

Studie i lønn (*Acer*) og bjørk (*Betula*) og mikroformering av fugleøyelønn og valbjørk (*Betula pendula* var. *carelica*).

Study of maple (*Acer*) and birch (*Betula*) and micropropagation of bird's eye maple and curly birch (*Betula pendula* var. *carelica*)



AV
Tommas Brogaard

NLH Norges landbrukshøgskole

1. Innledning.

Platanlønn (*Acer pseudoplatanus*) og vortebjørk (*Betula pendula*) er kjente trær for folk flest, mindre kjent er de varianter som er innen artene. Et par av variantene fugleøyelønn og valbjørk (*Betula pendula* var. *carelica*) produserer begge virke som skylls unormal vekst i kambiet (Rohr & Hanus 1987, Martinson 1995). Virket som produseres er eksklusivt og kostbart.

Siden begge arter og varianter finnes i landet (Frivold 1994, Berg 1996) kan spesielt fugleøyelønn og valbjørk bli trær som kan få en betraktelig økonomisk betydning om de kan mikroformeres. Grunnen er at frøformering ikke gir 100 % likt avkom, f.eks. en kryssing av to valbjørkplanter gir et resultat hvor maksimalt 80 % av plantene er masurdannere og av dem som danner masur er det forskjeller i vedstrukturen (Hodnebrog 1996, Bechsgaard & Larsen 1997). Mikroformerte planter må dyrkes frem, om de muligheter valbjørk og fugleøyelønn gir skogbruket skal utnyttes til fulle.

Formålet med denne oppgave er gjennom litteraturstudier og egne forsøk øke forståelsen for hvilke krav de to treartene stiller i naturen, samt via forsøk starte opp *in vitro* kultur med fugleøyelønn for videre oppformering og rotdanning. Målet er å stå med en utplantingsklar plante når forløpet med *in vitro* formering er gjennomgått.

For bjørk eksisterer det kjente metoder for hele mikroformeringsprosessen fra kulturoppstart til ferdig plante. Mitt forsøk starter ved oppformeringsleddet i prosessen fra knopp til ferdig plante. To forskjellige valbjørkkloner skal brukes til å se om det er noen sammenheng mellom kloners evne til å produsere mikroskudd og planter med røtter med antallet stammer på morplanten.

2. Litteraturredel.

2.1 Hva er mikroformering.

Mikroformering av planter er ikke en metode der har vært brukt i lang tid, og det var først i 1970- og 1980-tallet at planteskoler som brukte mikroformering til kommersiell planteproduksjon så dagens lys. I dag er der på verdensplan flere hundrede laboratorier der jobber med mikroformering, og noen av disse produserer over 20 millioner planter i året. Tidligere var der usikkerhet om det var mulig å mikroformere treaktige planter (trær og buske), dette lykkes og på midten av 1980-tallet var rundt 16 % av alle planter der ble produsert ved mikroformering verden over treaktige planter (Kyte & Kleyn 2001).

Kort fortalt går mikroformering ut på at en plante del, det kan være en bit av en stilk, rot, blad (adventive skudd), knopp (aksillære skudd) eller en enkelt celle (somatisk embryogenese), kan ved bruk av mikroformering bli en plante som kan oppformerer til et uendelig antall planter, hvis den behandles riktig dvs. på næringsmedium under aseptiske forhold.

Prosessen med å mikroformere en plante fra vevskultur til ferdig plante innholder 4 punkter.

- Etablering av kultur
- Oppformering.
- Rotdanning.
- Avherdning av plantene.

Når nytt plantemateriale startes i *in vitro* kultur vil det ofte først bli dannet små juvenile skudd, som kan brukes til oppformering. Skuddene som dannes under oppformeringen betraktes nu som en klon hvis de kommer fra samme vekstpunkt og kan settes til rotning så den ferdige plante kan bli utviklet (Kyte & Kleyn 2001).

2.1.1 Hvorfor velge mikroformering fremfor frøformering.

Kyte og Kleyn (2001) har satt opp en list over grunner til å velge mikroformering fremfor tradisjonell frøformering.

- Resultatet av frøformering gir planter med ulike egenskaper.
- Frøformerte planter er ikke like morplantene.
- Det tar lang tid for frøformerte planter og vokse frem til voksne planter.
- Oppbevaring og behandling av frø er vanskelig.
- Frø er ikke alltid tilgjengelig.
- Stiklinger vokser for langsomt.
- Stiklinger har lav overlevelsesprosent og krever for mye arbeid.
- Stiklinger er sårbare overfor sykdommer.
- Der er mangel på morplanter til å høste stiklinger fra. Dette kan skyldes, at der finnes kun en hybrid, en sykdomsfri plante eller kun et eksemplar av den ønskede mutasjonen.
- Morplantene legger beslag på store arealer, og det kreves mye arbeid å holde dem i live.
- Mikroformering er ofte det eneste alternativet som finnes, om man skal produseres et stort antall planter med eksakt samme egenskaper.
- Mikroformering er ikke sesongavhengig og kan foregå hele året.

2.2 Plantematerialet.

Før mikroformeringen kan startes opp må man finne det rette plantematerialet, som har de kvaliteter som ønskes.

2.2.1 Utvelgelsen av mortre.

Når der skal velges ut en morplante fra et tre, må man vurdere både ytre og indre kvaliteter. De ytre kvaliteter som undersøkes er, om det er et flerstammet tre eller om det er en tre med gjennomgående stamme. Dette er en metode ble brukt tidligere, med det viste seg, at det ikke var en holdbar metode. De indre kvalitetene må og undersøkes, for å se om strukturen på veden er den rette. Når man så har funnet et tre med de ønskede kvaliteter, kan produksjonen av morplanter startes (Jahren 2000).

2.2.2 Produksjon av morplanter.

Den normale fremgangsmåte er å pode kvist fra det tre man har funnet over på unge grunnstammer av det samme treslaget. Der er flere årsaker til dette, treet er ofte felt, i forbindelse med undersøkningen av de indre kvaliteter. Samlingen av nye morplanter virker som en genbank, og der kan hvert år høstes kvist til mikroformeringen fra planterne. Mikroformeringen lykkes ofte lettere med plantemateriale fra podede planter enn det originale mortre (Hodnebrog 1996).

Da risikoen for genetiske forandringer i plantematerialet øker for hver gang det oppdeles i laboratoriet, virker podningen av kvist som en sikring av plantematerialet. Da de podede trær gjør det mulig å vende tilbake til kilden og hente kvist. Uten podningen vil man jo miste plantematerialet hvis mortreet dør (Hodnebrog 1996).

2.2.3 Innsamling av plantemateriale.

Innsamlingen av hvilende knopper er første skritt på veien, men høstetidspunktet er viktig. Knoppene skal høstes rett før knoppen bryter, eller man kan ta knopper fra nye skudd på forsommeren (Hodnebrog 1996). Lenger mot sør i Europa for eksempel i Tyskland høstes knoppene tidligere enn i Norge, men på samme stadium. På høsten er der og mulighet for å høste hvilende knopper og starte mikroformeringen fra det stadiet (Durkovic 1997, Ewald et al. 2000). Taes det utgangspunkt i hvilende knopper må knoppene settes til driving, og dette kan gjøres på flere måter. Den enkleste måte, er å sette kvistene i vann og ha dem stående i et vindu ved normal stuetemperatur. En annen mulighet er å sette kvistene til driving i et klimarom i 10 timer dag med 23 °C, en lysstyrke på 350 mEm⁻²s⁻¹ og 10 nattetimer med 9°C. I de 2 timer før og etter hver mørkeperiode er der en skumringsperiode hvor lysstyrken er halvert (Ryynänen & Ryynänen 1986).

2.2.4 Desinfisering av plantemateriale.

Før plantematerialet kan brukes må det renses og desinfiseres. Hvis dette ikke gjøres, er der stor risiko for at man får en sopp- eller bakterieinfeksjon i kulturen. Får man infeksjon, vil det ofte drepe de kulturer man har på mediet. (Hodnebrog 1996).

2.2.4.1 Hvilende knopper.

En metode som ofte blir brukt til desinfisering av hvilende knopper fra vedaktige planteslag er:

- Kvistbitene vaskes i såpevann.
- Deretter settes de i et glass og dekkes med 70 % sprit i 1 min. Spriten helles fra..
- Desinfeksjonsvæske (2 % Natriumhypoklorid + en dråpe Tween 20) helles over kvistbitene. Glasset med kvistbitene, desinfeksjonsvæske og magnet plasseres på en magnetrører i 15 min, mens den kjører med lav hastighet.
- Sist skylles kvistene 3 ganger med sterilt vann i henholdsvis 3, 10 og 15-20 min.
- Kvistbitene er nu klare til å bli brukt til mikroformeringen.

(Hvoslef-Eide et al. 2004).

2.2.4.2 Brutte knoppe.

Metoden som ofte brukes til desinfisering av brutte knopper fra vedaktige planteslag er følgende:

- De brutte knopper med litt ved fra kvisten settes i et glass, og dekkes med 70 % sprit i 1 min.
- Desinfeksjonsvæske (0,5% NaOCl + en dråpe Tween 20) helles over kvistbitene. Glasset med kvistbitene, desinfeksjonsvæske og magnet plasseres på en magnetrører i 10-15 min, mens den kjører med lav hastighet.
- Sist skylles kvistene 3 ganger med sterilt vann i henholdsvis 3, 10 og 15 min.

(Hvoslef-Eide et al. 2004).

2.3 Medium.

Plantene dyrkes på et næringsmedium som består av makro- og mikronæringsstoff, aminosyrer, vitaminer, hormoner, sukker (energi kilde for planten) og evt. andre tilsetningsstoffer f. eks. aktivt kull. Blir det ikke brukt flytende medium, inneholder mediet også agar, som gjør mediet fast. Dette skal forhindre plantematerialet i å synke ned i mediet og drukne.

Det er mulig å lage mediet fra bunnen av, hvor hvert enkelt av de faste stoffene veies ut og løse de opp i et gitt volum destillert vann. For å forenkle arbeidet lages oppløsningene med en fra 10 til 1000 gange høyere konsentrasjon (stamløsninger), enn den konsentrasjon som skal brukes i mediet. For å unngå utfellinger samles alle nitrater i en løsning, og alle sulfater i en osv. Nitratløsningene lages ofte med en lav konsentrasjon (10x sluttkonsentrasjonen), da en høyere konsentrasjon ofte vil gi utfellinger, mens vitaminer kan tåle konsentrasjoner på 1000x sluttkonsentrasjonen i stamløsningen. Bruken av stamløsninger gjør at der spares tid, da hvert enkelt av stoffene ikke skal veies opp, hver gang der skal laves medium. Stamløsningene lagres kjølig og mørkt. Vitamin- og aminosyrestamløsningene blir frosset ned i små porsjoner. Hormonløsninger kan ikke gjemmes fra gang til gang, derfor må de lages på nytt hver gang det skal lages medium.

Kjøp av ferdige næringsløsninger som og kan inneholde vitaminer er mulig for de mest brukte grunnmediene f. eks. Murashige og Skoog (MS) medium og Woody Plant medium (WPM). Da MS mediet har en høyere konsentrasjon av næringsstoffer enn WPM brukes den ofte i halv konsentrasjon.

Når alle stoffer er løst opp, unntatt agaren, fylles det på med destillert vann nesten opp til det volum som ønskes. Deretter skal pH justeres, ved bruk av HCL og NaOH til den oppgitte pH, som vanligvis ligger i området fra 5,2 til 5,8. Så kan man fylle opp til eksakt volum, og agaren tilsettes. Skal mediet doseres ut før det autoklaveres (steriliseres) må det varmes opp til 60-70°C, så agaren kan løse seg opp, deretter kan det doseres ut i glass eller reagensglass. Så skal mediet autoklaveres, og det blir vanligvis gjort i 20 min ved 121°C i en autoklav. Hvis mediet ikke skal brukes umiddelbart etter nedkjøling kan det gjemmes til seinere. Men det må oppbevares kaldt og mørkt. Holdbarheten avhenger av hvilke ingredienser som er i mediet, da noen av stoffene brytes ned raskere enn andre. Det er derfor alltid best å bruke relativt nylaget medium (Hvoslef-Eide et al. 2004).

2.3.1 Fremgangsmåten ved produksjon av medium.

Satt opp som en kokebok.

1. Finn stamløsningene frem og kontroller dem for utfellinger og infeksjoner. Tin frosne løsninger, helst i rom temperatur. De kan i nødstilfelle tines i varmt vann.
2. Ta en Erlen Meyerkolbe i passene størrelse i forhold til hvor mange liter medium som skal lages. Tilsett halvparten av sluttvolumet med destillert vann, før de forskjellige stamløsningene tilsettes, så unngås utfellinger. Er mediet kjøpt ferdig i pulverform, veies ønsket mengde opp, og oppskriften som er med pulveret følges. Merk av hver ting som tilsettes på oppskriften, så der ikke oppstår tvil om hvor langt man er kommet i oppskriften. Ryst godt etter hver tilsetting, eller bruk magnetrører.
3. Vei opp sukker og andre faste stoffer. Tilsett dem et av gangen, og la det løse seg opp før et nyt stoff tilsettes. Veieskip skylles hver gang slik at alt stoff kommer med.
4. Plante-hormonene veies opp. Det er ofte vanskelig å veie presist på mindre enn 5 mg, derfor lages hormonene som stamløsninger i 50 ml målekolber og den riktige mengde pipetteres ut. Som hormo løsemiddel brukes enten 96% etanol, NaOH, eller destillert vann. Hvilket løsemiddel som skal brukes står opplyst i materiale som kommer fra firmaene som selger kjemikaliene.
5. Måling av pH foretaes etter der er fylt på mer destillert vann nesten opp til det ønskede volum. HCL og NaOH brukes til å justere inn pH til ønsket verdi.
6. Mediet helles over i en målekolbe, og ekstra destillert vann tilsettes, hvis det er nødvendig, for å få eksakt volum. Deretter helles det tilbake på Erlen Meyerkolben, agar veies opp og tilsettes løsningen. Skal mediet i sterile petriskåler foretaes hele autoklaveringen før utdosering på dette stadiet.

7. Mediet som skal varmes opp doseres ut og autoklaveres i 7 min ved 121°C. Agaren er da oppløst og mediet kan doseres ut. Til dette kan man bruke doseringspumpe eller det kan gjøres manuelt. Ved beregning av hvor meget medium der skal lages, kan man ta utgangspunkt i disse volumene pr. dyrkingskar.

- Reagensrør (60 ml)	10 ml.
- Mid.store syltetøyglass (150 ml)	40 ml.
- Store Syltetøyglass (350 ml)	60 ml.
- Petriskåler (Ø 9 cm)	20-25 ml.
- Petriskåler (Ø 5 cm)	10 ml.

Etter påfylling settes lokkene på, men ikke skru helt til på syltetøyglassene fordi da kan vakuemet få glassene til å eksplodere i autoklaven.

8. Glassene med mediet autoklaveres i 15 min ved 121 °C. Det er viktig at mediet ikke autoklaveres for lenge, da sukkeret delvis blir hydrolysert til monosakkaridene glukose og fruktose under autoklaveringen. Hydrolyseringen kan og nedbryte vitaminer og plantehormoner, hvis den får lov å pågå for lenge.

Når autoklaveringen er over, taes glass/rør ut av autoklaven så snart som mulig. Deretter skal det kjølnes og stivne ved romtemperatur i en sterilbenk (Hvoslef-Eide et al. 2004).

2.3.2 Medium tilsatt aktivt kull

Bruk av aktivt kull har i flere tilfelle fremmet veksten i flere *in vitro* kulturer. Dette skyldes at aktivt kull har sterk adsorptiv evne og tilsetningen i mediet har ofte en hemmende virkning på stoffer som utskilles fra plantematerialet (Fridborg et al. 1978, Weatherhead et al. 1979). Innholdet av fenoler er nært relatert til den fysiologiske tilstand i planten og har betydning for organogenesen både *in vivo* og *in vitro* (Chavre & Salesses 1987). Der ble funnet en gradvis opphoping av frie fenoler i kulturer med

Sequoiadendron giganteum. Innholdet av fenoler økte ikke i medium som var tilsatt aktivt kull, og dette indikerer at der dannes forbindelser mellom fenolene og det aktive kullet. Akkumulering av fenoler kan virke toksisk og det aktive kullets ”chelaterende” effekt kan derfor være til stor fordel for plantematerialet fysiologiske tilstand og formeringsevne (Bon et al. 1988). Favre & Juncker (1987) resultat viste at det sjeldnere forekom callusvekst og unormal vekst på *Quercus rubor L.* tilsatt aktivt kull, og at skuddene hadde en normal strekningsvekst. Bruk av aktivt kull i mediet var nødvendig for å få strekningsvekst på knopper fra modne trær som *Pinus lambertiana Dougl.* og *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. (Gupta & Durzan 1987).

Aktivt kull kan og ha en negativ effekt, og kan gjøre stoffer som virker fremmede på veksten utilgjengelige. Flere har funnet at auxiner og cytokininer er blitt adsorbent av det aktive kull (Weatherhead et al. 1978, Constantin et al 1977, Steinitz & Yahel 1982). Weatherhead et al. (1979) meldte at thiamin HCL og nikotinsyre blev fjernet fra mediet av det aktive kullet, så siden det aktive kull adsorberer en rekke forbindelser er verdien i mediet i vevskulturen vanskelig å forutsi.

I tillegg til de adsorptive evner har aktivt kull evnen til å ekskludere lys fra mediet. Dette kan være årsaken til at medium tilsatt aktivt kull fremmer rotdanningen i noen kulturer (Scholl et al. 1981, George & Sherrington 1984).



Fig. 1. Lønnkulturer på medium innholdende aktivt kull.

2.4 Faktorer som spiller inn ved mikroformering av vedaktige planteslag.

2.4.1 Genetisk stabilitet.

Da man normalt ønsker, å beholde de eksakte egenskapene til den plante som oppformerer, er det viktig å være sikker på, at den metode som brukes sikrer at materialet forblir stabilt.

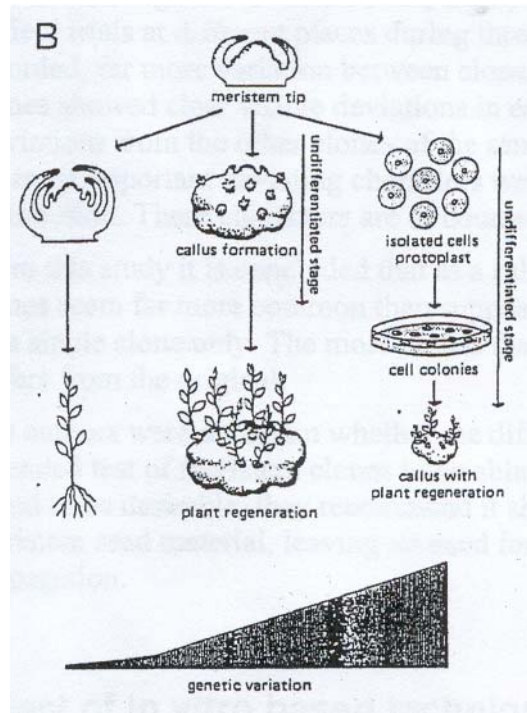


Fig. 2. Viser hvor genetisk stabilt plantematerialet er ved bruk av de forskjellige metodene. (Schilde-Rentschler & Smiediche 1984).

2.4.2 Juvenilitet.

Flerårige planter som trær hører under har en mer komplisert livssyklus en et- og toårige planter. Planternes livssyklus illustreres i fig. nr. 3, hvor den øverste sirkel representerer den generative syklusen, og den består av:

- Embryofase (embryo og frøplante frem til første varige blad).
- Juvenilfase (frøplante frem til blomsterinduksjonsevne).
- Overgangsfase (mellom juvenil- og voksefase).
- Voksefase (fra planten kan blomstre og sette frø).
- Senilfase (livsfunksjonene svekkes og planten dør langsomt).

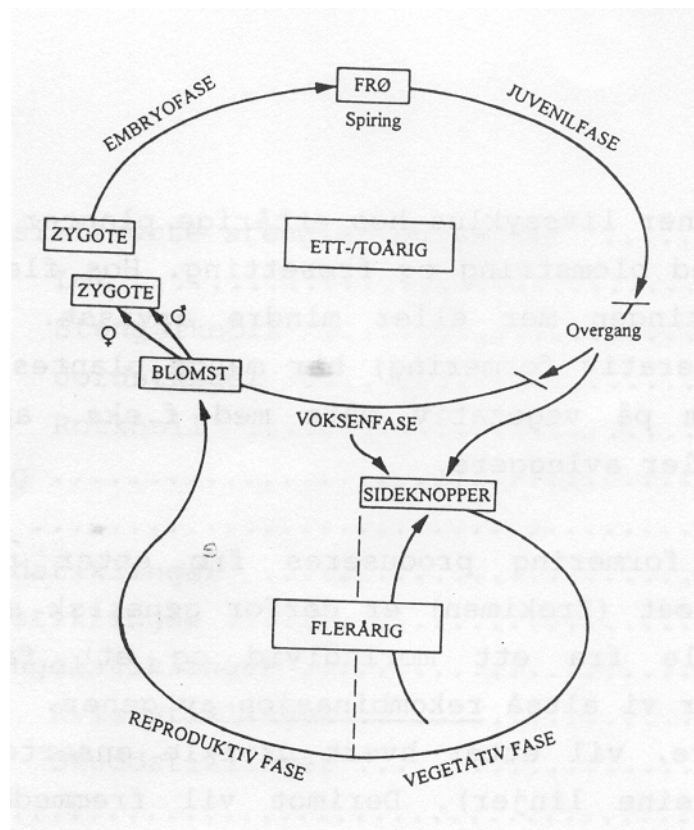


Fig. 3. Livssyklus hos en frøplante. Øvre sirkel illustrerer utviklingen hos en ett- eller toårig plante. Flerårige planter kan i tillegg ha en eller flere vegetative sykluser (nedre sirkel). Etter Hartman, Kester & Davies 1990 (Hansen 1997).

Trær har to typer alder. Den ene er kronologisk alder, hvilket er treets alder i antall år. Den andre form for alder er den ontogenetiske, og den regnes i antall celledelinger vekstpunktet har været igjennom. Den mest aktive celledeling foregår i toppskuddet, derfor blir det den del av treet som har høyest ontogenetisk alder. Jo lengre man kommer fra toppskuddet og ned mot bakken, jo mer avtar den ontogenetiske alderen. Sideskuddene har og lavere ontogenetisk alder jo nærmere man kommer bakken. Den ontogenetiske yngste del av et tre befinner sig i rothalsen, derfor kan man tvinge frem juvenile skudd ved å beskjæring eller hogst av treet (Hansen 1997).

