五种漠境深色有隔内生真菌对小麦促生抗旱效应研究

刘燕霞¹, 龙俊萌¹, 王静茹¹, 李海超¹, 李夏^{1,2*}, 贺学礼^{1,2*}

1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002;

2. 河北大学生命科学与绿色发展研究院, 保定 071002

* 联系人, E-mail: wulan2050@126.com; xlh3615@126.com

收稿日期: 2021-07-10; 接受日期: 2021-08-12; 网络版发表日期: 2021-09-14

国家自然科学基金(批准号: 31800345, 31770561)、河北省自然科学基金(批准号: C2020201043)和河北省研究生创新资助项目(批准号: CXZZSS2021014)资助

摘要 干旱是限制小麦生产力的主要环境压力之一, 而全球水资源短缺将进一步加剧这种情况. 因此, 通过可持续的方法提高小麦产量和抗旱性已迫在眉睫. 内生真菌与植物共生已被广泛研究, 而野生植物丰富的共生真菌为有益菌株筛选提供了更多选择. 本研究选取禾本科荒漠植物沙鞭根系分离的5种深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)为研究对象, 体外模拟干旱胁迫以筛选高效抗旱菌株; 人工接种实验考察接种小麦的营养生长、根系发育、抗逆生理、籽粒产量及土壤营养等指标, 探究DSE对小麦促生抗旱的潜力. 结果表明, DSE在体外培养条件下均具有干旱胁迫耐性, 共筛选2种优势菌株, 分别为*Alternaria sorghi*(As)和*Alternaria alternata*(Aa). 在干旱条件下, 接种漠境DSE显著提高了小麦籽粒产量、根长、根表面积及地上部氮含量, 且As, Aa和*Alternaria chlamydosporigena*对小麦的促生抗旱作用较强. 此外, 接种DSE的小麦生长基质中有机碳含量显著增加. 综上所述, Aa和As在小麦促生抗旱研究中具有较好的应用潜力.

关键词 深色有隔内生真菌, 小麦, 干旱, 沙鞭, 荒漠

小麦(*Triticum aestivum* L.)属禾本科(Poaceae)植物, 是全球主要粮食作物之一^[1], 且中国是世界上最大的小麦生产国和消费国^[2]. 然而, 我国约70%的小麦分布在干旱与半干旱区, 由于干旱造成的小麦减产和籽粒品质不高问题始终存在^[3,4]. 长久以来, 如何通过可持续的方法提高小麦产量是人们广泛关注的课题^[5]. 除传统育种和基因工程等方法外, 引入新型微生物技术已被证明是有效且经济可行的^[6,7]. 研究表明, 从野

生植物中分离的内生真菌能够促进小麦的生长发育, 增强其抗旱性^[7-9]. 如分离自沙伦山羊草*Aegilops sharonensis*的两株内生真菌能够人工接种小麦幼苗, 并促进干旱条件下宿主的叶片及根系生长, 降低干旱对植物的伤害^[8].

目前, 通过共生真菌提高植物抗旱性已被广泛报道^[10,11]. 其中, 深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)因其宿主专一性不强、可体外培养等特性

引用格式: 刘燕霞, 龙俊萌, 王静茹, 等. 五种漠境深色有隔内生真菌对小麦促生抗旱效应研究. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1339–1349
Liu Y X, Long J M, Wang J R, et al. Effects of five dark septate endophytes isolated from deserts on growing wheat under drought stress (in Chinese).
Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1339–1349, doi: 10.1360/SSV-2021-0313

成为研究热点^[12,13]。DSE是定殖于健康植物根部的具有深色有隔菌丝及微菌核结构的一类真菌, 分布广泛, 尤其是在干旱、寒冷、高海拔、重金属污染等逆境生态系统^[13~18]。作为重要的根系共生真菌, DSE能够为宿主植物带来多种有益影响, 如促进植物生长和水分养分吸收, 增强植物对胁迫的抵御能力等^[19,20]。此外, DSE还使宿主所在土壤的氮磷等物质转化为可利用形式以扩大营养库^[21,22], 从而促进植物的生长。然而不同DSE真菌对宿主的影响能力不同, 因此发掘高效抗旱的真菌资源并探明其促生机理对旱区小麦栽培具有重要意义。

