

GRANROTKJUKE (*HETEROBASIDION PARVIPORUM*) PÅ
KALKFATTIG- OG KALKRIKMARK PÅ ØSTLANDET -
SAMMENLIGNING AV VED pH, GRUNNSTOFFINNHold OG
SOPPENS OKSALSYREPRODUKSJON.

THE NORWAY SPRUCE ASSOCIATED ROOT AND BUTT ROT FUNGUS
(*HETEROBASIDION PARVIPORUM*) ON ACID AND CALCAREOUS FOREST SOIL IN
EASTERN NORWAY - COMPARISON OF XYLEM pH, ELEMENT CONTENT AND
FUNGAL PRODUCTION OF OXALIC ACID.

ELLEN CATHRINE BURCHARDT

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR
MASTEROPPGAVE 30/60 STP. 2008



Forord

Med denne oppgaven avslutter jeg mitt masterstudie i skogfag ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap. Prosessen med denne avhandlingen har vært både spennende og lærerik, selv om det til tider har vært frustrerende. Arbeidet har vært veldig interessant og motiverende fordi jeg har vært med på alle fasene i prosessen; fra A til Å, dvs. fra "grovarbeidet" ute i felt med motorsag og møkk, til det mer nøyaktig og pirkete sterilarbeidet inne på laboratoriet. Dette har gitt mye variasjon i hverdagen, men jeg føler også at jeg fikk en "dypere" forståelse for tallene jeg senere skulle jobbe med og fremstille.

I løpet av dette året har jeg fått verdifull hjelp, både faglige og moralske, fra mange personer både , og jeg ønsker å uttrykke min takknemlighet til dem alle. Spesielt vil jeg rette en stor takk til min veileder Professor Halvor Solheim som kom med forslaget om å ta fatt på denne problemstillingen - takk for alle konstruktive bidrag og støtte underveis.

Jeg vil få rette en stor takk til hele institusjonen Skog og Landskap for at jeg fikk komme og gå som jeg ville, at jeg fikk anvende utsyr, rom og materialer, og for godt og inkluderende arbeidsmiljø. At alle har tatt godt i mot meg og alle spørsmålene mine setter jeg stor pris på, og dette har bidratt til stor arbeidslyst. Siden oppgaven min omfatter flere ulike emner, har jeg gått på rundgang mellom mange spesialister som har bistått meg med det ypperste av veiledning innenfor de forskjellige arbeidsfeltene. Overingeniør Gry Wollebæk og Olaug Olsen har bidratt med mange gode tips og god opplæring på patologilaben. Avdelingsingeniør Jan Erik Jacobsen har bistått under forbehandlingen av jordprøvene, og andre tekniske spørsmål. Overingeniør Monica Fongen har veiledet meg når det gjelder forberedelsen av ulike prøver for kjemiske analyser, og har videre vært behjelpelig med å kjøre disse analysene. Monica, du har vekket min interesse for kjemi! Videre har også overingeniør Inger M. Heldal vært behjelpelig på laben. Seniorforsker Ari Hietela og forsker Nina Nagy har gitt meg opplæring på de ulike metodene og kommet med konstruktive kommentarer underveis - tusen takk for deres engasjement!

Institutt for energiteknikk, IFE, og Per-Gunnar Røstad har strålt og sterilisert trepulver for meg, og har i den sammenheng vært veldig behjelpelige og ytet god service.

Videre vil jeg også takke alle skogbrukssjefene rundt om i de aktuelle områdene, og alle skogeierne som har tatt seg tid til meg, funnet fram aktuelle bestand, kartmateriale og skogbruksplaner, og latt

meg få lov til å anvende skogen deres i mitt studium. Takk for mange hyggelige "kaffesamtaler" - uten dere hadde det ikke blitt noe datamateriale å bygge oppgaven på!

Tilslutt må jeg også rette en stor takk til mine venner og familie, som har vært til en stor støtte gjennom denne travle perioden.

Universitetet for miljø- og biovitenskap

Ås, 15 mai 2012

Ellen Cathrine Burchardt

Sammendrag

Flere studier konkluderer med at trær på kalkrike marker har større risiko for å bli angrepet av rotkjuke enn trær på kalkfattige marker, men det hersker imidlertid usikkerhetsmomenter knyttet til hvorfor kalkrike marker har denne effekten. I denne oppgaven undersøker jeg betydningen av markas pH- og Ca innhold for vekst- og etablering av granrotkjuke, *H. parviporum*, i norsk gran. Jeg ønsker å sammenligne rotkjukeinfiserte trær fra kalkrik- og kalkfattigmark ved å se på ved pH, grunnstoffkonsentrasjon, og soppens oksalsyre produksjon. Det er ennå uvisst hvordan rotkjuka greier å bryte reaksjonssonen, granas forsvarsmekanisme mot rotkjuke, og dermed infisere frisk yteved, og om det foreligger ulikheter i dette vevet karakterisert av økt pH mellom trær fra kalkrik- kontra kalkfattigmark.

Det ble foretatt en råtetelling på 1317 granstubber, fordelt på 36 bestand, noe som gav en gjennomsnittlig råtefrekvens for alle områdene (Hadeland, Hedemarken, Ringsaker og Nittedal/Skedsmo) på 35,76 %. Høyest råtefrekvens ble funnet på Hadeland (44,09 %), mens Nittedal/Skedsmo hadde minst råte (29,25 %). Rotkjuke sto helt klart for den høyeste råteandelen, da 71,76 % av råten ved stubbeavskjær skyltes rotkjuke alene. Dette er forenlig med andre undersøkelser som påpeker at rotkjuka er den mest betydningsfulle råtesoppen i norsk granskog. Videre viste beregningene en god korrelasjonskoeffisient mellom råtefrekvens og jordas pH (0,68), og mellom råtefrekvens og jordas Ca innhold (0,62). Dette er i samsvar med tidligere studier som konkluderer med at det er økt råte på kalkrikemarken. I denne undersøkelsen ble det funnet en sterk positiv korrelasjon mellom pH – og Ca innholdet i jorda, da 63 % av variasjonen kan forklares av denne regresjonen. Dette illustrerer imidlertid også at det er flere variabler som virker inn på høy pH. Jeg greide ikke å påvise en sammenheng mellom rotkjukeisolaters veksthastighet på agar og hvilken marktype de kom ifra.

Vedprøver fra yteved (SW), reaksjonssone (RZ1-2), anilinved (DW1-2) og kjerneved (HW) ifra infiserte stubber ble analysert for pH, oksalat/oksalsyre og innhold av ulike grunnstoffer. Resultatene mine viste at jord pH påvirker løseligheten til kationer, og jeg fikk en sterk negativ korrelasjonskoeffisient mellom jord pH og aluminium (Al) i SW (-0,81). En lavere pH medfører at spesielt dette grunnstoffet, blir mer løselig i jordvann og følgelig tatt inn i treet gjennom vanninntaket. DW1 hadde de høyeste konsentrasjoner av oksalat, og jeg fant en høy korrelasjonskoeffisient mellom vedens innhold av syreløselig oksalat og grunnstoffene Ca (0,85), Mg (0,70) og Mn (0,69) i DW1. Mangan (Mn) spiller en viktig rolle for rotjukens lignindegradering, men i for store konsentrasjoner vil imidlertid ulike grunnstoffer virke giftig på soppen. Hvor skillet går er vanskelig å si, og vil variere med ulike faktorer.

I tillegg er det mye som tyder på at rotkjuka kan få økt toleranse ovenfor enkelte metaller gjennom utskillelse av oksalsyre. Høy konsentrasjon av kalsium (Ca) i veden vil bidra til økt pH. For å senke reaksjonssonens høye pH til et mer gunstig nivå, anvender rotkjuka oksalsyre for å kjelater kationer som Ca. Dette medfører en reduksjon i pH til under 5, noe som er gunstig for enzymatisk degradering av lignin og hemicellulose. Som forventet viste reaksjonssonen økt pH i forhold til yteved og kjerneved, men det var ingen åpenbare forskjell mellom trær fra kalkrik- og kalkfattigmark. Trær fra kalkfattigmark hadde i gjennomsnitt et høyere grunnstoff- og oksalatinnhold enn trær fra kalkrikmark, men det var en klar overlapp i disse konsentrasjonene hos treindivider fra de ulike marktypene.

For å studere nærmere forskjellige rotkjukeindividers produksjon av oksalsyre og effektiviteten i modulering av vedens pH, ble oppmalt og gamma bestrålt, sterilisert yteved (SW), kjerneved (HW)/reaksjonssone (RZ), fra henholdsvis friske og infiserte trær, fra de to ulike berggrunnene, infisert med rotkjukeisolater fra kalkrik- og kalkfattigmark. Her ble produksjonen av oksalat/oksaltsyre og pH registrert i de ulike prøvene. Alle de inokulerte prøvene hadde pH verdier lavere enn kontroll prøvene, noe som underbygger teorien om at soppen, gjennom utskillelse av oksalsyre, reduserer pH'en til mer gunstig forhold for nedbrytning. Dette ble også vist ved at de høyeste oksalsyrekonsentrasjonene ble funnet i inokulerte prøver, bortsett fra prøvene med reaksjonssoneved fra kalkrikmark. For disse vedprøvene resulterte soppinkubasjon i redusert mengde oksalat. En mulig forklaring kan være at denne vedtypen hadde, før laboratorieeksperimentets start, allerede høyere konsentrasjon av oksalsyre, og dermed trengte soppen bare å katabolisere eksisterende oksalat for NADP produksjon. Resultatene viste ingen klare forskjell i oksalsyreproduksjon mellom ulike soppisolater fra kalkrik/kalkfattig mark, men det er bemerkelsesverdig at rotkjukeisolater fra mark med høyest pH og Ca innhold som regel viste lavest pH reduksjon på inokulert ved. Dette kan bety at rotkjukeindivider fra mark med ekstremt høy pH har økt pH toleranse. Ureabehandling av stubber er en vanlig kontrollmetode mot rotkjuke, hvor effekten er basert på at den behandlede stubbeoverflaten får en økt pH. Økt pH toleranse hos noen rotkjukeindivider kan innebære at stubbebehandling med urea vil kunne gi en redusert effekt. Videre studier med rotkjukeindivider fra mark med ekstremt høy pH vil være av betydning for å understøtte dette.

Det var en klar overlapp i grunnstoffinnholdet i ved ifra kalkrik-og kalkfattigmark, men trær ifra kalkfattigmark hadde generelt et gjennomsnittlig høyere grunnstoffinnhold enn trær ifra kalkrikmark. Tilsvarende viste rotkjukeinfisertved ifra kalkfattigmark et gjennomsnittlig litt høyere nivå av total oksalat enn ved ifra kalkrikmark. Da ved ifra disse to marktyper hadde like mengder med vannløselig

oksalat stammer sannsynligvis denne forskjellen ifra oksalat som er kjelatert med Ca. Siden det ble funnet økt grunnstoffinnhold i ved ifra kalkfattigmark, og at høye konsentrasjoner av visse grunnstoff, som tungmetaller, kan være giftig for sopp, er det ikke utelukket at ved ifra kalkfattig mark, inkludert reaksjonssone, har en høyere motstandsdyktighet mot rotkjuke enn ved ifra kalkrikmark. At råteprosessen krever høyere produksjon av oksalsyre på kalkfattigmark, underbygger denne teorien. Videre studier med rotkjukeindivider ifra mark med ekstremt lav og høy pH må til for å avklare denne hypotesen.

Abstract

Stumps (1317) on 36 clear-cut areas were visually inspected for rot. Soil samples were taken from all of the stands to establish pH and Ca. The overall mean frequency of root and butt rots was 35.76 %. Highest rot frequency was found at Hadeland (44.09 %), and lowest frequency at Nittedal/Skedsmo (29.25 %). Root rot caused by *Heterobasidion annosum* s.l. was found in 71.76 % of the infected stumps, and was therefore the most common rot. The correlation coefficient between rot frequency and the pH- and Ca contents in the soil were 0.68 and 0.62, respectively. Furthermore my results showed a good correlation coefficient between the pH and the Ca contents in the soil (0.79).

A total of 94 disks were cut with a chain saw and taken back to the laboratory. The presence of *H. annosum* s. l. was determined by fungal isolations, followed by a S/P- mating test. The test established that all the isolates were *H. parviporum*. I examine the level of element concentrations, pH and oxalic acid in sapwood (SW), reaction zone (RZ 1-2), discoloured wood (DW 1-2) and heartwood (HW) from 14 stumps taken from acid and calcareous soil. My results showed that the availability of the nutrients increases as the pH in the soil decreases. This was particularly the case for aluminium where the correlation coefficient was -0,81 in SW. The oxalate levels were highest in the DW. The correlation coefficient between the element and oxalate levels was especially good for the elements Ca (0.85), Mg (0.70) and Mn (0.69) in DW1. Mn participates in the lignin degradation process. *H. parviporum* requires trace amounts of essential heavy metals, but these metals are toxic when present in excess. However the production of oxalic acid may increase the fungal tolerance to some of the metals. The wood pH was the highest in the RZ tissue, and lower in the HW tissue where the fungi had produced oxalic acid. This is as expected since one of the roles of oxalic acid is to reduce the pH in the substrate to optimal levels for cellwalls degrading enzymes. Xylem from acid soil had higher average content of elements and oxalate, but there was an overlap in these values between individuals from the different soil types.

An inoculation experiment was carried out under laboratory conditions to examine the ability of *H. parviporum* to produce oxalate. Milled, gamma-irradiation-sterilized tissues from sapwood (SW) and heartwood (HW)/reaction zone (RZ) from healthy and infected trees from acid and calcareous soil were used as substrate. The different tissues were inoculated with conidia of *H. parviporum* isolates from acid and calcareous soil. The results showed that the tissue from RZ inoculated with *H. parviporum* had the highest pH value. All inoculated samples had pH values lower than the control samples, which supports the theory that the fungus produces oxalic acid to reduce the pH on the extracellular environment to optimal levels for cell wall degrading enzymes. This was also shown by

higher oxalic concentration in the inoculated samples, apart from samples with RZ tissue from calcareous soil. Here the incubation resulted in reduced oxalate production. A possible explanation may be that these samples already had high concentrations of oxalate due to previous oxalate productions that took place before the laboratory experiment started. Therefore the fungus in these samples only needed to catabolise already existing oxalate for production of NADP (energy). The results showed no clear difference between produced oxalate and the pH in the soil, however it is remarkable that isolates from areas with high pH and Ca soil contents resulted in the lowest pH reduction. This may imply that isolates from soil with extremely high pH level may have increased pH tolerance. Further studies will be important to support this statement.

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract	VI
Innledning	1
Råtens betydning og omfang	1
Forekomst av rotkjuke	1
Spredning av rotkjuke	2
Sykdomsforløp	3
Granas forsvarsmekanismer	4
Endringer i veden forårsaket av rotkjuke	5
Rotkjukas angrepstaktikk	6
Hvorfor er rotkjuke et aktuelt tema?	6
Problemstilling	7
Metoder	9
Feltarbeidet	9
Bestandene	9
Registreringer	10
Råtetellingen	10
Jordprøver	11
Forsøksmaterialet	11
Laboratoriearbeid	11
Analyser av jordprøver	11
Isolering	12
Artsbestemmelse	13
Vekststudie	14
Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden	15
Bestemmelse av pH i trepulver	17
Bestemmelse av oksalat/oksalsyre i treprøver	17
Bestemmelse av oksalsyre i treprøver etter vannekstraksjon	18
Bestemmelse av oksalat og oksalsyre i treprøver etter syreekstraksjon	18
Bestemmelse av grunnstoffer i treprøver	18
Soppkultiveringstest	18
Inokulering	19
Bestemmelse av pH i prøvene	21
Bestemmelse av organiske syrer i prøvene	21
Statistikk	21
Resultater	22
Råtetelling	22
Isolering	26
Vekststudie	27
Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden	30
Soppkultiveringstest	37
Diskusjon	45
Råtefrekvens	45
Isolering	47
Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden	48
Bestemmelse av pH i trepulver	48
Bestemmelse av grunnstoff og oksalat/oksalsyre i treprøver	50
Soppkultiveringstest	52
Konklusjon	55
Referanser	56
Vedlegg	65

Vedlegg 1. Oversikt over forsøksbestandene	65
Vedlegg 2. Feltskjema anvendt under råtetellingen	67
Vedlegg 3. Konsentrasjonen av grunnstoffer og syreløselig oksalat i vedsonene	70

Innledning

Råtens betydning og omfang

Heterobasidion rotråte, som er forårsaket av nært beslektede sopparter tilhørende *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. komplekset, blir ansett som det mest vanlige og ødeleggende patogenet hos bartrær i boreale og tempererte skoger (Enerstvedt & Venn 1979; Roll-Hansen & Roll-Hansen 1993; Huse et al. 1994; Solheim 1994; Swedjemark & Stenlid 1997; Korhonen & Stenlid; 1998). Dette artskomplekset vil i denne oppgaven heretter bli referert til som *H. annosum* s. l. eller rotkjuke. Denne råten blir kategorisert som en hvitråtesopp tilhørende Basidiomycetene, eller stilksporetsopp (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1993).

Huse (1983) studerte data ifra den Norske Landskogstakseringens tilvekstbøringer utført perioden 1964-1976, og fant en råtefrekvens i brysthøyde hos norske grantrær (*Picea abies* (L.) Karst.) på 7,9 %. Den norske Landskogstakseringen, som ble gjennomført perioden 1982-86, viste at 9,3 % av alle norske grantrær var råtebefengte i brysthøyde (Solheim & Holen 1990). En annen landsomfattende undersøkelse på stubber utført vinteren 1992, fastslo at mer enn hvert fjerde tre (26,8%) var råtebefengt etter slutthogst (Huse et al. 1994). Selv om disse undersøkelsene ikke er direkte sammenlignbare, blir det hevdet at skadeomfanget forårsaket av *H. annosum* s. l. har økt den siste tiden (Huse et al. 1994; Ihrmark 2001; Piri 2003; Penttilä et al. 2004). I Norge er det spesielt granskog som er utsatt for råteskader (Solheim 2010), og det er imidlertid ofte akkurat disse eldre granskogbestandene som har størst økonomisk betydning for skogeieren. En høy råtefrekvens i slike bestand vil kunne medføre lavere vekst, dårligere tømmerkvalitet, og følgelig betraktelig reduserte tømmerpriser. Det er anslått at rotkjuka koster det norske skogbruket ca. 100 millioner kroner hvert år (Solheim 2010).

Forekomst av rotkjuke

H. annosum s. l. er et artskompleks delt inn i flere intersterilitetsgrupper (IS), hvor tre av gruppene befinner seg i Europa med til dels ulike utbredelsesområder og vert preferanser (Korhonen 1978). Den europeiske S-gruppen (etter verten Spruce) foretrekker hovedsakelig norsk gran som vert (Korhonen 1978; Korhonen & Piri 1994). Furu (*Pinus* spp.) er hovedverten for den europeiske P gruppa (etter Pine), men er i Norge mer aggressiv på andre treslag enn det S-gruppa har vist seg å være (Korhonen 1978; Korhonen & Piri 1994). Andre arter som kan berøres er visse bartrær, lauvtrær og lyngarter (Ihrmark 2001). Årsaken til at P- gruppa har et større spekter av mulige verter, er blitt

begrunnet med at den besitter flere enzymer og har følgelig større nedbrytningsegenskaper (Stenlid et al. 2006). Det er imidlertid bare et fåtall av rotkjukas enzymer som har blitt studert (Stenlid et al. 2006). Den tredje europeiske IS gruppa kalles F etter hovedverten edelgran (*Abies* spp.) (som på engelsk bærer navnet fir).

Disse ulike gruppene er nå blitt anerkjent som egne arter, og har blitt navngitt (Niemelä & Korhonen 1998). Den europeiske S-gruppa har fått navnet granrotkjuke, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen sp. nov., og finnes i Norge ifra Vest-Agder i sør og opp til Saltfjellet nord (Niemelä & Korhonen 1998; Heggetveit & Solheim 1998; Solheim 1999). Per dags dato er imidlertid ikke granrotkjuke (S- typen) funnet på Vestlandet (Heggetveit & Solheim 1998; Solheim 1999).

Fururotkjuke, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.), er navnet på den europeiske P-gruppa, og er i Norge vanlig på Vestlandet og opp til Romsdalen, men den er også funnet på Sørlandet og Østlandet (Heggetveit & Solheim 1998; Niemelä & Korhonen 1998; Solheim 2010). Den europeiske F-gruppa er navngitt *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen sp. nov. (Niemelä & Korhonen 1998), og er foreløpig ikke funnet i Norge (Capretti et al. 1990).

Disse nært beslektede artene kan identifiseres gjennom ulike DNA teknikker, som anvendelse av PCR, eller ved en enkel S- og P- type paringstest på agar (Nobles 1948; Garbelotto et al. 1996). Biologien til rotkjukeartene er imidlertid forholdsvis lik, men i tillegg til de nevnte forskjellene, har *H. parviporum* vist en tendens til å stige høyere opp i stammen enn *H. annosum* s. s. (Vasilias & Stenlid 1998). Naturlige hybrider er sjeldne, men det er bl.a. blitt lokalisert og beskrevet en naturlig hybrid mellom de to Amerikanske S- og P-artene (Korhonen & Stenlid 1998; Stenlid et al. 2006; Gabrelotto et al. 2007). Imidlertid er parring mellom artene (IS gruppene) nokså vanlig i laboratorier, hvor man bl.a. belyser hvor konkurransedyktige slike hybrider kan være (Korhonen & Stenlid; 1998, Stenlid et al. 2006; Gabrelotto et al. 2007).

Spredning av rotkjuke

Primærspredning for *H. annosum* s. l. foregår når lufttemperaturen er over 0 °C ved at luftbårende sporer infiserer og etablerer seg på ferske stubbesnittflater, eller i ferske sår på stammen eller røtter hos friske trær (Schwantes et al. 1976; Swedjemark & Stenlid 1997). Det er med bakgrunn i at råtefrekvensen stiger i takt med tynningsaktiviteten, ved at ferske sår forårsaket av tunge skogsmaskiner skaper en inngangsport for patogenet, at det blir det hevdet at dagens skogbrukspraksis er i favør for rotkjukespredning (Ihremark 2001; Penttilä et al. 2004). Det er følgelig

anbefalt å legge omfattende inngrep i skogen til vinterhalvåret hvor det er lite eller ingen sporspredning (Solheim 1994). Suksessraten for infeksjoner på stubbesnittflaten er avtagende ved økende tilstedeværelse av andre konkurrerende sopper (Solheim 2010), og stubbebehandling med den konkurrerende arten stor barksopp (*Phlebiopsis gigante* (Fr.) Jülich), har vist seg som et effektivt tiltak for å hindre etableringen av *H. annosum* s.l. (Thor & Stenlid 2005). Et annet vellykket tiltak har vært å anvende urea på stubbesnittflaten (Thor & Stenlid 2005).

Sekundærspredning skjer ved at mycelet, som har kolonisert stubben eller stammen, kan spre seg vegetativt videre gjennom røttene og på den måten infisere friske, nærliggende trær via rotkontakt (fig. 1). (Schwantes et al. 1976; Swedjemark & Stenlid 1997). Siden *H. annosum* s. l. kan vedvare og forbli aktiv i stubber i flere tiår, kan gamle infiserte stubberøtter fra forrige omløp være effektive smittekilder til neste skoggenerasjon (Greig & Pratt 1976; Piri et al. 1990; Piri 2003; Lygis et al. 2004; Piri & Korhonen 2007). Schütt og Schuck (1979) kom frem til at sporespredning er størst 3-4 år etter hogst, og at hogstavfallet samt gjensatte råtebefengte trær og stubber vil kunne medføre til økt sporespredning. Et omløp med lauvtrær har vist seg effektivt for å forhindre infeksjon ifra et omløp til det neste (Oliva et al. 2010a). Andre forebyggende tiltak mot spredning via rotkontakt, er en større treslagssammensetning i bestandet, og forkortede omløpstider (Piri 2003, Lygis et al. 2004).

Sykdomsforløp

Det er bare planter og unge trær som kan dø raskt etter en rotkjukeinfeksjon (Horntvedt 1996; Bendz-Hellgren et al. 1998). Eldre grantrær motstår bedre infeksjonen slik at råten bruker lengre tid på å utvikle seg, men tilslutt vil treet dø da tilnærmet all levende vev er fortært (Horntvedt 1996; Bendz-Hellgren et al. 1998). Norsk gran har i utgangspunktet et svakt rotsystem med flatrot, og følgelig vil et råtebefengt tre lett kunne bikke under for et vindkast.

Grunnet tilstedeværelsen av aktive forsvarsmekanismer er soppens vertikale veksthastighet i stammens kjerneved, med et gjennomsnitt på 30-40 cm per år, litt raskere enn den laterale veksten inn mot yteveden (Huse & Venn 1994; Swedjemark & Stenlid 1997; Bendz-Hellgren et al. 1998). Av samme grunn er utviklingen av *H. annosum* s. l. raskere i døde enn i levende røtter, da døde røtter ikke lenger besitter et vitalt forsvar (Huse & Venn 1994; Swedjemark & Stenlid 1997; Bendz-Hellgren et al. 1998). Hvitråtesopp er spesielle ved at de kan bryte ned alle komponenter i celleveggen, men først blir gjerne lignin og hemicellulose selektivt fortært, før cellulosen tilslutt blir brutt ned (Hietala et al. 2009; Solheim 2010). I tillegg besitter hvitråtesopp den egenskapen at de kan tolerere eller

avgifte en del fenoler som finnes konsentrert i reaksjonssonen; granas forsvarsvev mot rotkjuke (Hietala et al. 2009).