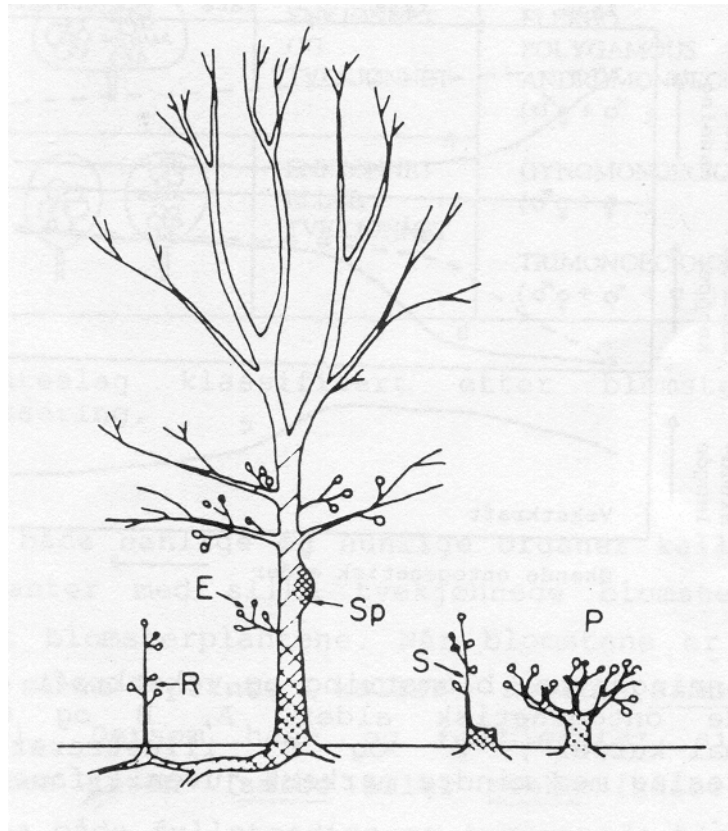


Fig. 4. Juvenile soner hos treaktige planter; skravering antyder graden av juvenilitet. E=vanskudd, P=hardt skåret plante, Sp=sfæroblast, S=stubbeskudd. Etter Pierik (Hansen 1997).

Det plantemateriale som egner seg best til vegetativ formering stammer fra morplanter i juvenil- eller voksenfase. Men problemet er, at når trærne er blitt så gamle, at man kan sortere mellom de enkelte individer, og finner dem som har de egenskaper man ønsker, er det ofte meget vanskelig eller umulig på få oppformeringen til å lykkes. Et eksempel er rotdanning på stiklinger (Bonga 1982b). Oppformering ved hjelp av vevskultur er en alternativ løsning på problemet med eldre plantemateriale. Det er lykkets å oppformere planter ifra voksne trær fra flere forskjellige trearter f.eks *Betula*, *Carpinus*, *Quercus*, *Tilia*, *Fraxinus*, og *Acer* (Chalupa 1983). Men det er stadig et problem å oppformere de fleste løvtrearter når plantematerialet stammer fra planter som har nået voksenstadiet. Dette skyldes at evnen til å formere seg vegetativt er ofte forbundet med juvenilitet (Chalupa 1983b), og kulturer av treaktige planteslag lettere lar seg etablere fra juvenilt materiale (George & Sherrington 1984). Juvenilt materiale reagerer bedre på cytokininer, auksiner, gibberelliner, og andre vekstregulatorer enn eldre materiale, sannsynligvis fordi den del av genomet som kontrollerer organdannelsen

i det juvenile stadiet er mindre undertrykt, eller bedre makter å overkomme undertrykkelsen ved hjelp av hormonbehandlingen enn plantemateriale fra eldre planter som har mer differensierte celler (Brown & Sommer 1982).

Den juvenile tilstand finnes i unge frøplanter, og der ser ut som om den er forbundet med den korte avstanden mellom røttene og skuddets apikale meristem (George & Sherrington 1984). Den apikale dominansen gjør at toppskuddet vokser mest og har derfor flest celledelinger på en vekstsesong. For hver celledeling øker den ontogenetiske alderen til meristemet (Hansen 1985).

Der er ikke et spesifikt tidspunkt hvor man kan si, at nu går en treaktig planten fra juvenilfase til voksenfase. Ofte bibeholder voksne trær noen juvenile karakterer. Rotskudd, epikorme skudd, skudd fra sfæroblaster, latente og adventive knopper som setter skudd, og sidegreiner fra den nederste delen av et tres stamme har større regenerasjonsevne enn modne skudd eller skudd fra kronens toppgreiner (Bonga 1982, Hansen 1985).

2.4.3 Rejuvenering.

Veksten av latente eller adventive vekstpunkter med lav ontogenetisk alder kan fremmes gjennom kraftig beskjæring (Hansen 1997).

Er der kun modent plantemateriale tilgjengelig kan man fremprovosere en rejuvenering. Dette kan skje på flere måter, ved podning av eldre materiale på juvenile grunnstammer, gibberellinbehandling (Hansen 1985), eller sprøyting med bensyladenin (Chalupa 1987). *In vitro* kultur er også en rejuveneringsteknikk. Skuddspisser fra *Syringa vulgaris* L. blir rejuvenert etter gjentatte oppdelinger *in vitro*. Antallet kulturer er sterkt avhengig av alderen på plantematerialet og genotype (Pierik et al. 1988).

Det har vært trodd at reversjonen fra voksent til juvenilt stadium starter når treet begynner å blomstre (George & Sherrington 1984). Der finnes indikasjoner på, at celler og vev i forbindelsen med den seksuelle reproduksjonen som frøanlegg eller pollenknappceller, kan induseres til å gjennomgå organogenese lettere enn andre deler av planten (Brown & Sommer 1982). Utvikling av aseksuelle embryo på kallus fra deler av frøanlegg fra *Phoenix dactylifera* L. ble oppnådd så tidlig som i 1979 av Reynolds og Murashige (xxx). Regenerasjon av planter fra pollenknappkulturer er beskrevet for *Betula pendula* Roth. og *Aesculus hippocastanum* L. av Chalupa i 1987.

Total rejuvenering skjer ved kjønnet formering og formasjon av frøembryo. Sannsynligvis blir gammel informasjon fjernet fra cytoplasmaet gjennom meiosen. Modning av cellekjernen kan av og til bli reversert ved å transplantere den modne kjernen til juvenilt cytoplasma (Bonga 1982b, George & Sherrington 1984). *In vitro* formering med aksillær skuddanning i skuddspisser eller mikroleddstiklinger, er en formeringsmetode som kan bli mulig for de fleste treslag. En fordel ved bruk av denne metoden er, at den genetiske stabiliteten i kulturen er høy (Chalupa 1983).

2.4.4 Høstetidspunktets betydning.

De forandringer som er i temperatur, daglengde, lysintensitet og vannstress som en morplante er utsatt for i løpet av et år resulterer i at planten også har forskjellige konsentrasjoner av karbohydrater, proteiner, og hormoner på forskjellige tidspunkter av året (George & Sherrington 1984). Derfor må resultatet av vevskultur sannsynligvis variere med når på året plantematerialet blir høstet fra morplanten (George & Sherrington 1984).

Skuddspisser og mikroleddstiklinger er mest brukt for å etablere mikrokulturer av løvtrearter, og skudd i aktiv vekst er som regel bedre materiale enn hvilende knopper (xxx). Hurtig aksillær knoppsskydning er knyttet til slutten av den periode hvor knoppen hviler, derfor kan materiale fra den perioden også brukes (Chalupa 1987). Radojevic et al. (1987) fant variasjoner i meristemdifferensieringen fra hvilene knopper og skudd fra *Aesculus hippocastanum* L. i perioden fra desember til mars. I mars var den største prosentvise differensieringen.

Mikrostiklinger fra *Acer pseudoplatanus* L. rotet sig bedre hvis de ble høstet på sommeren enn om våren. Men andelen med infiserte mikrostiklinger økte parallelt til 100 % differensiering på høsten (Rohr & Hanus 1987). Chalupa (1987) anbefaler at høstingen av skudd fra løvtrær utføres på våren og tidlig på sommeren, da der kommer problemer med sopp- og bakterieinfeksjoner seinere i vekstsesongen.

Det er mulig i noen tilfelle å få skuddspisser ifra hvilene knopper til å vokse og formere seg *in vitro*, i noen tilfeller brytes hvilen når meristemet taes ut av den hvilende knoppen. Lane (1978) kom frem til, at der ble utviklet normal vekst fra meristemet fra hvilene knopper fra eple, til tross for at knoppene ikke hadde gjennomgått en

tilstrekkelig kjøleperiode. Han mente at dette kunne forklares med fjerningen av knoppskjell og den frie gassutveksling til og fra meristemene.

Under skuddmodningen foregår det en rekke fysiologiske forandringer som resulterer i at veksten stanser og knoppen går i hvile. Med det klima som finnes i Skandinavia er knoppene til de fleste løvfellene lignoser i hvile fra september. Hvilten brytes ved påvirkningen fra den lave temperatur gjennom vinteren, og vil vanligvis være fullstendig opphevet i tidsrommet desember til februar (Hansen 1985).

2.4.5 Medium.

Hvilken vekst og utvikling plantematerialet får *in vitro* avhenger av mediets komponenter av uorganiske og organiske stoffer og vekstregulatorer. Der er noen faktorer i et basismedium som er særdeles viktige, og det er balansen mellom ammonium og nitrat, den totale ionkonsentrasjon, og konsentrasjonen av sukrose (George & Sherrington 1984).

Det har vist seg at treaktige planteslag ofte vokser bedre på medium med reduserte konsentrasjoner av et eller flere ioner (Anderson 1975, McCown & Lloyd 1981). Rahman & Blake (1988) har f. eks redusert konsentrasjonen av mineraler i Murashige & Skoog medium. Quoirin & Lepoivre (1977) bytter ut makronæringsstoffene i et Murashige & Skoog medium med en egen blanding, som inneholdt mindre nitrogen og ammonium. Resultatet var at skuddproduksjonen i *Prunus* kulturer ble økt.

2.4.6 Hormonene og deres rolle.

Vekst og morfogenese reguleres gjennom gjensidig påvirkning og balanse mellom de vekstregulatorer som er tilsatt mediet og vekststoffer som produseres endogent i de enkelte celler. Cytokinin kan redusere den apikale dominansen i hovedskuddet, og fremme veksten av aksillære knopper. I en hel normalt fungerende plante er det sannsynligvis i roten at biosyntesen av cytokinin finner sted (George & Sherrington 1984).

Forsøk har vist at i flere planteslag b.la. *Alnus* og *Salix* (Read et al. 1982), *Betula*, *Carpinus*, *Quercus*, *Tilia*, *Fraxinus*, og *Acer* (Chalupa 1983), har man oppnådd

tilfredsstillene skuddanning og formering ved kun å tilsette cytokinin til mediet. Ble det og tilsatt auksin, så induserte det en uønsket kallusvekst (Chalupa 1983).

De cytokininer som brukes oftest i mikroformering av løvtrearter er kinetin (furfuryladenin), 2iP (isopentenyladenin) og BA (bensyladenin). Effekten kan variere ut fra hvilket cytokinin som brukes, kulturtype og planteslag. Et spesifikt cytokininkrav er ofte observert i skuddspisskulturer hos mange trearter (George & Sherrington 1984).

BA er den mest effektive, når den sammenlignes med 2iP og kinetin for å få dannet skudd fra skuddspisser av jackfruit treet *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Rahman & Blake 1988), samt en del andre løvtrearter (Chalupa 1987). 2iP har derimot gitt best skuddanning i *Rhododendron* (Economou & Read 1981, Ettinger & Preece 1985).

Auksin kan i små mengder kombineres med cytokinin og kan for noen arters vedkommende fremme den aksillære skuddanningen. Chalupa (1983) brukte 0,05-0,2 mg/l NAA (naftyleddiksyre) eller IBA (indolsmørsyre) sammen med BA i kulturer av bla. *Sorbus*, *Ulmus* og *Populus*

Thidiazuron (TDZ) med det kjemiske navnet N-phenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5-yl) urea, er blant de cytokininlignende hormoner som har størst effekt på vedaktige planter (Huetteman & Preece 1993). Opprinnelig ble TDZ utviklet for å kunne mekanisere bomullinnhøstingen (Murthy, Murch & Saxene 1998).

Den forenkler effektivt mikroformeringen for mange treaktige planteslag, som det tidligere har vært vanskelig å få til å lykkes. Lave konsentrasjoner helt ned til ($<1 \mu\text{M}$) har kunne medføre et større antall aksillære skudd enn mange andre cytokininer (Huetteman & Preece 1993). TDZ kan virke hemmende på skuddstrekningen, i noen tilfelle er det nødvendig å overføre mikroskuddene til et strekningsmedium. Det nye mediet inneholder en lavere konsentrasjon av TDZ eller annet cytokinin (Huetteman & Preece 1993).

Ved konsentrasjoner over $1 \mu\text{M}$ kan TDZ stimulere til dannelse av callusvekst, når det dreier seg om mikroformering i forbindelse med somatisk embryogenese og aksillære skudd. Rotdanningsevnen kan forbli uforandret eller en anelse nedsatt av tidligere bruk av TDZ i mediet. Det største problemet som er forbundet med bruken av TDZ er, at kulturer fra noen arter tiltider kan danne sammenbundne røtter (Huetteman & Preece 1993).

Den høye cytokininaktivitet og positive effekt som TDZ har på vedaktige planter gjør, at den er blitt etablert som en av de viktigste og mest brukte hormonene innen mikroformeringen av nettopp denne type planter (Huetteman & Preece 1993).

Nyere undersøkelser på hvordan TDZ fungerer i planten viser, at det er flere forskjellige mekanismer som påvirkes. Flere rapporter indikerer, at TDZ forandrer vekstregulatorene i urteaktige planter. Dette skjer enten direkte eller indirekte via en fremprovokasjon av stress. Den andre muligheten er at TDZ gjør at det skjer forandringer i cellemembranen, energinivåene og næringsopptaket eller næringsstoff-assimilasjonen (Huetteman & Preece 1993, Murthy, Murch & Saxena 1998).

2.4.7 Lys og temperatur.

Mikrokulturene dyrkes i vekstroom, der det er mulig å ha kontroll på temperatur og lysforhold, og man sikrer at mikroskuddene får eksakt de forhold man ønsker. Temperaturen ligger normalt rundt 20 °C. Tidligere ble der ofte bruk høyere temperaturer opptil 28 °C, som resulterte i at man ofte fikk en voldsom og uønsket callusvekst. Hvis det ønskes kan man senke temperaturen i mørkeperioden. Daglengde på rundt 16 timer er ofte brukt og lysintensiteten kan ligge fra 1000 lux og oppover (Pers.med. Appelgren M. 2004).

Hvilken farge man har på lyset kan og spille inn på kulturens utvikling. Bruk av rødt lys kan i mange tilfelle stimulere til, at der kommer strekningsvekst på kulturene (Brattås 1994).



Fig. 6. Lønnkulturer som har stått under rødt lys. Kulturen til høyre har fått callus skjert bort.

3. Introduksjon til forsøkene.

I mine forsøk har jeg jobbet med to forskjellige treslag og samtidig har jeg arbeidet med dem på forskjellige stadier i prosessen med å mikroformere treaktige planter. Derfor har jeg valgt å dele oppgaven inn i en A-del, som omhandler forsøkene med lønn, oppstart av selve *in vitro* kulturen. B-delen vil beskrive forsøkene med bjørk om oppformeringen og resultater som ble oppnådd. Da det er ikke sammenheng mellom de to planteslagene vil denne oppdelingen av oppgaven gjøre den mer oversiktlig. Derved unngås det, at de to delene blandes sammen. Før mikroformeringsdelen i hver del vil jeg beskrive det treslag der blir jobbet med. Dette skyldes at jeg som skogbruker finner det viktig, at de trær som produseres skal kunne brukes i norsk skogbruk. Det er viktig å kjenne til de arter det jobbes med, og vite om de vil kunne klare seg i klimaet her i landet.

4. Del A: LØNN

4.1 Aceraceae-familien.

Lønnefamilien har to slekter *Acer* og *Dipteronia*, som har over 100 arter stedsegrønne og lauvfellende trær og busker. Noen finnes i tropene, men de fleste vokser i nordlige tempererte områder. Bredden på utbredelsesområdet går på tvers av den nordlige halvkulen fra Europa over Asia til Nordamerika. Det er kun noen få arter, som brukes i det kommersielle skogbruket i Nordamerika og Europa (Børset 1985, Coombes 2000). Arter som *Acer japonicum*, *Acer palmatum* og andre østasiatiske arter samt et utall av kultivarene er alle langsomt voksende, noen er til og med dvergformer (Plantekassen@dk).

4.2 Lønnearter i Norge.

Der finnes 2 arter lønn som vokser vilt i Norge. *Acer platanus* og *Acer pseudoplatanus*. Vestfold er det fylke som har mest lønn i sine skoger, rundt 33000 m³, som utgjør en fjerde part av all lønn i landet. Lønn utgjør ca. 0.2% av hele landets lauvskogkubikkmasse (Børset 1985).

4.2.1 Spisslønn (*Acer platanus*).

Spisslønnens naturlige utbredelsesområde er Europa, med unntak av den del som ligger vest for linjen sørspissen av Jylland til vestenden av Pyreneene. Den nordlige utbredelsesgrensen ligger i en ret linje, fra Oslo over Stockholm til Ålandsøyene, og den østlige utbredelsesområde strekker seg til Ural og det Kaspiske hav (Møller 1977). I Norge er spisslønnen mest konsentrert på Sør-Østlandet, fra Spind og Lyngdal og østover og nordover til Fåberg og Alvdal. Forekommer den utenfor dette området, er dette sannsynligvis kulturbetinget (Frivold 1994) .

4.2.2 Platanlønn (*Acer pseudoplatanus*).

Platanlønn er en art som er vidt utbredt. Det er vanskelig å fastslå det naturlige utbredelsesområdet nøyaktig, da den tidlig ble innført i parker, og har deretter forvillet seg videre derifra.

I Mellom-Europa sør for Harzen er den naturlig forekommende, mens dyrkingsområdet strekker seg lengre mot nord og vest. (Møller 1977).

Som eksempel kan man bruke Danmark. Platanlønn er ikke naturlig forekommende i Danmark. Da man på midten av 1700-tallet innførte en ordnet skogsdrift i Danmark, hadde den tyske forstmann von Langen med seg lønnen, og i dag er den vanlig forekommende i de danske skogene (Møller 1977, Teknologisk institutt@.dk).

Platanlønn forekommer sjeldent som rene bestand i skogen. Den vokser oftest som små holme eller i blandingsbestand, og den forekommer hyppigst i fjellområder. I Schweiz menes artens optimum å ligge mellom 900-1300 m.o.h, hvor den årlige nedbøren er på 1400 mm, middeltemperaturen i den kjøligste måneden er -3° og i den varmeste måneden 14° (Møller 1977).

I Norge kan platanlønnen oppnå en høyde på opptil 25 m, og bli opptil 250 år gammel. Er treet frittstående vil det oftest utvikle en grov stamme og en mektig hvelvet krone. Bladene er femlappede og mørkegrønne og blir brungule om høsten. Knoppene er ganske store, inntill 12 mm i lengden x 8 mm i bredden, og de er motsatt stilte, eggformede, nakne, og har motsatte gulgrønne, mørkegrønne til svart randete knoppskjell. Endeknoppene er større en de utstående sideknoppene. Langskuddene er kantete, og i begynnelsen brungule og senere lysebrune. Kortskuddene er rundere. Det

gamle lang- og kortskuddet lar seg bestemme av den ringformede tilvekstgrensen, som blir dannet etter at knopp skjellene på endeknoppen faller av. Med økende alder på trærne får alle skudd kortskuddskarakter og forgreiningen blir nærmest gaffelformet. Platanlønn er enbo med tvekjønnet blomst. De små, gulgrønne blomstene kommer i hengende klaser etter lauvsprett, hovedsakelig fra endeknoppene på kortskuddene. De tovingede spaltefruktene modner i september/oktober og faller av seint på høsten eller i løpet av vinteren. Eldre trær har et relativt kompakt, men dyptgående hovedrotsystem, som de mange siderøttene forgreiner seg fra. (Hoffmann 1959, Mitchell 1977, Sjøborg & Edissen 1982).

4.2.3 Fugleøyet lønn.

Fugleøyet lønn er en variant av platanlønn, som skyldes systematiske forandringer i vekstretningen av de fusiforme initialceller. Da denne bølgete veksten til tider og kan oppstå på eldre trær, er det vanskelig å fastslå om veksten er genetisk betinget (Rohr & Hanus 1987).

De fusiforme initialcellene har sitt opphav, i de celledelinger som skjer i spissen av skudd og røtter. De delingsdyktige cellene i spissen av skudd og røtter kalles apikale meristem. Når celledelingen skjer skyves meristemene fremover, og denne typen vekst kalles primærvekst og vevet som dannes kalles primærvev. I meristemene er det initialcellene som deler seg, og det dannes en dattercelle som er en kopi av morcellen, og en avledet celle som differensieres bort (Aarnes 2000). Bak meristemet kan det foregå deling av de avlede cellene, dette er den sekundære veksten og den foregår bl.a. i kambiet og gir eksempelvis diameterveksten. Kambiene består vanligvis av et eller to cellelag av initialceller som ligger parallelt med overflaten. Det finnes to typer initialceller, margstråleinitialceller som er korte celler og som gir opphav til treets margstråler, og fusiforme initialceller som er lange celler der er opphav til trakeider, vedrørselementer, silrørselementer og siceller (Aarnes 2000). Det er når de fusiforme initialcellene ikke ligger parallelt lengre at fugleøyeveden oppstår.

Fugleøyet lønn er ikke en sjeldent forekommende variant av platanlønn, og i Frankrike regner man med at 2-5 % av alle landets platanlønn produserer dette spesielle virke (Rohr & Hanus 1987). Der er en stor etterspørsel etter slikt virke fra bl.a. musikkinstrumentindustrien, spesielt de som bygger strenginstrumenter som

violiner, celloer og basser. Kan man gjennom vegetativ formering produsere planter, vil kan også kunne produsere meget verdifullt virke (Rohr & Hanus 1987).

4.3 Krav til levested.

Lønneslekten regnes som et halvskyggetre. Den tåler mye skygge i den juvenile fasen, men er lyskrevende som voksent tre. Derfor kan treet brukes, til å plante under et annet lyskrevende treslag, særlig eik, og danner et underbestand. Slike lønneplanter kan etter fristilling utvikle seg bra (Børset 1985). Men i ungdomsfasen må det dog ikke være for lite lys, for da undertrykkes toppskuddet, og treet får en ”bordformet” krone ovenover en spinkel rett stamme. Det optimale er lett skygge. Da samles veksten hovedsakelig i toppknoppen og derved lengderetningen, mens sidegreinene kun utvikles svakt (Møller 1977).

Lønn foretrekker dyp, fuktig, næringsrik morenejord med god drenering og relativ høy pH. Den er karakterart for kalkrike jordarter, og på de forskjellige formasjonene av skjellsand, hører lønn til de mest hurtigvoksende trearter i Europa. Treet trives innenfor et vidt klimaspektrum fra kjølig og fuktig fjellklima til de oseaniske klima i nordvest på kontinentet. Lønn skal også være vindsterk og hardfør ved kysten, og brukes mye som prydtre. (Børset 1985).

4.4 Lauv og frø.

De motsatt stiltebladen er ofte flikete og unner tiden kun takkede eller de kan være oppdelt i små blad. De små hann- og hunnblomstene som bestøves av insekter, varierer i farge fra kremfarge til gul, grøn, rød eller purpur. De sitter atskilte på samme tre eller på hvert sitt tre og de springer vanligvis ut samtidig med lauvet spretter. De bevingede frøene består av to halvdel. Hos lønneslekten har hver halvdel en sidestilt vinge. Hos diptoroniaslekten har hver halvdel en vinge som går hele vegen rundt (Coombes 2000, plantekassen@.dk).

