024). Plant responses to climate change, how global warming may impact on food security: A critical review. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1297569. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1297569>
- Ji, H., Zhang, M., Huang, C., Lin, W., Lu, Y., Wang, P., ... & Guo, L. (2024). The Impact of *Piriformospora indica* on plant heat and drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1479561. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1479561>
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., & Johri, A. K. (2009). Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*, 155(3), 780-790. <https://doi.org/10.1099/mic.0.019869-0>
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White Jr, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology*, 66(4), 268-276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
- Li, D., Bodjrenou, D. M., Zhang, S., Wang, B., Pan, H., Yeh, K. W., ... & Cheng, C. (2021). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms banana to cold resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4973. <https://doi.org/10.3390/ijms22094973>
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., & Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1110622. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1110622>
- Morales-Vargas, A. T., López-Ramírez, V., Álvarez-Mejía, C., & Vázquez-Martínez, J. (2024). Endophytic fungi for crops adaptation to abiotic stresses. *Microorganisms*, 12(7), 1357. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071357>
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K. H., & Schäfer, P. (2012). *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 508-518. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00764.x>
- Sabeem, M., Abdul Aziz, M., Mullath, S. K., Brini, F., Rouached, H., & Masmoudi, K. (2022). Enhancing growth and salinity stress tolerance of date palm using *Piriformospora indica*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1037273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1037273>

- Saddique, M. A. B., Ali, Z., Khan, A. S., Rana, I. A., & Shamsi, I. H. (2018). Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0226-1>
- Saleem, S., Sekara, A., & Pokluda, R. (2022). *Serendipita indica*—a review from agricultural point of view. *Plants*, 11(24), 3417. <https://doi.org/10.3390/plants11243417>
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütehorn, B., & Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2741-2744. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2741-2744.1999>
- Verma, A., Shameem, N., Jatav, H. S., Sathyanarayana, E., Parray, J. A., Poczai, P., & Sayyed, R. Z. (2022). Fungal endophytes to combat biotic and abiotic stresses for climate-smart and sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 13, 953836. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953836>
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., ... & Kogel, K. H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13386-13391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504423102>
- Xu, L., Wang, A., Wang, J., Wei, Q., & Zhang, W. (2017). *Piriformospora indica* confers drought tolerance on *Zea mays* L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes. *The Crop Journal*, 5(3), 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.10.002>
- Zhang, W., Wang, J., Xu, L., Wang, A., Huang, L., Du, H., ... & Oelmüller, R. (2018). Drought stress responses in maize are diminished by *Piriformospora indica*. *Plant Signaling & Behavior*, 13(1), e1414121. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1414121>