Granas forsvarsmekanismer

Siden trær er stedfaste har de ingen mulighet til å flykte unna angrep, og følgelig har de utviklet en rekke forsvarsmekanismer for å stoppe eller forsinke infeksjonsforsøk ifra ulike organismer de kan møte under sin lange livssyklus. Det konstitutive forsvaret, også kalt det stående forsvaret, representerer den første hindringen og er et generelt forsvar som er tilstede hele tiden (Franceschi et al. 2005). Dette forsvaret består av ulike mekaniske egenskaper, for eksempel barkens harde korklag, i tillegg til å innbefatte en rekke kjemikalier som terpenene i primærkvaen (Krekling et al. 2000; Hudgins et al. 2003; Franceschi et al. 2005).

Når treet erkjenner at angriperen har brutt seg igjennom det stående forsvaret blir det induserbare forsvaret (IR), også kaldt mobiliseringsforsvaret, aktivert (Jones & Dangl 2006). Det induserbare forsvaret kan mobiliseres et stykke unna angrepsstedet, på selve angrepsstedet, eller i hele planten – et fenomen som blir kalt systemisk indusert forsvar (SIR) (Eyles et al. 2009). Ved første infeksjonsforsøk blir signaler sendt til naboceller for å forberede treet mot ytterligere angrep. Treets reaksjon på disse signalene innebærer høye konsentrasjoner av forsvarsstoffer gjennom iverksetting av anatomiske prosesser som aktivisering av PP- celler (polyfenoliske parenkymceller), dannelse av traumatiske harpikskanaler og cellevegg lignifisering (Nagy et al. 2006).

Forskning konkluderer med at treets evne til å stå imot angrepet avhenger av samspillet mellom de ulike forsvarsresponsene, og hurtigheten av den samlede respons (Hietala et al. 2004). Noen genotyper viser mer motstandskraft enn andre, og i tillegg har faktorer som miljøforhold innvirkning på angrepets utfall (Danielsson et al. 2011). Trær som er smittet med mindre aggressive patogener, kan bli mer motstandsdyktig mot senere angrep siden det er vist at planter har en viss evne til å gjenkjenne ulike mikroorganismer (Eyles et al. 2009; Cipollini & Heil 2010). Mye tyder på at kitin, som utgjør en stor del av celleveggen hos sopper, er et stoff som kan utløse slike forsvarsreaksjoner i treet (Hietala et al. 2004). Siden forsvarsresponser krever mye energi, som heller kunne ha blitt brukt på bl.a. vekst, er det en kostnad/nytte vurdering mellom motstand og fitness (Olivia et al. 2010b).

Endringer i veden forårsaket av rotkjuka

Når *H. annosum* s. l. overlever på død kjerneved oppfører den seg som en saprofytt, men så fort den henter næring ved å drepe vertens levende yteved, opptrer den som en nektrofytt (Fossdal et al. 2011). Det er først når *H. annosum* s. l. opptrer som en nektrofytt at den må takle vertens forsvarsreaksjoner. Yteveden besitter imidlertid ikke bare et aktivt forsvar, men den høye konsentrasjonen av fuktighet i veden begrenser i tillegg oksygenmengden og dermed muligheten for soppaktivitet (Swedjemark 1995). Kjerneveden er forholdsvis lett å kolonisere ettersom cellene er døde, de har opphørt å fungere som ledningsvev, porene er blokkert og veden er innsatt med ulike ekstraktivstoffer (Hietala et al. 2009). For å beskytte den levende veden, danner grana en reaksjonssone (reaction zone; RZ) i skjæringspunktet mellom frisk yteved og infisert kjerneved (Shain 1971; Hietala et al. 2009) (figur 1). Denne reaksjonssonen karakteriseres ved et økt vann- og metallion innhold, en forhøyet pH grunnet økt innhold av karbonat, og en akkumulering av en rekke ulike sekundære metabolitter med en viss sopphemmende effekt, herunder fenoler (Shain 1971; Pearce 1991; Hietala et al. 2009). Mellom reaksjonssonen og frisk yteved dannes en blek og tørr overgangssone hvor parenkymcellene er døde, en prosess som kan minne litt om kjerneveddannelse (Hietala et al. 2009). Innenfor reaksjonssonen finner man ofte en omsluttet mørksone, kaldt anilinvæd (discoloured wood; DW), hvor misfargingen trolig skyldes fenoloksidering som følge av rotkjukas enzymproduksjon (Hietala et al. 2009). *H. annosum* s. l. er i stand til å bryte reaksjonssonen, men hvordan den greier å komme igjennom denne forsvarsbarrieren, er imidlertid lite forstått (Pearce 1991).



Figur 1. Til venstre er det en rotkjukeinfisert stubbe hvor den karakteristiske reaksjonssonen som oppstår i skjæringspunktet mellom frisk yteved og infisert kjerneved vises godt, og er merket med en rød pil. Fargen til reaksjonssonen kan variere fra oliven til lys grønnaktig, og skyldes opphopningen av fenoliske stoffer. På bildet til høyre er det 3 granstubber som er infisert av rotkjuke gjennom rotkontakt. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Rotkukas angrepstaktikk

Oksalsyre ($C_2H_2O_4$) er en sterk organisk syre som er forbundet med flere viktige prosesser i soppen og innehar bl.a. en viktig funksjon i trenedbrytning, og følgelig i trenedbrytningsforskningen (Munir et al. 2001; Mäkelä et al. 2002; Nagy et al. 2012). Det er kjent at *H. annosum* s. l. produserer oksalsyre (OxA) for å gjøre celleveggen mer forenlig med videre enzymatisk nedbrytning ved bl.a. å stimulere soppens lignin- degraderende mangan peroksidase enzym, og ved å kjelatere Ca fra celleveggens midtlamell. (Dutton & Evans 1996; Diouf et al. 2002; Mäkelä et al. 2002; Qian et al. 2002; Nagy et al. 2012). Etter at oksalsyre er produsert kan salter som kalsiumoksalat krystaller bli dannet (CaOx) (Dutton et al. 1993; Guggiari et al. 2011).

Hvorfor er rotkjuka et aktuelt tema?

Når *H. annosum* s. l. først har etablert seg i et bestand har det vist seg vanskelig å kontrollere sykdomsforløpet (Piri 2003). Det er dessuten mye som tyder på at en reduksjon i omfanget av *H. annosum* s. l. ikke vil skje med det første, da stadig mer av inngrepene i skogen er maskinelle, og i tillegg er det en økende fokusering på bruk av lukkede hogster, noe som medfører økt risiko for skader og sår på de gjenstående trærne. For bedre å kunne sikre det biologiske mangfoldet, er det tilrådet å øke mengden av døde trær i ulike nedbrytningsfaser og diameterklasser i de norske skoger, noe som kan bidra til økt sporespredning (Schütt & Schuck 1979). Videre kan det tenkes at ulike klimaendringer vil medføre utvidelse av utbredelsesområdet til *H. annosum* s. l., og at mildere vintre vil innebære lengre sesong for smittefare, og følgelig kortere intervaller for sikker hogst (Solberg & Dalen 2007). Gjennom bl.a. tømmerimport øker muligheten for at ulike *Heterobasidion annosum* arter som finnes andre steder i verden, vil kunne spres og hybridisere seg (Gonthier et al. 2007).

Økt forståelse om adferden til *H. annosum* s. l. kan benyttes til å minke skadeomfanget i skogbruket, bl.a. vil bedret kunnskap om de kjemiske stoffene som framkaller forsvarssignaler i bartrær være nyttig for å kunne øke grantrærs motstand mot patogenet. Økt resistens hos grantrær mot sopp sykdommer vil ikke bare være gunstig for skogbruket, men også i et større perspektiv, da soppnedbrytning frigjør store mengder karbon som ellers ville ha vært bundet i skogen eller i treprodukter med lang levetid. Videre vil kunnskap rundt hvordan soppens enzymer selektivt greier å bryte ned ligning være interessant for produksjon av bioetanol, og i masse- og papirindustrien hvor det er ønskelig å minimere celluloseetapet (Fossdal 2007; Mäkelä et al. 2002). Kunnskap rundt mekanismene involvert i oksalatproduksjon og dannelsen av kalsiumoksalat, vil ha en rekke potensielle bruksområder, og disse mekanismene har i større grad blitt studert hos brunråtesopper

enn hos hvitråtesopper (Guggiari et al. 2011). Dette er noen momenter som understreker at den "lille" soppen ikke er uten betydning, og at kunnskap rundt dens biologi er svært så aktuelt.

Problemstilling

Råtefrekvensen varierer sterkt mellom skogbestand som følge av flere ulike forhold, men jordsmonnet viser seg å være av stor betydning (Holmen 1973; Stamnes et al. 2000). I Norge, som i mange andre land, er det mer råte på kalkrikemarker, som rundt Oslofjorden, Mjøsa og Randsfjorden, enn på surere marktyper som bl.a. grunnfjellsområder (Holmen 1973; Enerstvedt & Venn 1979; Stamnes et al. 2000). Schwantes et al. (1976) viste at rotkjukeisolater fra kalkrik- og kalkfattigmarker, i hvert fall under laboratorieforhold, hadde forskjellig pH optimum. Isolater fra kalkmarker vokste best på agar ved pH 7, mens isolater fra kalkfattigmark vokste best på pH 4. Imidlertid vokste alle isolatene ved pH mellom 3-8. Årsaken til økt råteforekomst på kalkrikmark er fortsatt ikke avklart, men det foreligger to hovedhypoteser:

- 1) På de fleste kalkmarker varierer grunnvannsnivået, noe som medfører rotskader og svekkelser i vertens endogene forsvarsmekanismer. Dette er faktorer som gir økt mulighet for rotkjukeinfeksjoner (Lindeberg & Johansson 1992; Swedjemark & Stenlid 1997).
- 2) Råtefrekvensen øker bl.a. med økende pH i jorda, men dette er også sterkt korrelert med graden av kalsium (Ca) (Schönhar 1969; Schwantes et al. 1976; Holmen 1973). Ettersom de fleste av rotkjukas konkurrerende sopper trives dårlig på høy pH (>6), kan en tilpasning til kalkmarker, som har en høy pH, være fordelaktig for rotkjuke som blir ansett som en relativt konkurransesvak art (Korhonen & Stenlid 1998).

I denne oppgaven vil jeg se nærmere på tema beskrevet i hypotese 2, hvor jeg ønsker å undersøke betydningen av jordas pH- og kalsiuminnhold på rotkjukas vekst og utvikling. Jeg ønsker å studere rotkjukeindivider fra norsk gran, og sammenligne individer tatt fra kalkrikmarker med individer ifra kalkfattigmarker. De to hovedproblemstillingene for dette studiet har vært:

- A. Å undersøke om det er forskjell mellom soppindivider fra kalkrik/kalkfattig mark når det gjelder toleranse for høy pH, eller i effektiviteten til å justere ned høy pH gjennom produksjon av organiske syrer.

- B. Å undersøke om det er en forskjell i grunnstoff konsentrasjonen i reaksjonssona, granas forsvarsrespons mot rotkjuke, på kalkrik/kalkfattig mark som delvis kan forklare den økte råtefrekvens som observeres på de mer kalkrike lokalitetene.

Metoder

Feltarbeidet

Feltarbeidet ble utført i løpet av sensommeren og høsten 2011. Når det gjaldt soppkultiveringsforsøket hentet jeg inn stubbeskiver fra nylig avvirkende bestand på Hadeland i februar 2012 (siden marka var fryst, ble det ikke tatt jordprøver fra disse to bestandene).

Bestandene

Studien ble gjennomført i 5 regioner på Østlandet, fordelt på 43 bestand. Feltene ble inndelt etter markas kalkinnhold (se tabell 1). For oversikt over alle bestandene se vedlegg 1. Det geografiske valget skyldtes først og fremst tilgang på områder hvor bestandene på kalkrikt og kalkfattig jordsmonn var i relativ nærhet til hverandre, for best mulig sammenligningsgrunnlag. Alle feltene var senest avvirket vinteren 2011.

Tabell 1. Oversikt over bestandene fordelt på jordas kalkinnhold.

Hadeland:	Hedmarken:	Ringsaker:	Aurskog/Høland:	Nittedal/Skedsmo:
11 bestand	10 bestand	10 bestand	3 bestand	9 bestand
Antall kalkrike	Antall kalkrike	Antall kalkrike	Antall kalkrike	Antall kalkrike
7	4	8	0	1
Antall kalkfattige	Antall kalkfattige	Antall kalkfattige	Antall kalkfattige	Antall kalkfattige
4	6	2	3	8

Ut ifra skogbruksplanen hentet jeg ut de andre opplysningene fra bestandet som alder, bonitet og evt. antall tynninger. Kart over området og annet relevant informasjon fikk jeg fra skogbrukssjefen eller skogeieren. Bestandene var lokalisert fortrinnsvis på blåbærdominert granskog hvor bonitet lå mellom G17-G23. Jeg benyttet alderen som var oppgitt i skogbruksplanen, som for alle de bestandene jeg hadde informasjon ifra, varierte mellom 50-130 år. Noen bestand hadde blitt tynnet, og enkelte bestand hadde tidligere blitt anvendt som beitemark. Imidlertid var det vanskelig å få oversikt over bestandenes tidligere historikk, som gjennomførte skogsskjøtselstiltak, da det forelå lite dokumentert informasjon fra tidligere drifter.

Registreringer

Jeg utarbeidet et skjema til feltarbeidet (se vedlegg 2) hvor jeg noterte flatenummer, navn og kommune, dato og tilslutt ble h.o.h. og koordinatene (WGS84; grader, minutter og sekunder) for feltet registrert ved hjelp av GPS (Garmin Astro 220). For samtlige flater ble det tatt et oversiktsbilde, samt at alle stubbeskivene som ble tatt med for videre analyser og evt. tvilstilfeller, ble avbildet. Dette gjorde at det senere var mulig å gå tilbake i materialet og vurdere råtens karakter og omfang. Råten ble delt inn i ulike hovedtyper og gruppert etter råtens utbredelse i forhold til stubbesnittflaten. Eventuelle kommentarer ble notert ned på registreringsskjemaet.

Råtetellingen

Det ble gjennomført en råtetelling på 36 av feltene, hvor jeg tok utgangspunkt i skjemaet utviklet og anvendt under den store råtetellingen i 1992 (Huse et al. 1994). I tillegg ble diameteren til stubbene registrert. Råten ble klassifisert etter rådeårsaken, hvor jeg brukte 5 kategorier; rotkjuke, honningsopp (*Armillaria* spp. (Fr. ex Fr.)), såråte, kombinasjonsråte (både rotkjuke og honningsopp tilstede) og annen råte. Videre ble råtetyperne inndelt i ytterligere 5 klasser avhengig av råtens utbredelse i forhold til stubbediameteren. Dette ble angitt som angrepet areal i prosent av hele stubbesnittflaten. Stubber med misfarging, eller misfarging grunnet tennar, ble karakterisert friskt. Denne vurderingen ble gjort visuelt, men ved tvilstilfeller ble det anvendt fotokamera, og evt. ble en vedprøve tatt med hvor det påfølgende laboratoriearbeidet ville avdekke hvorvidt stubben var råtebefengt, og evt. hvilken råtesopp som var tilstede. For rask påvisning av mulig forekomst av rotkjuke ble en liten "kakeskive" ifra stubbeskiven pakket inn i fuktig avispapir for så å bli lagt i en plastboks i romtemperatur i ca. 3 dager, før den oppkommende oppveksten av konidier kunne studeres. Råtefrekvensen ble beregnet som antall råtebefengtestubber per felt, delt på totalt antall registrerte stubber per felt. Dette ble ganget med hundre for å få tallet i prosent.

Diameteren for alle de registrerte stubbene ble målt med et diatemermålebånd og notert ned. Stubbens aktuelle diameter ble regnet ut som et gjennomsnitt av de to målingene nord-sør og øst-vest. Det var imidlertid bare stubber av norsk gran over 10 cm i diameter, og som ikke hadde noen synlige skader etter hogst, som ble anvendt i råderegistreringen.

En diagonallinje gjennom bestanden ble på forhånd satt, for en nøytral utvelgelse av prøvematerialet, og for å få med de ulike variasjonene som finnes i terrenget. Flatestørrelsene varierte stort, og avhengig av om flaten var av mindre eller større karakter, tok jeg eksempelvis hver stubbe eller hver fjerde stubbe på linja. For hvert bestand ble mellom 30-47 stubber vurdert.

Jordprøver

For å kartlegge bestandene som befant seg på kalkrik versus kalkfattig mark, anvendte jeg Norges Geologiske Undersøkelse, NGU, sine karttjenester på internett (Nasjonal berggrunnsdatabase, 2011), og informasjon skogbrukslederne satt inne med. For sikkert å kunne fastslå dette, tok jeg i tillegg en jordprøve ifra hvert bestand. Jordprøven ble tatt tre steder langs den på forhåndssatte diagonallinjen. Først fjernet jeg det øverste humussjiktet, før jeg tok opp ca. en 20 cm lang jordstykke med en liten spade. Prøvene ble lagt i en pose, blandet godt, og fortest mulig lagt i fryseren for å unngå evt. endringer før videre behandling og analyse.

Forsøksmaterialet

Ved hjelp av motorsag tok jeg 2 stammeskiver på ca. 3 cm tykkelse ifra 1-3 ulike stubber i hvert bestand med til laboratoriet. For å unngå å få med mye kvae, andre sopper og "forurensninger" som kan ligge oppå stubbeoverflaten, ble den første skiven skåret vekk og kastet. For isolering av rotkjuke og materialer til kjemiske analyser, ble bare en sektor tatt med hjem, mens hele skiver ble tatt med til soppkultiveringstesten. Stubbeskivene ble merket og pakket inn i papirposer og lagt raskest mulig kjølig, før de innen en uke ble tatt med til laboratoriet for påvisning og isolering av rotkjuke. For å hindre kjemiske endringer ble skivene for kjemiske analyser og soppkultiveringsforsøket fryst ned ved -21 °C før videre forbehandling og analyser.

Laboratoriearbeid

Laboratoriearbeidet ble gjennomført kontinuerlig, dvs. sensommeren, høsten og vinteren 2011/2012.

Analyser av jordprøver

Det ble tatt jordprøver fra hvert felt for å dokumentere pH- og Ca innhold. Før bestemmelse av pH ble jordprøvene tatt opp av fryseren, tørket i tørkeskap ved 25 °C, og deretter, ved å anvende en trekloss, bearbeidet forsiktig igjennom en sikt med 2 mm maskeåpning. Forbehandlingen av jordprøver for kjemiske analyser, innebar i tillegg morting i en elektrisk dreven agatmorter (Retsch PM4). Jordprøvenes tørrstoff ble beregnet i prosent ved å veie alle prøvene, tørke de over natten i et varmeskap ved 105 ± 3 °C, for deretter å veie alle prøvene på nytt (etter metode NS 4764).

Bestemmelsen av pH og grunnstoffer ble foretatt etter de praktiserende standardene ved Skog og

Landskap (pH etter PH – 43200-M04, kjemisk analyse etter IPC 41100-M04 og OPP 21100-M08). For alle resultatene se vedlegg 1.

For bestemmelse av pH ble 10 ml godt blandet jord lagt i en plastpose og tilsatt 25 ml Milli-Q vann (ionebyttet vann fra dispenser). Posen ble "sveiset" igjen ved å anvendende en impulsveiser. Jordposene ble så ristet godt og lå natten over i romtemperatur, før pH neste dag kunne bli målt ved å anvende et pH-meter (PHM229 Lab pH Meter). Som kvalitetssikring ble det anvendt kontrollprøver og målinger med buffer pH 3.00 og 5.00. Før hver måling ble posene ristet godt, og elektroden (Radiometer Analytical S.A., France) ble vasket med Milli-Q vann og tørket forsiktig av mellom hver måling.

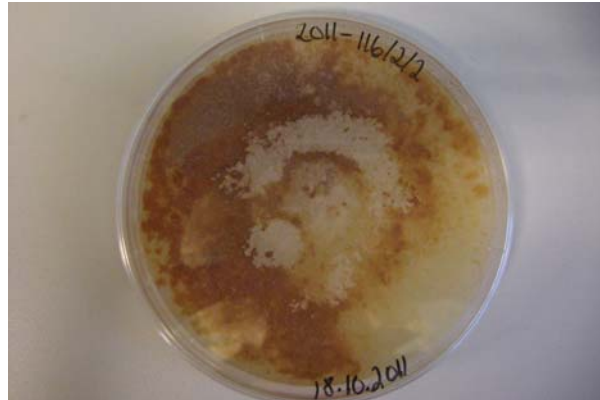
For bestemmelse av grunnstoffer i jordprøvene ble 0,44-0,46 g av de finmalte prøvene helt over i teflonbeholdere, samt en blindprøve og en kontrollprøve fra Årungen. Jordprøvene ble tilsatt 10 ml oksiderende syreblanding ($\text{HNO}_3\text{:HClO}_4$), før de ble varmet opp i mikrobølgeovn til de var dekomponerte. Deretter ble de nedkjølt til romtemperatur før 40 ml Milli-Q vann ble tilsatt. Væsken ble godt blandet i teflonbeholderne, og helt over på mindre merkede plastflasker. Jordprøvene var da klare for å bli analysert. Selve grunnstoffbestemmelsen ble utført av overingeniør Monica Fongen ved Norsk Institutt for Skog og Landskap ved bruk av en Induktiv Koplet Plasma Optisk Emisjons Spektrometer (ICP-OES, Thermo Fisher iCAP 6300 Duo View ICP Spectrometer). Resultatene fra analysen beregnes og oppgis i mg grunnstoff per kg tørr jordprøve. Alle teflonbeholderne ble nøyaktig veid etter at både vann og syre hadde blitt tilsatt, for å kontrollere metoden og evt. tap av væske.

Isolering

For å påvise tilstedeværelsen av *H. annosum* s. l. ble det på laboratoriet tatt en liten treflis ifra stammeskivene og lagt over i 9 cm petriskåler bestående av et vekstmedium laget av malt agar etter følgende oppskrift: 10 g agar, 6,25 g malt, 0,5 l destillert vann (1,25 % malt, 2 % agar) som autoklaveres i ca. 20 minutter ved 121°C. Autoklavene som ble anvendt var TOMY SS-325 og HMC HiClave HV-50.

Hver prøve ble hentet ut ifra den råtebefengte delen midt i stammeskiven for å unngå kontaminering fra andre sopper og bakterier som kan ligge på treoverflaten. Arbeidet ble utført i sterilbenk hvor redskapen ble dyppet i sprit og brent av for hver prøve. Jeg lagde alltid minst to parallelle skåler for

sikrere å få oppvekst av rotkjuke. Skålene ble satt mørkt i romtemperatur i ca. 2 uker (figur 2), før det framvokste myceliumet ble studert i mikroskop.



Figur 2. En skål med *H. parviporum* som har stått mørkt i romtemperatur i 3 mnd. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Alle skålene ble fulgt nøye med, og dersom de skulle være forurensset eller det var bakterier tilstede, ble skålene rensset ved at rent mycel eller utstryk ifra konidieforene ble lagt over på nye skåler med vekstmedium, mens den forurensede skålen ble destruert. Dersom det ikke kom opp tilfredsstillende oppvekst av rotkjuke ble det gjort nye isoleringsforsøk ifra stubbeskiven, som i mellomtiden lå på kjølerom.

Var isoleringen vellykket, ble den podet over på rør for en sikrere lagring. Det ble anvendt samme blandingsforholdet for vekstmediumet til rørene som til petriskålene (1,25 % malt, 2 % agar). Hvert rør ble målt opp med lik mengde agar, og lagt skrått til agaren stivnet slik at vekstoverflaten ble skeiv og dermed større. Etter podingen ble enden på røret brent i en gassbrenner før korken ble satt på, og forseglet med parafilm.

Artsbestemmelse

Et rotkjukeisolat fra hvert bestand, hvor det fantes vellykkede rotkjukeisoleringer, ble valgt ut for artsbestemmelse ved hjelp av en S- og P- type test (Korhonen 1978). I tillegg ble alle isolatene ifra stammeskivene som skulle benyttes i de videre laboratorieeksperimentene, artsbestemt. Dette utgjorde til sammen 45 isolater, som ble testet mot henholdsvis *H. annosum* (P type) og *H. parviporum* (S type). Dette ble utført ved å stake ut en liten inokulum ifra min ukjente rotkjukeisolat,

og legge denne over på vekstmedium (1,25 % malt, 2 % agar) 0,5 – 1 cm ifra en utstaket, kjent prøve av henholdsvis *H. annosum* eller *H. parviporum* (figur 3). De to kjente kulturene som ble anvendt var:

- *Heterobasidion parviporum* (S type). Identifikasjonsnummer: 1987-257/1. Funnet på granstubbe i Spikkestad 26.05.87. Isolert av Olaug Olsen.
- *Heterobasidion annosum* (P type). Identifikasjonsnummer: 1997-378/3. Funnet på gran i Nord-Vestlandet 15.07.97. Isolert av Olaug Olsen.

Samme kulturen podes på fire skåler, hvor to skal testes mot *H. annosum* og to imot *H. parviporum*. Det var essensielt at kulturene det ble staket ut ifra var rene og i god vekst, og at de ble staket ut i like store biter ved hjelp av et spesiallaget huljern med diameter 5 mm, for deretter å bli lagt midt i petriskålen med hyfe siden vendt ned mot agaren. Den etterfølgende veksten ble studert etter 4-6 uker, men noen skåler kunne vurderes før dette. Ettersom man fant en opphopning av hyfer mellom de to individene, eller om det var en mer glidende overgang, ble arten bestemt (Korhonen 1978).



