

Université de Montréal

**Diversité des organismes endophytes dans les racines de
plantes poussant en milieu contaminé en hydrocarbures**

par

Guillaume Bourdel

Département des Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Arts et des Sciences
en vue de l'obtention du grade de Maître des Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biologiques

Juin 2015

© Guillaume Bourdel, 2015

Résumé

Les champignons endophytes sont des organismes qui vivent à l'intérieur de plantes sans causer de symptômes de maladie apparents. Ils sont trouvés dans virtuellement toutes plante, et la nature des interactions peut aller de mutualiste à pathogène dépendant des conditions. La diversité et la structure des communautés des champignons endophytes dans les plantes poussant en milieu extrêmement pollué, ainsi que leur rôle potentiel pour améliorer la phytoremédiation, demeurent peu compris. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux communautés de champignons endophytes de racines de deux espèces de plantes (*Eleocharis erythropoda* et *Populus* sp.). Ces espèces poussaient de manière spontanée dans trois bassins de sédimentation d'une ancienne usine pétro-chimique ayant des niveaux de contaminations différents, en utilisant à la fois une approche d'isolation d'organisme ainsi que des analyses de pyroséquençage de l'ITS d'ADN ribosomal.

Nos résultats indiquent que les niveaux de contamination ont un effet significatif sur la composition taxonomique des champignons endophytes des racines de *E. erythropoda*. Une majorité des données de séquences appartiennent à la classe des Dothideomycetes dans les échantillons de forte concentration en hydrocarbures pétroliers, dont une majorité appartient au genre *Alternaria*. La comparaison des données d'isolation et de pyroséquençage suggère que l'isolation de souches ne permet pas l'obtention des souches les plus représentées dans les données de pyroséquençage.

Ces résultats pourront potentiellement aider à l'élaboration de stratégies pour améliorer la phytoremédiation en utilisant les champignons endophytes.

Mots-clés : champignons, endophytes, contamination en hydrocarbures, pyroséquençage, structures de communautés, *Eleocharis erythropoda*, *Populus*

Abstract

Endophytic fungi are organisms that live inside plant tissues without any apparent disease symptoms. They are found in virtually all plant species and their interactions can vary widely from mutualism to parasitism depending chiefly on environmental conditions and stresses. The diversity and community structure of fungal endophytes in extremely polluted sites and their role in phytoremediation remain largely unexplored. In this study we investigated the community structure of endophytic fungi in roots of two plant species (*Eleocharis erythropoda* and *Populus* sp.) growing spontaneously in three petroleum-contaminated sedimentation basins of a former petro-chemical plant with different contamination levels. We used both a culture-dependent method of strain isolation as well as a culture-independent method of pyrosequencing of ITS ribosomal DNA.

Our results indicate that levels of contamination shape the taxonomic composition of endophytic fungi in *E. erythropoda* roots. A majority of the reads belonged to the Dothideomycetes class in samples from high petroleum-hydrocarbon levels, with the *Alternaria* genus accounting for the majority of these reads. In addition comparison between culture-dependent and -independent methods showed that strain isolation does not promote the most abundant species found in pyrosequencing.

This could help to develop strategies for improving phytoremediation using fungal endophytes.

Keywords : fungi, endophytes, petroleum-hydrocarbon contamination, pyrosequencing, community structures, *Eleocharis erythropoda*, *Populus*

Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	x
Introduction.....	1
I. Les organismes endophytes	1
<i>I.1 Définition d'un organisme endophyte.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2 Limites de la définition</i>	<i>2</i>
II. Interactions plante-endophyte	3
<i>II.1 Différentes stratégies de vie</i>	<i>3</i>
<i>II.2 Les interactions plante-endophyte et leurs effets</i>	<i>5</i>
<i>II.3 L'étude des endophytes.....</i>	<i>6</i>
III. La phytoremédiation	8
IV. Objectifs du projet	11
<i>IV.1 Objectifs spécifiques.....</i>	<i>11</i>
<i>IV.2 Hypothèses de départ</i>	<i>12</i>
Chapitre I: Level of petroleum-hydrocarbon contamination shapes fungal endophytic community structure in plant roots.....	13
I. Abstract.....	14
II. Introduction	15
III. Materials and Methods.....	17
<i>III.1 Site description and sampling.....</i>	<i>17</i>
<i>III.2 Soil contamination analysis</i>	<i>18</i>
<i>III.3 Endophytic fungal isolation procedure.....</i>	<i>18</i>
<i>III.4 DNA extraction, PCR amplification and sequencing of isolated fungal endophytes</i>	<i>19</i>

<i>III.5 454-Amplicon sequencing</i>	20
<i>III.6 Sequence analysis</i>	21
<i>III.7 Statistical analysis</i>	21
IV. Results.....	22
<i>IV.1 Culture-based isolation of fungal endophytes from sterilized-plant roots</i>	22
<i>IV.2 Endophyte fungal diversity and community composition</i>	22
V. Discussion	24
VI. Conclusion and perspectives.....	25
VII. Acknowledgements	26
VIII. Tables and figures	27
Conclusion	34
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Table 1. Concentrations of Petroleum hydrocarbon pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs], alkanes [C10-C50] and total polychlorinated biphenyls [PBCs]) in the sediments of the three basins where <i>Eleocharis erythropoda</i> (E) and <i>Populus</i> sp. (P) plants were collected. Concentrations (mg.kg ⁻¹) above the accepted limits are in bold.	27
Table 2. List of isolated fungal endophytes from surface-sterilized roots of <i>Eleocharis erythropoda</i> (E) and <i>Populus</i> sp. (P).	28

Liste des figures

- Figure 1.** Rarefaction curve of OTUs in each root sample against the number of 454 reads excluding singletons. Analysis are based on 1000 iterations of re-sampling without replacement. 29
- Figure 2.** Endophyte diversity in of *E. erythropoda* and *Populus* sp. roots. Data show the estimated number of OTUs, as calculated by the Chao Richness Index on the sequences clustered at 97% nucleotide identity. Blue and dark-red colors show OTUs richness *Populus* sp. *E. erythropoda*, respectively. 30
- Figure 3.** Unconstrained ordination of fungal endophytes of *E. erythropoda* and *Populus* sp. roots. The fungal communities were binned at phylotype resolution and were ordinated using PCoA based on Hellinger distance. 31
- Figure 4.** Taxonomic composition of endophytic fungal communities recovered from roots of *E. erythropoda* and *Populus* sp. Bars show the frequency with which different taxonomic groups were recovered based on 454 pyrosquencing of the fungal ITS region. In total, 592 fungal OTUs from three fungal phyla Basidiomycota, Ascomycota and Glomeromycota as well as other unclassified fungal taxa 32
- Figure 5.** Venn diagrams showing OTUs shared in percentage between contaminant levels for *Eleocharis erythropoda* and *Populus* sp. samples at 97% genetic similarity 33

Liste des sigles

ADN / DNA : acide désoxyribonucléique / deoxyribonucleic acid

ANOVA : analysis of variance

DGGE : denaturing gel gradient electrophoresis

dNTP : deoxyribonucleotide triphosphate

DSE : dark septate endophytes

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid

HAP /PAH : hydrocarbure aromatique polycyclique / polycyclic aromatic hydrocarbon

ITS : internal transcribed spacer

PCB : polychlorobiphényles / polychlorinated biphenyl

PCR : polymerase chain reaction

PDA : potato dextrose agar

TPH : total petroleum hydrocarbon

OTU : operational taxonomique unit

PCoA : principal coordinates analysis

Liste des abréviations

bp : base pair

°C : degree Celsius

E. erythropoda : *Eleocharis erythropoda*

Hz : Hertz

kg : kilogram

µg : microgram

µL : microliter

µM : micromolar

mg : milligram

mL : milliliter

mM : millimolar

min : minute

ng : nanogram

sec : second

sp. : species

U : unit

A tous ceux qui m'ont supporté dans cette aventure 😊

Remerciements

Je voudrais remercier le Pr. Mohamed Hijri de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour toute l'aide qui m'a été donnée.

Je voudrais remercier le Dr. Marc St-Arnaud et le Dr. Etienne Yergeau pour leurs conseils éclairés lors de mon comité conseil, ainsi que le Dr. Etienne Laliberté pour ses remarques sur ce manuscrit.

Je voudrais remercier le projet GenoRem et tous ses collaborateurs pour les idées stimulantes qui ont parsemé mon cheminement.

J'aimerais enfin remercier tous les membres, chercheurs, étudiants, post-doc, employés et autres personnes du Jardin Botanique et de l'Université de Montréal que j'ai côtoyées pendant ma maîtrise et qui ont fait partie de ma vie aussi bien académique que sociale pendant ces années.

Introduction

I. Les organismes endophytes

I.1 Définition d'un organisme endophyte

Au sens littéraire, un endophyte est un organisme qui vit à l'intérieur d'une plante (du Grec *endon* = dans, et *phyton* = plante). Les endophytes recouvrent une grande variété d'organismes colonisateurs et colonisés. On parle essentiellement de bactéries (Kobayashi & Palumbo, 2000) et de champignons endophytes (Stone *et al.*, 2000), mais on peut aussi retrouver des algues (Peters, 1991) et des insectes (Feller, 1995) considérés comme endophytes.

Des champignons et bactéries endophytes ont été retrouvés dans virtuellement toutes les plantes étudiées rendant universelle la colonisation des plantes par les endophytes, attestant d'un large spectre d'individus colonisés et capables de faire de la colonisation (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soytong, 2008).

La définition d'un endophyte laisse place à un débat. Le sens du terme a évolué depuis les premières descriptions de ces organismes (De Bary, 1866) et continue encore d'évoluer. Cependant la proposition majoritairement acceptée décrit qu'un endophyte est un organisme qui peut être détecté à un moment donné à l'intérieur des tissus de la plante hôte et ne causant pas de symptômes de maladies apparents (Petrini, 1991; Wilson, 1995; Stone *et al.*, 2000; Schulz & Boyle, 2005). Selon les auteurs, une distinction peut être faite entre les interactions mycorhiziennes et les interactions endophytes, car ces dernières ne possèdent pas d'interface avec des hyphes spécialisés présents chez la plupart des mycorhizes (Brundrett, 2004).

Cette définition prend ainsi en compte la variabilité des interactions entre les endophytes et la plante. On retrouve un large éventail d'interactions tels que le mutualisme (Sieber, 2002) où l'hôte et le colonisateur retirent un bénéfice de l'interaction, le parasitisme

(Kogel *et al.*, 2006; Paszkowski, 2006) où l'endophyte vit au détriment de son hôte sans symptôme apparent, ainsi que les pathogènes latents (Schulz *et al.*, 2006).

La colonisation peut toucher tous les organes de la plante: système racinaire, tiges, feuilles (Petrini, 1991; Schulz *et al.*, 1993; Saikkonen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2000; Schulz & Boyle, 2005; Schulz *et al.*, 2006; Silvani *et al.*, 2008). Les organismes endophytes peuvent être adaptés spécifiquement à un organe de leur hôte. C'est le cas par exemple des champignons à hyphes septées noires (*dark septate endophytes* [DSE]), un groupe de champignons endophytes que l'on retrouve exclusivement associés aux racines de nombreuses plantes (Jumpponen & Trappe, 1998), ou encore de *Phyllosticta multicorniculata* qui est associé aux aiguilles de *Abies balsamea* (Petrini, 1996). D'autres peuvent aussi affecter le système racinaire et aérien tel *Fusarium moniliforme* (Bacon & Hinton, 1996).

