

苏铁 *Cycas revoluta* 珊瑚根内生真菌的多样性

刘嘉婷^{1,2}, 徐海燕^{1,2}, 王兆春¹, 潘爱芳³, 龚洵^{1*}

1 中国科学院昆明植物研究所 资源植物与生物技术重点实验室, 云南 昆明 650201

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 福州植物园, 福建 福州 350012

摘要: 苏铁类植物是目前发现的唯一一类具有珊瑚根结构的裸子植物, 是探究植物-微生物互作的理想材料。本研究通过高通量测序技术对中国 13 个地区栽培苏铁 *Cycas revoluta* 珊瑚根中的内生真菌组成及多样性进行分析, 结果表明苏铁内生真菌多样性较高, 但各地区间内生真菌的组成及多样性差异不显著, 显示苏铁和珊瑚根内生真菌的共生与栽培地无关。

关键词: 苏铁; 珊瑚根; 内生真菌; 多样性; 核心菌群

[引用本文] 刘嘉婷, 徐海燕, 王兆春, 潘爱芳, 龚洵, 2022. 苏铁 *Cycas revoluta* 珊瑚根内生真菌的多样性. 菌物学报, 41(7): 1035-1043

Liu JT, Xu HY, Wang ZC, Pan AF, Gong X, 2022. Diversity of endophytic fungi in coralloid roots of *Cycas revoluta*. Mycosystema, 41(7): 1035-1043

Diversity of endophytic fungi in coralloid roots of *Cycas revoluta*

LIU Jiating^{1,2}, XU Haiyan^{1,2}, WANG Zhaochun¹, PAN Aifang³, GONG Xun^{1*}

1 Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, Yunnan, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Fuzhou Botanical Garden, Fuzhou 350012, Fujian, China

Abstract: Cycads are the only known gymnosperms with coralloid root up to the present, and they are used as ideal materials to explore the interaction between plants and microorganisms. The diversity and composition of endophytic fungi in coralloid roots of cultivated *Cycas revoluta* collected from thirteen regions of China were analyzed through next-generation sequencing. High diversity of endophytic fungi presented itself in coralloid roots of *C. revoluta*, but there was no

基金项目: 国家自然科学基金(31970230)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970230).

*Corresponding author. E-mail: gongxun@mail.kib.ac.cn

ORCID: GONG Xun (0000-0003-1705-6935)

Received: 2021-10-18, accepted: 2021-12-09

significant difference in composition and diversity among different regions. The results indicated that the symbiosis between *C. revoluta* and endophytic fungi within coralloid roots was irrelevant to cultivation area.

Keywords: *Cycas revoluta*; coralloid root; endophytic fungi; diversity; core microbiota

植物内生菌是一类生活在植物组织内部且在当前状态下不会引起宿主植物病变的一类微生物, 主要包括细菌、真菌和放线菌(Stone *et al.* 2000; Schulz *et al.* 2006)。植物与内生菌的共生不仅能够促进宿主植物的生长, 增强其胁迫抗性, 内生菌也能从植物提供的营养及稳定的生态位中受益(Ujvari *et al.* 2021)。

苏铁类植物是现存最古老的裸子植物之一, 具有耐干旱、耐贫瘠的特性。有研究认为, 苏铁类植物进化的保守性与其珊瑚根中有大量蓝细菌共生有关(Lobakova *et al.* 2003)。对苏铁类植物珊瑚根内生细菌特别是蓝细菌的研究从 20 世纪就已开始(Bergman *et al.* 1986; Lindblad *et al.* 1989), 随着高通量测序技术的应用, 对内生真菌的研究也已取得了一些进展, 但仅涉及在不同的苏铁属物种(Pecundo *et al.* 2021a)以及不同的生态位间(Zheng *et al.* 2018; Zheng & Gong 2019)进行的研究, 对不同地理分布的苏铁类植物内生真菌的研究较少(郑颖 2018; Zheng & Gong 2019)。

苏铁科 Cycadaceae 苏铁属 *Cycas* 的苏铁 *Cycas revoluta* Thunb 对环境的适应性较强, 具有耐寒、耐旱的特性, 可在热带、亚热带及温带地区生长(Lim 2012)。虽然我国目前已无苏铁野生分布, 但因被广泛栽培而成为苏铁类植物中在我国分布最广的一种。近年来对苏铁内生菌的研究多在其珊瑚根内生蓝细菌方面(Shuntaro *et al.* 2012), 并没有内生真菌相关的文献报道。本文采用扩增子测序方法研究不同地区栽培苏铁珊瑚根中的内生真菌, 旨在探究内生真菌的组成和多样性是否存在差异, 分析核心菌群的组成, 并为进一步探讨苏铁环境适应性提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本收集和保藏

采集了中国 13 个地点(表 1)栽培的成年健康苏铁植株珊瑚根, 采集的样品均置于无菌的茶布袋中, 并快速保存至 -20 °C 冰箱。采集时间为 2020 年 9–11 月。