DSE宿主专一性不强的特性预示其具有应用于非宿主植物的潜力^[23]。目前, 非作物植物根系分离的DSE已被证明能够成功接种番茄、玉米等作物^[24,25], 并对植物生长有益。此外, 相比人工栽培作物, 自然生境的野生植物通常具有更丰富的共生真菌资源, 为有益菌株筛选提供了更多选择。我国西北荒漠生境复杂, 形成了许多特有的生物资源。其中, 沙鞭(*Psammochloa villosa*)是禾本科多年生草本植物, 主要分布于我国内蒙古高原沙地, 是极端荒漠分布的先锋植物和关键种, 具有较强的耐旱和抗风沙能力^[26]。有研究发现, 沙鞭能与DSE形成良好共生关系^[27], 而沙鞭的高耐旱性也可能与其根部DSE有关, 具有巨大的开发潜力。

由于DSE可体外培养, 因此能在可控条件下通过人工接种方式研究其对宿主植物的影响。本文选取荒漠植物沙鞭分离的5种DSE真菌, 一方面通过体外培养筛选高效抗旱菌株; 另一方面将其接种至小麦幼苗并施加干旱胁迫, 考察漠境DSE对小麦生长及产量的影响, 筛选出能够提高小麦抗旱性的优势DSE菌株, 为小麦高产栽培提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 供试真菌及植物材料

5种供试DSE真菌分离自沙鞭根系, 分别为*Curvularia spicifera*(Cs), *Alternaria alternata*(Aa), *Alternaria chlamydosporigena*(Ac), *Alternaria doliconidum*(Ad), *Alternaria sorghi*(As)^[27]。菌株生长基质为改良的MMN培养基: 葡萄糖15.0 g; MgSO₄·7H₂O 0.15 g; 柠檬酸(C₆H₈O₇)0.2 g; (NH₄)₂HPO₄ 0.25 g; KH₂PO₄ 0.5 g; CaCl₂ 0.05 g; NaCl 0.025 g; VB₁ 100 μg; FeCl₃(1%)

1.2 mL; 蒸馏水1000 mL; pH值5.5~6.0。供试菌株在培养基上生长2周后备用。

人工接种实验目标植物为小麦。挑取饱满均一的种子进行表面灭菌, 即将种子放入3%的NaClO中浸泡3 min, 之后使用无菌水冲洗3次, 放入含灭菌滤纸的玻璃培养皿中, 27℃下黑暗培养, 待种子萌发露白后播种。小麦生长基质为河沙, 经121℃, 2 h高压蒸汽灭菌后备用。

1.2 DSE体外抗旱菌株筛选

通过在MMN培养基中添加不同浓度聚乙二醇-6000(PEG-6000)模拟干旱胁迫, 筛选高效抗旱菌株。PEG浓度分别为0%(PEG-0)、6%(PEG-6)、18%(PEG-18)、30%(PEG-30), 共4个处理, 每个处理设置4个重复。使用无菌打孔器取直径5 mm的DSE菌饼分别放入不同处理固体和液体培养基, 27℃黑暗培养, 分别考察DSE在干旱胁迫下的生长特性和生理响应。处理期间, 对固体培养处理进行隔天观察, 记录菌落颜色、形态, 测量菌落直径, 计算生长速率。观察不同处理下DSE菌丝微观形态及产孢情况。对于液体培养处理, 27℃、120 r/min培养15 d后, 测定真菌菌丝超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、黑色素和可溶性蛋白含量、真菌生物量等。SOD活性采用氮蓝四唑法^[28]测定, 黑色素的提取与含量测定参考Zhan等人^[29]的方法, 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定^[28]。

