



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning

Effekter av metyl-jasmonat på frøanatomi og terpenkonsentrasjoner i små granplanter

Effects of methyl jasmonate on seed anatomy and
terpene concentrations in small spruce plants

Konrad Skåravik Bryhn

Master i skogfag

Forord

Som en del av det avsluttende året ved studiet 2-årig mastergrad i skogfag skal det skrives en masteroppgave som skal representere slutten på utdanningen. Prosessen har vært krevende, men meget lærerik og interessant.

Først og fremst ønsker jeg å takke mine veiledere: Melissa Magerøy (NIBIO) og Paal Krokene (NIBIO & NMBU). Melissa var til stor hjelp fra første stund, i oppstartsfasen og underveis med lab-arbeidet, og videre når jeg skulle begynne med statistikk. Takk til Paal for god hjelp med skriveprosessen, og tips og råd underveis. En takk også til Hans Ragnar Norli på NIBIO for hjelp med de kjemiske analysene. Sist, men ikke minst, sendes en takk til studiekamerater for å ha gjort dette til to gode år.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 14. mai 2019

Konrad Skåravik Bryhn

Sammendrag

Gransnutebilleren (*Hylobius abietis*) er en stor skadegjører i plantefelt med gran (*Picea abies*), og i internasjonal sammenheng gjør den skade for millioner av euro hvert år. Samtidig har giftige insekticider, tidligere brukt til å beskytte granplantene, blitt forbudt. Som følge av de store skadene gransnutebilleren forårsaker har det blitt forsket på bruken av det naturlige plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) som et miljøvennlig alternativ. MJ aktiverer forsvarssystemet til granplanter og gjør dem mer motstandsdyktige mot angrep. Det er ikke tidligere blitt studert hvordan behandling av granfrø med MJ påvirker frøanatomi og terpeninnholdet i de unge plantene som spirer fra behandlet frø. Jeg ønsket å teste følgende hypoteser: (1) Høye konsentrasjoner av MJ påvirker frøene negativt, for eksempel ved at frøene får kortere embryo; (2) Planter som spirer fra granfrø behandlet med MJ har høyere konsentrasjoner av terpenener enn planter fra kontrollfrø; (3) Fysisk skading av planter fra MJ-behandlede frø gir ytterligere økte konsentrasjoner av terpenener.

I januar 2019 ble granfrø behandlet med to ulike konsentrasjoner av MJ (0,1 mM og 0,5 mM), eller de forble ubehandlet som kontrollfrø. 300 frø til frøanatomiske analyser ble behandlet, og av disse ble 181 frø, fordelt på de tre behandlingene, delt i to og studert under mikroskop for å måle embryolengde. I tillegg ble 190 frø fra hver behandling plantet i M95 pottebrett og satt til spiring i vekstkamre. Alle behandlingene hadde en lav spireprosent, og frø behandlet med 0,1 mM MJ var dårligst med en spireprosent på kun 2,1 %. Etter syv uker i vekstkamrene ble åtte planter fra kontrollfrø og åtte planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ ekstrahert i heksan og klargjort for GC-MS analyser.

Jeg fant en signifikant forskjell i embryolengde målt én uke etterbehandling, mellom kontrollfrø og frø behandlet med 0,5 mM MJ. Det var ingen forskjell mellom kontrollfrø og 0,1 MJ. Samlet sett for alle ukene var det en tendens til forskjell i embryolengde mellom behandlingene ($p = 0.085$). Den totale konsentrasjonen av terpenener i småplantene var ikke signifikant forskjellig mellom behandlingene ($p = 0.425$), men jeg fant signifikante behandlingsforskjeller for fire individuelle terpenener (4-allylanisol, β -myrcene, tetradecane, terpinolen). Skadede planter som spiret fra frø behandlet med 0,5 mM MJ hadde noe overraskende lavere terpenkonsentrasjoner enn planter som spiret fra frø behandlet med 0,5 MJ.

Abstract

The large spruce weevil (*Hylobius abietis*) is a major pest in Norway spruce (*Picea abies*) plantations, and in an international context, it does damage for millions of euros every year. At the same time, toxic insecticides, previously used to protect the spruce plants, have been banned. Because of the large damage caused by the large spruce weevil, the use of the natural plant hormone methyl jasmonate (MJ) as an environmentally friendly alternative, has been researched. MJ can activate the defense system for spruce plants and make them more resistant against attack. However, the effect of MJ treatment on spruce anatomy and the terpene content of the young plants sprouting from treated seeds is not known. Therefore, I wanted to test the following hypotheses: (1) High concentrations of MJ adversely affect the seeds, for example, by giving the seeds shorter embryos; (2) Plants that germinate from spruce seeds treated with MJ have higher concentrations of terpenes than plants from control seeds; (3) Physical damage of plants from MJ-treated seeds gives a greater increase in terpene concentrations than corresponding damage to plants that germinate from control seeds.

In January 2019, spruce seeds were treated with two different concentrations of MJ (0.1 mM and 0.5 mM), or they remained untreated as control seeds. In total, 300 seeds to seed anatomical analysis were treated, of which 181 seeds were cut in half and studied under microscope to measure embryonic length. In addition, 190 seeds from each treatment were planted in M95 pots and germinated in growth chambers. All treatments had a low sprout percentage, and seeds treated with 0.1 mM MJ were worst with a sprout percentage of only 2.1%. After seven weeks in the growth chambers, eight plants from control seeds and eight plants from seeds treated with 0.5 mM MJ were extracted into hexane and prepared for GC-MS analysis.

I found a significant difference in embryo length measured one week post-treatment, between control seeds and seeds treated with 0.5 mM MJ. There was no difference between control seeds and 0.1 MJ. Overall, for all weeks, there was a tendency for difference in embryonic length between treatments ($p = 0.085$). The total concentration of terpenes in the small plants was not significantly different between treatments ($p = 0.425$), but we found significant treatment differences for four individual terpenes (4-allylanisol, β -myrcene, tetradecane, terpinol). Damaged plants that sprouted from seeds treated with 0.5 mM MJ had somewhat surprisingly lower terpene concentrations than plants that germinated from seeds treated with 0.5 MJ.

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Sammendrag	IV
Abstract	VI
1 Innledning	1
2 Materiale og metode	5
2.1 Plantemateriale	5
2.2 Anatomiske frøanalyser.....	5
2.3 Såing og spiring.....	6
2.4 Klargjøring av planter til kjemiske analyser.....	7
2.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC – MS)	8
2.6 Statistiske analyser	9
3 Resultater	10
3.1 Frøanalyser	10
3.2 Spireprosent	15
3.3 Prosentvis andel av terpenener	16
3.4 Terpenkonsentrasjoner i intakte planter fra kontrollfrø (TW) og frø behandlet med 0,5 mM MJ	17
4 Diskusjon	24
4.1 Embryoutvikling og spireprosent	24
4.2 Konsentrasjon av terpenener	26
4.3 Konsentrasjon av terpenener i skadede planter	27
4.4 Feilkilder	28
5 Konklusjon	29
6 Litteratur	30
7 Vedlegg	34

1 Innledning

Ved hjelp av pollenanalyser og karbondateringer har forskere funnet ut at grana (*Picea abies*) vandret inn i Norge fra øst og nordøst. Med granas innvandring for rundt 2500 år siden (Hafsten, 1992) fulgte også store verdier. Utnyttelsen av gran var i starten først og fremst knyttet til energi og bygningsmateriale, men sammen med den industrielle revolusjonen fulgte nye og mer effektive metoder for å utnytte skogen. Konsekvensen av dette ble etter hvert det vi i dag kaller for «det moderne skogbruket», og referer blant annet til bruk av effektive skogsmaskiner, flatehogst, planting og markberedning.

Sammen med furu (*Pinus sylvestris*) og ulike typer lauvtrær er gran et av våre mest utbredte treslag. Data fra Landsskogtakseringen viser at 27,4 % av Norges skogareal er grandominert, og ser man på det produktive skogarealet er hele 35 % grandominert (NIBIO, 2019). I 2018 ble det avvirket 10,8 millioner m³ tømmer for industriformål og av dette sto gran for 7,9 millioner m³. Gran representerer dermed 73 % av all skog hogget i Norge, og toppe derfor også listen over treslag med høyest økonomisk verdi (SSB, 2019).

Fordi utnyttelsen av gran er stor, er foryngelsen i etterkant av hogst svært viktig. Skogeier er i henhold til § 6 i lov om skogbruk pålagt å følge opp ny foryngelse etter hogst og sørge for at gjeldene krav til planter per dekar er tilfredsstilt. I 2018 ble 206 000 dekar skogareal plantet, en økning på 73 % siden 2010 (Landbruksdirektoratet, 2019), og norske planteskoler leverte i 2018 mer enn 39 millioner planter av norsk gran (Skogfrøverket, 2019). Sannsynligvis har den økte plantingen flere årsaker, slik som større bevisstgjøring rundt viktigheten og fordelene av planting, indirekte tilskuddsordninger fra staten gjennom skogfondsordningen, samt gunstigere tilskuddsordninger til suppleringsplanting. Det gjennomsnittlige planteantallet per dekar har også økt noe de seneste år (Granhus, Breidenbach, Eriksen, Gjertsen, Solberg, 2018).

Som en konsekvens av et skogbruk med høy avvirkning og påfølgende foryngelse har gransnutebillen (*Hylobius abietis*) etablert seg som en viktig skadegjører i norske skoger, og ellers i Europa, der den gjør skade for flere millioner euro hvert år (Leather, Day, Salisbury, 1999; Wallertz, 2005). Det moderne skogbruket med flatehogst og nyplanting passer perfekt til gransnutebillens livssyklus, siden billene legger egg i røttene på stubber og livnærer seg på blant annet unge granplanter. Dette har gjort at gransnutebillen har fått tilnavnet «et barn av bestandsskogbruket» (Långström & Day, 2007). Små granplanter er særlig utsatt for snutebilleangrep. Gnag i barken og kambielaget fra rothalsen og oppover stammen kan føre til ringbarking, hel eller delvis stopp i vanntransporten, uttørking og etter hvert plantedød

(Långström & Day, 2007). Døde planter gir skogeierne økonomiske tap i form av behov for suppleringsplanting og økte omløpstider. I Sverige er kostnaden knyttet til skader på skog fra gransnutebillen på flere hundre millioner årlig (Sveriges-lantbruksuniversitet, u.å.).

I NIBIO-rapporten «Snutebilleskader i Sør-Norge 2017» (Hanssen & Fløistad, 2018) vises det til stor avgang som følge av snutebilleangrep i mange fylker. På bare 10 % av prøveflatene ble det ikke funnet granplanter med snutebilleskader. Gjennomsnittlig plantetetthet var på kun 153 planter per dekar, noe som trolig skyldes en avgang på grunn av gransnutebiller på minimum 7 % (Hanssen & Fløistad, 2018). I undersøkelser fra prøveflater på hogstfelt i Hordaland, Rogaland, Sogn og Fjordane, Møre - og Romsdal, og Trøndelag var gjennomsnittlig dødelighet på grunn av gransnutebillen 11 %, og 26 % av plantene hadde gnagskader (Hanssen, 2010). Disse undersøkelsene viser at gransnutebillen gir betydelige skader, selv om granplantene som blir plantet ut har blitt behandlet med pesticider.