4.5 Frøformering.

I bestand i skogen setter lønnen gjerne rikelig med frø fra ca. 40 års alder, mens frittstående trær ofte er frøbærende fra 20-25 års alderen. Frøene blir modne i september/oktober, og faller av kort tid etterpå. Ut ifra et skogbruksmessig synspunkt, er det ønskelig å få så høy en alder som mulig på trærne før de begynner å være frøbærende. Lønn sin stammeform påvirkes på samme måte som ask (*Faxinus*

excelsior) når frøsetingen starter. Hovedaksen i treet blir ofte avbrutt, når toppknoppen har blomstret (Møller 1977).

4.5.1 Kommersiell planteproduksjon fra frø.

Den vanligste måten å formere lønn på er ved frøformering (Hansen 1982). Etter frømodning kan frøene såes direkte ut, og spirer da om våren, men vanligvis blir frøene tørket godt etter de er høstet. Deretter oppbevares frøene tørt gjennom vinteren, og blir stratifisert i fuktig sand 4-6 uker før de såes ut (Krüssmann 1981, Lundstad 1982). Et kg reint frø inneholder 12000 frø, og det kan forventes at produksjonen blir ca. 3000 planter (Møller 1977).

4.6 Vegetativ formering.

Vegetativformering: Har man trær med spesielt gode egenskaper, kan det være ønskelig å formere dem vegetativt. Derved kan man bevare de enkelte trees egenskaper. Unge planter kan formeres ved stiklinger (Spetmann 1982). Brukes det plantemateriale fra eldre trær, er det vanskelig å få stiklingene til å danne rot og vokse

Podning er brukt på en del kultivarer (Lamb & Nutty 1983). Yngre trær skyter ofte tallrike og kraftige stubbeskudd (Børset 1985). Det samme gjør eldre trær. Rohr & Hanus (1987) høstet stubbeskudd fra trær som var opp til 106 år gamle.

5. Metoder/materialer.

5.1 Plantematerialet.

Plantematerialet stammet fra en platanlønn fra en skog i Danmark som hedder Guldbæk Plantage, som ligg 20 km sør for Aalborg. Alderer på treet i brysthøyde er i flg. boreprøve 41 år. Der blev høstet knopper i flere omganger: Første innhøsting ble foretatt 12. jan 2003. Ved samme anledning ble det saget grener av treet. Disse skulle brukes i et forsøk, hvor mikrokulturen skulle startes fra knopper på grenene. Det ble innsamlet kvist igjen 31. februar, og ved denne innhøsting ble det også samlet inn knopper av forskjellig ontogenetisk alder, da et av skuddene stammet fra rothalsen på

mortreet. Den siste kvistinnsamling av knopper skjedde 1. april 2003, for å sikre plantemateriale som ikke var så bunnet av vinterhvilen.

5.2 Brutte knopper

5.2.1 Forsøk med greiner.

Greiner samlet den 12. januar blev oppbevart på kjølerom ved 5 °C frem til 24. februar 2003, da forsøket ble startet opp. Da der var en del alger på greinene, måtte de først gjennom en rengjøringsprosess.

Fremgangsmåten.

- For å fjerne det verste ble grenene først vasket i vanlig oppvasksåpe.
- Deretter blev de lagt i en bøtte med en blanding bestående av 240 ml NaOCl (10%) og 5 ltr. vann i 10 min.
- Deretter ble de skylt med vann og var klar til å bli tatt i bruk.

Greinene ble lagt i kasser på perlite tilsatt vann, og plassert i et vekstom under et plasttelt av klar plast under følgende forhold, dagtemperatur 22°C, 18 timer dag med kallhvit lys Philips TL33. Luftfuktigheten lå rundt 60 % relativ fuktighet. Der blev daglig ført tilsyn med grenene og de ble vannet etter behov. Deretter blev utviklingen på greinene registrert en gang i uken i 6 uker.

5.2.2 Forsøk med drevne knopper.

Kvist fra voksent plantemateriale samlet inn 12. januar ble satt til driving i vekstom med følgende forhold, dagtemperatur 22°C, 18 timer dag med kallhvit lys Philips TL33. Luftfuktigheten lå rundt 60 % relativ fuktighet. Der ble ført tilsyn med kvistene daglig og der ble fylt vann på vasen etter behov. Etter behov ble snittflatene på kvistene skjert av, så der kom nye snittflater. Dette ble gjort for å sikre at vanntransporten opp i kvisten var tilstrekkelig. Seinere skulle de brutte knoppene brukes til mikroformering på like fot med de hvilende knopper.

5.3 Hvilende knopper.

5.3.1 Fra kvist til reagensglass.

Etter knoppene ble desinfisert som tidligere beskrevet i teoridelen, var de klare til bruk i sterilbenken. Hver enkelt knopp ble skilt ad ved hjelp av skalpell og nål, og stereolupe. Dette måtte utføres presist, så meristemet ikke ble skadet. Samtidig gjelde det om å få skjert bort alt det som ikke var ungt plantevev, for å unngå fenolproblemer. Hvis noen av knoppene viste tegn på infeksjon, da de ble skilt av, ble de kassert. De resterende meristemene ble plassert på reagensglass med medium, deretter ble reagensglassene forseilet med en kork, og satt inn i vekststrøm.

5.3.2 Vekststrømmet

I vekststrømmet blev knoppene gitt følgende forhold, temperatur 20°C. Lyset var kallhvitt fra Philips cool white TL 50w/33 lysstoffrør med en styrke på 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. og en daglengde på 18 timer.

Fra den 16. juni 2003 blev der forsøkt med varmhvittlys fra Osram warm white 18w/30, med en styrke på 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, da mikrokulturene ikke hadde den utvikling som kunne forventes.

Den 18. oktober blev der gjort et forsøk med rødt lys, Philips TLD red 36w/15, for å se om dette kunne stimulere til den ønskede strekningsveksten.

5.3.3 Medium

Da der ikke var et spesifikt medium, som var kjent til platanlønnen måtte der prøves flere forskjellige medier. I første omgang blev der brukt to forskjellige medier, et WPM-medium og et Andersons-medium. Seinere ble det forsøkt med et Murashige & Skoog (MS) medium der makro- og mikrostoffene ble redusert til en 1/3 del av opprinnelige konsentrasjonen.

Tabell. 1. Sammenligning av innholdet i de brukte mediumtypene:

Medium	MS	WPM	Andersons
Makrostoff mg/l.			
NH ₄ NO ₃	1650	400	400
KNO ₃	1900	-	480
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	96	332,2
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	556	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	180,54
KH ₂ PO ₄	170	170	-
K ₂ SO ₄	-	990	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	330,6

Mikrostoff mg/l.	MS	WPM	Andersons
KJ	0,83	-	0,30
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	22,3	16,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,25	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-	0,025
NaFeEDTA	36,7	36,7	73,4

Vitaminer mg/l	MS	WPM	Andersons
M-inositol	100	100	100
Nikotinsyre	0,5	0,5	
Pyridoksin HCL	0,5	0,5	
Thiamin HCL	0,1	1,0	0,40
Glycin	2,0	2,0	
Adenin hemisulfat	-	-	80,0

(Saveen 2003-2005)

Der blev forsøkt forskjellige konsentrasjoner av veksthormonet TDZ på hvert enkelt medium av typene WPM og Anderson. I forsøkene med MS-mediet ble der, og foretatt forsøk der det bare ble brukt kinetin.

Tabell. 2 Oversikt over forskjellige media og hormon konsentrasjoner, som ble brukt til skuddstrekning.

Medium	Hormon.	Hormon konsentrasjon
WPM	Thidiazuron	10^{-6}
WPM	Thidiazuron	$5 \cdot 10^{-6}$
WPM	Thidiazuron	$5 \cdot 10^{-7}$
Andersons	Thidiazuron	10^{-5}
Andersons	Thidiazuron	10^{-6}
Andersons	Thidiazuron	$5 \cdot 10^{-7}$
1/3 Murashige & Skoog	Thidiazuron	$5 \cdot 10^{-7}$
1/3 Murashige & Skoog	Kinetin	0,2 mg/l

Av hver 1/3 kons. Murashige & Skoog medium som blev laget, blev der og laget et identisk medium, som var tilsatt aktivt kull (5 g/l).

6. Resultater.

6.1 Forsøk med greiner.

Knoppene på greinene svulmet opp en anelse, med de utviklet seg ikke videre. Det var derfor ikke mulig å starte *in vitro* kulturer med dette materialet.

6.2 Forsøk med brutte knopper.

Kvisten som var satt til driving utviklet seg og knoppene begynte å bryte etter 3 uker. I nesten annenhver knopp viste det seg, at der var infeksjon av sopp. Det der kunne ses var et grått "filtlignende" lag, som var tettest i spissen av knoppen, hvor dette laget blev sort. Derfor blev der truffet den beslutning, at der ikke var noen grunn til å gå videre med disse knoppene.

6.3 Hvilende knopper.

Vedleggene A-N viser hvilke registreringer som er gjort. Figurene 7-36 viser utviklingen til de kulturer der ble forsøkt.

6.4 Infeksjon i kulturene.

Totalt blev der laget 329 forskjellige kulturer med lønn og av disse var der infeksjon i 32 kulturer. Det gir en infeksjonsandel på 9,73 % av alle kulturer.

Fordelingen av infeksjon på de forskjellige typer plantemateriale.

Normal kvist.

Der blev laget 162 kulturer med normal kvist og av disse var 18 infisert, hvilket gir en infeksjonsandel på 11,11 %

Ungt plantemateriale.

Der ble startet 131 kulturer med ungt plantemateriale, og derav var 11 infiserte så andelen av infiserte kulturer blir 8,40 %.

¼- Materiale.

Kun 40 kulturer blev startet opp med ¼- Materiale og der var infeksjon i 5 av disse, andelen infiserte kulturer blir da 12,5 %

6.5 Fordeling infeksjon på mediene.

WPM-medium.

Der kom 120 vekstpunkter på WPM-medium og 13 av dem blev infisert, så andelen av infiserte var 10,83 %.

AM-medium.

Der blev startet 113 kulturer med AM-medium og 4 var infiserte, dette gav 3,54% infisert.

MS-medium.

100 kulturer med MS-medium blev startet opp og av disse var 17 infisert, andelen infiserte blir da 17 %

6.6 Forsøk med hvilende knopper.

6.6.1 Woody Plant Medium.

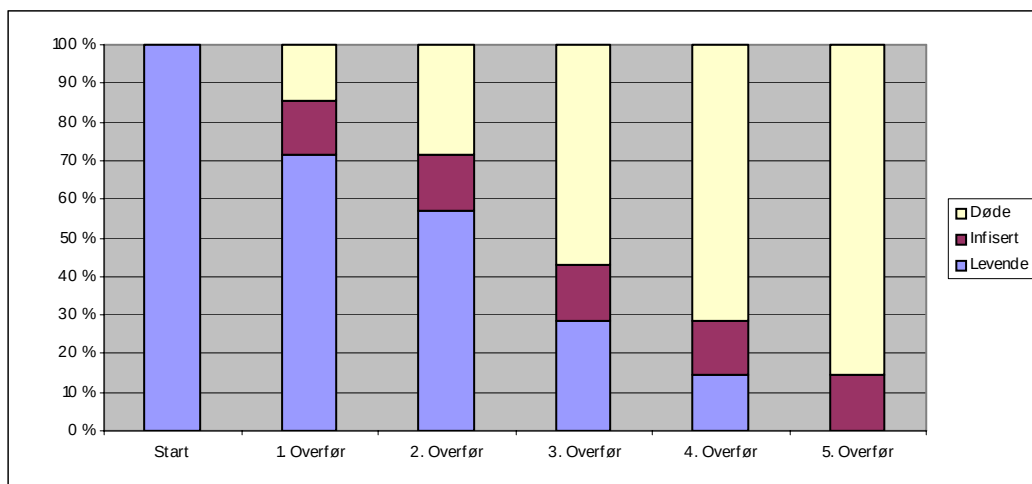


Fig. 7. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 7. Oppstart 04/02-03. Avsluttet 16/04-03.

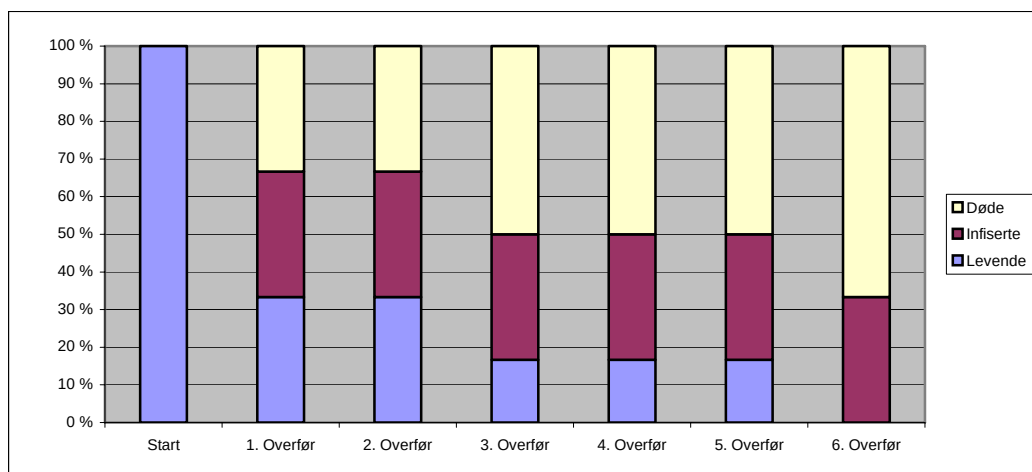


Fig. 8. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 6. Oppstart 04/02-03. Avsluttet 12/05-03.

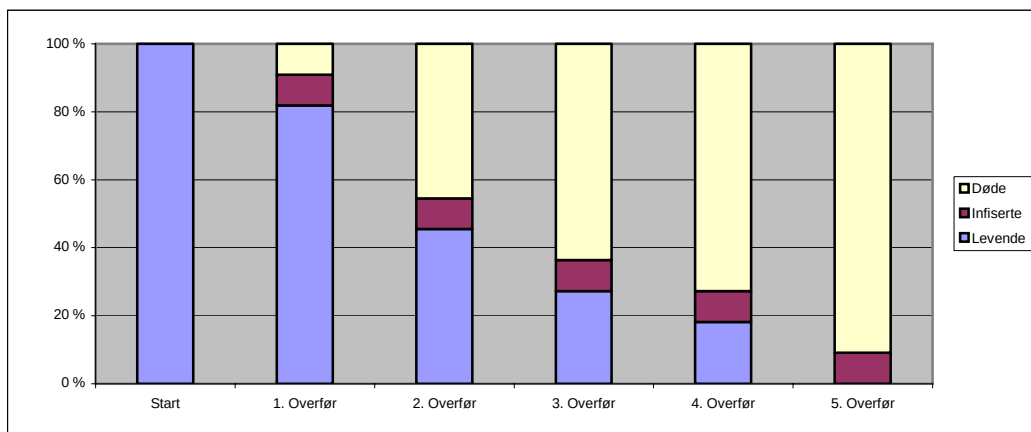


Fig. 9. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 14. Oppstart 05/02-03. Avsluttet 12/05-03.

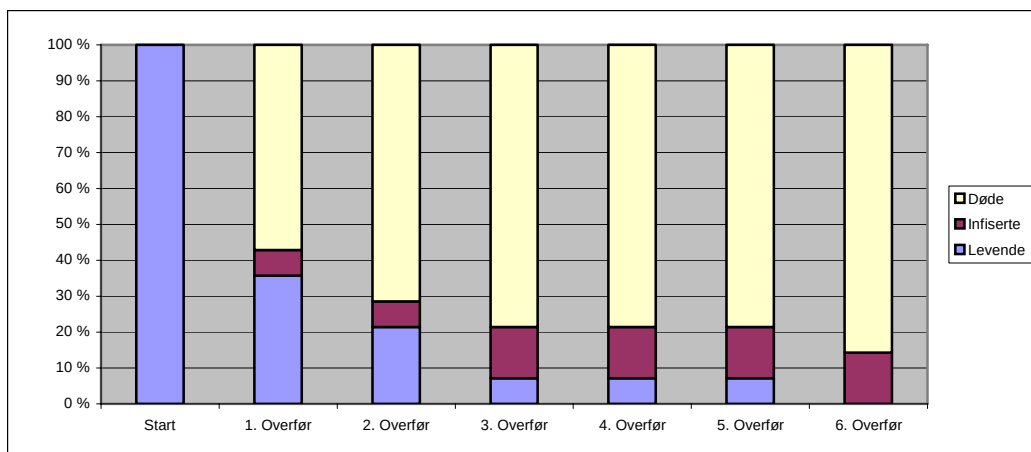


Fig. 10. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 11. Oppstart 06/03-03. Avsluttet 12/05-03

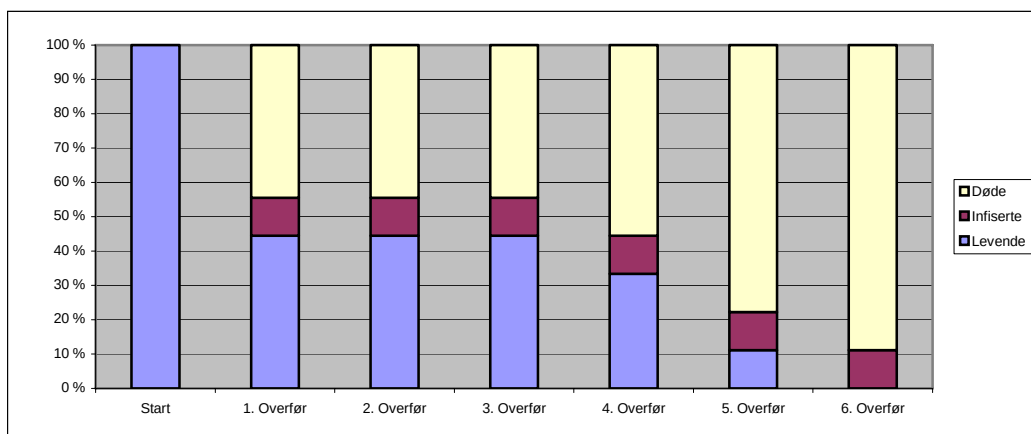


Fig. 11. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 9. Oppstart 06/03-03. Avsluttet 28/05-03.

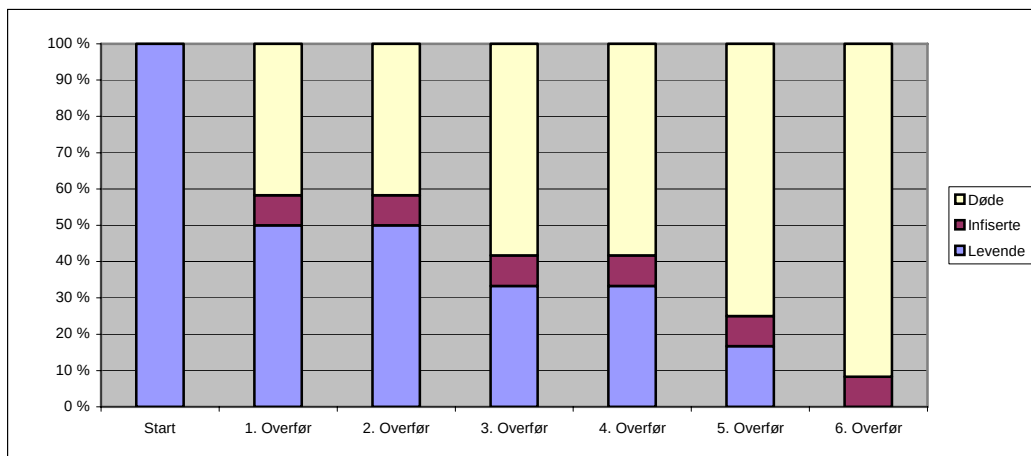


Fig. 12. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på WPM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 12. Oppstart 18/03-03. Avsluttet 28/05-03.

Figur 7-12 viser at på WPM ble etterhvert alle kulturer infisert, men ikke i like stor grad. Der er heller ikke stor forskjell i kulturenes levetid, selv om de dreier seg om to forskjellige typer plantemateriale. Den normale kvist hadde en levetid på 5 og 6 overføringer, mens det unge plantemateriale hadde en levetid på 6 overføringer. Det virker som om, den periode hvor prosentvis flest kulturer dør, er i oppstarts fasen, da rundt 50 % av vekstpunktene.

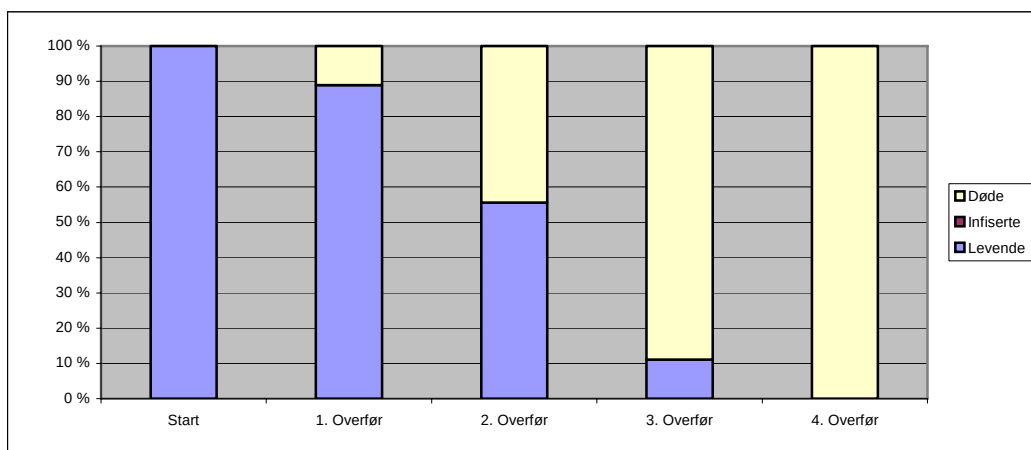


Fig. 13. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Antall kulturer 5. Oppstart 03/02-03. Avsluttet 11/04-03.

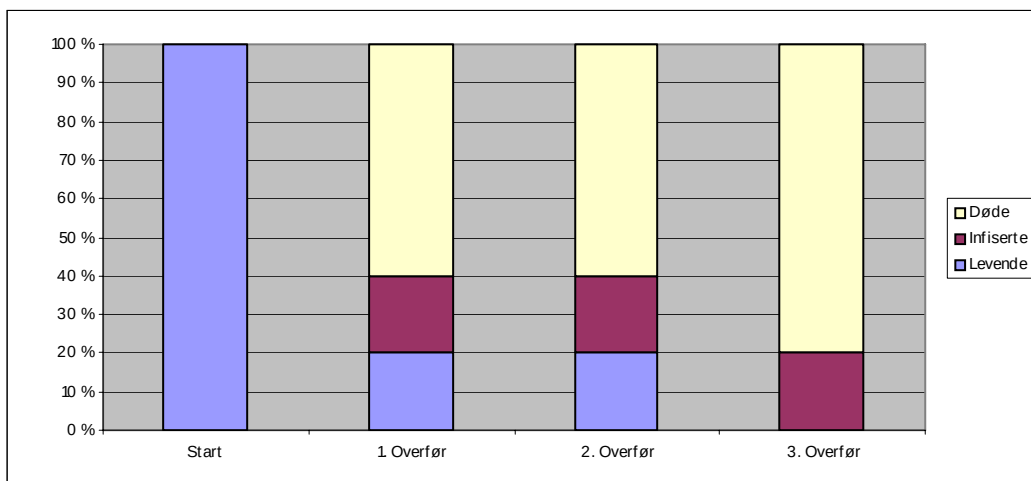


Fig. 14. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Antall kulturer 9. Oppstart 04/02-03. Avsluttet 16/04-03.