1.3 人工接种实验

(1) 实验设计。在干旱条件下分别设置5种DSE接种(Cs, Aa, Ac, Ad, As)及未接种对照(CK), 共6个水平, 每个处理设置4个重复。具体操作如下: 无菌条件下, 将沙鞭DSE人工接种至小麦幼苗。每盆1株幼苗, 同时每株幼苗根旁放入1个直径5 mm的DSE菌饼, 对照接种未生长DSE的培养基, 20 d后进行DSE定殖情况检测。接种成功的幼苗置于光照培养箱(14 h光照/10 h黑暗, 27℃/22℃, 湿度60%)中生长三个月。干旱胁迫处理: 采用称重法, 保持生长基质土壤含水量为40%田间持水量。每周随机调换培养盆的位置, 以保证其不受位置效应影响。胁迫处理后收获植物及生长基质, 并进行相关指标测定。

(2) 指标测定。实验结束后, 将小麦地上和地下部分分开收获, 并洗去根部表面残留土壤。将每株植物根

系洗净后放入装有蒸馏水的透明扫描盘内, 使用EPSON V800扫描仪(Epson, Japan)以400 dpi分辨率扫描获取根系图像, 使用WinRHIZO 2019图形分析系统(Regent Instruments Inc., Canada)获取根系相关数据(如总根长、总根表面积等)^[30]. 之后, 随机挑取少量根系使用酸性品红染色法进行DSE定殖观察, 并计算定殖率^[27]. 计算方法如下: DSE定殖率%=(侵染根段数/总根数)×100%.

植物样品剩余部分在80℃烘箱内烘干48 h至恒重计算生物量. 使用全自动智能化学分析仪Smartchem200测定植株全氮、全磷含量. 将生长基质自然风干后, 使用钼锑抗比色法测定速效磷含量^[31], 使用灼烧法测定有机碳含量^[32].

1.4 数据分析

采用SPSS 26.0对所得数据进行单因素和双因素方差分析.

2 结果

2.1 体外培养条件下DSE对干旱胁迫的响应

(1) 菌落形态与生长特性. 干旱胁迫下DSE菌落及菌丝生长响应如图1所示. 多数DSE真菌随着干旱胁迫的增加, 菌落颜色加深, 但在高胁迫条件下菌落颜色变浅、结构疏松. 个别DSE真菌菌丝结构发生改变. *Cs*和*Ac*随干旱胁迫增加, 菌丝颜色加深、菌丝直径增加、隔间距降低, 且*Cs*产孢量增加.

DSE种类、干旱胁迫及其交互作用对真菌生长速率影响显著(表1). 随着胁迫程度的增加, 大多数DSE菌株的生长速率表现为先增加后降低的趋势, 并在中度干旱胁迫下达到最大值. 与不加PEG的对照处理相比, *As*随干旱胁迫增强, 菌落生长速率显著升高, 甚至在最高胁迫处理下生长良好. *Aa*, *Ad*和*Ac*随干旱胁迫增加生长速率呈先升后降趋势, 并在PEG-18时达到最大值. *Cs*在干旱胁迫下生长受到抑制, 但在最高胁迫处理下生长速率与对照无显著差异(表2).

(2) 真菌生物量. 与不加PEG的对照处理相比, *Cs*菌株的生物量在所有胁迫处理下均显著增加, 而其他DSE的生物量随PEG浓度增加而增加或无显著差异(表1, 图2A). 随干旱胁迫增强, *Aa*, *Ad*和*As*的生物量呈先增后降的趋势, 并在PEG-6时达到最大值, 分别高于

对照120.5%, 49.9%和33.9%. *Ad*在PEG-30时生物量显著低于对照, 而*As*在干旱胁迫下生物量均显著高于对照. 随干旱胁迫增强, *Ac*的生物量在所有胁迫处理下均未受到不利影响, 与对照处理无显著差异(图2A).

(3) 真菌抗旱生理指标. DSE种类、干旱胁迫及二者交互作用对DSE黑色素含量影响显著(表1). 在胁迫处理下, *Cs*随干旱程度增强, 黑色素含量呈先升后降趋势, 并在PEG-6时达到最大值, 显著高于对照. 而其他菌株的黑色素含量在胁迫处理下表现为降低或无影响(图2B).