1.2 方法

1.2.1 珊瑚根表面灭菌及 DNA 提取

取一段健康成熟的珊瑚根, 用自来水将其表面清洗干净, 随后在超净工作台内进行珊瑚根表面灭菌。依次浸泡在 75% 的乙醇中 30 s, 2% 的次氯酸钠中 2 min, 之后用无菌水漂洗 5 遍。取少量最后一次漂洗液涂布于 PDA 培养基表面, 置于 25 °C 培养箱中黑暗培养, 4–5 d 后观察, 培养基表面无任何菌落长出证明表面灭菌彻底。采用改良的 CTAB 法提取珊瑚根总 DNA (Doyle 1991), 选取未长菌斑的样本用于扩增子测序。

1.2.2 测序及数据分析

选取 1737F 和 2043R 引物对扩增 rDNA 的 ITS 区(White *et al.* 1990)(表 2), 随后进行建库, 扩增产物用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序(建库、测序等工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成)。

高通量测序得到的原始数据提交到 NMDC 数据库(<http://nmcd.cn>), 接受号为 NMDC40013847–NMDC40013883。原始数据经质控(fastp v.0.19.6)和拼接(FLASH v.1.2.7)后, 通过 QIIME2 (v.2021.4)流程的 DADA2 插件完成进一步去噪, 获得扩增序列变异(amplicon sequence variant, ASV), 将代表序列比对至真菌数据库 unite8.0 (<http://unite.ut.ee>)进行物种注释。

表 1 样本采集地点及采集个体数

Table 1 Sampling localities and number of individuals

编号	采集地点	经度	纬度	采集个体数
Name	Localities	Longitude	Latitude	Number of samples
SZ	深圳仙湖植物园 Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen	114.17	22.58	3
NN	青秀山风景区 Qingxiu Hill Scenic Area	108.39	22.80	3
GZ	华南植物园 South China Botanical Garden	113.37	23.18	3
XM	厦门植物园 Xiamen Botanical Garden	118.12	24.45	3
GL	桂林植物园 Guilin Botanical Garden	110.30	25.07	3
FZ	福州植物园 Fuzhou Botanical Garden	119.30	26.16	3
PZH	攀枝花公园 Panzhihua Park	101.72	26.59	3
YY	益阳市资阳区 Ziyang District, Yiyang City	112.33	28.60	3
NC	江西省林业科学院 Jiangxi Academy of Forestry	115.87	28.70	2
HZ	浙江农林大学 Zhejiang A&F University	120.21	30.25	3
HG	黄冈师范学院 Huanggang Normal University	114.88	30.46	3
CD	中国科学院成都生物研究所 Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences	104.07	30.57	2
JZ	介休市汾秀公园 Fenxiu Park, Jiexiu City	111.92	37.02	3

注：CD：成都；FZ：福州；GL：桂林；GZ：广州；HG：黄冈；HZ：杭州；JZ：晋中；NC：南昌；NN：南宁；PZH：攀枝花；SZ：深圳；XM：厦门；YY：益阳。下同

Note: CD: Chengdu; FZ: Fuzhou; GL: Guilin; GZ: Guangzhou; HG: Huanggang; HZ: Hangzhou; JZ: Jinzhong; NC: Nanchang; NN: Nanning; PZH: Panzhihua; SZ: Shenzhen; XM: Xiamen; YY: Yiyang. The same below.

表 2 高通量测序的引物信息

Table 2 Information of primers used in next generation sequencing

扩增区域	引物序列	扩增长度
Region	Primer sequences (5'→3')	Length (bp)
1737F-2043R	1737: GGAAGTAAAGT	306
	CGTAACAAGG	
	2043: GCTGCGTTCTCA	
	TCGATGC	

使用 mothur 软件(v.1.30)绘制稀释性曲线以检测测序深度是否合理，以 Chao1、Simpson 和 Shannon 指数(分别代表群落的丰富度、均匀度和多样性)评估各地区珊瑚根中内生真菌群落的 α 多样性。指数组间差异检验(采用 Kruskal-Wallis 秩和检验)通过 R 软件中的 stat 包完成，同时利用 R 包 vegan 进行主坐标分析(PCoA)，以进一步探究不同地区间内生真菌群落的组成是否存在差异，各样本中内生真菌的组成通过群落柱状图(python v.2.7)来显示。另外，为探究各地区内生真菌的组成差异，使用 R

包 stat 绘制了花瓣图，对于各地区特有的内生真菌与环境因子的关系，通过 R 包 vegan 进行冗余分析(RDA)。利用 R 包 psych v.2.1.6 (Revelle 2013)计算内生真菌属间的 Spearman 相关系数和显著性(95%的置信区间)，确定物种间存在相互作用关系的阈值(以相关系数 $R>0.6$ ，显著性 $P<0.05$ 为阈值)，用 Gephi 软件(v.0.9.2)绘制网络图以探究各个内生真菌间的相互关系并确定苏铁珊瑚根中的核心内生真菌。