For å forhindre skader er det utviklet ulike skjøtselsmetoder og kjemiske behandlinger som skal beskytte granplantene. Imidakloprid er et vannløselig insekticid som inntil nylig var godkjent for å beskytte granplanter mot blant annet gransnutebillen. Imidlertid er dette preparatet, sammen med flere andre insekticider, svært giftig for vannlevende organismer, bier og andre insekter (Mattilsynet, u.å.; Berglund, Lindström, Aghelpasand, Stattin, Ohlsson, 2015). I 2018 ble det derfor innført et forbud mot all utendørs bruk av preparatet Merit forest som inneholder insektgiften imidakloprid i EU- og EØS-området (Mattilsynet, 2018). Et miljøvennlig alternativ som mange planteskoler bruker i dag er voks. Voksen er laget av et biologisk materiale og blir sprøytet nederst på stammen til småplantene, enten automatisk eller manuelt. Voksen beskytter granplantene fysisk mot gnag fra snutebillen, og metoden har vist seg å ha like god effekt som insekticider uten tilførsel av skadelige giftstoffer til økosystemet (Härlin, Eriksson, 2014). Investeringskostnadene i forbindelse med voksbehandling er imidlertid store. Norgesplanter AS investerte i 2017 15 millioner kroner i en ny produksjonslinje, hvor store deler av kostnadene var knyttet til produksjonsanlegget for voksing (Skogselskapet, 2017).

Blant skjøtselsmetodene er det markberedning som er mest aktuelt for gran. Markberedning har vist seg å redusere snutebilleskadene betraktelig, da billene foretrekker å ha skjulesteder i nærheten av plantene de gnager på og helst unngår de åpne områdene som markberedningen etterlater seg. Billene er også mer utsatt for predasjon på markberedningsflekkene (Bjørklund, 2008). Markberedning krever imidlertid spesialutstyr og er forholdsvis kostbart: gjennomsnittsprisen for markberedning lå i 2018 på 346 kr per dekar (SSB, 2018). Planting under skjermstilling har også vist seg å redusere skader av gransnutebillen. Skjermen tilbyr billene en

alternativ næringskilde i trekronene (Örlander, Nordlander, Wallertz, Nordenhem, 2000), men hogstformen er svært lite utbredt i granskog (<4 % av all hogst; Landbruksdirektoratet, 2018). Økt ventetid mellom hogst og planting kan også gi mindre snutebilleskader, men gir økte problemer med konkurrerende vegetasjon. Svenske studier har vist at det var mest skader etter en ventetid på 2 år og minst skader etter en ventetid på 4 år (Von Sydow & Örlander, 1994). Etter 4 år vil det imidlertid ha kommet store oppslag av konkurrerende vegetasjon som gjør plantingens vanskeligere og gir plantene dårligere vekstforhold.

Gjennom evolusjon og sameksistens med ulike skadegjørere har grana også utviklet et eget forsvar. Forsvaret til gran og andre planter kan deles inn i stående forsvar og induserbart forsvar (Franceschi, Krokene, Christiansen, Krekling, 2005). Det stående forsvar er til stede hele tiden, også før planten er angrepet, og baserer seg på både mekanisk og kjemisk forsvar. Mekanisk forsvar består av harde og tykke strukturer i vevet, som først og fremst skal beskytte mot skader på bark og kambium, samt hindre skader som kan forstyrre vanntransporten i yteveden. Kjemisk forsvar innebærer produksjon og lagring av kjemikalier som fenoler, terpenier og alkaloider (Franceschi et al., 2005). Kvae, som er den seigtflytende væsken som kan observeres ved skader på bartrær, skilles ut fra kvaekanaler og kan fysisk fange små organismer (Franceschi et al., 2005). I tillegg kan terpenier være både frastøtende og giftige for insekter og andre plantespisere (Heijari, Nerg, Kainulainen, Viiri, Vuorinen, Holopainen, 2005). Det induserbare forsvar har en rekke ulike komponenter som kan aktiveres ved angrep (Franceschi et al., 2005). Økt produksjon av terpenier i stamme og nåler er en av de viktigste forsvarsresponsene granplantene har mot skadegjørere (Heijari et al., 2005; Berglund, Lindström, Aghelpasand, Stattin, Ohlsson, 2015).

Det naturlige plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) kan aktivere induserbare forsvarsresponsen i granplanter (Martin, Tholl, Gershenzon, Bohlmann, 2002). Studier har vist at påføring av MJ inducerer forsvar til granplanter direkte, på en lignende måte som angrep fra skadegjørere. Spraying av MJ på unge granplanter fører blant annet til en økt akkumulering av mono- og diterpenier (Martin, et al., 2002), samt dannelse av traumatiske kvaekanaler ytterst i yteveden. Forsvarssystemet til plantene kan også bli induert på en annen måte, gjennom såkalt forsvarspriming. Forsvarspriming beskriver en fysiologisk tilstand der en tidligere påvirkning gjør planten mer resistent mot patogener og insekter, men forsvar aktiveres først etter at planten blir angrepet. Fordi det er en forsinkelse i aktiveringen av forsvar, medfører priming lavere kostnader for planten enn direkte induserbart forsvar (Conrath, Beckers, Flors, García-Agustín, Jakab, Mauch, Pugin, 2006). Priming har tidligere blitt studert i både småplanter og

eldre grantrær, men bortsett fra et lite forsøk i Sverige (Berglund et al., 2015) har ingen tidligere sett på effekten av å prime granfrø med MJ. Videre har ingen studert de direkte effektene av MJ-behandling på frøene, eller hvordan konsentrasjonen av terpenener i plantene som spirer fra frøene påvirkes av MJ-behandling. Dersom MJ-behandling av frø kan gi økt motstandskraft til små granplanter vil dette kunne være et godt alternativ eller supplement til kostbare skjøtelsesmetoder og produksjonsanlegg for voksing, og ikke minst til skadelige insekticider (Berglund, et al., 2015).

Målet med denne studien er å undersøke effekten av å prime granfrø med MJ. Følgende hypoteser ble testet: (1) Høye konsentrasjoner av MJ påvirker frøene negativt, for eksempel ved at frøene får kortere embryo; (2) Planter som spirer fra granfrø behandlet med MJ har høyere konsentrasjoner av terpenener enn planter fra ubehandlede kontrollfrø; (3) Fysisk skading av planter fra MJ-behandlede frø gir ytterligere forhøyninger av terpenkonsentrasjoner i plantene.

Gjennom å teste disse hypotesene kan vi få mer kunnskap om hvordan MJ-behandling av frø påvirker unge granplanter, og dermed komme et steg videre for å finne effektive tiltak mot dødelige snutebilleangrep på unge granplanter.

2 Materiale og metode

Alle forsøkene ble gjort innendørs i NIBIO sine laboratorier på Ås. Det omfatter frøspiring i vekstkamre, anatomiske frøanalyser og kjemiske analyser av plantene. Alle forsøkene ble igangsatt i januar 2019.

2.1 Plantemateriale

Jeg testet de tre hypotesene ved å gjøre to uavhengige forsøk: Behandling av frø med MJ og anatomiske analyser i mikroskop, og behandling av frø med MJ og kjemiske analyser av plantene som spiret. Frøene benyttet til frøspiring, såring av frøplanter og kjemiske analyser hadde opprinnelse i Halden med provenienskode CØ1 (98063). Frøene benyttet til anatomiske frøanalyser hadde opprinnelse i Hogstmark forsøksfelt i Ås med provenienskode CØ1, familie 6 (15951). Provenienskodene forteller hvilket sankeområde og høydelag frøene er hentet fra. I dette tilfellet Østlandet og høydelag 1 (0-149 m. o. h.) for begge frøkildene (Skogfrøverket, 1995).

2.2 Anatomiske frøanalyser

22. januar ble frøene behandlet med en blanding av vann, tween og MJ. Tween er et overflateaktivt stoff som tilsettes for å øke kontakten mellom MJ og frøene. Det har tidligere blitt observert svakt forsvarsfremkallende virkninger av tween (Moreira, Sampedro, Zas, 2009), og jeg behandlet derfor kontrollfrøene med vann tilsatt tween. Jeg brukte 100 frø per behandling. Frøene ble plassert i tre glass med henholdsvis kontrolløsning (vann og tween), 0,1 mM MJ og 0,5 mM MJ (Tabell 1). Tween-konsentrasjonen for alle tre behandlinger var 0,1 %. Glassene ble plassert på et vibrasjonsbrett for å holde blandingene i konstant bevegelse. Etter 24 timer ble frøene skylt i rent vann og tatt med til laboratoriet. Frøene ble lagt i sine respektive glass, før prosessen med deling av frøene startet. Frøene ble lagt på høykant og snittet i lengderetningen med en skalpell, plassert i skåler og behandlet med en iodine/potassium iodide løsning (Sigma Logul 62650-100ml). Denne prosessen ble gjort tre uker på rad. Løsningen fra Sigma Logul er et desinfeksjonsmiddel som skal fremheve fargenyanser i megagametophyten og embryoet (Figur 2). Etter 5 minutter ble frøene på nytt vasket i rent vann og tørket. Frøene ble fotografert gjennom et Zeiss Discovery V. 20 stereomikroskop ved hjelp av dataprogrammet Axio Vision Documentation (Zeiss). Lengden på embryoet ble bestemt fra bildene ved å bruke funksjonen «Length». Embryolengde ble målt 1, 2 og 3 uker etter at frøene hadde blitt behandlet med MJ/Tween for å sammenligne utviklingen av embryoet over tid.

Tabell 1. Frø av vanlig gran ble behandlet med plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) ved å legge frø i en løsning bestående av vann, MJ og Tween. Tween ble tilsatt for å øke kontakten mellom MJ og frøene.

Behandling	MJ konsentrasjon (mM)	Vann	Antall frø - Frøanatomi	Antall frø - Kjemiske analyser
1. Kontroll	0	100 ml	100	190
2. MJ - lav	0,1	100 ml	100	190
3. MJ - høy	0,5	100 ml	100	190

2.3 Såing og spiring

For å undersøke hvilken effekt MJ hadde på plantene som spirte fra frøene brukte vi de tre samme behandlingene som for de anatomiske frøanalysene (Tabell 1). Behandlede frø ble sådd i brett med 95 mini-potter med to frø per potte, totalt 190 frø per brett (Figur 1, Tabell 1). På samme måte som for de anatomiske frøanalysene ble frøene liggende 24 timer i primingløsningene. Frøene ble så vasket i vann og plantet i blomsterjord fra Hageland, sammensatt av sphagnum-torv H3-H6, barkkompost, kalkdolomitt og NPK-gjødsel med mikronæring. De to frøene i hver mini-potte ble plassert med 3-5 mm mellomrom og dyttet forsiktig ned i plantejorden med én finger. Deretter ble brettene plassert 1 uke på kjølerom ved 4 °C for kaldstratifisering, før de ble flyttet over til tre separate vekstkamre. Kaldstratifisering er ment å simulere en vinterperiode og skal stimulere frøene til spiring (Bratberg, 2015). For å enkelt kunne vanne plantene ble brettene plassert i plastkasser (Figur 1). Vekstkamrene ble programmert så daglengden var 20 timer og natlengden 4 timer. Kassene ble fylt opp med 2-3 cm vann, og både vannmengde og planter ble regelmessig kontrollert 1-2 ganger i uken. Plantebrettene ble stående i vekstkamrene i nøyaktig syv uker, fra 23.januar - 13. mars 2019. Jeg hadde planlagt å starte testingen av frøplantene etter fem uker, men grunnet dårlig spiring, spesielt i plantebrettet behandlet med 0,1 mM MJ (Tabell 1), ventet jeg ytterligere to uker for å se om flere av frøene ville spire.



Figur 1. Plantebrett (1. kontroll), med 95 mini-potter etter fem uker i vekstkammer.