在胁迫处理下, DSE真菌的可溶性蛋白含量表现为增加或无影响. 与未添加PEG的对照相比, *Aa*, *Ac*, *As*随干旱胁迫增大可溶性蛋白含量升高, 并在高胁迫处理下达到最大值, 而*Cs*和*Ad*在低胁迫处理下(PEG-6)达到最大值(表1, 图2C).

在低胁迫处理条件下, DSE真菌的SOD活性与对照无显著差异或降低(*Aa*). 但随着干旱胁迫增强, 其SOD活性显著提高, 并在PEG-18(*Aa*)或PEG-30(*Cs*, *Ac*, *Ad*, *As*)达到最大值(表1, 图2D).

2.2 DSE接种对小麦的促生抗旱效应

实验结束后, 在接种处理的小麦根内均能观察到典型的DSE结构, 菌丝有隔, 棕色或褐色. 而在对照植株根系未观测到DSE真菌结构, 如图3A, 说明荒漠植物根系DSE能够成功接种非宿主植物小麦. 其中*Aa*的定殖率最高, 显著高于*Ac*, *Ad*和*As*(图3B).

(1) 小麦营养生长及产量. 接种DSE对小麦植株生物量无显著有益影响, 但促使宿主分配更多的生物量用于生殖生长. 与对照植株相比, 接种DSE的小麦地上和根系生物量并无显著差异(图4A), 但DSE真菌增加了宿主植物麦粒占地上生物量的比重(图4B). 除*Cs*外, DSE真菌均使宿主麦粒比重显著增加, 接种*Ac*, *Aa*, *Ad*和*Aa*分别使麦粒比重较对照增加68.4%, 60.7%, 27.7%和41.5%.

接种DSE对小麦根系生长具有促进作用, 但仅在部分植株表现出显著有益影响. 接种*As*的小麦根长显著高于对照植株, 而接种*Cs*和*As*显著增加了宿主小麦的根表面积(图4C和D).

(2) 小麦植株营养元素含量. DSE真菌改变了小麦植株的营养分配, 促进氮素向地上部供应. 与对照相比, 接种DSE显著增加了宿主地上部总氮含量, 但根

图 1 不同干旱胁迫下5种DSE真菌菌落与微观形态特征。1~4分别表示PEG浓度为0%, 6%, 18%, 30%
Figure 1 Colony and mycelium morphology of five DSE strains under drought stress. The numbers 1~4 show 0%, 6%, 18%, and 30% PEG concentration, respectively

表 1 DSE种类和干旱胁迫对5种DSE生长速率及生理特性影响的双因素方差分析^{a)}

Table 1 Two-way analysis of variance of DSE species and drought stress on the growth rate and physiological characteristics of five DSE strains

测定指标	DSE种类		干旱胁迫		DSE种类*干旱胁迫	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
生长速率	98.17	<0.001	39.32	<0.001	10.79	<0.001
生物量	37.41	<0.001	17.13	<0.001	13.50	<0.001
黑色素	16.61	<0.001	69.64	<0.001	16.97	<0.001
可溶性蛋白	72.32	<0.001	58.16	<0.001	19.13	<0.001
SOD活性	30.01	<0.001	45.68	<0.001	11.70	<0.001

a) 加粗字体表示差异显著

表 2 不同干旱胁迫下5种DSE真菌的生长速率(cm d⁻¹)^{a)}

Table 2 Growth rate (cm d⁻¹) of five DSE strains under drought stress^{a)}

真菌	PEG-0	PEG-6	PEG-18	PEG-30
<i>Cs</i>	1.06±0.05a	0.82±0.03b	0.92±0.07b	1.10±0.16a
<i>Aa</i>	0.62±0.02b	0.65±0.01b	0.77±0.03a	0.63±0.05b
<i>Ac</i>	0.60±0.01c	0.68±0.02b	0.88±0.08a	0.71±0.01b
<i>Ad</i>	0.52±0.02b	0.56±0.03b	0.75±0.12a	0.61±0.08b
<i>As</i>	0.36±0.07c	0.36±0.01c	0.61±0.10b	0.72±0.09a

a) 不同小写字母表示同一菌株在不同干旱胁迫下的生长速率差异显著(*P*<0.05)

