

DISS.ETH NO 18375

**SYNTHETIC MYCORRHIZAL COMMUNITIES –  
ESTABLISHMENT AND FUNCTIONING**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**CÉCILE THONAR**

Ingénieur agronome, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux

Born February 28, 1978

Citizen of Belgium

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Emmanuel Frossard, examiner

Prof. Dr. Yoram Kapulnik, co-examiner

Dr. Jan Jansa, co-examiner

2009

## Summary

Communities of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were established in roots of *Medicago truncatula* under controlled conditions, using fungal isolates, which have previously been obtained from a single field site. Their composition was dissected using novel real-time PCR approach, which allowed species-specific quantification of the different AMF both in roots and in the soil. Together with the traditional staining-microscopy approach, these tools have been used to describe the ontogeny of root colonization of medic plants by five different AMF species. Significant diversity in root colonization patterns among the different species was described, along with the magnitude and temporal trajectories of phosphorus (P) acquisition benefits provided by the fungi to the plant. This diversity of plant responses was further characterized in a compartmented system coupled with dual radioisotope labeling ( $^{32}\text{P}$  and  $^{33}\text{P}$ ) of a root-free zone. This allowed assessment of contribution of the morphological and physiological traits of the external mycorrhizal mycelium to the P acquisition by the plants and comparison of the mycorrhizal carbon (C) costs associated with the established symbiosis. More precisely, *Gigaspora margarita* was collecting P only from a limited soil volume, establishing dense mycelium networks close to the roots. Following P uptake by the fungus from the soil, the P was immobilized in the fungal mycelium before being delivered to the plant. The extent of soil exploration by two different *Glomus* species was higher than that by *Gigaspora margarita*. They both provided differential amounts of P to the plants. However, since the less efficient P-gatherer *Glomus claroideum* also required significantly less C from the plants than *G. intraradices*, the levels of growth promotion by both of the *Glomus* species were similar. Competitive abilities of these three AMF species were then assessed in all possible two-species combinations using a range of inoculum densities of the involved fungal species. The results indicated limited competition and frequent facilitation between members of the AMF community. Facilitation was particularly strong if phylogenetically distant fungal species were combined. Functional complementarity with respect to P uptake and plant growth was observed in some AMF combinations sharing the same plant root system.

## Zusammenfassung

Gemeinschaften arbuskulärer Mykorrhizapilze (AMF) wurden unter kontrollierten Bedingungen in *Medicago trunculata* Wurzeln etabliert. Dabei wurden Pilzisolat verwendet, die von derselben Ackerfläche stammten. Die Zusammensetzung der Mykorrhizagemeinschaften wurde durch Verwendung eines neuartigen real-time PCR Ansatzes aufgegliedert, so dass die verschiedenen AMF sowohl in Wurzeln als auch im Boden artspezifisch quantifiziert werden konnten. Diese Werkzeuge wurden zusammen mit der traditionellen mikroskopischen Färbemethode verwendet, um die Ontogenese der Wurzelkolonisierung bei *Medicago* durch fünf verschiedene AMF-Arten zu beschreiben. Bedeutende Unterschiede im Kolonisierungsschema der einzelnen Arten wurden beschrieben, ebenso wie Ausmass und der zeitlicher Verlauf des Zugewinns bei der Phosphor-(P)-Aufnahme, den die Pilze der Pflanze verschaffen. Diese Diversität in der Wirkung auf die Pflanze wurde weiterhin in einem Kammersystem durch doppelte Radioisotopenmarkierung ( $^{32}\text{P}$  und  $^{33}\text{P}$ ) der wurzelfreien Kammer charakterisiert. Dadurch konnten die Beiträge von morphologischen und physiologischen Eigenschaften des externen Myzels zur pflanzlichen P-Aufnahme erhoben und der mit der Symbiose verbundene Kohlenstoff-(C)-Aufwand verglichen werden. Im Detail nahm *Gigaspora margarita* durch dichte, wurzelnahe Myzelgeflechte nur aus einem begrenzten Bodenvolumen P auf. Dieses wurde nach der Aufnahme aus dem Boden im Pilzmyzel festgesetzt, bevor es der Pflanze zugeführt werden konnte. Die Flächenausnutzung durch zwei unterschiedliche *Glomus*-Arten war höher als durch *Gigaspora*. Beide lieferten den Pflanzen unterschiedliche Mengen P. Da der weniger leistungsfähige P-Beschaffer *Glomus claroideum* aber signifikant weniger C von den Pflanzen benötigte als *G. intraradices*, war die Wachstumsförderung durch beide *Glomus*-Arten ähnlich. Die Wettbewerbsfähigkeit dieser drei AMF-Arten wurde dann in allen möglichen Zwei-Arten-Kombinationen erhoben, wobei die Inokulumdichten der beteiligten Pilzarten variiert wurden. Die Ergebnisse deuteten auf begrenzte Konkurrenz und häufig auf eine gegenseitige Förderung zwischen Mitgliedern der Pilzgemeinschaft hin. Förderung war besonders stark ausgeprägt, wenn phylogenetisch entfernte Pilzarten kombiniert wurden. Funktionelle Ergänzung im Bezug auf P-Aufnahme und Pflanzenwachstum wurde bei einigen AMF-Kombinationen beobachtet, die dasselbe Wurzelsystem teilten.