2.4 Klargjøring av planter til kjemiske analyser

Etter syv uker ble plantene tatt ut fra vekstkamrene og klargjort til kjemiske analyser. På grunn av svært dårlig spiring var det så få planter behandlet med 0,1 mM MJ (fire planter, Tabell 1) at de ikke ble analysert, men det var nok planter til å gjennomføre analyser av kontrollplanter og planter behandlet med 0,5 mM MJ (Tabell 1). Til sammen ble 16 planter, åtte fra hver behandling analysert med GC-MS. Analysene skulle avdekke sammensetningen og konsentrasjonen av organiske forbindelser i planten. Fire av kontrollplantene og fire av plantene behandlet med MJ ble fysisk skadet ved å knipe stammen og nålene med pinsett for å se om priming og såring påvirket terpeninnholdet. Alle plantene ble ekstrahert i en løsning bestående av 50 mL heksan og 4 mg pentadekan som intern standard (nødvendig for å beregne terpenkonsentrasjonene i prøvene). Først ble fire kontrollplanter og fire planter behandlet med MJ tatt opp fra pottene, røttene ble fjernet, og resten av plantene ble plassert individuelt i hydrolytiske glass (HPLC & GC – 1,5 ml) med 1 ml ekstraksjonsløsning. Deretter ble fire andre planter fra hver behandling fysisk skadet og satt i vekstkamrene igjen over natten. Neste dag gjennomgikk plantene samme prosess som de usårete plantene, med fjerning av røtter og plassering i glass med ekstraksjonsløsning. Ett døgn etter plantene ble lagt i glass ble ekstraksjonsløsningen overført til nye glass og glassene ble plassert i fryseskap (-20 °C) fram til GC-MS analyse. For å bestemme tørrvekten av plantevevet ble de tomme glassene med planter plassert i avtrekksrom til tørking i én uke. Deretter ble plantene veid på en analysevekt,

med presisjon ned til 0,001 mg (Mettler Toledo Excellence Balances). Tørrvekten av plantene var nødvendig for å beregne semikvantitative data av terpenkonsentrasjoner.

2.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC – MS)

Glassene med ekstraksjonsløsning ble tatt med til NIBIO for GC-MS analyser. Gasskromatografi er en kjemisk analysemetode med det mål å separere ut, i dette tilfellet, organiske forbindelser ut i fra deres masser (Egeland, 2018). Massespektrometeret er detektororen som bestemmer identiteten til stoffer ut fra deres molekylmasser (Husby, 2018). Mer detaljert beskrivelse kommer nedenfor. Analysene ble utført av personell ved NIBIO sitt kjemiske analyselaboratorium.

Betingelser for GC-MS analysene

Kromatografen ble kjørt i «splitless mode» på 250 °C med en injeksjon av 1 µl per prøve. En 30 meter kondensert silisiumdioksyd separasjons kolonne (Agilent J & W Scientific DB – Wax, Agilent Technologies) med en indre diameter på 0,25 mm og en filmtykkelse på 0,25 µm ble benyttet. En 2,5 meter metyl deaktivert pre-kolonne (Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) med de samme indre diameterne ble koblet til den analytiske kolonnen via en trykkpresset kontakt (BGB Analytic AG, Boeckten, Switzerland). Etter at en prøve var injisert ble temperaturen holdt på 40 °C i 2 minutter og deretter økt til 6,9 °C/min til 160 °C og så økt med 21.5 °C/min til 250 °C. Deretter ble temperaturen holdt konstant på 250 °C i 3,6 min. Den totale tiden ble 27,18 min. Massespektrometeret ble kjørt i scan-modus fra 40 MHz til 550 MHz med en terskel på 50 og 2,86 scans/s. Temperaturen på overkjøringslinjen ble satt til 280 °C, ionkildetemperaturen var 230 °C og kvadrupoltemperaturen var 150 °C.

De organiske forbindelsene ble identifisert ved å bruke Reporting Software (DRS, ver. A.02.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), som kombinerer automatisk MS dekonvolusjon og identifikasjons programvare (AMDIS version 2.62, National Institute of Standards and Technology-NIST), et MS bibliotek (NIST08 database) og GC–MS programvare (ChemStation ver. D.03.00) (Agilent Technologies). AMDIS- databasen inneholder 1187 flyktige forbindelser. For å oppnå sammenlignbare retensjonstider for alle prøvene ble retensjonen låst og referert til den interne standarden, pentadecane, til 10,75 min ved å bruke programvarens retensjonstidslås-program. Topper som var til stede i kromatogrammene, men som ikke ble identifisert av DRS ble manuelt tolket ved hjelp av NIST08 databasen. For å sikre pålitelig identifikasjon benyttet vi en matchfaktor på >70 (Stein, 1999). Forbindelsene ble identifisert ved å sammenligne massespektrum og Kováts-indeks med verdiene for syntetiske standarder

av ulike referansestoffer for samme kolonne. Referansestandardene var levert fra Sigma-Aldrich eller Chiron AS og hadde en renhet på 95–99 %. I første omgang ble «area ratio» regnet ut, som er arealet av topper i kromatogrammet for hvert enkelt terpen delt på arealet for internstandard i prøven. For å få såkalt semikvantitative verdier for terpenkonsentrasjonene ble «area ratio» multiplisert med 80 µg internstandard. Det gir konsentrasjonsmengder i µg/prøve pentadekan-ekvivalenter (absolutte mengder). For å uttrykke konsentrasjonene per vektenhet granplante dividerte vi absolutte mengder med vekten for hver granplante (Vedlegg 1). Det ga terpenkonsentrasjoner i plantene oppgitt som terpenkonsentrasjon per mg plantevev. Disse tallene ble benyttet i de fleste statistiske analyser og figurer. I noen figurer blir også absolutte mengder benyttet.

Terpener kan deles inn i tre hovedgrupper ut fra hvor mange karbonatomer de inneholder. Monoterpener har 10 karbonatom, sesquiterpener har 15 karbonatom og diterpener har 20 karbonatom (Keeling & Bohlmann, 2006). På nettsidene til U.S. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information ligger strukturformler av alle de aktuelle terpeneene, og disse ble brukt til å avgjøre hvilken terpentype som ble detektert (Pubchem, u.å.).

2.6 Statistiske analyser

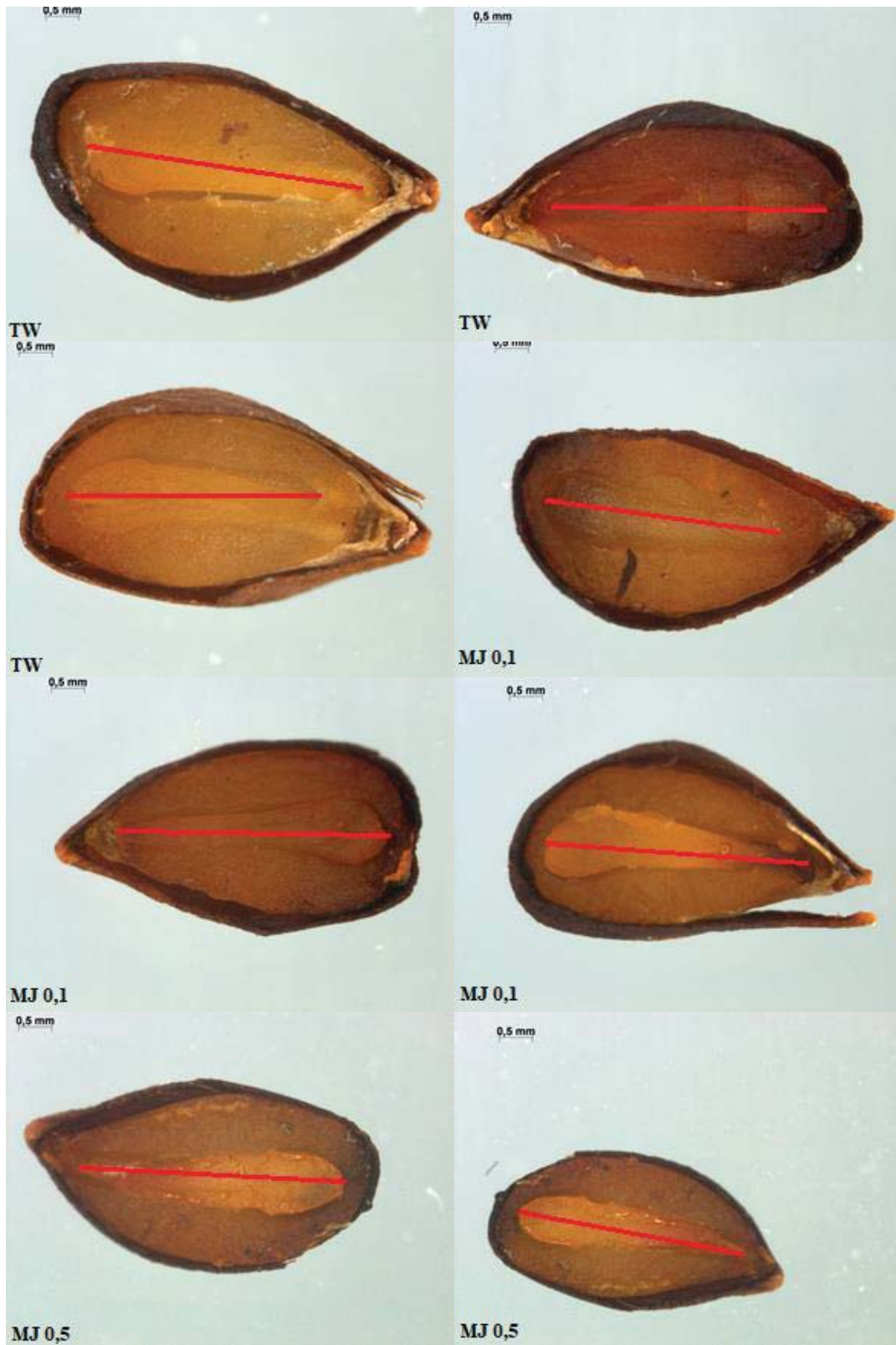
De statistiske analysene ble gjennomført i R-Studio 3.5.3 og Microsoft Excel 2016. For å analysere forskjeller i terpenkonsentrasjoner mellom behandlinger og mellom individuelle terpener ble det kjørt variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukey's HSD test. Sistnevnte ble brukt til å se om det var statistiske forskjeller mellom de ulike behandlingene. I tillegg ble det kjørt t-test i Excel for to utvalg med antatt ulik varians, for å sammenligne to og to behandlinger. En kji-kvadrat test ble kjørt i Excel for å se på statistiske forskjeller i spiring mellom behandlingene. ANOVA og Tukey's HSD ble også brukt til å analysere data fra de anatomiske frøanalysene. P-verdien ble regnet for å være signifikant ved $< 0,05$. Verdier mellom 0,05-0,10 ble vurdert til å vise en tendens. Microsoft Excel ble i tillegg brukt til å lage stolpediagram og tabeller.

3 Resultater

3.1 Frøanalyser

Embryoer i frøene viste store forskjeller hva gjelder utseende og struktur. Til sammen ble 181 frø dissekert, hvorav 139 hadde tydelig nok avgrenset embryo til at jeg kunne måle embryolengde nøyaktig. De 139 frøene fordelte seg med 60 kontrollfrø, 60 0,1 mM MJ frø og 61 0,5 mM MJ frø. 12 frø fra kontroll og 12 frø fra 0,1 mM MJ-behandling var ikke med, mens de resterende 18 frøene som ikke kunne måles embryolengde på stammet fra 0,5 mM MJ-behandling.

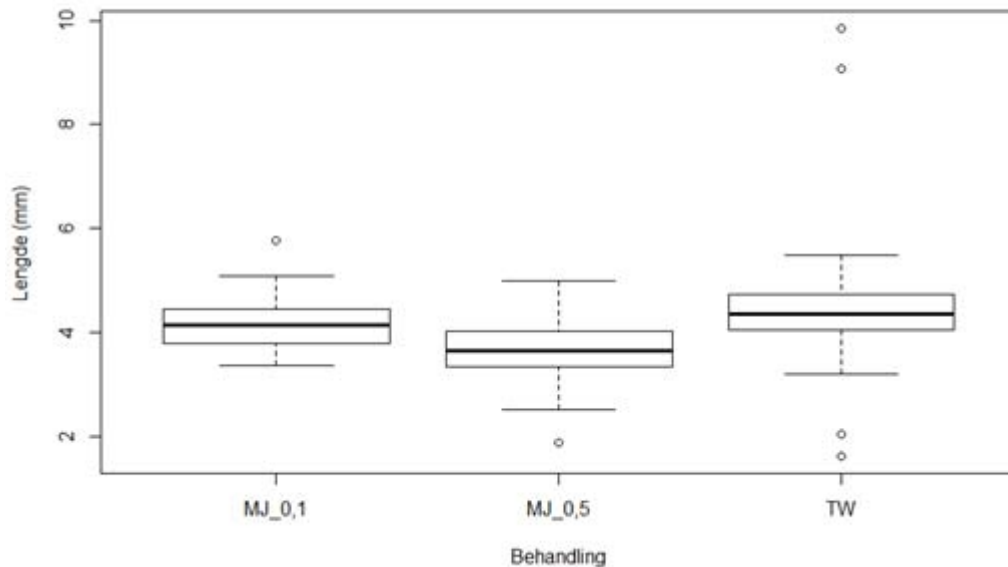
Et frø kan deles inn i tre hovedkomponenter: frøskallet, embryoet og megagametofytten. Frøskallet har som funksjon å beskytte de indre strukturene og hindre oksygen- og vannopptak. De indre strukturene er blant annet embryoet som har oppstått som følge av befruktning. Embryoet er avlangt og kan ses i midten av frøet, omsluttet av megagametofytten. Megagametofytten fungerer som næringsreserve for embryoet inntil det har spirt til en frøplante som er stor nok til å starte med fotosyntese (Kolotelo, 1997) (Figur 2).