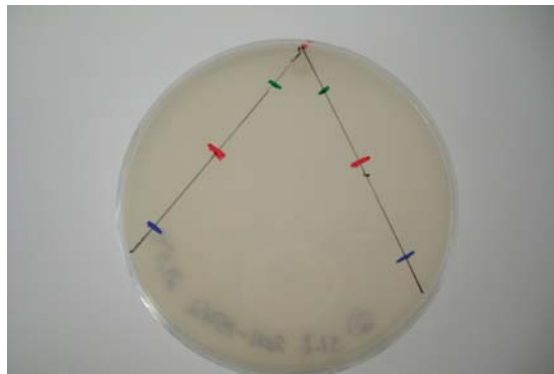
Figur 3. Til venstre blir isolat Ha 10 testet mot *H. parviporum*. Til høyre blir isolat Ha 10 testet mot *H. annosum*. Skålene har stått mørkt i romtemperatur i 4 uker. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Vekststudie

H. parviporum mycel ifra 10 kalkrike og 10 kalkfattige isolater ble podet for vekststudiet. Isolatene for vekststudiet ble valgt ut etter hvordan de var rangert på lista over kalkinnhold. Isolatene ifra de mest kalkfattige og de mest kalkrike områdene ble anvendt. I tillegg ble alle isolatene ifra skivene benyttet til kjemiske analyser, brukt i vekstforsøket (se vedlegg 1). Vekstmediet jeg anvendte besto av det samme blandingsforholdet av malt, agar og destillert vann som tidligere beskrevet (1,25

% malt, 2 % agar), men agaren ble imidlertid målt til 25 ml i de 9 cm store petriskåler ved hjelp av en "tipper". Dette for å skape likest mulig vekstvilkår for de ulike isolatene, og dermed bedre sammenligningsgrunnlag.

Inokulumet ble plassert med mycelet vendt ned mot agaren, og inn mot den ene sideveggen på petriskåla. Jeg podet to parallelle skåler ifra 20 ulike isolater som ble plassert ved tre forskjellige temperaturer; dette utgjorde tilsammen 120 skåler. Skålene ble podet på en torsdag, mens de ble streket opp med to streker på undersiden av skålen på fredagen før de deretter ble plassert i varmeskap ved de aktuelle temperaturene; 14,5 °C, 21,5 °C og 28 °C (figur 4). Jeg målte opp mycelveksten, langs de to markerte strekene på undersiden av skålen, etter 3, 7, 10 og 14 dager (figur 4). Jeg brukte ulike farger på pennene for hver av de 4 tidsperiodene (figur 4). Målingene ble gjort ved tilnærmet samme klokkeslett hver gang (på ettermiddagen). Mycelvekst utenfor de opptegnede merkene ble ikke målt. Siden det var to oppmerkede streker ble det to målinger for en skål, og siden det var to skåler ifra hvert isolat, medførte dette 4 målinger for hvert isolat.



Figur 4. Bildet viser veksten til *H. parviporum* (isolatnr 2011-150/2) tatt ifra kalkrikmark (pH 5,03) i Stange. Grønnmarkering viser veksten langs den på forhåndssatte svarte linjen etter 3 dager, rødmarkering viser etter 7 dager, mens blåmarkering viser etter 10 dager. Skålen har stått ved 21,5 °C. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

For å kontrollere og logge temperaturen i de ulike varmeskapene ble det anvendt en temperatur datalogger kaldt Lascar indikator, modell EL-usb-1-1cd. Denne logget temperaturen hver time, og viste at temperaturene var konstant gjennom hele forsøksperioden.

Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden

For å bestemme innholdet av kjemiske komponenter i de ulike deler av veden, ble det foretatt prøver ifra fryste stammeskiver infisert av *H. parviporum*. Det ble plukket ut 7 skiver fra kalkfattige områder,

og 7 skiver fra kalkrikmark (se vedlegg 1). Disse prøvene ble valgt ut etter markas kalkinnhold, og etter hvilke skiver som visuelt hadde markante soner. Fra en stammeskive ble det tatt 6 prøver, som vist i figur. Dette betyr at det til sammen var 84 prøver fordelt på 14 ulike skiver. Det ble tatt en prøve ifra yteveden (SW 1), to ifra reaksjonssonen (RZ 1 og 2), to ifra den misfargede veden rett innenfor reaksjonssonen, kaldt anilinved, (DW 1 og 2), og tilslutt en prøve ifra kjerneveden (HW). På noen av prøvene var det vanskelig å skille hvor de ulike grensene gikk, så for å vite i ettertid hvordan skivene så ut og hvor de ulike sonene ble satt til, ble alle skivene fotografert og fordelingen av de ulike sonene ble markert inn på bildene (figur 5). Prøve 2, 3, 4, og 5 ble tatt kontinuerlig innover i skivene, og hver av prøvene utgjorde 5 mm. I fra prøve 5 ble det målt 2 cm lengre inn i skiven, hvor prøve 6 ble tatt (figur 5).



Figur 5. Tallene viser hvor de ulike vedprøvene ble tatt i denne stubbeskiven fra kalkfattigmark (pH 4,16) i Nittedal. 1 viser hvor prøven for SW ble tatt, 2 er hvor prøven for RZ1 ble tatt, 3 er hvor prøven for RZ2 ble tatt, 4 er hvor prøven for DW1 ble tatt, 5 er hvor prøven for DW2 ble tatt, mens 6 er hvor prøven for HW ble tatt. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Først ble de ulike prøvene ifra stammeskivene grovoppdelt ved å anvende kniv, hammer og en hoggestabel, før de ble kuttet opp i finere biter ved hjelp av en hagesaks. De fint hakkede treprøvene og beholderne de skulle mortes i, ble i neste fase kjølt ned ved hjelp av flytende nitrogen (N_2), før de ble ristet i en Retsch MM300 (Retsch GmbH, Haan, Germany) mølle i 2 min ved maks hastighet (30 1/s). Tilslutt ble trepulveret helt over i mindre plastbeholdere og fryst ned igjen for å unngå kjemiske endringer. Under hele prosessen var det viktig med god merking av prøvene, og grundig rengjøring av utstyr mellom behandlingen av hver enkelt prøve, for å unngå kontaminering.

For de kjemiske analysene av veden, anvendte jeg metoder utarbeidet ved Skog og Landskap. 100 mg trepulver i fra hver prøve ble lagt i 4 ulike plastrør med skrukork for bestemmelse av: pH, grunnstoffanalyse, syreløselig oksalat og vannløselig oksalat. I tillegg ble tørrstoffet til alle prøvene beregnet ved at treprøvene sto natten over i digler i et varmeskap ved 105 ± 3 °C. Den påfølgende morgenen ble prøvene avkjølt til romtemperatur i en eksikator, før de igjen ble veid. Alle de veide subprøvene ble lagret ved -21 °C før de videre analysene.

Bestemmelse av pH i trepulver

Fremgangsmåten for bestemmelse av pH i trepulver er ganske lik metoden beskrevet for bestemmelsen av pH i jordprøver. 10 ml Milli-Q vann ble tilsatt beholderne hvor det var målt opp 100 mg trepulver, flaskene ble ristet godt og sto i romtemperatur fram til neste dag. På morgenen ble prøvene igjen ristet godt, før pH ble målt. Siden mengde innveid prøve og prøvens tørrstoff kan variere, måtte pH beregnes til innveid mengde 0,1 g tørr prøve.

Denne metoden gav ikke konsekvente resultater, og derfor ble metoden modifisert og alle pH målingene ble gjort på nytt. Denne gangen ble også 0,1 g trepulver veid opp i plastflasker, men nå ble de i stedet tilsatt 2 ml Milli-Q vann. Deretter ble de lagt 1 time på et "rullebrett" (The Coulter mixer), før de sto natten over. Prøvene ble lagt på "rullebrettet" for å få bedre kontakt mellom vannet og pulveret. Den videre fremgangen var lik som beskrevet over. For 5 av de 84 prøvene hadde jeg imidlertid ikke nok trepulver igjen, og måtte derfor anvende målingene gjort etter den første metoden.

Bestemmelse av oksalat/oksalsyre i treprøver

For å bestemme mengden vannløselig og syreløselig oksalat og oksalsyre i de soppinfiserte treprøvene, ble det anvendt en agilent væskekromatograf (HPLC) med autoinjektor og en Diode Array detektor. Oksalsyre hadde en retensjonstid på 7,5 minutter og ble detektert ved 210 nm. Kolonnen som ble anvendt var en Aminex HPX-87H HPLC for separasjon av organiske syrer (størrelse 300 mm × 7,8 mm) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Kolonnetemperaturen var 30 ° C. Mobilfasen som ble anvendt var 20 mM svovelsyre, og analysetiden for hver prøve var på 30 min. For å få fram en kalibreringskurve, ble det laget 9 standardløsninger bestående av ulike konsentrasjoner av oksalsyre. I tillegg ble prøvenes tørrstoff bestemt (etter metode NS 4764), og analyseresultatene ble korrigert i forhold til vedpulverets tørrvekt. Resultatene ble oppgitt som mg/g TS. Jeg gjorde alle

forarbeidene av prøvene, mens Monica Fongen gjorde selve HPLC analysen.

Bestemmelse av oksalsyre i treprøver etter vannekstraksjon

Hvert plastrør med innveid mengde trepulver ble tilsatt 1,5 ml Milli-Q vann. I tillegg ble det benyttet et blankt plastrør, og tre plastrør med kvalitetskontroll løsning av oksalsyre fortynnet med Milli-Q vann. Disse prøvene ble behandlet likt som de øvrige prøvene. Alle prøvene ble ristet ved å anvende en minishaker (Vortex – genie 2), før de ble satt på varmeblokk (Ori – Block, OB - 3) ved 100 °C i 18 min. Deretter ble prøvene avkjølt i romtemperatur, før de ble sentrifugert (Eppendorf centrifuge, 5415 R) i to minutter ved maks hastighet (16- 100 rpm). 0,75 ml av væsken ble overført til nye rør, og tilført 0,75 ml 0,2 M fosforløsning. Prøvene var så klare for HPLC analyse.

Bestemmelse av oksalat og oksalsyre i treprøver etter syreekstraksjon

Hvert plastrør med innveid mengde trepulver, ble tilsatt 1,5 mL 1 M saltsyre. Framgangsmåten var deretter lik som beskrevet over: "*Bestemmelse av oksalsyre i treprøver etter vannekstraksjon*", fram til prøvene var sentrifugert. Etter sentrifugering ble 0,15 mL væske overført på nye glass, og tilsatt 1,35 mL 0,111 M fosfatbuffer. Kvalitetskontroll løsningen besto her av oksalsyre fortynnet med saltsyre istedenfor Milli-Q vann. Prøvene var så klare for HPLC analyse.

Bestemmelse av grunnstoffer i treprøver

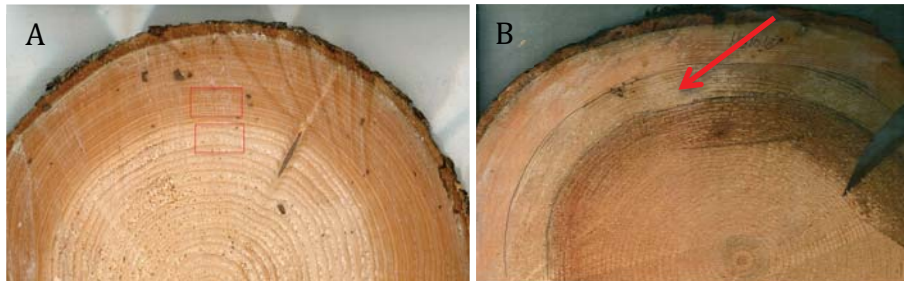
De oppveide treprøvene ble tilsatt 10 ml 0,1 M saltsyreløsning. Prøvene ble ristet og sto på laboratoriebenken natten over. Neste dag ble prøvene sentrifugert, før de ble filtrert igjennom en Acrodisc 25 mm filter. De var så klare for å bli analysert ved bruk av en ICP-OES. Monica Fongen utførte selve ICP-OES analysen.

Soppkultiveringstest

På Hadeland ble det innhentet stubbeskiver ifra nylig avvirkede bestand. Disse besto av en frisk prøve ifra hver marktype, og en prøve ifra hver marktype hvor råteomfanget av *H. parviporum* var omfattende og med en tydelig og bred reaksjonssone.

Ifra kjerne- og yteved hos de friske skivene ble det tatt ut en sone på ca. 1 cm. Prøven ifra yteveden hos friske skiver ble tatt i området som tilsvarer reaksjonssonen hos infiserte stubber (figur 6). Fra de infiserte skivene ble det tatt ut en sone ifra yteveden og hele sonen med reaksjonssoneved. Disse to

sonene, som ble tatt ut ifra de infiserte skivene, vil variere litt i størrelse, da dette er avheng av bredden til reaksjonssonen og avstanden ifra denne til barken (figur 6).



Figur 6. Bilde A viser hvor yteved- og kjerneved prøver ble tatt hos en frisk skive (markert med en rød boks). Bilde B viser en oppmerket reaksjonssone (vist med rød pil). Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Metoden for å pulverisere treprøvene er lik den som er beskrevet under avsnittet: *"Kjemiske analyser av de ulike sonene i veden"*. Denne gangen benyttet jeg imidlertid i tillegg en kaffekvern (Krups, F 203), for bedre å flise opp treprøvene før flytende nitrogen ble anvendt.

Fra hver stubbeskive fikk jeg minst 50 g pulver per vevstype. Disse ble så pakket i mindre plastikkposer. Hver pose ble fylt med ca. 10 g trepulver, før den ble forseglet med en impulsseiser. Disse ble så lagt i en ny plastpose som igjen ble forseglet, for deretter å bli sendt til stråling ved Gammaavdelingen ved Instituttet for Energiteknikk på Kjeller. Her fikk trepulveret en dose på 30,1 kGy, noe som medførte at trepulveret ble sterilt. Etter strålingen ble pulveret inoculert med rotkjukeisolater fra kalkrik- og kalkfattig mark for å studere deres effekt på pH og produksjon av oksalsyre.

Inokulering

Mycel ifra 8 isolater (10 skåler for hvert isolat) ble podet to uker før inokulasjon. Isolatene hadde vokst på medium bestående av 1,25 % malt, 2% agar, og var lagret mørkt i romtemperatur. Disse 8 isolatene besto av 4 isolater ifra kalkfattig mark, og 4 ifra kalkrik mark (se vedlegg 1). Videre hadde jeg 8 ulike gamma sterile trepulvere (1: yteved kontroll fra kalkfattig mark, 2: yteved kontroll ifra kalkrikmark, 3: kjerneved kontroll ifra kalkfattig mark, 4: kjerneved kontroll ifra kalkrik mark, 5: yteved ifra rotkjukeinfiserttre ifra kalkfattig mark, 6: yteved ifra rotkjukeinfiserttre ifra kalkrikmark, 7: reaksjonssoneved ifra kalkfattig mark, 8: reaksjonssoneved ifra kalkrikmark). Jeg lagde to duplikater,

noe som tilsammen utgjorde 128 skåler (8×8×2) (figur 7).

Det ble laget 2 liter Hagem medium etter følgende oppskrift: 0,4 g NH_4NO_3 , 1 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,076 g (200 μM) $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1,6 ml $\text{Fe(II)Cl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (1 % væske blanding) og 4 g malt ekstrakt (Bacto). PH 'en ble justert til 4,5 med 1 M H_2SO_4 . Deretter ble væsken autoklavert før den ble tilsatt konidier ifra de 8 ulike isolatene.

Hver av isolatskålene ble tilsatt Hagem medium, rørt litt rundt før væsken med mycelet ble tatt opp ved å bruke en pipette. Væsken ble så lagt over på hver sin flaske, slik at en flaske besto kun av konidier ifra ett isolat. Dette gav 8 ulike flasker med Hagem medium. Pr ml Hagem medium skulle det være ca 150 000 konidier ifra *H. parviporum*. Dette ble justert etter den flasken bestående av færrest konidier ved å tilsette mer Hagem medium i de flaskene som inneholdt flere konidier. Konidiene ble telt ved å anvende en Bürkers regnekammer. Dette regnekammeret gav et grovt estimat over antall konidier.

Målene som ble anvendt var 350 mg sterilt trepulver oppveid i 5 cm petriskåler og tilsatt 3, 1 ml Hagem medium bestående av ca 150 000 konidier per ml. Skålene ble forseglet ved å anvende parafilm, før de ble satt i et varmeskap. Det ble anvendt en digital termaturmåler (Lascar) for å logge og kontrollere varmeskapets temperatur. Temperaturloggeren viste at varmeskapet holdt mellom 21- 21,5 °C. Etter en måned ble alle skålene tatt ut av varmeskapet (figur 7), og studert i mikroskop (Leica DMR – Wetzlar, Germany) for visuelle forskjeller. Deretter ble alle prøvene tørrfryst i et døgn ved å benytte en Heto Drywinner, for deretter å bli lagt i en eksikator. Dette for at prøvenes tørrvekt skulle bli anvendt i den påfølgende oppveingen av prøvene for pH bestemmelse og HPCL analyse.

Som kontrollprøver anvendte jeg det gamma sterile trepulveret fra de ulike treskivene og vedsonene, som ikke hadde blitt tilsatt Hagem medium eller konidier. Jeg hadde to replikater ifra hver vedtype, noe som gav 16 kontrollprøver (8x2).



Figur 7. Alle de inokulerte skålene etter en måned i varmeskap ved 21, 5 °C. Den horisontale rekken til venstre består av alle prøvene ifra vedtype 1 (yteved kontroll ifra kalkfattig mark), og kontinuerlig bortover kommer alle vedprøvene hvor vedprøve 8 (reaksjonssoneved ifra kalkrikmark) er lengst til høyre. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Bestemmelse av pH i prøvene

50 mg pulver ifra hver av skålene ble målt opp og tilsatt 2 ml Milli-Q vann. Fremgangsmåten er lik som for den sist nevnte pH metoden beskrevet under avsnittet: *"Bestemmelse av pH i trepulver"*.

Bestemmelse av organiske syrer i prøvene

50 mg pulver ifra hver skål ble målt opp i to plastbegre med skrukork for å kunne måle vannløselig, og syreløselig oksalat. I tillegg ønsket jeg å se på tilstedeværelsen av eventuelt andre organiske syrer som det er kjent at hvitråtesopp kan skille ut under nedbrytning av tresubstrat (Mäkelä 2009). I tillegg til oksalsyre ønsket jeg å se på citric syre, tartaric syre, glyoxylic syre, malic syre, malonic syre, succinic syre, formic syre, acetic syre og fumaric syre. Den videre framgangsmåten er lik som beskrevet over under kapittelet *"Bestemmelse av oksalat/oksalsyre i treprøver"*. I tillegg til standarder av oksalsyrer, ble det her laget en standard for hver av de andre organiske forbindelsene. Oksalatresultatene ble oppgitt som µg/g TS. I dette forsøket ble det ikke foretatt en bestemmelse av de ulike grunnstoffene i prøvene.

Statistikk

Alle beregningene er gjort i excel (Microsoft Office 2010, versjon 14.2.3).

Resultater

Råtetelling

Etter visuell bedømming av 1317 granstubber etter hogst, fordelt på 36 bestand, ble rotkjuka, *H. annosum* s. l., påvist som den dominerende årsaken til råde, noe som framgår av tabell 2. Rotkjuka ble alene eller som kombinasjonsråde (hvor rotkjuka opptrer sammen med honningsopp) registrert i 71,76 % av de råtne stubbene. Denne råderegistreringen gav en gjennomsnittlig rådefrekvens på 35,76 % for alle de aktuelle områdene (tabell 2). Høyest rådefrekvens ble funnet på Hadeland hvor 44,09 % av alle stubbene var rådebefengte etter slutthogst, mens den laveste rådefrekvens ble registrert i Nittedal/Skedsmo hvor 29,25 % av stubbene var rådebefengte (tabell 2). Honningsopp- og rotkjuke opptrer i samme stubbe 22,93 % som kombinasjonsråde, noe som innebærer at honningsopp er den nest meste forekommende råten etter rotkjuke. Det er hovedsakelig topprâtesoppen (*Stereum sanguinolentum* (Alb. & Schw. Ex Fr.) Schw.) som er den dominerende sårâtesoppen i norske granskoger, men det forekommer også andre sårâtepatogener under denne kategorien.

Tabell 2. Rådefrekvens (%) fordelt på områder og råtetyper. Råten er visuelt vurdert på granstubber etter hogst.

Rådefrekvens for områdene							
	Antall felt/antall stubber	Rotkjukeråde	Honningsopp- råde	Kombinasjonsråde*	Såråde**	Annen råde	Råde total
Nittedal/Skedsmo	9 / 359	16,43	5,29	3,06	1,95	2,51	29,25
Hadeland	7 / 254	35,83	7,09	0,00	0,00	1,18	44,09
Hedemarken	10 / 345	23,77	5,51	1,45	0,00	1,16	31,88
Ringsaker	10 / 359	29,53	8,36	1,67	0,28	0,28	40,11
Sum	36 / 1317	25,66	6,53	1,67	0,61	1,29	35,76

*Honningsopp og rotkjuke opptrer i samme stubbe

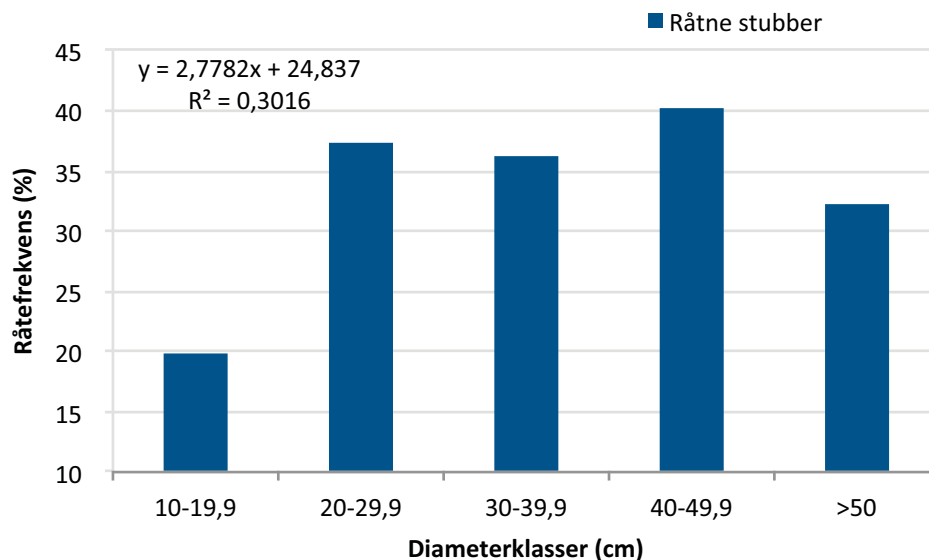
**Topprâtesoppen er den dominerende sårâten, men herunder inngår også andre sårâtepatogener

I 6,76 % av de rådebefengte stubbene var rådeutbredelsen mer enn 80 % av snittflata, mens hos de fleste av de rådebefengte stubbene var omfanget mellom 51-80 % av stubbediameteren (tabell 3).

Tabell 3. Rådefrekvens (%) fordelt på råtetyper og råtediameter.

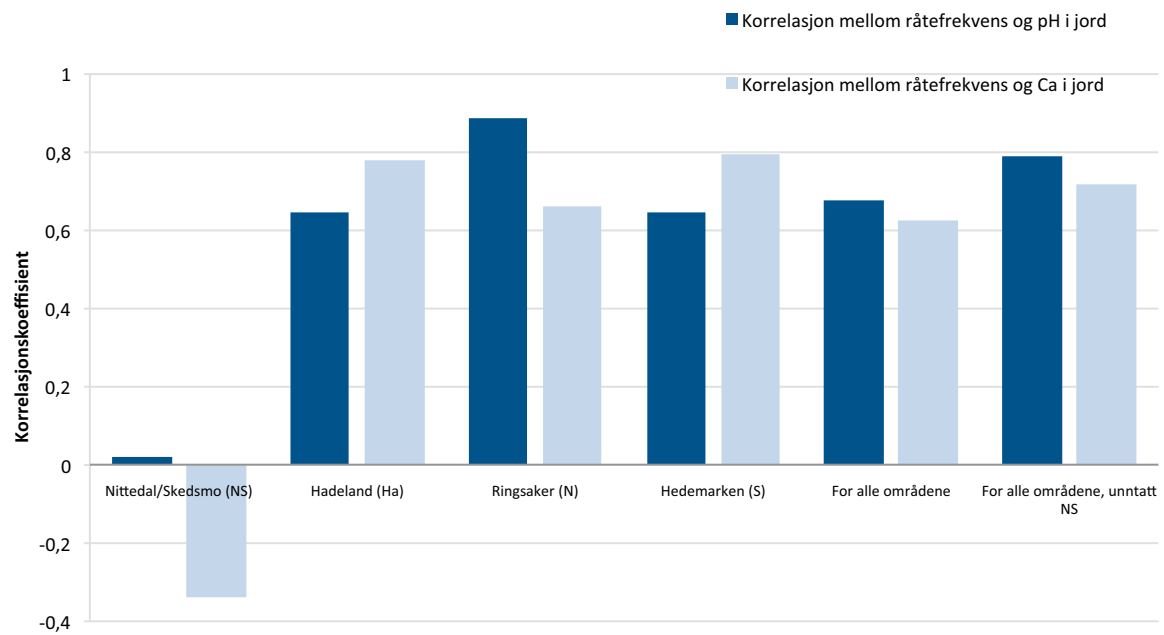
Rådefrekvens (%) fordelt på råtetyper og råtediameter						
Råtediameter i % av stubbediameter	Rotkjukeråde	Honningsopp- råde	Kombinasjonsråde	Såråde	Annen råde	Råde total
0 - 10 %	0,46	1,97	0,00	0,00	0,23	2,66
11 - 25 %	2,96	1,06	0,23	0,38	0,30	4,94
26 - 50 %	4,40	1,14	0,23	0,08	0,30	6,15
51 - 80 %	11,77	2,13	1,06	0,08	0,23	15,26
81 - 100 %	6,07	0,23	0,15	0,08	0,23	6,76
Sum	25,66	6,53	1,67	0,61	1,29	35,76

Råtefrekvensen øker med økende stubbediameter, før den igjen avtar ved stubbediameter over 50 cm (figur 8). Denne sammenhengen er relativ god med en R^2 på 0,3 (figur 8). Denne trenden ser imidlertid ut til å være forskjellig mellom rotkjuke og honningsopp, da frekvensen av rotkjuke øker med økende diameter, mens honningsopp ble hyppigst funnet i de lavere diameterklassene. Videre viste resultatene mine en tendens til økende råte ved bedret bonitet (gjennomsnittlig råte ble 28,51 % på G 14, 39,91 % på G 17, 44,33 % G 20 og 47,30 % på G 23).