De même que les endophytes peuvent coloniser un organe particulier de la plante, le spectre de plantes qu'ils peuvent coloniser peut varier entre les différentes souches considérées. Certains endophytes auront ainsi la capacité de coloniser de manière ubiquitaire les plantes présentes dans leur milieu, ou auront une préférence de leur hôte (Petrini, 1996; Stone *et al.*, 2000; Cohen, 2004). Certains parleront de spécificité d'hôte, bien que cela implique l'adaptation de coloniser seulement un hôte particulier (Zhou & Hyde, 2001; Schulz & Boyle, 2005).

I.2 Limites de la définition

Comme mentionné précédemment, la définition des organismes endophytes fait débat. La définition apportée a aussi ses limites.

Des études portant sur les communautés des organismes épiphytes (vivant sur les parois externes de l'hôte) et les communautés endophytes révèlent des différences significatives de ces populations, même si elles se trouvent très proches physiquement l'une de l'autre (Legault *et al.*, 1989; Santamaria & Bayman, 2005; Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Une zone grise existe ainsi dans l'identification et l'isolation d'organismes endophytes. La distinction entre les deux peut être faite de manière arbitraire, en effet certains endophytes peuvent requérir une phase de croissance sur l'organe à coloniser avant de devenir endophytes

(Porras-Alfaro & Bayman, 2011). De ce fait, il peut être difficile de caractériser de manière précise de tels organismes. D'autre part dans l'éventualité où un organe colonisé par un endophyte subit un stress (blessure d'une racine, d'une feuille ou encore d'une tige par exemple), l'endophyte peut se retrouver en situation d'épiphyte, même si celui-ci ne requiert pas de phase épiphyte dans sa stratégie de colonisation (Saikkonen *et al.*, 2004; Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

II. Interactions plante-endophyte

II.1 Différentes stratégies de vie

La colonisation d'une plante par un endophyte est le résultat de multiples stratégies de vie, différentes d'un organisme à l'autre. Malgré la très grande variété d'organismes endophytes, peu de choses sont connues sur les raisons de la colonisation, ainsi que l'importance d'une phase endophyte dans leur cycle de vie (Schulz & Boyle, 2005).

Selon les auteurs, les endophytes peuvent être classés dans deux grands groupes: les endophytes associés aux graminées, dits clavicipitaléens (*clavicipitalean*) ou balansiées (*balansiaceous*) selon les auteurs, et ceux associés aux autres plantes, les non-clavicipitaléens ou non-balansiées (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soyong, 2008). Ils sont aussi appelés endophytes de class 1 (Rodriguez *et al.*, 2009).

Les effets associés aux endophytes des graminées sont généralement mieux connus que les effets des endophytes des plantes non herbacées (Hyde & Soyong, 2008). On retrouve dans ce groupe les espèces du genre *Epichloë*, *Claviceps* et *Neotyphodium*. Des organismes du genre *Neotyphodium* ont été découverts en premier lors de la mise en évidence de leur responsabilité de la toxicité d'herbes de prairies sur les animaux et leur impact économique et écologique a conduit à des recherches plus poussées sur ce groupe d'organismes (Bacon *et al.*, 1977; Schulz & Boyle, 2005). Les organismes de ce groupe sont mutualistes et colonisent l'espace intercellulaire des feuilles des plantes herbacées (Schulz & Boyle, 2005; Sanchez-Marquez *et al.*, 2012).

Les organismes de ce groupe ont la capacité de se transmettre de manière verticale (d'une plante à sa descendance) où des hyphes peuvent croître dans les graines comme les espèces du genre *Neotyphodium*, ou bien à la fois verticale et horizontale (avec propagation par production de spores pour colonisation d'autres plantes) comme celles du genre *Epichloë* (Saikkonen *et al.*, 2004). Ce mode de transmission uniquement vertical de *Neotyphodium* est dû à la perte de reproduction sexuée, alors qu'*Epichloë* a encore cette capacité (Saikkonen *et al.*, 2004).

Au contraire des endophytes associés aux graminées, les mécanismes et les raisons poussant les endophytes à coloniser les plantes demeurent obscures. De plus on retrouve une très grande variabilité dans les types d'interactions entre la plante et le microorganisme colonisant, laissant supposer de multiples stratégies de vie. Parmi les hypothèses proposées pour expliquer ces stratégies de survie, il est supposé que la colonisation d'une plante permettrait principalement à un organisme endophyte de se protéger plus efficacement des stress biotiques et abiotiques en comparaison à un organisme de la rhizosphère (Hallmann *et al.*, 1997; Schulz & Boyle, 2005; Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

La colonisation d'une plante par un endophyte est la réaction d'un équilibre antagoniste. Comme mentionné précédemment, les endophytes sont des organismes vivant à l'intérieur des plantes ne montrant pas de symptômes de maladie. Cependant les voies de colonisation utilisées par les endophytes sont similaires à celles utilisées par les pathogènes (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soyong, 2008). Ils peuvent coloniser les plantes de manière opportuniste via une blessure, mais peuvent aussi pénétrer dans la plante au moyen d'exoenzymes de dégradation, ainsi que de production de métabolites phytotoxiques (Schulz & Boyle, 2005).

L'équilibre antagoniste est le résultat d'un ajustement entre les réactions de virulence de l'endophyte nécessaires pour la colonisation de la plante, et la réaction de défense de la plante en réponse à la virulence de l'endophyte (Schulz & Boyle, 2005; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Dès lors qu'un déséquilibre est introduit, le résultat se traduit par soit la virulence plus forte que les mécanismes de défense où l'endophyte devient pathogène, soit les défenses plus fortes que la virulence qui conduira au rejet de l'endophyte.

De plus on retrouve une grande diversité de colonisation des endophytes au niveau tissulaire d'une plante. La colonisation peut être définie selon le type d'organisme. Il a ainsi été découvert que les DSE peuvent se retrouver en colonisation intercellulaire mais aussi intracellulaire formant des structures appelées microsclérotés (Jumpponen & Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Schmidt *et al.*, 2008; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). La colonisation peut aussi être limitée à une seule cellule, ou systémique et s'étendre sur une plus grande zone (Stone *et al.*, 2000).

II.2 Les interactions plante-endophyte et leurs effets

Les endophytes recouvrent une grande diversité d'organismes. On retrouvera ainsi un large spectre d'interactions différentes entre la plante et les endophytes. Ainsi une plante peut abriter des organismes plus ou moins bénéfiques pour elle. Dans le cas d'une interaction mutualiste, l'endophyte et la plante retirent tous deux d'un avantage. Les bénéfices retirés sont tout aussi variés pour les deux organismes. La plante peut bénéficier d'une augmentation de sa croissance (Petrini, 1991; Varma *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009). Elle peut obtenir une résistance envers les stress biotiques avec la production de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes induisant une toxicité nouvelle luttant contre l'ingestion de la plante ou encore des antibiotiques contre l'attaque de nouveaux pathogènes (Bacon *et al.*, 1977; Carroll, 1988; Clay, 2001; Selosse *et al.*, 2004; Schulz & Boyle, 2005; Sieber, 2007; Melo *et al.*, 2009). La plante peut aussi être protégée face aux stress abiotiques tels qu'une résistance accrue à la sécheresse (Schardl *et al.*, 2004; Hamilton & Bauerle, 2012). Il est aussi supposé que la colonisation d'un endophyte active la résistance systémique induite de la plante et peut ainsi améliorer la réaction de défense contre les pathogènes. Les interactions plante-endophyte montrent plusieurs similarités avec les interactions plante-pathogènes au niveau des réactions de la plante. Des études ont montrées que lors des deux types d'interaction, on trouve une augmentation de production de H₂O₂ ainsi qu'une activité de peroxydase à l'intérieur de la plante caractéristiques de la réponse hypersensible chez plante (Peters *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2001; Bishop, 2002). Seulement, à la différence d'une infection pathogène, une interaction

plante-endophyte ne conduit pas à une maladie et il est supposé que l'activation des systèmes de défense demeure après la colonisation.

Les endophytes sont des organismes très diversifiés. Les effets résultants d'une interaction plante-endophyte ont ainsi des conséquences très différentes selon les souches considérées, ainsi que l'hôte colonisé.

Les DSE par exemple regroupent un ensemble de champignons ascomycètes conidiques et stériles colonisant principalement les racines des plantes (Jumpponen & Trappe, 1998; Jumpponen, 2001). Ce groupe de champignons représente plus de 600 espèces de 320 genres, et peut coloniser un grand spectre de plante, allant des plantes tropicales aux plantes arctiques (Jumpponen, 2001). Les DSE forment un groupe largement hétérogène, ayant des fonctions écologiques très diverses. Ils peuvent en effet faire des interactions mutualistes ainsi que des interactions pathogènes avec les plantes (Jumpponen, 2001; Andrade-Linares *et al.*, 2011a; Andrade-Linares *et al.*, 2011b). La variabilité du résultat d'une interaction peut dépendre de la souche colonisant (Tellenbach *et al.*, 2011), mais aussi des conditions environnementales (Johnson *et al.*, 1997). Un stress environnemental peut aisément perturber l'équilibre antagoniste existant entre la plante et l'endophyte, résultant potentiellement en maladie ou en rejet de l'endophyte selon le déséquilibre.

II.3 L'étude des endophytes

Les résultats obtenus lorsque l'on étudie les endophytes dépendent fortement de la méthode employée (Guo *et al.*, 2001). D'une part, les endophytes peuvent être étudiés directement par visualisation des organismes colonisateurs avec l'utilisation de matériel d'imagerie et de coloration des tissus (Jumpponen & Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Schmidt *et al.*, 2008; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Cette méthode directe permet de voir les endophytes directement dans la plante, pouvant éliminer le doute sur le fait que l'organisme identifié est à l'intérieur ou non (endophyte ou épiphyte). Cette méthode comporte néanmoins le désavantage de ne pas permettre la détection facile d'endophytes de petite taille tels que les bactéries.

D'autre part, il est possible d'étudier les endophytes en procédant à leur isolation à partir de segments de plantes dont on a fait une stérilisation de surface (Schulz & Boyle, 2005; Schulz *et al.*, 2006; Hyde & Soyong, 2008). De multiples biais de méthodes existent dans ces procédures. La stérilisation de surface est une étape importante de la méthode: elle doit être suffisamment bien faite pour éliminer les organismes épiphytes, mais se doit de ne pas trop endommager les organismes qui sont à l'intérieur de la plante (Schulz & Boyle, 2005; Schulz *et al.*, 2006; Hyde & Soyong, 2008). Plusieurs méthodes de désinfection ont été proposées et le choix d'une méthode requiert quelques tests et ajustements.

Une fois la stérilisation de surface faite, il est important de s'assurer de son efficacité en faisant une impression des segments stériles sur des milieux de culture et en vérifiant si des organismes apparaissent après quelques jours (Schulz *et al.*, 1998; Sanchez-Marquez *et al.*, 2007).

L'autre étape importante concerne la culture des organismes. L'utilisation de différents types de milieux de culture est nécessaire afin de récupérer un maximum de diversité d'organismes (Schulz *et al.*, 2006; Hyde & Soyong, 2008). Les milieux couramment utilisés sont des milieux de culture traditionnels dilués à 10% par rapport à leur concentration normale (Schulz *et al.*, 2006) car les champignons poussent en général plus facilement dans un milieu plus pauvre en nutriments. Dans le même sens, il est aussi possible d'utiliser différentes concentrations de milieux pour obtenir une diversité encore plus grande d'organismes, en utilisant des milieux encore plus dilués par exemple (Ferrari *et al.*, 2011).