Figur 2. For å måle embryolengde måtte frø fra de tre respektive behandlingene kontroll (TW), 0,1 mM MJ og 0,5 mM MJ dissekteres. Bildene viser noen av de dissekerte granfrøene som inngikk i de statistiske testene. Rød strek representerer lengden på embryoet (fremhevet i etterkant for tydeligere bilde). Øverst i venstre hjørne er målestokk på 0,5 mm.

Uke 1

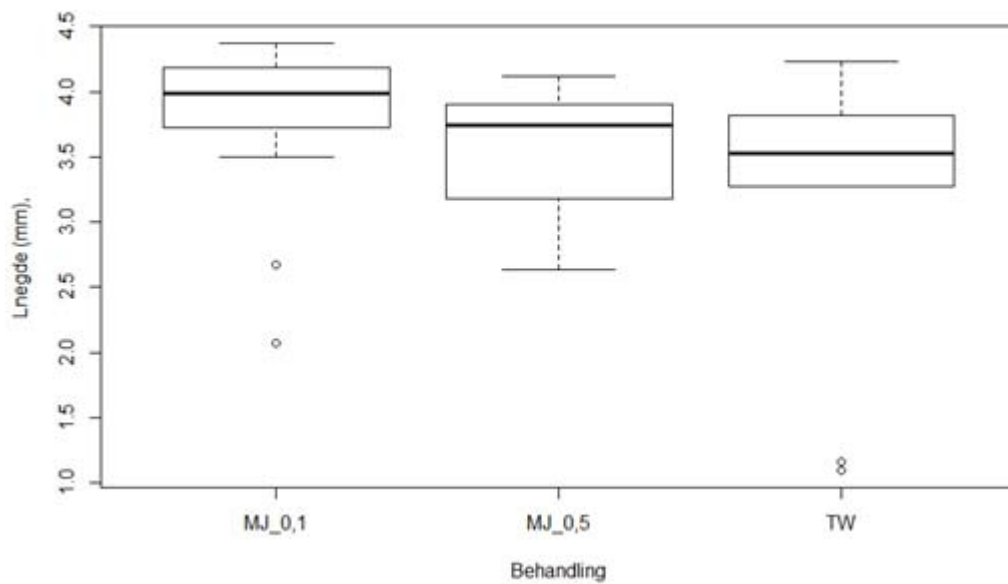
Det var en signifikant forskjell i lengden på embryoet mellom behandlinger én uke etter behandling ($p = 0.045$) ($n=19$). Embryoer i kontrollfrø (TW) var signifikant lengre enn i frø behandlet med 0,5 mM MJ ($p = 0.035$). Det var ingen signifikante forskjeller mellom andre behandlinger (Tabell 2).



Figur 3. Embryolengde én uke etter behandling i granfrø behandlet med to ulike konsentrasjoner av plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) samt ubehandlede kontrollfrø (TW). Den svarte horisontal linje representerer medianverdien i embryolengde for hver behandling. Standardavvik (mål på spredning i datasettet) i hver behandling og enkelt observasjoner (runde prikker) for hver behandling kan også ses i boxplottet.

Uke 2

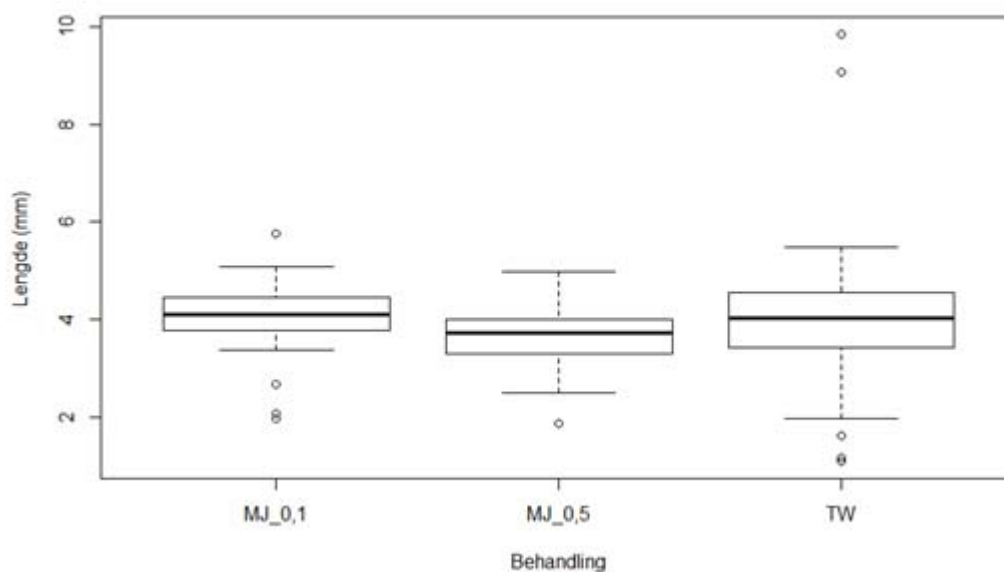
To uker etter behandling var det ingen signifikante forskjeller i embryolengder mellom behandlinger ($p = 0.231$) ($n=13$) (Tabell 2). Kontrollfrø (TW) hadde en lavere medianverdi enn frø behandlet med 0,1 og 0,5 mM MJ.



Figur 4. Embryolengde to uker etter behandling i granfrø behandlet med to ulike konsentrasjoner av plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) samt ubehandlede kontrollfrø (TW). Den svarte linjen representerer medianverdien i embryolengde, for hver behandling. Standardavvik (mål på spredning i datasettet) i hver behandling og enkelt observasjoner (runde prikker) for hver behandling kan også ses i boxplottet.

Samlet

Det kunne ikke påvises en signifikant forskjell i embryolengde samlet sett for alle frøene i uke 1, 2 og 3 ($n=41$), men det var en tendens til forskjell ($p = 0.085$). Gjennomsnittslengden på embryoet for kontrollfrøene var høyest med 4,03 mm, frø behandlet med 0,1 mM MJ hadde en gjennomsnittlig embryolengde på 4,02 mm, og frø behandlet med 0,5 mM MJ hadde en gjennomsnittlig embryolengde på 3,62 mm.



Figur 5. Embryolengde samlet for uke 1, 2 og 3 etter behandling av granfrø med to ulike konsentrasjoner av plantehormonet metyl-jasmonat (MJ) samt ubehandlede kontrollfrø (TW). Den svarte linjen representerer medianverdien i embryolengde, for hver behandling. Standardavvik (mål på spredning i datasettet) i hver behandling og enkelt observasjoner (runde prikker) for hver behandling kan også ses i boxplottet.

Tabell 2. En-veis ANOVA ble brukt for å teste signifikante forskjeller i embryolengde mellom to ulike MJ-behandlinger av granfrø og kontrollfrø. Frøene ble behandlet på samme tidspunkt, men dissekering og måling av embryo ble gjort henholdsvis én uke, to uker og tre uker etter behandling for å se på forskjeller i embryoutvikling. Frø dissekert og målt tre uker etter behandling er inkludert i den samlede testen.

Uke	Frihetsgrader	Kvadratsum	Std.Avvik	P-verdi
1				
Behandling	2	9.770	2538528	0.046*
Residuals	57	85.493	1131889	
2				
Behandling	2	1383907	0.784	0.232
Residuals	39	20.157	0.517	
Samlet				
Behandling	2	5.191	1481456	0.085
Residuals	134	138.671	1.035	

Tabell 3. For å se hvilke av behandlingene som er signifikant forskjellig fra hverandre ble det kjørt en Tukey's HSD test. For hver uke og samlet sett ble embryolengde sammenlignet for å se forskjeller i frø behandlet med 0,1 mM MJ, 0,5 mM MJ og TW (kontroll).

Uke	Behandling	Estimat	Std.Feil	P-verdi
1	MJ 0,5 – MJ 0,1	-0.528	0.397	0.38
	TW – MJ 0,1	0.450	0.383	0.47
	TW – MJ 0,5	0.978	0.383	0.035*
2	MJ 0,5 – MJ 0,1	-0.175	0.271	0.78
	TW – MJ 0,1	-0.468	0.271	0.21
	TW - MJ_0,5	-0.292	0.271	0.53
Samlet	MJ 0,5 - MJ_0,1	-0.424	0.213	0.12
	TW - MJ_0,1	-0.011	0.209	1.00
	TW - MJ_0,5	0.413	0.215	0.14

3.2 Spireprosent

Det var generelt sett en lav spireprosent for alle tre behandlingene, men spireprosenten var høyere for kontrollfrø (TW) enn for frø behandlet med MJ (Tabell 4). Noe overraskende ga 0,1 mM MJ lavere spireprosent enn 0,5 mM MJ. Kji-kvadrat testen avslørte en signifikant forskjell i spiring mellom behandlingene ($p = <0.0001$).

Tabell 4. Granfrø ble behandlet med to ulike konsentrasjoner av plantehormonet metyl-jasmonat og sådd i hver sine plantebrett, før de ble plassert i vekstkamre til spiring. I tillegg ble ett plantebrett sådd med frø uten behandling.

Behandling	Frø	Planter	Spiring (%)
1. Kontroll (TW)	190	52	27,1
2. 0,1 mM MJ	190	4	2,1
3. 0,5 mM MJ	190	23	12

3.3 Prosentvis andel av terpener

Totalt 38 ulike organiske forbindelser ble påvist i de 16 plantene som ble analysert med GC-MS. Fire av disse forbindelsene var ikke terpener, mens 34 var ulike former for terpener (Tabell 5). Av disse var 26 monoterpener, seks sesquiterpener og to diterpener. Flere av terpenene var til stede i svært små prosentandeler av den totale konsentrasjonen. Monoterpenene dominerte både i antall og i prosentandeler, mens det var mye mindre sesqui- og diterpener (Tabell 5).