2 结果与分析

2.1 测序结果及物种组成

数据预处理后，共获得 1 898 520 条有效序列，聚类后得到 1 166 个 ASV。基于 ASV 构建的稀释性曲线(图 1)表明测序深度合理。在珊瑚根内生真菌的物种比对结果中(图 2)，仅 66.47% 的序列可以比对至门水平，比对至纲、目、科、属水平的序列数相差不大，而能被注释至

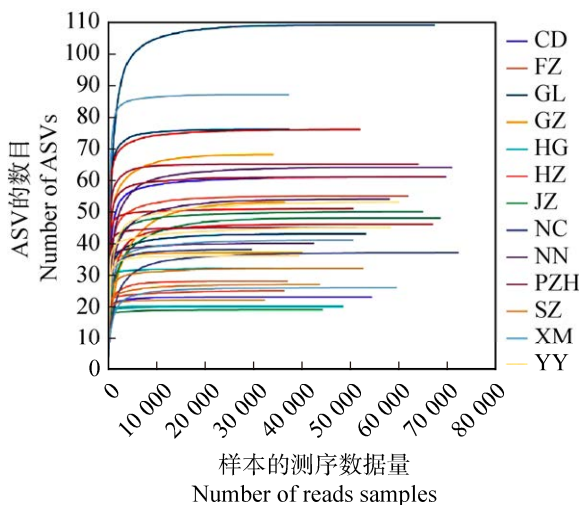


图 1 稀释性曲线
Fig. 1 The rarefaction curves of all the coralloid root samples based on ITS.

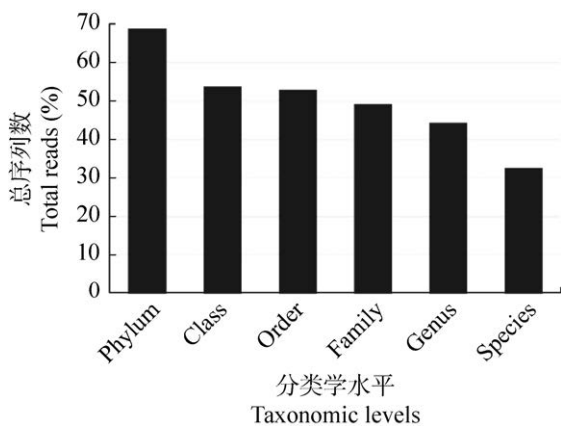


图 2 苏铁内生真菌能被注释到各分类水平序列的比例
Fig. 2 Proportion of total endophytic fungal reads assigned to taxonomical ranks.

种的序列较少(30.19%), 表明种水平很难代表苏铁内生真菌的菌相, 因此采用属水平的物种注释来进行后续分析。苏铁内生真菌共检测到 7 个门, 分别是子囊菌门 Ascomycota、担子菌门 Basidiomycota、被孢霉门 Mortierellomycota、毛霉门 Mucoromycota、罗兹菌门 Rozellomycota、球囊菌门 Glomeromycota 和壶菌门 Chytridiomycota (图 3)。在所有地区中, 占主导地位的真菌门为子囊菌门(61.57%), 其次是担子菌门(7.01%), 其他菌类在真菌群落组成中占比很小, 如被孢霉

门和毛霉门, 但有 29.26%的内生真菌在门水平上不能识别。相比其他地区, 南昌的苏铁珊瑚根内生真菌中子囊菌门较少(3.17%), 87.34%的内生真菌在门水平上未能识别。

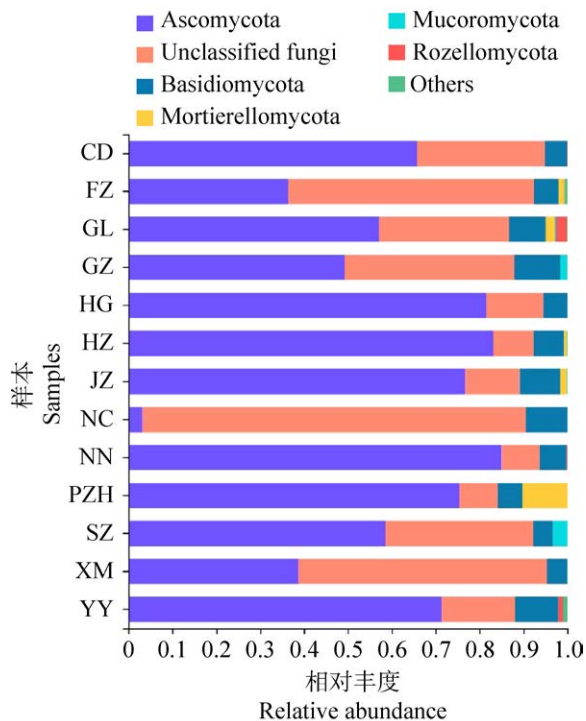


图 3 苏铁珊瑚根内生真菌在门水平的群落柱状图
相对丰度小于 0.01%的门合并为“others”
Fig. 3 Community histogram of endophytic fungi in coralloid roots of *Cycas revoluta* at phylum level. Phyla with relative abundance less than 0.01% are merged into “others”.

