

**POST-FIRE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND
THEIR ROLE FOR *PINUS SYLVESTRIS* L. SEEDLING GROWTH**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

TABEA KIPFER

Master of Science, University of Zurich

born April 1st, 1982

citizen of Langnau i.E. (BE), Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Jaboury Ghazoul, examiner
Dr. Thomas Wohlgemuth, co-examiner
Dr. Simon Egli, co-examiner
Prof. Marcel G. A. van der Heijden, co-examiner
Prof. Ian J. Alexander, co-examiner

SUMMARY

Forest fires are among the most important disturbances in many forested landscapes, and climate change is likely to enhance their relevance because of predicted warmer conditions and shifts in precipitation patterns. In the dry inner-alpine valleys of Central Europe, the frequency of extreme fire events is expected to increase. Today already, regeneration of *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) on forest fire sites in these regions is sparse or even missing. Ectomycorrhiza, the symbiosis between fungi and woody plants, is suggested to be an important biotic factor for successful tree recruitment because the fungi enhance plant growth and improve the water status of their host. Yet, little is known about their ability to resist fire and to recover from fire disturbance. In this thesis, the following two questions are addressed: 1) How resistant and resilient are ectomycorrhizal fungal communities to forest fire? 2) If ectomycorrhizal fungal communities are altered due to forest fire and diversity is reduced, what are the consequences for seedling growth under drought stress?

In *chapter 1*, an experiment that examines the susceptibility of ectomycorrhizal fungi to heat is reported. Soil samples were collected from a *P. sylvestris* stand in the Valais (Switzerland) and experimentally heated to three different temperature levels (45, 60 and 70 °C). Surviving ectomycorrhizal fungi were assessed using a bioassay with *P. sylvestris* as an experimental host plant, and identified by a combination of morphotyping and DNA sequencing. Heating at 60 and 70 °C caused a reduction in mean species number, and species composition changed due to heat. While some ectomycorrhizal fungal species did not survive, a considerable number was also found in the heated samples, indicating their resistance to high temperatures.

Chapter 2 presents an investigation of the post-fire recovery of ectomycorrhizal fungi. On a chronosequence (1990-2006) of 12 sites located in the Val d'Aosta (Italy) and the Valais (Switzerland), soil samples were taken along transects on both, burnt and adjacent non-burnt forest sites. Ectomycorrhizal fungal communities were assessed via a bioassay and subsequent morphotyping and DNA sequencing. Samples from burnt sites were species-poorer than those from non-burnt forest, but the species number increased with time since fire. Fire disturbance altered composition of ectomycorrhizal fungal communities, and there

was no apparent tendency for community composition from burnt sites and non-burnt forest to become more similar over time. This indicates resilience of ectomycorrhizal fungi in terms of species richness, but not in terms of species composition.

In *chapter 3*, the effect of ectomycorrhizal fungal community composition on host performance is addressed. Sterile *P. sylvestris* seedlings were inoculated with four selected ectomycorrhizal fungal species (*Cenococcum geophilum* Fr., *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. and *Suillus granulatus* (L.) Roussel.), either in monoculture or in different species mixtures. Seedlings were cultivated in a growth chamber under two different watering regimes (moist vs. dry). Presence of *S. granulatus* enhanced shoot growth, whereas seedlings inoculated with any other fungus did not differ from non-mycorrhizal ones. However, the positive effect of *S. granulatus* was attenuated by drought. These findings provide evidence that ectomycorrhizal fungal species composition has a strong effect on seedling performance measured as biomass, since one fungus considerably increased seedling growth, whereas the others did not.

The results of this thesis contribute to our knowledge about ectomycorrhizal fungal communities on forest fire sites in the Central Alps. Ectomycorrhizal inoculum was not completely missing on these sites, but species composition remained altered for at least two decades. The inoculation experiment suggests that not only the presence, but also the species identity of ectomycorrhizal fungi is important for seedling growth. Consequently, this study proposes that fungal species composition plays an important role for seedling performance.