图 2 不同干旱胁迫下5种DSE的生长及生理指标. 误差线上不同小写字母表示同一菌株不同处理间差异显著(*P*<0.05)

Figure 2 Growth and physiological indexes of five DSE strains under different drought stress. Different lowercase letters above the error bars indicate significant differences at *P*<0.05 for each strain

图3 接种3个月后小麦根内DSE定殖情况. 不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$). 下同

Figure 3 Colonization status of DSE in the roots of wheat seedlings three months after inoculation. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below

系总氮含量多表现为负效应(图4E). 接种Cs和Ad后, 小麦地上部总氮含量较对照显著增加. 接种DSE均提高了小麦植株地上/根系的总氮含量比值, 除Cs外, 接种植株的地上总氮含量所占比例均显著高于对照(图4F).

大多数DSE对小麦植株的总磷含量无显著有益影响, 仅接种Ad和As后根系总磷含量显著高于对照(图4G). 与对照相比, 接种DSE真菌有降低小麦植株地上/根系总磷含量比值的趋势, 但均无显著差异(图4H).

(3) 生长基质元素含量. 接种DSE真菌改变了生长基质中的营养元素含量. 与对照相比, 接种不同DSE均增加了基质有机碳含量, 且As, Ad和Aa影响显著(图4I). 而接种DSE真菌对基质中有效磷含量无显著影响(图4J).

3 讨论

3.1 DSE真菌对干旱胁迫的响应

本实验中, 纯培养条件下多数DSE的生长未受到

干旱胁迫的显著不利影响, 且生物量积累及生长速率明显增加. 由于不同真菌抗旱能力存在差异, 共筛选2株高效抗旱菌株, 分别为As和Aa. 此外, 本研究发现中度胁迫处理更适宜DSE生长. Santos等人^[33]研究也发现DSE在干旱胁迫下的生长比对照增加近50%. DSE对干旱基质的偏好性可能与其原生境有关. 沙鞭分布区通常干旱、少雨, 土壤可利用水分较低. 在长期进化中, DSE较好地适应了干旱环境, 适宜在偏旱条件下生长^[34].

水分胁迫通常会对生物体产生不利影响, 并引发细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)损伤^[35]. 黑色素是DSE真菌细胞壁的重要成分, 能够作为抗氧化物质缓解活性氧伤害, 被认为是胁迫环境下真菌生存的重要因子^[29,36]. 本研究中, Cs在低干旱胁迫下黑色素含量增加, 可能是黑色素被合成以修复干旱胁迫下的氧化损伤. 在外生菌根研究中, 黑色素也被发现在真菌应对水分胁迫中发挥作用^[37]. 然而, 其他菌株黑色素含量在干旱胁迫下显著低于对照或不变, 说明黑

图 4 DSE接种对小麦生长、产量及基质的影响

Figure 4 Effect of DSE inoculation on the growth, yield, and soil substrate of wheat seedlings

色素对真菌抗旱的作用与DSE种类有关。研究者在重金属胁迫研究中也发现相似结果^[38]。SOD被认为是能够清除活性氧的重要酶类之一^[39]。本研究中的5株DSE真菌在干旱胁迫下的SOD活性均高于对照, 说明SOD可能被合成用于ROS的清除。此外, DSE真菌在干旱胁迫下的可溶性蛋白含量也高于对照。可溶性蛋白作为重要的渗透调节物质, 可能在维持细胞膨压、抵御干旱环境等方面发挥了作用^[39]。然而, 由于植物抗氧化酶系统易受多种因素影响, 因此DSE真菌应对干旱胁迫的具体机制还有待进一步研究。