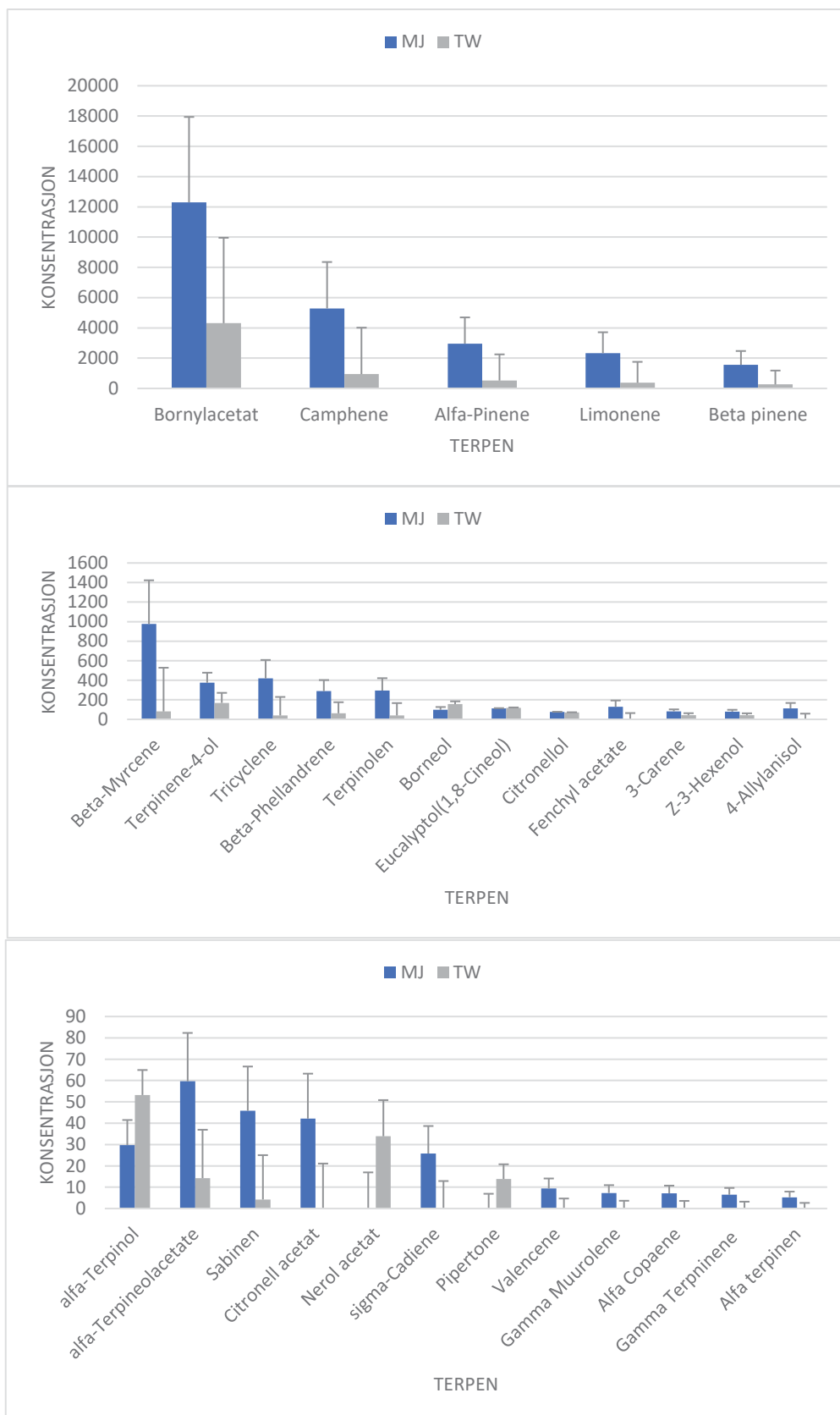
Tabell 5. Totalt 34 terpener ble detektert i små granplanter. Terpenkonsentrasjon angir prosentandelen av hvert terpen og summerer til 100 %. Verdiene er regnet ut på tvers av 16 planter som var gitt ulike behandlinger: fire intakte planter fra kontrollfrø, fire skadete planter fra kontrollfrø, fire intakte planter fra frø behandlet med 0,5 mM metyl-jasmonat (MJ), og fire skadete planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ.

Terpener	Terpentype	Terpen-konsentrasjon (%)
3-Carene	Monoterpen	0,55
4-Allylanisol	Monoterpen	0,16
α -Copaene	Monoterpen	0,02
α fa-Pinene	Monoterpen	7,69
α fa-Terpinen	Monoterpen	0,01
α fa-Terpinol	Monoterpen	0,25
β pinene	Monoterpen	3,49
β eta-Myrcene	Monoterpen	2,06
β eta-Phellandrene	Monoterpen	0,70
Camphene	Monoterpen	13,99
Citronellol	Monoterpen	0,41
Citronell acetat	Monoterpen	0,12
Eucalyptol (1,8-Cineol)	Monoterpen	0,48
Fenchyl acetate	Monoterpen	0,24
Gamma-Terpinene	Monoterpen	0,01
Borneol	Monoterpen	1,79
Bornyl acetat	Monoterpen	41,15
Metyl-jasmonat	Monoterpen	14,44
Nerol acetat	Monoterpen	0,32
Piperitone	Monoterpen	0,03
Sabinen	Monoterpen	0,13

Terpinolen	Monoterpen	0,86
Terpinene-4-ol	Monoterpen	0,87
Limonene	Monoterpen	6,06
Tricyclene	Monoterpen	0,99
Z-3-Hexenol	Monoterpen	0,30
alfa-Terpineolacetate	Sesquiterpen	0,19
α-Cadinol	Sesquiterpen	0,11
Tetradecane	Sesquiterpen	0,06
Valencene	Sesquiterpen	0,02
Gamma-Murolene	Sesquiterpen	0,02
Sigma-Cadiene	Sesquiterpen	0,25
Epimanool	Diterpen	0,31
2,4-Ditert-butylphenyl 5-hydroxypentanoate	Diterpen	1,92
Totalt		100,00

3.4 Terpenkonsentrasjoner i intakte planter fra kontrollfrø (TW) og frø behandlet med 0,5 mM MJ

Det var ingen signifikante forskjeller i terpenkonsentrasjoner mellom planter fra kontrollfrø og planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ, men det var en tendens til at planter behandlet med MJ hadde høyere konsentrasjoner ($p = 0.078$). For 29 av de 34 påviste terpenene var konsentrasjonen høyest i planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ. Det er store kvantitative forskjeller mellom terpenene. Bornyl acetat hadde de høyeste konsentrasjonene, sammen med blant andre camphen, α -pinen, limonen og β -pinen. Flere av terpenene ble detektert i kun én av behandlingene.

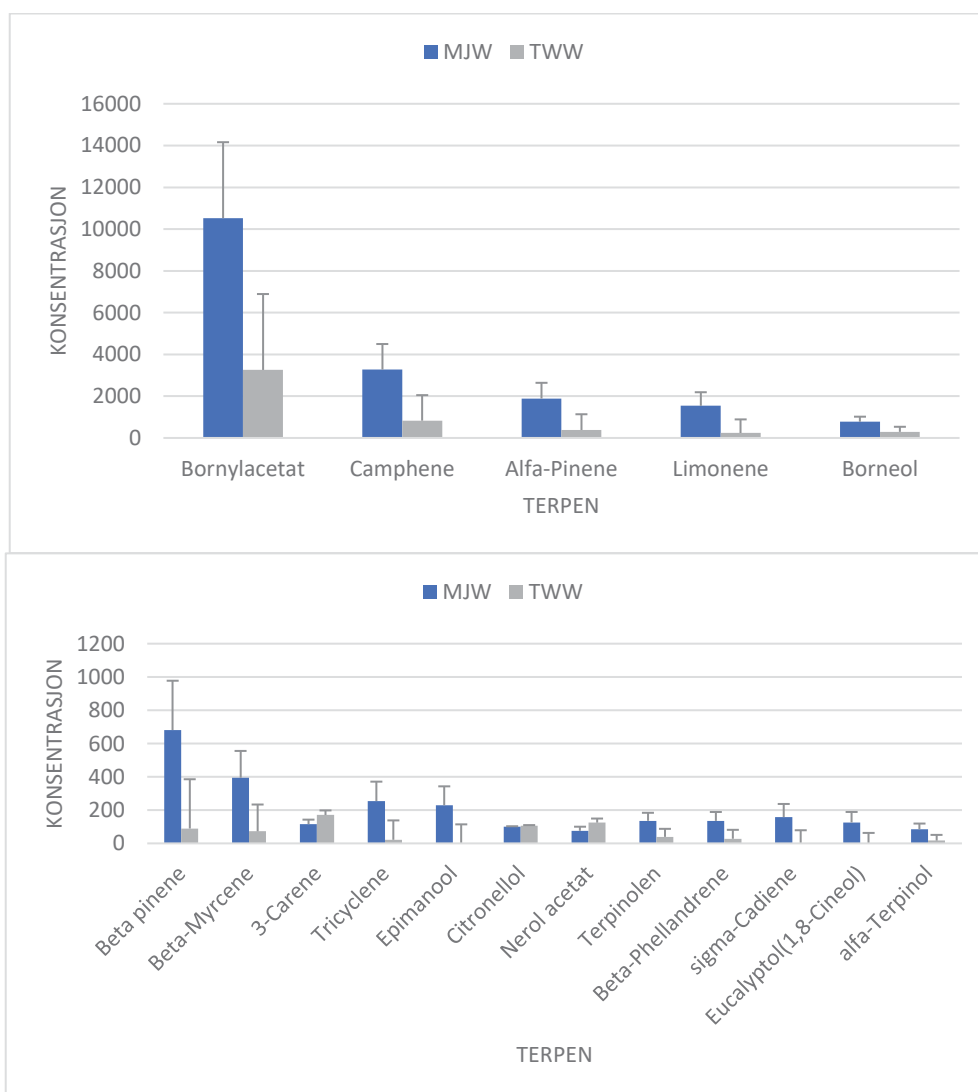


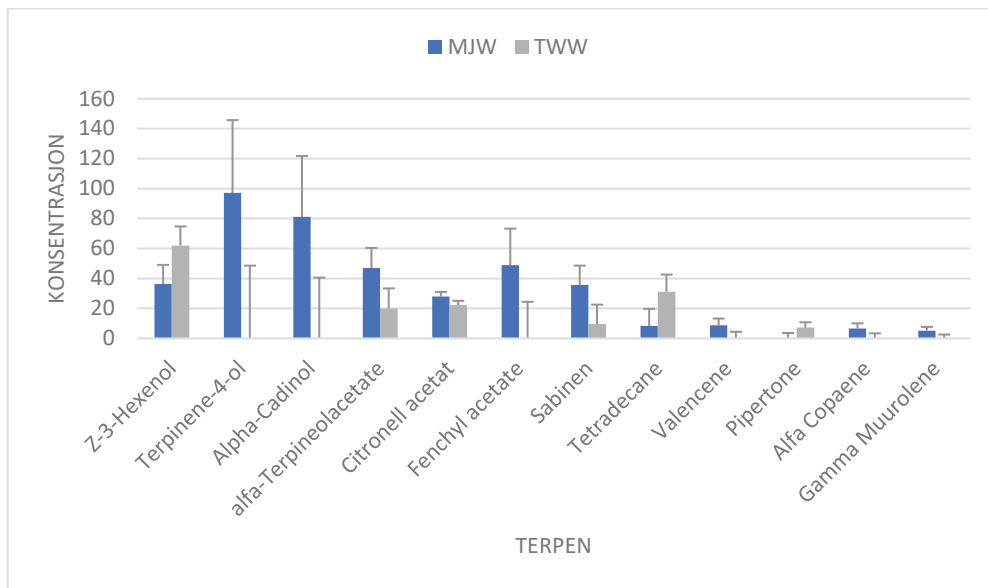
Figur 6. Fire intakte planter spiret fra kontrollfrø og fire intakte planter spiret fra 0,5 mM MJ ble GC-MS analysert for å se på konsentrasjonen av terpenier. En t-test i Excel for to utvalg med antatt ulik

varians ble kjørt for å se på signifikante forskjeller mellom behandlingene. Søylene representerer standardfeil for hvert terpen.

3.5 Terpenkonsentrasjoner i skadete planter fra kontrollfrø (TWW) og frø behandlet med 0,5 mM (MJW)

Skadete planter fra kontrollfrø hadde ikke signifikant forskjellige terpennivåer enn tilsvarende planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ, men det var en tendens til at MJ-planter hadde høyere nivåer ($p = 0,096$). For alle terpener, med unntak av fem, var konsentrasjonen høyest i planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ, men det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene. Som for intakte planter var det store kvantitative forskjeller imellom terpenene. Igjen hadde bornyl acetat de høyeste konsentrasjonene. Tre av terpenene ble kun påvist planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ.