2.2 多样性分析

苏铁珊瑚根内生真菌在属水平的多样性分析(图 4A–4C)表明, 各地区的物种丰富度较高, 均介于 14 到 35 个属之间, 其中桂林最高(35 个属), 福州最低(14 个属)。而均匀度在各地区中都比较低(<0.4), 其中厦门最低(0.13), 深圳最高(0.38)。对于物种多样性指数, 攀枝花最高, 为 2.24, 厦门最低, 为 1.42, 其余各地区的 Shannon 指数值均介于两者之间。但从这 3 个多样性维度进行的组间差异检验表明, 各地区间群落多样性差异并不显著($P>0.05$)。

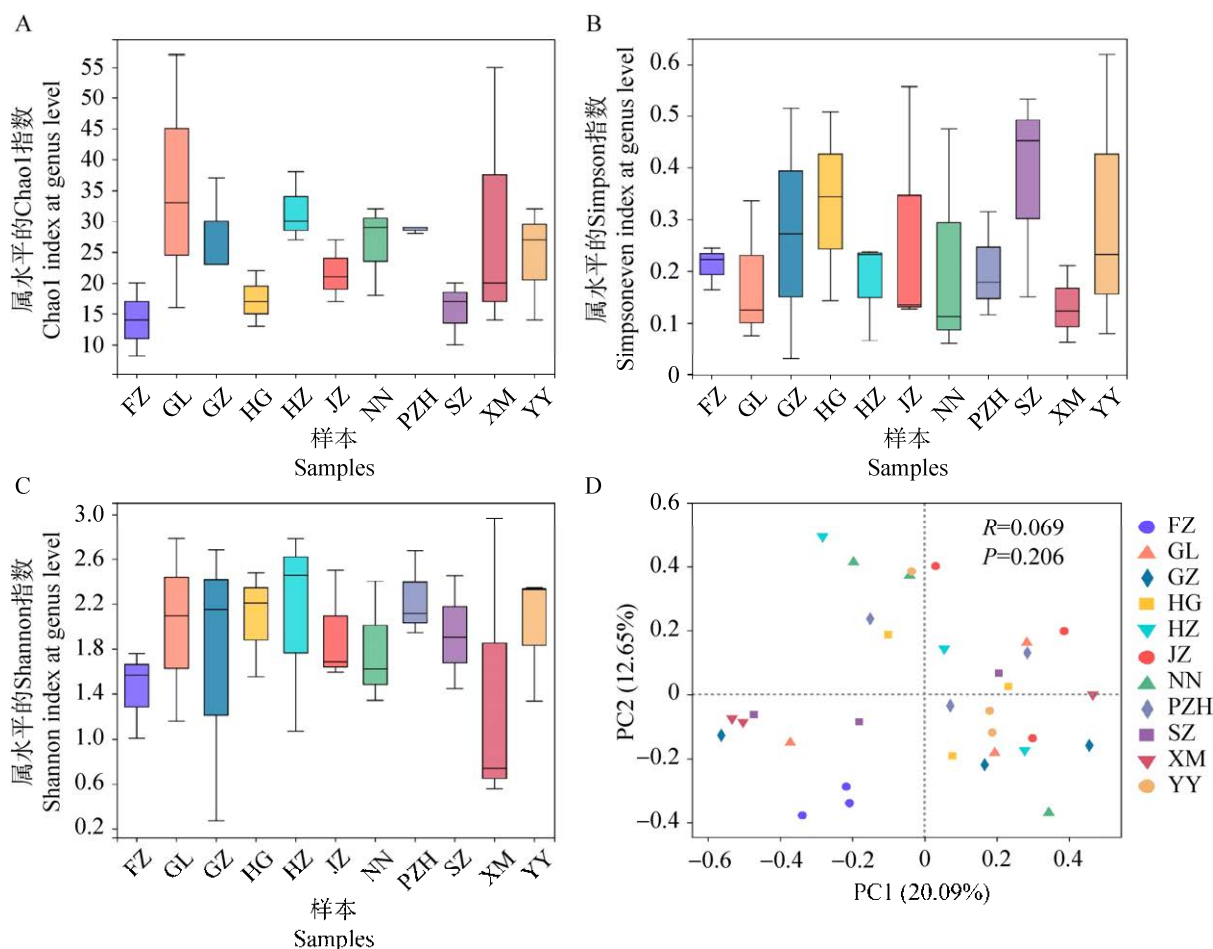


图4 苏铁珊瑚根内生真菌在属水平上的 α 多样性和 β 多样性分析 A: Chao1 指数; B: Simpson 指数; C: Shannon 指数; D: PCoA 分析

Fig. 4 Alpha and beta diversity analysis of endophytic fungi within coralloid roots of *Cycas revoluta*. A: Chao1 index; B: Simpson index; C: Shannon index; D: PCoA analysis.