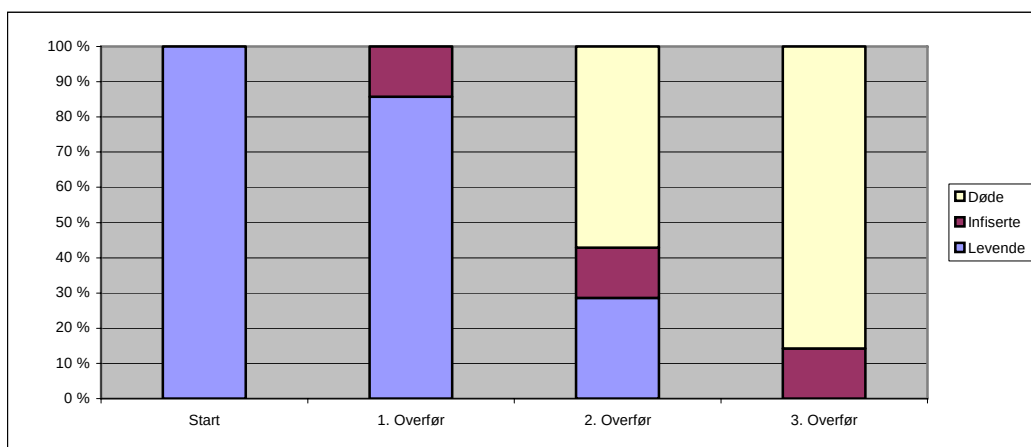


Fig. 15. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Antall kulturer 7. Oppstart 04/02-03. Avsluttet 11/04-03.

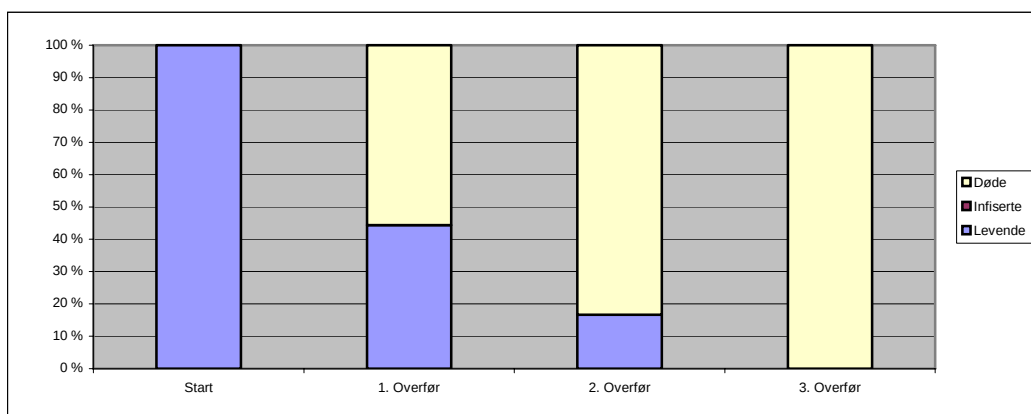


Fig. 16. Utvikling kulturer med normal kvist på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Antall kulturer 18. Oppstart 06/02-03. Avsluttet 11/04-03.

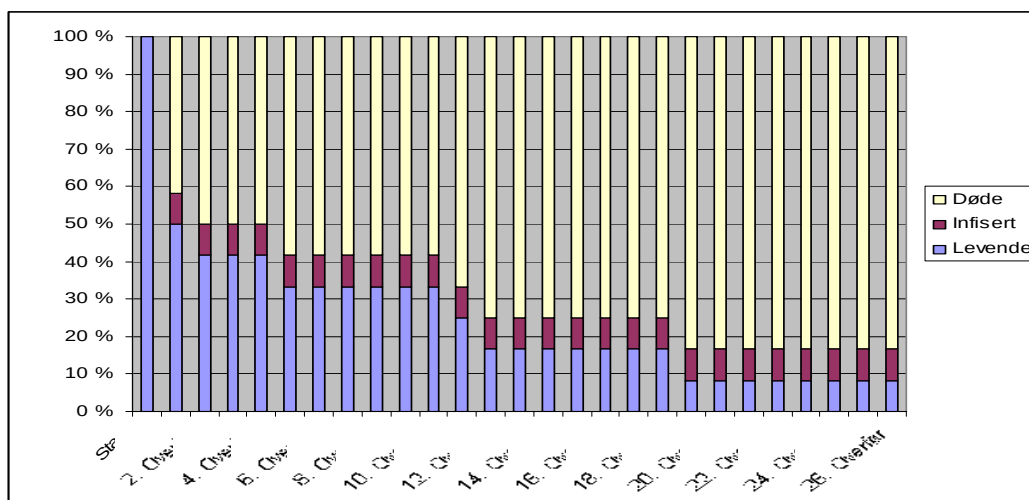


Fig.17. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$.
 6. Antall kulturer 12. Oppstart 18/03-03. Avsluttet 04/05-04.



Fig. 17a. En av kulturene i fig. 17. den 15. mai 2003.

Figur 13-17 viser at plantematerialet som stammet fra normal kvist, hadde en ganske lik utvikling, hvor kulturen var død ved 3. overføring, med et enkelt unntak hvor kulturen var død ved 4. overføring (fig. 13). Der var en ujevn avgang forsøkene imellom, hvor noen hadde en stor avdøingsprosent i oppstart, mens den hos andre kom litt seinere. Der er halvdelen av kulturene som hadde infeksjon (fig. 14, 15, 17).

Det unge plantemateriale viste en helt annen utvikling, enn det normale plantemateriale (fig. 17). Med unntak av infeksjon, her var og en enkelt infisert. Der var etter 1. overføring 50 % levende tilbake, deretter hadde kulturen en jevn, men langsam nedgang i prosentvis overlevende. Der var en levende tilbake da forsøket ble avsluttet.

Her kunne man se stor forskjell på hvilken utvikling de forskjellige typene plantemateriale hadde hatt, tross for de hadde fått samme behandling.

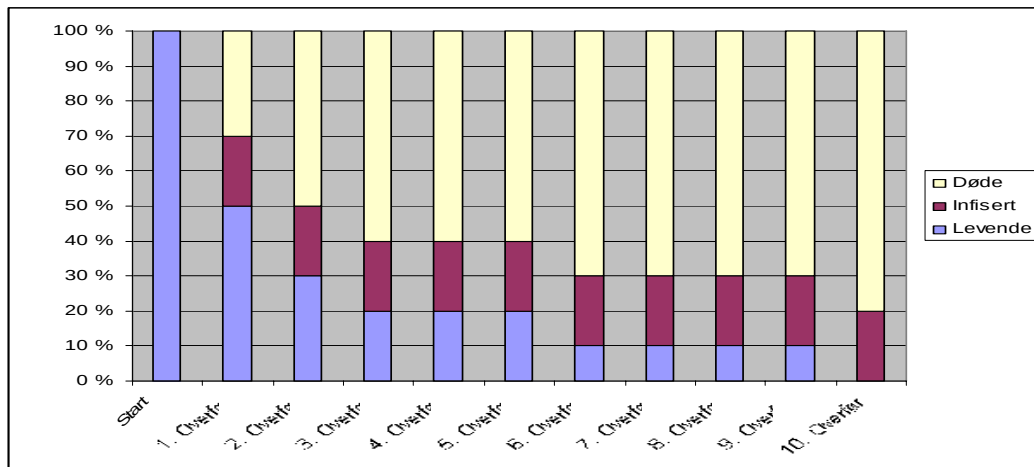


Fig. 18. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på WPM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-7}$. Antall kulturer 10. Oppstart 06/03-03. Avsluttet 18/09-03.

Figur 18 viser en utvikling som også er sett ved de fleste tidligere forsøk (fig. 7-12), med at 50 % av kulturen døde i oppstartsfasen for også deretter ha en jevn men sikker nedgang, frem til alle kulturer var døde. Der var dog en forholdsvis lang levetid på kulturene i dette forsøk, da den siste kultur døde etter 9. overføring. I alt ungt plantemateriale var 20 % av kulturene infiserte.



Fig. 18a. En av kulturene i fig. 18. Den 15. mai 2003.

6.3.3 Anderson's medium.

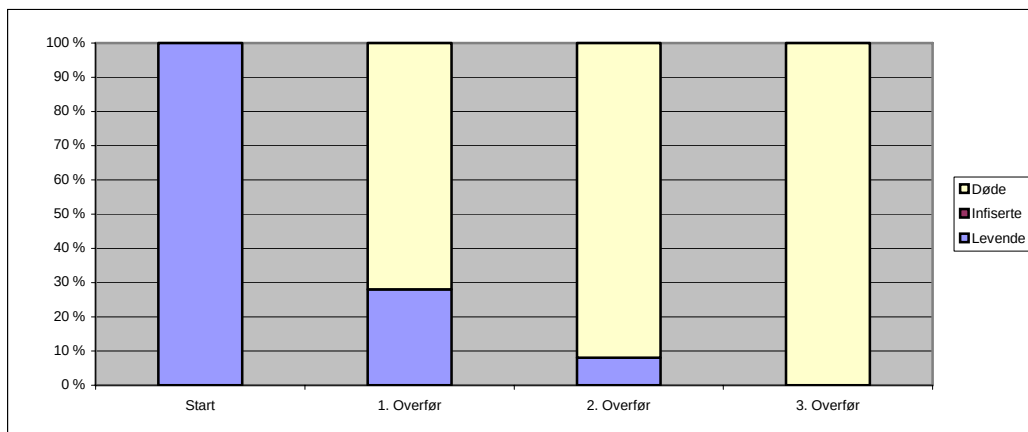


Fig. 19. Utvikling kulturer med normal kvist på AM-medium + TDZ 10^{-5} . Antall kulturer 25. Oppstart 10/02-03. Avsluttet 11/04-03.

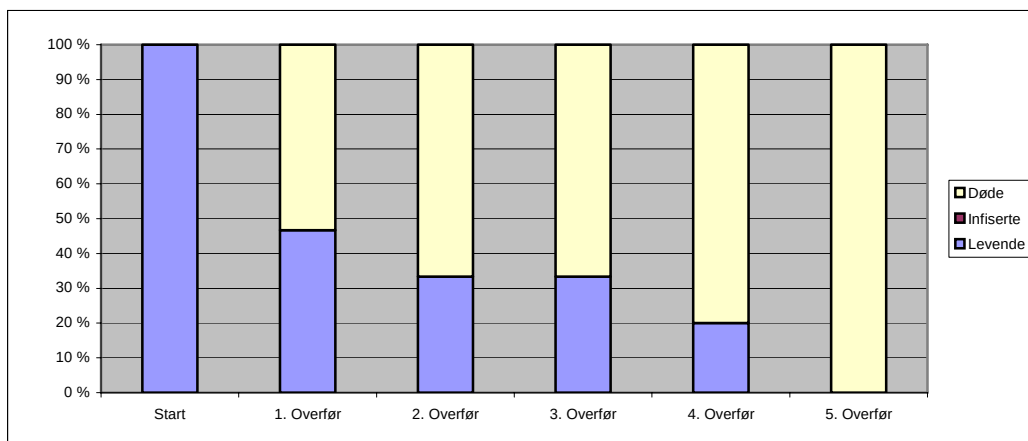


Fig. 20. Utvikling kulturer med normal kvist på AM-medium + TDZ 10^{-5} . Antall kulturer 15. Oppstart 04/03-03. Avsluttet 12/05-03.

Figur 19-20 viser at bruk av AM medium, ikke ga store forandringer i kulturenes utvikling for normal kvist. Her var det og en stor avgang i oppstarten, og den jevne nedgang i avdøding fulgte forholdsvis raskt som i fig 7-12. Alle kulturene var døde etter 2 og 4 overføringer, selv om der ble laget et stort antall kulturer fig. 19 25 stk og fig. 20 15 stk. Der var ingen infeksjon i noen av kulturene

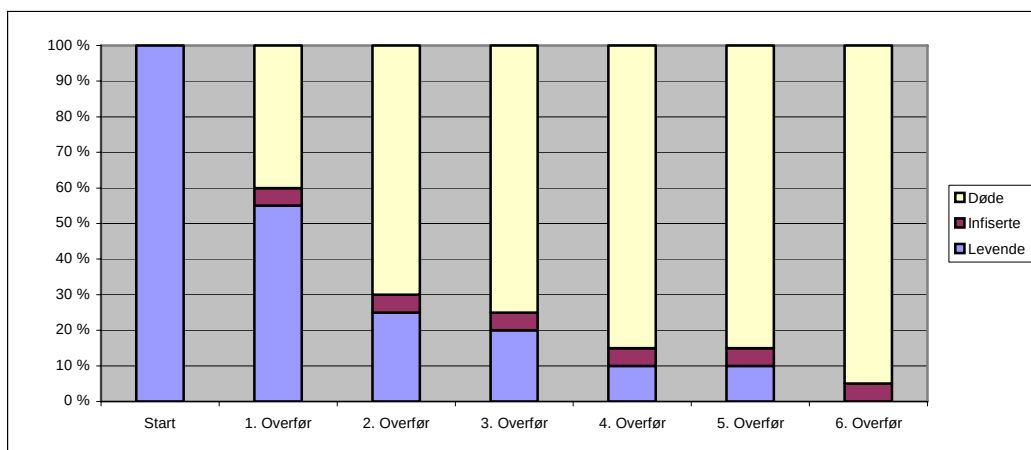


Fig. 21. Utvikling kulturer med normal kvist på AM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 20. Oppstart 11/02-03. Avsluttet 12/05-03.

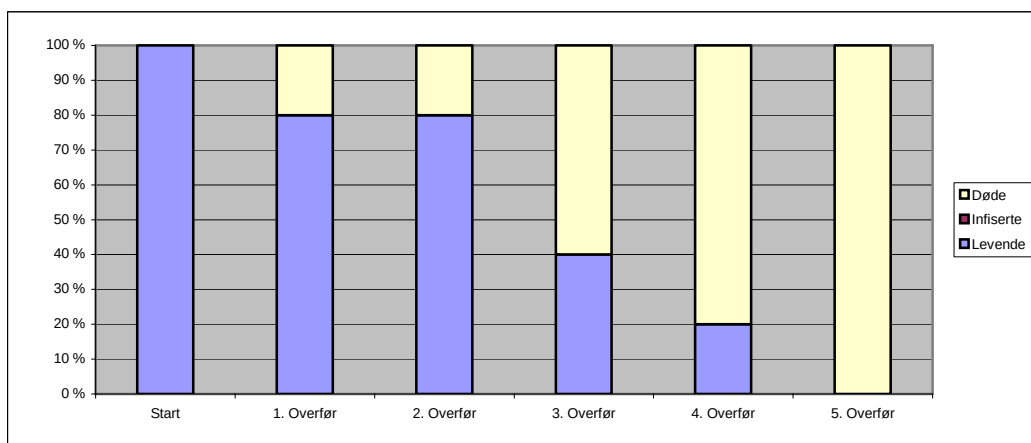


Fig. 22. Utvikling kulturer med normal kvist på AM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 5. Oppstart 04/03-03. Avsluttet 12/05-03.

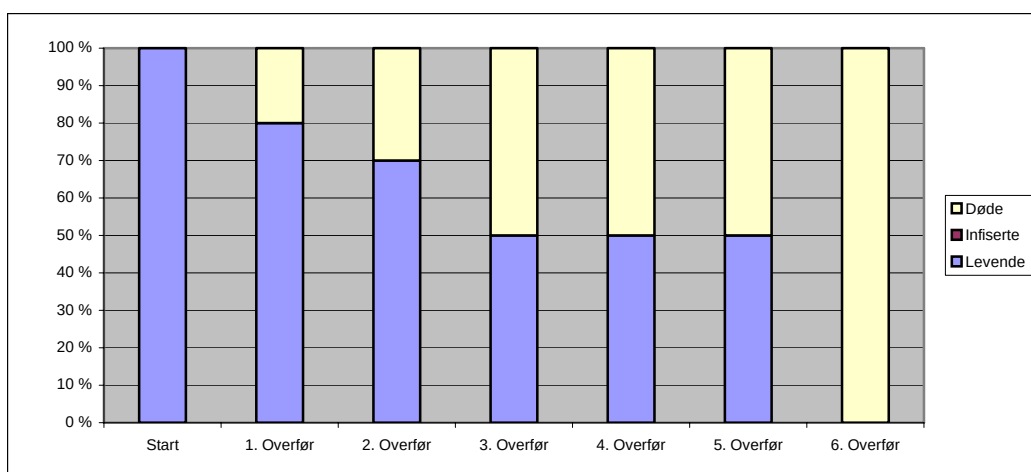


Fig. 23. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på AM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 06/03-03. Avsluttet 28/05-03.

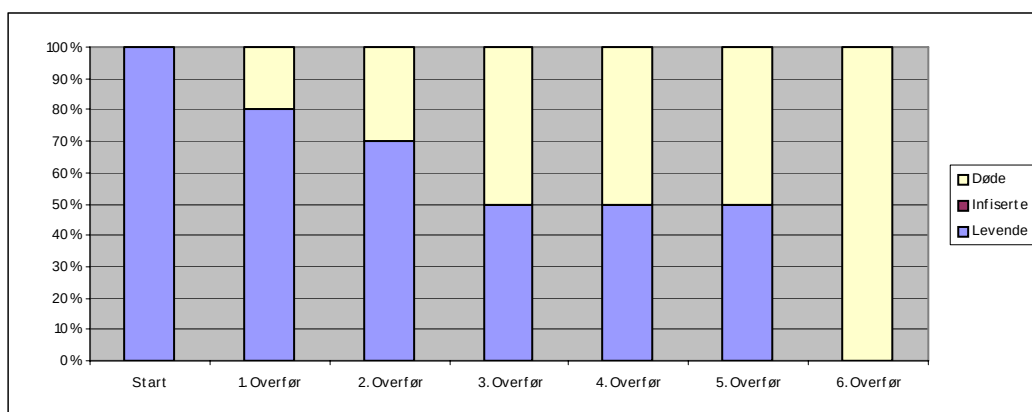


Fig.24. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på AM-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 12. Oppstart 18/03-03. Avsluttet 13/08-03.

Figur 21-24 viser at det ikke var stor forskjell på resultatene mellom de normal kvist og ungt plantemateriale. Overlevelsesprosenten lå høyere i oppstartsfasen sammenlignet med (fig. 19, 20), den jevne nedgang kommer og alle kulturene døde til slutt. Det unge plantematerialet levde en anelse lenger, enn den normale kvist gjorde. Det unge plantemateriale overlevde frem til 6. og 8. overføring, mens den normale kvist overlevde frem til 5. og 6. overføring.

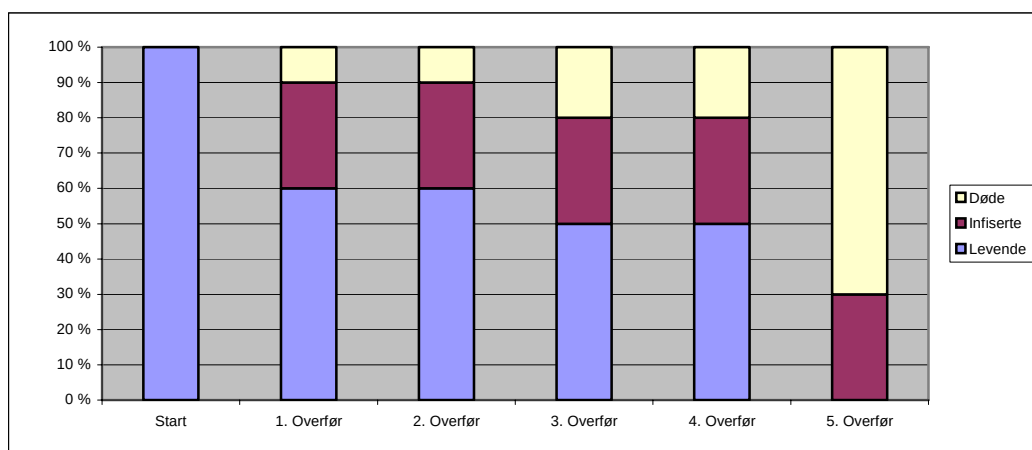


Fig. 25. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på AM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-7}$. Antall kulturer 10. Oppstart 06/03-03. Avsluttet 12/04-03.

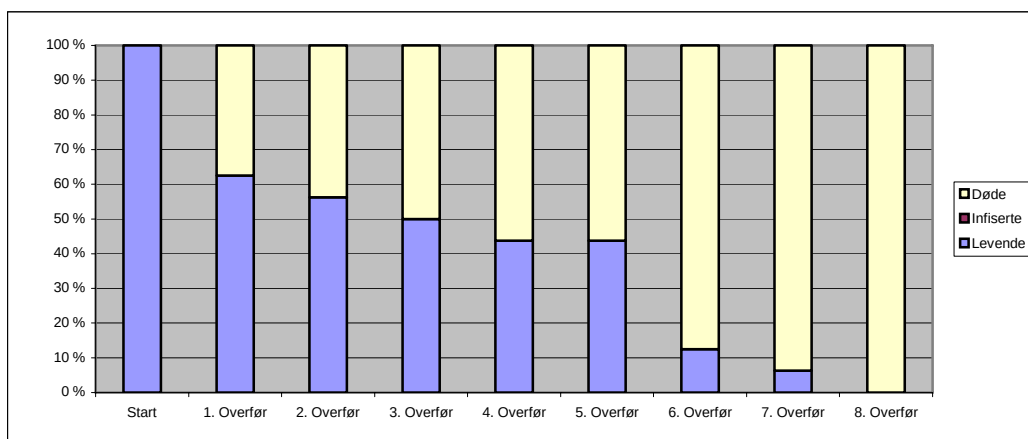


Fig. 26. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på AM-medium + TDZ $5 \cdot 10^{-7}$. Antall kulturer 16. Oppstart 18/03-03. Avsluttet 13/08-03.

På mediene (fig. 25, 26) ble det utelukkende brukt ungt plantemateriale. Men det er vanskelig å sammenligne tallene, da der i 1. forsøk var 30 % infeksjon i kulturene (fig. 25), og ingen infeksjon i det 2. forsøket (fig. 26). Men igjen døde rundt halvdelen i starten, og deretter kom den jevne avgang til alle kulturer døde ved 5. og 8. overføring.