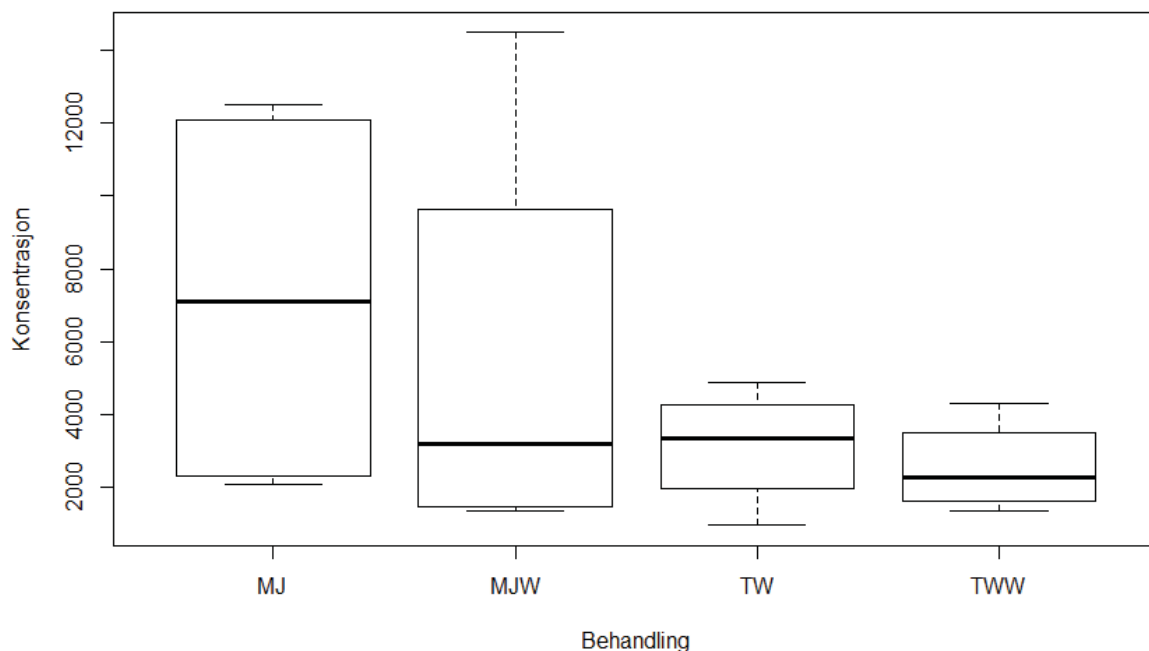




Figur 7. Fire skadede planter spiret fra kontrollfrø og fire skadede planter spiret fra 0,5 mM MJ ble GC-MS analysert for å se på konsentrasjonen av terpenener. En t-test i Excel for to utvalg med antatt ulik varians ble kjørt for å se på signifikante forskjeller mellom behandlingene. Søylenes representerer standardfeil for hvert terpene.

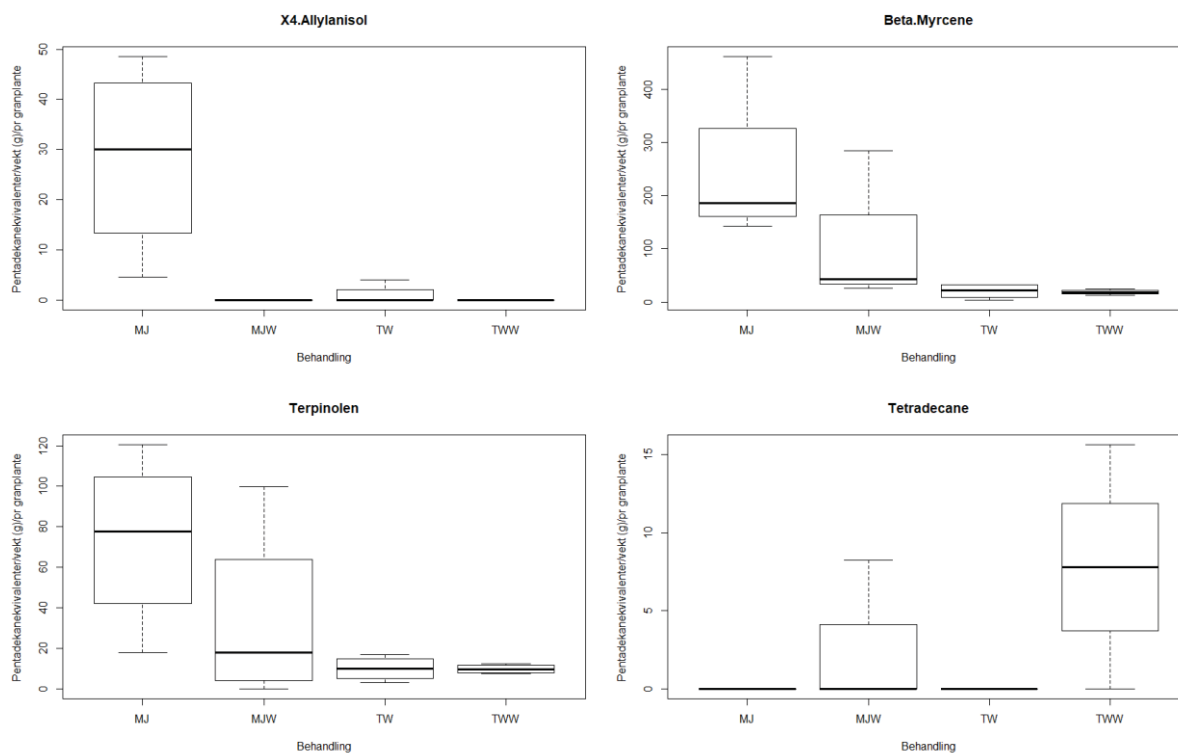
3.6 Total terpenkonsentrasjon mellom behandlinger

Totalt sett for alle terpenener kombinert var det ingen signifikant forskjell i konsentrasjon mellom behandlingene ($p = 0.425$). Av medianverdien ser vi at konsentrasjonen av terpenener i planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ var høyere enn plantene spiret fra kontrollfrøene. Konsentrasjonen av terpenener i planter fra frø behandlet med 0,5 mM MJ og skadet var lavere enn planter som spiret fra frø med 0,5 mM MJ, uten skading. Konsentrasjonen av terpenener lå på nivå med planter spiret fra frø uten behandling.



Figur 8. 34 terpenier utgjorde konsentrasjonen av terpenier i fire granplanter som spirte fra kontrollfrø, fire planter fra 0,5 mM MJ frø, fire planter spiret fra kontrollfrø og skadet, samt fire planter spiret fra 0,5 mM MJ-behandlede frø og skadet. Svart linje representerer medianverdien i konsentrasjon for hver av de fire behandlingene. Verdiene er oppgitt som konsentrasjon per tørrvekt granplante.

Som følge av svært små konsentrasjoner, og tilstedeværelse i bare én av behandlingene ble seks terpenier ikke inkludert da vi testet for behandlingsforskjeller for enkeltterpenier. 28 terpenier ble testet med ANOVA og Tukey's HSD test for å se på forskjell i terpenkonsentrasjon mellom de fire behandlingene. Fire terpenier hadde signifikant forskjellig konsentrasjon mellom behandlingene (Figur 9). Terpenene 4-allylanisol ($p = 0.002$), β -myrcene ($p = 0.019$), terpinolen ($p = 0.044$) og tetradecane ($p = 0.041$) utgjorde bare 3,1 % av den totale prosentandelen terpenier funnet for alle behandlinger (Tabell 2). Alfa-pinene ($p = 0.088$) og beta-pinene ($p = 0.093$) viste en tendens til forskjell, og utgjorde totalt 11,18 % av den totale prosentandelen terpenier.



Figur 9. Terpenkonsentrasjoner ble sammenlignet for fire intakte planter spiret fra kontrollfrø (TW), fire intakte planter spiret fra 0,5 mM MJ, fire skadede planter spiret fra kontrollfrø (TWW), og fire skadede planter spiret fra 0,5 mM MJ (MJW). Tukey's HSD test ble kjørt for å se på forskjeller av enkelt terpen mellom behandlingene. Den svarte linjen representerer medianverdien i terpenkonsentrasjon for hver behandling.

Tabell 6. Fire intakte planter spiret fra kontrollfrø (TW), fire intakte planter spiret fra 0,5 mM MJ, fire skadede planter spiret fra kontrollfrø (TWW) og fire skadede planter spiret fra 0,5 mM MJ (MJW) ble testet for signifikante forskjeller med variansanalyse (ANOVA).

Terpen	Frihetsgrader	Kvadratsum	Std.Avvik	P-verdi
4-Allylanisol		2349.7	783.22	0.002**
Sample	3	1119.2	93.27	
Residuals	12			
βeta myrcene				
Sample	3	134680	44893	0.019**
Residuals	12	110766	9320	
Terpinolen				
Sample	3	10836	3611,9	0.044*
Residuals	12	11929	994,1	

Tetradecane

Sample	3	162,8	54,268	0.041*
Residuals	12	173,17	14,431	

For tre av terpenene var det planter som spiret fra 0,5 mM MJ-behandlede frø som hadde de høyeste konsentrasjonene, og var signifikant forskjellig fra de andre behandlingene (Tabell 7). Imidlertid var det en signifikant høyere konsentrasjon av tetradecane i planter som spiret fra kontrollfrø og som deretter ble skadet. Det skiller seg fra de andre terpenene (Figur 9).

Tabell 7. Fire intakte planter spiret fra kontrollfrø (TW), fire intakte planter spiret fra 0,5 mM MJ, fire skadede planter spiret fra kontrollfrø (TWW) og fire skadede planter spiret fra 0,5 mM MJ (MJW) ble testet for signifikante forskjeller. Terpenene som viste signifikante forskjeller ble kjørt i en Tukey's HSD test for å se på hvilke behandlinger som var signifikant forskjellig fra hverandre.

Terpen	Behandling	Estimat	Std.Feil	P-verdi
4-Allylanisol	MJW-MJ	-2.83x10 ⁵	6.829e+00	0.006**
	TW-MJ	-2.73x10 ⁵	6.829e+00	0.008**
	TWW-MJ	-2.83x10 ⁵	6.829e+00	0.006**
	TW-MJW	1.00x10 ⁵	6.829e+00	0.998
	TWW-MJW	-1.06x10 ⁵	6.829e-00	1.000
	TWW-TW	-1.00x10 ⁵	6.829e+00	0.998
βeta Myrcene	MJW-MJ	-145.22	67.93	0.196
	TW-MJ	-223.64	67.93	0.028*
	TWW-MJ	-225.70	67.93	0.026*
	TW-MJW	-78.41	67.93	0.665
	TWW-MJW	-80.48	67.93	0.647
	TWW-TW	-2.06	67.93	1.000
Terpinolen	MJW-MJ	-39.59	22.29	0.330
	TW-MJ	-63.66	22.29	0.060.
	TWW-MJ	-63.68	22.29	0.060.
	TW-MJW	-24.07	22.29	0.707
	TWW-MJW	-24.09	22.29	0.707
	TWW-TW	-0.02	22.29	1.000
Tetradecane	MJW-MJ	2.05	2.68	0.868
	TW-MJ	0.00	2.68	1.000
	TWW-MJ	7.79	2.68	0.056.
	TW-MJW	-2.05	2.68	0.868
	TWW-MJW	5.73	2.68	0.196
	TWW-TW	7.79	2.68	0.056.