Cependant cette technique montre ses limites. Plusieurs organismes ne pourront pas être récupérés car ils ne sont pas capables de pousser sur milieux conventionnels (Guo *et al.*, 2001; Duong *et al.*, 2006), ou parce qu'ils poussent de manière très lente en comparaison à d'autres champignons présents sur le milieu (Taylor *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008). Les endophytes obligatoires seront aussi écartés de cette méthode, n'étant pas capable de pousser sans la présence d'une plante (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soyong, 2008).

Enfin il est possible d'étudier la communauté endophyte d'un organisme par les techniques de la biologie moléculaire. Cette méthode permet potentiellement d'identifier toute la biodiversité des communautés endophytes, ce que les deux premières méthodes d'isolation

ne peuvent pas faire. Les différentes méthodes impliquent l'extraction totale d'ADN de l'organe, puis l'amplification de séquence avec des amorces spécifiques des champignons (séquences ITS de l'ADN ribosomiques) ou de bactéries (ADNr 16S). L'étude de la diversité peut ensuite se faire par clonage et séquençage de produits PCR (Guo *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Seena *et al.*, 2008), ou par analyse de ceux-ci avec l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE) (Duong *et al.*, 2006).

L'amplification directe permet d'obtenir une plus grande diversité d'organismes endophytes et d'avoir une meilleure idée sur la structure des communautés microbiennes colonisant l'organisme. Par contre, elle ne permet cependant pas l'obtention des souches détectées et ainsi une analyse potentielle de l'effet des endophytes sur la plante.

III. La phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation de plantes afin de procéder à l'assainissement de sols contaminés (Cunningham & Berti, 1993). Cette méthode de décontamination des sols est beaucoup plus économique (environ 10 fois) et écologique que les méthodes traditionnelles impliquant des traitements physico-chimiques du sol (Salt *et al.*, 1998; Pilon-Smits, 2005). Ces procédés traditionnels incluent l'excavation et stockage du sol, transport, lavage et traitements chimiques afin d'éliminer les contaminants, rendant cette technique très chère et utilisant beaucoup d'énergie (Chaudhry *et al.*, 2005; Göhre & Paszkowski, 2006; Kaimi *et al.*, 2007).

La phytoremédiation peut être appliquée pour les contaminations organiques et inorganiques (Salt *et al.*, 1998). On retrouve plusieurs stratégies de phytoremédiation: la phytoextraction avec accumulation de contaminants dans la plante, puis collecte de la plante; la phytodégradation où la plante dégrade les polluants organiques; la rhizofiltration utilisant les racines de la plante pour éliminer les contaminants présents dans l'eau; la phytostabilisation ayant pour but de réduire la mobilité et la disponibilité des polluants dans l'environnement, ainsi que la phytovolatilisation pour volatiliser les polluants (Salt *et al.*, 1998; Pilon-Smits, 2005). On peut retrouver plusieurs de ces processus dans un même système de phytoremédiation (Hansen *et al.*, 1998).

Les études sur la phytoremédiation se sont d'abord tournées vers les plantes hyper-accumulatrices. Certaines plantes ont en effet la capacité d'accumuler de grandes quantités de polluants inorganiques dans leurs tissus (Salt *et al.*, 1998). Des observations ont entre autre pu montrer de grandes teneurs en cobalt, cuivre, manganèse, plomb, nickel, zinc, sélénium, cuivre et cadmium dans les tissus des plantes (Baker & Brooks, 1989; Bañuelos *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1998; Vara Prasad & de Oliveira Freitas, 2003).

La phytoextraction d'éléments inorganiques peut bénéficier de l'ajout de chélateurs dans l'environnement afin d'augmenter la disponibilité des contaminants pour la plante. L'ajout d'EDTA, d'EGTA et de citrate ont par exemple permis une meilleure extraction de plomb, cadmium et d'uranium des sols (Blaylock *et al.*, 1997; Salt *et al.*, 1998).

Il existe un lien étroit entre les plantes et les microorganismes de la rhizosphère lors de la phytoremédiation, notamment dans la décontamination d'éléments organiques du sol (Siciliano & Germida, 1998; Ho & Banks, 2006). Les racines influencent la rhizosphère par des changements de pH, d'apport d'oxygène ainsi qu'en apportant une source d'énergie provenant de racines mortes ou d'exsudats riches en carbone (Marschner *et al.*, 1986; Dennis *et al.*, 2010; Lundberg *et al.*, 2012).

En plus de la rhizosphère, il a été montré que les plantes influencent les communautés endophytes qui les colonisent en réponse à la contamination du sol sur lequel elles poussent. Ainsi il a été trouvé que des plantes en milieu contaminé par des éléments nitro-aromatiques favorisent naturellement les organismes endophytes ayant les gènes de décomposition des composés nitro-aromatiques, et que ces souches étaient plus fréquentes dans la plante que dans la rhizosphère associée (Siciliano *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2008). De plus les endophytes interagissent plus étroitement avec la plante que les microorganismes de la rhizosphère et pourraient potentiellement améliorer la phytoremédiation (Weyens *et al.*, 2009; Weyens *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012).

La recherche sur les organismes endophytes associés aux plantes pour l'amélioration de la phytoremédiation représente une avenue prometteuse. Les études passées ont privilégiés la recherche portant sur les bactéries endophytes pour assister à la phytoremédiation, et peu de

choses sont connues parmi les champignons endophytes et leur association avec les plantes (Li *et al.*, 2012). Les champignons endophytes ont une très grande plasticité développementale et sont aussi sources de nombreux métabolites secondaires (Tan & Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Hyde & Soyong, 2008). Ainsi, près de 4500 métabolites secondaires ont pu être isolés à partir de 6500 champignons endophytes de plantes herbacées et d'arbres par Schulz *et al.* (2002). D'autre part, dû à la complexité de structure de la lignine, les champignons lignolytiques émettent des enzymes extracellulaires à faible spécificité de substrat. On retrouve trois types d'enzymes parmi ces composés: des peroxydases de lignine, des peroxydases dépendantes au manganèse ainsi que des phénol-oxydases (laccases et tyrosinase) (Ball & Jackson, 1995; Hofrichter *et al.*, 1998). Des expériences avec des enzymes pures ont montré que les enzymes lignolytiques peuvent dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Hofrichter *et al.*, 1999).

Par ailleurs de nombreux champignons appartenant aux genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Pseudallescheria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* et *Paecilomyces* ont la capacité de produire des enzymes extracellulaires similaires aux enzymes de dégradation de la lignine pour métaboliser des hydrocarbures pétroliers (Naranjo *et al.*, 2007).

Une étude portant sur la phytoremédiation de sols contaminés au pétrole a montré une action bénéfique de la colonisation des plantes par des organismes endophytes. Dans leur étude Soleimani *et al.* (2010) se sont intéressés aux effets de la colonisation de deux espèces de graminées (*Festuca arundinacea* Schreb. and *Festuca pratensis* Huds.) par des endophytes clavipitaléens (*Neotyphodium coenophialum* et *Neotyphodium uncinatum* respectivement). Les auteurs ont trouvé que les plantes colonisées par les endophytes possédaient une biomasse plus importante que les plantes non colonisées. De même, la teneur en pétrole totale s'est vue diminuée dans les échantillons de sols avec les plantes colonisées, ainsi qu'une activité de déshydrogénase plus importante dans le sol (indicateur d'une plus grande activité microbienne du sol) dans ces mêmes conditions par rapport au sol des plantes non colonisées.

IV. Objectifs du projet

Le projet de recherche s'inscrit dans le projet GenoRem sur la bioremédiation, avec l'étude des champignons endophytes en milieu pollué. Dans cet objectif, nous avons à notre disposition des plantes poussant en milieu contaminé avec des niveaux de pollutions extrêmes en hydrocarbures pétroliers (hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB)) sur le site d'une ancienne usine pétrochimique dans la région de Montréal (Varenes, Québec).

L'objectif principal de ma maîtrise est d'étudier les organismes endophytes des plantes poussant sur ce site contaminé, en utilisant les méthodes conventionnelles d'isolation sur différents milieux de culture, ainsi que d'en faire une identification moléculaire. L'axe de recherche portant sur les endophytes et leur utilisation dans la phytoremédiation est une nouvelle avenue prometteuse pour améliorer ces techniques. Les recherches entreprises ces dernières années ont été majoritairement faites sur les bactéries et ainsi peu de choses sont connues pour les champignons endophytes, aussi bien dans la caractérisation des communautés colonisant les racines d'une plante que dans le rôle qu'ils peuvent jouer dans leur symbiose avec la plante.

IV.1 Objectifs spécifiques

Mon projet de maîtrise se divise en deux volets:

1) Isolation et identification moléculaire des champignons endophytes de plantes poussant naturellement en milieu contaminé

- isolation de souches de champignons endophytes
- identification moléculaire des souches en utilisant les ITS

2) *Étude des structures des communautés des champignons endophytes en fonction de la contamination du sol*

- amplification directe des séquences de champignons endophytes de végétation poussant en milieu contaminé

- analyse des structures de communautés des endophytes en fonction du type de plante et du niveau de contamination

- évaluation des pressions environnementales sur le recrutement des endophytes par les plantes

IV.2 Hypothèses de départ

À partir des données existantes dans la littérature à ce jour sur les études des endophytes et de leur utilisation dans la phytoremédiation, nous savons que des endophytes colonisent les plantes poussant en milieu contaminé et nous posons les hypothèses suivantes:

- 1) le recrutement des endophytes se fait de manières différentes selon les différentes espèces de plantes et selon le niveau de contamination des sols.

- 2) l'isolement physique des souches de champignons endophytes ne permet pas un échantillonnage représentatif de la population des organismes endophytes.

Chapitre I: Level of petroleum-hydrocarbon contamination shapes fungal endophytic community structure in plant roots

Ce chapitre est en cours de préparation pour soumission prochaine.

Guillaume Bourdel, Alice Roy-Bolduc, Marc St-Arnaud and Mohamed Hijri*

Institut de recherche en biologie végétale, Département de sciences biologiques, Université de Montréal 4101 Sherbrooke est, Montréal, QC, H1X 2B2, Canada.

* Corresponding author: M. Hijri;

IRBV, 4101 Rue Sherbrooke Est, QC, H1X 2B2, Canada

Phone: +1 514 868 5136

Fax: +1 514 872 9406

Running title: Fungal endophyte community structure in plant roots

Keywords: Fungi, Endophytes, Petroleum-hydrocarbon contamination, Pyrosequencing, Ribosomal DNA, *Eleocharis erythropoda*, *Populus* sp.

I. Abstract

Plant-roots inhabiting fungi is a universal phenomenon found in all ecosystems where plants are able to grow, even in harsh environments. Interactions between fungi with plant roots can vary widely from mutualism to parasitism depending on many parameters. The diversity and community assemblage of fungal endophytes in extremely polluted sites and their role on phytoremediation remains largely unexplored. In this study, we investigated the community structure of endophytic fungi in roots of two plant species growing spontaneously in petroleum-contaminated sedimentation basins of a former petro-chemical plant using pyrosequencing on ITS of ribosomal DNA and a culture-based isolation approach. Three individual plants of *Eleocharis erythropoda* and *Populus* sp. each were sampled in three adjacent basins that have different levels of petroleum hydrocarbon pollutants. We found that contamination level significantly shaped endophytic fungal diversity and community composition in *E. erythropoda*. Only 9.9% of the total fungal OTUs in 454 sequencing data were found in the three basins. However, fungal diversity and community structure of *Populus* sp. remained unchanged with 28.2% of fungal OTUs were shared among the three basins. This could be explained by the smaller differences of pollutant concentrations in *Populus* sp. basins compared to those of *E. erythropoda*. Culture-based approach allowed isolating 11 and 30 fungal endophyte species from surface-sterilized roots of *E. erythropoda* and *Populus* sp. respectively. These isolates were ribotyped using ITS, whose sequences were found in pyrosequencing datasets. Our study demonstrated that extreme level of pollution reduced fungal diversity and shaped their community composition. This could help to develop strategies for improving phytoremediation using fungal endophytes.