6.3.3 Murashige & Skoogs medium.

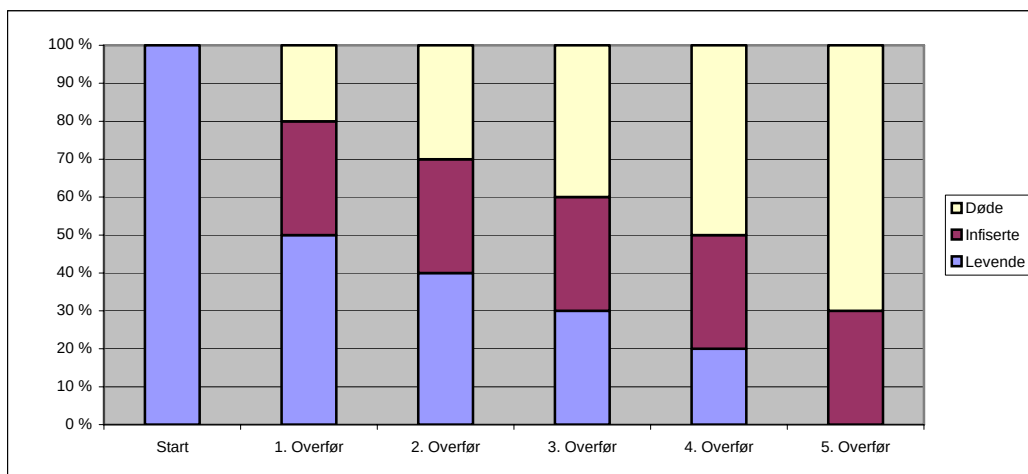


Fig. 27. Utvikling kulturer med normal kvist på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 13/08-03.

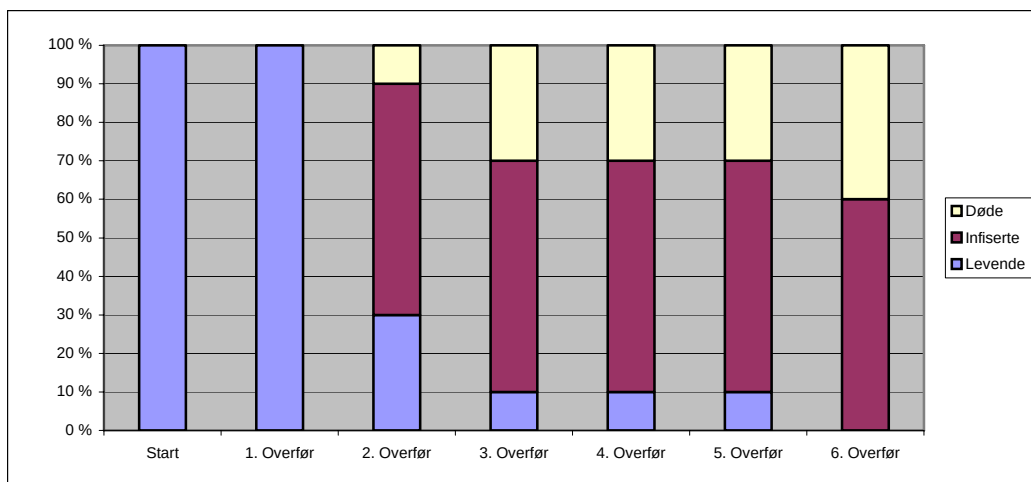


Fig. 28. Utvikling kulturer med normal kvist på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 13/08-03.

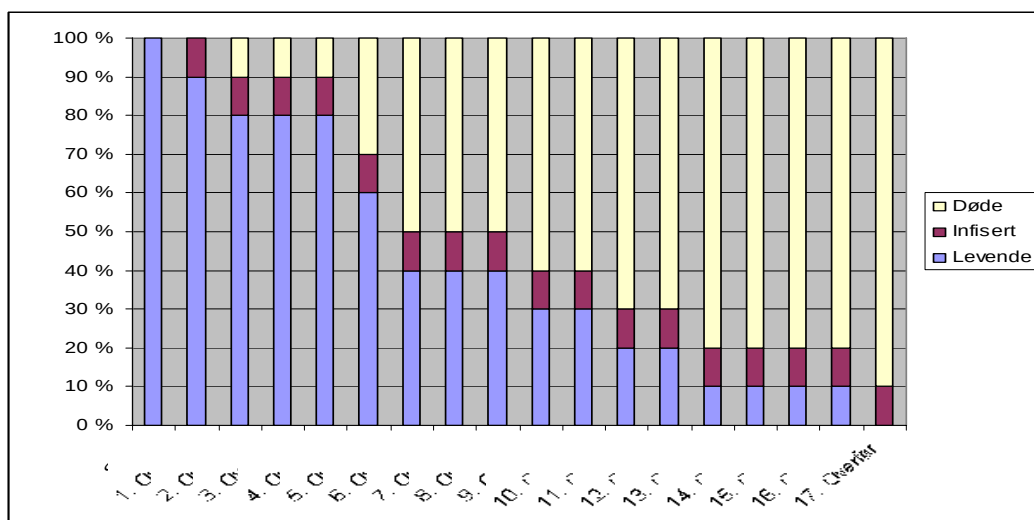


Fig. 29. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 08/04-03. Avsluttet 23/02-04.

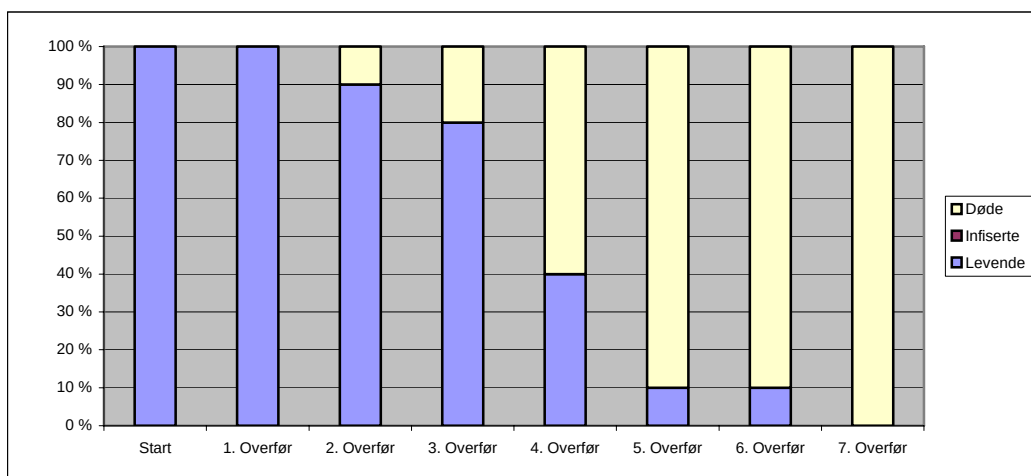


Fig. 30. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 08/04-03. Avsluttet 18/09-03.

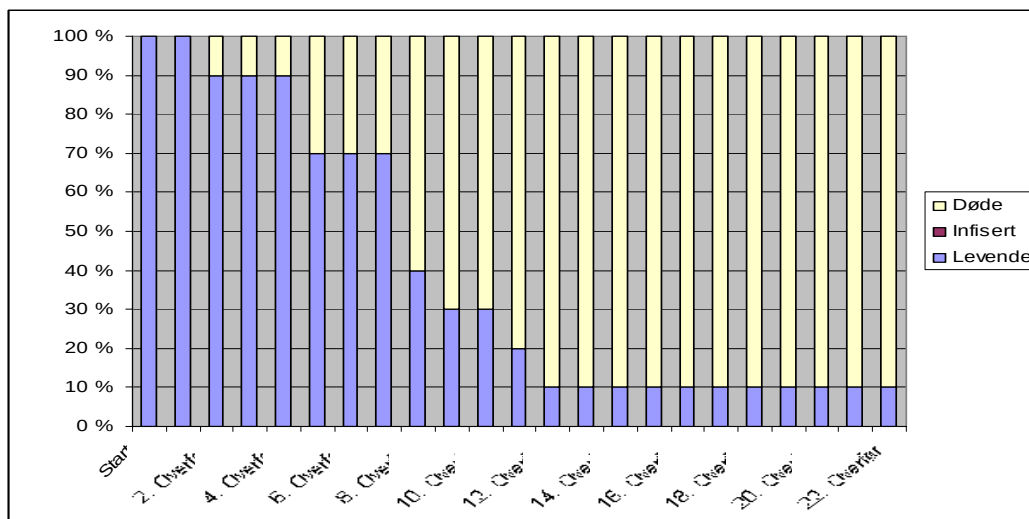


Fig. 31. Utvikling kulturer med $\frac{1}{4}$ materiale på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 08/04-03. Avsluttet 04/05-04

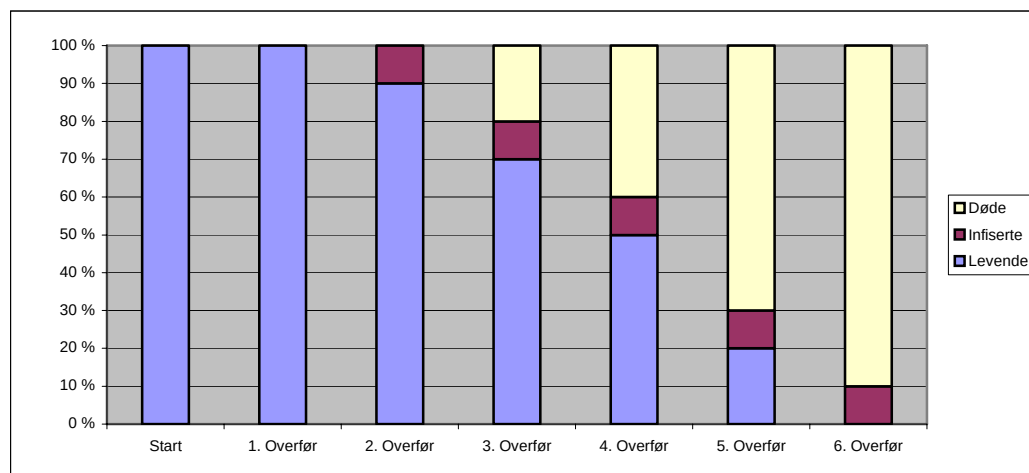


Fig. 32. Utvikling kulturer med $\frac{1}{4}$ materiale på MS-medium + TDZ 10^{-6} . Antall kulturer 10. Oppstart 08/04-03. Avsluttet 13/08-03.

De resultater den normale kvist frembrakte, er ganske like de resultater som ble opp nådd med samme hormonkonsentrasjon i WPM- mediet (fig. 27, 28). Flere kulturer var infiserte, opptil 60 % av kulturene, men total avgangs tidspunktet det samme med 5. og 6. overføring (fig 27, 28). Det aktive kullet så ikke ut til å ha noen effekt, på dette plantemateriale (fig. 27,28). Kulturenes utvikling var den samme, 50 % døde i oppstart, og deretter døde de jevnt utover (fig. 27,28)

Det ungeplantemateriale hadde en annen utvikling (fig. 23,24). Mediet der det ikke var tilsatt aktivt kull, hadde samme utvikling, som den samme hormonkonsentrasjonen i WPM- mediet viste. Med total avgang ved 6. overføring, og der ble samme antall infiserte kulturer i hvert forsøk. Det medium som var tilsatt

aktivt kull, derimot hadde en levetid helt frem til 17. overføring. Det var en jevne avgang av levende skudd, den går bare langsommere nu. AT kulturene ble overført til medium med aktivt kull til medium uten aktivt kull hadde ingen betydning for utviklingen (fig. 29, 31). Plantematerialet høstet $\frac{1}{4}$ (fig 31, 32) viste og stor forskjell i resultatene, avhengig om der ble brukt medium med eller uten aktivt kull. Medium uten aktivt kull (fig. 31) hadde en god start uten avgang, men deretter kom en jevne avgang, og alle kulturer døde ved 6. overføring. En enkelt av kulturene ble infisert. Kulturene som hadde stått på medium som innholdt aktivt kull (fig. 32), hadde heller ingen avgang i oppstarten, og holdt en høy overlevelses prosent på 70 % frem til 7. overføring, hvor kulturene ble flyttet over på medium uten kull. Deretter døde 3 kulturer frem til 8. overføring, og den jevn avgang inntraff. Der var dog stadig en kultur i leve da forsøket ble avsluttet 4. mai 2004. der var ikke infeksjon i noen av kulturene.

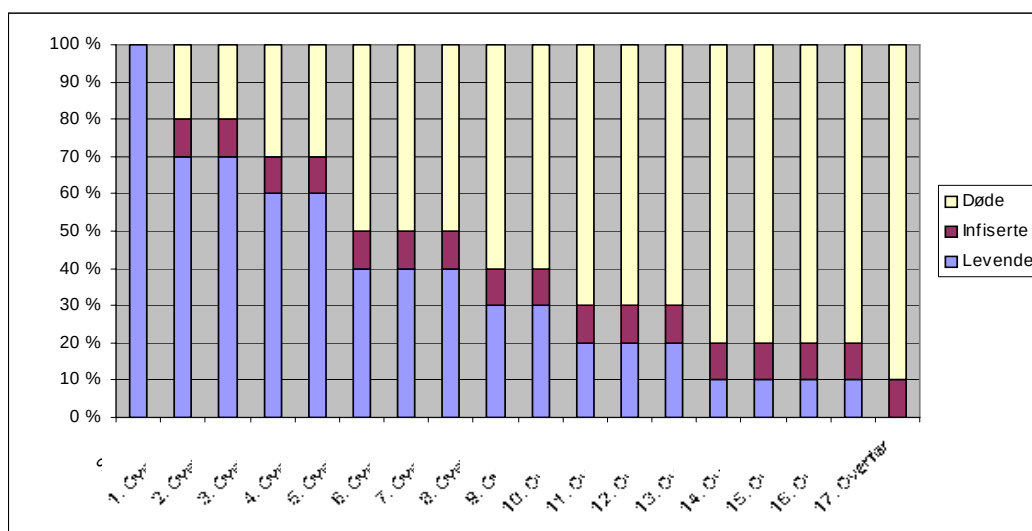


Fig. 33. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på MS-medium + Kin 0,2 mg/l. Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 23/02-04.

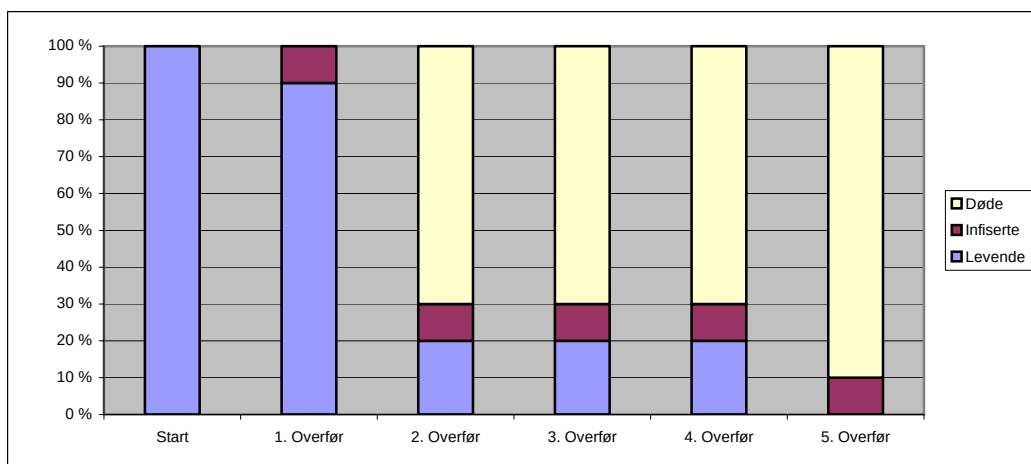


Fig. 34. Utvikling kulturer med ungt plantemateriale på MS-medium + Kin 0,2 mg/l. Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 13/08-03.

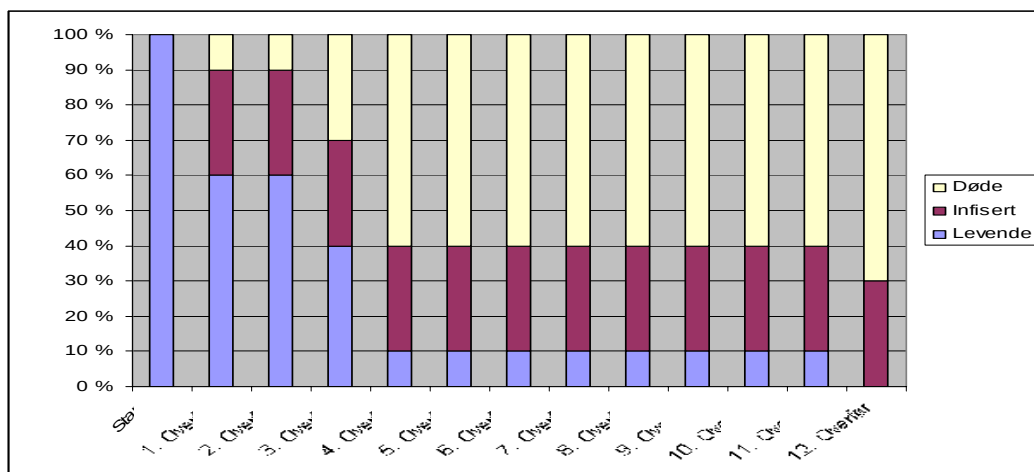


Fig. 35. Utvikling kulturer med 1/4 materiale på MS-medium + Kin 0,2 mg/l. Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 27/11-03.

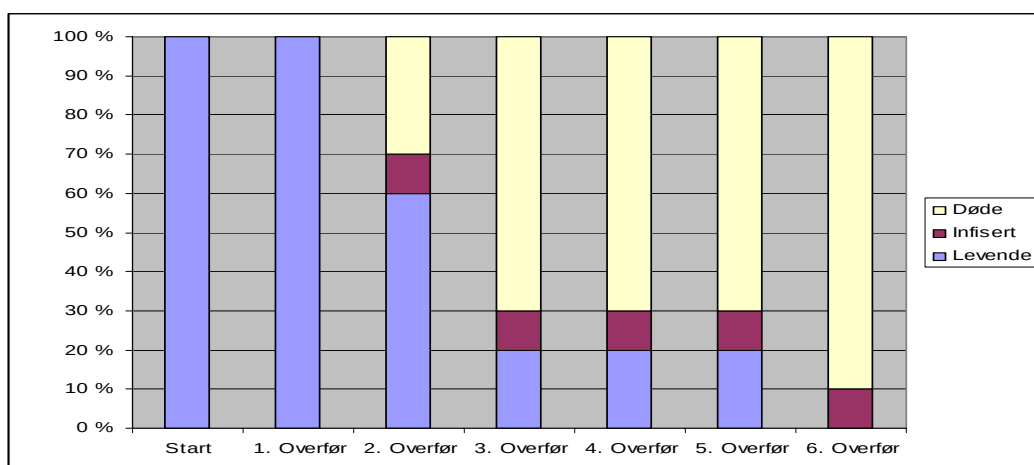


Fig. 36. Utvikling kulturer med 1/4 materiale på MS-medium + Kin 0,2 mg/l. Antall kulturer 10. Oppstart 09/04-03. Avsluttet 13/08-03.

Kommentarer til resultatene: Der var ikke mer gammel kvist tilbake, så i forsøkene med kinetin (fig. 33-36), ble der kun brukt ungt plantemateriale og kvist høstet 1/4. Resultatene som kom frem viser, at der stort sett ikke var forskjell på de to typer plantematerialers utvikling. Der forskjellen ligger er om kulturene har stått på medium med eller uten aktivt kull.

Medium uten kull (fig. 34, 36). Begge typer plantemateriale startet stort sett uten avgang, med deretter steg avgangen forholdsvis raskt. Ungt plantemateriale døde ved 5. overføring og 1/4 materialet var dødt ved 6. overføring. Der var 1 kultur infisert i begge typer plantemateriale.

Kulturene som ble dyrket på medium med aktivt kull (fig. 33,35), hadde og den samme utviklingen, tross at det var to forskjellige typer plantemateriale. Det unge plantemateriale levde dog i lengere tid, frem til 17. overføring, enn 1/4 materialet som levde frem til 12. overføring. 30 % av 1/4 kulturene var og infiserte, mens kun 10 % av kulturene fra det unge plantemateriale var det. Ellers hadde begge forsøk en jevn men langsomt nedgående overlevelsesprosent til den er 0 %. Ingen av plantematerialer typene ble negativt påvirket av å gå fra medium med aktivt kull over til medium uten (fig. 33, 35). Døde kulturene ikke i oppstartsfasen, døde de vanligvis pga. callus overvoksninger (vedlegg A-M).

7.Diskusjon lønn.

7.1 Driving av knopper fra grener.

På morttreets stamme og greiner finnes et stort antall små kviste, så der var basis for å tro, at dette forsøk kunne gi brutte knopper der kunne brukes i mikrokulturen. Metoden er tidligere blitt brukt på eik (Vieitez et. al.1994, Hernandes et. al. 2003), hvor knoppene begynte å vokse etter en til to uker. Denne metode kan åpenbart ikke brukes på lønn, som reagerer annerledes på behandlingen enn eik. Knoppene svulmet opp men brøt ikke. Vieitez et. al. (1994) Hadde høstet grenene på slutten av mars rett før knoppene spretter og Hernandez et. al.(2003) samlet plantematerialet i perioden desember til mai, og fikk dårligst resultat med materialet samlet i januar. Grenene som blev brukt var samlet 12. januar. Det er mulig at man burde ha ventet med å drive greinene til slutten av mars eller begynnelsen av april.

7.2 Brutte knopper fra kvist

Oppstart av mikrokultur fra brutte knopper er en metode som er blitt brukt på forskjellige treslag eks. bjørk (Ryynänen & Ryynänen 1986). Mikroformering med plantemateriale samlet ute i det fri innebærer en stor risiko for at plantematerialet skal gi infeksjon., for er kan ofte være sopp og bakterier i knoppene, som vil gi infeksjon når *in vitro* kulturen startes opp. Rohr & Dominuque (1987) fikk, da de samlet stubbeskudd fra lønn en infeksjonsprosent mellom 55 og 75 prosent. Jeg så tilsvarene på knoppene til de kvist som ble satt til driving. Halvdelen av knoppene var infisert av sopp. Forsøket ble derfor avbrutt før de brutte knopper ble satt på medium, da der ikke var grunn til å forsøke noe som i utgangspunktet ikke så ut til å ikke ville kunne lykkes.

7.3 Hvilende knopper.

Der fantes ikke en metode beskrevet for mikroformering av lønn fra hvilende knopper, så der taes utgangspunkt i hvordan den normale fremgangsmåte er når treaktige planteslag skal mikroformeres fra hvilene knopper. Metoden har tidligere gitt vellykkede resultater på bjørk (Durkovic 1997, Ryynänen & Ryynänen 1986, Hodnebrog 1996). (Chalupa 1983) nevner arter som *Carpinus*, *Quercus*, *Tilia*, og *Fraxinus*.

Det som er viktig er alderen på plantematerialet og innsamlingstidspunktet. Da knoppene kom fra et voksent tre, ville juvenilitet være et typisk eksempel på et problem. Da evnen til å formere seg vegetativt ofte er forbundet med juvenilitet (Chalupa 1983), og kulturer av treaktige planteslag letter lader seg etablere fra juvenilt materiale (George & Sherrington 1984). Den optimale fremgangsmåte ville ha været å pode kvist fra mortræet på unge grunnstammer av lønn, som resultere i en rejuvenering av plantematerialet (Hansen 1985, Hodnebrog 1996). Dette ble ikke gjort, der ikke var tid til å vente på at podekvistene skulle etablere seg på grunnstammen.