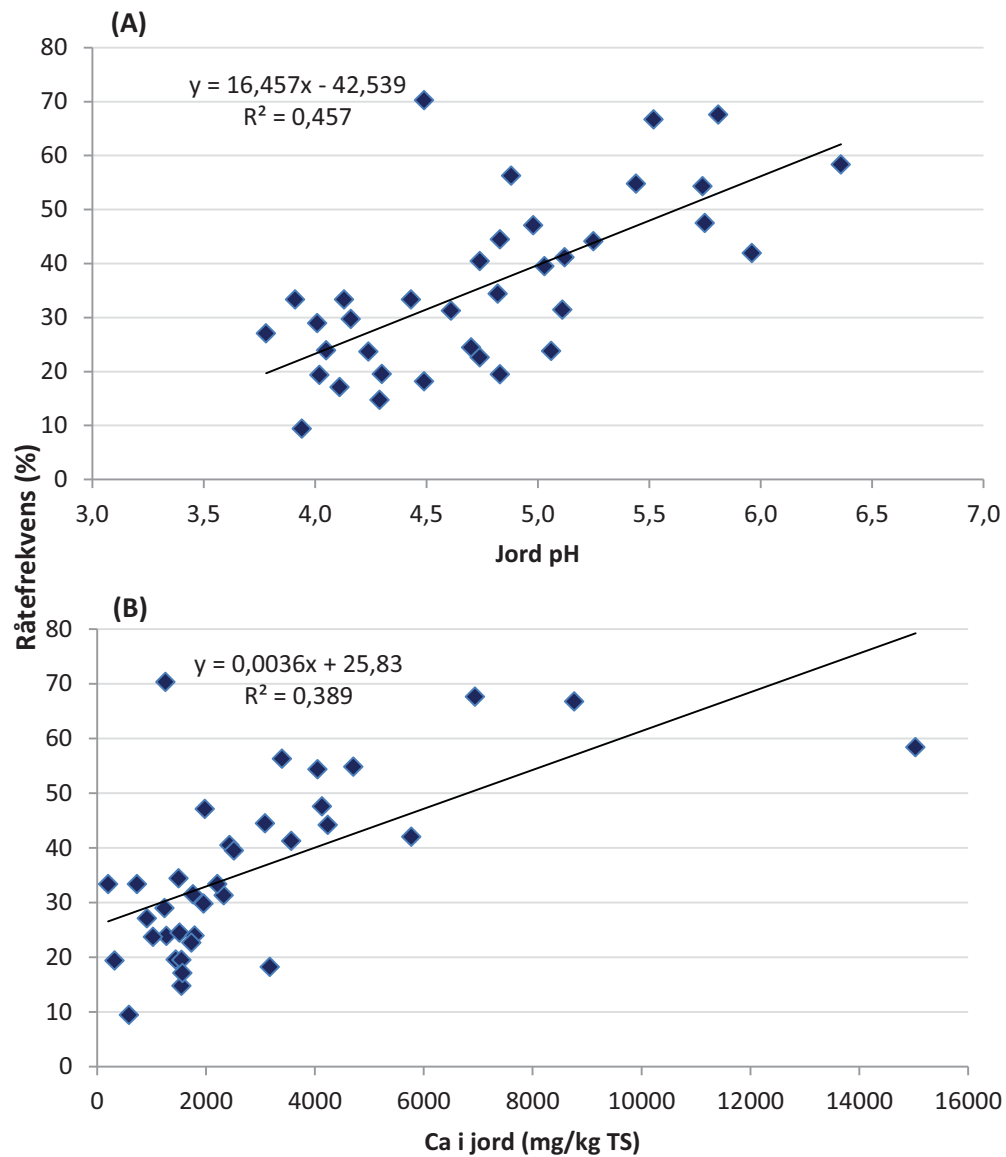


Figur 8. Råtefrekvens (%) fordelt på diameterklasser for alle områdene sett under ett (diameteren målt på stubben), og den kvadrerte korrelasjonskoeffisienten.

For hele materialet ble det funnet en korrelasjonskoeffisient mellom råtefrekvens og pH i jord på 0,68 (figur 9 og 10). Dette betyr at 46 % av variasjonen i råtefrekvensen kan tilskrives variasjoner i jord pH (R^2 på 0,46). Korrelasjonskoeffisienten mellom råtefrekvensen og Ca innhold i jord var på 0,62, dvs. at variasjonen i jordas Ca innhold kan forklare 39 % av variasjonen i råtefrekvensen (figur 9 og 10). Figur 9 viser at jeg ikke fikk en god korrelasjon mellom råtefrekvens og pH- eller Ca innholdet i jorda for bestandene jeg undersøkte i Nittedal/Skedsmo. Ser jeg bort ifra disse områdene blir korrelasjonskoeffisienten mellom pH i jorden og råtefrekvensen på 0,79 (R^2 på 0,62), mens mellom råtefrekvens og Ca innhold på 0,72 (R^2 på 0,52).

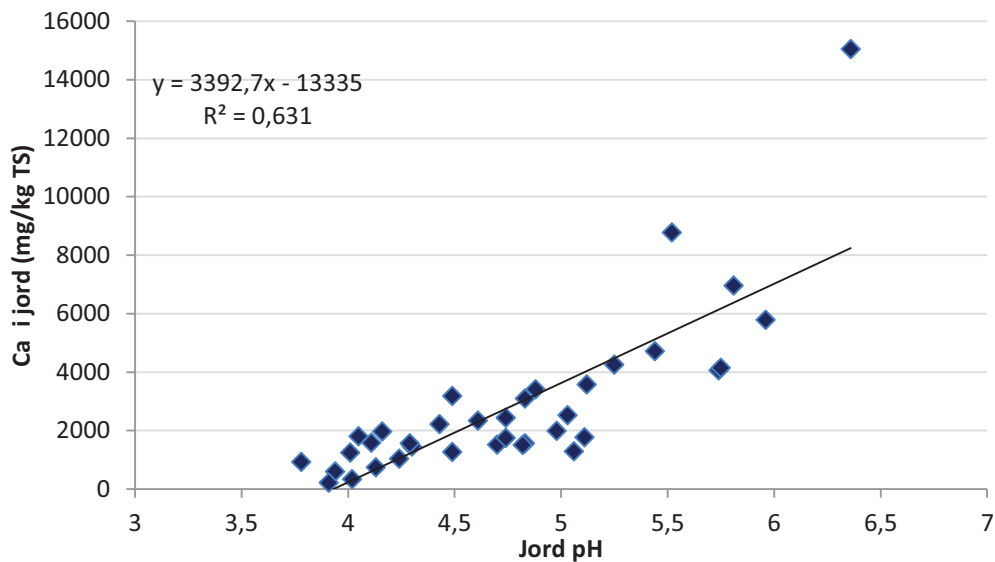


Figur 9. Korrelasjonskoeffisienten mellom råtefrekvens (%), og pH- og kalsium (Ca) innhold i jord for de undersøkte områdene.



Figur 10. Forhold mellom pH i jord og råtefrekvens (%) (A), og mellom råtefrekvens (%) og jordas Ca innholdet (B), for de undersøkte områdene. Framstilt med lineær regresjon og den kvadrerte korrelasjonskoeffisienten.

For hele materialet mitt var korrelasjonskoeffisienten mellom pH- og Ca innhold i jorda på 0,79 (kvadrert koeffisient på 0,63) (figur 11).



Figur 11. Forhold mellom jord pH og kalsium (Ca) innholdet i jord for de undersøkte områdene. Framstilt med lineær regresjon og den kvadrerte korrelasjonskoeffisienten.

Isolering

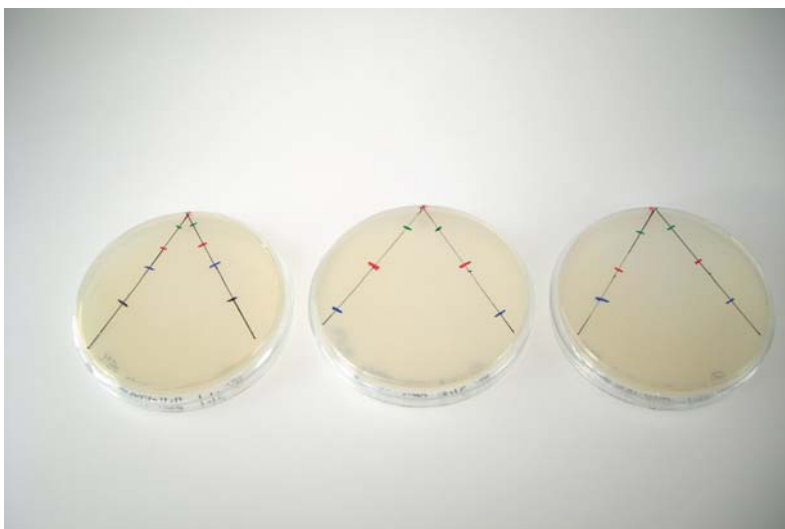
H. annosum s. l. er forholdsvis lett isolerbar og gav oftest oppvekst på første forsøk. Det var imidlertid 5 bestand, av til sammen 43 bestand, hvor jeg ikke fikk fram vellykkede rotkjukeisolater. Det ble påvist forekomst av rotkjuke på 72 av de 94 innhentede stubbeskivene. For å bestemme om det var rotkjuke ble det sett etter typiske kjennetegn som lange mycelstrenger, knappeformede konidiebærere og lyst mycel (figur 12). Etter en tid kunne imidlertid mycelet bli mørkebrunt. Det var i alt 45 isolater som ble testet mot henholdsvis *H. annosum* (P type) og *H. parviporum* (S type). Var de to isolatene av forskjellig art så man en kompakt opphopning der mycelene møttes, men var det derimot snakk om samme art ville det bli et skille mellom mycelmattene. Alle isolatene jeg testet ble bestemt til arten *H. parviporum*.



Figur 12. Til venstre er det oppvekst av rotkjuke, *Heterobasidion parviporum*, hvor man godt ser de lange mycelstrengene. Bilde i midten viser alle konidiebærerne som er formet som knappehoder, noe som er karakteristisk for rotkjuke. Til venstre ser man en konidiebærer uten konidier. Alle bildene viser skåler som har stått mørkt i romtemperatur i 3 mnd. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

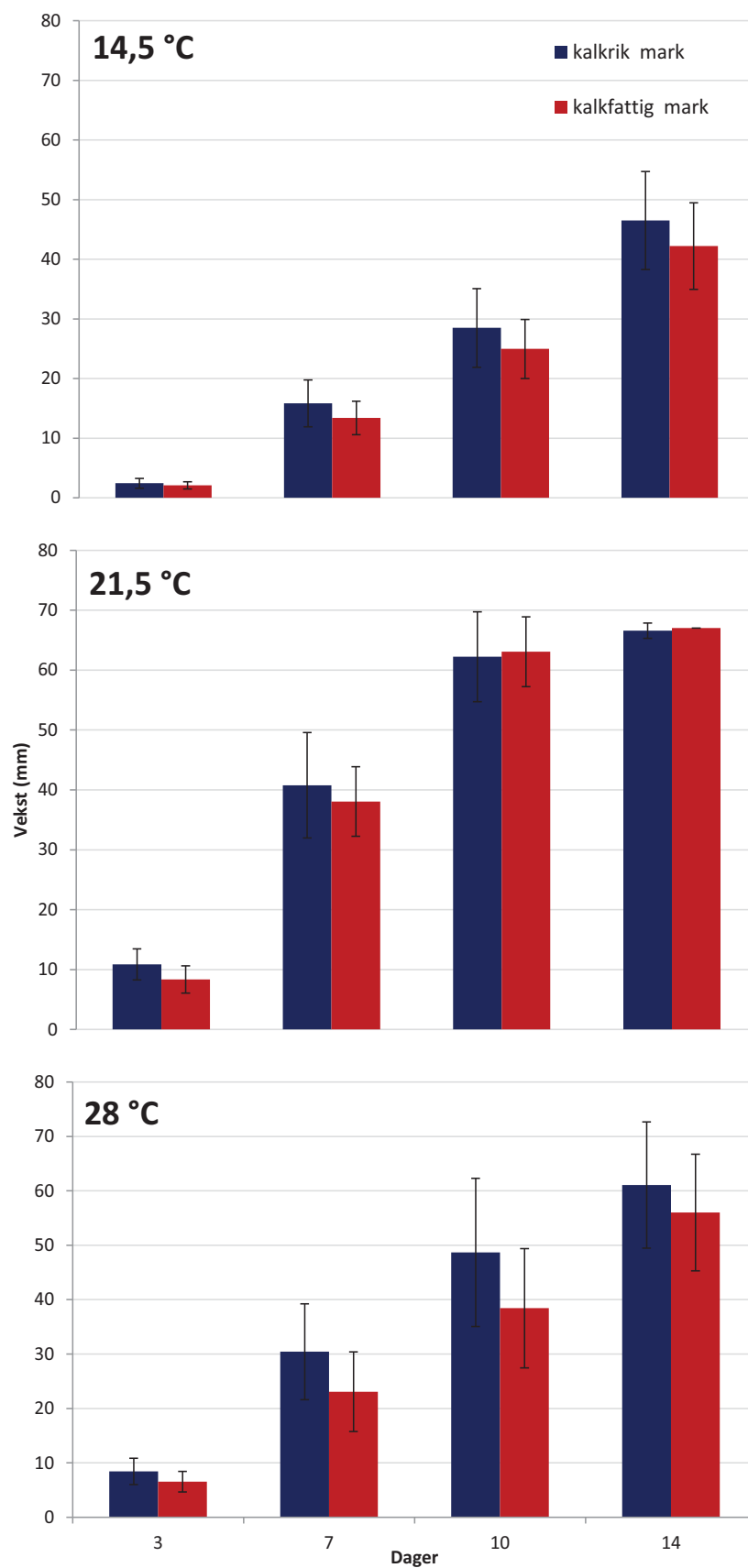
Vekststudie

I vekststudiet ble vekstgraden til isolater ifra kalkrik- og kalkfattigmark på agar sammenlignet og målt ved ulik 3 temperaturer; 14,5 °C, 21,5 °C og 28 °C etter 3 dager (markert med grønn penn), 7 dager (rød penn), 10 dager (blå penn) og 14 dager (svart penn) (figur 13). Det var stort sett bare skåler plassert ved 14, 5 °C hvor isolatet ikke hadde vokst helt ut til kanten av skålen etter 14 dager (figur 13).



Figur 13. Vekstforsøket illustrert ved veksten til isolat S1.1 (2011-150/2) fra Stange (pH 5,03) ved henholdsvis 14,5 °C (til venstre), 21,5 °C (i midten) og 28 °C (til høyre). Veksten er markert med grønn penn langs den på forhånd satte linjen etter 3 dager, rød markering markerer veksten oppnådd etter 7 dager, blå markering er etter 10 dager, mens svart markering viser veksten etter 14 dager. Foto: Ellen Cathrine Burchardt.

Figur 14 viser at det ikke er en forskjell mellom isolatenes vekst, og hvilken marktype isolatet kom fra. Dette kan bl.a. illustreres ved de overlappende standardavvikene på grafene (figur 14). Det er imidlertid en svak tendens til at isolater ifra kalkrikmark hadde en gjennomsnittlig raskere vekst (figur 14). I dette vekstforsøket vokste isolatene best ved 21,5 °C, og dårligst ved 14,5 °C (figur 14). Isolatene som vokste ved 28 °C hadde en mellomliggende vekstgrad (figur 14).



Figur 14. Sammenligning av vekstgrad hos isolater ifra kalkrik/kalkfattigmark på agar, målt ved tre ulike temperaturer; 14,5 °C, 21,5 °C og 28 °C.

Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden

Resultatene av analysene av pH i jord ble samholdt med resultatene av analysene av grunnstoffer i veden. Dette viste at desto surere jorda er, desto mer av de fleste grunnstoffene finnes i vedsonene (tabell 4). I yteved (SW) er korrelasjonskoeffisienten høyest mellom jord pH og grunnstoffene aluminium (Al) (-0,81), magnesium (Mg) (-0,65), arsen (As) (-0,61), bly (Pb) (-0,50), jern (Fe) (-0,48) og mangan (Mn) (-0,45) (tabell 5). I RZ1 (reaksjonssonen) er korrelasjonskoeffisienten også forholdsvis høy, mens den er mye lavere i vedsonene RZ2, DW1-2 (anilinved) og HW (kjerneved). Dette gjelder ikke grunnstoffet Pb og kobolt (Co). Korrelasjonskoeffisienten mellom jord pH og Co var høyest i HW. Ut fra tabell 4 ser man også at det ikke er en god korrelasjonskoeffisient mellom jord pH og oksalat innhold i veden.

Tabell 5 viser at det er høyest korrelasjonskoeffisient mellom SW og DW1 for kadmium (Cd) (0,86), bly (Pb) (0,83) og sink (Zn) (0,83). Tabell 5 viser også at noen ukvadrerte korrelasjonskoeffisientene er negative. Det er imidlertid en positiv korrelasjonskoeffisient mellom yteved og patologisk ved for de fleste av grunnstoffene, og spesielt grunnstoffene arsen (As), kadmium (Cd), kobber (Cu), mangan (Mn), bly (Pb), silisium (Si) og sink (Zn) har gode korrelasjonskoeffisient i alle vedsonene (tabell 5).

Det framgår av tabell 6 at det er høyest korrelasjonskoeffisient mellom syreløselig oksalat og grunnstoffene kalsium (Ca) (0,85), magnesium (Mg) (0,70) og mangan (Mn) (0,69) i DW1. Tabell 6 viser også hvilke ukvadrerte korrelasjonskoeffisientene som er negative (tabell 6).

pH målingen i de ulike vedsonene viste at det var høyest pH i reaksjonssonen (gjennomsnittlig pH 6,2), mens i kjerneved var den lavest (gjennomsnittlig pH 5,37) (figur 15). Jeg registrerte ikke større forskjell i pH mellom SW, DW1-2 og HW. Imidlertid viste noen målinger i HW en pH på under 5, noe ingen av de andre sonene hadde. Det ble ikke påvist forskjell mellom vedprøver ifra kalkrik- og kalkfattigmark, men det var en tendens til at vedprøver fra kalkrikmark hadde en høyere pH i reaksjonssonen, mens vedprøver fra kalkfattigmark hadde en høyere pH i DW2 og HW. Standardavviket er imidlertid ganske høyt for disse målingene, og følgelig kan ikke en sikker slutning trekkes.

Det var høyest konsentrasjoner av oksalat i DW1 sonen (figur 15). Det var i gjennomsnitt 5,49 mg/g syreløselig oksalat i DW1, mens for vannløselig oksalat var verdien 2,36 mg/g. Konsentrasjonen av oksalat var lavest i SW, og økte gradvis til DW, før den igjen avtok inn mot HW. Det er en svak tendens til at prøver ifra kalkfattigmark hadde høyere oksalat mengder i DW1, men som det framgår

av standardavviket vist i figur 15, så er det en klar overlapp av oksalatkonsentrasjoner mellom vedprøver ifra kalkrik- og kalkfattigmark.

De fleste av grunnstoffene viste høyest konsentrasjoner i DW1 sonen, med unntak av bl.a. fosfor (P) som hadde høyest konsentrasjon i SW. For å se alle grunnstoffenes konsentrasjoner i de ulike vedsonene se vedlegg 3. I figur 16 er grunnstoffene kalsium (Ca), magnesium (Mg) og mangan (Mn) framstilt. Trær ifra kalkfattigmark hadde som gjennomsnitt noe høyere generell grunnstoffinnhold enn trær ifra kalkrikmark, men det foreligger store variasjoner i datagrunnlaget (figur 16).

Tabell 4. Kvadrert korrelasjonskoeffisient (R^2) og korrelasjonskoeffisient av jord pH i forhold til grunnstoff og oksalat konsentrasjoner i de ulike vedsoner (yteved (SW), reaksjonssone (RZ1-2), anilinved (DW1-2) og kjerneved (HW)) i rotkjukeinfiserte trær fra kalkfattig og kalkrik mark. Tabellen er organisert etter korrelasjonskoeffisienten mellom jord pH og grunnstoff/oksalat konsentrasjonen i yteveden (SW).

Kvadrert korrelasjon av jord pH i forhold til grunnstoff og oksalat konsentrasjoner i vedprøver						
	SW	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW
Al	0,65	0,51	0,09	0,07	0,04	0,17
Mg	0,42	0,16	0,00	0,02	0,01	0,01
As	0,37	0,21	0,34	0,02	0,26	0,09
Pb	0,25	0,44	0,55	0,35	0,41	0,27
Fe	0,23	0,19	0,00	0,00	0,16	0,01
Mn	0,20	0,10	0,06	0,03	0,10	0,10
B	0,18	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01
Na	0,15	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01
Si	0,13	0,07	0,02	0,01	0,03	0,02
Cr	0,13	0,47	0,40	0,21	0,20	0,12
S	0,11	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00
Zn	0,08	0,14	0,00	0,06	0,21	0,03
oksalat (sl)*	0,06	0,04	0,09	0,03	0,09	0,08
oksalat (vl)*	0,05	0,00	0,07	0,01	0,01	0,03
Co	0,05	0,11	0,02	0,04	0,10	0,54
K	0,04	0,00	0,06	0,02	0,02	0,04
Ni	0,04	0,17	0,15	0,04	0,44	0,16
Ca	0,03	0,05	0,08	0,05	0,14	0,03
Cu	0,01	0,19	0,05	0,05	0,25	0,04
P	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
Cd	0,00	0,01	0,03	0,00	0,03	0,00
Se	0,08	0,10	0,09	0,10	0,00	0,13
Korrelasjonskoeffisient av jord pH i forhold til grunnstoff og oksalat konsentrasjoner i vedprøver						
	SW	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW
Al	-0,80	-0,71	-0,30	-0,27	-0,21	-0,41
Mg	-0,65	-0,40	0,07	-0,13	-0,09	-0,08
As	-0,61	-0,46	-0,59	-0,16	-0,51	-0,30
Pb	-0,50	-0,66	-0,74	-0,59	-0,64	-0,52
Fe	-0,48	-0,44	0,06	0,03	-0,40	-0,08
Mn	-0,45	-0,32	-0,24	-0,18	-0,32	-0,32
B	-0,43	-0,01	-0,01	-0,07	0,21	0,08
Na	-0,38	-0,04	0,07	0,05	0,16	-0,07
Si	-0,36	-0,27	-0,13	-0,11	-0,18	-0,13
Cr	-0,36	-0,69	-0,63	-0,46	-0,44	-0,35
S	-0,33	-0,01	0,11	0,02	0,14	0,06
Zn	-0,29	-0,37	0,05	-0,24	-0,45	-0,17
oksalat (sl)*	-0,25	0,20	0,30	-0,17	-0,29	-0,28
oksalat (vl)*	-0,22	0,06	0,27	0,08	0,09	-0,16
Co	-0,22	-0,33	-0,15	-0,20	-0,32	-0,73
K	-0,20	0,01	0,25	0,16	0,13	0,19
Ni	-0,19	-0,41	-0,38	-0,21	-0,66	-0,39
Ca	-0,17	0,22	0,28	-0,22	-0,38	-0,16
Cu	-0,12	-0,44	-0,22	-0,23	-0,50	-0,20
P	-0,04	0,02	0,12	-0,01	-0,10	0,02
Cd	-0,04	-0,11	0,17	0,03	-0,18	-0,06
Se	0,29	-0,32	-0,30	-0,32	-0,06	-0,36

* sl, syreløselig; vl, vann løselig

Tabell 5. Kvadrert korrelasjonskoeffisient (R^2) og korrelasjonskoeffisient av grunnstoff og oksalat konsentrasjoner mellom yteved (SW) og patologisk ved (reaksjonssone; RZ1-2, anilinved; DW1-2 og kjerneved; HW) i rotkjukeinfiserte trær fra kalkrik og kalkfattig mark. Tabellen er organisert etter korrelasjonskoeffisienten mellom grunnstoff og oksalat konsentrasjoner i anilinved 2 (DW2).