II. Introduction

Endophyte means literally any organism that lives inside a plant (from Greek *endon* = inside and *phyton* = plant). Endophytes encompass a broad variety of hosts and colonising organisms. The term endophyte usually refers to bacteria (Kobayashi & Palumbo, 2000) and fungi (Stone *et al.*, 2000), but algae (Peters, 1991) and insects (Feller, 1995) can also be considered as endophytes in some occasions. Endophytic bacteria and fungi have been found in all plants studied so far, providing examples of the broad variety of colonising organisms as well as host organisms for endophytic interactions (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soytong, 2008). However, many definitions of the term endophyte exist but the most accepted is that an endophyte is an organism living in healthy plant tissues without any apparent disease symptoms (Petrini, 1991; Wilson, 1995; Stone *et al.*, 2000; Schulz & Boyle, 2005). Therefore there are many different types of interactions between an endophytic organism and the plants spanning from mutualism (Sieber, 2002) to parasitism (Kogel *et al.*, 2006; Paszkowski, 2006). In addition some latent pathogens are considered as endophytes (Schulz *et al.*, 2006). Plants may benefit from the presence of endophytes such as increased growth (Petrini, 1991; Varma *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009), and resistance against biotic (Bacon *et al.*, 1977; Carroll, 1988; Melo *et al.*, 2009) and abiotic stresses, e.g. drought tolerance (Schardl *et al.*, 2004; Hamilton & Bauerle, 2012).

The biodiversity of endophytic organisms has been increasingly investigated in the last decades, and methods of studying endophytes within plants have evolved over time. Endophytic detection was first carried out using microscopy and plant tissue staining for identification (Jumpponen & Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Isolation of endophytes using surface-sterilised plant tissues on growth media has been intensively used for bacteria and fungi (Schulz & Boyle, 2005; Schulz *et al.*, 2006). Isolation methods have been showed to provide better results than microscopic observation, although they require a lot of effort and time, and could also be biased depending on the type of media used and sampling effort (Hyde & Soytong, 2008). In recent years, the study of endophytes has shifted towards culture-independent methods using molecular approaches such as PCR cloning and sequencing, as well as next-generation sequencing. These molecular approaches can be directly applied to any plant tissue and they can be used to study changes in community

structure of endophytes within plants. For example, some studies undertaken with *Arabidopsis thaliana* grown in different soils, revealed different patterns of endophytic bacteria inhabiting the plant roots (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012). Studying the community structure of endophytes allows us to better understand the dynamics including taxonomic profile and relative abundance of living organisms within plant tissues as well as their putative roles in plant-growth promoting activities.

Phytoremediation consists of using plants to remove pollutants from contaminated soils (Cunningham & Berti, 1993). This decontamination method is a cost-effective as well as environmentally friendly biotechnology compared to conventional methods involving excavation, transportation and soil disposal, as well as physical and chemical treatments (Salt *et al.*, 1998; Pilon-Smits, 2005). These traditional processes usually include removing the soil from the contaminated sites for *ex situ* treatment and chemically removing pollutants, which is an expensive and energy demanding technology (Chaudhry *et al.*, 2005; Göhre & Paszkowski, 2006; Kaimi *et al.*, 2007). Limits to phytoremediation use include efficiency of pollutant removal, longer treatment duration and the depth of treated soils (Chaudhry *et al.*, 2005; Pilon-Smits, 2005). Thus many attempts have been undertaken to enhance phytoremediation efficiency by selecting performing plant species and cultivars, and their associated microorganisms, such as rhizospheric microbes, endophytes and symbiotic microorganisms.

Although many studies on endophytes have been reported, interactions between endophyte organisms and their host in particular in phytoremediation are still poorly understood (Soleimani *et al.*, 2010). Furthermore bacterial endophytes have been traditionally much more studied than fungal endophytes while the fungal role in plant growth-promoting abilities remains unexplored in phytoremediation (Li *et al.*, 2012). It has been shown that the use of endophytic fungi enhanced phytoremediation applications because of their developmental plasticity and production of variety of secondary metabolites and enzymes that could degrade or sequester pollutants (Tan & Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Hyde & Soyong, 2008). Soleimani *et al.* (2010) have studied the effect of two grass species *Festuca arundinacea* Schreb. and *Festuca pratensis* Huds. infected with endophytic fungi *Neotyphodium coenophialum* and *Neotyphodium uncinatum* respectively, on the degradation of petroleum hydrocarbon in a contaminated soil. The authors found that infected plants were able to decontaminate soils better than non-inoculated plants. However, the authors used

plants and endophytic strains that are not native to the contaminated site and the fungi used for inoculation belong to the *Balansia* group, a group of well-studied endophytic fungi known for their beneficial roles for grasses (Bacon *et al.*, 1977; Schulz *et al.*, 1993).

The aim of this study was to investigate the community structure of endophytic fungi in roots of two plant species growing spontaneously in petroleum-contaminated basins of a former petro-chemical plant. These species were *Eleocharis erythropoda* and *Populus* sp. These plant species have been selected in this study because they were locally abundant and can be found in three adjacent basins that have different levels of petroleum hydrocarbon pollutants. Thee individual plants were sampled from three basins (no-contamination, low and extreme levels of contamination) for both species. Roots were subjected to DNA extraction and to 454 amplicon sequencing using ITS in order to evaluate the diversity of endophytic fungi and changes in community structures in the roots in response to levels of contamination. Fungal isolation procedures based on culture-dependant approach was also investigated and compared to that of amplicon sequencing.

III. Materials and Methods

III.1 Site description and sampling

Sampling was done at the site of a former petrochemical plant located in the Montreal region (Varenes, 45°43 N, 73°22 W, Québec, Canada). The sampling site consisted of three sedimentation basins separated by dikes in which petroleum hydrocarbon wastes were dumped for many decades. We chose *E. erythropoda* and *Populus* sp., two plants that are spontaneously growing in these three basins for our study. Roots of these two plants were sampled in each basin. We collected three replicates of each plant in the three basins. The total sampling consisted of 18 root samples (2 plant species, 3 replicates in each 3 basins). These samples were used for pyrosequencing.

In addition, composite samples were made by collecting three subsamples of roots that were cut in small pieces that were used for isolation of endophytes. Other composite soil

samples were also made by collecting three subsamples of rhizospheric soils that were used for chemical analyses for assessing petroleum hydrocarbon contaminants.

III.2 Soil contamination analysis

Soil analyses were performed by Maxxam Analytics (Montréal, Québec, Canada). We measured polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), aliphatic hydrocarbons C10-C50 and polychlorinated biphenyl (PCB). Soil analysis data are shown in Table 1. Analysis revealed concentrations of 3000, 41000 and 91000 mg.kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbon (TPH) in soil where *E. erythropoda* roots were sampled, and concentrations of 280, 380 and 9040 mg.kg⁻¹ of TPH where *Populus* sp. roots were sampled.

III.3 Endophytic fungal isolation procedure

Eleocharis erythropoda and *Populus* sp. root samples were used to isolate fungal endophytes. Root samples were processed immediately after their collection from the site. Roots were cleaned using tap water in order to remove soil particles and were put in 50 mL Falcon tubes. After cleaning, roots were surface-sterilized using the following procedure: roots were first washed three times in sterile water, followed by immersion in 3% H₂O₂ solution for 4 min, 6% NaOCl solution for 7.5 min, 96% ethanol for 2.5 min and 3% H₂O₂ solution for 3.5 min. Roots were rinsed three times between each treatment using autoclaved water and were rinsed again five times. The last rinsing water was then kept in a 50 mL Falcon tube to assess the presence of any microorganisms in order to test the surface sterilization efficiency. Root-imprint on plates containing each media type (as described below), was another approach to test surface sterilization efficiency.

Media used in this experiment were 0.1 x PDA medium (1/10 strength), 0.1 x Malt medium and Gel-Gro® medium containing 0.4% Gel-Gro® (ICN Biochemicals Aurora, Ohio, USA), plus 0.03% MgSO₄ (Silvani *et al.*, 2008). 100 µg.µL⁻¹ streptomycin was added to each medium. As a control, 150 µL of the last rinsing water were also plated on each medium in triplicates and incubated at 27°C. Surface sterilization efficiency was checked by following up the growth for potential contamination of microorganisms in media using both last rinsing

water and root-prints. In the meantime roots were cut in 5 mm segments and put on each medium for fungal endophytes isolation. For each sample (meaning samples for both plants sampled from each contaminated basin) a total of 90 root segments were put in culture with 5 segments per Petri dish and 6 dishes per medium type. For Gel-Gro® medium root segments were placed inside a 150 µL drop of medium as described in Silvani *et al.* (2008). Plates were incubated at 27°C and check after five days for growth under binocular microscope for hyphae emerging from cut ends. Segments showing growing hyphae, were transferred and cultured on 0.1 x Malt medium as per Silvani *et al.* (2008) description with a single fragment per plate and incubated at 27°C for growth. Fungal isolates were further subcultured in triplicates using the same culture media used for isolation.

III.4 DNA extraction, PCR amplification and sequencing of isolated fungal endophytes

For DNA extraction, pure fungal isolates were grown on liquid 0.1 x Malt media. DNA extraction was performed using E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) according the manufacturer's instructions with an additional first step in which fungal mycelia were dried out on clean paper towel to remove liquid medium and heated at 50°C in 1.5 mL tubes. Mycelia were crushed with liquid nitrogen using a micro pestle in the 1.5 mL. No DTT buffer was used in the DNA extraction. Incubation time at step 5 of the protocol was 60 min and the final elution volume was 70 µL.

PCR amplification of ITS regions was performed using ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers (White *et al.*, 1990). PCR reactions were performed in volume of 50 µL containing 2 µL of DNA template, 1X of PCR Buffer, 0.4 µM of each primer, 0.25 mM of dNTPs, 1 µg.µL⁻¹ of bovine serum albumin, 2.5 mM of MgCl₂, 1 U of HotStar *Taq* polymerase (QIAGEN, Toronto, ON, Canada) or 0.75 U of Kapa *Taq* polymerase (VWR, Montreal, Québec, Canada). Cycling conditions were as follows: 15 min for HotStar *Taq* or 2 min for Kapa *Taq* at 95°C, 32 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final elongation step of 72°C for 10 min. PCR reactions were run on MaterCycler Pro S (Eppendorf, Mississauga, Ontario, Canada). PCR patterns were revealed with agarose gel

electrophoresis using GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Positive PCR reactions were directly sequenced at the Genome Quebec Innovation Centre (McGill University, Montreal, QC). Geneious Pro v.4.8.5 (Drummond *et al.*, 2009) was used to analyse sequences. Blast nucleotide searches were performed at the NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

III.5 454-Amplicon sequencing

DNA of surface sterilised roots was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Toronto, Ontario, Canada) according the manufacturer's instructions. Roots were crushed using a mortar and pestle in liquid nitrogen. Soil DNA extraction was performed using NucleoSpin Soil kit (Macherey-Nagel, Toronto, Ontario, Canada) using 250 mg of soil and the lysis step as follows: samples were put in a Tissue Lyser (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada) for 15 min at 3 Hz, and then in a FastPrep (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 3 times for 20 sec at speed 4.