Forsøkene viser at den normale kvist, som har ontogenetisk eldst type plante materiale har kortest overlevelsestid in vitro, maksimalt frem til 6. overføring . Det unge plantemateriale som er ontogenetisk yngst, viser en helt annen atferd hvor kulturene i 4 ut av 12 forsøk overlever frem til fra 10. til 26. overføring.

Høsttidspunkt for kvistene spiller og inn på juveniliteten (George & Sherrington 1984). Da der i løpet av et år er store variasjoner i temperatur, daglengde, lysintensitet og vannstress som en mor-plante er utsatt for i løpet av et år, er resultatet at planten også har forskjellige konsentrasjoner av karbohydrater, proteiner, og hormoner på forskjellige tidspunkter av året. Derfor må resultatet av mikroformeringen sannsynligvis variere med når på året plantematerialet blir høstet fra morplanten (George & Sherrington 1984). Forsøksresultatene indikerer ikke dette. Den normale kvist som er samlet mens knoppene ennå er i sterkt bunnet av vinterhvilen, har en kort levetid in vitro på 3-6 overføringer inklusiv de kulturer som er på medium med aktivt kull. Dette til tross for at der er en spredning på opptil halvannen måned på innsamlingstidspunktet og oppstartsdatoene på de enkelte forsøk. Det plantemateriale som er inn samlet den 1. april 2003, har samme levetid 5 og 6 overføringer, hvis der ses bort fra de kulturer som er på meduim inneholdende aktivt kull, som de andre kulturer hvor der er brukt plantemateriale med et innsamlingstidspunkt som ligg tidligere på året.

7.4 Infeksjon i kulturene.

Desinfiseringen av plantematerialet må ha været ganske effektiv, da der totalt var en infeksjonsandel på 9,73 % av alle forsøkene som ble gjort, når man sammenligner med Rohr og Dominuque (1987) som hadde en infeksjonsprosent i kulturene mellom 55-75 %. Forklaringen på den lave andel infiserte kulturer er at der blev gjort et stort sorteringsarbeid når knoppkjellene ble fjernet. Var der de minste tegn på infeksjon blev knoppene kassert. Knoppene som blev satt til driving hadde soppinfeksjon i halvdelen av knoppene, så uten sorteringsarbeidet ville forsøkene sikkert ha hatt en meget høyere infeksjonsprosent.

7.5 Medium

Der blev i forsøkene brukt flere forskjellige mediumtyper og hormonkonsentrasjoner. Dette skulle gi mulighet for, at den riktige kombinasjon skulle være mellom det som ble forsøkt. Der blev tatt utgangspunkt i hvilke mediumtyper som tidligere hadde gitt vellykkede resultater på treaktige planteslag tidligere og de hormonkonsentrasjoner som ble brukt.

Valg av medium.

Da det erfaringsmessig har vist seg at treaktige planteslag ofte vokser best på medium med reduserte konsentrasjoner av et eller flere ioner (Anderson 1975, McCown & Lloyd 1981). De mediumtyper som ble brukt var Murashige og Skoog (MS), Andersons medium (AM) og Woody Plant medium (WPM) har alle vist positive resultater på treaktige planteslag tidligere (Hodnebrog 1996, Quoirin & Lepoivre 1977. MS mediet ble brukt med en tredje dels konsentrasjon, så innholdsmessig er der ikke den store forskjell på de 3 medium typene som er blitt brukt. Derfor er det sannsynligvis ikke mediet der er årsak til, at der ikke kom noen strekningsvekst på de kulturer som ble startet opp.

Hormonvalg og -konsentrasjon.

Resultatene av forsøkene indikerer ikke at der er en hormonkonsentrasjon av TDZ som er å foretrekke frem for andre når der brukes normalt plantemateriale.

Det unge plantemateriale er eneste materiale, hvor det er lykket å få en lang levetid på kulturene uten bruk av aktivt kull. Kulturene var på WPM.medium + TDZ med konsentrasjoner på $5 \cdot 10^{-6}$ og $5 \cdot 10^{-7}$, men ikke på 10^{-6} som ligger midt imellom de to. Det eneste medium med en TDZ konsentrasjon 10^{-6} og ungt plantemateriale med lang overlevelsestid er MS-mediet, men kun hvis mediet var tilsatt aktivt kull.

Kulturene som blev startet opp med materiale innsamlet 1. april 2003, som har hatt lang overlevelsestid på MS-mediet, er de som var tilsatt aktivt kull. Kulturene der kom på medium uten aktivt kull, fikk en overlevelsestid der ikke var lenger enn de fleste andre kulturer på medium uten aktivt kull. Det ser ikke ut som om der er den store forskjell om hormonet der blev brukt var TDZ eller kinetin, overlevelsestiden var omtrent lik for de samme typer plantemateriale.

Da der ikke kom strekningsvekst på noen av kulturene er det vanskelig å vite om det er de riktige hormoner og konsentrasjoner som er blitt brukt.

Aktivt kull i mediet.

Tidligere forsøk har vist, at med aktivt kull i mediet kan veksten fremmes i *in vitro* kulturer med treaktige planter ved å forhindre, at der dannes frie fenoler i mediet (Chavre & Salesses 1987).). Favre & Juncker (1987) fant at det aktive kullet virkede dempende på callusveksten og at skuddene fikk en normal strekningsvekst.

Det ble ikke observert, om der ble dannet frie fenoler i de kulturer der var på medium inneholdende aktivt kull. Spørsmålet er, om det går an at observere om der er frie fenoler i kulturene. Fenolene kan muligvis bli absorbert via en kjemiskprosess av det aktive kullet så snart det dannes. Sammenlignes de kulturer der var på identiske medium uten kull, og den samme type plantemateriale med de kulturer som var på medium med aktivt kull, fremgår det tydelig at mediet som inneholder aktivt kull har den lengst levetid. Levetiden for kulturene er fra dobbelt så lang til nesten fire ganger så lang, for de kulturer der har stått på medium med aktivt kull.

Det ble i forbindelse med overføringene registrert at der ikke tilnærmelsesvis var den samme callusdannelse i de kulturer som innholdt aktivt kull, som i de kulturer der ikke innholdt aktivt kull. (Scholl et al. 1981). Skuddene fikk ikke en normal strekningsvekst, men det var der heller ikke på noen av de andre kulturer uten aktivt kull. Så der er ikke noen forskjell i kulturenes utvikling om mediet inneholder aktivt kull eller ikke.

7.6 Vekstrom.

Forholdene med temperatur og daglengde stemmer godt overens med de forhold der normalt er i vekstrom der inneholder kulturer med treaktige planter.

Lyset der ble startet opp med var kallhvit, men ingen strekning ble oppnådd. Etterpå ble de forsøk med rødtlys. Resultatet var en eksplosiv callusvekst, det samme opplevde (Pers. med. Padilla Guzman 2004), da der blev gjort forsøk med blåbær under rødtlys. Da dette absolutt ikke var løsningen, blev kulturene etterfølgende satt unner et varmhvit lys, og den voldsomme callusvekst stoppede, men der kom stadig ikke strekningsvekst på kulturene. At der ikke kom strekningsvekst på kulturene tror jeg ikke skyldes forholdene kulturene hadde i vekstrommet. Forklaringen ligger nærmere i plantematerialet og hormonene der ble brukt i mediene.

8. Konklusjon Del A:

Resultatene på forsøkene gav det samme resultat, og det lyktes ikke at få strekningsvekst på noen av kulturene. Men det er helt klart, at skal det lyktes å mikroformere fugleøyet lønn skal det brukes ungt plantemateriale og det skal være høstet rett før knoppene spretter på våren. Da det er det plantemateriale der har vist de mest lovende resultater. Hvis der skal forsøket igjen, vil det sikkert være fornuftig å prøve med de samme medium typer (WPM og MS 1/3 kons.).

Hormon og ved hvilken konsentrasjon som da skal brukes i mediet ved nye forsøk er jo et av de store spørsmål. Jeg vil anbefale at der brukes TDZ, da resultatene ikke viser forskjell om der brukes TDZ eller kinetin når der er aktivt kull i mediet. Det var kun med TDZ, at det lyktes å få lang levetid på kulturene uten bruk av aktivt kull i mediet. Det er fristene at si seg enig med det Rohr & Dominique (1987) skrev. ”..we demonstrated that *in vitro* culture of explants such as cambium or buds was not suitable when directly taken from adult trees”. Dette var i 1987, og tiden har ikke stått stille, så jeg tror det skal være mulig å lykkes med mikroformering av platanlønn. Det er bare at fortsette med at prøve.

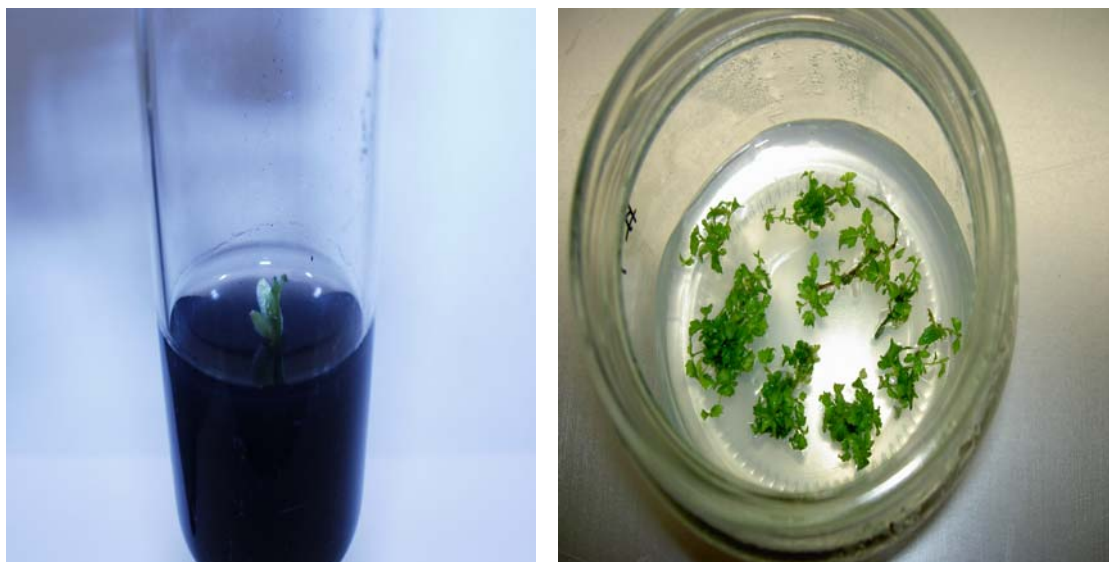


Fig. 37. Der er stor forskjell på kulturoppstart og oppformering.

9. Del B: BJØRK

9.1 Bjørke slekten.

De best kjente rakelbærende trær tilhører bjørkefamilien, som også omfatter hassel (*Corylus*) og or (*Alnus*). Familien innholder 6 slekter og over 150 arter av lauvfellende trær og buske, som især vokser på den nordlige og tempererte soner. *Alnus* slekten finnes også i Andesfjellene. Bladene er spredte. Hanh- og hunblomster sitter i atskilte rakler på samme tre, men der er kun hannraklene som er store i iøynefallende (Coombes 2000).

9.2 Bjørkeartene i Norge.

Det har vært mye uenighet om både navn og artsinndeling og spesifiseringen av de forskjellige typene av bjørk både i Norge og resten av verden. Foreløpig er det enighet om at det vokser 3 hovedarter av bjørk naturlig i Norge. Dunbjørk og vortebjørk er de to såkalte tredannende/stammedannende artene. Den tredje arten, dvergbjørk (*Betula nana*) er en rislignende/buskeformet art (Børset 1985, Frivold 1994). Artene kan variere både i utseende og form, og deles derfor ofte inn i enten underarter, former eller varianter.

Hos dunbjørk finner man underarter som myrbjørk (*B. pubescens subsp pubescens*) og fjellbjørk (*B. pubescens subsp tortuosa*) (Frivold 1994).

Når det dreier seg om vortebjørk snakker vi derimot om varianter. En av de mest kjente er valbjørk (*Betula pendula var. carelica*), eller masurbjørk, som mange velger å kalle den. En annen kjent variant av vortebjørken er flammebjørk, disse må dog ikke forveksles, selv om der kan være flammestruktur i valbjørk. Flammebjørk oppstår når kambielaget sprekker, slik at bølger i årringene dannes og veden får et flammet utseende (Ruden 1954, Jahren 2002).

9.3 Naturlig utbredelsesområde

Det naturlige utbredelsesområde til bjørken er den nordlige halvkule i et belte. Innenfor skogbruket snakkes det om ”Bjørkebeltet”, som går fra Europa gjennom Russland til Stillehavskysten, hvor dunbjørka (*Betula pubescens*) danner grensen for den nordlige utbredelsen av slekten, og vortebjørken (*Betula pendula*) går lengst mot sør. Dunbjørka finnes dessuten i store deler av det nordlige Asia samt på Grønland og Island. Vortebjørken finnes muligvis og i det nordlige Asia. Begge arter kan vokse høyt over havet. I de Sveitsiske alpene kan begge arter finnes i opptil 2000 m.o.h. Det er vanlig, at det er dunbjørka som danner skoggrensen opp mot fjellet.

Med så stort et utbredelsesområde må der være store forskjeller i klima. Som eksempel er det i dunbjørkas nordøstlige utbredelsesområde et årlig gjennomsnitt på 350 mm nedbør og en middeltemperatur på -20° i januar og 15° i juli. I den sørvestlige delen av området kan den årlige nedbørsmengde komme opp på 1500mm med en januartemperatur på 3° og en julitemperatur på 15°.

De viktigste områdene er det nordlige Skandinavia og Russland hvor bjørken finnes i rene bestand eller i blandingsbestand med osp (*Populus tremula*), Gråor (*Alnus incana*), furu (*Pinus sylvestris*), og gran (*Picea abies*) og andre arter (Møller 1977).

9.4 Krav til levested.

Bjørken stiller ikke store krav til jordbunnens innhold av næringsstoffer eller jordtype, men den er lyskrevende. Hvor der er rikelig vannforsyning er bjørkens vannforbruk meget høyt, men den klarer seg med meget lite vann om det er nødvendig. På fuktige, sure, torvaktige jordtyper er det dunbjørken som trives best, på de tørre sandholdige jordtyper er det vortebjørken som trives best. Den beste veksten har vortebjørken på moldrik, dyp jord med frisk fuktighet, gjerne i noe hellende terreng med lun beliggenhet.

Står bjørk i rene bestand blir jorden normalt gressdekket, står den i blanding med bartrær påvirker bjørken jordbunnen i gunstig retning på grunn av dens lettomsattelige lauv (Møller 1977, Børset 1985).

Når man er på de to artenes klimakrav, er det dunbjørken som står frem som den hardføre med et minimumskrav på 7,5 °C til sommervarme. Vortebjørken er nesten å regne som et varmekrevende treslag, selv om der finnes forekomster helt oppe i Pasvikdalen på 69°30' n.br. hvor middeltemperaturen juni-september er 10,1 °C. Dette angir trolig det absolutte minstekrav til varme (Børset 1985).

9.5 Lauv og frø.

Bladene hos vortebjørk er mer eller mindre dobbelt sagtaggede, og de kan ha en utstrakt bladspiss og smalner brått av mot bladstilken. Lauvet til dunbjørken er typisk jevnt eller uregelmessig sagtagget, og formen er ofte oval med en kort bladspiss (Frivold 1994). Frøene er lette og de små bjørkenøttene har to hinneaktige vinger, så de lett kan fraktes over store avstander ved hjelp av vinden (Børset 1985). Man kan og artsbestemme frøene. Frøvingene på vortebjørk går frem over frøspissen, og er ofte 3-4 ganger bredere enn selve frøet. Rakleskjellene har vinger og ligner på en fugl i flukt. Dunbjørkfrø sine frøvinger går kun frem til spissen av frøet, og frøvingene er 1,5-2 ganger bredere enn frøet. Rakleskjellene har sidefliker som ofte går skrått ut fra skjellbasis (Frivold 1994).

9.6 Frøformering.

Bjørk er en rik frøprodusent med blomstring og frøsetting nesten hvert år fra 15-20 års alderen, og de modnes i august/september. Frø som modnes i august kan spire med en gang, mens de frø som modnes seinere ofte må gjennom en periode med frost før de kan spire. Bjørkefrø er små og har nesten ikke noe opplagsnæring, og spirer så snart der er god tilgang på fuktighet, ofte på naken mineraljord med stor kapillær vannledningsevne. Derfor ser man ofte tette naturlige foryngelser med bjørk på de flater der oppstår etter skogbrann og flatehogst (Børset 1985, Frivold 1994, Møller 1977).

Kommersiell planteproduksjon fra frø.

Naturlig foryngelse i skogen har vært den mest brukte metode for planteproduksjon, derfor er der i det praktiske skogbruket ennå en nokså begrenset

med erfaringer i Norge med planting av bjørk. I seneste år har vortebjørk blitt en del av sortimentet i mange skogplanteskoler (Frivold 1994). Normalt såes frøene på våren i et fuktig bed, flere steder praktiseres det og såing på høsten. Metoden er at frøene bredsåes i bedet, og der beregnes 75-125 m² bed/ kg frø. Dekklaget over frøene skal være tynt; eventuelt tråkkes eller tromles bedet bare etter såing og dekkes med granbar, som seinere reises opp for å gi skygge til de små bjørkeplanter. Utbyttet fra frøbeddene variere mye, men 35000 planter/kg frø regnes for gjennomsnitt. Dette er ikke et stort antall planter, når et kilo frø fra vortebjørk inneholder 3,5-4 mil. frø og et kilo frø fra dunbjørk inneholder rundt 5 mil. frø (Møller 1977).

9.7 Vegetativ formering.

Begge artene kan formere seg vegetativt med stubbeskudd. Evnen er størst mens trærne er unge, fra 30-40 års alder avtar evnen og opphører nesten helt ved 60-80 år. Dunbjørk i høyere liggende strøk i Nord-Norge setter ofte skudd fra rothals mens treet er i live, så når den gamle stammen råtner fortsetter skuddet med å vokse og danner nytt individ. Dunbjørk har dessuten evnen til og formere seg via rotskudd (Børset 1985).

Får bjørk menneskelig hjelp til den vegetative formeringen er der flere muligheter. Stiklingsformering er en av formeringsteknikkene som kan brukes, men der er ofte en meget lav overlevelsesprosent på stiklingene. I Finland ble det gjort et forsøk med stiklingsformering i 1940, og resultatet var at kun 3 % av stiklingene ble mer en 1 år gamle (Ryynänen & Ryynänen 1986). Podning er også en foryngelses metode er blitt benyttet i mange år. Men den bliver for kostbar (Hodnebrog 1996). Et annet problem med podning er, at det kun kan produseres et begrenset antall planter, da det kun er et begrenset antall kvister på et trø.

I Norge er planteproduksjonen av for eksempel valbjørkplanter stort sett basert på mikroformerte planter (Bechsgaard & Larsen 1997)

9.8 Valbjørk

Navnet på denne spesielle varianten av vortebjørken har og er varierende fra både land og sted. I dag brukes benevnelsen valbjørk mest, men enkelte steder har den fått navn etter opphavstedet til virket. Den kalles f. eks Ringeubjørk i nedre Gudbrandsdal.

I de andre skandinaviske land er masurbjørk den mest brukte betegnelsen. I Sverige har det vært vanlig å kalle all bjørk med flammet ved for masur. Valbjørk er derfor ofte blitt kalt for brunmasur. I norrønlitteratur er det nevnt en ”masurbolle”, så navnet har nok også blitt brukt her i landet (Ruden 1954). I Finland brukes betegnelsen masurbjørk eller visabjørk. Mens man i Russland har knyttet navnet opp mot det område, hvor den forekommer hyppigst nemlig Karelen. Derav navnet karelsk bjørk (Raulo 1987, Ruden 1954, Martinson 1995).

9.9 Hva er valbjørk.

Der har tidligere vært mange ulike forklaringer på hvordan masurdannelsen gikk for seg. Både insekt- og soppangrep ble satt i sammenheng med denne (Larsen 1940). I dag veit man at valbjørk er en variant av vortebjørken, som skyldes en arvelig defekt. Denne defekten styres av flere gener, og dermed blir nedarvingen av defekten ikke 100% (Martinson 1998). Dette beviste finske forskere allerede på 1920-tallet (Heikinheimo 1940, Larsen 1940). Forsøkene ble senere gjentatt i Sverige, og disse bekreftede de finske resultatene (Johnson 1951)

Det er i dag kjent at det ikke kun er vortebjørken, som kan danne masurved. Dette er tidligere blitt avvist (Heikinheimo 1940, Johnson 1951, Ruden 1954, Braastad et al 1998). Dunbjørk kan også danne masur (Raulo 1987, Almgren 1990), og i følge Martinson (1995) kan det også dannes masur i or (*Alnus spp.*), selje (*Salix spp.*), og rogn (*Sorbus spp.*), men det er meget sjeldent.

9.10 Naturlige forekomster av valbjørk.

Her i landet er den naturlige utbredelsen av valbjørk hovedsakelig i de sørøstlige delene av landet. Men den er funnet så langt nord på som Gudbrandsdalen. Forekomstene er meget sporadiske og der kan være flere mil mellom de enkelte forekomster (Ruden 1954). Enkelte eksemplarer er funnet på Sørlandet og i Rogaland (Berg 1996).

Utenfor landets grenser forekommer valbjørken i Sør-Sverige, Sør-Finland, i Karelen, Baltikum og Hvite-Russland. I Europa ellers forekommer den svært spredt (Saarino 1976, Johnson 1974). Der blev i forfjor funnet en naturlig forekomst av valbjørk i Danmark. Men man regner med å finne enda flere forekomster, da der ikke er blitt leitet etter valbjørk tidligere (Pers.med. Rønne T.)

Hvilke landskapstyper er det så typisk at valbjørken forefinnes naturlig? Valbjørk er naturligvis bundet til de stedene hvor vortebjørken er vanlig. Det er ikke vanlig at valbjørken er i typiske skogområdene, men det ser ut som om den er knyttet til beboede strøk, særlig på gamle bosetninger, gjenvokste slåttenger, jordekanter, og nedlagte plasser (Ruden 1954). I Finland vokser valbjørken særlig ofte på plasser der svedjebruk var vanlig (Martinson 1995, Berg 1996). Disse landskapsformene er ved å forsvinne gradvis rundt om i Europa, så det er sannsynlig å tro at valbjørken var mer vanlig før. Da treet har et stort lyskrav og en dårlig konkurranseevne i forhold til andre treslag, vil den fort få store eksistensproblemer når slike landskapsformer forsvinner. Det er derfor i dag mest vanlig å finne valbjørk i veikanter og skogbryn (Martinson 1995).

9.11 Vedens utseende, indre og ytre egenskaper.

Masurveden er lett å kjenne igjen på grunn av den spesielle vedstruktur. Den er som tidligere nevnt et resultat av en arvelig tilvekstforstyrrelse, og bestemmes av flere gener (Martinson 1995). Disse tilvekstforstyrrelser gjør at årringene ikke får en normal utvikling. Nærmere forklart, når treet vokser i diameter, må barkceller dele sig tangentialt hvis barken skal fortsette med å omgi hele stammen. Dette foregår vanligvis jevnt, men hos valbjørka, er barkveksten konsentrert i bestemte partier i barken. Derved oppstår der en strekkbelastning på vedkambiet og det blir dannet små sår, som blir fylt med kallusvev. Denne prosessen danner i sammenheng med luft og

fuktighet de karakteristiske brune tegningene. På grunn av sår dannelsen får vi små innsynkninger i veden. Dette gir årringene et bølget forløp, som igjen uttrykker seg i veden som flammestruktur (Ruden 1954, Martinson 1995, Ås 1996).