对于 β 多样性, 我们使用 PCoA 来探究不同地区间内生真菌群落的组成差异(图4D), 各地区群落组成分布较为分散且同一地区的不同个体也大多没有聚在一起, 说明不仅地区间存在差异, 同一地区内也存在差异。基于 weighted unifrac 距离算法以及 ANOSIM 组间差异检验的结果表明, 在属水平, 各地区群落组成差异不显著($P=0.206$)。

2.3 核心菌群的确定

2.3.1 花瓣图分析

在门水平, 仅子囊菌门、担子菌门在 13 个地区苏铁珊瑚根中都有分布, 且相对丰度较高,

占比分别为 61.57%和 7.01%。在目水平共有的内生真菌种类最多, 共 7 目, 如座囊菌目 Hypocreales、格孢菌目 Pleosporales、散囊菌目 Eurotiales, 其中座囊菌目在所有样本中的丰度最高, 占 28.76%。在科水平, 除未识别的两科外, 仅曲霉科 Aspergillaceae 为全部所测样本共有, 占比为 4.40%。而在共有的属(图 5A)中也仅有枝顶孢霉属 *Acremonium* 被注释到属水平, 在所有样本中的丰度为 1.17%。

2.3.2 网络分析

苏铁珊瑚根内生真菌群落在属水平的共现网络模式, 网络由 206 个节点和 1 027 条边

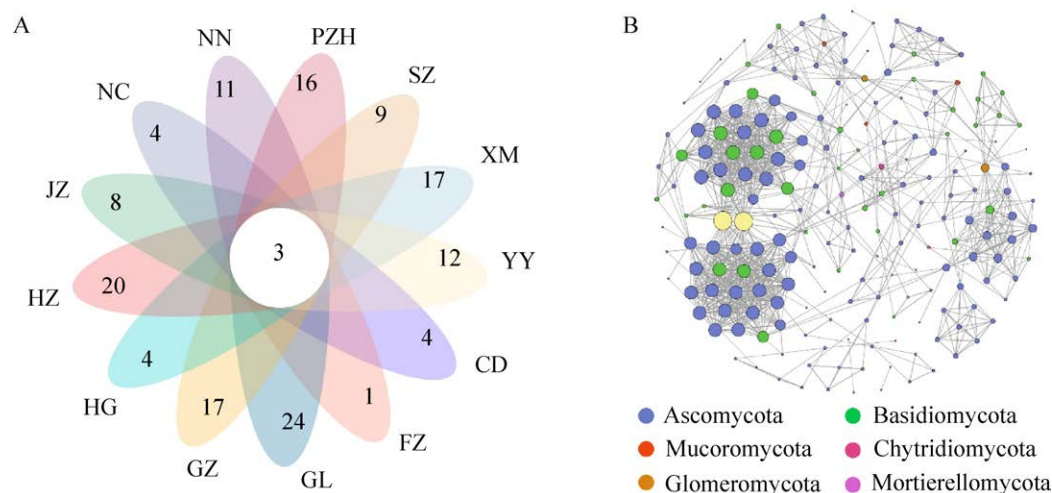


图 5 属水平苏铁珊瑚根核心内生菌群 A: 花瓣图; B: 网络分析, 节点的颜色代表所属的门类别, 节点的大小代表度的大小, 黄色标注的为度最大的 2 个节点

Fig. 5 Core microbiome in coralloid roots of *Cycas revoluta*. A: Flower figure; B: Network analysis, the color of the node represents the phylum it belongs in, the size of the node represents the value of the degree, and the two nodes with the largest value of degree are marked in yellow.

构成(图 5B), 其中子囊菌门占大多数(70.87%), 其次是担子菌门(24.27%), 毛霉门、壶菌门、球囊菌门以及被孢霉门占比都很少。网络图显示内生真菌之间的相互作用都是正相关。以“度”的大小来判别核心菌群, 隐球菌属 *Cryptococcus* 和暗壳腔菌科 *Phaeosphaeriaceae* 作为核心菌群与其他菌群之间的关系极为密切(度为 35), 分别属于担子菌门、银耳纲、银耳目和子囊菌门、座囊菌纲、格孢菌目, 但这两类菌均只在桂林和厦门的样本中检测到。

2.4 各地区特有内生真菌的分布及影响因素

在 13 个地区苏铁珊瑚根样本中, 每个地区的样本在属水平上均有本地区特有的内生真菌(图 5A), 其中, 桂林特有的内生真菌属最多(24), 其次是杭州(20)、广州(17)和厦门(17), 福州最少, 仅有 1 特有属。大多数地区特有真菌(87.76%)在当地占比都小于 1%。为探究各地区特有内生真菌的分布是否与地理因子有关, 我们汇总了各采样地的经纬度和年均温(数据来源于 www.worldclim.org)数据。因大部分样品采集自植物园, 不同地区、不同季节施肥、浇水等各不