ITS amplicons were obtained using ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns, 1993) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Forward primers for each sample were tagged with unique multiplex identifiers (MIDs). PCR amplifications were done in a volume of 20 μL containing 0.275 μM of each primer, 415 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of bovine serum albumin, 0.83 μL of Tween20 1% solution (v/v), 0.83 μL of dimethyl sulfoxide 0.275 mM of dNTPs, final concentration of 2.75 mM of MgCl_2 , 1X of *Taq* polymerase buffer, 0.5 U of *Taq* polymerase (QIAGEN, Toronto, Ontario, Canada) and 2 μL of genomic DNA as a template. Amplicons were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Toronto, Ontario, Canada). Triplicate samples were pooled together and DNA concentration was quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). All samples were then pooled together in an equimolar ratio and were sent to sequencing at the Genome Quebec Innovation Centre (McGill University, Montréal, Québec, Canada) using the 454 GS-FLX Titanium Lib-L chemistry (Roche, Laval, Québec, Canada).

III.6 Sequence analysis

Sequences were pre-processed in mothur v1.29.2 (Schloss *et al.*, 2009) and then imported in Qiime (Caporaso *et al.*, 2010) for quality filtering. Low quality ends were trimmed using a moving window of 50 bp with a minimum quality score of 25. Reads shorter than 200 bp, longer than 1000 bp, with more than two ambiguities (Ns), with homopolymers longer than 8 bp, with two or more mismatches in the primer or barcode were eliminated. Reads were then pruned to a fixed length (400 bp) with mothur. Usearch v7.0 (Edgar, 2010) was used for chimera checking and clustering into OTUs. Singletons (i.e. OTUs represented by only one read) were eliminated because they are mostly artifacts that can be attributed to sequencing errors (Tedersoo *et al.*, 2010). Finally, reads were mapped back into an OTU table and all global singletons (i.e. OTUs represented by a single sequence in the complete dataset) were eliminated. Taxonomy was assigned to each OTU consensus sequence using the UNITE database (Kõljalg *et al.*, 2013) in mothur with a minimum bootstrap value of 60%.

III.7 Statistical analysis

All statistical analyses were conducted in R v.3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing; available at <http://www.R-project.org>) and in mothur. In order to observe patterns in fungal endophytes diversity, we conducted OTU rarefaction analysis for individual samples. The ‘rarefaction.single’ command in mothur was used with 1000 iterations of re-sampling without replacement to compute both Chao total richness estimators (Chao, 1984) and Good’s coverage (Good, 1953), and to generate rarefied samples. A sampling effort curve showing the number of OTUs recorded in relation to the number of roots samples examined for both *E. erythropoda* and *Populus sp.* was also computed in mothur. Mean endophyte richness at the different contamination levels was calculated and compared using One-Way ANOVA in R with the ‘aov’ function of the ‘stats’ package’. Endophyte community composition in terms of OTUs was examined using a type of unconstrained ordination: a principal component analysis (PCoA). We used the Hellinger distance calculated in the ‘vegan’ package (Oksanen *et al.*, 2013) and the PCoA was computed using the ‘pcoa’ function of the ‘ape’ package (Paradis *et al.*, 2004).

IV. Results

IV.1 Culture-based isolation of fungal endophytes from sterilized-plant roots

A total of 41 endophytic fungal strains were obtained from *E. erythropoda* (11 strains in total) and *Populus* sp. (30 strains in total) roots. We isolated nine endophytes from *E. erythropoda* roots sampled in soils containing 3000 and 40000 mg.kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbon (TPH) while only two strains were successfully isolated from *E. erythropoda* roots sampled in soils containing extreme level of pollution (91000 mg.kg⁻¹ of TPH). We isolated 23 and seven fungal strains from *Populus* sp. roots sampled in soil containing 280-380 and 9040 mg.kg⁻¹ of TPH, respectively (Table 2). Strain identification revealed that *Fusarium* and *Leptosphaeria* were the most represented genera with 5 strains belonging to each genus and were both isolated from *Populus* sp. roots. All the isolated endophytes belonged to Dikarya (Ascomycota and Basidiomycota). Thirty-nine isolates were ascomycetes and only two isolates were basidiomycetes.

IV.2 Endophyte fungal diversity and community composition

We used Amplicon 454-pyrosequencing to assess diversity and community composition of fungal endophytes in *E. erythropoda* and *Populus* sp. roots sampled in the three different sedimentation basins. A total of 721,191 raw sequences were initially retrieved from 18 root samples. After quality trimming, sequence filtering and standardizing the number of sequences per sample, a total of 217,086 sequences were recovered, which represent 30% of the raw sequences. Rarefaction curves of OTU richness reached saturation at each level of contamination for plant roots samples, Good's coverage were close to 1 (Figure 1). Using a similarity threshold of 97% to cluster sequences belonging to the same OTU, a total of 592 OTUs were recovered from endophytic fungal datasets.

No significant changes in fungal diversity between contamination levels for both *E. erythropoda* and *Populus* sp. endophytic communities were found using ANOVA (Figure 2).

Community analyses were assessed using principal component analysis and did not show an effect of contamination levels on community structures for both *E. erythropoda* and *Populus* sp. (Figure 3). Samples from the same contamination level showed distinct compositions. Some communities from the 91000 mg.kg⁻¹ contamination level showed slight overlap with those from the 41000 mg.kg⁻¹ contamination in *E. erythropoda* roots, as well as a slight overlap between some communities from all three contamination levels in *Populus* sp. roots.

The endophytic OTUs represented three fungal phyla: Ascomycota, Basidiomycota and Glomeromycota as well as other unclassified fungal taxa, although a large dominance of ascomycetes was observed across all contamination levels.

Shifts in communities were different between *E. erythropoda* and *Populus* sp. fungal endophytes (Figure 4). Contaminated *E. erythropoda* samples (41000 and 91000 mg.kg⁻¹ of TPH) were dominated by Dothideomycetes with as low as 44% and much as 97.46% of sequences affiliated to this class in 41000 mg.kg⁻¹ of TPH samples, and the most OTUs belonged to the order Pleosporales. Root samples of contamination level of 3000 mg.kg⁻¹ showed a higher relative abundance of Sordariomycetes (mainly from the order Hypocreales) and unidentified Ascomycota.

Populus sp. samples did not show a significant shift in taxonomic composition with Ascomycota dominating all samples. Leotiomycetes accounted between 10% and 20% of the total OTUs of the 280 mg.kg⁻¹ of TPH samples.

While Dothideomycetes dominated in *E. erythropoda* roots sampled in highly contaminated basins, unclassified ascomycetes were dominant in *Populus* sp. roots.

We compared OTUs shared between samples of each plant (Figure 5). We found 9.9% and 28.2% of shared OTUs between the different contamination levels in *E. erythropoda* and *Populus* sp., respectively. Level of 41000 mg.kg⁻¹ TPH contamination showed the greatest amount of unique OTUs in *E. erythropoda*, while the two other contamination levels (3000 and 91000 mg.kg⁻¹ TPH) showed similar percentage of unique OTUs. However, the community composition between these contamination levels was completely different with only 1.2% of shared OTUs.

V. Discussion

It has been reported that community structure of soil microorganisms are influenced by environmental conditions such as contamination levels and vegetation (Ferrari *et al.*, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2012; Abbai & Pillay, 2013; Bell *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). In this study, we investigated the changes in community structure of endophytic fungi in relation to contamination levels in two spontaneous plant species using high-throughput sequencing and isolation methods. Our results showed that there was no statistical change in endophyte diversity between contamination levels in each plant species with the Chao estimator. Furthermore PCoA did not show differences in community structures of endophytic fungi with changes in contamination levels for each plant species. However taxonomic composition showed different shifts in community compositions between *E. erythropoda* and *Populus* sp. where *E. erythropoda* showed a greater abundance of Dothideomycetes in the 41000 mg.kg⁻¹ and 91000 mg.kg⁻¹ TPH samples which is not seen in the 3000 mg.kg⁻¹ TPH samples.

While previous studies generally showed a correlation between the increase of contamination levels and the decrease of soil microorganism diversity (Törneman *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2011; Bell *et al.*, 2013), our results on root endophytic fungi did not clearly show the same pattern. These studies focused on soil microorganisms while we investigated endophytic fungi. The cryptic nature of endophytic fungi living inside their plant host roots compared to soil microorganisms may explain the differences in these results. Indeed, endophytic fungi may be more protected from environmental stresses and thus soil microorganisms might be more prone to changes in their community in case of such stresses such as petroleum contamination for example. Furthermore our study investigated endophytic fungal communities associated with spontaneous vegetation while Bell *et al.* (2013) investigated changes of community structures after the introduction of plant species in the disturbed field. The spontaneous vegetation and their associated root endophytic fungi may have had the chance to stabilize more over time and thus showed less variation than soils where introduction of plant species occurred. Plant species introduction can change environmental conditions such as soil nutrient availability via root exudation, leading to the

promotion of certain microorganisms in the rhizosphere (Van Breemen & Finzi, 1998; Reynolds *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006).

The abundance of Dothideomycetes in *E. erythropoda* roots growing in high levels of petroleum hydrocarbon levels is in line with findings of Ferrari *et al.* (2011) and Bell *et al.* (2013) where they found this group to be dominant in high hydrocarbon conditions. The genus *Alternaria* accounted for the majority of the Dothideomycetes sequencing reads found in *E. erythropoda* roots. While generally described as a plant pathogen (Thomma, 2003), some *Alternaria* species do not exhibit pathogen behaviour and might help plants to deter pathogens by showing potential antimicrobial activity (Gu, 2009).

Our results suggest that studying microorganism community structures is highly dependent on the method used. Isolation methods using different types of media and 454 sequencing did not reveal the same predominant genera. This is similar to the study of Stefani *et al.* (2014) where bacterial and fungal diversity in hydrocarbon-contaminated soils were assessed using culture-dependent and independent methods. Their results showed that microorganism isolation did not represent the most abundant OTUs found in 454 sequencing for both bacteria and fungi communities.

VI. Conclusion and perspectives

The results of our study show that in some cases endophytic fungi community structure in plants is shaped by levels of petroleum-hydrocarbon contamination. It also appears that culture-dependent and -independent methods do not promote the same strains, as the most abundant reads in 454 sequencing do not match with the most species recovered using isolation methods from samples taken from the same contamination levels. It is therefore important to better understand how endophytic fungi are recruited by plants and what their role is when inside the plant. This could potentially help develop newer and better strategies to improve phytoremediation using endophytic fungi. Improvement of such techniques could involve a better colonization of the soil by the plants with the help of endophytic fungi. Such

earlier colonisation of contaminated sites could in turn favor and stabilize soil microorganisms that are responsible in the decontamination processes involved in phytoremediation techniques.

VII. Acknowledgements

This project was supported by the Genome Canada and Genome Quebec funded Genorem project which are greatly acknowledged. We thank Petromont Inc. (ConocoPhillips Canada) for allowing us to access to the Varennes field site. We also thank Karen Fisher-Favret for comments on the manuscript.

VIII. Tables and figures

Table 1. Concentrations of Petroleum hydrocarbon pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs], alkanes [C10-C50] and total polychlorinated biphenyls [PBCs]) in the sediments of the three basins where *Eleocharis erythropoda* (E) and *Populus* sp. (P) plants were collected. Concentrations (mg.kg⁻¹) above the accepted limits are in bold.