4 Diskusjon

Resultatene mine kan indikere at embryoene i granfrø behandlet med MJ blir påvirket i form av underutviklede embryo. Imidlertid viser resultatene bare forskjeller i embryolengde én uke etter behandling med MJ, og en tendens til forskjell i embryolengde samlet sett for alle frø (Tabell 2). Grunnet tvetydige resultater mellom ukene og samlet sett kan hypotesen om at frøene blir negativt påvirket av MJ-behandling gjennom kortere embryoer forkastes. Spireprosenten for granfrøene var lav, uavhengig av om granfrøene var behandlet med 0,1 mM MJ, 0,5 mM MJ, eller kontrollfrø uten behandling (Tabell 4). Det var en signifikant forskjell i spiring mellom behandlingene. Frøene som var behandlet med 0,1 mM MJ hadde noe overraskende den lavest spireprosenten, da de ble utsatt for den svakeste blandingen med MJ. Resultatene fra spireprosenten kan imidlertid ikke påvise at MJ påvirker granfrøene negativt, da jeg ville forventet den laveste spireprosenten fra frø behandlet med 0,5 mM MJ. Det var ikke en signifikant forskjell i den totale terpenkonsentrasjon mellom behandlingene (Figur 8). Derimot var det signifikante forskjeller i terpenkonsentrasjon mellom behandlingene i enkelte av terpenene (Figur 9). At noen terpenier skiller seg ut med høyere terpenkonsentrasjoner er ikke nok til å beholde hypotesen om at MJ-behandling gir høyere terpenkonsentrasjoner, og hypotesen kan dermed forkastes. Skading av planter ga heller ingen forhøyede terpenkonsentrasjoner i planter spiret fra MJ-behandlede frø, som jeg predikerte. I den videre diskusjonen vil jeg gå nærmere inn på betydningen av hvert enkelt funn.

4.1 Embryoutvikling og spireprosent

Det er meg bekjent, ikke tidligere studert hvilke konsekvenser et underutviklet embryo i granfrø som følge av MJ-behandling har på den videre utviklingen og overlevelsen av planten. Imidlertid er det gjort forsøk med MJ på frø fra solsikke (*Helianthus annuus*). Solsikkefrøene opplevde at MJ hemmet spiringen, samt at MJ hadde en sterkt reduserende effekt på oksygenopptak under spiring og hemmet klorofyll biosyntesen i isolerte frøblad (Corbineau, Rudnicki, Come, 1988). Den samme negative effekten ble observert i MJ-behandling av krokfrø (*Xanthium pennsylvanicum*) der konsentrasjoner av MJ over 1 mM/liter hemmet spiring av frø og samtidig hindret etylenproduksjon før spiring. En annen side ved forsøket avslørte imidlertid at påføring av etylen eksogent reverserte den negative effekten av MJ, helt opp til MJ konsentrasjoner på 300 mM/liter (Nojavan-Asghari & Ishizawa, 1998). Uten å trekke direkte paralleller til granfrø, kan det tenkes at noen av de samme effektene har oppstått i MJ-behandlingen av granfrø i denne studien. Etylen er et plantehormon som plantene skiller ut, og som generelt sett har en hemmende effekt på prosesser i planten (Berner, 2017). Sett at MJ har

hemmet spiring i granfrø, og i tillegg har hindret etylen produksjon som trengs for å reversere den negative effekten, kan det ha ført til den lave spireprosenten og at noen av embryoene med 0,5 mM MJ var underutviklet.

For å avdekke om det har oppstått negative konsekvenser på frøene i etterkant av MJ-behandling finnes det metoder som ser på spiredyktigheten til frøene. Skogfrøverket bruker i dag en metode utviklet av Milan Simik der kontrast røntgen blir brukt til å dele embryo- og endosperm utvikling inn i klasser, og ut i fra klassene kan en potensiell spireprosent beregnes etter en modell (Bye, Røsok & Edvardsen Meland, 2004). Studiet til Høst (2012, s.27) beskriver også hvordan en spiretest kan utføres for å finne ut om frøene er spiredyktige etter behandling. For å se om frøene er levende eller døde kan det tas en tetrazoliumtest. Frø som er levende vil ta opp løsningen med tetrazolium, mens døde frø vil forbli ufarget av løsningen de snittede frøene ligger i (Høst, 2012).

En god spireprosent er svært viktig for at MJ-behandling skal kunne implementeres som en regulert metode å behandle granfrø mot snutebiller. Frø som ikke spirer betyr tapte inntekter ved at planteskolene ikke klarer å møte etterspørselen som markedet krever og at det må suppleres med flere frø. Resultatet fra dette forsøket gir en spireprosent for MJ-behandlede frø på 12 % (0,5 mM MJ) og 2,1 % (0,1 mM MJ). Det er vanskelig å vite eksakt hvilke faktorer som har spilt inn på den lave spireprosenten, men med tanke på at 0,5 mM MJ-frøene hadde en høyere spireprosent enn 0,1 mM MJ-frøene, er det nærliggende å tenke seg at det er noen tilleggårsaker foruten om MJ som gir dårlig spiring. Spiring i vekstkamre krever at faktorer som lys, temperatur og vanntilgang er gunstige. Den første uken sto frøene til kaldstratifisering. I denne perioden blir hormonbalansen i frøet påvirket, noe som hjelper frøet til å spire når de først blir satt i veksthuset (Bratberg, 2015). Ifølge Høst (2012, s.19) trenger ikke norsk gran stratifisering for å oppheve hvilen, men de frøene som blir stratifisert kan være utsatt for sopppangrep grunnet fuktighet og kulde, og lav spireprosent. Andre årsaker som umodne og overmodne frø, samt eldre frø er også faktorer som kan gi lav spireprosent (Høst, 2012). Disse faktorene kan ha spilt inn på resultatene. De første to døgnene kan daglengden i to av veksthusene ha vært noe uregelmessig grunnet feilinnstillinger i automatiseringsskapet. Det ble oppdaget ved første kontroll av plantene at det var mørkt i plantehusene når det egentlig skulle være lyst. Jeg tror imidlertid ikke det har spilt en avgjørende rolle for spiresuksessen. Det kunne vært interessant å inkludere frø uten tilsatt tween i kontrollbehandling for å se effekten av ingen påvirkning sammenlignet med tween og MJ. Felles for alle behandlinger var tween, og med

tanke på at alle plantebrett hadde lav spireprosenten kan tveen ha vært en utløsende faktor for det.

Når det gjelder hvor høy konsentrasjon av MJ som trengs for å få effekt uten negative konsekvenser for vekst må det undersøkes nærmere. I frø fra planten reveamarant (*Amaranthus caudatus*) behandlet med MJ kunne ikke etylen reversere den negative effekten av høye konsentrasjoner MJ, noe som tyder på at MJ har en giftig effekt på frøene (Kępczyński & Bialecka, 1994). Grunnet dårlig spiring fikk jeg ikke testet effekten av den svakest MJ-behandlingen (0,1 mM MJ), men det anbefales å bruke så små mengder som mulig siden høye konsentrasjoner kan føre til fytotoksisitet og død (Moreira, Zas, Sampedro, 2012).

Det er nødvendig med flere forsøk med MJ behandling av frø for å luke ut noen av faktorene som kan ha påvirket den lave spiringsprosenten i forsøket mitt. Til senere studier burde MJ-behandlede frø undersøkes mer inngående for å se på effekten av MJ-behandling vs. ubehandlede frø.

4.2 Konsentrasjon av terpener

Konsentrasjonen av terpener kan ses på som et indirekte mål på motstandsevnen til granplanten. Jeg hadde forventet at konsentrasjoner av terpener i granplanter som spiret fra frø behandlet med MJ ville gi en direkte induksjon på terpenkonsentrasjonen i plantene. Terpenkonsentrasjonen var imidlertid ikke signifikant høyere enn terpenkonsentrasjonen i planter som spiret fra kontrollfrø. Det viste seg derimot at enkelte av terpenene skiller seg signifikant fra hverandre innad i behandlingene. Frøet er beskyttet av frøskallet som skal hindre blant annet vannopptak (Kolotelo, 1997). Det kan tenkes at denne forsvarsmekanismen har fungert som en beskyttelse imot behandlingen som frøene ble utsatt for, og at frøene ikke har blitt primet tilsvarende det de blir ved påføring ved spraying av voksne trær (Zeneli, Krokene, Christiansen, Krekling, Gershenzon, 2006). De naturlige forsvarsegenskapene til granfrø kan dermed ha bidratt til å beskytte granfrøene.

Hvilke terpener som synes å være de viktigste i forsvaret til plantene varierer noe imellom studier og hvilken alder det er på planter og trær i forsøket. Studier i Tyskland på to år gamle planter pekte på α - og β -pinene som de viktigste monoterpene (Schürmann, Ziegler, Kotzias, Schönwitz, Steinbrecher, 1993). I en studie fra Martin, Gershenzon og Bohlmann (2003) var bornyl acetate, α -pinene, camphene og limonene mest fremtredende. Dette stemmer relativt godt med funnene i denne studien hvor bornyl acetat, camphene og limonene, var de mest fremtredende (Tabell 2). α -pinene og β -pinene var riktignok fire og fem på

listen, men med betydelig mindre konsentrasjoner. Funnene samsvarer også med et annet forsøk på to år gamle granplanter hvor både α -pinene, β -pinene, camphene, myrcene, limonene og β -phellandrene viste høye konsentrasjoner (Martin et al., 2002). Vi kan merke oss at ingen av de signifikante terpenene som ble detektert i MJ-behandling av frø er blant de med høyest konsentrasjoner. Det betyr likevel ikke at de ikke er betydningsfulle for forsvaret av planten.

Den genetiske variasjonen mellom plantene er ikke undersøkt i dette studiet. Tidligere studier på furu har pekt at det er store genetiske variasjoner hva gjelder forsvarsegenskaper og deres evne til å bli induisert (Sampedro et al., 2011). Det er nærliggende å tenke seg at det er den samme genetiske variasjonen i gran, og at den genetiske variasjonen er et aspekt som kan ha påvirket forsvarsevnen til granplantene.

4.3 Konsentrasjon av terpenener i skadede planter

Ved å fysisk skade plantene ønsket jeg å simulere en reell situasjon hvor gnag fra snutebiller ville utløse forhøyede terpenkonsentrasjoner. Jeg forventet at terpenkonsentrasjonen i MJ-behandlede planter ville bli ytterligere forhøyet på grunn av behandlingen med MJ, som primet forsvaret til plantene, og at tilsvarende reaksjon i kontrollplantene ville være mye lavere fordi de ikke var blitt primet med MJ. Terpenkonsentrasjonen i skadede planter som spiret fra 0,5 mM MJ var omtrent på samme nivå som planter som spiret fra frø uten behandling (Figur 8). Store deler av plantene som ble analysert inneholdt mono- og sesquiterpener (Tabell 5). Disse er flyktige hydrokarboner og har utslipp fra bartre til atmosfæren (Schürmann et al., 1993). Det kan derfor tenkes at når skaden oppstår, i dette tilfellet ved såring, vil produksjonen av mono- og sesquiterpenene øke, før de fordamper fra planten og således ikke bli fanget opp under analysene. Diterpenene opptrer litt annerledes da de ikke har utslipp til atmosfæren, men blir i planten og vil herde til og beskytte såret (Keeling & Bohlmann, 2006). Det kan være en mulig forklaring på årsaken til at ikke terpenkonsentrasjonen økte. Resultatene sier dermed ikke noe videre om virkningen av MJ i forbindelse med skading, selv om en oppregulering av terpenkonsentrasjon ikke kunne påvises.

Behandling av unge granplanter med MJ har vist seg å gi flere traumatiske kvaekanaler (TD) som er viktige i plantenes forsvar ved at produksjonen av terpenener i kambiet og nålene øker (Heijari et al., 2005), og at fenolforbindelser i samarbeid med oleoresin vil hjelpe til med å forsvare plantene ved en skade (Martin et al., 2002). Med tanke på at plantene i forsøket kun var syv uker gamle kan det tenkes at produksjonen av TD ikke har blitt tilstrekkelig satt i gang,

og at det derfor skilles ut færre terpenener ved skading. Skading og andel terpenener kan derfor gi en høyere effekt om plantene er eldre enn i dette studiet.