相同, 因此并不考虑这些人为因素。

从 RDA 分析(图 6)中可以看出, 大多数地区特有真菌聚集在靠近零点的位置, 深圳的特有菌与经度、年均温呈正相关; 广州、南宁的特

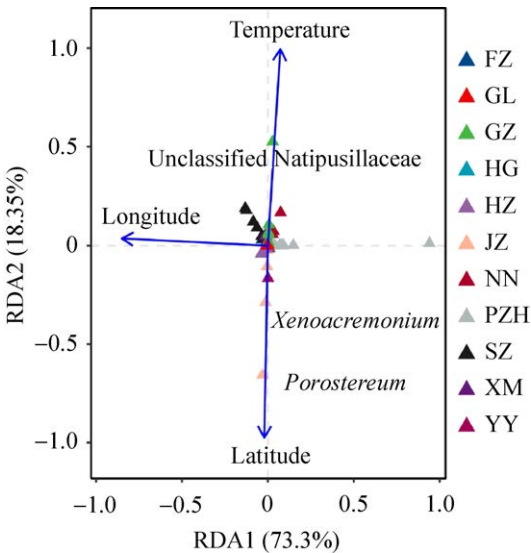


图 6 各地区特有内生真菌属与地理环境因子的 RDA 分析 三角形代表 11 个地区特有的属

Fig. 6 Redundancy analysis (RDA) between endemic genus in different regions and geographical factors. Triangles indicate the genera endemic to 11 regions.

有菌与年均温呈正相关,且广州的相关性更高,尤其是那提普斯壳科 *Natipusillaceae*; 晋中的少数特有菌与纬度的正相关性较高,如 *Porostereum* 和类枝顶孢属 *Xenoacremonium*; 另外,攀枝花的特有菌与经度呈负相关。总之,多数地区特有真菌的存在几乎不受地理因素的影响,仅少数地区的部分特有真菌与地理因子有较高的相关性。

3 讨论

本研究采用扩增子测序的方法对中国 13 个区域栽培苏铁珊瑚根中内生真菌的组成及多样性进行了分析,发现苏铁内生真菌多样性较高,且其不同地区间的差异并不显著,这与郑颖(2018)长叶苏铁珊瑚根内生真菌的研究结果基本一致,即中国与越南采样点珊瑚根的真菌内生菌相似,表明苏铁珊瑚根内生真菌的组成可能受宿主选择作用的影响。

对于核心菌群的鉴定, Dong *et al.* (2021)总结了 4 种定义方法,本研究采用花瓣图分析和网络分析 2 种方式来判定苏铁珊瑚根中的核心内生真菌,2 种方法得出的结果并无重叠。其中,门水平共享的子囊菌门和担子菌门在有关长叶苏铁 *C. dolichophylla* (郑颖 2018)、叉叶苏铁 *C. bifida* (Zheng *et al.* 2018)、仙湖苏铁 *C. fairylakea* 和德保苏铁 *C. debaoensis* (Pecundo *et al.* 2021a, 2021b)内生真菌的研究中也被鉴定为优势菌群。除苏铁类植物外,目前所发现的植物内生真菌大多为子囊菌门,包括核菌纲 *Pyrenomycetes*、盘菌纲 *Discomycetes* 和腔菌纲 *Loculoascomycetes* 的许多种类(石晶盈等 2006)。对本文鉴定到的核心内生真菌曲霉科,这一科中的某些种也是巴西卡廷加干旱森林中特有的一种凤梨科植物叶片中的内生真菌(Freire *et al.* 2020)。在本研究中,花瓣图显示的各地区在属水平共有的内生真菌中除未识别的 2 属外,还检测到枝顶孢霉