Petroleum Hydrocarbons		Accepted limit values ^[1]	Concentrations (mg.kg ⁻¹)					
			Basin 1		Basin 2		Basin 3	
			E	P	E	P	E	P
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)	Acenaphthene	100	760	150	620	<0.1	0.2	<0.1
	Anthracene	100	340	28	570	3.8	6.7	3.7
	Benzo(a)anthracene	10	21	7.2	83	0.7	1.5	<0.1
	Benzo(c)phenanthrene	10	9	3	39	0.3	1.3	<0.1
	Chrysene	10	23	8.8	99	1.2	1.1	<0.2
	Fluoranthene	100	97	30	300	0.5	2.8	<0.1
	Fluorene	100	710	78	630	0.2	0.3	0.1
	Naphtalene	50	11	52	150	<0.1	<0.1	<0.1
	Phenanthrene	50	2700	357	4300	<0.1	1	0.2
	Pyrene	100	150	47	440	1.9	14	0.1
	2-Methylnaphthalene	10	160	62	240	<0.1	<0.1	<0.1
	1-Methylnaphthalene	10	320	77	300	<0.1	<0.1	<0.1
	1,3-Dimethylnaphthalene	10	390	123	580	<0.1	<0.1	<0.1
2,3,5-Trimethylnaphthalene	10	150	18	280	<0.1	0.2	<0.1	
Alkanes (C10-C50)		3500	41000	9040	91000	380	3000	280
Polychlorinated Biphenyls		10	<1	<1	20	<0.01	0.3	0.1

¹Values corresponding to the maximum limit accepted for contamination of industrial areas by the Sustainable Development, Environment, Wildlife and Parks Department of the Province of Québec, Canada (http://www.mddefp.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_tableau_1.htm).

Table 2. List of isolated fungal endophytes from surface-sterilized roots of *Eleocharis erythropoda* (E) and *Populus* sp. (P).

Isolate	Roots	TPH (g.kg ⁻¹)	Identification	Closest match (accession number, % identity)
1	E	3	Unidentified fungus 01	Uncultured fungus (FM875862, 99%)
2	E	3	<i>Plectosphaerella</i> sp. 01	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (JX431888, 99%)
3	E	3	<i>Plectosphaerella</i> sp. 02	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (JX431888, 99%)
4	E	41	Pleosporaceae sp.	Uncultured Pleosporaceae (FM178248, 98%)
5	E	41	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria rosae</i> (KC797650, 97%)
6	E	91	Unidentified fungus 02	Uncultured fungus (JQ989297, 99%)
7	E	91	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Emericellopsis minima</i> (U57675, 100%)
8	E	3	Unidentified fungus 03	Uncultured fungus (JQ989297, 100%)
9	E	3	Unidentified fungus 04	Uncultured fungus (JQ989322, 99%)
10	E	3	Sordariales sp. 01	Uncultured Sordariales (JN802311, 98%)
11	E	3	Sordariales sp. 02	Uncultured Sordariales (JN802311, 97%)
12	P	9	<i>Fusarium oxysporum</i> 01	<i>Fusarium oxysporum</i> (JX045827, 99%)
13	P	9	Unidentified fungus 05	Fungal sp. (GU566228, 99%)
14	P	9	<i>Penicillium</i> sp. 01	<i>Penicillium</i> sp. (KF811430, 100%)
15	P	9	Pleosporales sp.	Pleosporales sp. (KC460810, 98%)
16	P	9	Unidentified fungus 06	Uncultured fungus (KF800645, 99%)
17	P	9	Ascomycota sp.	Ascomycota sp. (AB566314, 100%)
18	P	9	<i>Schizophyllum</i> sp.	<i>Schizophyllum commune</i> (JN882337, 97%)
19	P	0.3	Unidentified fungus 07	Fungal sp. (GU566255, 100%)
20	P	0.3	<i>Pythium</i> sp. 01	<i>Pythium sterilum</i> (JQ898474, 98%)
21	P	0.3	<i>Leptosphaeria</i> sp. 01	<i>Leptosphaeria</i> sp. (AB752252, 100%)
22	P	0.3	Unidentified fungus 08	Fungal sp. (GU566255, 100%)
23	P	0.3	<i>Pythium</i> sp. 02	<i>Pythium periplocum</i> (GU811234, 100%)
24	P	0.3	<i>Leptosphaeria</i> sp. 02	<i>Leptosphaeria</i> sp. (AB752252, 99%)
25	P	0.3	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	<i>C. luteo-olivacea</i> (GU128589, 100%)
26	P	0.3	Unidentified fungus 09	Fungal sp. (GU566294, 99%)
27	P	0.3	<i>Leptosphaeria</i> sp. 03	<i>Leptosphaeria</i> sp. (AB752252, 100%)
28	P	0.3	<i>Fusarium oxysporum</i> 02	<i>Fusarium oxysporum</i> (JX045827, 99%)
29	P	0.3	<i>Fusarium oxysporum</i> 03	<i>Fusarium oxysporum</i> (KC254033, 100%)
30	P	0.2	Unidentified fungus 10	Fungal sp. (GU566255, 100%)
31	P	0.2	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp. (AM160641, 98%)
32	P	0.2	Unidentified fungus 11	Fungal sp. (GU566255, 100%)
33	P	0.2	Unidentified fungus 12	Fungal sp. (GU566294, 100%)
34	P	0.2	<i>Fusarium oxysporum</i> 04	<i>Fusarium oxysporum</i> (KC202938, 99%)
35	P	0.2	<i>Fusarium oxysporum</i> 05	<i>Fusarium oxysporum</i> (HM179530, 100%)
36	P	0.2	<i>Penicillium</i> sp. 02	<i>Penicillium</i> sp. (HQ850367, 100%)
37	P	0.2	Unidentified fungus 13	Fungal sp. (GU566255, 100%)
38	P	0.2	<i>Penicillium</i> sp. 03	<i>Penicillium</i> sp. (HQ850367, 100%)
39	P	0.2	<i>Leptosphaeria</i> sp. 04	<i>Leptosphaeria</i> sp. (AB752252, 100%)
40	P	0.2	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma herbarum</i> (JX077064, 99%)
41	P	0.2	<i>Leptosphaeria</i> sp. 05	<i>Leptosphaeria</i> sp. (AB752252, 99%)

Figure 1. Rarefaction curve of OTUs in each root sample against the number of 454 reads excluding singletons. Analysis are based on 1000 iterations of re-sampling without replacement.

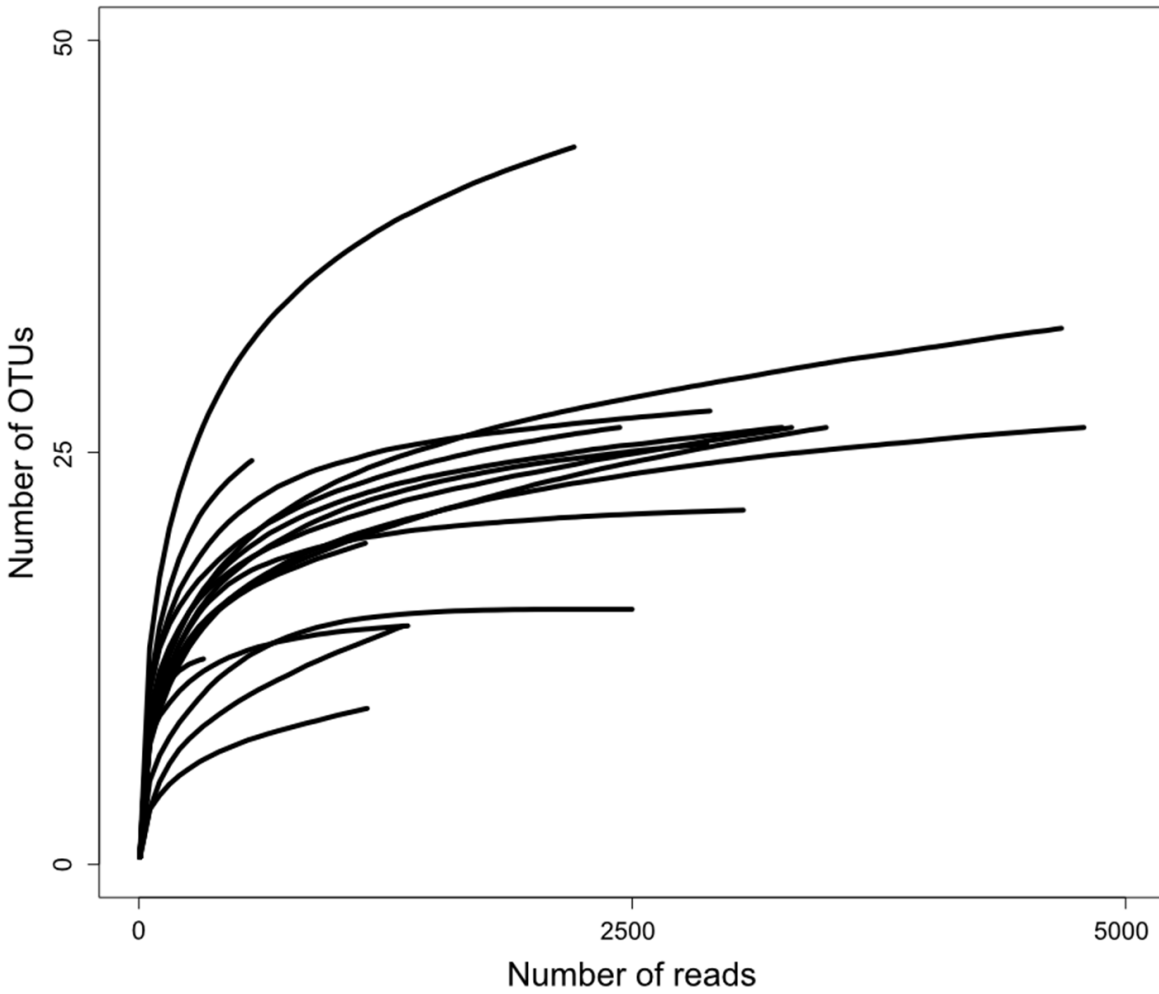


Figure 2. Endophyte diversity in of *E. erythropoda* and *Populus* sp. roots. Data show the estimated number of OTUs, as calculated by the Chao Richness Index on the sequences clustered at 97% nucleotide identity. Blue and dark-red colors show OTUs richness *Populus* sp. *E. erythropoda*, respectively.

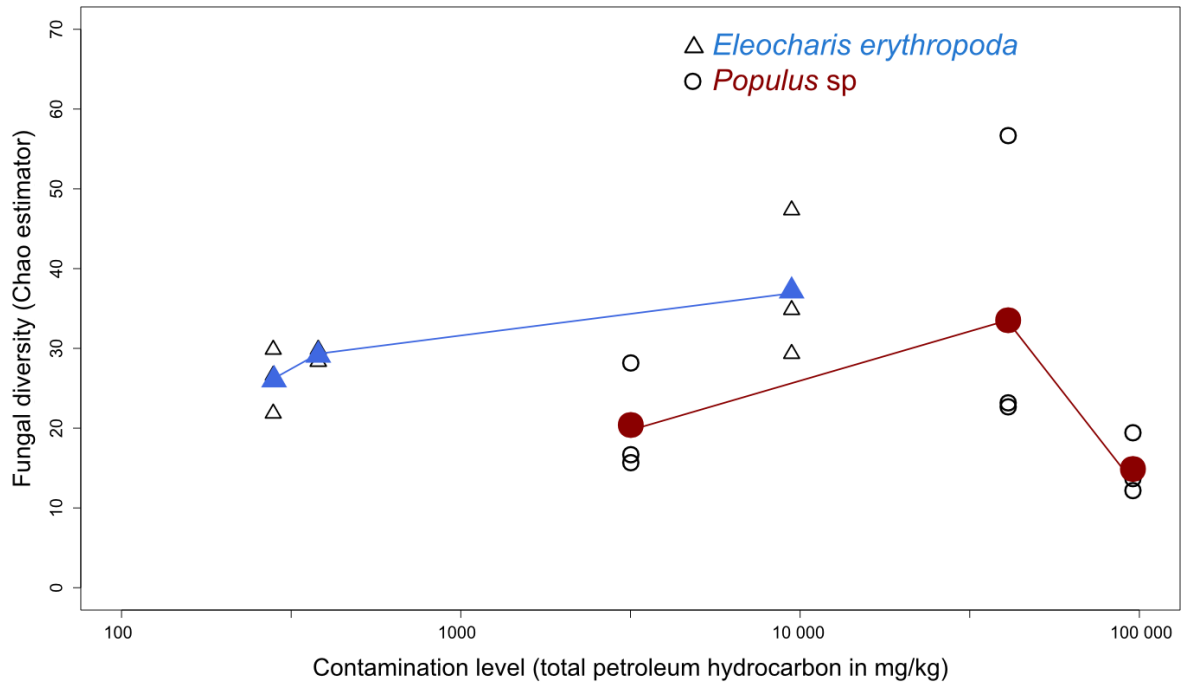


Figure 3. Unconstrained ordination of fungal endophytes of *E. erythropoda* and *Populus* sp. roots. The fungal communities were binned at phylotype resolution and were ordinated using PCoA based on Hellinger distance.