3.2 DSE接种对小麦的促生抗旱效应

已有研究表明, DSE能够促进非宿主作物, 如黄瓜、高粱等的生长^[40,41]。本研究也发现, 所有DSE均能成功定殖于小麦根系, 并对其生长和抗旱性有益。本研究与前人结论一致, 即DSE能够作为非宿主定殖者发挥有益影响。本研究进一步说明, 漠境DSE真菌可能在促进植物抗旱方面具有更高的潜力, 但不同真菌提高植物抗旱性能力不同, 所以筛选抗旱潜力较高且具有促生作用的DSE菌株具有重要意义。

尽管DSE对干旱条件下小麦植株生物量影响不显著, 但4株DSE真菌在接种小麦后宿主麦粒重相比对照均显著增加。这可能与接种DSE改变了小麦的生长策略, 促使其将更多营养物质分配至生殖生长有关, 从而提高小麦产量。Hubbard等人^[9]研究也发现, 室内培养条件下, 从野生小麦分离的内生真菌能够增加作物小麦的籽粒产量。研究表明, 小麦籽粒产量与其开花期到成熟期的光合生产能力和氮积累有关^[42]。本文发

现, 接种DSE的小麦地上/根系总氮含量比值显著高于对照, 且麦粒比重与小麦根系氮含量呈负相关, 这可能是由于DSE促使小麦将更多的氮素从根系转运至地上部, 最后供给穗部用于籽粒生长。在其他禾本科作物中, Vergara等人也发现接种DSE提高了水稻植株的氮含量与积累^[43]。

干旱条件下, DSE对小麦的促生作用还表现在促进宿主根系生长。发育较深且复杂的根系能够调控植物对土壤中水分及营养物质的吸收, 最终影响植物生长^[44]。已有多种包含DSE在内的微生物被报道能够影响植物的根系结构^[45,46]。例如, Valli和Muthukumar^[47]发现, DSE能够促进干旱条件下番茄的根系发育, 增加宿主根长及主根直径等参数, 进而促进植物生长。本研究中接种DSE真菌增加了小麦的根长和根表面积, 说明其可能通过延伸宿主根系来促进小麦水分吸收。其中As促进小麦根系生长的作用较强。

DSE真菌不仅能影响植物生长, 还对共生体所在基质产生影响。小麦接种DSE后, 生长基质中的有机碳含量均有不同程度增加。这可能是由于DSE矿化了土壤中的有机化合物。例如, 研究者发现DSE真菌*Phialocephala fortinii*能够分解基质中含C、N、P的聚合化合物, 如纤维素、淀粉和蛋白质等^[21]。总体来说, As和Aa在干旱胁迫下自身具有较强的抗旱性, 且对非宿主植物小麦具有促生抗旱作用, 这两种DSE真菌在小麦抗旱栽培中具有较好的应用潜力。考虑到田间DSE的应用可能受到多种环境微生物的影响, 在今后的研究中将继续探讨自然生境中DSE的作用潜力及影响机制, 为其作为生物制剂用于农业生产提供理论支持。

参考文献

- 1 Yadav A K, Carroll A J, Estavillo G M, et al. Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse-imposed drought. *J Exp Bot*, 2019, 70: 4931–4948
- 2 Qin X, Feng F, Li Y, et al. Maize yield improvements in China: past trends and future directions. *Plant Breed*, 2016, 135: 166–176
- 3 Jin N, Ren W, Tao B, et al. Effects of water stress on water use efficiency of irrigated and rainfed wheat in the Loess Plateau, China. *Sci Total Environ*, 2018, 642: 1–11
- 4 Li Z, Zhang Z, Zhang L. Improving regional wheat drought risk assessment for insurance application by integrating scenario-driven crop model, machine learning, and satellite data. *Agric Syst*, 2021, 191: 103141
- 5 Curtis T, Halford N G. Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann Appl Biol*, 2014, 164: 354–372
- 6 Fan Q J, Liu J H. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungus affects growth, drought tolerance and expression of stress-responsive genes in *Poncirus trifoliata*. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33: 1533–1542