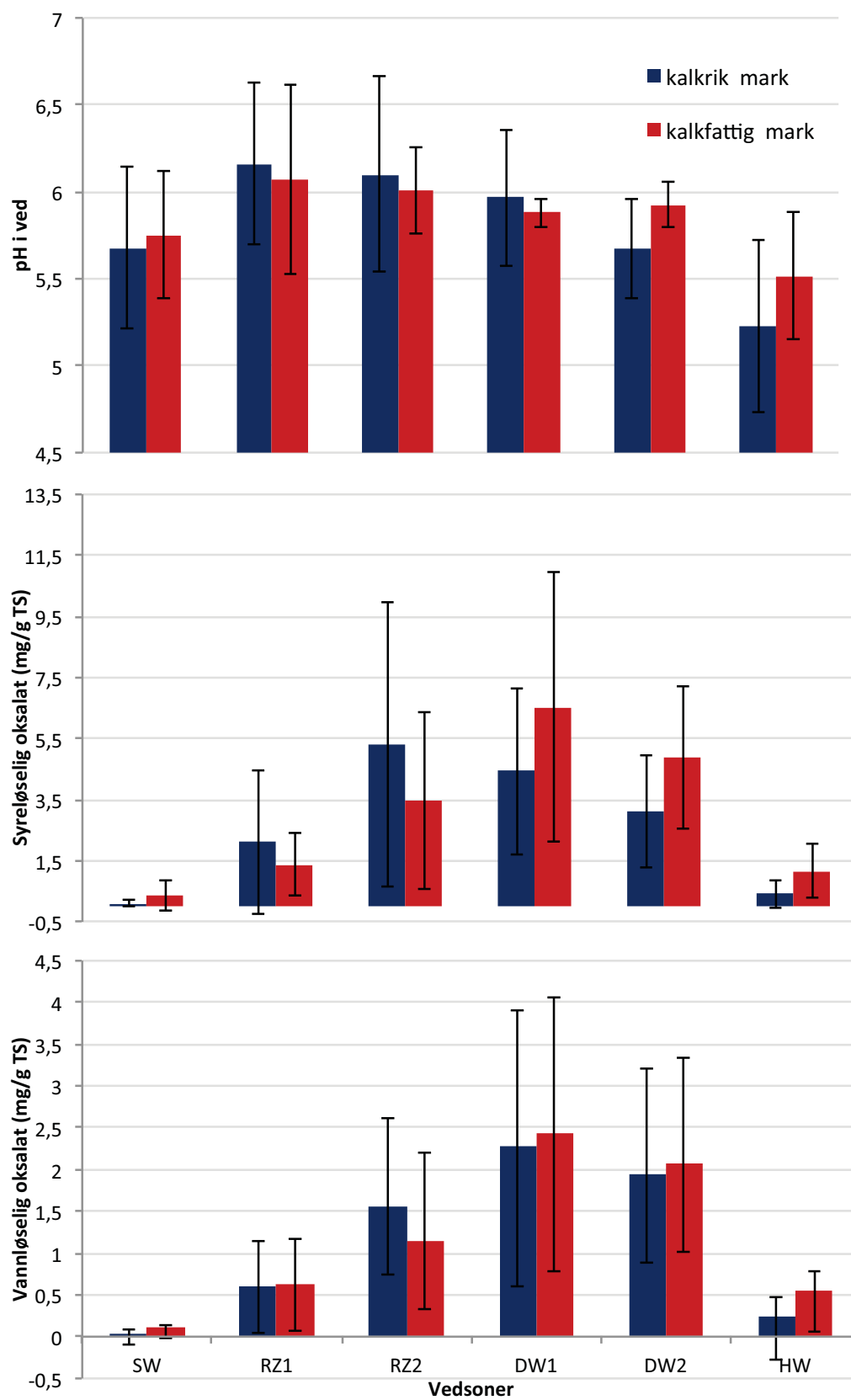
Kvadrert korrelasjon av grunnstoff og oksalatkonsentrasjoner mellom yteved og patologiskved					
	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW1
Cd	0,20	0,63	0,74	0,62	0,59
Pb	0,53	0,74	0,69	0,40	0,76
Zn	0,10	0,45	0,68	0,69	0,62
Si	0,67	0,63	0,59	0,52	0,26
Mn	0,33	0,65	0,59	0,68	0,90
B	0,50	0,30	0,51	0,20	0,07
Na	0,33	0,26	0,49	0,37	0,08
oksalat (sl)*	0,09	0,12	0,44	0,17	0,00
Ni	0,43	0,49	0,38	0,28	0,20
P	0,70	0,54	0,38	0,15	0,01
S	0,31	0,29	0,34	0,43	0,17
Fe	0,35	0,19	0,30	0,18	0,05
oksalat (vl)*	0,15	0,08	0,29	0,11	0,08
Se	0,25	0,11	0,29	0,10	0,08
Ca	0,05	0,20	0,21	0,00	0,00
As	0,63	0,60	0,21	0,71	0,48
Cu	0,59	0,64	0,17	0,22	0,46
Cr	0,19	0,00	0,15	0,07	0,10
Co	0,35	0,63	0,12	0,48	0,32
K	0,07	0,06	0,10	0,19	0,02
Mg	0,05	0,00	0,01	0,01	0,10
Al	0,39	0,01	0,00	0,00	0,08
Korrelasjonskoeffisient av grunnstoff og oksalatkonsentrasjoner mellom yteved og patologiskved					
	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW1
Cd	0,45	0,80	0,86	0,79	0,77
Pb	0,73	0,86	0,83	0,63	0,87
Zn	0,32	0,67	0,83	0,83	0,79
Si	0,82	0,79	0,77	0,72	0,51
Mn	0,57	0,80	0,77	0,83	0,95
B	0,70	0,55	0,72	0,44	0,27
Na	0,57	0,51	0,70	0,61	0,29
oksalat (sl)*	-0,29	0,35	0,66	0,42	0,02
Ni	0,66	0,70	0,62	0,53	0,45
P	0,84	0,74	0,61	0,39	0,09
S	0,55	0,54	0,59	0,65	0,42
Fe	0,59	0,43	0,55	0,42	0,23
oksalat (vl)*	-0,38	-0,29	0,54	0,33	-0,29
Se	-0,50	0,34	0,54	0,31	0,28
Ca	-0,22	0,45	0,46	0,03	0,07
As	0,79	0,78	0,46	0,84	0,69
Cu	0,77	0,80	0,41	0,47	0,68
Cr	0,44	-0,04	0,39	0,26	0,31
Co	0,59	0,79	0,35	0,70	0,56
K	0,27	0,25	0,32	0,44	0,14
Mg	0,23	-0,05	0,07	0,09	0,32
Al	0,62	0,09	0,07	0,06	0,28

* sl, syreløselig; vl, vann løselig

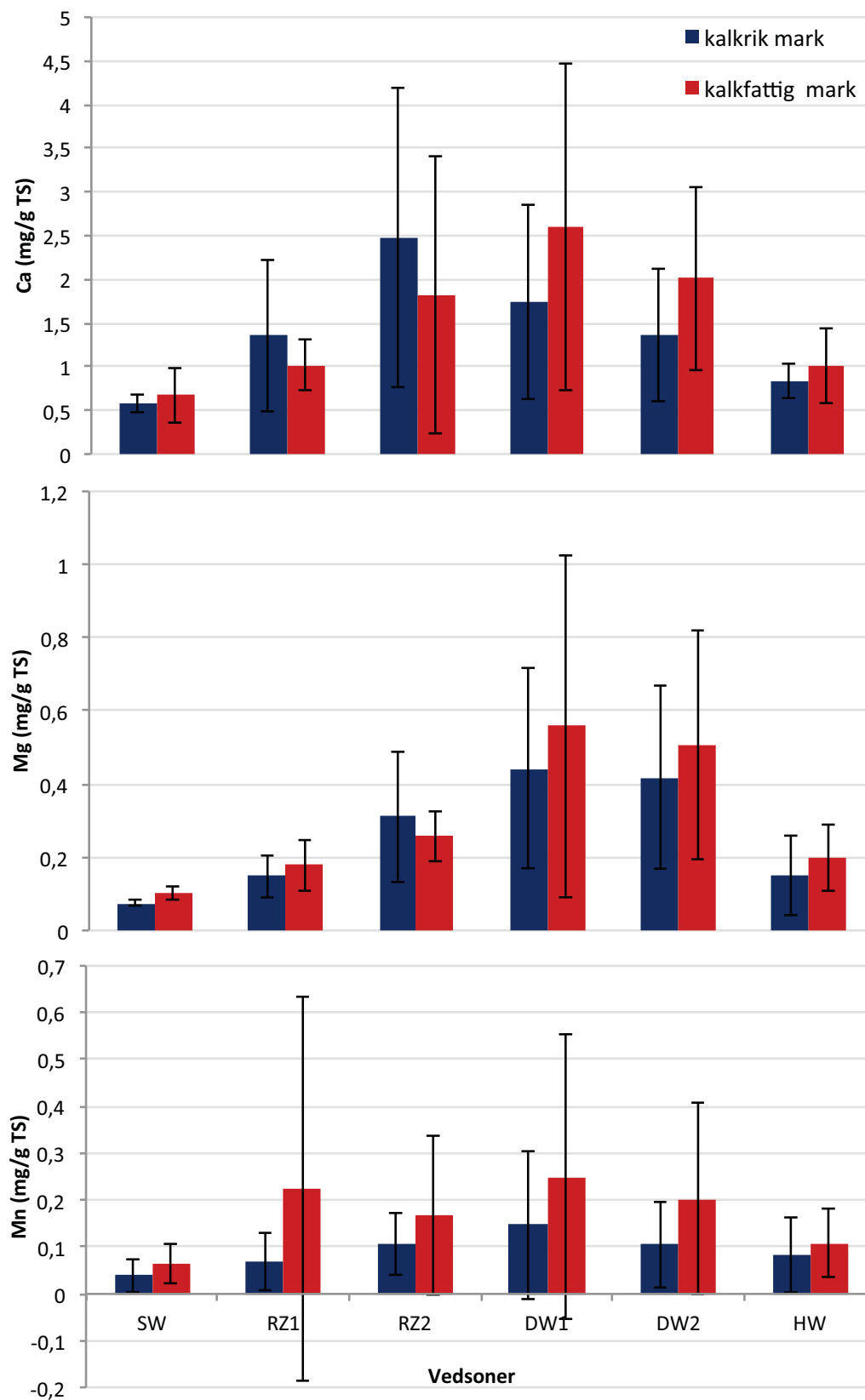
Tabell 6. Kvadrert korrelasjonskoeffisient (R^2) og korrelasjonskoeffisient mellom syreløselig oksalat og grunnstoff konsentrasjoner i yteved (SW), reaksjonssone (RZ 1-2), anilinved (DW1-2) og kjerneved (HW) i rotkjukeinfiserte trær fra kalkrik og kalkfattig mark. Tabellen er organisert etter korrelasjonskoeffisienten mellom syreløselig oksalat og grunnstoff konsentrasjoner i anilinved 2 (DW2).

Kvadrert korrelasjon mellom syreløselig oksalat og grunnstoff konsentrasjoner i ulike vedsoner						
	SW	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW
Ca	0,76	0,83	0,88	0,72	0,45	0,62
Mg	0,02	0,17	0,55	0,49	0,44	0,43
Mn	0,12	0,05	0,03	0,48	0,21	0,13
Co	0,01	0,01	0,10	0,41	0,21	0,42
Al	0,00	0,00	0,04	0,40	0,21	0,00
oksalat (vl)*	0,95	0,71	0,43	0,39	0,43	0,86
Se	0,26	0,09	0,13	0,36	0,07	0,00
Cd	0,39	0,01	0,18	0,33	0,17	0,02
Zn	0,57	0,06	0,54	0,31	0,31	0,00
K	0,08	0,74	0,57	0,17	0,40	0,14
Cr	0,07	0,13	0,29	0,11	0,50	0,12
Pb	0,28	0,03	0,08	0,08	0,04	0,00
Ni	0,00	0,01	0,06	0,03	0,20	0,18
Cu	0,21	0,22	0,02	0,02	0,04	0,01
Fe	0,00	0,21	0,03	0,00	0,13	0,25
Si	0,03	0,02	0,00	0,00	0,07	0,67
B	0,08	0,03	0,01	0,01	0,01	0,19
S	0,09	0,07	0,03	0,01	0,00	0,34
P	0,05	0,00	0,01	0,01	0,03	0,30
Na	0,07	0,07	0,04	0,02	0,01	0,17
As	0,00	0,00	0,21	0,03	0,07	0,30
Korrelasjonskoeffisient mellom syreløselig oksalat og grunnstoff konsentrasjoner i ulike vedsoner						
	SW	RZ1	RZ2	DW1	DW2	HW
Ca	0,87	0,91	0,94	0,85	0,67	0,79
Mg	0,15	0,41	0,74	0,70	0,67	0,65
Mn	0,35	-0,21	0,17	0,69	0,46	-0,36
Co	0,11	0,11	0,32	0,64	0,46	0,65
Al	0,05	-0,05	0,21	0,63	0,46	0,03
oksalat (vl)*	0,97	0,84	0,65	0,63	0,65	0,93
Se	0,51	-0,31	0,36	0,60	0,27	0,06
Cd	0,62	-0,10	0,42	0,57	0,42	-0,12
Zn	0,75	-0,25	0,73	0,55	0,56	-0,01
K	0,28	0,86	0,76	0,41	0,63	0,38
Cr	0,26	-0,36	-0,54	0,33	0,71	0,34
Pb	0,53	-0,18	-0,29	0,28	0,21	-0,02
Ni	-0,04	-0,09	-0,25	0,18	0,45	0,42
Cu	0,46	-0,47	-0,12	0,13	-0,20	-0,08
Fe	-0,03	-0,46	-0,17	-0,02	0,37	0,50
Si	-0,17	0,14	-0,01	-0,03	0,26	0,82
B	-0,28	0,17	0,10	-0,08	0,10	0,44
S	-0,30	0,27	0,17	-0,09	-0,02	0,59
P	-0,22	-0,01	0,10	-0,10	0,17	0,54
Na	-0,26	0,27	0,20	-0,15	0,08	0,41
As	0,01	0,06	-0,46	-0,17	0,26	0,55

* vl, vann løselig



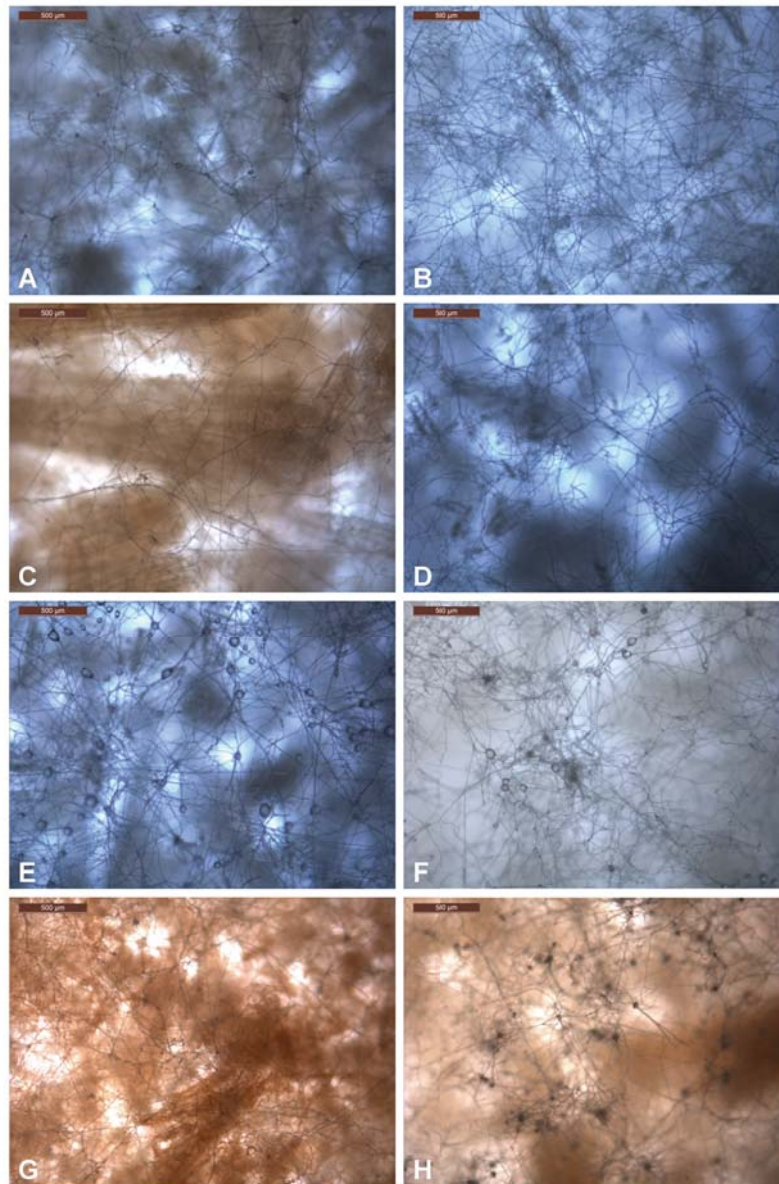
Figur 15. pH, syreløselig- og vannløselig oksalat i de ulike vedsonene ifra stubbeskiver fra kalkrik- og kalkfattigmark med $\pm$ standardavvik.



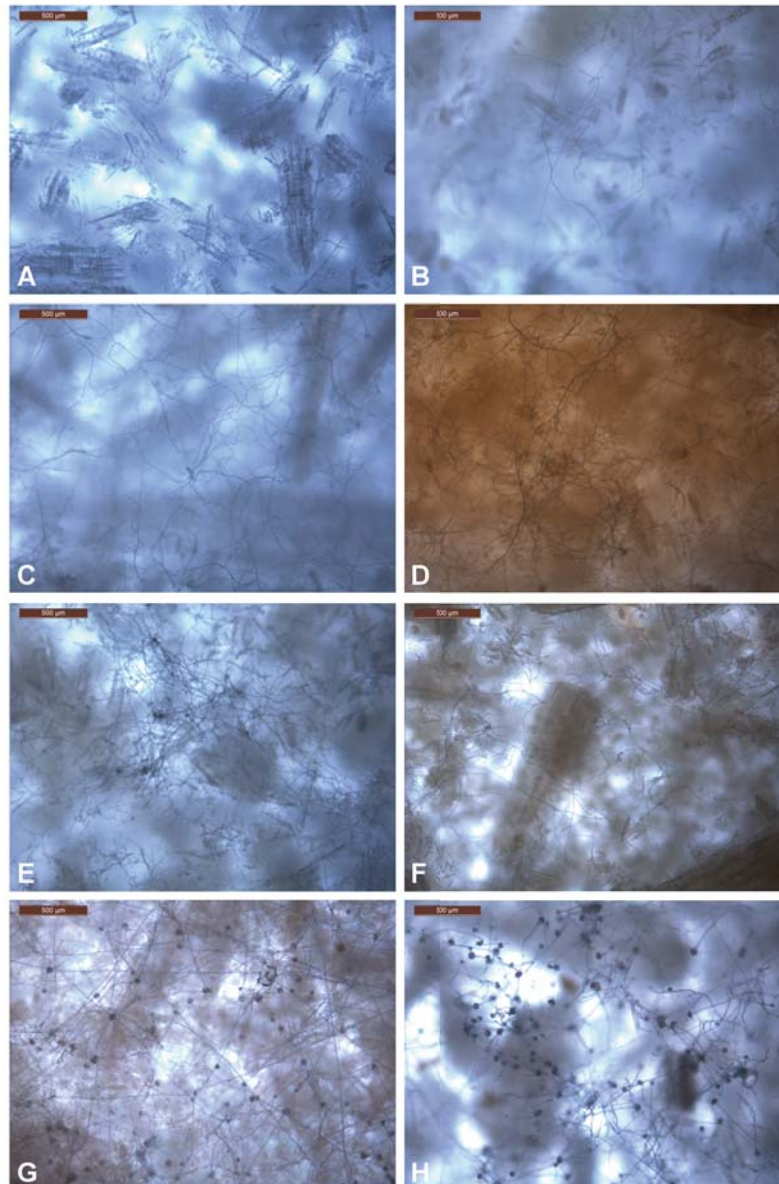
Figur 16. Konsentrasjoner av Ca, Mg og Mn i de ulike vedsonene ifra stubbeskiver fra kalkrik- og kalkfattigmark med $\pm$ standardavvik.

Soppkultiveringstest

Ved å studere isolatene i lysmikroskop så man klart at det var mest konidioeformer i reaksjonssoneved, mens det var mer sparsomt i de andre vedtypene (figur 17 og 18). Jeg så ingen visuell forskjell mellom isolater fra kalkrikmark og fra kalkfattigmark. Bilder av alle skålene med isolater ble tatt ved å anvende et Leica DMR mikroskop (Wetzlar, Germany) med et Leica DC 3000 CCD kamera.

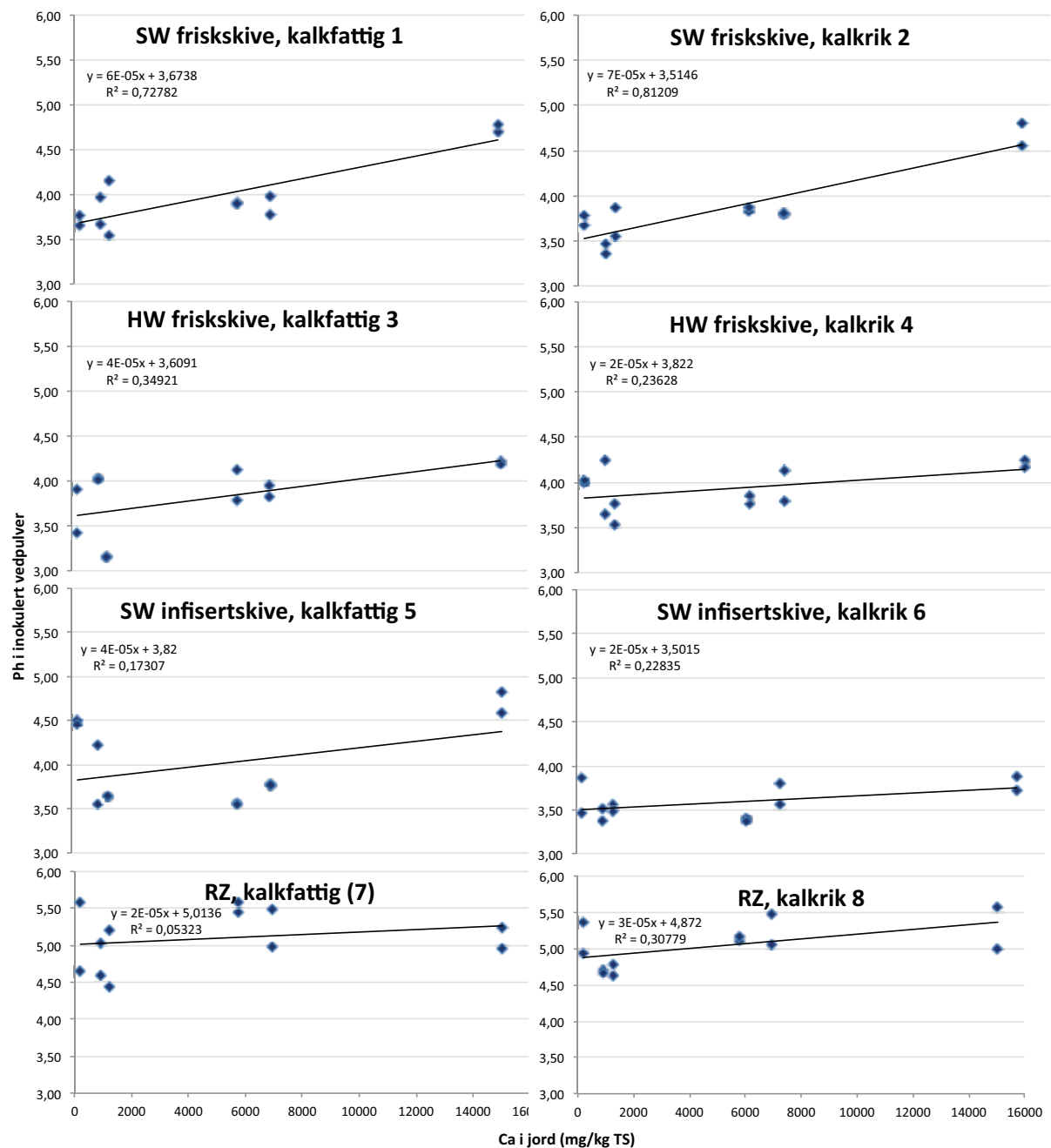


Figur 17: Soppisolat NS 7 (2011-169/1) som stammer fra kalkfattigmark med pH 3,78, inokulert på ulikt sterilt trepulver og avbildet etter 3 ukers vekst i varmeskap (21-21,5 °C). A-H viser hyfeveksten på følgende ulike vedtyper: A. Yteved fra frisk skive fra kalkfattigmark. B. Yteved fra frisk skive fra kalkrikmark. C. Kjerneved fra frisk skive fra kalkfattigmark. D. Kjerneved fra frisk skive fra kalkrikmark. E. Yteved fra rotkjukeinfisert skive fra kalkfattigmark. F. Yteved fra rotkjukeinfisert skive fra kalkrik mark. G. Reaksjonssoneved fra kalkfattigmark. H. Reaksjonssoneved fra kalkrikmark.