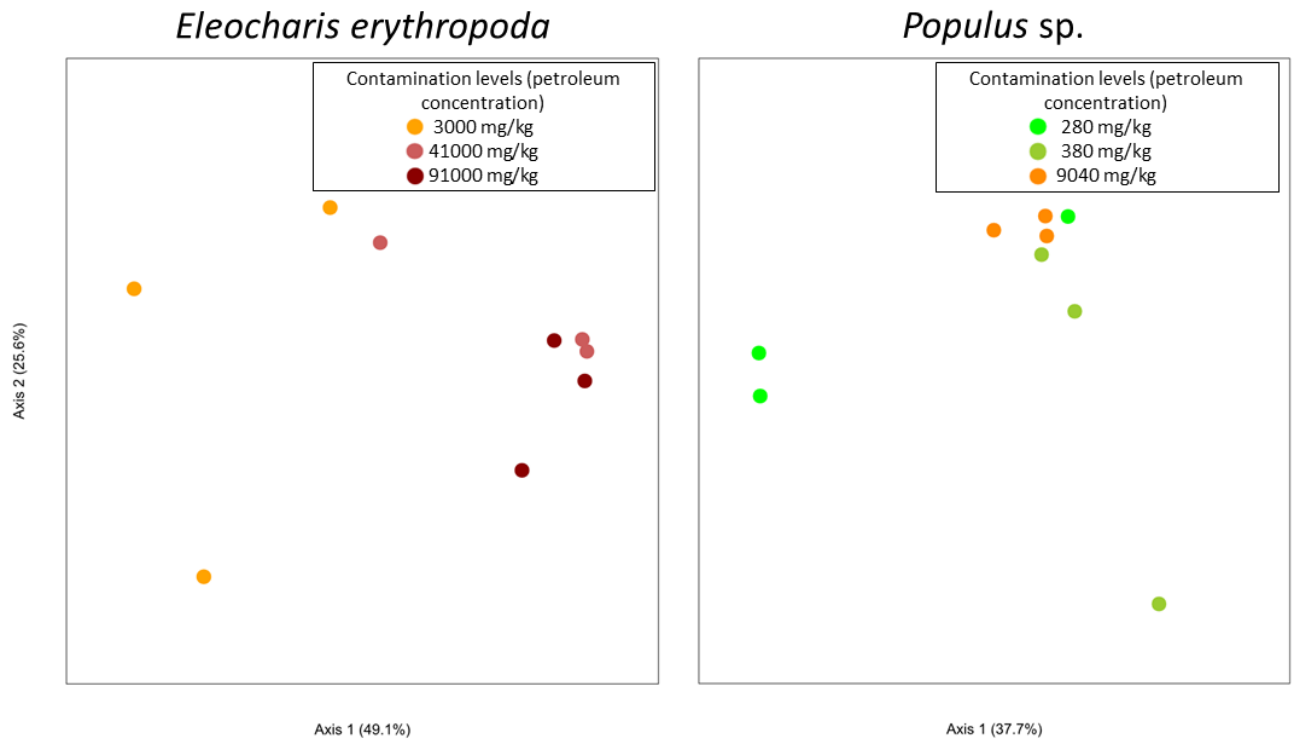


Figure 4. Taxonomic composition of endophytic fungal communities recovered from roots of *E. erythropoda* and *Populus* sp. Bars show the frequency with which different taxonomic groups were recovered based on 454 pyrosequencing of the fungal ITS region. In total, 592 fungal OTUs from three fungal phyla Basidiomycota, Ascomycota and Glomeromycota as well as other unclassified fungal taxa

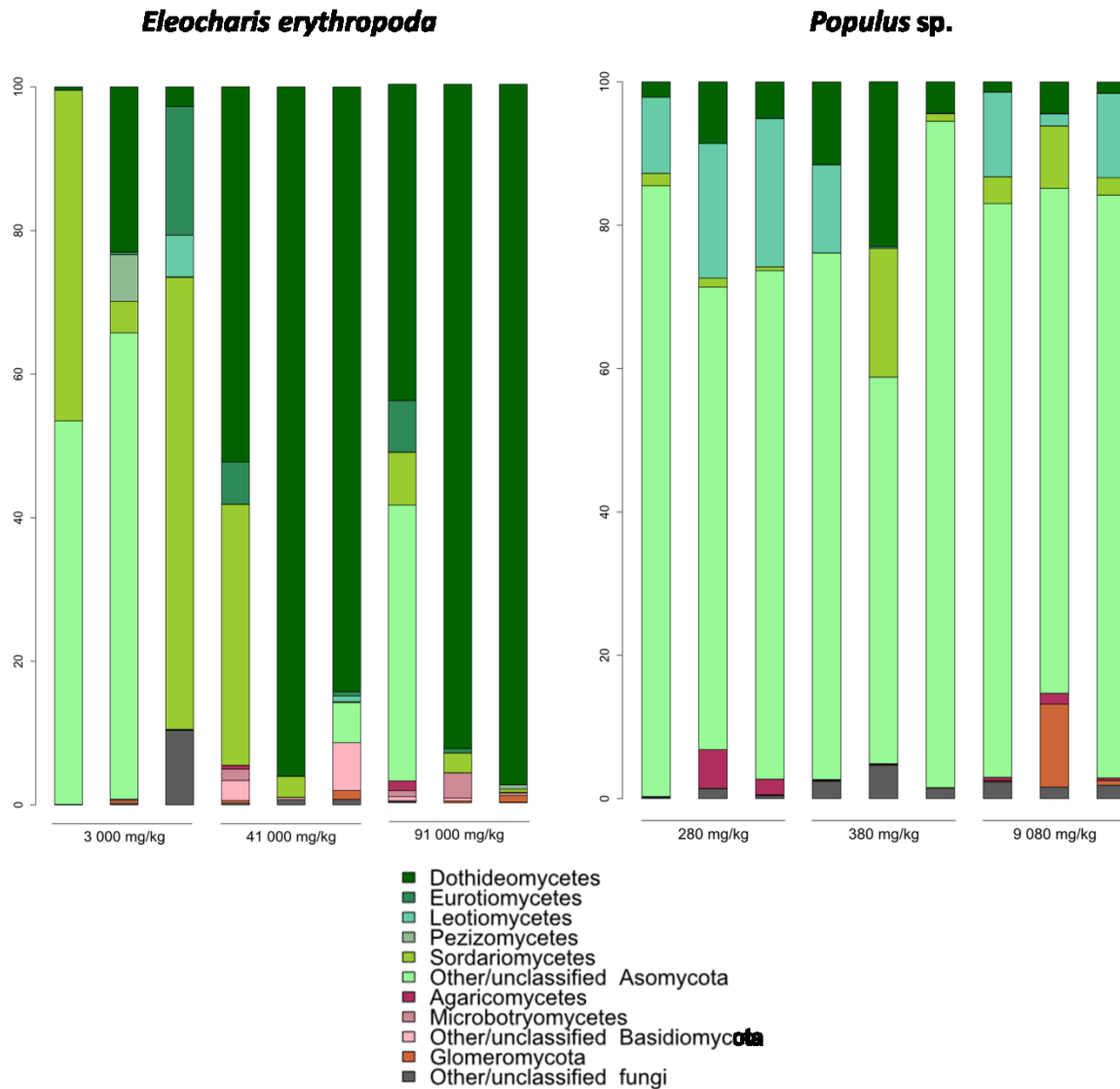
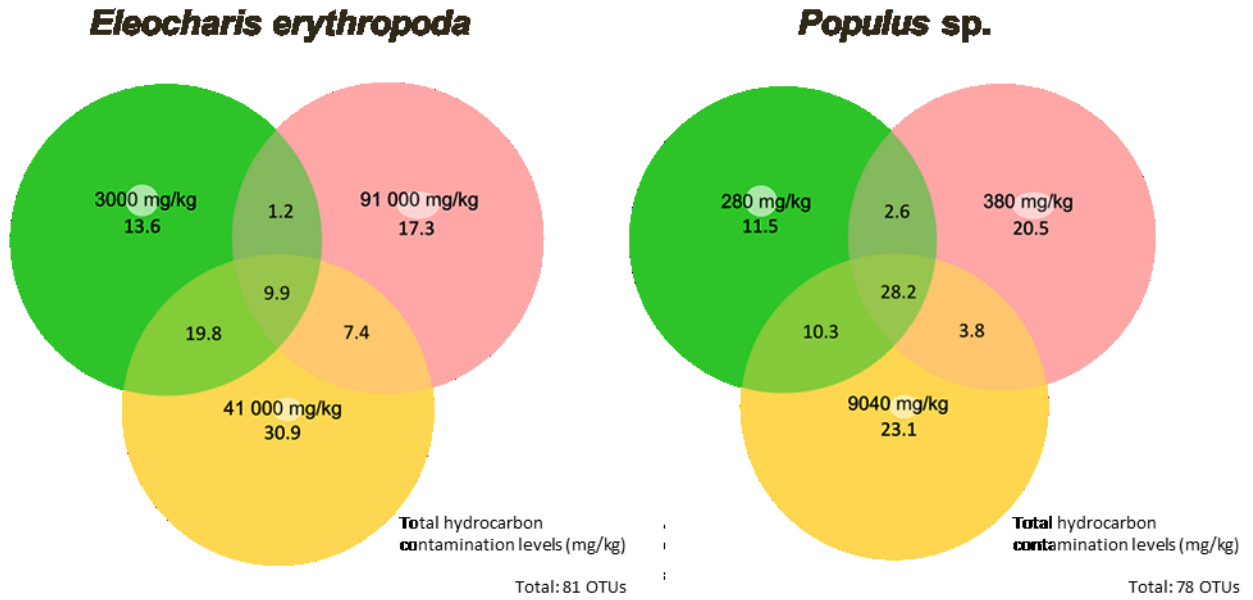


Figure 5. Venn diagrams showing OTUs shared in percentage between contaminant levels for *Eleocharis erythropoda* and *Populus sp.* samples at 97% genetic similarity



Conclusion

Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux changements induits par les stress environnementaux sur les communautés de champignons endophytes présentes dans les racines de plantes poussant en condition de pollution extrême.

Les résultats montrent un effet significatif du niveau de contamination sur la composition taxonomique des communautés endophytes des racines de *E. erythropoda*. Cet effet se traduit par une forte abondance de Dothidéomycètes dans les racines de *E. erythropoda* en condition de forte contamination en hydrocarbures. Les données montrent que les souches du genre *Alternaria* représentent pour la majorité du groupe des Dothidéomycètes.