- 7 García-Parisi P A, Gavilán S A, Casas C, et al. A fungal endophyte of an annual weed reduces host competitive ability and confers associational protection to wheat. *Basic Appl Ecol*, 2021, 50: 16–24
- 8 Llorens E, Sharon O, Camañes G, et al. Endophytes from wild cereals protect wheat plants from drought by alteration of physiological responses of the plants to water stress. *Environ Microbiol*, 2019, 21: 3299–3312
- 9 Hubbard M, Germida J J, Vujanovic V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *J Appl Microbiol*, 2013, 116: 109–122
- 10 Zhong T, Zhang L, Sun S, et al. Effect of localized reduction of gibberellins in different tobacco organs on drought stress tolerance and recovery. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8: 399–408
- 11 González-Teuber M, Urzúa A, Plaza P, et al. Effects of root endophytic fungi on response of *Chenopodium quinoa* to drought stress. *Plant Ecol*, 2018, 219: 231–240
- 12 Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol*, 2005, 53: 173–189
- 13 Zhang Y, Zhang Y, Liu M, et al. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. *J Microbiol*, 2008, 46: 624–632
- 14 Mandyam K, Fox C, Jumpponen A. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza*, 2012, 22: 109–119
- 15 Cofré M N, Becerra A G, Nouhra E R, et al. Arbuscular mycorrhizae and dark-septate endophytes on *Atriplex cordobensis* in saline sites from Argentina. *J Agr Sci Tech*, 2012, 8: 2201–2214
- 16 Porras-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh R L, et al. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 2805–2813
- 17 Li X, He C, He X, et al. Dark septate endophytes improve the growth of host and non-host plants under drought stress through altered root development. *Plant Soil*, 2019, 439: 259–272
- 18 Zhao Z W, Li T. Dark septate endophytes and their ecological function in metal mining areas (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 921–926 [赵之伟, 李涛. 重金属矿区深色有隔内生真菌资源及其生态学功能. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 921–926]
- 19 Newsham K K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol*, 2011, 190: 783–793
- 20 Rodriguez R J, White Jr J F, Arnold A E, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*, 2010, 182: 314–330
- 21 Surono, Narisawa K. The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. *Fungal Ecol*, 2017, 28: 1–10
- 22 Hou L, Yu J, Zhao L, et al. Dark septate endophytes improve the growth and the tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* under cadmium stress. *Front Microbiol*, 2020, 10: 3061
- 23 Li X, He X, Hou L, et al. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Sci Rep*, 2018, 8: 7896
- 24 Zhu L, Li T, Wang C, et al. The effects of dark septate endophyte (DSE) inoculation on tomato seedlings under Zn and Cd stress. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25: 35232–35241
- 25 Wang J L, Li T, Liu G Y, et al. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Sci Rep*, 2016, 6: 22028
- 26 Li Y, He X, Zhao L. Tempo-spatial dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi under clonal plant *Psammochloa villosa* Trin. *Bor* in Mu Us sandland. *Eur J Soil Biol*, 2010, 46: 295–301
- 27 Hou L, He X, Li X, et al. Species composition and colonization of dark septate endophytes are affected by host plant species and soil depth in the Mu Us sandland, northwest China. *Fungal Ecol*, 2019, 39: 276–284
- 28 Elavarthi S, Martin B. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. In: Sunkar R, ed. *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. New York: Humana Press, 2010. 273–281
- 29 Zhan F, He Y, Zu Y, et al. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 2483–2489
- 30 Chen Y L, Dunbabin V M, Diggle A J, et al. Assessing variability in root traits of wild *Lupinus angustifolius* germplasm: basis for modelling root system structure. *Plant Soil*, 2012, 354: 141–155
- 31 Bever J D, Morton J B, Antonovics J, et al. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown

- grassland. *J Ecol*, 1996, 84: 71–82
- 32 Heiri O, Lotter A F, Lemcke G. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *J Paleolimnol*, 2001, 25: 101–110
- 33 Santos S G D, Silva P R A, Garcia A C, et al. Dark septate endophyte decreases stress on rice plants. *Braz J Microbiol*, 2017, 48: 333–341
- 34 Hou L, Li X, He X, et al. Effect of dark septate endophytes on plant performance of *Artemisia ordosica* and associated soil microbial functional group abundance under salt stress. *Appl Soil Ecol*, 2021, 165: 103998
- 35 Reddy A R, Chaitanya K V, Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*, 2004, 161: 1189–1202
- 36 Ban Y H, Tang M, Chen H, et al. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*, 2012, 7: e47968
- 37 Fernandez C W, Koide R T. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecol*, 2013, 6: 479–486
- 38 Berthelot C, Zegeye A, Gaber D A, et al. Unravelling the role of melanin in Cd and Zn tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species. *Microorganisms*, 2020, 8: 537
- 39 Gessler N N, Aver'yanov A A, Belozerskaya T A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochem Moscow*, 2007, 72: 1091–1109
- 40 Surono, Narisawa K. The inhibitory role of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* against *Fusarium* disease on the *Asparagus officinalis* growth in organic source conditions. *Biol Control*, 2018, 121: 159–167
- 41 Zhang Q M, Gong M G, Yuan J F, et al. Dark septate endophyte improves drought tolerance in *Sorghum*. *Int J Agric Biol*, 2017, 19: 53–60
- 42 Desai R M, Bhatia C R. Nitrogen uptake and nitrogen harvest index in durum wheat cultivars varying in their grain protein concentration. *Euphytica*, 1978, 27: 561–566
- 43 Vergara C, Araujo K E C, Urquiaga S, et al. Dark septate endophytic fungi increase green manure-¹⁵N recovery efficiency, N contents, and micronutrients in rice grains. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1–11
- 44 Hund A, Ruta N, Liedgens M. Rooting depth and water use efficiency of tropical maize inbred lines, differing in drought tolerance. *Plant Soil*, 2009, 318: 311–325
- 45 Villarreal-Ruiz L, Anderson I C, Alexander I J. Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytol*, 2004, 164: 183–192
- 46 Wu L Q, Lv Y L, Meng Z X, et al. The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucreata* Kar. et Kir. *Mycorrhiza*, 2010, 20: 127–135
- 47 Valli P P S, Muthukumar T. Dark septate root endophytic fungus *Nectria Haematococca* improves tomato growth under water limiting conditions. *Ind J Microbiol*, 2018, 58: 489–495

Effects of five dark septate endophytes isolated from deserts on growing wheat under drought stress

LIU YanXia¹, LONG JunMeng¹, WANG JingRu¹, LI HaiChao¹, LI Xia^{1,2} & HE XueLi^{1,2}

¹ School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

² Institute of Life Science and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, China

Drought is one of the major barriers to high wheat yield, which will be exacerbated by water scarcity. It is therefore urgent to increase wheat growth and drought resistance through eco-friendly methods. The interactions between endophytic fungi and plant hosts are well known, and the abundant strains in wild plants represent more options for fungi screening. In this study, five dark septate endophytes (DSE) found in the roots of desert plants, *Psammochloa villosa*, were selected. Drought-resistant strains were screened using *in vitro* simulated drought stress. To explore the potential influence of DSE on wheat seedlings, the vegetative growth, root morphology, physiological indices, yield, and soil nutrition indices were investigated using an artificial inoculation experiment. The results showed that DSE isolated from deserts exhibited drought tolerance *in vitro*, and *Alternaria sorghi* (*As*), as well as *Alternaria alternata* (*Aa*), performed better. Under drought conditions, desert DSE significantly increased the grain weight, root length, root surface area, and aboveground nitrogen content of host plants. Additionally, the soil organic carbon content of inoculated wheat increased significantly. Among them, *As*, *Aa*, and *Alternaria chlamydosporigena* had a stronger beneficial effect on wheat growth and drought resistance. Furthermore, we speculate that *Aa* and *As* can enhance wheat growth in arid areas.

dark septate endophyte, wheat, drought, *Psammochloa villosa*, desert

doi: 10.1360/SSV-2021-0313