ZUSAMMENFASSUNG

Waldbrände gehören zu den wichtigsten Störungen in bewaldeten Landschaften. Ihre Bedeutung dürfte aufgrund des Temperaturanstiegs und der Veränderung in Niederschlagsmustern durch den Klimawandel noch zunehmen. Auch in den inneralpinen Trockentälern Mitteleuropas muss mit häufigeren Waldbränden gerechnet werden. Bereits heute verjüngt sich die Waldföhre (*Pinus sylvestris* L.) auf Waldbrandflächen in diesen Regionen nicht oder nur spärlich. Man kann annehmen, dass Ektomykorrhizapilze, welche Symbionten von Holzpflanzen wie der Waldföhre sind, eine wichtige Rolle für die Verjüngung spielen, weil sie das Pflanzenwachstum verbessern und die Wasserversorgung ihres Wirts fördern. Bis jetzt weiss man wenig darüber, ob diese Pilze einen Brand überdauern können und wie schnell sie eine Brandfläche wiederbesiedeln. Folgende Fragen wurden deshalb in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht: 1) Wie resistent und resilient sind Ektomykorrhizapilz-Gesellschaften gegenüber Waldbrand? 2) Wenn sich die Artenzusammensetzung der Ektomykorrhizapilze durch Brand ändert und sich die Anzahl Arten verringert, welche Folgen hat dies für das Wachstum der Föhrenkeimlinge?

Kapitel 1 beschreibt ein Experiment, das die Hitzeempfindlichkeit von Ektomykorrhizapilzen überprüfte. Bodenproben aus einem Waldföhren-Bestand im Wallis (Schweiz) wurden auf drei Temperaturen (45, 60 and 70 °C) erhitzt und die überlebenden Pilze wurden mittels Bioassay nachgewiesen, entsprechend ihrer Morphologie gruppiert und mit DNS-Sequenzierung identifiziert. Bei 60° und 70° C nahm die Artenzahl ab und die Artenzusammensetzung veränderte sich. Obwohl einige Arten die hohen Temperaturen nicht überlebten, wurde eine grosse Anzahl Arten auch in den behandelten Proben nachgewiesen, was auf deren Hitzeresistenz schliessen lässt.

Das *Kapitel 2* beinhaltet eine Untersuchung über die Regeneration der Ektomykorrhizapilze nach einem Brand. Auf einer Chronosequenz (1990-2006) von 12 Waldbränden im Aostatal (Italien) und im Wallis (Schweiz) wurden Bodenproben, jeweils auf der Brandfläche und im angrenzenden nicht verbrannten Wald, entnommen. Die Ektomykorrhizapilz-Gesellschaften wurden mittels Bioassay erfasst und die Arten mittels Gruppierung nach Morphologie und DNS-Sequenzierung bestimmt. Es zeigte sich, dass die Proben der Brandflächen artenärmer

waren als diejenigen des nicht verbrannten Waldes, dass aber die Artenzahl mit dem Alter der Brandfläche zunimmt. Waldbrand veränderte die Artenzusammensetzung der Pilz-Gesellschaften, und auch die ältesten Brandflächen zeigten wenig Übereinstimmung mit dem nicht verbrannten Wald. Das deutet auf Resilienz bezüglich der Artenzahl, nicht aber bezüglich der Artenzusammensetzung hin.

Die Auswirkungen der Pilzarten-Zusammensetzung auf das Wachstum der Wirtspflanze wurden in einem weiteren Experiment genauer untersucht (*Kapitel 3*). Sterile Waldföhren-Keimlinge wurden mit vier ausgewählten Pilzstämmen (*Cenococcum geophilum* Fr., *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. and *Suillus granulatus* (L.) Roussel) geimpft, entweder als Monokultur oder als Artengemisch. Die Keimlinge wurden danach in einer Klimakammer mit zwei Giessmengen (feucht vs. trocken) angezogen. *S. granulatus*, erhöhte das Sprosswachstum, auch wenn der Effekt bei der trockenen Behandlung, im Vergleich zur feuchten, abgeschwächt war. Bei den anderen drei Pilzarten konnte kein Unterschied zu den nicht-mycorrhizierten Keimlingen festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Artenzusammensetzung einen grossen Einfluss auf das Wachstum der Keimlinge hat.

Die Resultate der vorliegenden Forschungsarbeit leisten einen Beitrag zur Kenntnis der Ektomykorrhizapilz-Gesellschaften auf Waldbrandflächen in den Zentralalpen. Auf den untersuchten Flächen fehlten Ektomykorrhizapilze nicht vollständig, aber ihre Artenzusammensetzung blieb während mindestens zwei Jahrzehnten verändert. Der Impfversuch deutet darauf hin, dass nicht allein die Präsenz der Symbionten für das Wachstum der Keimlinge entscheidend ist, sondern auch welche Arten vorhanden sind. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Zusammensetzung der Ektomykorrhizapilz-Gesellschaften eine wichtige Rolle für das Wachstum von Waldföhren-Keimlingen spielt.