Det er ofte vanskelig å skille valbjørk fra vanlig vortebjørk mens trærne er unge. De er ofte 5-6 år gamle før man ser en antydning til masurdannelse (Martinson 1995). I følge Hodnebrog (1996) kan det gå opptil 10 år, før man kan se at treet danner masurved.

Utseendemessig kan vortebjørkstrær variere mye, fra buskvekster til opprette stammer (Raulo 1989, Martinson 1995). Trærne har heller ikke alltid de typiske kjennetegnene, og kan iblant ligne på vanlige vortebjørk., og omvendt er en oppsprukken bark og en knuttete stamme ikke en garanti for at det er en valbjørk (Ruden 1954, Martinson 1995, Jahren 2002).

Men oftest kommer de karakteristiske kjennetegnene, som er vanlige for valbjørk, til uttrykk. Kjennetegnene er:

- Treet er ofte lavere enn normalen, diameteren tatt i betraktning.
- Treet er mer forgreinet og har ofte en krokete og knuttete stamme.
- Vokser den i åpent terreng blir ofte greinene tykkere enn normalt og kronen blir avrunnet.
- Masurveden finnes ofte i større eller mindre partier av treet og greinene, men forekommer oftest i stammens nedre del (Johnson 1974, Martinson 1998).

9.11.1 Typer av masurved.

Masurdannelsen kan variere ganske mye både i form og vedstruktur. Dette kan skyldes arv og miljømessige forhold (Saarino 1976, Martinson 1995). Med den spesifiseringen som er kjent i dag, deles masurveden inn i 4 hovedtyper (Saarino 1976, Raulo 1987, Martinson 1995). Frekvensen av de forskjellige typene kjenner man og mer til i dag (Saarino 1976).

9.11.1.1 Knollmasur.

Den vanligste formen for masurved er knollmasur med en hyppighet på 60 % av den masur som er blitt undersøkt. Den kjennetegnes ved store og små karakteristiske knoller oppover stammen, som gjør at den får et ruglete utseende. Veden inneholder rikelig med masurtegninger (Saarino 1976, Martinson 1995).

9.11.1.2 Halsmasur.

Formen på masurveden ved halsmasur er oval sett ifra siden. Stammen består vekselvis av grovbarkede fortykninger fulgt av et tynnere halsparti mellom hver fortykkelse. Hos eldre trær øker diameter tilveksten i de tynne halspartierne, og de kan etter hvert nesten forsvinne (Raulo 1987). I de tynne partiene mellom fortykningene kan det dannes ved uten masuravtegninger (Saarino 1976).

9.11.1.3 Randmasur.

Masurved av typen randmasur kjennetegnes ved folder i treets lengderetning (Raulo 1987), og den har færre masurtegninger enn de to foregående typene. Randmasur er mer sjelden enn halsmasur (Saarino 1976).

9.11.1.4 Ringmasur.

Ringmasuren har tettstilte ringlignende utsvellinger oppover langs stammen. Denne typen skiller seg ut fra de andre typene, ved at den har hvite og ikke brune masurtegninger. Denne typen kalles gjerne ismasur, og flammebjørk er en kjent variant av ringmasur (Martinson 1995). Forekomsten av ringmasur ligger på unner 2 % av de undersøkte valbjørkene (Saarino 1976).

10. Materiale og metode.

Mikroformering av valbjørk

For å studere mikroformering og spesielt oppformeringen av valbjørk *in vitro* ble to kloner som stammet fra vidt forskjellige områder rent klimatisk og hadde forskjellig stammeform valgt ut. En ønsket å finne ut om det var forskjeller i antall mikroskudd, som ble produsert av de forskjellige klonene samt rotdanningsevnen. De to klonene ble derfor behandlet likt.

10.1 Materiale

To forskjellige mikrokulturer av valbjørkkloner hadde vært dyrket *in vitro* siden mai 01 ble valgt ut som utgangsmateriale.. Den ene klonen stammet fra Halden i Østfold, og den ble gitt benevnelsen HØ5. Klonen stammet fra et enkeltstammet tre, hvis opprinnelige vokseplass låg 95 m.o.h. Den andre klonen kom fra Nord-Odal i Hedmark og hadde fått benevnelsen NH28. Dette var en flerstammet klon, som opprinnelig hadde vokst 180 m.o.h..

Mediet som ble brukt var basert på en modifisert form av WPM-mediet som var tilsatt 9 mg/l adenin hemisulfat, 0.5 mg /l BAP, 20 g/l sukrose (sukker) og agar.

10.2 Metode.

Der ble laget medium i 5 syltetøyglass (volum 250 ml.) til hver klon, og i hvert glass ble det dyrket 8 mikroskudd slik at det ble totalt 40 skudd av hver klon. Etter 3-4 uker ble det høstet mikroskudd fra hvert glass. Åtte skudd fra hvert glass ble flyttet over på nytt medium for videre oppformering. Skuddene ble valgt ut slik at de var like lange, ca 4 cm lange. Hver gang mikroskuddene blir brukt til oppformering ble alle blad og toppskuddet skåret bort og stengelen ble lagt horisontalt på det nye mediet.

De resterende mikroskuddene som var lengre enn 2.5 cm ble registrert og skuddene ble priklet ut i brett (140stk/brett). Før skuddene ble priklet ble de dyppet i et rotdanningshormon Seradix (pink), hvor det aktive stoff var IBA. Seradix (pink) er beregnet for urteaktige planter. Grunnen til at denne type Seradix ble brukt og ikke Seradix (grå) som er beregnet for treaktige planteslag, var at mikroskuddene var mer urteaktige en treaktige på prikletidspunktet. Der ble brukt fuktig jord, en blanding av gartnermull og perlitte i forholdet 4:1. Mikroskuddene ble hele tiden holdt fuktige i vannbad til de ble dyppet i rotdanningshormonet. Etter priklingen ble de med jevne mellomrom sprayet med en vannforstøver inntil de ble flyttet ut i plastteltet i veksthuset.

Brettene med de priklete plantene ble plassert i veksthus med følgende klimaforhold, dagtemperatur 20 °C, nattemperatur 18 °C og med en daglengde på 18 timer. Lyset som ble brukt var en kombinasjon av det naturlige sdagslyset og lys fra HPI- og SON-T-lamper. Plantebrettene ble plassert under en hvit plastduk for å holde på fuktigheten. De ble daglig sprayet med en vannforstøver for å unngå uttørking. Når de priklete plantene hadde dannet det første nye bladparet, ble de plantet om til nye brett med 77 stk/brett og plastikkduken ble gradvis fjernet. Ved ompotting ble rotdanningsprosenten registrert.

Bjørkeplantene ble seinere pottet fra brett til 8 cm pottet og overført til et vanlig veksthus for å gjøre dem klare til å komme over på friland.



Fig. 38. Bjørkekultur på medium med glukose. Bladene tetttest på mediet er blitt mørkere og mer stive.

11. Resultater.

11.1. 1. Oppformering.

Tabell. 3. Total produksjon av mikroskudd >2.5 cm for klon HØ5 og NH28 ved 1.oppformering

Glass nr.	Klon	Ant. skudd	Ikke rot	Rot	Rotdannings %
1	HØ5	50	2	48	96
2		52	0	52	100
3		89	8	81	91
4		60	1	59	98
5		32	3	29	90
6	NH28	69	0	69	100
7		64	4	60	94
8		32	3	29	91
9		70	5	65	93
10		79	4	75	94

Tabell. 3. viser resultatene for alle kulturer: Totalt ble det dannet 597 mikroskudd og 567 av skuddene dannet rot. Dette gir en total rotdanningsprosent på 95 %. Dette betyr at hver stengel har i gjennomsnitt produsert 7,46 mikroskudd og 7,09 av mikroskuddene har dannet rot.

HØ5 produserte 283 mikroskudd, av disse dannet 263 røtter. Dette gir en rotdanningsprosent på 92,9 %. I gjennomsnitt produserte klonen 7,08 mikroskudd pr. stengel og 6,58 mikroskudd dannet rot.

NH28 produserte 314 mikroskudd, og 298 dannet rot. Rotdanningsprosenten ble 94,9 % I gjennomsnitt produserte NH28 produsert 7,85 mikroskudd pr. stengel, og 7,45 dannet rot.

Evnen til å produsere mikroskudd.

Ved 1. overføring hadde HØ5-klonen produsert 283 skudd og NH28- 314 skudd. Dette gir en prosentvis forskjell på $314-283=31$. $31/314 = 0,099$. NH28-klonen produserte ved dette tidspunkt 9,9% flere mikroskudd enn HØ5.

Evnen til å danne rot.

HØ5 produserte 6,58 rotede planter/stengel, mens NH28 produserte 7,45/stengel. ($7,45-6,58 = 0,87$. $0,87/7,45 = 0,132$). M.a.o. NH28 produserte 13,2 % flere rotede planter enn HØ5.

11.3.2 2. Oppformering.

Tabell 4. Total produksjon av mikroskudd > 2.5cm for klon HØ5 og NH28 ved 2. oppformering

Glass nr.	Klon	Ant. skudd	Ikke rot	Rot	Rotdannings %
1	HØ5	10	2	8	80
2		23	8	15	65
3		11	1	10	91
4		7	0	7	100
5		18	2	16	89
6	NH28	10	1	10	90
7		30	1	29	97
8		19	5	14	74
9		15	1	14	93
10		2	0	2	100

Totalt ble 145 mikroskudd > 2.5 cm dannet og 125 av skuddene dannet rot. Dette gir en total rotdanningsprosent på 86 %. Hver stengel som ble lagt på medium, har i gj.snitt produsert 1,81 mikroskudd og 1,56 mikroskudd som dannet rot.

HØ5 produserte 69 mikroskudd, ut av disse dannet 56 rot. Dette gir en rotdannings prosent på 81 %. I gjennomsnitt har denne klon produsert 1,73 mikroskudd pr. stengel og 1,4 mikroskudd som har dannet rot.

NH28 produserte 76 mikroskudd, og av disse dannet 69 rot.
Rotdanningsprosenten blir 90,1 % I gj.snitt har hver stengel av NH28 klonen produsert 1,90 mikroskudd/stengel, og hver stengel har gitt 1,7 rotete planter.

Evnen til å produsere mikroskudd.

HØ5-klonen har produsert 69 skudd og NH28-klonen 76 skudd. Dette gir en prosentvis forskjell på $76-69=7$. $7/76 = 0,092$). NH28-klonen har produsert 9,2% flere mikroskudd enn HØ5.

Evnen til å danne rot.

HØ5-klonen produserer 56 rotete planter, og NH28-klonen produserer 69. $(1,4-1,7 = 0,3$. $0,3/1,4 = 0,214$). NH28 produserer 21,4 % flere rotete planter enn HØ5.

11.3.3 3. Oppformering.

Tabell. 5. Total produksjon av mikroskudd > 2.5 cm for klon HØ5 og NH28 ved 3. oppformering

Glass nr.	Klon	Ant. skudd	Ikke rot	Rot	Rotdannings %
1	HØ5	20			
2		49			
3		16			
4		22			
5		18			
6	NH28	49			
7		25			
8		24			
9		36			
10		Infeksjon			

Totalt ble det dannet 259 mikroskudd. Hver stengel som ble lagt på medium, har i gjennomsnitt produsert 3,24 mikroskudd.

HØ5: 125 mikroskudd. I gjennomsnitt har denne klonen produsert 3,13 mikroskudd pr. stengel.

NH28: Produserte 134 mikroskudd. I gjennomsnitt har denne klon 3,35 mikroskudd pr. stengel.

Evnen til å produsere mikroskudd.

HØ5-klonen har produsert 125 skudd og NH28-klonen 134 skudd. Dette gir en prosentvis forskjell på $(134 - 125) / 125 = 0,072$. NH28-klonen har produsert 7,2% flere mikroskudd enn HØ5.

* Da der var infeksjon i et glass legges til gj.snitt for de andre glassene.

Mikroskuddproduksjon.

NH28-klonen som kommer fra et flerstammet tre produserte gjennomgående flere mikroskudd enn HØ5 som kommer fra et enkelt stammet tre.

Ved 1. oppformering produserte NH28 9,9 % flere mikroskudd enn HØ5.

Ved 2. oppformering produserte NH28 9,2 % flere mikroskudd enn HØ5.

Ved 3. oppformering produserte NH28 25,1 % flere mikroskudd enn HØ5.

Rotdanningsevne.

Evnen til å danne rot.

Den rotdanningsprosent som er oppnått i forsøket kan ses i tabell nr. 6.

Tabell. 6. Rotdanningsprosent for klon HØ5 og NH28 i de forskjellige oppformeringene.

Oppformering nr.	Klon	Rotdannings %
1	HØ5	92,9
1	NH28	94,9
2	HØ5	81,0
2	NH28	90,1

Hvis det taes utgangspunkt i antallet mikroskudd produsert og rotdanningsprosenten er det også NH28-klonen som har størst succesrate.

1. prikling hadde NH28 en høyere rotdanningsprosent på 13,2 % enn HØ5.
2. prikling hadde NH28 en høyere rotdanningsprosent på 21,4 % enn HØ5.

12. Diskusjon Bjørk.

12.1 Evne til å produsere mikroskudd.

Antallet mikroskudd som blev produsert ved første oppformering lå en hel del høyere med 7.08 mikroskudd pr. stengel for HØ5 og 7.85 mikroskudd for NH28 ved 1. oppformering enn det Durkovic (1997) oppnådde med 7.8 mikroskudd > 3 mm pr. stengel. Men kun 1 mikroskudd pr. stengel > 15 mm. I mine forsøk var alle mikroskudd som blev tatt fra til rotning minst 25 mm i lengde ettersom finske forsøk tidligere hadde vist at 25 mm var minimum lengden for å sikre en tilfredsstillende rotdanning (Ryynänen & Ryynänen 1987). Andre oppformeringen med en produksjon på 1.73 mikroskudd for HØ5 sitt vedkommende og 1.9 for NH28 låg derimot litt under de produksjonstall Durkovic (1997) kom frem til. Det ble brukt et nesten identisk WPM-medium av Durkovic, med 0.5 mg/l. BAP men uten adenin. Oldrich (1991) brukte og WPM-medium med 0.5 mg/l. BAP uten adenin. Han rapporterer 2,9 mikroskudd pr vekstpunkt etter 12-14 uker, men hvor store disse mikroskuddene var ble det ikke opplyst om.

Hvordan skal den kraftige nedgangen i mikroskuddproduksjonen fra første til andre oppformering forklares? Der er flere mulige årsaker og nedgangen kan skyldes en kombinasjon av dem.

12.1.1 Mulige årsaker til nedgangen i skuddproduksjonen.

Medium.

Det er mulig at en eller annen ingrediens er blitt glemt da mediet ble laget og at dette har innvirket på veksten i kulturene.

Mediet som ble brukt inneholdt sukker som energikilde, men i den opprinnelige oppskriften, den som tidligere hadde blitt brukt for bjørk på Plantecellelaboratoriet var glukose ført opp som energikilde. Det er mulig at det på et tidspunkt er blitt brukt medium med glukose i bjørkekulturene før de ble en del av denne oppgaven, men det er også usikkert om glukose er brukt i det hele tatt. Det kan tenkes at det er nødvendig å bruke medium som inneholder glukose med jevne mellomrom for at kulturens vitalitet skal vedlikeholdes. Til 3. overføring ble det laget et medium med glukose i stedet for sukker og mikroskuddene lagt på dette mediet. Mikroskuddproduksjonen økte sterkt. HØ5 hadde en øking på 81 % og NH28 økte 76 %, til tross for at en femtedel av kulturene var infiserte. Bruk av glukose ga en øking i mikroskuddproduksjonen men samtidig såg det ut som om skuddene begynte å bli vitrifisert.

Lys.

Mikrokulturene blev rett før påske flyttet til en annen hylle i vekststrømmet da der var gått et lysstoffrør på den hylle der de stod. Det jeg ikke var oppmerksom på var, at den hylle kulturene kom over på hadde en lysintensitet på $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, hvilket er det dobbelte i forhold til hva de skulle ha. Feilen ble først oppdaget etter 2 uker, og kulturene ble da flyttet tilbake til $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Overføring.

I 2. oppformeringen ble kulturene ikke overført til nytt medium midt i vekstperioden, som de ble i 1. oppformering. Derved ble der heller ikke skjert bort kallus, hvilket der ble gjort i forbindelse med overføringen i 1. oppformering. Dette kan og være en forklaring på den voldsomme nedgang i produksjonen av mikroskudd.

12.2 Rotdanningssevne.

12.2.1 Rotningsprosent og størrelse på mikroskudd.

Oldrich (1991) fikk en rotdanningsprosent på 25 % av alle mikroskudd etter 12-14 uker, ved bruk av et WPM rotdanningsmedium, men det er ikke opplyst om størrelse på mikroskuddene i artikkelen. I vekststrømmet der de kulturene ble dyrket ble temperaturen holdt på 24 C° om dagen og 19 C° om natten. Det ble gitt 16 timer dag med lys fra kallhvite lysstoffrør og en lysintensitet på 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Durkovic (1997) som også brukte WPM med halv konsentrasjon av næringsstoffene som rotningsmedium, oppnådde forskjellige rotningsprosenter avhengig av størrelsen på mikroskuddene. Men rotdanningsprosenten var ca 82 % etter 25-30 dager, når det ble brukt mikroskudd med en lengde > 15 mm.. Han fant og frem til at var mikroskuddene < 6 mm i lengde ville man få en lav rotdanningsprosent, helt ned til i underkant av 30 % etter 40 dager. Derfor bør mikroskudd under 6 mm ikke brukes til rotdanning og det videre arbeidet med å produsere ferdige planter.

I Finland har Ryynänen & Ryynänen (1986) og gjort et forsøk på valbjørk. De har ikke noen tall som viser deres rotdanningsprosent. Men de kommer med noen retningslinjer for hvilken størrelse mikroskuddene må for at man skal få en tilfredsstillende rotdanning. Den optimale lengde på skuddene når de kommer på rotdanningsmedium skal være 30-50 med mer. De fikk ingen rotning hvis skuddene var kortere enn 25 mm. Sett i lyset av de rotdanningsprosenter andre har oppnådd, henger dette godt sammen med de resultater jeg oppnådde. Kort sagt, lange mikroskudd gir høy rotdanningsprosent.

12.2.2 Metode for rotdanning.

Der er ikke blitt brukt samme metoder for rotdanning. I mine forsøk ble ikke rotdanningsmedium brukt i det hele tatt, i stedet mikroskuddene ble høstet etter oppformering og priklet direkte ut i jord. For å fremme rotdanningen ble mikroskuddene dyppet i seradix, som inneholdt IBA som aktivt stoff. Brettene med

de priklete mikroskuddene ble plassert under plast i veksthus, for å holde en høy luftfuktighet, så skuddene ikke tørket ut.

Oldrich (1991) brukte samme medium til oppformering som til rotdanning, et WPM-medium som jeg men uten adenin.

Durkovic (1997) brukte og et rotningsmedium basert på et WPM- medium, men med halv konsentrasjon av $\text{Ca}(\text{NO}_3)$, samt 0,5 mg/l BAP og 0,1 mg/l NAA.

Ryynänen & Ryynänen (1986) brukte et MS-medium i sine forsøk, med halv og hel konsentrasjon av næringsstoffene og det var ikke tilsatt noen vekst regulatorer.

Brukes det rotdanningsmedium eller blir skuddene flyttet direkte fra oppformeringen til jord, spiller trolig ikke noen annen rolle enn at oppformeringen blir billigere ved direkte prikling, når begge metodene gir så høye rotningsprosent.

13. Konklusjon Del B.

Det har ikke vært problematisk å få oppformeringen til å lykkes på de 2 valbjørkklonene. Det blir straks lettere å lykkes når man på forhånd veit hvilken behandling kulturene skal ha for å lykkes.

Resultatene viser, at det er forskjeller på evnen til å produsere mikroskudd og danne rot på de to forskjellige klonene som ble brukt. Det er ikke mulig å fastslå om forskjellen skyldes stammeantallet på mortræet, eller om evnen til å produsere mikroskudd ikke er forbundet med antallet av stammer på morplanten. Hvis noen flere forskjellige bjørkekloner ble undersøkt ville man med større sikkerhet kunne se om det var sammenheng mellom stammeantallet på morplanten og evnen til å danne mikroskudd.

Bytte av energikilde fra sukker til glukose ser ut til å virke forfriskende på valbjørkkulturene, men de skal ikke dyrkes på medium med glukose alt for lenge, for da begynner kulturene å bli vitrifiede.

Rotdanningsmetoden med direkte fra oppformering til jord ser ut til å gi en minst like så god rotdanningsprosent, som når rotdanningsmedium blir brukt.

Mikroskuddenes lengde har og en stor betydning for hvor høy rotdanningsprosenten blir. Har mikroskuddene ikke en minimumslengde på minst 25 mm blir rotdanningsprosenten lav.

14. Samlet konklusjon.

Mikroformering av treaktige planter er ikke noen kunst, man skal bare kjenne de metoder, ingredienser og den behandling det enkelte treslag skal ha. Det er viktig for en kommersiell produksjon. Resultatene i oppgaven viser dette tydelig. Del A om lønn handler om oppstart - etablering - av en kultur, og det er den vanskeligste fasen av mikroformeringen sammen med rotdanningen. Del B om bjørk viser at oppformeringsdelen ikke er tilnærmelsesvis så vanskelig som kulturoppstarten. Alt blir lettere når det finnes en "kokebok" man kan følge fra start til slutt. Det viktigste her er at være nøye med hygienen når man jobber med kulturene og lager medium.



Fig. 39. Forskjellige trin fra oppformering til ferdig plante.

Litteraturliste.

- Aarnes, H. 2000. Forelæsningsnotater i plante anatomi. UIO Biologisk institutt avd. botanikk og plantefysiologi.
- Almgren, G. 1990. Lövskog – björk, asp och al i skogsbruk och naturvård. Skogstyrelsen, Jönköping. 261s.
- Anderson, W.C. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture: Part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25:129-135.
- Bechsgaard, A. & Larsen, P.V. 1997. Masurbirk i Norge og Finland – og i Danmark. Skoven 5/1997: 246-248.
- Berg, P.Ø. 1996. Kresne kunder kjøper valbjørk. Norsk landbruk 115(7): 54-56.
- Bon, M., Gendraud, C.M. og Franclet, A.1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: Influence of activated charcoal. Science Horticulturae. 34:283-291.
- Bonga, J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. I: J.M. Bonga og D.J. Durzan (eds.), Tissue culture in forestry. s. 387-412.
- Braastad, H, Bunkholm, A.A., Huse K.J, Næss R.M., Pettersen J, & Risdal, M.. 1998. Skjøtsel av lauvskog. Skogbrukets kursinstitutt, Biri. 64s.
- Brattås, A. 1994. Effekt av lys på invitro-formering av *Quercus rubor* L. Hovedfagsoppgave ved Norges Landbrukshøgskole, Institutt for plantefag. 52 s.
- Brown, C.L. & Sommer, H.E. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. I: J.M. Bonga og D.J. Durzan (eds). Tissue culture in forestry. s. 109-149.