属。有研究认为,该属与植物的共生可能会增强宿主植物对生物和非生物胁迫的抗性,如抗虫、耐旱以及增强与其他植物种的竞争(Hoveland 1993),因此,枝顶孢霉属可能也对苏铁适应各种环境有一定的促进作用。然而,在仙湖苏铁和德保苏铁珊瑚根中发现的核心真菌属为篮状菌属 *Talaromyces*、青霉属 *Penicillium*、镰刀菌属 *Fusarium*、*Pochonia* 和 *Gliocladiopsis* (Pecundo *et al.* 2021b)。在多种其他植物(除苏铁类植物外)中广泛分布的几个属是半壳霉属 *Leptostroma*、*Cryptocline*、拟隐孢霉属 *Cryptosporipsis*、拟茎点霉属 *Phomopsis* 和叶点霉属 *Phyllosticta* (石晶盈等 2006),表明在属水平,苏铁与其他植物的核心菌群不同。网络分析显示的核心类群隐球菌属(银耳科)和暗壳腔菌科,这两类群所属的科作为内生真菌在欧洲野榆 *Ulmus minor* 中也曾检测到(Macaya-Sanz *et al.* 2020; Martínez-Arias *et al.* 2020)。Martínez-Arias *et al.* (2020)发现从欧洲野榆中分离出的菌株 YCB36 (暗壳腔菌科)能显著抑制榆树病菌 *Ophiostoma novoulmi* 的生长,诱导宿主植物的代谢防御,如叶片气孔导度增大,木质部中类黄酮和总酚类化合物浓度升高,从而提高宿主植物对生物胁迫的耐受性;此外,暗壳腔菌科中的某些真菌也存在于盐生植物盐角草 *Salicornia europaea* 中,其具有较高的耐盐度(Furtado *et al.* 2019)。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi)被认为是植物根系内生菌的祖先,能促进宿主对磷的吸收从而提高宿主的生长速率(Parniske 2008)。但在本研究的所有样本中均未检测到丛枝菌根真菌,前人在对泽米铁 *Zamia pumila* 和双子铁 *Dioon edule* (Fisher & Vovides 2004)、长叶苏铁(郑颖 2018)珊瑚根的研究中也未发现丛枝菌根真菌的存在,然而 Pecundo *et al.* (2021a)发现丛枝菌根真菌双型囊霉科 *Ambisporaceae* 尤其

是双型囊霉属 *Ambispora* 存在于仙湖苏铁的珊瑚根中,但相对丰度较低,这可能是由于珊瑚根中蓝细菌占据绝对优势(Zheng *et al.* 2018),抑制了其他内生菌包括真菌的定殖(Werner & Kiers 2015),也可能是丛枝菌根真菌在苏铁类植物中的定殖与宿主的种类有关,而与宿主的地理分布无关。

与苏铁珊瑚根核心内生真菌相反,各地区特有的内生真菌可能与宿主无关,且 RDA 分析表明其与地理因素也无太大关系,猜测可能与珊瑚根根围的微环境有关,比如根围土壤的酸碱度、含水量、含氮量等(贾彤等 2017)。在与地理因素相关的内生真菌中,类枝顶孢属在欧洲栗 *Castanea sativa* 的树皮中被鉴定到(Aghayeva *et al.* 2018), Hamayun *et al.* (2017)的分析表明内生真菌 *Porostereum spadiceum* AGH786 是发现的第一种能产生 6 种赤霉素的担子菌,其通过调节幼苗内源植物激素和异黄酮的含量来提高大豆对氯化钠胁迫的耐受性。因此,本研究所发现的不论是核心内生真菌还是与地理因子相关的各地区特有内生真菌,都可能与宿主植物的抗胁迫能力相关,这也可能是苏铁对环境适应性较高的原因之一。

综上所述,在 13 个地区的苏铁珊瑚根中,其内生真菌的组成和多样性在各地区之间无显著差异。枝顶孢霉属、隐球菌属和暗壳腔菌科为苏铁珊瑚根内生真菌的核心类群,可能与苏铁环境适应性较强有关。苏铁作为一种古老的植物在长期的进化过程中与其体内的真菌菌群可能已经形成了较好的适应关系,不仅多样性水平较高,而且较为稳定,这在另一种起源较为古老的植物——银杏中也发现了类似现象(Zheng *et al.* 2013)。不过,这需要长期和地域广泛(包括野生植株)的研究调查才能证实。

[REFERENCES]

Aghayeva DN, Rigling D, Meyer JB, Mustafabeyli E, 2018.

Diversity of fungi occurring in the bark of *Castanea sativa* in Azerbaijan. *Acta Horticulturae*, 2018(1220): 79-86

Bergman B, Lindblad P, Rai AN, 1986. Nitrogenase in free-living and symbiotic cyanobacteria: immunoelectron microscopic localization. *FEMS Microbiology Letters*, 35(1): 75-78

Dong C, Shao Q, Zhang Q, Yao T, Han Y, 2021. Preferences for core microbiome composition and function by different definition methods: evidence for the core microbiome of *Eucommia ulmoides* bark. *Science of the Total Environment*, 790: 148091

Doyle J, 1991. DNA protocols for plants CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM, Johnston A (eds.) *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, Berlin. 283-293

Fisher JB, Vovides AP, 2004. Mycorrhizae are present in cycad roots. *The Botanical Review*, 70(1): 16-23

Freire KTLS, Araújo-Magalhães GR, Nascimento SS, Paiva LM, Barbosa RN, Bezerra JDP, Souza-Motta CM, 2020. First report of *Penicillium brasilianum* Bat., *P. cluniae* Quintan., and *P. echinulonalgiovense* S. Abe ex Houbraken & R.N. Barbosa (Eurotiales, Aspergillaceae) as endophytes from a bromeliad in the Caatinga dry forest in Brazil. *Check List*, 16(4): 1055-1061