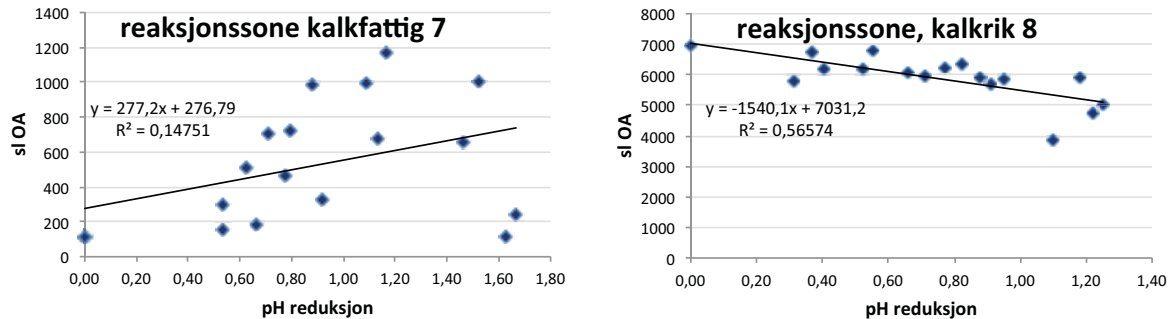
Figur 18: Soppisolat Ha 5 (2011-129/2) som stammer fra kalkrikmark med pH 5,96, inokulert på ulikt sterilt trepulver og avbildet etter 3 ukers vekst i varmeskap (21-21,5 °C). A-H viser hyfeveksten på følgende ulike vedtyper: A. Yteved fra frisk skive fra kalkfattigmark. B. Yteved fra frisk skive fra kalkrikmark. C. Kjerneved fra frisk skive fra kalkfattigmark. D. Kjerneved fra frisk skive fra kalkrikmark. E. Yteved fra rotkjukeinfisert skive fra kalkfattigmark. F. Yteved fra rotkjukeinfisert skive fra kalkrik mark. G. Reaksjonssoneved fra kalkfattigmark. H. Reaksjonssoneved fra kalkrikmark.

Figur 19 viser at desto høyere Ca innhold i jord, desto høyere var pH 'en i prøvene. Det ble funnet en sterk R^2 mellom Ca innhold i jord, og pH i inokulert ytevedprøver ifra friske stubbeskiver fra både kalkrik (0,81) og kalkfattigmark (0,73).



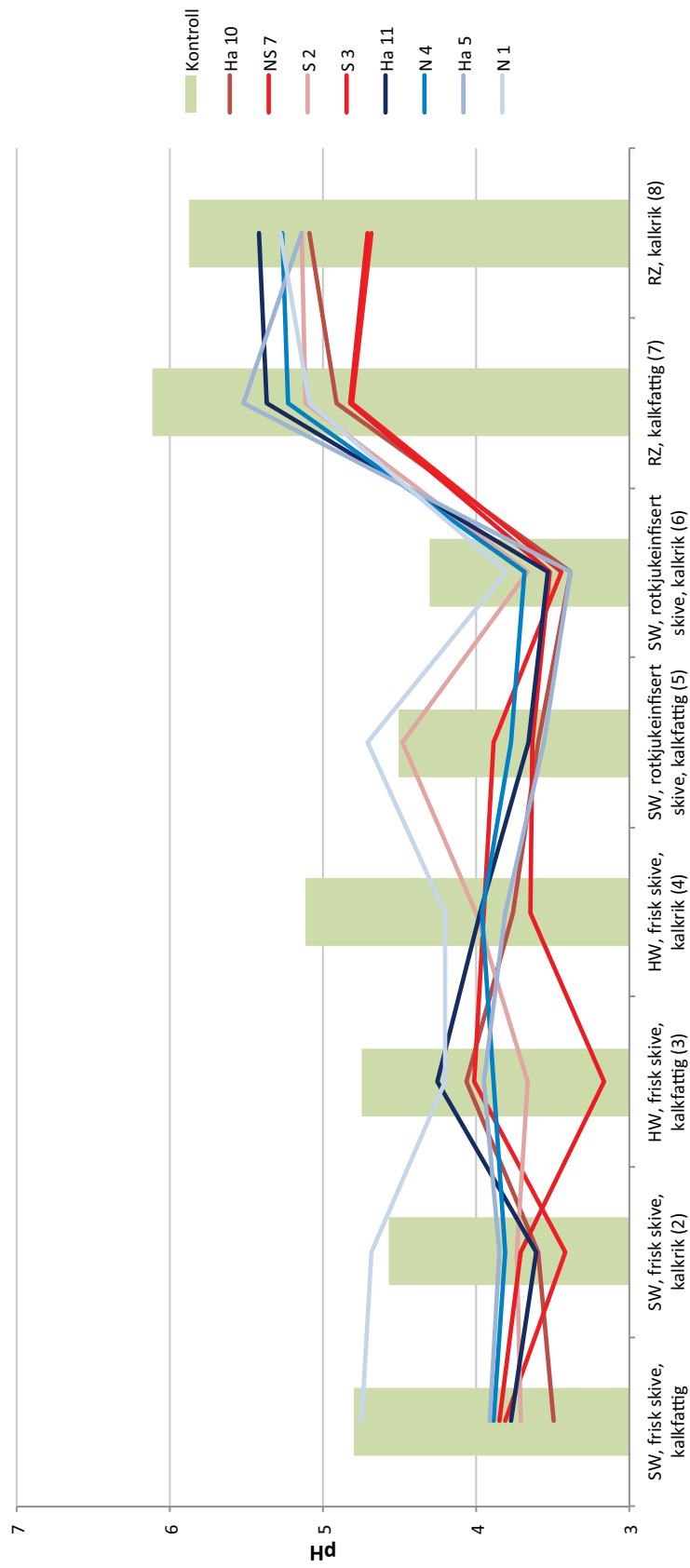
Figur 19. Forhold mellom kalsiuminnholdet (Ca) i jord, og pH i oppmalt ved fra skive tatt fra kalkfattig- og kalkrikmark. Veden er inokulert med *H. parvaporum* isolater fra kalkrik- og kalkfattigmark og inkubert i 3 uker ved 21 °C. Vist med lineær regresjon, og kvadrerte korrelasjonskoeffisient (R^2).

For reaksjonssoneved fra skive tatt fra kalkrikmark resulterte soppinkubasjon i redusert mengder oksalat (figur 20). Dette gjaldt ikke for de andre ved- og marktypene.



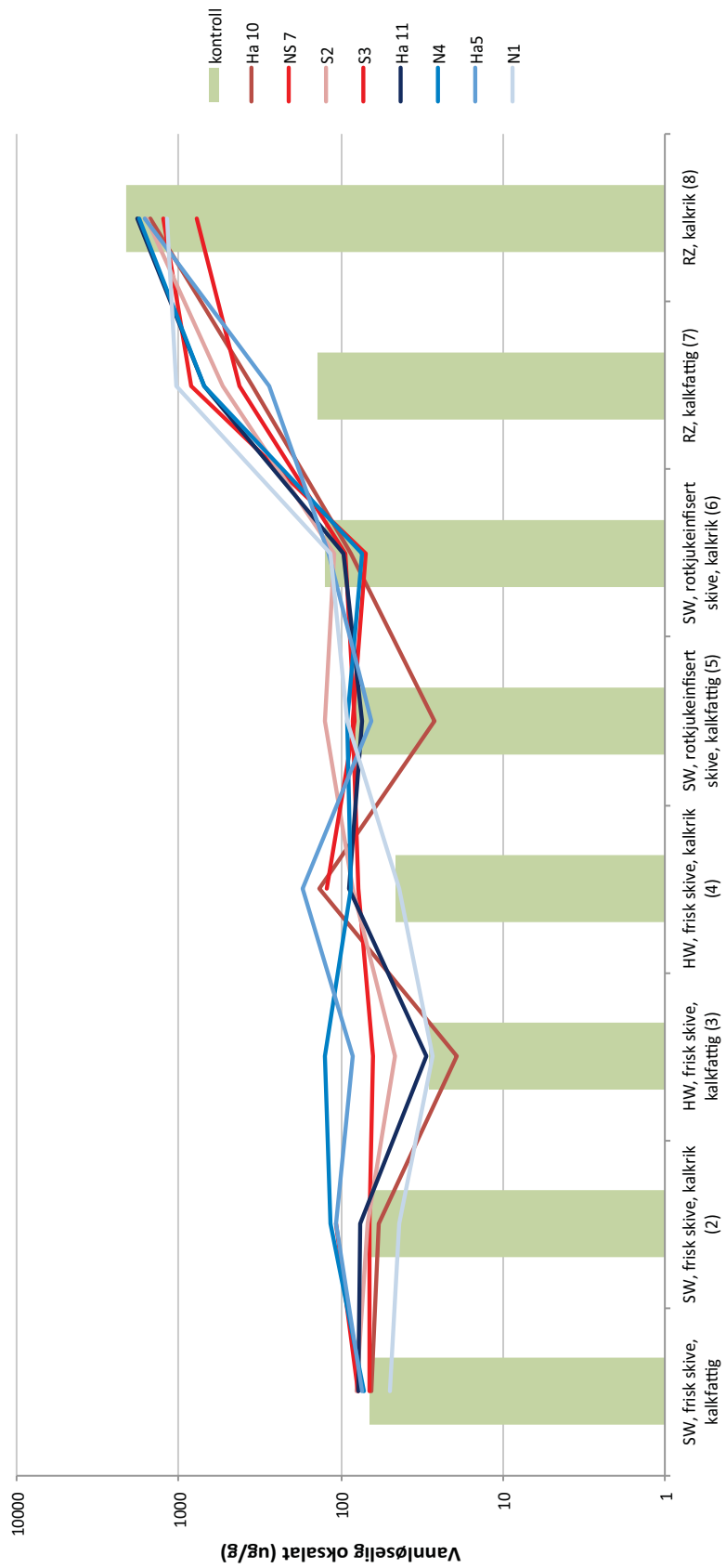
Figur 20. Forhold mellom syreløselig oksalat og pH reduksjon (pH til kontroll prøver fratrukket pH til inokulerte prøver) fra reaksjonssoneved fra kalkfattig – og kalkrik mark. Veden er inokulert med *H. parviporum* isolater fra kalkfattigmark og inkubert i 3 uker ved 21 °C. Vist med lineær regresjon, og kvadrerte korrelasjonskoeffisient (R^2).

I forhold til kontrollprøvene lå, stort sett, alle pH verdiene lavere for de soppinokulerte prøvene (figur 21). Som det kommer fram av figur 21 ble det funnet høyest pH i prøver med reaksjonssoneved. Kontrollprøver er vedpulver som ikke er inokulert, men som er gamma bestrålt og sterilisert, og vises i figur 21 som de grønne stolpene. Isolater fra kalkfattigmark er: Ha 10, NS 7, S 2 og S 3, og vises i figur 21 med rødfargede linjer. Isolater fra kalkrikmark er: Ha 11, N 4, Ha 5 og N 1, og vises i figur 21 med blåfargede linjer. I figur 21 ser man at de blå linjene, som indikerer isolater fra kalkrikmark, ligger litt høyere enn de rød (kalkfattigmark) i bl.a. reaksjonssoneved. Ha 10 ble isolert ifra den oppmalte stubbeskiven fra kalkfattigmark, som senere ble gamma bestrålt, sterilisert og infisert med de ulike isolatene i dette forsøket. Ha 11 ble isolert fra den oppmalte stubbeskiven fra kalkrikmark som også er anvendt i dette forsøket.

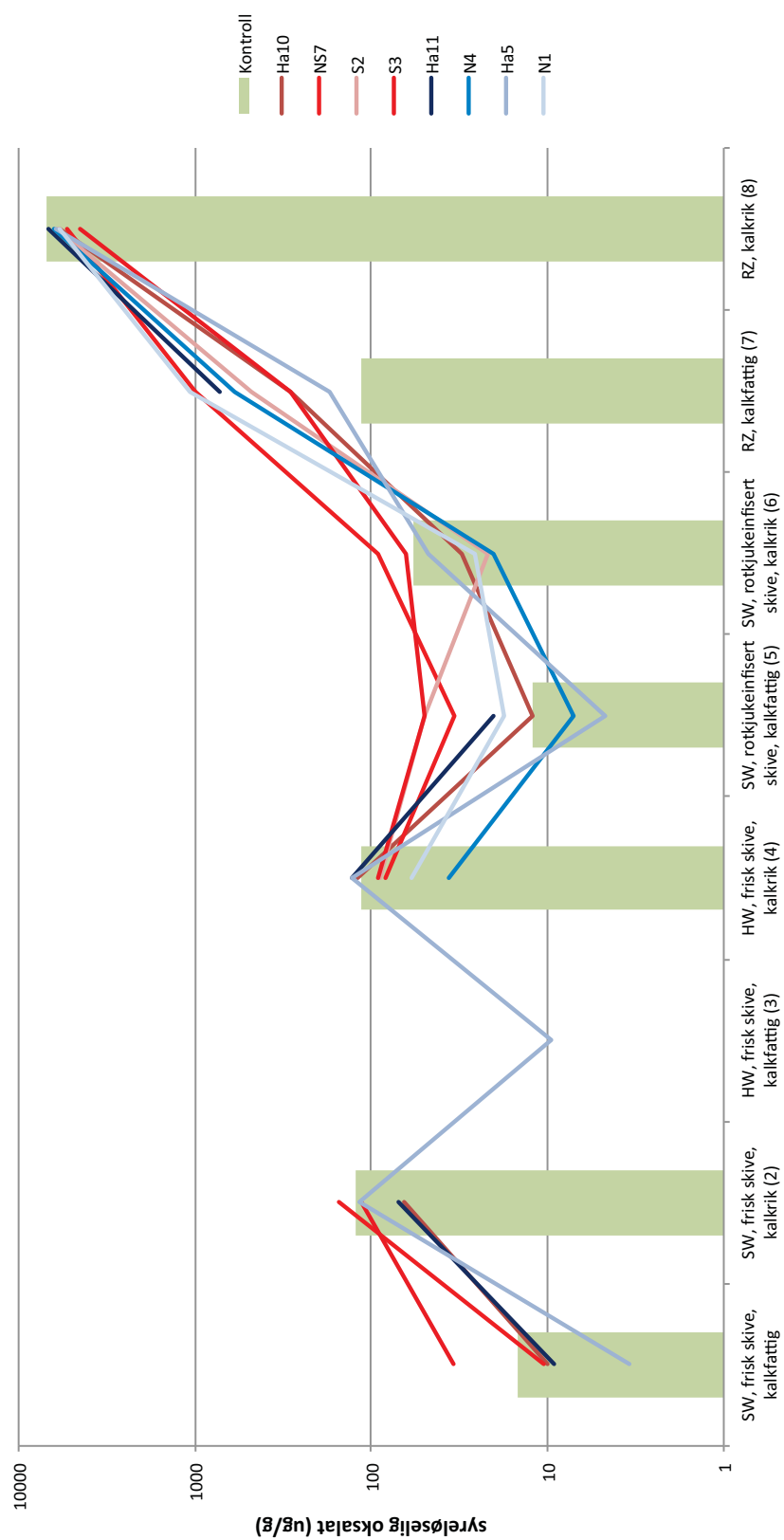


Figur 21. PH i de forskjellige vedpulverene inokulert med *H. parvivorum* isolater og inkubert i 3 uker ved 21 ° C. Isolater tatt fra kalkfattigmark er: Ha 10, NS 7, S 2 og S 3. Isolater fra kalkrikmark er: Ha 5, Ha 11, N 1 og N4. Kontrollprøvene (vedpulver som ikke er inokulert) er de grønne stolpene.

Figur 22 og 23 viser at de inokulerte prøvene, i forhold til kontrollprøvene, hadde høyere konsentrasjoner av oksalat. Kontrollprøver er vedpulver som ikke er inokulert, men som er gamma bestrålt og sterilisert, og vises i figur 22 og 23 som de grønne stolpene. Isolater fra kalkfattigmark er: Ha 10, NS 7, S 2 og S 3, og vises i figur 22 og 23 med rødfargede linjer. Isolater fra kalkrikmark er: Ha 11, N 4, Ha 5 og N 1, og vises i figur 22 og 23 med blåfargede linjer. Ha 10 ble isolert ifra den oppmalte stubbeskiven fra kalkfattigmark, som senere ble gamma bestrålt, sterilisert og infisert med de ulike isolatene i dette forsøket. Ha 11 ble isolert fra den oppmalte stubbeskiven fra kalkrikmark som også er anvendt i dette forsøket. Resultatene viser ikke en sterk kobling mellom jord pH og produksjon av oksalat/oksalsyre, men man kan se en interessant trend da 3 av de 4 best produserende isolatene stammer ifra kalkrikmark (figur 22 og 23). I figur 23 blir bare resultatet for isolatet Ha 5 for vedtype 3 vist. Dette er fordi verdiene for de andre isolatene og kontrollprøvene, er lavere enn 1 µg/g.



Figur 22. Vannløselig oksalat i de forskjellige vedpulverene inokulert med *H. parviporum* isolater og inkubert i 3 uker ved 21 °C. Isolater tatt fra kalkfattigmark er: Ha 10, NS 7, S 2 og S 3. Isolater fra kalkrikmark er: Ha 5, Ha 11, N 1 og N4. Kontrollprøvene (vedpulver som ikke er inokulert) er de grønne stolpene.



Figur 23. Syreløselig oksalat i de forskjellige vedpulverene inokulert med *H. parviporum* isolater og inkubert i 3 uker ved 21 °C. Isolater tatt fra kalkfattigmark er: Ha 10, NS 7, S 2 og S 3. Isolater fra kalkrikmark er: Ha 5, Ha 11, N 1 og N4. Kontrollprøvene (vedpulver som ikke er inokulert) er de grønne stolpene.

Diskusjon

Jeg kunne påvise få forskjeller mellom trær og rotkjukeisolater fra kalkrik- og kalkfattigmark i denne studien, men det var mange interessante trender. Grunnen er trolig at materialet var for lite. Det er dermed viktig å være klar over at det er et begrenset antall bestand og stubber som ligger bak analysene, og med mine 38 bestand representerer dette bare en begrenset del av områdets variasjon og trender. Råtetellingen ble gjort i 36 bestand fordelt på 1317 stubber. For enhver forskningsoppgave, hvor statistikk er en viktig del, er det ønskelig med størst mulig datagrunnlag gjennom mange observasjoner og replikater. Imidlertid er det vanskelig, i biologiske undersøkelser, å få med alle faktorer som kan spille inn, i tillegg er det tidskrevende og kostnadsfullt å få nok observasjoner til at resultatet blir representativt. At det eksisterer mange påvirkningsfaktorer, innebærer også at det blir vanskeligere å sammenligne og forklare resultatene.

Råtefrekvens

Denne studien konstaterte at rotkjuke er den mest omfattende og viktigste råtesoppen i norsk granskog, noe som er i overensstemmelse med tidligere forsøk (Holmen 1973; Enerstvedt & Venn 1979; Huse et al. 1994; Heggertveit & Solheim 1998). Videre fant jeg en større råtefrekvens på kalkrike marker, noe som også er i samsvar med tilsvarende funn beskrevet i flere publikasjoner (Holmen 1973; Enerstvedt & Venn 1979; Stamnes et al. 2000), og med min aktuelle problemstilling. Jeg fant en råtefrekvens, for alle områdene jeg studerte, på 35,76 %. Tidligere utførte studier i Norge har funnet en lavere råtefrekvens enn dette (Huse 1983; Solheim & Holen 1990; Huse et al. 1994). Det er imidlertid viktig å påpeke at de fleste råtetellingene som foreligger er basert på en borkjerne tatt ut i brysthøyde (Huse 1983; Solheim & Holen 1990). Siden rotkjuka vokser fra rotbasis og oppover i kjerneveden, blir bare omlag 50 % av trærne med rotråte fanget opp ved borer i brysthøyde (Kallio & Tamminen 1974; Stenlid & Wästerlund 1986). Ved å studere stubber etter hogst fant jeg en råtefrekvens for Hadeland, Hedemarken og Ringsaker på 44, 1 %, 31, 9 % og 40, 1 %. Den landsomfattende råtetellingen i 1992 var også utført på stubber og gav en råtefrekvens for Hadeland (Jevnaker, Lunner og Gran) og Hamar/Vang/Ringsaker/Stange på henholdsvis 37, 2 % og 31, 3 %, noe som er mer i samsvar med mine resultater.

Mye tyder på at det kan ha blitt en overvekt av rotkjukeklassifiserte stubber, og en underklassifisering av andre råtesopper under råtetellingen. Under soppisolering viste det seg at noen stubbeskiver, som vi i utgangspunktet var ganske sikre på var infisert av *H. annosum* s. l., imidlertid var befengte av andre råtesopper som toppråte og vasskjuke (*Climacocystis borealis*). Man

må nesten anta at dette også kan ha skjedd ute i felt, da råten hovedsakelig ble bedømt visuelt, og ikke gjennom isolering. Siden jeg bare utførte råtetellingen på hogstflater er det også tenkelig at andelen såråte er underrepresentert, siden eventuelle skader oppover stammen ikke vil bli oppdaget. Selv om jeg ikke registrerte stubber som hadde synlige skader som følge av hogst, var det i noen bestand nesten umulig å finne dette, og slike stubber vil være vanskelig å bedømme. Videre var det ikke en jevn fordeling mellom kalkrike- og kalkfattige bestand innad i et område, noe som kan påvirke områdets totale råtefrekvens.

Korrelasjonskoeffisienten mellom råtefrekvensen og jord pH var, i dette datamaterialet, på 0,68, mens korrelasjonskoeffisienten mellom råtefrekvens og Ca innhold i jord var 0,62. Dette indikerer at jord pH og Ca innhold er betydningsfulle faktorer for råtefrekvensen, noe som er i henhold til min hypotese (2). Grunnen til at jeg ikke fikk en god korrelasjonskoeffisient mellom råtefrekvens, og jordas pH- og Ca innhold for bestandene i Nittedal/Skedsmo, mens jeg fikk høye korrelasjonskoeffisienter mellom de samme forholdene for de andre områdene, kan skyldes at jeg manglet de store ytre punktene i skalaen for pH og Ca innhold for Nittedal/Skedsmo området, og at det er mange andre faktorer som spiller inn. Videre er ikke jordsmonnet homogent og følgelig vil pH og Ca innholdet i jorda kunne variere betraktelig innen et bestand. Jeg blandet jordprøver ifra 3 lokaliteter i det aktuelle bestandet, noe som kan gi et annet resultat enn dersom jeg hadde brukt separate jordprøver. Ca og pH i jord er godt korrelert, hvor korrelasjonskoeffisienten for hel mitt datasett er på 0,79. Dette kan betegnes som en sterk positiv korrelasjon, da 63 % av variasjonen forklares av denne regresjonen, og følgelig støtter dette min aktuelle hypotese (2). Imidlertid indikerer dette også at Ca ikke er den eneste variabelen som virker inn på høy pH.

Råtefrekvensen varierer også med bonitet (Stamnes et al. 2000). Enerstvedt et al. (1979) fant at råtefrekvensen avtok markant med synkende bonitet, hvor det imidlertid ble registrert høyest råtefrekvens på de aller laveste og de høyeste bonitetene. Datagrunnlaget mitt er ikke stort nok til å dokumentere dette, men tendensen i min undersøkelse viser også at råten er mest utbredt på de høyeste bonitetene. Jeg hadde ingen bestand på de laveste bonitetene, G 6-11, eller på den høyeste boniteten, G 26. Mitt datagrunnlag viste en svak tendens til stigende rotkjukeomfang med økende diameter, mens honningsopp viste en motsatt trend. Dette kan tyde på at rotkjuka hovedsakelig angriper trær i herskende kronelag, mens honningsoppen er mer omfattende i undertrykte trær.

Stamnes et al. (2000) fant at geologien, som hadde den høyeste forklaringsvariabelen, bare kunne forklare 2,7 % av den totale råtevariasjonen. Det er i flere tidligere undersøkelser, konkludert med at råtefrekvensen øker med alder opp til ca 60-80 år (Huse 1983, Huse et al. 1994, Heggertveit &

Solheim 1998). Etter dette avtar råtefrekvensen som følge av bl.a. de råtebefengte trærne vil bli plukket ut i skogbehandlingen, de vil bli vindfelt eller dør. Som nevnt før, så motstår eldre trær bedre en råteinfeksjon, mens yngre trær dør raskt etter en infeksjon. Videre vil råten lettere etablere seg når det er blitt dannet kjerneved i stammen, noe som først skjer i norsk gran ved alder mellom 25-40 år (Korhonen & Stenlid 1998). Siden råtefrekvensen øker med alderen, bør ikke råteutsatte bestand overholdes utover normal hogstmodenhetsalder. Jeg har ikke i dette studiet sett på sammenheng mellom råtefrekvens og alder.

Det er imidlertid flere skogsskjøtselaktiviteter som påvirker råtefrekvensen. Det er funnet en høyere andel råte på tidligere beitet- og drevet mark, og det er dokumentert en høynet råtefrekvens ved økt grad av tynningsaktivitet (Huse et al. 1994; Horntvedt 1996; Korhonen & Stenlid 1998). Tynning kan medføre skader og sår på gjenstående trær, og i tillegg vil en avvirkning av råtebefengte trær kunne medføre at råten eskalerer, da døde røtter ikke har et vitalt forsvar lenger. Det er videre påpekt at både kjemisk og organisk gjødsel kan føre til surere jordsmonn (Soil acidity and liming, 2012). Registreringene ble utført i grandominerte bestand, men innslaget av andre treslag, kan ha hatt betydning for spredningen og fordelingen av *H. annosum* s. l. Ingen av disse nevnte faktorene har blitt belyst nærmere i denne undersøkelsen, eller er implementert i dataene.