La comparaison des données de pyroséquençage et des données d'isolation de souches nous ont montré les méthodes basées sur la culture d'organismes ne favorisent pas l'isolation des espèces les plus abondamment représentées dans les données de pyroséquençage dans les plantes.

Bien que les champignons endophytes isolés par méthodes classiques ou détectés par pyroséquençage possèdent une phylogénie proche d'organismes pathogènes ou saprophytes, leur rôle au sein de l'organisme hôte est encore inconnu et des études plus approfondies pourraient être faites afin d'en apprendre plus sur l'effet de la colonisation des plantes par les endophytes, ainsi que sur leur cycle de vie dans la plante.

Ces résultats pourront potentiellement aider le développement de stratégies pour améliorer la phytoremédiation de sols contaminés en utilisant les champignons endophytes. De telles améliorations peuvent passer par une meilleure colonisation des sols contaminés par les plantes grâce à l'aide de champignons endophytes, ce qui favoriserait par la suite le maintien et le développement du microbiome du sol aidant ainsi à la dégradation des contaminants et à la dépollution des sols.

Bibliographie

- Abbai NS, Pillay B. 2013.** Analysis of Hydrocarbon-Contaminated Groundwater Metagenomes as Revealed by High-Throughput Sequencing. *Molecular Biotechnology* **54**(3): 900-912.
- Andrade-Linares DR, Grosch R, Franken P, Rexer KH, Kost G, Restrepo S, de Garcia MC, Maximova E. 2011a.** Colonization of roots of cultivated *Solanum lycopersicum* by dark septate and other ascomycetous endophytes. *Mycologia* **103**(4): 710-721.
- Andrade-Linares DR, Grosch R, Restrepo S, Krumbein A, Franken P. 2011b.** Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza* **21**(5): 413-422.
- Bacon CW, Hinton DM. 1996.** Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **74**(8): 1195-1202.
- Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES. 1977.** *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* **34**(5): 576-581.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 233-266.
- Baker A, Brooks R. 1989.** Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**(2): 81-126.
- Ball AS, Jackson AM. 1995.** The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Bioresource Technology* **54**(3): 311-314.
- Bañuelos GS, Cardon G, Mackey B, Ben-Asher J, Wu L, Beuselinck P, Akohoue S, Zambruski S. 1993.** Boron and selenium removal in boron-laden soils by four sprinkler irrigated plant species. *Journal of Environment Quality* **22**(4): 786-792.
- Bell TH, El-Din Hassan S, Lauron-Moreau A, Al-Otaibi F, Hijri M, Yergeau E, St-Arnaud M. 2013.** Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME J*.
- Bishop DL. 2002.** Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**(1): 65-71.
- Blaylock MJ, Salt DE, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley BD, Raskin I. 1997.** Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology* **31**(3): 860-865.
- Boyle C, Gotz M, Dammann-Tugend U, Schulz B. 2001.** Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis* **31**(4): 259-281.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM. 1995.** Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environmental Science & Technology* **29**(6): 1581-1585.
- Brundrett M. 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**(3): 473-495.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann**

- R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. 2012.** Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**(7409): 91-95.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010.** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**(5): 335-336.
- Carroll G. 1988.** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**(1): 2-9.
- Chao A. 1984.** Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**(4): 265-270.
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner EJ. 2005.** Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* **12**(1): 34-48.
- Chen L, Luo S, Chen J, Wan Y, Li X, Liu C, Liu F. 2014.** A comparative analysis of endophytic bacterial communities associated with hyperaccumulators growing in mine soils. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-10.
- Clay K. 2001.** Symbiosis and the regulation of communities. *American Zoologist* **41**(4): 810-824.
- Cohen SD. 2004.** Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *European Journal of Plant Pathology* **110**(7): 713-721.
- Cunningham S, Berti W. 1993.** Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **29**(4): 207-212.
- De Bary A. 1866.** *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Leipzig: W. Engelmann.
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR. 2010.** Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **72**(3): 313-327.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A. 2009.** Geneious version 4.8. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Duong LM, Jeewon R, Lumyong S, Hyde KD. 2006.** DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Diversity* **23**: 121-138.
- Edgar RC. 2010.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**(19): 2460-2461.
- Feller IC. 1995.** Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs* **65**(4): 477-505.
- Ferrari BC, Zhang C, van Dorst J. 2011.** Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. *Frontiers in Microbiology* **2**: 217.
- Gardes M, Bruns TD. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**(2): 113-118.

- Göhre V, Paszkowski U. 2006.** Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* **223**(6): 1115-1122.
- Good IJ. 1953.** The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika* **40**(3/4): 237-264.
- Gu W. 2009.** Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**(9): 1677-1683.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. 2000.** Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* **147**(3): 617-630.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. 2001.** Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**(1): 1-13.
- Hallmann J, QuadthHallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**(10): 895-914.
- Hamilton CE, Bauerle TL. 2012.** A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Diversity* **54**(1): 39-49.
- Hansen D, Duda PJ, Zayed A, Terry N. 1998.** Selenium removal by constructed wetlands: Role of biological volatilization. *Environmental Science & Technology* **32**(5): 591-597.
- Ho C-h, Banks MK. 2006.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* and associated microbial community changes. *Bioremediation Journal* **10**(3): 93-104.
- Hofrichter M, Scheibner K, Schneegaß I, Fritsche W. 1998.** Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(2): 399-404.
- Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, Hatakka A. 1999.** Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(5): 1864-1870.
- Hyde KD, Soyong K. 2008.** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* **33**: 163-173.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997.** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**(4): 575-586.
- Jumpponen A. 2001.** Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**(4): 207-211.
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998.** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**(2): 295-310.
- Kaimi E, Mukaidani T, Tamaki M. 2007.** Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Plant Production Science* **10**(2): 211-218.
- Kobayashi DY, Palumbo JD. 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial Endophytes*: 199-233.
- Kogel K-H, Franken P, Hückelhoven R. 2006.** Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* **9**(4): 358-363.
- Köljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T,**

- Eberhardt U, Duenas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lucking R, Martin MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Poldmaa K, Saag L, Saar I, Schussler A, Scott JA, Senes C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22(21): 5271-5277.
- Legault D, Dessureault M, Laflamme G. 1989. Mycoflora of the needles of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa*. 1. Endophytic fungi. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 67(7): 2052-2060.
- Li H-Y, Wei D-Q, Shen M, Zhou Z-P. 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity* 54(1): 11-18.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Rio TGD, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488(7409): 86-90.
- Marschner H, Römheld V, Horst WJ, Martin P. 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149(4): 441-456.
- Melo FMPd, Fiore MF, Moraes LABd, Silva-Stenico ME, Scramin S, Teixeira MdA, Melo ISd. 2009. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4a. *Scientia Agricola* 66: 583-592.
- Naranjo L, Urbina H, De Sisto A, Leon V. 2007. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation* 25(2-4): 341-349.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5544-5550.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H 2013. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20(2): 289-290.
- Paszkowski U. 2006. Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* 9(4): 364-370.
- Peters AF. 1991. Field and culture studies of *Streblonema macrocystis* sp. nov. (Ectocarpales, Phaeophyceae) from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia* 30(4): 365-377.
- Peters S, Dammeyer B, Schulz B. 1998. Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to endophytic and pathogenic fungi. *Symbiosis* 25(1-3): 193-211.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J, Hirano S eds. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer Verlag, 179-197.
- Petrini O. 1996. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In: Redlin SC, Carris LM eds. *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution*. St Paul, Minnesota: APS Press, 87-100.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 15-39.

- Porrás-Alfaro A, Bayman P. 2011.** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. In: VanAlfen NK, Bruening G, Leach JE eds. *Annual Review of Phytopathology, Vol 49*. Palo Alto: Annual Reviews, 291-315.
- Reynolds HL, Packer A, Bever JD, Clay K. 2003.** Grassroots ecology: Plant-microbe-soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics. *Ecology* **84**(9): 2281-2291.
- Rodriguez RJ, White JF, Jr., Arnold AE, Redman RS. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**(2): 314-330.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**(8): 827-837.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. 2008.** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**(1): 1-9.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. 1998.** Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319-343.
- Saikkonen K, Wali P, Helander M, Faeth SH. 2004.** Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* **9**(6): 275-280.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668.
- Sanchez-Marquez S, Bills GF, Herrero N, Zabalgoeazcoa I. 2012.** Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology* **5**(3): 289-297.
- Sanchez-Marquez S, Bills GF, Zabalgoeazcoa I. 2007.** The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* **27**(1): 171-195.
- Santamaria J, Bayman P. 2005.** Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* **50**(1): 1-8.
- Schardl CL, Leuchtmann A, Spiering MJ. 2004.** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 315-340.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009.** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(23): 7537-7541.
- Schmidt SK, Sobieniak-Wiseman LC, Kageyama SA, Halloy SRP, Schadt CW. 2008.** Mycorrhizal and dark-septate fungi in plant roots above 4270 meters elevation in the Andes and Rocky Mountains. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **40**(3): 576-583.
- Schulz B, Boyle C. 2005.** The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**(6): 661-686.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K. 2002.** Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**: 996-1004.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. 1993.** Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* **97**(12): 1447-1450.
- Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. 2006.** *Microbial root endophytes*: Springer Berlin Heidelberg.
- Schulz BJE, Guske S, Dammann U, Boyle CJC. 1998.** Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* **25**: 213-227.

- Seena S, Wynberg N, Baerlocher F. 2008.** Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. *Fungal Diversity* **30**: 1-14.
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuysse P. 2004.** Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* **327**(7): 639-648.
- Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Lee K, Greer CW. 2001.** Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6): 2469-2475.
- Siciliano SD, Germida JJ. 1998.** Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews* **6**(1): 65-79.
- Sieber TN. 2002.** Fungal root endophytes. In: Kafkafi U, Waisel Y, Eshel A eds. *Plant Roots – The Hidden Half*. CRC Press, 887-917.
- Sieber TN. 2007.** Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* **21**(2-3): 75-89.
- Silvani VA, Fracchia S, Fernández L, Pérgola M, Godeas A. 2008.** A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry* **40**(5): 1259-1263.
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH. 2010.** Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* **81**(9): 1084-1090.
- Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, de la Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M, Hijri M 2014.** Culture-dependent and independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *Manuscript under review*.
- Stone JK, Bacon CW, White JF. 2000.** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF eds. *Microbial Endophytes*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 3-29.
- Tan RX, Zou WX. 2001.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**(4): 448-459.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000.** Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**(1): 21-32.
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Koljalg U. 2010.** 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* **188**(1): 291-301.
- Tellenbach C, Grünig CR, Sieber TN. 2011.** Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent. *Environmental Microbiology* **13**(9): 2508-2517.
- Thomma BP. 2003.** *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* **4**(4): 225-236.
- Törneman N, Yang X, Baath E, Bengtsson G. 2008.** Spatial covariation of microbial community composition and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in a creosote-polluted soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(5): 1039-1046.

- Van Breemen N, Finzi AC. 1998.** Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* **42**(1-2): 1-19.
- Vara Prasad MN, de Oliveira Freitas HM. 2003.** Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**: 285-321.
- Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Butehorn B, Franken P. 1999.** *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2741-2744.
- Weyens N, Truyens S, Dupae J, Newman L, Taghavi S, van der Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J. 2010.** Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution* **158**(9): 2915-2919.
- Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. 2009.** Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* **27**(10): 591-598.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: Academic Press, 315-322.
- Wilson D. 1995.** Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**(2): 274-276.
- Zhou D, Hyde KD. 2001.** Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* **105**(12): 1449-1457.
- Zhu GS, Yu ZN, Gui Y, Liu ZY. 2008.** A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity* **33**: 123-137.