Furtado BU, Szymańska S, Hryniewicz K, 2019. A window into fungal endophytism in *Salicornia europaea*: deciphering fungal characteristics as plant growth promoting agents. *Plant and Soil*, 445(1/2): 577-594

Hamayun M, Hussain A, Khan SA, Kim HY, Khan AL, Waqas M, Irshad M, Iqbal A, Rehman G, Jan S, Lee IJ, 2017. Gibberellins producing endophytic fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 rescues growth of salt affected soybean. *Frontiers in Microbiology*, 8: 686

Hoveland CS, 1993. Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 44: 3-12

Jia T, Cao MW, Zhou YN, Qiao SS, Chai BF, 2017. Distribution of endophyte fungi associated with common plants and preliminary assessment of impact factors in Pangquangou Nature Reserve. *Acta Ecologica Sinica*, 37(4): 1103-1110 (in Chinese)

Lim TK, 2012. *Cycas revoluta*. In: Lim TK (ed.) *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Springer, Netherlands. 732-738

Lindblad P, Haselkorn R, Bergman B, Nierzwicki-Bauer SA, 1989. Comparison of DNA restriction fragment length polymorphisms of *Nostoc* strains in and from cycads. *Archives of Microbiology*, 152(1): 20-24

Lobakova E, Orazova MK, Dobrovol'skaya TG, 2003. The

- structure of cyanobacterial communities formed during the degradation of apogeotropic roots of cycads. *Microbiology*, 72(5): 634-637
- Macaya-Sanz D, Witzell J, Collada C, Gil L, Martin JA, 2020. Structure of core fungal endobiome in *Ulmus minor*: patterns within the tree and across genotypes differing in tolerance to Dutch elm disease. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.23.166454>
- Martínez-Arias C, Sobrino-Plata J, Ormeño-Moncalvillo S, Gil L, Martin JA, 2020. Endophyte inoculation enhances *Ulmus minor* resistance to Dutch elm disease. *Fungal Ecology*, 50: 101024
- Parniske M, 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 763-775
- Pecundo MH, Chang ACG, Chen T, Dela Cruz TEE, Li N, 2021a. Full-length 16S rRNA and ITS gene sequencing revealed rich microbial flora in roots of *Cycas* spp. in China. *Evolutionary Bioinformatics*, 17: 1-16
- Pecundo MH, Dela Cruz TEE, Chen T, Notarte KI, Ren H, Li N, 2021b. Diversity, phylogeny and antagonistic activity of fungal endophytes associated with endemic species of *Cycas* (Cycadales) in China. *Journal of Fungi*, 7: 572
- Revelle W, 2013. Psych: procedures for psychological, psychometric, and personality research. R Package Version 1.0-95
- Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, 2006. Microbial root endophytes. Springer, Berlin. 1-355
- Shi JY, Chen WX, Liu AY, 2006. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases. *Acta Ecologica Sinica*, 26(7): 2395-2401 (in Chinese)
- Shuntaro Y, Satoshi O, Hideaki M, Hiroaki S, 2012. Genetic diversity of symbiotic cyanobacteria in *Cycas revoluta* (Cycadaceae). *FEMS Microbiology Ecology*, 81(3): 696-706
- Stone JK, Bacon CW, White J, 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JFJ (eds.) *Microbial endophytes*. Academic Press, New York. 3-33
- Ujvári G, Turrini A, Avio L, Agnolucci M, 2021. Possible role of arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria in the recruitment of endophytic bacterial communities by plant roots. *Mycorrhiza*, 31(5): 527-544
- Werner GDA, Kiers ET, 2015. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist*, 205(4): 1515-1524
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. 315-322
- Zheng JH, Kang JC, Lei BX, Li QR, Wen TC, Meng ZB, 2013. Diversity of endophytic fungi associated with *Ginkgo biloba*. *Mycosystema*, 32(4): 671-681
- Zheng Y, 2018. Phylogeography and endophyte diversity of *Cycas dolichophylla*. PhD Dissertation, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing. 1-87 (in Chinese)
- Zheng Y, Chiang TY, Huang CL, Gong X, 2018. Highly diverse endophytes in roots of *Cycas bifida* (Cycadaceae), an ancient but endangered gymnosperm. *Journal of Microbiology*, 56(5): 337-345
- Zheng Y, Gong X, 2019. Niche differentiation rather than biogeography shapes the diversity and composition of microbiome of *Cycas panzhihuaensis*. *Microbiome*, 7(1): 152

[附中文参考文献]

- 贾彤, 曹苗文, 周永娜, 乔沙沙, 柴宝峰, 2017. 庞泉沟自然保护区常见禾本科植物内生真菌分布及其影响因素. *生态学报*, 37(4): 1103-1110
- 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛, 2006. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. *生态学报*, 26(7): 2395-2401
- 郑颖, 2018. 长叶苏铁的谱系地理学及内生菌多样性研究. 中国科学院大学博士论文, 北京. 1-87