At mest råte ble funnet med en utbredelse i stubbesnittflata på mellom 51-80 %, er av betydning for sortimentsfordelingen. 6,8 % av stubbene hadde så stor utbredelse av råte i stubbesnittflata (mer enn 80 % av diameteren), at rotstokkene mest sannsynlig måtte bultes. De resterende råtebefengte rotstokkene, 29 %, ble mest sannsynlig nedklassifisert som følge av råten. Dette illustrerer at råte har stor innvirkning på økonomien til skogeieren. Det faktum at rotkjuka kan bevege seg 8-12 m opp i stammen medfører at de økonomiske konsekvensene, for denne mest vanlige råtetypen, vil bli mer omfattende enn i forhold til for eksempel honningsoppen som holder seg mer i rotfeste (Swedjemark & Stenlid 1997; Bendz-Hellgren et al. 1998).

Isolering

Jeg fant bare rotkjuke arten *H. parviporum*. Dette er som forventet da *Heterobasidion annosum*, med bare noen unntak, er påvist på Vestlandet (Heggertveit & Solheim 1998).

I vekststudiet fant jeg ingen sammenheng mellom jordas pH, og isolatenes veksthastighet på agar. Slike sammenheng kunne muligens bli forklart ut ifra en større andel individer, enn mine 20 isolater.

Vekststudiet tok ikke hensyn til isolater som produserte mer luftmycel (mer horisontal vekst enn vertikal), og resultatene kunne ha vært annerledes dersom skålene hadde blitt veid for sikrere kunne si hvor mye isolatene hadde vokst. Dersom ikke hyfesiden ble lagt ned mot agaren, kan dette ha påvirke veksthastigheten. Det kunne videre ha vært interessant å måle pH 'en i de ulike skålene eller teste påvirkning av forskjellige pH scenarier på soppvekst, siden Schwantes et al. (1976) undersøkte veksten hos *H. annosum* s. l. på ulik agar og fant at isolater ifra kalkrik/kalkfattigmark hadde ulik pH optimum.

I mitt vekstforsøk viste isolatene inkubert i varmeskap ved 21,5 ° C raskest vekst, mens de som var inkubert ved 14,5 ° C vokste senest. Isolatene inkubert ved 28 ° C hadde en mellomliggende veksthastighet. Den optimale temperaturen for soppvekst for *H. annosum* s.l. ligger, i følge Schwantes et al. (1976), på mellom 24-28 °C, mens minimumstemperaturen er 0 °C, og maksimaltemperaturen på 32-36 °C. *H. annosum* s.l. tåler imidlertid sterk kulde bedre enn sterk varme, og letal temperatur er på ca 40 °C (Schwantes et al. 1976). Resultatene mine kan dermed sies å være i henhold til teorien. Tauber (2008) fant at i sin masteroppgave at *H. parviporum* oppnådde vekst ved et litt bredere temperaturspekter, enn hva *H. annosum* s. s. gjorde. I mitt studium opererte jeg kun med *H. parviporum*. Det å kunne vokse i en bredspektret temperatursone er helt klart et fortrinn i konkurranse med andre sopper og for suksessraten for en stubbeinfeksjon. Temperatur er imidlertid bare er en av flere abiotiske faktorer som påvirker arters spredning, og i tillegg vil ulike biotiske faktorer spille inn.

Kjemiske analyser i de ulike sonene i veden

Bestemmelse av pH i trepulver

Resultatene etter den første pH målingen, da jeg tilsatte 10 ml Milli-Q vann til trepulveret, gav ikke resultater som forventet. Denne metoden var en omgjøring av standarden for måling av pH i jordprøver. Det finnes i dag ingen standard for måling av pH i vedprøver, og det opereres med flere ulike metoder (Sithole 2005). Disse metodene er basert på forutsetningen om at pH 'en til væsken som omgir pulveret er identisk med pH 'en til trepulveret. Dette kan sies å være en forenkling av virkeligheten. Det kan bl.a. tenkes at andelen av utskilte sure eller basiske ekstraktivstoffer vil kunne påvirke væskens pH, og det er mye som tyder på at pH synker med økende ionisk styrke. For å forhindre at pH 'en synker ved økende ionisk styrke burde prøven ha blitt tilsatt 0,2 M med NaCl

(Sithole 2005). Sithole (2005) fastslår at mengde tilsatt vann kan påvirke pH målingen, da store mengder vann vil kunne fortynne konsentrasjonen av sure komponenter. Derfor ble metoden gjort om, og prøvene ble denne gangen tilsatt bare 2 ml Milli-Q vann for så å bli lagt på et "rullebrett" for å få bedre kontakt mellom trepulveret og vannet. 2 ml Milli-Q vann var det minste vi greide å tilsette og ennå få målt pH med de tilgjengelige midlene. Uansett er det vesentlig, for best mulig sammenligningsgrunnlag, å anvende lik metode for alle prøvene, og at man er klar over at det opereres med mange ulike metoder for måling av pH i trepulver. Dessverre hadde jeg ikke nok trepulver igjen for 5 av de 84 prøvene, og måtte derfor anvende de første målingene for disse prøvene. Dette gjaldt prøve S 5.1 for RZ1, S 5.1 for RZ2, NS 1.1 for RZ2, NS 7.2 for RZ1 og NS 7.2 for DW2.

Mine resultater viste en gjennomsnittlig pH i reaksjonssonen (RZ) på 6,2 og i infisert kjerneved (HW) på 5,37. Den laveste pH 'en jeg registrerte var i infisert kjerneved (HW) på 4,68. PH 'en i yteveden hos mine prøver lå gjennomsnittlig på 5,71. Standardavvikene på pH målingene var imidlertid relativt høye. Nagy et al. (upublisert) undersøkte pH i levende trær og konkluderte med at reaksjonssonen hadde høyere pH og et forhøyet vanninnhold, sammenlignet med yteveden og ved ifra friske trær (kontroll trær). Kontrolltrærne hadde en pH på 5,65 i yte- og kjerneved, mens reaksjonssonen (RZ) hadde en pH på 6,7 (Nagy et al. upublisert). Infisert kjerneved (HW) viste lavere pH verdier enn kontrollprøve ved (Nagy et al. upublisert). Jeg hadde ingen friske kontrolltrær, noe jeg burde ha hatt for å kunne si noe om størrelsen av endringene jeg fant. Sammenlignet med Nagy et al. (upublisert) sine data, så er pH resultatene ganske sammenlignbare. Den andre pH målingen gav altså et mer forventet resultat, men ikke de samme sterke forskjellene som påvist av Nagy et al. (upublisert). Det kan tenkes at pH 'en har endret seg i tiden etter hogst. De aktuelle bestandene ble avvirket i løpet av vinteren 2011, mens feltarbeidet ble utført i løpet av sensommeren/høsten 2012. Dette betyr at stubbene kan, i verstefall, ha vært 9 måneder gamle. Jeg kunne ikke påvise en forskjell mellom vedens pH, og om prøvene kom ifra kalkrik/kalkfattigmark. Det kan tenkes at trender kunne bli synlige ved et større datagrunnlag, enn det som var mulig med mine 14 stubbeskiver; 7 ifra hver marktype.

Vedens cellevegg består hovedsakelig av de tre biopolymerer cellulose, hemicellulose og lignin (Harris & Stone 2008). Dette lignocellulose komplekset skaper en viktig barriere ved å hindre patogeners enzymer å trenge inn i treets cellevegger, og på den måten beskytter lignin de lettere nedbrytbare polymerene cellulose og hemicellulose (Mäkelä et al. 2002). Hvitråtesoppen har imidlertid en evne til å bryte ned lignin til CO₂ siden de besitter oksidative lignin modifierende enzymer (LME) (Hammel and Cullen 2008). I tillegg skiller hvitråtesoppen ut andre organiske

forbindelser, som oksalsyre. Oksalsyre stimulerer aktiviteten til mangan peroksidase som bryter ned lignin og dermed skaper hulrom i celleveggen slik at enzymene lettere kan trenge inn (Nagy et al. upublisert). Det er funnet at hvitråtesopp har en optimal pH for degradering på rundt 3-4,5 (Guggiari et al. 2011). Punja et al. (1985) skriver imidlertid at enzymene har et optimum under pH 5, mens Dutton & Evans (1996) påviste en pH på 4,5 i områder hvor oksalsyre ble produsert. Uti fra dette er det som forventet at reaksjonssonen, som er treets forsvarsmekanisme mot rotkjuke, besitter en høyere pH, og at rotkjukekolonisert kjerneved har lavere pH. Etter at oksalsyre er blitt dannet kan den bindes til et kation og danne ulike salter (Schilling & Jellison 2004). Det vanligste er at oksalsyre bindes til Ca^{2+} ifra plantens cellevegg, og danner kalsiumoksalat krystaller (Traquiar 1987; Ostrofsky et al. 1997; Hietala et al. 2009; Guggiari et al. 2011). Høye konsentrasjoner av Ca i veden bidrar til en økning av pH 'en, men siden oksalsyre kjelaterer kationer som Ca for å gjøre vedens pH mer gunstig for nedbrytning (Hietala et al. 2009), kan slike forhold være vanskelig å påvise.

Bestemmelse av grunnstoff og oksalat/oksalsyre i treprøver

Det var, for noen av stubbeskivene, en utfordring å bestemme hvor de ulike sonene gikk, og å kutte de i fra hverandre med øks og kniv. I dette arbeidet kan det ha forekommet feilkilder. Dette er også grunnen til at alle prøvene, med merking, ble fotografert og at prøvene 2-5 ble tatt kontinuerlig innover i skiven med 5 mm 's bredde. Jeg observerte bunnavfall i noen av glassene som var klargjort for HPLC analyse og som var tilsatt Milli-Q vann og fosfatbuffer. Ut ifra disse glassene ble væsken pipettert ut og lagt over i nye analyseglass, bunnfallet ble kastet, og ikke videre analysert. Det er uvisst hvorfor dette skjedde og hva det var, men det forekom ikke da jeg gjorde den samme prosessen for prøvene ifra soppkultiveringsforsøket.

Siden vanntransport skjer i yteveden (SW), er det fortrinnsvis her det er interessant å se på korrelasjonskoeffisient mellom jord pH og grunnstoff/oksalat konsentrasjon. Jeg fikk en negativ korrelasjonskoeffisient for stort sett alle grunnstoffene. Resultatene mine viste at pH i jorda påvirker løseligheten til kationer; jo lavere pH, desto mer av grunnstoffene blir løselige i jordvannet og dermed kan de tas inn i treet sammen med vanninntak. Spesielt gjaldt dette for grunnstoffene Al, Mg og As. At 65,6 % av variasjonen i pH kan forklare variasjonen i Al konsentrasjon i SW1, kan betegnes som en sterk korrelasjon. At tilgjengeligheten av Al øker i surere jordsmonn er i henhold til teorien, da surere jord medfører at kationer blir løst opp og erstattet av H^+ , og følgelig blir grunnstoffene mer tilgjengelige for planteopptak. Jeg analyserte bare en liten bit av en større stubbe, og det er lite nærliggende å tro at grunnstoff er homogent fordelt i et tre. Videre var det ikke en stor bredde i pH

målingene i jord, da den laveste målte pH verdien var 3,78, mens det bare var i et bestand det ble registrert en pH verdi over 6 (6,36). Dette er momenter som kan bidra til skjevheter i resultatene.

Jeg registrerte, for de aller fleste prøvene, høyest grunnstoffkonsentrasjoner i DW1. For grunnstoffene As, Cd, Cu, Mn, Pb, Si og Zn, fant jeg en positiv korrelasjonskoeffisient mellom yteved og patologisk ved (reaksjonssone; RZ1-2, anilinved; DW1-2, kjerneved; HW). En forhøyning av grunnstoffer i patologisk ved kan bety at treet akkumulerer disse grunnstoffene i reaksjonssonen når rotkjuka angriper. At infisert ved får forhøyning av visse grunnstoffer avhenger av at stoffene fanges opp i ytevedens næringstransport, for så å avsettes i patologiskved gjennom bl.a. radielle margstråler (Nilsson et al. 2002). Dette fordi det ikke foregår en vertikal transport i kjerneveden lengre. Spesielt Cu er giftig for soppen og denne kunnskapen er bl.a. blitt anvendt i utviklingen av treimpregneringsmidler (Baldrian 2003). At grunnstoff har høye korrelasjonskoeffisienter mellom yteved og patologiskved er imidlertid som forventet, da patologisk ved også en gang har vært yteved. Nagy et al. (upublisert) fant en økning av Ca, K, Mg, Mn og Zn i reaksjonssone (RZ), anilinved (DW) og kjerneved (HW) hos infiserte trær, i forhold til kontroll trærne. Forskjellen var størst for grunnstoffet K (Nagy et al. upublisert). Høyeste konsentrasjoner, i forholdt til kontrolltrær, for grunnstoffet K ble også påvist av Nilsson et al. (2002). Siden jeg ikke hadde friske trær som kontroll, kunne jeg ikke påvise et lignende forhold.

Jeg fant at DW1 (anilinved) er den vedsonen med størst konsentrasjoner av oksalat. Dette er naturlig siden DW1 representerer soppkoloniens laterale front begrenset av reaksjonssonen (Hietala et al. 2009). Nagy et al. (upublisert) fant lignende resultat da den høyeste konsentrasjonen av oksalsyre ble funnet i ytterkanten av DW (anilinved), mens det var omtrent ingen spor av oksalsyre i friske kontrolltrær. I tillegg til at oksalsyre kan hindre vertens forsvarsmekanismer og bedre vekstvilkårene til substratet, kan oksalsyre hemme veksten til andre konkurrerende patogener (Mäkelä et al. 2002). Andre diskuterte funksjoner oksalsyre besitter er forvitring av mineraler som inneholder silikater (Fomina et al. 2006), regulering av biotilgjengelighet av fosfat og sulfat (Dulton & Evans 1996), avgiftning av metaller (Baldrian 2003), og produksjon av energi (Shimada et al. 1997; Munir et al. 2001).

Jeg fant en høy korrelasjonskoeffisient mellom syreløselig oksalat og grunnstoffene Ca, Mg og Mn i DW1, noe som også er beskrevet i andre studier (Shain 1971; Nilsson et al. 2002; Nagy et al. upublisert). Nilsson et al. (2002) skriver at Mn ofte akkumuleres i visse punkter i rotkjukeinfisert tre, og at et større prøveuttak trolig vil medføre at konsentrasjonen av Mn utjevnes. Kobber og mangan kan være viktige i prosessen med å degradere lignin (Hughes & Poole 1991; Shimada et al. 1994). For

sin utvikling og vekst er hvitråtesopp avhengig av en viss mengde av noen utvalgte tungmetaller (Baldrian 2003). På den andre siden vil for store konsentrasjoner av de samme tungmetallene kunne være giftige og medføre hemming av soppveksten, føre til morfologiske og fysiologiske endringer og påvirke reproduksjonen (Hughes & Poole 1991). Hva som er store konsentrasjoner vil være vanskelig for meg å påvise, bl.a. fordi jeg mangler analyser av friske trær som en kontroll. Baldrian (2003) skriver at tungmetallets effekt på soppens etablering og vekst, vil avhenge av faktorer som soppart, type tungmetall, konsentrasjoner og hvilke forsvarsmekanismer som er involvert. Det har blitt vist at gjennom å skille ut oksalsyre, kan patogenet tolerere en del tungmetaller (Sayer & Gadd 1997; Jarosz-Wilkolazka & Graz 2006). Et overskudd av Ca er korrelert med produksjonen av kalsium oksalat krystaller (Guggiari et al. 2011), men dette forholdet ble ikke sett nærmere på i denne studien.

Trær fra kalkfattigmark hadde gjennomsnittlig et høyere grunnstoff- og oksalatinhold enn trær fra kalkrikmark, men treindivider fra de to marktypene hadde overlappende konsentrasjoner av både grunnstoff og oksalat, noe som bl.a. kommer fram av et forholdsvis høyt standardavvik. Siden det er mange påvirkende faktorer må det et stort datagrunnlag til for å kunne se eventuelle trender og påvise signifikante forskjeller. Dersom det blir påvist at kalkfattigmark har et høyere grunnstoffinnhold enn trær fra kalkrikmark, er det tenkelig at trær fra kalkfattigmark kan være mer motstandsdyktige mot rotkjuke siden høye konsentrasjoner av ulike grunnstoffer kan være giftig for sopp. Dette kan også demonstreres gjennom at råteprosessen krever høyere produksjon av oksalsyre på kalkfattigmark.

Soppkultiveringstest

Det foreligger få studier som fokuserer på trenedbrytende soppers utskillelse av oksalsyre på naturlig lignocellulose holdige substrater (Mäkälä 2009). For å få bedre innsikt i de mekanismene som inntreffer når *H. parviporum* forsøker å bryte igjennom reaksjonssone og infisere frisk yteved, og om denne koloniseringen er forskjellig på kalkfattig- og kalkrik marker, undersøkte jeg prøver ifra friske og naturlige koloniserte granstubber ifra begge marktypene, i et soppkultiveringsforsøk.

De andre syrene jeg så på (citric syre, tartaric syre, glyoxylic syre, malic syre, malonic syre, succinic syre, formic syre, acetic syre, fumaric syre), gav ingen utslag på resultatene og er følgelig ikke framstilt. Selv om disse ulike organiske syrene har blitt oppdaget i forbindelse med hvitråtesopps nedbrytning av vedsubstrat, så er oksalsyre den hyppigst utskilte syren og følgelig den mest

interessante å betrakte (Mäkelä 2009). I forbindelse med dette forsøket hadde det også vært interessant og sett på de ulike grunnstoffkonsentrasjonene i prøvene.

Bildene som ble tatt av isolatene på skålene med de ulike vedtypene etter soppkultiveringsforsøkets slutt, viser tydelig at det var mest konidioforer i reaksjonssoneved, noe som er en typisk stress respons hos rotkjuke (Hietala et al. 2009). Videre viste laboratorieanalysen høye konsentrasjoner oksalat i sterilt reaksjonssoneved inokulert med *H. parviporum*. Oksalsyre trenger imidlertid ikke korrelere med høy vekst. Ut ifra mine resultater kan jeg ikke konkludere med at det finnes forskjellige mengder sopp i de ulike prøvene, dette kan etableres gjennom bl.a. kvantifisering av soppens DNA med PCR (Hietala et al. 2002). Nagy et al. (2012) viste at kolonisering av reaksjonssone innebærer en lengre periode med selektiv nedbrytning av pektin og hemicellulose, mens en nedbrytning i kjerneved kan skje relativt raskt. Den langsomme hastigheten på nedbrytningen av reaksjonssoneved, til tross for den tilknyttede høye biomassen av mycel, tyder på at koloniseringen innebærer overdrevet utskillelse av stoffer som primært er knyttet til vev avgiftning, som oksalsyre, snarere enn til nedbrytning av cellevegg (LME) (Swarze & Baum 2000; Nagy et al. 2012).

Jeg kunne ikke påvise en sterk sammenheng mellom oksalatkonsentrasjoner, og om soppisolatet kom ifra kalkrik eller kalkfattig mark, men jeg fant imidlertid en sterk korrelasjon mellom pH i inokulert yteved tatt ifra en frisk stubbeskive, og Ca innhold i jorda. Isolater fra Ca rik jord som ble inokulert hadde en lavere reduksjonen i pH, enn isolater fra mark med et lavere Ca innhold. Denne sammenheng ble vist med en R^2 for prøver ifra kalkfattigmark på 0,73, og for kalkrikmark på 0,81. Resultatene kan indikere at rotkjukeindivider fra mark med ekstremt høy pH har økt pH toleranse, noe som kan bety at stubbebehandling med urea vil kunne gi redusert effekt. Virkningen av urea er basert på at den behandlede stubbesnittflaten får en forhøyet pH, noe som kan føre til en redusert effekt mot rotkjukeindivider som viser økt pH toleranse.

Resultatene viste at reaksjonssoneved hadde høyest pH, mens pH 'en for inokulerte prøver lå generelt lavere enn hos kontrollprøvene. Da jeg i tillegg fant høyere konsentrasjoner av oksalsyre i mange av de inokulerte prøvene, i forhold til kontrollprøvene, underbygger dette teorien om at soppen utskiller oksalsyre for å senke pH til et mer optimalt nivå for nedbrytning (Dutton and Evans 1996).

Jeg fant motsigende resultater for inokulert reaksjonssoneved ifra kalkrik- og kalkfattigmark. Inokulerte prøver på reaksjonssoneved ifra kalkrikmark viste reduserte mengder oksalat i forhold til kontrollprøvene. En mulig forklaring kan være at denne vedtypen hadde, før

laboratorieeksperimentets start, høyere konsentrasjon av oksalsyre som følge av tidligere soppaktivitet. Her vil kationer allerede være kjelatert med oksalsyre slik at soppen ikke trenger å produsere mer oksalat, men bare kataboliserer eksisterende oksalat for å produsere NADH (energi). Lav start mengde oksalat i reaksjonssoneved ifra kalkfattigmark gjør at soppen må produsere oksalat for å kjelater kationer og følgelig er oksalatmengdene her større. En annen mulig forklaring kan være en høy pH og Ca innhold i veden. Ved høy Ca innhold i veden kan oksalsyre bli til kalsiumoksalat, en form som ikke kan støtte lignin degraderings aktiviteten til mangan peroksidase. Har derimot ikke veden høy nok pH eller store nok konsentrasjoner av Ca, vil ikke oksalsyre bli nøytralisert til kalsiumoksalatkrystaller og dermed kan den delta i lignin degradering. PH og Ca er altså to viktige faktorer for hvilken form oksalsyre finnes i, og følgelig rotkjukas nedbrytningsegenskaper.

Det ble innsamlet mer material under denne studien enn det som er blitt presentert her, og det er mulig å implementere dette i videre studier.

Konklusjon

Målet med denne avhandlingen var å undersøke sammenhenger mellom råtefrekvens og jordas pH- og Ca innhold, og studere eventuelle forskjeller mellom rotkjukeindivider ifra kalkrik/kalkfattigmark ved å se på ved pH nivå, grunnstoffkonsentrasjoner og soppens produksjon av oksalat/oksalsyre. I denne undersøkelsen sto rotkjuke alene, eller som kombinasjonsrâte, for 76,43 % av råten, og illustrerer at tiltak som begrenser rotkjukas etablering, vekst og spredningsmuligheter, vil ha stor betydning for råtesituasjonen i de norske skoger.

Resultatene mine bekrefter at jord pH er en sterkere forklaringsvariabel for råtefrekvensen enn det Ca innholdet i jorda er, da Ca bare er en av flere variabler som har innvirkning på pH (2). I denne undersøkelsen kan det ikke konstateres en sammenheng mellom rotkjukeisolaters veksthastighet på agar, og hvilken marktype de kom ifra, selv om trender kan antydes. Gjennom laboratorieeksperimenter kunne det heller ikke påvises en sammenheng mellom ved pH eller oksalsyreproduksjon, og om soppindivider kom ifra kalkrik eller kalkfattig mark (A). Videre ble det heller ikke dokumentert sterke forskjeller i grunnstoffkonsentrasjoner i de ulike vedtypene mellom individer ifra de to marktypene (B). Resultatene mine viser allikevel noen interessante trender ved at trær fra kalkfattigmark generelt hadde gjennomsnittlig høyere grunnstoff- og totalt oksalatinhold, enn trær ifra kalkrikmark, selv om disse verdiene hadde store standardavvik. Med et større prøvematerialet, enn det jeg har hatt, kan man undersøke hvor signifikant disse trendene er.

Resultatene viser at jord pH har innvirkning på grunnstoffers tilgjengelighet, og særlig aluminium (Al) blir mer løselig i surere jord. Det kom klart fram, gjennom analyse av andre organiske syrer hvitråtesopp skiller ut, at oksalsyre er den hyppigste utskilte syren og er følgelig den mest interessante å granske. Videre indikerer resultatene mine at soppen, gjennom utskillelse av oksalsyre, senker pH 'en på vedsubstratet og dermed legger til rette for videre enzymatisk nedbrytning. At det ble funnet større konsentrasjoner av mange grunnstoffer i anilinved (DW1) tyder på at det skjer en akkumulering av grunnstoffer når rotkjuka angriper. Det er fremdeles mange hull i forståelsen rundt økologien til *H. annosum* s.l., som hvorfor det er mer råte på kalkrikemark, hvordan rotkjuka greier å bryte reaksjonssonebarrieren og funksjonen til oksalsyre, og her trengs det flere studier. Framtidige forsøk bør se nærmere på rotkjukeindivider og trær fra mark med ekstremt høy og lav pH for å avklare om rotkjukeindivider fra kalkrikmark har økt pH toleranse og om trær fra kalkfattigmark har en høyere motstandsdyktighet ovenfor rotkjuke enn trær fra kalkrikmark. Spørsmålet om hvorfor det er høyere råtefrekvens på kalkrikemark forblir i denne omgang ubesvart.

Referanser

Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microbial Techn.* 32:78-91.

Bendz-Hellgren, M., Lipponen, K., Solheim, H. and Thomsen, I.M. 1998. Impact, control and management of *Heterobasidion annosum* root and butt rot in Europe and North America. The Nordic Countries. In: S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen and A. Hüttermann (eds.), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. CAB International, Wallingford, UK. ISBN 0 85199 2757. pp. 333-345.

Capretti, P., Korhonen, K., Mugnai, L. & Romagnoli, C. 1990. An intersterility group of *Heterobasidion annosum* specialized to *Abies alba*. *European Journal of Forest Pathology* 20, 231-240.

Cipollini, D. F. & Heil, M. 2010. Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. *CAB Rev: Persp Agric Vet Sci Nut Nat Res* 5: 1–25

Danielsson, M., Lundén, K., Elfstrand, M., Hu, J., Zhao, T., Arnerup, J., Ihrmark, K., Swedjemark, G., Borg-Karlson, A – K. & Stenlid, J. 2011 Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. infection. *BMC Plant Biology* 2011, 11:154.