- Børset, O. 1985. Skogskjøtsel I.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Commun. Inst. For. Cech. 13:7-39.
- Chalupa, V. 1987. European hardwoods. 1: J.M. Bonga (eds). Tissue culture in forestry s. 224-246.
- Coombes, A..J. 2000. Trær i farver. Politikens Forlag. Copenhagen. s. 84, 96, 99, 116.
- Durkovic, J.1997. Shoot proliferation of curly birch (*Betula pendula* var. *carelica*) in vitro depends on the explant type. Biologia, Bratislava 52/1: 79-83.
- Economou, A.S. & Read, P.E. 1981. Effect of benzyladenine, kinetin, and 2-isopentenyladenine on in vitro shoot formation of hardy deciduous Aales. Proceedings of the plant growth regulator society of America. 8:8-14.
- Ettinger, T.L. & J.E. Preece, 1985. Aseptic micropropagation of *Rhododendron* P.J.M. hybrids. J. Hort. Sci. 60:269-274.
- Ewald, D. Naujoks, G. & Piegert, H. 2000. Performance and Wood Quality of in Vitro Propagated Hybrid Curly Birch (*Betula pendula* x *Betula pendula* var. *carelica* sok.) Clones. Silvae Genetica 49,2 (2000).
- Fridbord, G. Pedersen, M. Landstrøm, L.E. & Erikson, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant. 43:104-106.
- Frivold, L.H. 1994. Trær i kultur landskapet. Landbruksforlaget. Oslo.224s.
- George, E.F. & Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern press. s. 125-130, 161-173, 284, 298, 302, 324, 379.

- Hansen, O.B. 1985. Formering med stiklinger. Inst. For dendrologi og planteskoledrift, Ås-NLH. s. 7-9,50,57,61.
- Hansen, O.B. 1997. Planteformering. Inst. For dendrologi og planteskoledrift, Ås-NLH. s. 4-8.
- Heikinheimo, O. 1940. Om odling av masurbjörk. Skogen 27: 165-167.
- Hernández, I, Celestino, C. & Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. 1. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. Plant Cell reports, published online.
- Hodnebrog, T. 1996. Utvalg av kloner av valbjørk (*Betula pendula f. carelica*). (Selection of clones of curly birch (*Betula pendula f. carelica*)). Norsk landbruksforskning 10: 101-106.
- Hoffmann, E. 1959. Der Ahorn. Veb Deutscher Landwirtschaftsverlag. s. 15, 19, 24-26, 52-56, 63, 69.
- Huetteman, C.A. & Preece J.E. 1993: Thidiazuron-A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant cell tissue and organ culture 33:105-119.
- Hvoslef-Eide, T, Melby, T & Skjeseth, G. 2004. Mikroformering av planter. Inst, for plante- og miljøvitenskap, Ås-NLH.
- Jahren, I. 2002. Finsk valbjørk i verditoppen. Skogeieren. 10(14): 30
- Jahren, I. 2000. Vokser mot store verdier. Skogeieren 8 (14):
- Johnsson, H. 1974. Genetiv characteristics of *Betula verrucosa* Ehrh. And *Betula Pupescens* Ehrh. (Genetske oznake vrsta *Betula varrucosa* Ehrh. And *Betula ‘Pupescens* Ehrh.) Annales Forestales 6(4): 91-150.

- Johnson, H. 1951. Avkommor av masurbjörk. Svenska skogsvårdföreningens tidskrift 49: 34-45.
- Krüssmann, G. 1981. Die Baumschule. Verlag Paul Parey. s. 350-354.
- Lundstad, A. 1982. Planteskoleproduksjon. Kompendium, NLH-Ås s. 46.
- Lamb, J.G.D. & Nutty, F.J. 1983. Propagation techniques in the genus acer. The Plantsman. 5:186-192.
- Lane, W.D, 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. Plant Sci. Lett. 13:281-285.
- Larsen, C. Muhle. 1940. Masurbirk. Dansk skovforenings tidsskrift 24: 33-72.
- Martinson, O. 1998. Masurbjörk – odling, production, virkesanvändning. Arbetsrapporter 150. Institut for skogskötsel. Umeå 2000 22s.
- Martinson, O. 1995. Odlingsforsøk - en outveklad nisch för svensk skogsbruk. Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för skogskötsel, arbetsrapport 85. 15s.
- McCown, G. & Lloyd, B. 1981. Woody plant medium (WPM) – A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. Hort. Science. 16:453 (Abst. 394).
- Mitchell, A. 1977. Trær i skog og hage. Tiden Norsk Forlag. S. 331-334.
- Murthy, B.M.S, Murch, S.J, & Saxena, P.K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In vitro cellular & developmental biology-plant 34:267-275.

- Møller, C.M. 1977. Vore skovtræarter og deres dyrkning.
- Oldrich, D. 1991. In vitro regeneration of Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*. Thaiszia, kosice, 1:119-124.
- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M., Elias, A.A. Stiekema, O.T.J. & A.A. Van Der Velde. 1988. Vegetative propagation of *Syringa vulgaris* L. in vitro. *Acta Hort.* 78:437-442.
- Quoirin, M & Lepoivre, P. 1977. Etude du milieux adaptes aux cultures in vitro da prunus. *Acta Hort.* 78:437-442.
- Raulo, J. 1987. Björkboken. Den svenske Skogstyrelsen. Jönköping 87s
- Radojevic, L. Druart, P. & Boxus, Ph. 1987. Vegetative propagation of androgenous embryos of horse chestnut by meristem culture *in vitro*. *Acta Hort.* 212:531-537.
- Rahman, M.A. & Blake, J. 1988. Factors affecting in vitro proliferation and rooting of shoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) Plant cell, tissue and organ culture. 13:179-187.
- Read, P.E., Garton, S. Loouis K.A. & Zimmermann, E.S. 1982. In vitro propagation of species for bioenergy plantations. 1: A. Fujiwara, plant tissue culture. 5th Int. cong. Of Plant Tissue and Cell Culture. s. 757-758.
- Rohr, R. & Hanus, D. 1987. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. *Can. J. Forest Research.* 17:418-420.
- Ruden, T. 1954. Om valbjørk og en del andre unormale veddannelser hos bjørk. (On speckled birch ("Mazer-birch) and some other forms of curled birch). *Meddelser fra Det norske skogforsøksvesen* 12: 451-505.
- Ryynänen, L. & Ryynänen M. 1986. Propagation of adult curly-birch succeeds with

tissue culture. Silva Fennica vol. 20, no. 2, 139-147.

Saarino, R. 1976, Viljetyjen visakoivikkoiden laatu ja kehitys etelä-suomessa. (The quality and development of cultivated curly birch (*Betula verrucosa* f. *carelica* Sok.) stands in southern Finland.) Folia forestalia 263. 28s.

Saveen 2003-2005: Biochemicals plantcell and tissue culture (produktkatalog).

Sjøborg, S. & Edissen, H. 1982. Norsk Hageleksikon. Det beste. s. 13-16.

Spetmann, W. 1982. Stecklingsvermehrung von Laubbaumarten. Deutscher Gartenbau. 36:42-47.

Vieitez, A.M, Concepción Sánchez, M, Amo-Marco, J.B, & Ballester, A.1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 37: 287-295.

Weatherhead, M.A., Burdon, J. Henshaw, G.G. 1979. Effect of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media: Part 2. Z. Pflanzphysiol. 94:399-405.

Ås, S.M. 1996. Vevsformering av hengebjørk og valbjørk. NLH-Ås

Nettadresser:

Plantekassen@dk).

Teknologisk institutt@dk

Vedleggsliste

- A. Registreringsskemaer: WPM + TDZ 10^{-6} . Normal kvist.
- B. Registreringsskemaer: WPM + TDZ 10^{-6} . Ung kvist.
- C. Registreringsskemaer: WPM + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Normal kvist.
- D. Registreringsskemaer: WPM + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$. Ung kvist.
- E. Registreringsskemaer: WPM + TDZ $5 \cdot 10^{-7}$. Ung kvist.
- F. Registreringsskemaer: AM 10^{-5} . Normal kvist.
- G. Registreringsskemaer: AM 10^{-6} . Normal kvist.
- H. Registreringsskemaer: AM 10^{-6} . Ung kvist.
- I. Registreringsskemaer: AM $5 \cdot 10^{-7}$. Ung kvist.
- J. Registreringsskemaer: MS + TDZ. Normal kvist.
- K. Registreringsskemaer: MS + TDZ. Ung kvist.
- L. Registreringsskemaer: MS + TDZ. ¼-03 kvist.
- M. Registreringsskemaer: MS + kinetin. Ung kvist.
- N. Registreringsskemaer: MS + kinetin. ¼-03 kvist.

Vedlegg I.

Medium: WPM + TDZ 10^{-6}

Plantemateriale: Normal kvist

Forsøk nr 1.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/02-03	∞,O	7	1	1	5	16/03-03	callus red.	4
					4	26/03-03	callus red.	2
				1*	2	11/04-03	gen.gang	1
				1	1	16/04-03	callusred.	0

*callus overvokset.

Forsøk nr 2.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/02-03	Ü	6	2	1	3	16/03-03	callus red.	2
					2	26/03-03	callus red.	2
				1*	2	11/04-03	gen.gang	1
					1	16/04-03	callusred.	1
					1	25/04-03	callusred.	1
				1	1	12/05-03	gen.gang	0

* callus overvokset

Forsøk nr 3.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
05/02-03	Ki.bær	14	1	1	12	16/03-03	callus red.	5
					5	26/03-03	callus red.	3
			1	1	3	11/04-03	gen.gang	1
					1	16/04-03	callusred.	1
					1	25/04-03	callusred.	1
				1	1	12/05-03	gen.gang	0

Forsøk nr 4.

Registreringsskema.

Dato	Merke*	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/03-03	II	11	1	1	9	26/03-03	callus red,	9
				4(2**)	9	11/04-03	gen.gang	5
					5	16/04-03	callusred.	3
				1	3	25/04-03	callusred.	2
				2**	2	12/05-03	gen/callus	0

* Er feilmerket som AM og ikke WPM. ** callus overvokset.

Vedlegg II.

Medium: WPM 10⁻⁶

Plantemateriale: Ung kvist

Forsøk nr 5.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/03-03	S	9	1	2	6	26/03-03	Callus red.	4
					4	11/04-03	gen.gang	4
					4	16/04-03	callusred	4
					4	25/04-03	callusred.	3
				2*	3	12/05-03	callusred.	1
				1	1	28/05-03	callusred.	0

Forsøk nr 6.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
18/03-03	Z	12	1	5	5	26/03-03	callus red.	6
					6	11/04-03	gen.gang	6
					6	16/04-03	callusred.	4
					4	25/04-03	callusred.	4
				2	4	12/05-03	callusred.	2
				2 1*	2	28/05-03	callusred.	0

Vedlegg III.

Medium: WPM + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$

Plantemateriale: Normal kvist.

Forsøk nr 7.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
03/02-03	▽	5	1	2	2	14/03-03	callus red.	1
					1	26/03-03	callus red.	1
				1	1	11/04-03	gen.gang	0

Forsøk nr 8.

Registreringsskema

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/02-03	∞+	9	0	0	9	16/03-03	callus red.	8
					8	26/03-03	callus red.	5
				4 (3*)	1	11/04-03	gen.gang.	1
					1	16/04-03	callusred.	0

* callus overvokset

Forsøk nr 9.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/02-03	Ü	7	1	0	6	14/03-03	callus red.	6
					6	26/03-03	callus red.	2
				2*	2	11/04-03	gen.gang	0

* callus overvokset

Forsøk nr 10.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/02-03	X^O	18	0	7	11	14/03-03	callus red.	8
					8	26/03-03	callus red.	3
				3*	3	11/04-03	gen.gang.	0

* callus overvokset.

Vedlegg IV.

Medium: WPM + TDZ $5 \cdot 10^{-6}$

Plantemateriale: Ungt plantemateriale.

Forsøk nr 11.

Registreringsskema

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
18/03-03	Z	12	1	1	10	26/03-03	callus red.	6
				1	6	11/04-03	gen.gang	5
					5	11/04-03	fenol	5
					5	16/04-03	callusred.	5
				1	5	25/04-03	callusred.	4
					4	12/05-03	callusred.	4
					4	28/05-03	callusred.	4
					4	14/06-03	callusred.	4
					4	13/08-03	callusred.	4
					4	25/08-03	callusred.	4
				1	4	18/09-03	callusred.	3
				1	3	25/09-03	callusred.	2
					2	08/10-03	callusred.	2*
					2	23/10-03	callusred.	2
					2	13/11-03	callusred.	2
					2	27/11-03	callusred.	2
					2	19/12-03	callusred.	2
					2	12/01-04	callusred.	2
				1	1	26/01-04	callusred.	1
					1	04/02-04	callusred.	1
					1	23/02-04	callusred.	1
					1	03/03-04	callusred.	1
					1	11/03-04	callusred.	1
					1	22/03-04	callusred.	1
					1	07/04-04	callusred.	1
					1	21/04-04	callusred.	1
4. Mai 04 Forsøk avsluttes, ingen tegn på strekningsvekst vil komme.								

En sat under rødtlys for at stimulere høydevæksten.

Vedlegg V.

Medium: WPM 5*10⁻⁷

Plantemateriale: Ungt plantemateriale

Forsøk nr 12.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/03-03	S	10	2	1	7	26/03-03	Callus red.	5
				2*	5	11/04-03	gen.gang	3
					3	16/04-03	callused.	2**
					2	25/04-03	callused.	2
					2	12/05-03	callused.	2
				1*	2	28/05-03	callused.***	1
					1	14/06-03	callused.	1
					1	13/08-03	callused.	1
					1	25/08-03	callused.	1
					1	18/9-03	callused.	0

* callus overvokset. ** overført til wpm 5 10-6 *** ført tilbake på opprinneli medium.

Vedlegg VI.

Medium: AM 10⁻⁵

Plantemateriale: Normal kvist

Forsøk nr 13.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
10/02-03	X	25	0	15	10	14/03-03	callus red.*	7
					7	26/03-03	callus red	2
				2	2	11/04-03	gen.gang	0

Eft. callus red.overført til AM 10⁻⁶.

Forsøk nr 14.

Registreringsskema

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/03-03	I	15	0	5	10	26/03-03	callus red.	7
				2	7	11/04-03	gen.gang	5
					5	16/04-03	callusred.	5
				2	5	25/04-03	callusred.	3
				3*	3	12/05-03	callusred.	0

Vedlegg VII.

Medium: AM10⁻⁶

Plantemateriale: Normal kvist

Forsøk nr 15.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
11/02-03	stjrn	20	1	4	15	16/03-03	callus red.	11
					11	26/3-03	callus red.	5
				1	5	11/04-03	gen.gang	4
					4	16/04-03	callusred.	2
					2	25/04-03	callusred.	2
				2*	2	12/05-03	callusred.	0

*callus overvokset

Forsøk nr 16.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
04/03-03	I	5	0	1	4	26/03-03	callus red.	4
					4	11/04-03	gen.gang	4
					4	16/04-03	callusred.	2
				1	2	25/04-03	callusred.	1
				1*	1	12/05-03	callusred	0

*callus overvokset

Vedlegg IIX.

Medium: AM10⁻⁶

Plantemateriale: Ungt plantemateriale.

Forsøk nr 17.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/03-03	S	10	0	1	9	26/03-03	callus red.	8
				1	8	11/04-03	gen.gang	7
					7	16/04-03	callusred.	5
					5	25/04-03	callusred.	5
					5	12/05-03	callusred.	5
				5	5	28/05-03	callusred.	0

Forsøk nr 18.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
18/03-03	Z	12	0	3	9	26/03-03	callus red.	8
					8	11/04-03	gen.gang	8
					8	16/04-03	callusred.	7
				2*	7	25/04-03	callusred.	5
				3 2*	5	12/05-03	callusred.	2
					2	28/05-03	callusred.	2
				1*	2	14/06-03	callusred.	1
				1	1	13/08-03	callusred.	0

Vedlegg IX.

Medium: AM 5*10⁻⁷

Plantemateriale: Ungt plantemateriale.

Forsøk nr 19.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
06/03-03	S	10	3	1	6	26/03-03	Callus red.	6
					6	11/04-03	gen.gang	6
					6	16/04-03	callusred.	5
					5	25/04-03	callusred.	5
				5 3*	5	12/04-03	callusred.	0

Forsøk nr 20.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
18/03-03	Z	16	0	6	10	24/03-03	fenol flyt.	10
				1*	10	11/04-03	gen.gang	9
					9	16/04-03	callusred.	8
				1	8	25/04-03	callusred.	7
					7	12/05-03	callusred.	7
				5 3*	7	28/05-03	callusred.	2
				1*	2	14/06-03	callusred.	1
					1	13/08-03	callusred.	0

* callus overvokset.

Vedlegg X.

Murashige & Skoog medium

Medium: MS + TDZ

Plantemateriale: Normal kvist

Forsøk nr 21 med kull.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YTG*	10	3	2	5	25/04-03	gen.gang	5
				1	5	12/05-03	callusred.	4
				1**	4	29/05-03	callusred.	3
				1	3	14/06-03	callusred.	2
				2	2	13/08-03	callusred.	0

Forsøk nr 22 uten kull.

Registreringsskema

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YTG	10			10	16/04-03	fenolflyt.	10
			6	1	10	25/04-03	gen.gang	3
					3	12/05-03	callusred.	1
					1	29/05-03	callusred.	1
					1	14/06-03	callusred.	1
				1	1	13/08-03	callusred.	0

Vedlegg XI.

Medium: MS+ TDZ 10^{-6}

Plantemateriale: Ungt plantemateriale

Forsøk 23 med aktivt kull.

Registreringsskema.

Dato*	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
08/04-03	XX	10	1		9	25/04-03	gen.gang	9
				1	9	15/05-03	callusred.	8
					8	29/05-03	callusred.	8
					8	14/06-03	callusred.	8
				2**	8	13/08-03	callusred.	6
				2	6	25/08-03	callusred.	4
	*1				4	18/09-03	callusred.	4
					4	29/09-03	callusred.	4
				1	4	08/10-03	callusred.	3
					3	23/10-03	callusred.	3
				1	3	13/11-03	callusred.	2
					2	27/11-03	callusred	2
				1	1	19/12-03	callusred	1
					1	12/01-04	callusred	1
					1	26/01-04	callusred	1
					1	04/02-04	callusred	1
				1	1	23/02-04	callusred	0

*med kull ** gul bakterie *1 overført til medium uten kull

Forsøk 24 uten aktivt kull.

Registreringsskema .

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
08/04-03	XX	10			10		fenolflyt.	10
					10	16/04-03		
					10	25/04-03	gen.gang	10
				1*	10	15/05-03	callusred.	9
				1*	9	29/05-03	callusred.	8
				4*	8	14/06-03	callusred.	4
				3	4	13/08-03	callusred.	1
					1	25/08-03	callusred.	1
				1	1	18/09-03	callusred.	0

*callus overvokset

Vedlegg XII.**Medium:** MS+ TDZ 10^{-6} **Plantemateriale:** ¼ Materiale.**Forsøk 25 med aktivt kull.**

Registreringsskema.

2003.

Dato*	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
08/04-03	X	10			10	24/04-03	gen.gang	10
				1	10	15/05-03	callusred.	9
					9	29/05-03	callusred.	9
					9	14/06-03	callusred.	9
				2	9	13/08-03	callusred.	7
					7	25/08-03	callusred.	7
	*1				7	18/09-03	callusred.	7
				3	7	25/09-03	callusred.	4
				1	4	08/10-03	callusred.	3**
					3	23/10-03	callusred.	3
				1	3	13/11-03	callusred.	2
				1	2	27/11-03	callusred	1
					1	19/12-03	callusred	1

2004.

Dato*	Merk	Antal	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
	X				1	12/01-04	callusred	1
					1	26/01-04	callusred	1
					1	04/02-04	callusred	1
					1	23/02-04	callusred	1
					1	03/03-04	callusred	1
					1	11/03-04	callusred	1
					1	22/03-04	callusred	1
					1	07/04-04	callusred	1
					1	21/04-04	callusred	1

4. Mai 04 Forsøk avsluttes, ingen tegn på strekningsvekst vil komme.

*med kull ** en sat under rødt lys for at stimulere høydevækst. *1 overført til medium uten kull

Forsøk 26 uten aktivt kull..

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
08/04-03	X	10				16/04-03	fenolflyt.	10
			1		10	25/04-03	gen.gang	9
				2*	9	15/05-03	callusred.	7
				2,1*	7	29/05-03	callusred.	5
				3,2*	5	14/06-03	callusred.	2
				2	2	13/08-03	callusred.	0

*callus overvokset.

Vedlegg XIII.

Medium: MS + kinetin..

Plantemateriale: Ungt plantemateriale

Forsøk nr 27 med kull.

Registreringsskema.

Dato*	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YKU	10	1	2	7	25/04-03	gen.gang	7
					7	15/05-03	callusred.	7
				1	7	29/05-03	callusred.	6
					6	14/06-03	callusred.	6
				2	6	13/08-03	callusred.	4
	*1				4	25-08-03	callusred.	4
					4	18/09-03	callusred.	4
				1	4	25/09-03	callusred.	3
					3	08/10-03	callusred.	3
				1	3	23/10-03	callusred.	2
					2	12/11-03	callusred.	2
					2	27/11-03	callusred	2
				1	1	19/12-03	callusred	1
					1	12/01-04	callusred	1
					1	26/01-04	callusred	1
					1	04/02-04	callusred	1
				1	1	23/02-04	callusred	0

*med kull *1 overført til medium uten kull

Forsøk nr 28 uten kull.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YKU	10			10	16/04-03	fenolflyt.	10
			1		10	25/04-03	gen.gang	9
				7*	9	15/05-03	callusred.	2
					2	29/05-03	callusred.	2
					2	14/06-03	callusred.	2
				2	2	13/08-03	callusred.	0

*callus overvokset

Vedlegg XIV.

Medium: MS+ Kinetin..

Plantemateriale: ¼ materiale.

Forsøk nr 29 med kull.

Registreringsskema.

Dato*	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YK1	10	3	1	6	25/04-03	gen.gang	6
					6	15/05-03	callusred.	6
				2	6	29/05-03	callusred.	4
				3**	4	14/06-03	callusred.	1
					1	13/08-03	callusred.	1
					1	25/08-03	callusred.	1
	*1				1	18/09-03	callusred.	1
					1	25/09-03	callusred.	1
					1	08/10-03	callusred.	1
					1	23/10-03	callusred.	1
					1	13/11-03	callusred.	1
				1	1	27/11-03	callusred	0

*med kull ** bakterieinfek. *1 overført til medium uten kull

Forsøk nr 30 uten kull.

Registreringsskema.

Dato	Merke	Antall	Infeksjon	Døde	Levende	dato	Behandling	Ant. levende etter
09/04-03	YK1	10			10	16/04-03	fenolflyt.	10
			1	3	10	25/04-03	gen.gang	6
				4	6	15/04-03	callusred.	2
					2	29/05-03	callusred.	2
					2	14/06-03	callusred.	2
				2	2	13/08-03	callusred.	0