## Résumé

Des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) ont été établies en conditions contrôlées dans des racines de *Medicago truncatula*, en utilisant des isolats fongiques préalablement isolés d'un même champ. Leur composition a été disséquée en utilisant une nouvelle approche basée sur la PCR en temps réel qui rend possible la quantification spécifique au niveau des espèces de différents AMF lorsque présents dans les racines et le sol. Combinés à l'approche traditionnelle reposant sur la coloration et la microscopie, ces outils ont été employés pour décrire l'ontogénèse de la colonisation de racines par cinq espèces différentes d'AMF. Une diversité significative a été observée parmi ces différentes espèces dans le profil de colonisation des racines ainsi que dans l'amplitude des bénéfices résultant de la symbiose concernant l'acquisition de phosphore (P) et du temps nécessaire pour leur apparition. Cette diversité de réponses de plantes fut ensuite caractérisée dans un système compartimenté couplé à un double marquage radioisotopique ( $^{32}\text{P}$  and  $^{33}\text{P}$ ) d'une zone non accessible aux racines. Cela permit l'évaluation de la contribution des traits morphologiques et physiologiques du mycélium mycorhizen extra-racinaire à l'acquisition de P par la plante ainsi que la comparaison des coûts mycorhiziens en carbone (C) associés à l'établissement de la symbiose. Plus précisément, il fut montré que *Gigaspora* prélevait du P uniquement dans un volume limité de sol, y établissant un réseau dense de mycélium à proximité des racines. Suite au prélèvement de P du sol par le champignon, le P fut immobilisé dans le mycélium fongique avant d'être livré à la plante. L'étendue de l'exploration du sol par deux espèces différentes de *Glomus* fut supérieure à celle par *Gigaspora*. Ils fournirent tous les deux des quantités différentes de P aux plantes. Cependant, puisque *Glomus claroideum*, montré pour être moins efficace à prélever le P, requière en même temps significativement moins de C des plantes que *Glomus intraradices*, les niveaux de promotion de la biomasse par les deux espèces de *Glomus* étaient similaires. Les capacités compétitives de ces trois espèces d'AMF furent ensuite évaluées dans toutes les combinaisons possibles de deux espèces, en utilisant une gamme de densités d'inoculum des espèces fongiques impliquées. Les résultats indiquèrent l'occurrence de peu de compétitions mais de fréquentes facilitations entre les membres de la communauté des AMF. Les facilitations étaient particulièrement marquées si les espèces fongiques

combinées étaient phylogénétiquement distantes. Des phénomènes de complémentarité fonctionnelle ont été observés à l'égard de l'acquisition de P et de la croissance de la plante dans certaines combinaisons d'AMF partageant le même système racinaire.