Diouf, P. N., Delbarre, N., Perrin, D., Gerardin, P., Rapin, C., Jacquot, J.P. & Gelhaye, E. 2002. Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9):4377–4382.

Dutton, M. V., Evans, C. S., Atkey, P. T. & Wood D. A. 1993. Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:5-10

Dutton, M. V. & Evans, C. S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* 42: 881-895.

Enerstvedt, L. I. & Venn, K. 1979. Råte i eldre granskog: en undersøkelse på hogstflater i Øvre Eiker. *Norsk Institutt for Skogforskning* 35/4: 237-264.

Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. & Mohammed, C. 2009. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist* 185(4), 893-908.

Fomina, M., Burford, E. P. & Gadd, G. M. 2006. Fungal dissolution and transformation of minerals: significance for nutrients and metal mobility. In: Gadd, G. M. (Ed.), *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 236-265.

Fossdal, C. G. 2007. CO₂ og bioenergi: Genomstudier av skadesopp kan gi uventede muligheter. *Genialt* 16(4): 18-19.

Fossdal, C. G., Nagy, N., Hietala, A., Yakovlev, I. & Solheim, H. 2011. The reaction zone is a unique plant defense found in trees: differentially expressed genes and cell wall changes. *BMC Proceedings* 2011, 5(Suppl 7):P84.

Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E. & Krekling, T. 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol* 167: 353–376

Garbelotto, M., Ratcliff, A., Cobb, F. W., Bruns, T. D. & Otrosina, W. J. 1996. Use of taxon specific competitive priming PCR to study host specificity, hybridization, and intergroup gene flow in intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Phytopathology* 86: 543-551.

Garbelotto, M., Gonthier, P. & Nicolotti, G. 2007. Ecological constraints limit the fitness of fungal hybrids in the *Heterobasidion annosum* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6106-6111.

Gonthier, P., Nicolotti, G., Linzer, R., Guglielmo, F. & Garbelotto, M. 2007. Invasion of European pine stands by a North American forest pathogen and its hybridization with a native infertile taxon. *Molecular Ecology* 16: 1389-1400.

Greig, B.J.W. and Pratt, J.E. 1976. Some observations on the longevity of *Fomes annosus* in conifer stumps. *European Journal of Forest Pathology* 6: 250-253.

Guggiari, M., Bloque, R., Aragno, M., Verrecchia, E., Job, D. and Junier, P. 2011. Experimental calcium-oxalate crystal production and dissolution by selected wood-rot fungi. *Int. Biodet. Biodegr.* 65:803-809.

Hammel, K. E. & Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:349-355.

Harris, P. J. & Stone, B. A. 2008. Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In: Himmel M., editor. *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell Pub., Oxford, UK, pp. 61-93.

Hietala, A. M., Eikenes, M., Kvaalen, H., Solheim, H. & Fossdal, C.G. 2002. Comparison of quantitative multiplex real-time PCR and ergosterol as tools for determining the infection levels of a highly pathogenic *Heterobasidion parviporum* strain in Norway spruce clones. *In: Proc. 6th Conf. EFPP 2002, Prague: Disease Resistance in Plant Pathology*, p. 30. Abstract 163.

Hietala, A., Kvaalen, H., Schmidt, A., Johnk, N., Solheim, H. & Fossdal, C. G. 2004. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3948-3953.

Hietala, A.M., Nagy, N.E., Steffenrem, A., Fossdal, C.G., Kvaalen, H., and Solheim, H. 2009. Spatial patterns in hyphal growth and wood degradation within Norway spruce stems colonized by the pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion parviporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4069–4078.

Heggertveit, J. & Solheim, H. 1998. Stubberegistrering av råte i gran etter hogst i kommunene Molde, Nesset og Rauma. Rapport fra skogforskningen 16/98: 1-13.

Holmen, E. 1973. Forekomst av råte i gammel granskog på ulike voksesteder i Oslo-området, råtens utbredelse og symptomer. Hovedoppgave ved Norges Landbrukshøgskole.

Horntvedt, R. 1996. Forstpatologi. Kompendium FEP 10. "Forstpatologi og forstentomologi". NISK. 91 s.

Hudgins, J. W., Christiansen, E. & Franceschi, V. R. 2003. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical and chemical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Tree Physiol* 23: 361–371.

Hughes, M. N. & Poole, R. K. 1991. Metal speciation and microbial growth— the hard (and soft) facts. *J Gen Microbiol* 1991;137:725–34.

Huse, K. J. 1983. Forekomst av råte i norsk granskog. (Frequency of butt rot in stands of *Picea abies* (L.) Karst. In Norway). *Rapp. Nor. inst. skogforsk.* 3/83: 1-39.

Huse, K. J., Solheim, H. & Venn, K. 1994. Råte i gran registrert på stubber etter hogst vinteren 1992. *Rapp. Skogforsk* 23/94: 1-26.

Huse, K. J. & Venn, K. 1994. Vertical spread of *Heterobasidion annosum* in stems of Norway spruce. In: M. Johansson and J. Stenlid (eds.), *Proceedings of the 8th IUFRO root and butt rot conference in Sweden and Finland, August 9-16, 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.* pp. 208-212.

Ihrmark, K. 2001. Double-stranded RNA elements in the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. Doctor's dissertation. ISSN 1401-6230, ISBN 91-576-6094-8.

Jarosz-Wilkolazka, A. & Graz, M. 2006. Organic acids production by white rot basidiomycetes in the presence of metallic oxides. *Can. J. Microbiol.* 52:779-785.

Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117), 323-329.

Kallio, T. & Tamminen, P. 1974. Decay of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in the Åland Islands. *Acta For. Fenn.* 138: 1-42.

Korhonen, K. 1978. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae.* 94 (6), 1-25.

Korhonen, K. and Piri, T. 1994. The main hosts and distribution of the S and P groups of *Heterobasidion annosum* in Finland. In: Johansson, M. & Stenlid, J. (eds.), *Proceedings of the 8th Int. Conf. on Root and Butt Rots, Sweden and Finland, Aug. 9-16, 1993, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden,* pp. 260-267. ISBN 91- 576-4803-4.

- Korhonen, K. & Stenlid, J. 1998. Biology of *Heterobasidion annosum*. In: *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Ed. by Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. and Hiittermann, A. CAB International. Wallingford, UK. pp. 43-70.
- Krekling, T., Franceschi, V. R., Berryman, A. A. & Christiansen, E. 2000. The structure and development of polyphenolic parenchyma cells in Norway spruce (*Picea abies*) bark. *Flora* 195: 354–369
- Lindberg, M. & Johansson, M. 1992. Resistance of *picea abies* seedling to infection by *Heterobasidion annosum* in relation to drought stress. *European Journal of Forest Pathology* 22: 115-124.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R. & Stenlid, J. 2004. Planting *Betula pendula* on pine sites infested by *Heterobasidion annosum*: disease transfer, silvicultural evaluation and community of wood inhabiting fungi. *Can. J. For. Res.* 34, 120-130.
- Munir, E., Yoon, J.J., Tokimatsu, T., Hattori, T., Shimada, M., 2001. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 11126-11130.
- Mäkelä, M. R. 2009. The white-rot fungi *Phlebia radiata* and *Dichomitus squalens* in wood-based cultures: expression of laccases, lignin peroxidases, and oxalate decarboxylase. Masteroppgave fra: Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Molecular Biosciences University of Helsinki.
- Mäkelä, M., Galkin, S., Hatakka, A., and Lundell, T. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enz. Microbial Techn.* 30:542, 549.
- Nagy, N. E., Krokene, P., and Solheim, H. 2006. Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiol.* 26:159-167.
- Nagy, N. E., Balance, S., Kvaalen, H., Fossdal, C. F., Solheim, H. & Ari Hietala, A. M. 2012. Xylem defense wood of Norway spruce compromised by the pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion parviporum* shows a prolonged period of selective decay. *International Journal of Plant Biology*.

Nagy, N. E., Kvaalen, H., Fongen, M., Fossdal, C. G., Clarke, N., Solheim, H. & Hietala, A. M. The pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion parviporum* responds to spruce xylem defense by enhanced production of oxalic acid. *Molecular Plant. Microbe. Interactions* (i trykk/upublisert).

Nasjonal berggrunnsdatabase. 2011. Tilgjengelig fra: <http://geo.ngu.no/kart/berggrunn/> (Lest: 13.06.2011).

Niemela, T. & Korhonen, K. 1998. Taxonomy of the genus *Heterobasidion*. In: *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Ed. by Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. and Hiittermann, A. CAB International. Wallingford, UK. pp. 27-33.

Nilsson, T., Karlton, E. & Rothpfeffer, C. 2002. Effekter av rotröta (*Heterobasidion annosum*) på elementhalter i stamved från gran (*Picea abies* (L.) Karst.). KAM-rapport A70.

Nobles, M. K. 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res.*

Oliva, J., Thor, M. & Stenlid, J. 2010 a. Long-term effects of mechanized stump treatment against *Heterobasidion annosum* root rot in *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* 40(6), 1020-1033.

Oliva, J., Thor, M. & Stenlid, J. 2010 b. Reaction zone and periodic increment decrease in *Picea abies* trees infected by *Heterobasidion annosum* s.l. *Forest Ecology and Management* 260(5), 692-698.

Ostrofsky, A., Jellison, J., Smith, K.T. & Shortle, W.C. 1997. Changes in cation concentrations in red spruce wood decayed by brown rot and white rot fungi. *Can. J. For. Res.* 27(4): 567-571.

Pearce, R. B. 1991. Reaction zone relics and the dynamics of fungal spread in the xylem of woody angiosperms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:41-55.

Penttilä, R., Siitonen, J. & Kuusinen, M. 2004. Polypore diversity in managed and old-growth boreal *Picea abies* forests in southern Finland. *Biological Conservation* 117: 271-283.

Piri, T. 2003. Early development of root rot in young Norway spruce planted on sites infected by *Heterobasidion* in southern Finland. *Canadian Journal of Forest Research* 33: 604-611.

Piri, T., Korhonen, K. and Sairanen, A. 1990. Occurrence of *Heterobasidion annosum* in pure and mixed spruce stands in southern Finland. Scandinavian Journal of Forest Research 5: 113-125.

Piri, T. & Korhonen, K. 2007. Spatial distribution and persistence of *Heterobasidion parviporum* genets on a Norway spruce site. Forest Pathology 37: 1-8.

Punja, Z. K., Huang, J.-S. & Jenkins, S. F. 1985. Relationship of mycelial growth and production of oxalic acid and cell wall degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*. Can. J. Plant Pathol. 7:109–117.

Roll-Hansen, F. & Roll-Hansen, H. 1993. Sykdommer på skogstrær. 2 utg.. Landbruksforlaget: 120 s.

Sayer, J. & Gadd, G. M. 1997. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. Mycol Res 1997;106:653–61.

Schilling, J. S. & Jellison, J. 2004. High-performance liquid chromatographic analysis of soluble and total oxalate in Ca- and Mg-amended liquid cultures of three wood decay fungi. Holzforschung 58:682-687.

Schwantes, H. O., Courtois, H. & Ahrberg, H. E. 1976. Ökologie und Physiologie von *Formes annosus*. I: Der Wurzelschwamm (*Formes annosum*) und die Rotfäule der Fichte (*Picea abies*). Forstwissenschaftliche Forschungen, Beihefte zum Fortwissenschaftliches Centralblatt, 36. Verlag Paul Parey. Hamburg und Berlin, pp 14-30.

Schwarze, F. W. M. R., Baum, S. 2000. Mechanisms of reaction zone penetration by decay fungi in wood of beech (*Fagus sylvatica*). New Phytol 146:129–140.

Schütt, P. & Schuck, H. J. 1979. *Fomes annosus* sporocarps – their abundance on decayed logs left in the forest. Eur J For Path 9: 57–61.

Schönar, S. 1969. Untersuchungen über das Vorkommen von Rotfäulepilzen in Fichtenbeständen der Schwäbischen Alb. Mitt. Ver. Forstl. Standortskunde ForstpflZücht. 19: 20-28.

- Shain, L. 1971. The response of sapwood of Norway spruce to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology* 61(3): 301-307.
- Shimada, M., Ma, D.B., Akamatsu, Y., Hattori, T., 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 285-296.
- Shimada, M., Akamatsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., and Hattori, T. 1997. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotech.* 53:103–113.
- Sithole, B. 2005. New method of measuring the pH of wood chips. Presented at the 59th Appita Conference, Auckland, New Zealand 16-19 may 2005.
- Soil acidity and liming – part 2, Internet inservice training. 2012. Tilgjengelig fra: [file:///Users/bruker/Desktop/Soil%20Acidity%20and%20Liming%20\(Overview\),elementer4.webarchive](file:///Users/bruker/Desktop/Soil%20Acidity%20and%20Liming%20(Overview),elementer4.webarchive) (Lest 09.07.2012).
- Solberg, S. & Dalen, L. S. (red.) 2007. Effekter av klimaendring på skogens helsetilstand, og aktuelle overvåkingsmetoder. *Viten fra Skog og landskap* 3/07: 42 s.
- Solheim, H. 1994. Infeksjon av rotkjuke på granstubber til ulike årstider og effekten av ureabehandling. Rapport fra Skogforsk 3/94. 10 p.
- Solheim, H. 1999. Sporespredning hos rotkjuke (*Heterobasidion annosum*) i Rana og Saltdalen. Rapport fra skogforskningen 3/99: 1-11.
- Solheim, H. 2010. Råtesopper – i levende trær. Fakta hefta fra Skog og Landskap 10: 1-26.
- Solheim, H. & Holen, O. C. 1990. Rotråde- et sunnhetsproblem i norsk granskog. *Norsk skogbruk* 36 (5): 26-27.
- Stamnes, V. S. G., Solberg, S. & Solheim, H. 2000. En analyse av råtefrekvens i eldre granskog, utifra skoglige, klimatiske og edafiske faktorer. Rapport fra skogforskningen. 17/00: 1-16.

Stenlid, J. & Wästerlund, I. 1986. Estimating the frequency of stem rot in *Picea abies* using an increment borer. *Scandinavian Journal of Forest Research* 1: 303-308.

Stenlid, J., Karlsson, M., Lind, M., Lundèn, K., Adomas, A., Asiegbu, f. & Olson, Å. 2006. Pathogenicity in *Heterobasidion annosum* s.l. *Aktuelt fra skogforskningen* 1/06: 13-15.

Swedjemark, G. 1995. *Heterobasidion annosum* root rot in *Picea abies*: variability in aggressiveness and resistance. Doctor's dissertation, Dept. Forest Mycol. Pathol., Swed. Univ. Agr. Sci., Uppsala, Sweden. 42 pp.

Swedjemark, G. & Stenlid, J. 1997. Between-tree and between-isolate variation for growth of S-group *Heterobasidion annosum* in sapwood of *Picea abies* cuttings. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 711-715.

Taubert, J. 2008. Temperature requirements for germination of conidiospores and growth of mycelia of *Heterobasidion annosum* s. s. and *Heterobasidion parviporum*. Master Thesis no. 123. Swedish University of Agricultural Sciences, Southern Swedish Forest Research Centre

Thor, M. & Stenlid, J. 2005. *Heterobasidion annosum* infection following mechanised first thinning and stump treatment in *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 20, 154-164.

Traquiar, J. A. 1987. Oxalic acid and calcium oxalate production by *Leucostoma cincta* and *L. personii* in culture and in peach bark tissues. *Can. J. Bot.* 65:1952-1956.

Vasiliauskas, R. & Stenlid, J. 1998. Spread of S and P group isolates of *Heterobasidion annosum* within and among *Picea abies* trees in central Lithuania. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 961-966.

Qian, Y., Goodell, B., Felix, C.C. 2002. The effect of low molecular weight chelators on iron chelation and free radical generation as studied by ESR measurement. *Chemosphere* 48:21–28.

Vedlegg

Vedlegg 1. Oversikt over forsøksbestandene

Felt	Prøvenr	Hoh (m)	Koordinater	Ph i jord	Ca (mg/kg TS)	Råtetellingutført	Brukt i vekststudiet	Kjemisk analyse	Soppkultiveringstf.
Aurskog/Høland (Ovlien)	H5	297	N60 03 04	E11 43 29	4,57	1311			
Aurskog/Høland (Baronkogen)	H7	250	N60 02 28	E11 43 17	4,22	1905			
Aurskog/Høland (Baronskogen)	H8	259	N59 59 19	E11 43 31	4,36	3503			
Nittedal/ Skedsmo 1 (Nittedal)	NS1	238	N60 06 02	E10 50 59	5,06	1274	x	x	
Nittedal/ Skedsmo 2 (Nittedal)	NS2	159	N60 05 33	E10 51 58	4,7	1511	x		
Nittedal/Skedsmo 3 (Nittedal)	NS3	140	N60 03 10	E10 54 06	4,49	1252	x	x	
Nittedal/Skedsmo 4 (Nittedal)	NS4	148	N60 02 12	E10 52 36	4,05	1790	x		
Nittedal/Skedsmo 5 (Nittedal)	NS5	217	N60 01 32	E10 52 25	4,16	1953	x	x	
Nittedal/Skedsmo 7 (Nittedal)	NS7	250	N60 01 37	E10 55 54	3,78	915	x	x	2011-169/1
Nittedal/Skedsmo 8 (Nittedal)	NS8	157	N60 00 07	E10 57 48	4,3	1445	x		
Nittedal/Skedsmo 9 (Skedsmo)	NS9	113	N59 59 43	E10 58 56	4,49	3174	x	x x	
Nittedal/Skedsmo 10 (Skedsmo)	NS10	193	N60 00 11	E11 00 57	4,13	732	x		
Hadeland 1 (Roen)	Ha1	266	N60 17 51	E10 24 57	5,65	5086			
Hadeland 2 Sølvsberget()	Ha2	357	N60 22 01	E10 28 22	5,72	6672			
Hadeland 3 (Kjekstad)	Ha3	271	N60 21 52	E10 27 40	5,52	8764	x		
Hadeland 4 (Monserud)	Ha4	286	N60 21 48	E10 27 08	5,44	4705	x		
Hadeland 5 (Sølvsberget)	Ha5	407	N60 22 03	E10 28 35	5,96	5772	x		2011-129/2
Hadeland 6 (Jevnaker)	Ha6	476	N60 15 58	E10 32 03	4,74	2431	x		
Hadeland 7 (Jevnaker)	Ha7	460	N60 15 48	E10 31 33	4,61	2324	x		
Hadeland 8 (Jevnaker)	Ha8	533	N60 12 38	E10 31 51	4,29	1551	x		
Hadeland 9 (Jevnaker)	Ha9	571	N60 15 28	E10 31 21	4,88	3398	x	x	
Hadeland 10 (Gran almenning)	Ha10	600	N60 24 43	E10 44 19					2012-6/1
Hadeland 11 (Kjekstad)	Ha11	295	N60 22 01	E10 27 32					2012-5/1
Ringsaker 1 (Nes)	N1	179	N60 48 49	E10 56 56	6,36	15035	x		2011-102/1/1
Ringsaker 2 (Nes)	N2	252	N60 47 56	E10 57 22	5,74	4047	x		
Ringsaker 3 (Nes)	N3	305	N60 48 28	E10 49 32	4,83	3085	x		
Ringsaker 4 (Nes)	N4	234	N60 50 20	E10 46 12	5,81	6942	x		2011-108/1/1
Ringsaker 5 (Nes)	N5	249	N60 51 33	E10 50 05	4,98	1977	x		
Ringsaker 6 (Brøttum)	N6	701	N61 07 16	E10 41 18	3,94	586	x		
Ringsaker 7 (Brøttum)	N7	418	N61 02 50	E10 36 29	4,83	1549	x		
Ringsaker 8 (Brøttum)	N8	332	N61 03 34	E10 29 46	4,11	1569	x		2011-117/1/1
Ringsaker 9 (Brøttum)	N9	378	N61 03 35	E10 31 10	4,82	1498	x		
Ringsaker 10 (Lillehammer)	N10	149	N61 05 11	E10 27 48	5,75	4132	x		
Hedemarken 1 (Tangen)	S1	166	N60 36 48	E11 14 42	5,03	2514	x	x x	
Hedemarken 2 (Stange)	S2	270	N60 40 18	E11 10 39	3,91	200	x	x	2011-149/1
Hedemarken 3 (Stange)	S3	176	N60 41 25	E11 08 20	4,01	1239	x		2011-146/2/1
Hedemarken 4 (Stange)	S4	172	N60 40 47	E11 07 50	4,43	2208	x	x	
Hedemarken 5 (Stange)	S5	160	N60 42 16	E11 06 42	5,25	4239	x	x	
Hedemarken 6 (Hamar)	S6	226	N60 49 12	E11 14 14	5,11	1759	x	x	
Hedemarken 7 (Hamar)	S7	149	N60 50 01	E11 05 48	4,24	1025	x		
Hedemarken 8 (Hamar)	S8	150	N60 49 48	E11 06 13	4,74	1733	x		
Hedemarken 9 (Hamar)	S9	377	N60 52 36	E11 11 47	4,02	321	x		
Hedemarken 10 (Stange)	S10	206	N60 45 52	E11 11 12	5,12	3567	x	x	2011-133/1

Vedlegg 2. Feltskjema anvendt under råtetellingen

Sted og flatenr:

Dato:

Bilde:

Hoh:

Koordinater:

Antall friske trær:

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Antall råteinfisertetrær:

Rotkjuke

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Honningsopp:

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Kombinasjonsrâte:

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Sårråte:

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

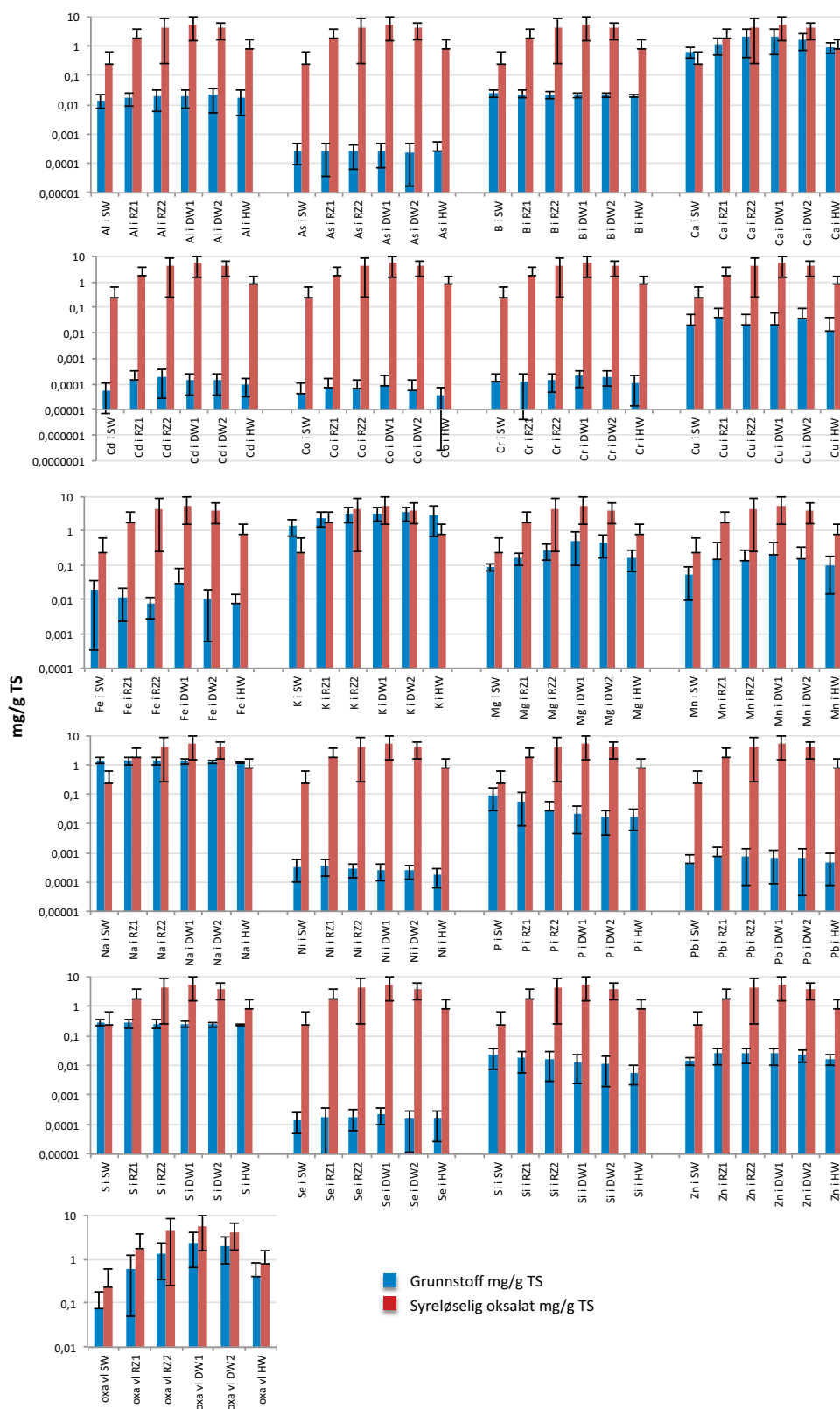
	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Annen råte:

Diameterklasser fordelt på råteomfang (%):

	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	>50
≤ 10 %					
11-25 %					
26-50 %					
51-80 %					
> 80 %					

Vedlegg 3. Konsentrasjonen av grunnstoffer og syreløselig oksalat i vedsonene



Konsentrasjonen av alle de undersøkte grunnstoffene og syreløselig oksalat i de ulike rotjukeinfiserte vedsonene (SW, RZ1, RZ2, DW1, DW2 og HW). Material fra kalkrik- og kalkfattigmark er presentert sammen i denne figuren.