4.4 Feilkilder

Det er alltid en utfordring å jobbe med datasett med liten utvalgsstørrelse. Uheldigvis var ikke spiringen i pluggbrettet med 0,1 mM MJ suksessfull, og de ble derfor utelatt fra GC-MS analysen. Vi valgte å begrense utvalget av planter som skulle kjøres i GC-MS analysene grunnet tidsaspektet. Ved en høyere utvalgsstørrelse kunne vi kanskje opplevd og fått tydeligere svar på hvordan MJ påvirker terpenkonsentrasjonen i planter som spirer fra MJ-behandlede frø. I fremtidige forsøk bør det derfor etterstrebes et større datagrunnlag som kan gi grundigere svar på hypotesene.

Når det gjelder frøanalysene opplevde vi en usikkerhet rundt den praktiske gjennomføringen. Snitting av frø krever høy presisjon, og selv om det ble gjennomført i tråd med anbefalt metode fra faglitteraturen var en del av embryoene i frøene vanskelig å tyde. Den første dagen av målingene valgte jeg ut 20 prøvefrø for å lære metoden, noe som kanskje ikke var nok. I etterkant ser jeg også at en spiretest av frøene kunne gitt bedre svar på virkningen av MJ på frø. I tillegg kunne plantebrettene blitt fulgt over tid så jeg kunne fått data på spirehastighet.

5 Konklusjon

Denne studien er en av de første som ser på effekten av MJ-behandling av granfrø. I dette forsøket kunne jeg påvise en høyere konsentrasjon av terpenener i planter som spiret fra MJ-behandlede frø, kontra plantene som spiret fra frø uten behandling med MJ. Imidlertid kunne jeg ikke påvise signifikante forskjeller mellom behandlingene. Tre av terpenene viste en signifikant høyere konsentrasjon i 0,5 mM MJ-behandling, men de er ikke blant terpenene som er mest fremtredende hva gjelder prosentvis andel av terpenener i plantene. Studien kunne ikke påvise signifikante forskjeller i embryolengde, men det var en tendens. Spiringen var lav for alle behandlinger. Således kan ikke negative konsekvenser på granfrøene relateres direkte til MJ. Imidlertid er dette et viktig tema å få belyst til senere studier siden en eventuell implementering av MJ er helt avhengig av at frøene tåler behandlingen. Til tross for at resultatene ikke var så tydelige som vi hadde håpet på, har vi fått frem noen interessante funn som forhåpentligvis kan være til nytte for framtidig forskning på MJ-behandling av frø. Det blir da viktig å finne en avveining mellom å behandle frø med lave nok konsentrasjoner til at de negative konsekvensene på frøene ikke kommer til syne, men samtidig at MJ gir den ønskede virkningen gjennom å prime frøene, og gjøre dem bedre forberedt på angrep fra gransnutebillen. Resultatet kan bli en kostnadsbesparende og effektiv metode å beskytte granplanter på.

6 Litteratur

- Berglund, T., Lindström, A., Aghelpasand, H., Stattin, E., & Ohlsson, A. B. (2015). Protection of spruce seedlings against pine weevil attacks by treatment of seeds or seedlings with nicotinamide, nicotinic acid and jasmonic acid. *Forestry*, 89(2), 127-135.
- Berner, E. (2017, 22. februar). Etylen-plantehormon. I *Store norske leksikon*. Hentet den 10. mai 2019 fra [https://snl.no/etylen - plantehormon](https://snl.no/etylen_-_plantehormon)
- Björklund, N. (2008). Cues for shelter use in a phytophagous insect. *Journal of insect behavior*, 21(1), 9-23
- Bye Røsok, H., Edvardsen Meland, Ø., (2004). *The use of x-ray for prediciton of seed viability in cones*. Skogfrøverket. Upublisert.
- Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*, 67(22), 2415-2423.
- Bratberg, E. (2015, 02. juni). Stratifisering av frø. I *Store norske leksikon*. Hentet 24. april 2019 fra [https://snl.no/stratifisering_av fr%C3%B8](https://snl.no/stratifisering_av_fr%C3%B8)
- Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... & Pugin, A. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062-1071.
- Corbineau, F., Rudnicki, R. M., & Come, D. (1988). The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation*, 7(3), 157-169.
- Egeland, S. E. (2018, 25. september). Gasskromatografi. I *Store norske leksikon*. Hentet den 02. april 2019 fra <https://snl.no/gasskromatografi>
- Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E., & Krekling, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*, 167(2), 353-376.
- Granhus, A., Breidenbach, J., Eriksen, R., Gjertsen, A. K., & Solberg, S. (2018). Tilstand i foryngelsesfelt. Analyse basert på data fra Resultatkartleggingen, Landsskogtakseringen og Økonomisystem for skogordningene (ØKS). *NIBIO Rapport*.
- Hanssen, K. H. (2010). *Snutebilleskader på Vestlandet og i Trøndelag 2009*. Norsk institutt for skog og landskap.
- Hanssen, K. H., & Fløistad, I. (2018). *Snutebilleskader i Sør-Norge 2017*. *NIBIO Rapport*.

- Hafsten, U. (1992). The immigration and spread of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Norway.
- Heijari, J., Nerg, A. M., Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M., & Holopainen, J. K. (2005). Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 117-124.
- Holopainen, J. K., Heijari, J., Nerg, A. M., Vuorinen, M., & Kainulainen, P. (2009). Potential for the use of exogenous chemical elicitors in disease and insect pest management of conifer seedling production.
- Husby, Tømmerdal, A. (2018). GC-MS. NTNU. Hentet 30. mars 2019 fra <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/GC-MS>
- Høst, E. (2012). *Soppsykdommer i juletrær; er beising av frø et aktuelt tiltak?* (Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås).
- Härlin, C., & Eriksson, S. (2014). *Test av mekaniska plantskydd och insekticider mot snytbaggas i omärkberedd och märkberedd mark, anlagt våren 2011* (No. 10).
- Kępczyński, J., & Białecka, B. (1994). Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A 3 and A 4+ 7 on germination of methyl jasmonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Regulation*, 14(3), 211-216.
- Kolotelo, D. (1997). Anatomy & Morphology of Conifer Tree Seed. *Forest Nursery Technical Series 1.1. British Columbia. Ministry of Forests*.
- Landbruksdirektoratet. (2018). Hogstformer – arealfordeling. Hentet 26. mars 2019 fra <https://www.landbruksdirektoratet.no/no/statistikk/skogbruk/foryngelse-og-miljohensyn>
- Landbruksdirektoratet. (2019a). Skogkultur 2008-2018: Areal. Hentet 26. mars 2019 fra <https://www.landbruksdirektoratet.no/no/statistikk/skogbruk/skogkultur>
- Landbruksdirektoratet. (2019b). Bedre betingelser for suppleringsplanting i 2019. Hentet 11. mars 2019 fra <https://www.landbruksdirektoratet.no/no/eiendom-og-skog/skog-og-klima/tettere-planting/bedre-betingelser-for-suppleringsplanting-i-2019>
- Leather, S. R., Day, K. R., & Salisbury, A. N. (1999). The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): a problem of dispersal? *Bulletin of Entomological Research*, 89(1), 3-16.
- Långström, B., & Day, K. R. (2007). Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. In *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* (pp. 415-444). Springer, Dordrecht.
- Mattilsynet. (2018). Hvordan vil EUs forbud mot utendørs bruk av neonikotinoide påvirke bruk i Norge? Hentet 26. april 2019 fra

- https://www.mattilsynet.no/planter_og_dyrking/plantevernmidler/godkjenning_av_plantevernmidler/hvordan_vil_eus_forbud_mot_utendørs_bruk_av_neonikotinoider_paavirke_bruk_i_norge.31267
- Mattilsynet. (u.å.). Merit forest WG. Bruksområde: Mot skadeinsekter på bartrær i planteskoler. Hentet 26. april 2019 fra https://www.mattilsynet.no/plantevernmidler/etiketter/2011_8.pdf
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 129(3), 1003-1018.
- Martin, D. M., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2003). Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant physiology*, 132(3), 1586-1599.
- Moreira, X., Sampedro, L., & Zas, R. (2009). Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: concentration effect and systemic response. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 94-100.
- Moreira, X., Zas, R., & Sampedro, L. (2012). Methyl jasmonate as chemical elicitor of induced responses and anti-herbivory resistance in young conifer trees. In *Plant defence: Biological control* (pp. 345-362). Springer, Dordrecht.
- NIBIO. (2019). Skog- og miljøinformasjon fra Landskogstakseringen. Nøkkeltall 2013-2017. Hentet 06. mars 2019 fra <https://www.nibio.no/tema/skog/skog-og-miljoinformasjon-fralandsskogtakseringen/nokkeltall>
- Nojavan-Asghari, M., & Ishizawa, K. (1998). Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17(1), 13-18.
- Pubchem. (u.å.). U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information. Hentet 15. april 2019 fra <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sampedro, L., Moreira, X., & Zas, R. (2011). Resistance and response of *Pinus pinaster* seedlings to *Hylobius abietis* after induction with methyl jasmonate. *Plant Ecology*, 212(3), 397-401.
- Schürmann, W., Ziegler, H., Kotzias, D., Schönwitz, R., & Steinbrecher, R. (1993). Emission of biosynthesized monoterpenes from needles of Norway spruce. *Naturwissenschaften*, 80(6), 276-278.
- Skogfrøverket. (2019). 40,2 millioner planter levert! Hentet 11. mars 2019 fra [http://www.skogfroverket.no/userfiles/files/Bibliotek/Statistikk/Levert-2018\(1\).pdf](http://www.skogfroverket.no/userfiles/files/Bibliotek/Statistikk/Levert-2018(1).pdf)

- Skogfrøverket. (1995). Sankeområder for skogfrø. Hentet 02. mai 2019 fra http://www.skogfroverket.no/userfiles/files/Instrukser%2C%20skjemaer%20og%20veiledere/Fr%C3%B8sonekart_scan_lav.pdf
- Skogselskapet. (2017). Skogplanteskolene satser. Hentet 14. mars 2019 fra <https://www.skogselskapet.no/2017/12/20/skogplanteskolene-satser/>
- Statistisk sentralbyrå. (2019). Skogavvirkning for salg. Hentet 05. mars 2019 fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/skogav>
- Statistisk sentralbyrå. (2018). Skogkultur. Hentet 05. mars 2019 fra <https://www.ssb.no/statbank/table/03679/tableViewLayout1/>
- Stein, S. E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(8), 770-781.
- Sveriges lantbruksuniversitet. (u.å.). Snytbaggen – biologi och aktuell forskning. Hentet 12. mai 2019 fra <http://snytbagge.slu.se/>
- Von Sydow, F., & Örlander, G. (1994). The influence of shelterwood density on *Hylobius abietis* (L.) occurrence and feeding on planted conifers, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 9(1-4), 367-375.
- Wallertz, K. (2005). *Pine weevil Hylobius abietis feeding in shelterwood systems*.
- Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., & Gershenson, J. (2006). Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 26(8), 977-988.
- Öhrn, P. (2006). Effekten av metyljasmonat som skydd mot gnag av snytbagge (*Hylobius abietis*) på gran-och tallplantor.
- Örlander, G., Nordlander, G., Wallertz, K., & Nordenhem, H. (2000). Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15(2), 194-201.

7 Vedlegg

Vedlegg 1. 16 planter ble valgt ut til GC-MS analyser; fire som spiret fra frø behandlet med 0,5 mM MJ, fire som spiret fra kontrollfrø (TW), fire som spiret fra 0,5 mM MJ (MJW) og skadet, og fire som spiret fra kontrollfrø og skadet (TWW). Alle plantene ble veid i en analysevekt for å få tørrvekten.

Nr.	Behandling	Vekt (mg)
1	0,5 MJ	4,9
2	0,5 MJ	7,8
3	0,5 MJ	1,1
4	0,5 MJ	9,2
5	TW	7,4
6	TW	9,5
7	TW	6,5
8	TW	7,9
9	0,5 MJW	7,2
10	0,5 MJW	1,3
11	0,5 MJW	8,2
12	0,5 MJW	7,7
13	TWW	5,7
14	TWW	9,6
15	TWW	7,6
16	TWW	8,6



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitskapelege universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway