

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultetet for miljøvitenskap og naturforvaltning, MINA

Stående og induserbart fenolforsvar hos kulturplanter og naturlig foryngelse av gran (*Picea abies*)

Constitutive and inducible phenolic defence in
nursery plants and natural regeneration of Norway
spruce (*Picea abies*)

Maren Lomsdal

Skogfag

Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på min mastergrad i skogfag ved Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA) på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven omhandler temaer innen skogproduksjon og -økologi som jeg synes er svært interessante og jeg er glad for å ha fått bidra i et slikt prosjekt.

Jeg vil rette en stor takk til veilederne mine; forsker Inger S. Fløistad (NIBIO), forsker Melissa Magerøy (NIBIO), førsteamanuensis Johan Asplund (NMBU), og ikke minst min hovedveileder professor Line Nybakken (NMBU). Takk for all hjelp og støtte gjennom prosessen med forsøksplanlegging, gjennomføring av forsøket, og skriving av oppgaven. Takk til medstudent Solveig Strålberg for godt samarbeid i planleggingen av forsøket og samarbeid ved gjennomføring av utplanting, måling og behandling av plantene våren 2019. Jeg vil også rette en takk til overingeniør Annie Aasen og overingeniør Claus D. Kreibich for hjelp til laboratorieanalyser. Jeg vil også takke samboeren min og min familie som har hjulpet meg og vært støttende i dette prosjektet.

Disse årene på skogfag har gitt meg gode minner, opplevelser og erfaringer som jeg vil ta med meg videre. Derfor vil jeg også takke mine medstudenter på skogfag for mange fine samtaler på og utenfor skogbrukersalen, som har gjort dette til to fine år på Ås.

Ås, 2. juni 2020

Maren Lomsdal

Sammendrag

Foryngelse er et viktig tiltak for å sikre bærekraftig forvaltning av skogen. Gran (*Picea abies*) forynges i hovedsak ved hjelp av foredlede planter som gir økt skogproduksjon sammenlignet med naturlig foryngelse. Gransnutebilla (*Hylobius abietis*) beiter på rothalsen til granplanter og kan føre til skader og økt avgang hos kulturforyngelse de første årene etter utplanting. Naturlig foryngelse virker å være mindre attraktiv for gransnutebilla enn kulturforyngelsen. Vanligvis beskyttes plantene mot snutebillegnag med voksbehandling, insekticider og markberedning, men dette gir en økt foryngelseskostnad. For å øke plantenes motstand mot skadegjørere kan det være aktuelt å øke plantenes eget kjemiske forsvar. Planter har både et stående og et induserbart forsvar, hvor de produserer kjemiske forsvarsstoffer til beskyttelse mot skadegjørere. Formålet med denne studien var å sammenligne det stående kjemiske forsvaret i bark, her i form av fenoler, hos kulturforyngelse av gran med naturlig foryngelse. I tillegg undersøkte jeg om fenolforsvaret ble induisert ved påføring av metyljasmonat (MJ) og simulert snutebillegnag.

200 ett år gamle kulturplanter og 200 naturlig foryngede granplanter sto en vekstsesong på relativt ferske hogstflater, fordelt på fem blokker. Nedre del av stammen hos hver plante fikk enten skadebehandling, MJ-behandling (50 mM MJ), en kombinasjon av skadebehandling og MJ-behandling, eller kontroll. Jeg samlet barkprøver og brukte HPLC for å kvantifisere konsentrasjonen av lavmolekylære fenoler, og kvantifiserte konsentrasjonen av kondenserte tanniner, karbon og nitrogen. I tillegg registrerte jeg skader og avgang på grunn av snutebiller.

Bark på kulturforyngelse av gran hadde en høyere konsentrasjon av fenoler enn bark på naturlig foryngelse, for alle de undersøkte fenolgruppene (acetofenoner, flavonoider, stilbener og kondenserte tanniner). Kulturforyngelsen investerer antakelig mer ressurser i sitt kjemiske forsvar grunnet stress i omgivelsene. Kulturforyngelsens høye attraktivitet for snutebiller sammenlignet med den naturlige foryngelsen var antakelig grunnen til høyere skadegrad. MJ-behandlingen sammen med skadebehandlingen induiserte økt konsentrasjon av flavonoider og kondenserte tanniner, men ikke hver for seg. Resultatene fra denne studien indikerer at MJ-behandling sammen med skadebehandling kan induisere det kjemiske forsvaret i form av fenoler hos kulturplanter av gran. Studien bidrar med økt kunnskap om det kjemiske forsvaret hos unge bartrær, særlig for naturlig foryngelse, og kan bidra til å finne naturlige alternativer til insekticider som plantebeskyttelse.

Abstract

Regeneration is an important measure to insure sustainable forestry. Norway spruce (*Picea abies*) is mostly regenerated with nursery plants, which leads to increased forest production compared to natural regeneration. The pine weevil (*Hylobius abietis*) is a spruce pest that feeds on the lower part of the stem and can lead to damage and increased mortality the first years after planting. Natural regenerated spruce seem to be less attractive to the pine weevil than does nursery plants. Waxing of stems, application of insecticides and soil scarification are commonly used to protect spruce from pine weevil damage, but these treatments increase the regeneration cost. Another solution is to increase the plants own chemical defence and resistance to pests and pathogens. Plants have both constitutive and inducible chemical defences. Important spruce defence chemicals include phenolics and terpenes. The aim of this study was to compare constitutively produced defensive phenolics in bark of nursery plants and naturally regenerated Norway spruce. In addition, I investigated the inducibility of chemical defence by applying methyl jasmonate (MJ) and simulated browsing from weevils.

200 one-year old nursery spruce plants and 200 naturally regenerated spruce stood in relatively new clear cuts for one growing season, distributed in five blocks. The lower part of the plant stem was given one out of four different treatments: MJ-treatment, wounding, a combination of MJ and wounding, or control. I sampled bark and used HPLC to quantify the concentration of low molecular phenolics. Further, concentrations of condensed tannins, carbon and nitrogen was quantified. In addition, I registered damage and mortality by weevils.

Bark of nursery plants had a higher concentration of phenolics than did bark of natural regenerated spruce, for all the analysed groups of phenolics (acetophenones, flavonoids, stilbenes and condensed tannins). Nursery plants are probably investing more resources in chemical defence due to environmental stress. These plants also had higher degree of damages because of weevils compared to natural regeneration, most likely due to higher attractivity. Combined treatment with MJ and wounding induced an increased concentration of flavonoids and condensed tannins, but not alone. The results in this study indicate that MJ-treatment together with wounding can induce the phenolic chemical defence in nursery spruce plants. This study contributes to increased knowledge of chemical defence in young conifers, especially for natural regeneration, and to find natural alternatives to insecticide plant protection.

Innhold

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract	V
1 Innledning.....	1
2 Materiale og metode.....	5
2.1 Beskrivelse av forsøk.....	5
2.1.1 Plantemateriale.....	6
2.1.2 Feltregistreringer.....	6
2.2 Kjemisk analyse.....	8
2.2.1 Klargjøring av prøver.....	8
2.2.2 Ekstraksjon av fenoler.....	9
2.2.3 HPLC-analyse av lavmolekylære fenoler	9
2.2.4 Analyse av kondenserte tanniner	10
2.2.5 Karbon- og nitrogenkonsentrasjoner.....	10
2.3 Databehandling.....	10
3 Resultat.....	12
3.1 Relativ høyde- og diameter tilvekst.....	12
3.2 Snutebilleskade.....	14
3.3 Effekter av plantetype, behandling og snutebilleangrep på C- og N-konsentrasjoner ...	15
3.4 Konsentrasjon av fenoler	16
3.5 Fenolkonsentrasjon og snutebilleangrep	19
4 Diskusjon.....	20
5 Konklusjon	25
6 Litteraturliste	26

1 Innledning

Foryngelse av skog etter hogst er et av de viktigste tiltakene skogeier kan gjøre for å sikre bærekraftig forvaltning av skogen, og det er lovpålagt å tilrettelegge for foryngelse innen tre år etter hogst (Skogbrukslova, 2006). Norge domineres av treslagene gran (*Picea abies*), furu (*Pinus sylvestris*) og bjørk (*Betula spp.*), hvor det økonomisk viktigste treslaget er gran.

Foryngelsen av gran i Norge skjer hovedsakelig ved planting av kulturforyngelse fra planteskoler, men noen skogområder med lav bonitet forynges naturlig. Naturlig foryngelse fungerer også som et supplement til plantet kulturforyngelse. I 2018 ble det plantet skog for 206 millioner kroner, noe som tilsvarer om lag 40 millioner planter (Statistisk sentralbyrå, 2019). Av disse var 97 % granplanter (Stiftelsen Det norske Skogfrøverk, 2020). Bruk av foredlet plantemateriale (kulturforyngelse) av gran kan gi 10-25 % økt volumvekst i tillegg til kortere omløpstid sammenlignet med naturlig foryngelse, og dermed økt avkastning per dekar for skogeier (Jansson et al., 2017). Kulturplanter av gran kan ha relativt høy avgang i sine første leveår hovedsakelig på grunn av konkurrerende vegetasjon, insekter, beiting, tørke og sopp (Granhus & Eriksen, 2017). Høy avgang hos kulturplanter fører til et økonomisk tap for skogeier ved behov for suppleringsplanting og økt omløpstid.

En av hovedårsakene til avgang på granplantefelt er gnag fra gransnutebilla (*Hylobius abietis*). Insektet er vanlig på nye hogstflater, og kan gi høy avgang på plantefelt (Tudoran et al., 2016; Zas et al., 2017). En svensk studie viser inntil 60 % avgang på nye, ett og to år gamle hogstflater (Örlander & Nilsson, 1999). Gransnutebilla gnager bark på rothalsen av små planter slik at de får redusert vekst eller dør på grunn av uttørking (Långström & Day, 2004). For å redusere insektskader på granplanter behandler man ofte plantene med insekticider før utplanting, men miljøproblemer ved bruk av slike preparater har ført til forbud mot flere mye brukte preparater (Mattilsynet, 2018). Sverige har utviklet flere mekaniske alternativer for snutebillebeskyttelse (Eriksson et al., 2018). I Sverige brukes hovedsakelig Conniflex, som er en behandling hvor sand limes fast på nedre del av planta og med det reduserer gnag fra gransnutebilla (Nordlander et al., 2009). Som et alternativ til insekticider har man i Norge begynt å påføre voks på deler av stammen på granplanter. Dette gir en høyere foryngelseskostnad, og kan potensielt være en stressfaktor for planta, men så langt er det ikke publisert noen forskningsresultater på dette. I tillegg til direkte beskyttelse av plantene er skogskjøtselstiltak som markberedning og styrking av plantenes eget forsvar metoder som kan bedre plantenes etableringsevne.

Trær har både et fysisk og et kjemisk forsvar som de bruker for å forsvare seg mot sykdommer og skadegjørere (Bennett & Wallsgrove, 1994). Bark, spisse nåler, voks, torner og pigger er eksempler på fysiske strukturer som beskytter planter (Royle, 1975). Det kjemiske forsvaret, på den andre siden, er både stående og induserbart, og er oppsummert i Franceschi et al. (2005). Bark har celler med mekaniske egenskaper som harde cellevegger med lignin og kalsiumoxalat-krystaller, lignifiserte steinceller, suberin i cellevegger, harpiksceller og -kanaler, og polyfenoliske parenkymatiske celler som produserer og lagrer fenoler, og som er en del av det stående forsvaret. Det induserbare forsvaret inkluderer vekst av sårvev (med mye lignin, suberin eller fenoler) og syntese av kjemiske forsvarsstoffer som fenoler, terpenier og alkaloider. Det er antatt at den induserbare produksjonen av fenoler er mer giftig eller mer spesifikk mot en invaderende art enn fenoler i det stående forsvaret. Fenoler er en stor gruppe kjemiske forsvarsstoffer som inkluderer blant andre flavonoider, stilbener og kondenserte tanniner, og bark av gran inneholder høye konsentrasjoner av disse forsvarsstoffene (Metsamuuronen & Siren, 2019). De ulike stoffenes funksjoner i planteforsvaret er ikke fullt ut beskrevet og kan variere mellom arter, men flavonoider fungerer blant annet som lysbeskyttelse for plantene, stilbener beskytter mot sopp og bakterier, og kondenserte tanniner kan ha både giftig effekt og antibiteeffekt (Metsamuuronen & Siren, 2019).

Påvirkning som insektgnag, beiting, konkurrerende vegetasjon og soppangrep skaper stress (Hjelm et al., 2012). Reaksjoner på stresset setter i gang trærnes induserbare forsvar (Franceschi et al., 2005) og kan gjøre planta mer motstandsdyktig (Klepzig et al., 1995). Gran som har fått påført skade og soppinfeksjon viste økt motstandsdyktighet mot inokulering av blåvedsopp (Christiansen et al., 1999). Klepzig et al. (1995) fant at mekanisk skadet bark inneholdt høyere konsentrasjon av fenoler enn uskadet bark, og Lopez-Goldar et al. (2016) fant økt konsentrasjon av forsvarsstoffer i stammen hos snutebilleangrepne planter. Det induserbare forsvaret er avhengig av at plantehormoner som jasmonsyre og metyljasmonat (MJ) fungerer som signalmolekyler i forsvaret mot insektgnag og patogener (Bennett & Wallsgrove, 1994; Moreira et al., 2012; Pieterse et al., 2012). På grunn av dette kan man aktivere det kjemiske planteforsvaret ved påføring av MJ utenpå planta (Heijari et al., 2005; Hudgins et al., 2003; Moreira et al., 2009; Moreira et al., 2012). Tidligere studier har vist at behandling med MJ kan føre til redusert høydevekst (Sampedro et al., 2011), men også begrenset kolonisering av granbarkbille (*Ips typographus*) (Erbilgin et al., 2006; Mageroy et

al., 2020). Det induserbare forsvaret blir dermed påvirket av stress som påført skade og påføring av MJ.

Næringstilgang er en begrensende faktor for planters vekst og utvikling. Tidligere forskning konkluderer med at planter med høy næringstilgang vokser fortere enn planter med lav næringstilgang, mens saktevoksende planter investerer mer ressurser i sitt kjemiske forsvar (Bryant et al., 1983; Coley et al., 1985; Holopainen et al., 1995). I planteskolene blir plantene gjødslet for bedre vekst og robusthet (Fløistad et al., 2018), og vokser under varierende, men kontrollerte, omgivelser, og stressfaktorer som lyspåvirkning og tørke reduseres sammenlignet med omgivelsene ute i skogen. Med bakgrunn i dette kan man anta at kulturforyngelse vil ha et lavere innhold av kjemiske forsvarsstoffer enn planter som er forynget naturlig i skogen, men jeg har ikke kjennskap til noe tidligere forskning som har tatt for seg dette. Videre er det få studier som har sammenlignet snutebilleskader, eller andre skader, for den saks skyld, i kulturforyngelse og naturlig forynget av gran. Thorsén et al. (2001) fant at rasktvoksende kulturplanter av gran hadde lavere skadegrad på grunn av snutebillegnag enn sakterevoksende kulturplanter, og Hannerz et al. (2002) fant høyest mortalitet hos planter med tynn bark. Planter med gode vokseegenskaper kan antakelig raskere oppnå en størrelse og barktykkelse som gir bedre beskyttelse mot stress som tørke, frost og angrep av skadegjørere, slik at de oppnår raskere etablering enn naturlig forynget (Grossnickle, 2012). Klatremus (*Microtus agrestis*) er en annen skadegjører som beiter på foryngetsfelt, men som gjør skade om vinteren under snøen. Ved å undersøke beitepreferanser for arten har man funnet at arten prefererer kulturplanter over naturlig forynget av gran (Virjamo et al., 2013).

I denne oppgaven ønsket jeg å sammenligne det stående kjemiske forsvaret, nærmere bestemt fenoler, i bark hos naturlig forynget og kulturforyngelse av gran etter én vekstsesong på relativt ferske hogstflater. Videre studerte jeg i hvilken grad de to plantetyperne aktiverte det induserbare forsvaret etter simulerte snutebillegnag og påføring av MJ. Jeg sammenlignet også fenolkonsentrasjoner hos planter med og uten naturlige snutebilleskader. Jeg satte opp følgende problemstillinger og hypoteser:

- 1) Er det en forskjell i snutebilleangrep på bark mellom kulturforryngelse og naturlig forryngelse av gran, og kan dette knyttes til fenolkonsentrasjoner i barken?

H1: Bark på kulturforryngelse blir i høyere grad angrepet av snutebiller enn bark på naturlig forryngelse av gran.

H2: Bark på naturlig forryngelse har høyere fenolkonsentrasjoner enn bark på kulturforryngelse av gran.

- 2) Induseres det kjemiske forsvaret hos granplanter ved påføring av MJ, simulert snutebilleskade, og ved naturlig snutebilleskade, og er det en forskjell i induserbarheten mellom kulturforryngelse og naturlig forryngelse?

H3: Påføring av MJ, skade og en kombinasjon av MJ og skade på bark på granplanter øker konsentrasjonen av fenoler fordi forsvaret induseres.

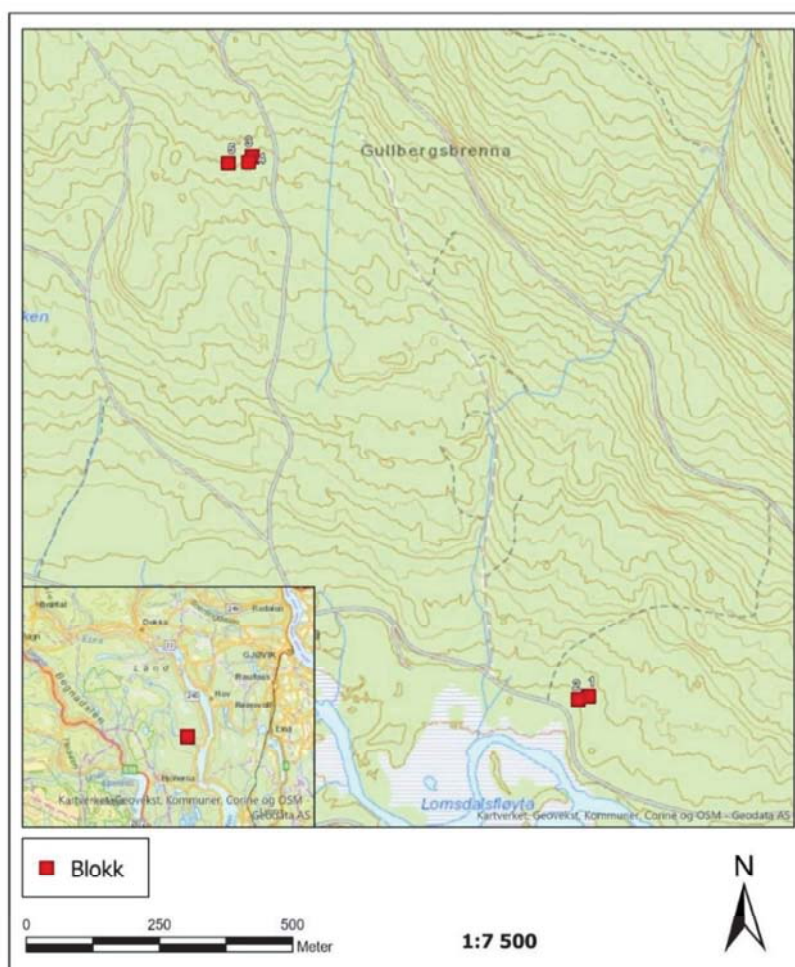
Naturlige snutebilleskader vil også indusere en forsvarsreaksjon og gi en økt fenolkonsentrasjon.

H4: Påføring av MJ og skade reduserer høyde- og diametervekst hos granplanter fordi ressurser prioriteres til produksjon av forsvarsstoffer.

2 Materiale og metode

2.1 Beskrivelse av forsøk

Forsøket ble etablert i Lomsdalen på vestsiden av Randsfjorden i Søndre Land kommune, Innlandet fylke, i Norge (Figur 1). Forsøksområdet er i boreal barskog med gran (*Picea abies*) som dominerende treslag. Relevante bestandsdata for forsøksområdet er beskrevet i Tabell 1.



Figur 1. Oversiktskart over Søndre Land (innfelt) og forstørret kart over forsøksområdet med punkter som viser plasseringen av de fem blokkene i Lomsdalen. To blokker ligger nær Lomsdalsfløyta, og tre blokker ligger nær Gullbergsbrenna.

Vi valgte ut bestand i tilnærmet homogene skogområder med tilfredsstillende naturlig foryngelse av gran i størrelse og antall. De resulterende bestandene (A og B) lå begge i sørvest-helling, ca. 1,2 km fra hverandre (Tabell 1). Vi la ut to blokker i bestand A og tre blokker i bestand B, med så like fuktighetsforhold som mulig (Figur 1). Gjennomsnittlig årsnedbør for de siste 30 år (1990-2019) i Lomsdalen var på 739 mm, og gjennomsnittlig årstemperatur var på 4,9°C. For vekstmånedene juni, juli og august la gjennomsnittlig

årsnedbør og årstemperatur på henholdsvis 76 mm og 13,9°C, 87 mm og 16,5°C, og 98 mm og 15,0°C (Norges vassdrags- og energidirektorat, 2020).

Tabell 1. Stedsangivelse og informasjon om bestand A og B.

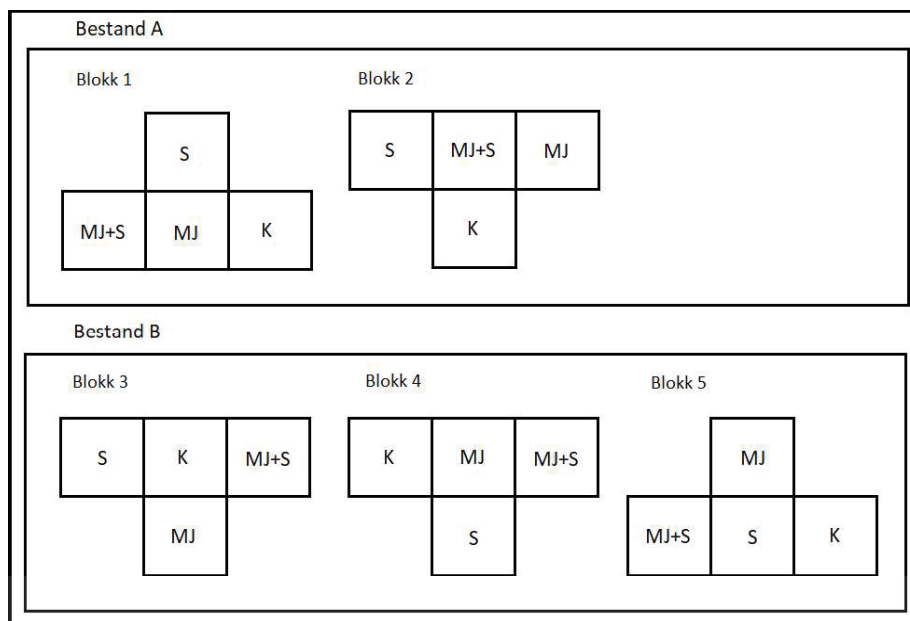
Egenskap	A	B
EUREF89 UTM33	6728604.09 N 241029.98 Ø	6729632.82 N 240476.75 Ø
Høyde over havet (m)	175	275
Bonitet (H ₄₀)	G20	G20
Slutthogst (år)	2017	2017
Hogstflateareal (dekar)	5	36

2.1.1 Plantemateriale

Vi brukte både kulturforyngelse og lokal naturlig foryngelse i forsøket. Kulturforyngelsen var ett år gamle M95-granplanter fra Huse frøplantasje på Lillehammer, oppalet hos Skogplanter Østnorge AS på Biri. Plantene ble levert uten voks eller kjemisk behandling. Planter fra Huse frøplantasje brukes på lavereliggende høydeler på Østlandet; tilsvarende Sanderud frøplantasje (Stiftelsen Det norske Skogfrøverk, 2018). Det var ønskelig at kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen var så lik som mulig i størrelse.

2.1.2 Feltregistreringer

Forsøket besto av fem blokker (Figur 1 og 2). I hver blokk valgte vi ut 40 naturlig foryngede planter. 15. mai 2019 ble det plantet ut 40 kulturplanter i hver av de fem blokkene, fordelt på fire prøveflater med ulike behandlinger per blokk (Figur 2). De fire behandlingene var «kontroll» (K), «skade» (S), «MJ» (MJ) og «MJ+skade» (MJ+S). For hver blokk var det 20 planter totalt per behandling.



Figur 2. Inndeling av blokker i bestand A og B, fordelt på behandlingene K (kontroll), S (skade), MJ (metyljasonat), MJ+skade (50 mM metyljasonat og skade). Forsøket består av fem blokker med fire prøveflater hver, og 10 planter per prøveflate (5 kulturforyngede planter og 5 naturlig foryngede planter). Totalt omfang av forsøket var 400 granplanter (*Picea abies*).

Vi valgte ut den naturlige foryngelsen blant planter i områder i bestandene som hadde minst 10 granplanter i tilnærmet samme størrelse som kulturforyngelsen, så jevnt spredt som mulig i 3×3 meter forband. Plantingen av kulturforyngelse og utvelgelsen av naturlig foryngelse ga til sammen 400 planter i forsøket, 80 planter i hver blokk. Hvilke prøveflater innenfor hver blokk som ble tildelt hvilken behandling var tilfeldig og ble merket med ulike farger som senere ble de ulike behandlingene; altså var det randomisert blokkdesign. Vi forsøkte å prioritere gode planteplasser for kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen, selv om dette kunne skape ujevnheter i avstand mellom plantene innenfor prøveflatene.

Etter utplanting 15. mai merket vi alle plantene med et individuelt nummer og målte høyde og diameter. Høyden ble målt fra bakkenivå og opp til toppen av knoppen på toppskuddet (med en nøyaktighet på 0,5 cm). Diameter ble målt 3-5 cm opp på rothalsen, på et mest mulig jevnt område (med en nøyaktighet på 0,1 mm). 29. mai ble alle plantene behandlet og vi registrerte om det hadde skjedd skuddskyting. Plantene med behandlingen «MJ» ble penslet med metyljasonat (MJ) (blanding av vann, 50 mM MJ, og én dråpe Tween® per liter) på to sider av den nederste 1/3 av plantestammen. Det ble påført ett til to penselstrøk med MJ på hver side av barken med en liten pensel, slik at det dekket omtrent hele omkretsen. For planter med behandlingen «skade» brukte vi skalpell til å skrape bort barklagene inn til veden. Det ble skrapet bort en firkant på ca. $0,5 \times 0,5$ cm på øst- og vestsiden av stammen med ulik høyde på

hver side, ca. 5 cm opp på stammen, for å unngå ringbarkingseffekt. Dette gjorde vi for å simulere gransnutebillegnag på plantene. Etter skading ble plantene penslet med en blanding av Tween® og vann for å eliminere en eventuell forskjell i påvirkning mellom plantene på grunn av bruk av Tween®. Planter med behandlingen «MJ+skade» ble påført både 50 mM MJ og skade med skalpell på samme måte som behandlingen «skade». Planter med behandlingen «kontroll» ble kun penslet med en blanding av Tween® og vann for å fungere som en referanse for de andre behandlingene

30. august til 1. september målte jeg høyde og diameter på alle 400 planter og valgte ut halvparten av plantene for videre undersøkelser på laboratorium. Jeg registrerte skader av beiting og avgang på grunn av snutebillegnag, samt gnagets størrelse og skadens betydning for plantas overlevelse etter beskrivelser av skadekategorier i Wallertz et al. (2016). Noen av plantene overlevde ikke sommeren; disse ble ikke registrert og heller ikke tatt med i videre undersøkelsene. 1.-4. september samlet jeg inn prøver fra de utvalgte plantene. Plantene som det ble tatt prøver av ble valgt ut med bakgrunn i overlevelse, synlig skade (f. eks ringbarking) og størrelse, for å få et jevnest mulig sammenligningsgrunnlag. Mye av kulturforyngelsen i to av blokkene (bestand A) hadde tørr topp ved innsamling og mange av de naturlige foryngede plantene var større enn kulturforyngelsen. 200 planter ble klippet ved rothals; 20 kulturforyngede planter og 20 naturlig foryngede planter i hver blokk, fordelt på fem kulturforyngede planter og fem naturlig foryngede planter per prøveflate. De nederste 10-15 cm av stammen eller opp til første kvistkrans ble splittet og den ene halvparten ble overført til en papirpose med 5 ml silicagel. Prøvene ble tørket i tørkeskap på 30°C i 60-84 timer, og deretter lagret i plastikkposer i en fryser ved -20°C i en måned i påvente av videre bearbeiding.

2.2 Kjemisk analyse

2.2.1 Klargjøring av prøver

Jeg skrapte av barken inn til veden på stammeprovne med skalpell, og overførte den til 2 ml eppendorfrør sammen med en metallkule. Barken ble pulverisert ved bruk av en Retsch MM400 kulemølle (Retsch, Haag, Tyskland) med en vibrasjonsfrekvens på 30 Hz i 90 sekunder. Deretter ble eppendorfrørene med barkpulver oppbevart i fryser (-20°C) fram til videre behandling.

2.2.2 Ekstraksjon av fenoler

Jeg veide inn 6 mg ($\pm 0,5$ mg) av barkpulveret på mikrovækt (Mettler-Toledo XP6, GmbH, Sveits) og overførte dette til 2 ml precellysrør sammen med to homogeniseringskuler av teflon. Precellysrørene ble så lagret i fryser ved -20°C frem til ekstraksjon.

For ekstraksjon av lavmolekylære fenoler løste jeg opp barkpulverprøvene i 400 μl MeOH, homogeniserte dem ved 5000 rpm i 20 sekunder med en Precellys 24-homogenisator (Bertin Technologies, Montigny-Le Bretonneux, Frankrike) og satte dem på isbad i 15 minutter. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 15 000 o/m i tre minutter (Eppendorf sentrifuge 5417C Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Jeg pipetterte væsken (videre kalt «supernatanten») i de sentrifugerte prøvene over i ett 10 ml plastrør per prøve. Ekstraheringen ble gjentatt tre ganger, uten 15 minutter isbad, og pipettert over i samme plastrør. Totalt ekstraherte jeg supernatanten fire ganger per prøve. Jeg ekstraherte de fire første prøvene fem ganger for å teste om dette var nødvendig for å få med nok fenoler. Det var tilstrekkelig med fire ekstraheringer. Etter ekstraheringen ble supernatantene avdampet i en vakuumsentrifuge (Eppendorf concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) til ekstraktet var helt tørt, før jeg forseglede plastrørene med kork og lagret dem i fryser ved -20°C før forberedelsene til HPLC-analyse.

2.2.3 HPLC-analyse av lavmolekylære fenoler

Jeg satte de avdampede supernatantene fra ekstraheringen i romtemperatur i 30 minutter før jeg løste dem opp med 200 μl MeOH og 200 μl ultradestillert vann, og blandet det sammen ved hjelp av ultralydbad. Deretter ble supernatantene helt over i 2 ml eppendorfrør, sentrifugert på 15 000 o/m i tre minutter, og væsken pipettert over i HPLC-ampuller og forseglet.

Væsken i HPLC-ampullene ble analysert ved HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland). HPLC-systemet besto av en G1312A binærpumpe, en G1329A autosampler med termostat, en G1316A kolonneovn med termostat og en G1315D diode-matrise-detektor. En kolonne med $50 \times 4,6$ mm indre diameter, fylt med ODS Hypersil (3 μm) partikler, ble brukt for å separere fenolene (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Mobil fase bestod av en A- og B-løsning som ble brukt til eluering av prøvene, hvor A-løsningen inneholdt 30 ml tetrahydrofuran og 5 ml ortofosforsyre blandet med ultradestillert vann til totalt 2000 ml. B-løsningen besto av metanol (MeOH) av kromatografikvalitet. Injeksjonsvolumet var på 20 μl ,

og temperaturen under analysen var 30°C. HPLC-analysen med gradient og oppsett av systemet er nærmere beskrevet i Nybakken et al. (2012).

$$\text{Konsentrasjon (mg g}^{-1} \text{ tørrvekt)} = \frac{\text{areal} \times \text{responsfaktor} \times \text{volum}_{\text{oppløst}}}{\text{vekt} \times \text{volum}_{\text{injisert}}}$$

Formel 1. Beregning av konsentrasjon av lavmolekylære fenoler.

Jeg identifiserte og beregnet konsentrasjonen av lavmolekylære fenoler ved å sammenligne spekterdiagrammet fra absorbansen ved 270 og 320 nm og respektive retensjonstider med kommersielle standarder. Konsentrasjonen av fenoler er beskrevet som en funksjon av areal (arealet under toppen i kromatogrammet), responsfaktor, volum_{oppløst} (volum væske prøven ble oppløst i før HPLC-analyse), vekt (vekt av innveid prøve) og volum_{injisert} (volum injisert prøve i HPLC-analyse) i formel 1.

2.2.4 Analyse av kondenserte tanniner

MeOH-løselige kondenserte tanniner ble analysert fra HPLC-ekstraktene innen 48 timer etter HPLC-analysen. Jeg pipetterte 100 µl ekstrakt fra HPLC-ampullene over i to 10 ml glassrør (A- og B-prøver), og tilsatte 400 µl MeOH, 100 µl jernreagens (2 M HCL med 2 % ammoniumjern(iii) sulfat) og 3 ml butanolsyre (950 ml butanol og 50 ml kons. HCL), og blandet det sammen. Som kontrollprøver blandet jeg to glassrør med alle kjemikaliene unntatt ekstrakt, hvor jeg erstattet ekstraktmengden med MeOH. Prøverørene ble forseglet og kokt i vann i 50 minutter. Deretter ble det målt absorbans på prøvene ved 550 nm i et spektrofotometer (UV-1800, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), og gjennomsnittsverdier for A- og B-prøvene ble brukt i statistiske analyser. Konsentrasjonen av kondenserte tanniner ble beregnet ut i fra en standard av isolerte kondenserte tanniner i grannåler.

2.2.5 Karbon- og nitrogenkonsentrasjoner

5 mg (± 0,5 mg) barkpulver ble veid inn, pakket inn i tinnfolie og analysert i en Micro Cube elementanalysator (Elementar Analyse, Hanau, Tyskland). Alle prøvene, inkludert 7 prøver med for lite prøvemateriale, ble tatt med videre i statistiske analyser.

2.3 Databehandling

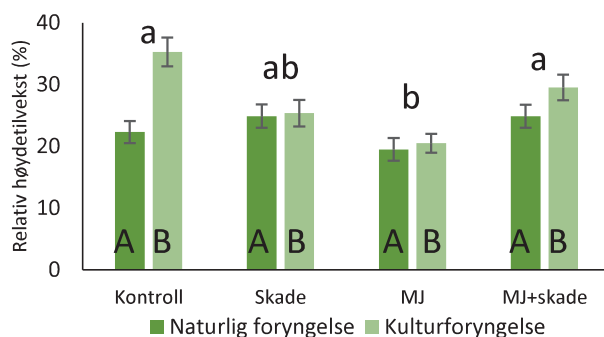
Det ble tilpasset en Linear Mixed-Effects Model for konsentrasjon av fenoler, for karbon- og nitrogenkonsentrasjon, CN-ratio, snutebilleskadegrad og høyde- og rothalsdiametertilvekst. Toveis variansanalyse (ANOVA) ble deretter brukt på modellene for å avdekke forskjeller i fenolkonsentrasjon for plantetyper og behandlinger, andel snutebilleangrep,

snutebilleskadegrad, og høyde- og rothalsdiametertilvekst. Videre ble Estimated Marginal Means (EMMs) brukt for å avdekke statistiske forskjeller mellom ulike behandlinger. For å undersøke forskjeller i andelen snutebilleangrepne planter for plantetype og behandlinger ble det brukt en Generalized Linear Model (GLM). Alle residualer i datasettet for fenolkonsentrasjon ble testet for normalfordeling, og vi kan dermed anta at dataene er normalfordelte. Analyseverdier ble ansett for å være signifikante ved $p < 0,05$. Alle statistiske tester ble utført i RStudio, versjon 3.6.1, og figurene ble laget i Microsoft Excel 2016.

3 Resultat

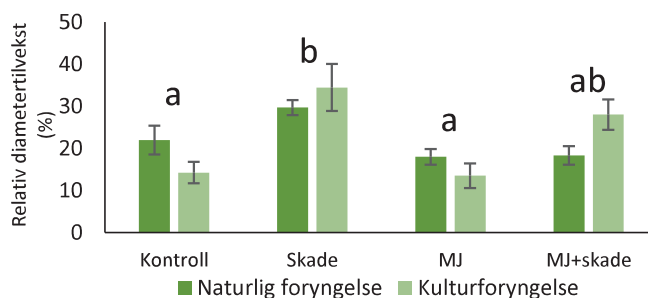
3.1 Relativ høyde- og diametertilvekst

Kulturforyngelsen hadde 21 % større relativ høydetilvekst enn den naturlige foryngelsen ($p < 0,001$; Figur 3). Høydetilveksten på kulturforyngelsen varierte mellom 0 og 83 %, mens naturlig forynget gran varierte mellom 0 og 64 %. Planter med behandlingen «MJ» hadde 31 % lavere relativ høydetilvekst sammenlignet med kontrollen ($p < 0,001$; Figur 3) og 26 % lavere enn «MJ+skade» ($p = 0,001$; Figur 3). Dette resultatet er forårsaket av behandlingseffekten på relativ høydetilvekst hos kulturforyngelsen, mens høydetilveksten hos den naturlige foryngelsen ikke hadde en effekt av behandlingene (signifikant interaksjon behandling $\times$ plantetype for relativ høydetilvekst).



Figur 3. Relativ høydetilvekst (%) på granplanter (*Picea abies*) fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljamonat) og MJ+skade). Ulike store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen, og ulike små bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA og Estimated Marginal Means ved $p < 0,05$). $n = 400$.

Jeg fant ingen signifikant forskjell i relativ diametertilvekst mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen. Hos kulturforyngelsen varierte rothalsdiametertilveksten mellom 0 og 200 %, mens hos den naturlige foryngelsen varierte mellom 0 og 94 %. Planter med behandlingen «skade» hadde 104 % høyere diametertilvekst ved rothals sammenlignet med «MJ» ($p < 0,001$) og 77 % høyere enn kontrollen ($p < 0,001$; Figur 4).



Figur 4. Relativ diametertilvekst (%) på rothalsen til granplanter (*Picea abies*) fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljamonat) og MJ+skade). Ulike små bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA og Estimated Marginal Means ved $p < 0,05$). Det var ingen forskjell mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen. $n = 400$.

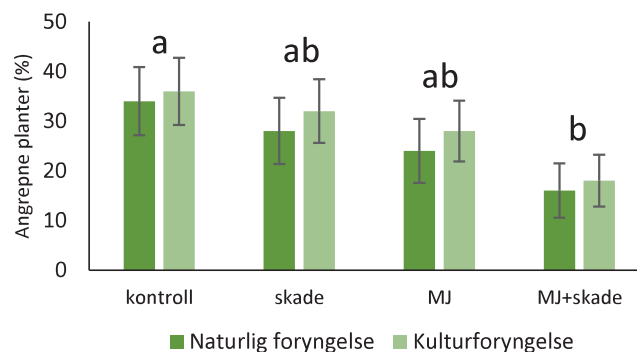
Gjennomsnittlig høyde og rothalsdiameter ved utplanting var 26 cm og 5,0 mm for den naturlige foryngelsen, og 20 cm og 3,3 mm for kulturforyngelsen. Ved innsamling var gjennomsnittlig høyde og rothalsdiameter 32 cm og 6,1 mm for den naturlige foryngelsen, og 26 cm og 4,0 mm for kulturforyngelsen (Tabell 2).

Tabell 2. Gjennomsnittlig høyde og rothalsdiameter på naturlig foryngede og kulturforyngede granplanter (*Picea abies*) ved utplanting og innsamling, samt gjennomsnittlig relativ høydetilvekst og diameterilvekst. Signifikante forskjeller mellom naturlig foryngelse og kulturforyngelse ved $p < 0,05$ er markert med *. $n = 400$.

	Høyde utplanting (cm)	Høyde innsamling (cm)	Rothalsdiameter utplanting (mm)	Rothalsdiameter innsamling (mm)	Relativ høydetilvekst (%)	Relativ diameterilvekst (%)
Naturlig foryngelse	26	32	5,0	6,1	23	22
Kulturforyngelse	20	26	3,3	4,0	28*	23

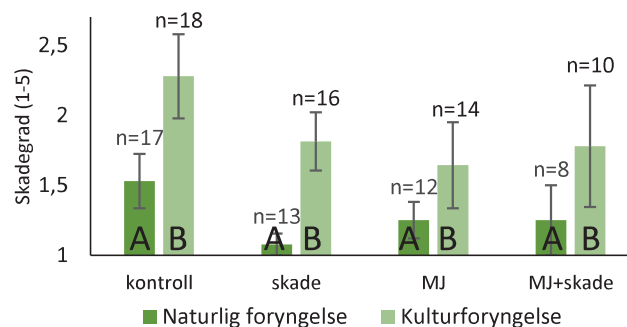
3.2 Snutebilleskade

Jeg fant ingen signifikant forskjell i andel snutebilleskade mellom kulturplanter og naturlig foryngede planter. Jeg registrerte skade på mellom 16 og 36 % av plantene innen hver behandling (Figur 5). Det var 18 % færre planter med snutebilleskade hos plantene med behandlingen «MJ+skade» enn for de ubehandlede kontrollplantene ($p = 0,046$; Figur 5). Ellers var det ingen signifikant forskjell i snutebilleskade mellom de ulike behandlingene.



Figur 5. Andel (%) av granplanter (*Picea abies*) med skade fra gransnutebille (*Hylobius abietis*) fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljasonat) og MJ+skade). Ulike små bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (GLM og Estimated Marginal Means ved $p < 0,05$). Det var ingen forskjell mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen. $n = 400$.

Kulturforyngelsen hadde 47 % høyere skadegrad av snutebille enn den naturlige foryngelsen ($p = 0,001$), men jeg fant ingen forskjeller i skadegrad mellom behandlingene (Figur 6).



Figur 6. Gjennomsnittlig skadegrad (1-5) for granplanter (*Picea abies*) med skade fra gransnutebille (*Hylobius abietis*) fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljasonat) og MJ+skade). Ulike store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen (ANOVA ved $p < 0,05$). Det var ingen forskjell mellom behandlingene. $n = 108$.

3.3 Effekter av plantetype, behandling og snutebilleangrep på C- og N-konsentrasjoner

Den naturlige foryngelsen hadde gjennomsnittlig 3 % høyere konsentrasjon av karbon (C) enn kulturforyngelsen ($p < 0,001$; Tabell 3). Jeg fant også gjennomsnittlig 2 % høyere konsentrasjon av C i planter med behandling «MJ+skade» enn hos «MJ»-, «skade»- og «kontroll»-behandlingene ($p < 0,001$; Tabell 3). Det var ingen effekt av plantetype, behandling eller snutebilleangrep på nitrogenkonsentrasjon eller CN-ratio.

Tabell 3. Resultat av toveis ANOVA på gjennomsnittlig konsentrasjon av karbon (C; %) og nitrogen (N; %), og CN-ratio (C:N) i bark på gran (*Picea abies*). Fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse), Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljasonat) og MJ+skade), og Angrepet (plante angrepet av snutebille (0/1)). Signifikante forskjeller mellom Plantetype og Behandling, og Plantetype og Angrepet ved $p < 0,05$ er uthevet. $n = 200$.

		C	N	C:N
Naturlig foryngelse	kontroll	53,17 ± 0,43	0,72 ± 0,02	75,00 ± 2,99
	skade	53,39 ± 0,34	0,69 ± 0,02	71,54 ± 2,66
	MJ	53,05 ± 0,26	0,75 ± 0,02	73,41 ± 2,47
	MJ+skade	54,36 ± 0,43	0,71 ± 0,02	77,96 ± 2,97
Kulturforyngelse	kontroll	51,21 ± 0,21	0,71 ± 0,03	75,16 ± 2,03
	skade	51,49 ± 0,29	0,74 ± 0,03	78,60 ± 2,48
	MJ	51,91 ± 0,27	0,72 ± 0,02	71,68 ± 1,97
	MJ+skade	52,52 ± 0,23	0,70 ± 0,03	78,40 ± 2,50
Plantetype (T)	F 1,188 (P)	68,16 (<0,001)	0,00 (0,983)	0,73 (0,395)
Behandling (B)	F 3,188 (P)	7,02 (<0,001)	0,93 (0,428)	1,75 (0,157)
T × B	F 3,188 (P)	0,84 (0,475)	1,13 (0,339)	1,22 (0,305)
Naturlig foryngelse	Ikke angrepet	53,42 ± 0,21	0,72 ± 0,01	75,56 ± 1,26
	Angrepet	53,78 ± 0,47	0,71 ± 0,02	77,55 ± 2,77
Kulturforyngelse	Ikke angrepet	51,66 ± 0,15	0,72 ± 0,01	74,21 ± 1,63
	Angrepet	52,09 ± 0,29	0,72 ± 0,03	75,16 ± 2,69
Plantetype (T)	F 1,193 (P)	49,61 (<0,001)	0,02 (0,889)	0,43 (0,510)
Angrepet (A)	F 1,193 (P)	0,32 (0,572)	0,02 (0,901)	0,03 (0,853)
T × A	F 1,195 (P)	0,11 (0,745)	0,07 (0,791)	0,03 (0,861)

3.4 Konsentrasjon av fenoler

Kulturforlyngelsen hadde gjennomsnittlig 65 % høyere konsentrasjon av picein enn den naturlige forlyngelsen av gran ($p < 0,001$; Tabell 4; Figur 7). I kulturforlyngnet gran varierte konsentrasjonen av picein fra 0,02 til 0,32 mg g⁻¹, mens konsentrasjonen av picein i naturlig forlyngnet gran varierte mellom 0 og 0,15 mg g⁻¹. Jeg fant ingen effekt av behandling for konsentrasjon av picein.

Tabell 4. Gjennomsnittlig konsentrasjon i mg g⁻¹ ($\pm$ SE) og resultat av toveis ANOVA på fenoler i bark på gran (*Picea abies*), er beregnet på Plantetype (naturlig forlyngelse og kulturforlyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljasmonat) og MJ+skade). Signifikante forskjeller mellom Plantetype og Behandling ved $p < 0,05$ er uthevet. * log-transformert, ** sqrt-transformert. n = 200.

	Naturlig forlyngelse				Kulturforlyngelse				Plantetype (T)	Behandling (B)	T × B
	kontroll	skade	MJ	MJ+skade	kontroll	skade	MJ	MJ+skade	F 1,188 (P)	F 1,188 (P)	F 1,188 (P)
ACETOGENONER											
Picein *	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	52,69 (<0,001)	0,87 (0,459)	0,62 (0,604)
FLAVONOIDER											
Gallocatechin **	1,04 $\pm$ 0,16	1,62 $\pm$ 0,25	1,35 $\pm$ 0,22	1,45 $\pm$ 0,25	1,28 $\pm$ 0,23	1,12 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,17	1,35 $\pm$ 0,27	0,62 (0,432)	1,00 (0,393)	1,19 (0,316)
(+) Catechin **	1,52 $\pm$ 0,22	1,50 $\pm$ 0,23	2,01 $\pm$ 0,29	2,37 $\pm$ 0,26	1,98 $\pm$ 0,41	1,90 $\pm$ 0,22	4,78 $\pm$ 0,50	4,68 $\pm$ 0,42	56,80 (<0,001)	27,30 (<0,001)	8,34 (<0,001)
Dihydromyricetin der. 1 **	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	45,01 (<0,001)	14,97 (<0,001)	13,32 (<0,001)
Dihydromyricetin der. 2 *	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	42,05 (<0,001)	0,69 (0,559)	0,76 (0,519)
Quercetin glycoside **	0,20 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,09	0,58 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,07	65,86 (<0,001)	1,40 (0,246)	0,65 (0,581)
Monocoumaryl astragallicin **	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	353,29 (<0,001)	0,22 (0,886)	0,71 (0,550)
Dicoumaryl astragallicin **	0,02 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,03	2,82 $\pm$ 0,37	2,22 $\pm$ 0,29	2,35 $\pm$ 0,36	2,34 $\pm$ 0,32	689,11 (<0,001)	0,49 (0,691)	0,86 (0,461)
Sum flavonoider **	2,94 $\pm$ 0,34	3,90 $\pm$ 0,45	3,44 $\pm$ 0,44	4,25 $\pm$ 0,45	7,11 $\pm$ 0,57	7,46 $\pm$ 0,61	7,92 $\pm$ 0,54	9,42 $\pm$ 0,49	208,65 (<0,001)	6,17 (<0,001)	0,77 (0,511)
STILBENER											
Piceatannol glycoside *	6,84 $\pm$ 1,00	6,89 $\pm$ 1,20	8,03 $\pm$ 1,27	6,69 $\pm$ 0,78	7,48 $\pm$ 0,82	5,83 $\pm$ 0,50	6,01 $\pm$ 0,47	7,82 $\pm$ 0,83	1,10 (0,295)	1,05 (0,372)	0,56 (0,639)
Resveratrol glycoside *	0,91 $\pm$ 0,21	0,97 $\pm$ 0,22	0,90 $\pm$ 0,14	0,89 $\pm$ 0,19	1,31 $\pm$ 0,22	0,98 $\pm$ 0,11	1,38 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,19	22,73 (<0,001)	0,28 (0,839)	0,41 (0,746)
Iso-rhapontin glycoside *	7,96 $\pm$ 1,55	8,59 $\pm$ 1,83	8,23 $\pm$ 1,47	7,75 $\pm$ 1,75	10,87 $\pm$ 1,93	9,88 $\pm$ 0,78	11,43 $\pm$ 1,25	9,66 $\pm$ 0,96	28,74 (<0,001)	0,24 (0,869)	0,19 (0,905)
Piceatannol aglycon *	0,41 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,06	0,76 (0,384)	3,19 (0,025)	0,58 (0,631)
Piceatannol der **	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	27,33 (<0,001)	1,95 (0,124)	1,94 (0,125)
Iso-rhapontin aglycon **	0,73 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,10	0,64 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,09	0,00 (0,996)	0,29 (0,831)	1,43 (0,237)
Ukjent stilben 1 *	0,22 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,15	0,004 $\pm$ 0,004	0,27 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,06	4,32 (0,039)	9,70 (<0,001)	4,08 (0,008)
Ukjent stilben 2 *	0,21 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,11	0,003 $\pm$ 0,003	0,23 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,05	8,66 (0,004)	9,99 (<0,001)	5,13 (0,002)
Sum stilbener *	17,59 $\pm$ 2,51	18,01 $\pm$ 2,71	18,80 $\pm$ 3,22	17,40 $\pm$ 2,61	20,92 $\pm$ 2,85	19,60 $\pm$ 1,69	19,04 $\pm$ 1,42	20,43 $\pm$ 1,87	10,16 (0,002)	0,08 (0,970)	0,02 (0,996)
UKJENTE FENOLER											
Ukjent 1 **	0,16 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02	1,27 (0,262)	1,01 (0,387)	1,35 (0,260)
Ukjent 2 **	0,19 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02	26,29 (<0,001)	0,49 (0,687)	1,41 (0,240)
Sum ukjente fenoler **	0,35 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04	12,89 (<0,001)	0,37 (0,772)	1,06 (0,366)
SUM LAVMOLEKYLÆRE FENOLER **	20,66 $\pm$ 2,97	22,28 $\pm$ 3,15	22,57 $\pm$ 3,63	22,10 $\pm$ 3,00	28,46 $\pm$ 3,07	27,53 $\pm$ 2,15	27,43 $\pm$ 1,56	30,17 $\pm$ 2,19	25,45 (<0,001)	0,38 (0,766)	0,10 (0,973)
KONDENSERTE TANNINER											
MeOH-løselige	51,07 $\pm$ 3,68	47,51 $\pm$ 2,86	53,04 $\pm$ 4,35	55,70 $\pm$ 2,37	51,97 $\pm$ 2,31	54,23 $\pm$ 3,46	63,45 $\pm$ 2,99	67,82 $\pm$ 3,27	12,67 (<0,001)	6,25 (<0,001)	1,37 (0,252)

Jeg fant gjennomsnittlig 120 % høyere konsentrasjon av sum flavonoider i kulturforlyngelsen enn i den naturlige forlyngelsen av gran ($p < 0,001$; Tabell 4; Figur 7). Forskjellen mellom kulturforlyngelse og naturlig forlyngelse var signifikant for alle de enkelte flavonoidene, unntatt gallocatechin. Samlet konsentrasjon av flavonoider varierte mellom 2,61 og 18,35 mg g⁻¹ hos kulturforlyngnet gran, mens den for naturlig forlyngelse varierte mellom 0,33 og 12,59 mg g⁻¹. Planter med behandlingen «MJ+skade» hadde gjennomsnittlig 36 % høyere konsentrasjon av sum flavonoider enn ubehandlede kontrollplanter, og 20 % høyere enn for planter med behandlingen «MJ» ($p = 0,001$; Tabell 4; Figur 7). Dette resultatet er forårsaket av effekten på de individuelle flavonoidene (+)catechin og dihydromyricetin der. 1 hos

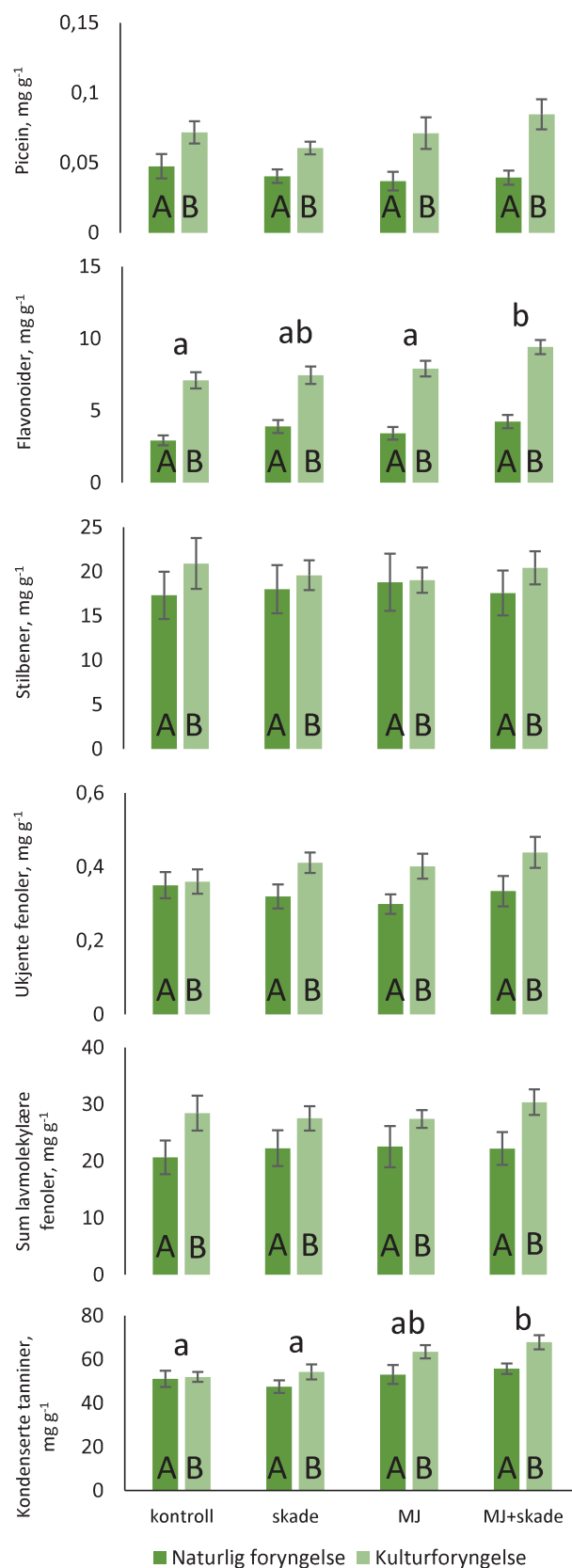
kulturforyngelsen (signifikant interaksjon behandling $\times$ plantetype for (+) catechin og dihydromyricetin der. 1).

Kulturforyngelsen hadde gjennomsnittlig 11 % høyere konsentrasjon av sum stilbener enn den naturlige foryngelsen ($p = 0,002$; Tabell 4; Figur 7). Denne forskjellen var også signifikant for alle individuelle stilbener, unntatt piceatannol glycoside, piceatannol aglycon og iso-rhapontin aglycon. Konsentrasjon av sum stilbener hos kulturforynget gran varierte mellom 4,47 og 68,31 mg g⁻¹, mens konsentrasjonen i den naturlige foryngelsen varierte mellom 2,76 og 57,61 mg g⁻¹. Jeg fant en effekt av behandling for piceatannol aglycon og to ukjente stilbener (ukjent stilben 1 og 2), men ikke for sum stilbener. Det var gjennomsnittlig 34 % høyere konsentrasjon av piceatannol aglycon i planter med behandling «MJ+skade» sammenlignet med kontrollen ($p = 0,025$; Tabell 4).

Samlet konsentrasjon av lavmolekylære fenoler var gjennomsnittlig 30 % høyere hos kulturforyngelsen enn hos den naturlige foryngelsen ($p < 0,001$; Tabell 4; Figur 7).

Konsentrasjonen av lavmolekylære fenoler samlet varierte mellom 9,04 og 74,54 mg g⁻¹ for kulturforynget gran, og for naturlig foryngelse varierte den mellom 3,19 og 70,63 mg g⁻¹. Jeg fant ingen effekt av behandling for konsentrasjonen av lavmolekylære fenoler samlet (Tabell 4).

Kulturforyngelsen hadde gjennomsnittlig 15 % høyere konsentrasjon av kondenserte tanniner enn den naturlige foryngelsen ($p < 0,001$; Tabell 4; Figur 7). Konsentrasjonen av kondenserte tanniner varierte fra 16,33 til 102,86 mg g⁻¹ for kulturforynget gran, men for naturlig forynget gran varierte konsentrasjonen av kondenserte tanniner fra 6,30 til 115,94 mg g⁻¹. Planter med behandling «MJ+skade» hadde henholdsvis gjennomsnittlig 21 og 20 % høyere konsentrasjon av kondenserte tanniner enn planter som fikk behandlingene «skade» og «kontroll» ($p < 0,001$; Tabell 4; Figur 7).



Figur 7. Gjennomsnittlig konsentrasjon (mg g^{-1}) av picein, flavonoider, stilbener, ukjente fenoler, sum lavmolekylære fenoler og kondenserte tanniner i bark på gran (*Picea abies*). Fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Behandling (kontroll, skade, MJ (metyljasmonat) og MJ+skade). Ulike store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen, og ulike små bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA og Estimated Marginal Means ved $p < 0,05$). $n = 200$.

3.5 Fenolkonsentrasjon og snutebilleangrep

Jeg fant ingen effekt av snutebilleangrep på sum flavonoider ($p = 0,829$; Tabell 5).

Konsentrasjonen av dihydromyricetin der. 2 og monocoumaryl astragallin var høyest for ikke-angrepne planter hos kulturforyngelsen, mens det var motsatt for den naturlige foryngelsen (signifikant interaksjon angrepet $\times$ plantetype for dihydromyricetin der. 2 og monocoumaryl astragallin) ($p = 0,046$, $p = 0,002$; Tabell 5). Jeg fant ingen effekt av snutebilleangrep på sum stilbener ($p = 0,278$; Tabell 5), unntatt piceatannol der og ukjent stilben 1 og 2.

Snutebilleangrepne planter hadde henholdsvis 50, 94 og 93 % høyere gjennomsnittlig konsentrasjon av piceatannol der og ukjent stilben 1 og 2 enn de ikke-angrepne plantene ($p = 0,002$, $p = 0,001$, $p = 0,004$; Tabell 5). Jeg fant ingen forskjell i konsentrasjonen av summen av lavmolekylære fenoler eller kondenserte tanniner mellom planter angrepet og ikke-angrepet av snutebiller ($p = 0,355$ og $0,881$; Tabell 5).

Tabell 5. Gjennomsnittlig konsentrasjon i mg g⁻¹ ($\pm$ SE) og toveis ANOVA på fenoler i bark av gran (*Picea abies*), fordelt på Plantetype (naturlig foryngelse og kulturforyngelse) og Angrepet (plante angrepet av snutebille (0/1)). Signifikante forskjeller mellom Plantetype og Angrepet ved $p < 0,05$ er uthevet. * log-transformert, ** sqrt-transformert. $n = 200$.

	Naturlig foryngelse		Kulturforyngelse		Plantetype (T)	Angrepet (A)	T $\times$ A
	Ikke angrepet	Angrepet	Ikke angrepet	Angrepet	F 1,192 (P)	F 1,192 (P)	F 1,192 (P)
ACETOFENONER							
Picein *	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,01	31,23 (<0,001)	1,43 (0,234)	1,82 (0,180)
FLAVONOIDER							
Galocatechin **	1,37 $\pm$ 0,12	1,35 $\pm$ 0,27	1,22 $\pm$ 0,11	1,23 $\pm$ 0,24	0,68 (0,410)	0,00 (0,993)	0,09 (0,770)
(+) Catechin **	1,86 $\pm$ 0,14	1,81 $\pm$ 0,32	3,25 $\pm$ 0,29	3,55 $\pm$ 0,43	22,45 (<0,001)	0,60 (0,441)	1,01 (0,316)
Dihydromyricetin der. 1 **	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	19,12 (<0,001)	0,24 (0,623)	0,97 (0,327)
Dihydromyricetin der. 2 *	0,11 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	43,24 (<0,001)	2,08 (0,151)	4,02 (0,046)
Quercetin glycoside **	0,22 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,08	47,21 (<0,001)	0,02 (0,889)	0,11 (0,743)
Monocoumaryl astragallin **	0,01 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	336,38 (<0,001)	0,02 (0,899)	9,83 (0,002)
Dicoumaryl astragallin **	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	2,47 $\pm$ 0,20	2,34 $\pm$ 0,31	538,46 (<0,001)	0,04 (0,851)	0,53 (0,467)
Sum flavonoider **	3,62 $\pm$ 0,23	3,66 $\pm$ 0,51	7,91 $\pm$ 0,31	8,08 $\pm$ 0,51	139,88 (<0,001)	0,05 (0,829)	0,11 (0,707)
STILBENER							
Piceatannol glycoside *	7,13 $\pm$ 0,58	7,02 $\pm$ 1,32	6,75 $\pm$ 0,37	6,86 $\pm$ 0,79	0,51 (0,475)	0,25 (0,618)	0,09 (0,760)
Resveratrol glycoside *	0,92 $\pm$ 0,11	0,92 $\pm$ 0,21	1,21 $\pm$ 0,11	1,27 $\pm$ 0,17	14,10 (<0,001)	1,11 (0,292)	0,45 (0,501)
Iso-rhapontin glycoside *	8,02 $\pm$ 0,92	8,58 $\pm$ 1,83	10,56 $\pm$ 0,81	10,19 $\pm$ 1,02	21,64 (<0,001)	2,10 (0,149)	0,02 (0,902)
Piceatannol aglycon *	0,48 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,06	0,50 (0,480)	1,33 (0,251)	0,08 (0,783)
Piceatannol der **	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	21,27 (<0,001)	10,36 (0,002)	0,23 (0,631)
Iso-rhapontin aglycon **	0,74 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,09	0,07 (0,799)	0,02 (0,885)	0,34 (0,560)
Ukjent stilben 1 *	0,22 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,14	0,11 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,07	3,71 (0,056)	10,96 (0,001)	0,01 (0,918)
Ukjent stilben 2 *	0,21 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,14	0,09 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,05	7,22 (0,008)	8,39 (0,004)	0,02 (0,888)
Sum stilbener *	17,78 $\pm$ 1,52	18,57 $\pm$ 3,30	20,03 $\pm$ 1,20	19,92 $\pm$ 1,84	7,10 (0,008)	1,18 (0,278)	0,01 (0,926)
UKJENTE FENOLER							
Ukjent 1 **	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02	0,90 (0,343)	0,17 (0,682)	0,00 (0,976)
Ukjent 2 **	0,16 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	21,13 (<0,001)	1,36 (0,246)	0,24 (0,626)
Sum ukjente fenoler **	0,32 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,03	8,94 (0,003)	0,38 (0,541)	0,08 (0,774)
SUM LAVMOLEKYLÆRE FENOLER **	21,76 $\pm$ 1,72	22,61 $\pm$ 3,81	28,43 $\pm$ 1,37	28,48 $\pm$ 2,16	18,17 (<0,001)	0,86 (0,355)	0,03 (0,873)
KONDENSERTE TANNINER							
MeOH-løselige	51,55 $\pm$ 1,79	52,96 $\pm$ 4,69	59,70 $\pm$ 1,95	58,51 $\pm$ 3,05	9,65 (0,002)	0,02 (0,881)	0,12 (0,734)

4 Diskusjon

Hovedutfordringen på foryngelsesfelt er snutebilleskader, og plantenes naturlige forsvar kan bidra til å øke plantenes motstandsdyktighet mot skadegjørere (Christiansen et al., 1999). I denne studien har jeg sett på konsentrasjoner av kjemiske forsvarsstoffer i gruppen fenoler hos naturlig foryngelse og kulturforyngelse av gran, i tillegg til snutebilleskade på de to plantetyperne. Jeg forventet å finne høyest forsvar i naturlig foryngelse fordi disse plantene har hatt lavere næringstilgang og sannsynligvis har blitt utsatt for mer stress enn det kulturforyngelsen har blitt. I dette forsøket hadde imidlertid kulturforyngelsen høyere konsentrasjoner av fenoler i barken enn den naturlige foryngelsen, noe som ikke var i samsvar med min hypotese. Dette gjaldt både lavmolekylære fenoler og kondenserte tanniner, og de aller fleste individuelle forbindelser. Resultatet vedrørende fenoler i denne studien var dermed heller ikke i tråd med de fleste tidligere studier på bartrær og næringstilgang, siden man som regel har funnet at høy næringstilgang hos planter fører til økt vekst og lavere investering i kjemisk forsvar (Bryant et al., 1983; Coley et al., 1985; Holopainen et al., 1995).

En forklaring på den høye konsentrasjonen av fenoler i kulturforyngelsen kan være at kulturforyngelsen har reagert på stress i nytt miljø ved å danne forsvarsstoffer. En overgang for kulturplanter fra planteskoler til plantefelt vil sannsynligvis bety redusert næringstilgang, endrede fuktighetsforhold og lysforhold, og skader fra insekter og skadegjørere. Det vil blant annet ta tid før røttene har etablert seg i det nye miljøet og kan ta opp vann og næring. I tidligere studier om bartrær har man funnet at stress som mekanisk skade og inokulering av sopp har ført til økt konsentrasjon av fenoler (Klepzig et al., 1995; Lieutier et al., 2003). Turtola et al. (2003) viste at tørkestress reduserte veksten og økte konsentrasjonen av terpenener hos små granplanter to år etter tørke. Entry et al. (1991) viste at planter fikk lavere konsentrasjon av fenoler ved redusert lys- og næringstilgang. Det er mulig at kulturforyngelsen ble påvirket av stress før eller etter utplanting, og at dette er grunnen til at kulturforyngelsen har høyere innhold av fenoler enn den naturlige foryngelsen. Vi kan imidlertid ikke si noe sikkert om dette, da vi ikke har analyser av fenolinnhold fra utplantingstidspunktet. I tillegg kunne det vært interessant å undersøke fenolkonsentrasjonen hos kulturforyngelse og naturlig foryngelse etter to sesonger for å se om forskjellene har blitt utlignet ettersom kulturplantene har tilpasset seg nytt voksested.

Kulturforyngelsen hadde større andel snutebilleangrepne planter enn den naturlige foryngelsen, men denne forskjellen var ikke signifikant. Graden av skade var imidlertid

signifikant større hos kulturforyngelsen enn hos den naturlige foryngelsen. Min forventning om at kulturforyngelsen ble mest angrepet av snutebiller ble derfor kun delvis bekreftet. Jeg har kun funnet undersøkelser som har sett på snutebilleangrep på kulturforyngelse av gran, ikke på naturlig foryngelse (Tudoran et al., 2016; Zas et al., 2017; Örlander & Nilsson, 1999). Hannerz et al. (2002) fant imidlertid at i valget mellom vanlig kulturforyngelse og stiklinger fra en frøplantasje så ble kulturforyngelsen i større grad angrepet av gransnutebiller. Planter med høy næringsstatus ved utplanting var mer ettertraktet av planteetere (elg (*Alces alces*), rådyr (*Capreolus capreolus*), klatremus (*Clethrionomys glareolus*) eller hare (*Lepus timidus*)) enn planter med lav næringsstatus (Løken, 2016), og kan sammenlignes med henholdsvis kulturforyngelse og naturlig foryngelse. Ved kartlegging av beitepreferanser for klatremus (*Microtus agrestis*) på granplantefelt, fant Virjamo et al. (2013) at de helst beitet på kulturforyngelse i stedet for naturlig foryngelse av gran. I deres studie ble beitepreferanser koblet opp mot kjemisk innhold i plantene, og forfatterne mente at kulturforyngelsen prefereres på grunn av høyt nitrogeninnhold og lavt innhold av stilbener. I min studie fant jeg imidlertid høyere konsentrasjon av stilbener i kulturforyngelsen sammenlignet med den naturlige foryngelsen, med unntak av tre enkeltstilbener (piceatannol glycoside, piceatannol aglycon og iso-rhapontin aglycon). Det er også mulig at andre forsvarsstoffer, for eksempel terpen, er viktigere enn fenoler for forsvar mot gransnutebiller. Etter hvert som plantene vokser, øker høyden og stammediameteren, og barken blir hardere. Jeg fant større høyde og rothalsdiameter ved utplanting hos den naturlige foryngelsen sammenlignet med kulturforyngelsen. Det er vist at økende rothalsdiameter reduserer risiko for avgang på grunn av snutebiller (Thorsén et al., 2001). Vi kan derfor anta kulturforyngelsen er mer attraktiv for snutebilleangrep, eller at naturlig foryngelse har et bedre forsvar mot skadegjørere som snutebiller. I etterpåklokskapens lys hadde det kanskje vært bedre å velge kraftig toårig kulturforyngelse (M60-granplanter) til dette forsøket fordi disse plantene da hadde hatt mer lik størrelse sammenlignet med den naturlige foryngelsen som er forventet å finne på relativt nye hogstflater.

I motsetning til hva jeg forventet, ga behandling med MJ ingen utslag på konsentrasjon av noen av fenolgruppene som helhet, og var ikke i samsvar med min hypotese om økt kjemisk forsvar ved MJ-behandling. De to flavonoidene (+)catechin og dihydromyricetin der. 1 økte imidlertid sammenlignet med skadebehandlingen og kontrollen hos kulturforyngelsen. Behandling med MJ ga også redusert relativ høydetilvekst på kulturforyngelsen sammenlignet med kontrollen og den kombinerte skade- og MJ-behandlingen. Dette bekreftet min hypotese

om redusert tilvekst ved MJ-behandling. Seldal et al. (2017) fant redusert vekst og økt forsvarsrespons hos blåbær (*Vaccinium myrtillus*) ved spraying av 5 og 10 mM MJ. De målte vegetativ vekst og insektbeiting, men undersøkte ikke innhold av forsvarsstoffer. Heijari et al. (2005) fant også redusert vekst hos toårige MJ-behandlede furuplanter (*Pinus sylvestris*). Andre studier har vist at påføring av MJ fører til økt konsentrasjon av harpiks (Heijari et al., 2005) og økt konsentrasjon av terpenier (Erbilgin et al., 2006). Moreira et al. (2009) fant økt konsentrasjon av fenoler i nåler hos strandfuru (*Pinus pinaster*) ved 5 mM MJ, men de fant også en lavere konsentrasjon av fenoler igjen ved 100 mM MJ, noe som viste seg visuelt som stress i form av klorose og døde nåler. Lavere konsentrasjon av fenoler ved høye MJ-konsentrasjoner har også blitt vist i andre studier (Gould et al., 2009; Heijari et al., 2005).

Skadebehandlingen ga heller ingen effekt på konsentrasjon av fenoler for noen av fenolgruppene totalt, eller for enkeltstoffer, og var ikke i samsvar med min hypotese om økt kjemisk forsvar ved skadebehandling. Lieutier et al. (2003) viste økt konsentrasjon av catechin ved inokulering av sopp ved såring, mens stilbener ikke varierte. Tidligere er det funnet høyere konsentrasjon av fenoler ved å skade bark av furu (Klepzig et al., 1995). Christiansen et al. (1999) fant økt motstandsdyktighet mot blåvedsopp (*Ceratocystis polonica*) ved å skade barken på trærne. Skadet og sårinokulert bark inneholdt høyere konsentrasjon av fenoler enn i intakt bark hos furutrær (Klepzig et al., 1995). Skadebehandlingen ga økt relativ diameter-tilvekst sammenlignet med MJ-behandling og kontrollen, og var dermed ikke i samsvar med min hypotese om redusert diameter-tilvekst ved skadebehandling. Man skulle heller tro at planter begrenset planteveksten etter skadebehandling fordi plantene prioriterer ressurser til produksjon av forsvarsstoffer i stedet for vekst og utvikling. Skading av bark har ført til utvikling av sårvev (hard bark) rundt skadeområdet, og svelling av polyfenoliske parenkymatiske celler og akkumulering av fenoler en cm fra skadeområdet (Hudgins et al., 2003). Det er også funnet økt produksjon av harpikskanaler i skadebehandlet bark hos furu (Klepzig et al., 1995; Nagy et al., 2006). Det kan derfor tenkes at svulmet bark kan være en grunn til økt diameter ved skadebehandling.

Den kombinerte behandlingen «MJ+skade» ga økt konsentrasjon av fenolgruppene flavonoider og kondenserte tanniner i forhold til kontrollen, og bekrefter dermed min hypotese om økning av kjemisk forsvar som en effekt av behandlinger for de to fenolgruppene. Påføring av MJ og skade alene ga utslag på enkeltstoffer og i ulike retninger, men ingen signifikante utslag for hele kjemiske grupper. Ved å kombinere disse behandlingene har plantene antakelig blitt stresset nok til å produsere mer flavonoider og

kondenserte tanniner: man fikk en såkalt additiv effekt. Christiansen et al. (1999) fant også størst motstandsdyktighet mot blåvedsopp ved å kombinere barkskading, soppinokulering og steril inokulering. Seldal et al. (2017) fant derimot ingen økt forsvarsrespons ved å kombinere skading og spraying med 5 og 10 mM MJ på blåbær (*Vaccinium myrtillus*), men de målte ikke innhold av forsvarstoffer. Både mine resultater og tidligere studier tyder med andre ord på at MJ-behandling kan forsterke den induserende effekten av skader. Lieutier et al. (2003) fant at graden av motstand mot masseinokulering av sopp tilknyttet barkbiller kan predikeres basert på diversiteten av fenoler i det stående forsvaret i innerbarken og evnen til å indusere fenoler etter skading. Det var også færre snutebilleangrepne planter med behandlingen «MJ+skade» enn blant de ubehandlede kontrollplantene. Disse resultatene støttes av tidligere studier som har funnet at MJ-behandling ga en økt forsvarsrespons ved redusert beiting fra insekter (Heijari et al., 2005; Sampedro et al., 2011; Seldal et al., 2017). Hypotesen om at beiteskade fra snutebiller induserte høyere konsentrasjon av fenoler i snutebilleskadde planter ble bekreftet for tre stilbener, men ikke for de andre fenolene. Beiting fra gransnutebilla ga dobbelt så høy harpikskonsentrasjon i beitede plantedeler sammenlignet med utilgjengelige deler av stammen hos strandfuru (Sampedro et al., 2011), men i denne studien så de ikke på forskjeller mellom angrepne og ikke-angrepne planter.

Vedlikehold av stående og induserbart forsvar over tid krever at plantene har tilgang på ressurser som karbon og nitrogen (Franceschi et al., 2005). Jeg undersøkte innholdet av karbon, nitrogen og C:N i barken, for eventuelt å kunne underbygge min forventning om at plantenes næringstilgang kan være avgjørende for fenolkonsentrasjon og gransnutebilleangrep. Jeg fant imidlertid ingen forskjeller i N-konsentrasjon i barken mellom kulturforyngelse og naturlig foryngelse av gran i denne studien, og hypotesen min støttes dermed ikke. Virjamo et al. (2013) fant at klatremus, som spiser knopper og skudd, prefererer kulturplanter overfor naturlig foryngelse av gran, og koblet dette resultatet til at skadegjørere prefererer planter med høyt nitrogeninnhold. Løken (2016) fant ingen forskjeller i N-konsentrasjon i nåler og kvist etter endt vekstsesong hos planter som hadde høy og lav næringsstatus ved utplanting. Han begrunnet dette med at god næringstilgang (G17) hadde utjevnet denne forskjellen i N-konsentrasjon. God næringstilgang ved høy bonitet (G20) kan i så fall forklare den «manglende» forskjellen i N-konsentrasjon i bark mellom kulturforyngelse og naturlig foryngelse i min studie. Planter lagrer mye av sin næring i nålene, så det kan tenkes at det er en større forskjell i C- og N-innhold i nålene enn i barken på kulturforyngelse og naturlig foryngelse.

Det var imidlertid høyere konsentrasjon av C i den naturlige foryngelsen enn i kulturforyngelsen. Den naturlige foryngelsen er sannsynligvis eldre og har hardere bark enn kulturforyngelsen, og dette kan være et resultat av saktere vekst og dermed større densitet i stamme og bark. Jeg fant også høyere konsentrasjon av C i barken ved behandlingen «MJ+skade», men dette har jeg ikke en god forklaring på. Tomatplanter som fikk påført MJ på bladene reagerte ved å relokere karbon og nitrogen fra blader til andre plantedeler som røtter, for å forhindre at store deler av næringsstoffene blir tapt til planteetere (Gómez et al., 2010). Det kan derfor tenkes at granplantene som har fått behandlingen «MJ+skade» har endret allokeringen av karbon og nitrogen fra lett tilgjengelige til mindre tilgjengelige plantedeler nærmere røttene.

5 Konklusjon

Bark på kulturforyngelse av gran hadde høyere konsentrasjon av fenoler (acetofenoner, flavonoider, stilbener og kondenserte tanniner) sammenlignet med naturlig foryngelse etter en vekstsesong på relativt ferske hogstflater. En forklaring kan være at stress i omgivelsene gjør at disse plantene investerer mer i sitt kjemiske forsvar. Selv om jeg fant høyest fenolinnhold hos kulturforyngelsen, hadde disse plantene høyest grad av snutebilleskade. Større diameter og hardere bark på den naturlige foryngelsen kan være med på å forklare hvorfor kulturforyngelsen er mer attraktiv for snutebiller. Startmålinger ved utplanting og målinger av fenolkonsentrasjon i barken på kulturforyngelse og naturlig foryngelse etter to sesonger kan gi flere svar på om stress påvirker fenolkonsentrasjonen i kulturforyngelse.

Jeg fant økte konsentrasjoner av flavonoider og kondenserte tanniner ved den kombinerte behandlingen «MJ+skade», som indikerer at det kjemiske forsvaret ble induisert ved MJ-behandling sammen med skadebehandling. MJ-behandlingen og skadebehandling hver for seg ga imidlertid ingen effekter på konsentrasjon av fenolgruppene. Jeg fant heller ingen effekt på konsentrasjon av fenoler hos snutebilleskadde planter, bort sett fra for tre stilbener. Relativ høydevekst hos kulturforyngelsen ble redusert ved MJ-behandling. Skadebehandling, derimot, ga økt relativ diametertilvekst hos kulturforyngelsen og den naturlige foryngelsen.

Dette er en av få studier som sammenligner kulturforyngelse og naturlig foryngelse av gran, og resultatene i denne studien kan bidra til å øke kunnskapen rundt plantenes eget kjemiske forsvar, særlig for naturlig foryngelse, og være med på å finne naturlige alternative løsninger til insekticider for å øke kulturplantenes overlevelse. Videre kan det være interessant å undersøke hvilke egenskaper hos naturlig foryngelse som gir god etablering og overlevelse i skogen, og om det er mulig å overføre noen av disse egenskapene til kulturforyngelse.

6 Litteraturliste

- Bennett, R. N. & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *New Phytologist*, 127 (4): 617-633. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S. & Klein, D. R. (1983). Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos*, 40 (3): 357-368. doi: 10.2307/3544308.
- Christiansen, E., Krokene, P., Berryman, A. A., Franceschi, V. R., Krekling, T., Lieutier, F., Lonneborg, A. & Solheim, H. (1999). Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. *Tree Physiology*, 19 (6): 399-403.
- Coley, P. D., Bryant, J. P. & Chapin, F. S. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230 (4728): 895-899. doi: 10.1126/science.230.4728.895.
- Entry, J. A., Cromack, K., Hansen, E. & Waring, R. (1991). Response of western coniferous seedlings to infection by *Armillaria ostyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology*, 81 (1): 89-94. doi: 10.1094/Phyto-81-89.
- Erbilgin, N., Krokene, P., Christiansen, E., Zeneli, G. & Gershenson, J. (2006). Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus*. *Oecologia*, 148 (3): 426-436. doi: 10.1007/s00442-006-0394-3.
- Eriksson, S., Wallertz, K. & Karlsson, A.-B. (2018). *Test av mekaniska plantskydd mot snytbaggas i omarkberedd och markberedd mark, anlagt våren 2015*. Rapport (Sveriges lantbruksuniversitet, Enheten för skoglig fältforskning) (12190053).
- Fløistad, I. S., Eldhuset, T. D. & Kvalbein, A. (2018). *Gjødsling i skogplanteskoler*. Faktaark om dyrking av skogplanter Nr. 2 - 2018: NIBIO.
- 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. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x.
- Gómez, S., Ferrieri, R. A., Schueller, M. & Orians, C. M. (2010). Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. *New Phytologist*, 188 (3): 835-844. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03414.x.
- Gould, N., Reglinski, T., Northcott, G. L., Spiers, M. & Taylor, J. T. (2009). Physiological and biochemical responses in *Pinus radiata* seedlings associated with methyl jasmonate-induced resistance to *Diplodia pinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74 (2): 121-128. doi: 10.1016/j.pmp.2009.10.002.
- Granhus, A. & Eriksen, R. (2017). *Resultatkontroll skogbruk/miljø. Rapport 2016. I*: NIBIO (red.).
- Grossnickle, S. C. (2012). Why seedlings survive: influence of plant attributes. *New Forests*, 43 (5-6): 711-738. doi: 10.1007/s11056-012-9336-6.
- Hannerz, M., Thorsén, Å., Mattsson, S. & Weslien, J. (2002). Pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to cuttings and seedlings of Norway spruce. *Forest Ecology and Management*, 160 (1): 11-17. doi: 10.1016/S0378-1127(01)00467-4.
- 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. doi: 10.1111/j.1570-7458.2005.00263.x.
- Hjelm, K., Langvall, O., Bergh, J. & Langvall, K. (2012). Optimization of Environmental Factors Affecting Initial Growth of Norway Spruce Seedlings. *Silva Fennica*, 46. doi: 10.14214/sf.64.

- Holopainen, J. K., Rikala, R., Kainulainen, P. & Oksanen, J. (1995). Resource partitioning to growth, storage and defence in nitrogen fertilized Scots pine and susceptibility of the seedlings to the tarnished plant bug *Lygus rugulipennis*. *New Phytologist*, 131 (4): 521-532. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03088.x.
- Hudgins, J. W., Christiansen, E. & Franceschi, V. R. (2003). Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the *Pinaceae*. *Tree Physiology*, 23 (6): 361-371. doi: 10.1093/treephys/23.6.361.
- Jansson, G., Hansen, J. K., Haapanen, M., Kvaalen, H. & Steffenrem, A. (2017). The genetic and economic gains from forest tree breeding programmes in Scandinavia and Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 32 (4): 273-286. doi: 10.1080/02827581.2016.1242770.
- Klepzig, K. D., Kruger, E. L., Smalley, E. B. & Raffa, K. F. (1995). Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. *Journal of Chemical Ecology*, 21 (5): 601-626. doi: 10.1007/bf02033704.
- Lieutier, F., Brignolas, F., Sauvard, D., Yart, A., Galet, C., Brunet, M. & van de Syde, H. (2003). Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 23 (4): 247-256. doi: 10.1093/treephys/23.4.247.
- Lopez-Goldar, X., Sampedro, L. & Zas, R. (2016). Carbon starvation by light deprivation does not constrain the ability of young pines to produce induced chemical defences in response to a bark-chewing herbivore. *Environmental and Experimental Botany*, 130: 141-150. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.05.010.
- Løken, S. (2016). *Effekt av markberedning, næringsstatus og kortdagsbehandling ved planting av gran (Picea abies)*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Långström, B. & Day, K. R. (2004). Damage, Control and Management of Weevil Pests, Especially *Hylobius Abietis*. I: Lieutier, F., Day, K. R., Battisti, A., Grégoire, J.-C. & Evans, H. F. (red.) *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, s. 415-444. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Mageroy, M. H., Christiansen, E., Långström, B., Borg-Karlson, A.-K., Solheim, H., Björklund, N., Zhao, T., Schmidt, A., Fossdal, C. G. & Krokene, P. (2020). Priming of inducible defenses protects Norway spruce against tree-killing bark beetles. *Plant, Cell & Environment*, 43 (2): 420-430. doi: 10.1111/pce.13661.
- Mattilsynet. (2018). *Hvordan vil EUs forbud mot utendørs bruk av neonikotinoider påvirke bruk i Norge?* Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/planter_og_dyrking/plantevernmidler/godkjenning_av_plantevernmidler/hvordan_vil_eus_forbud_mot_utendørs_bruk_av_neonikotinoider_paa_virke_bruk_i_norge.31267 (lest 07.05.2020).
- Metsamuuronen, S. & Siren, H. (2019). Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews*, 18 (3): 623-664. doi: 10.1007/s11101-019-09630-2.
- 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. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.05.015.
- Moreira, X., Zas, R. & Sampedro, L. (2012). Methyl Jasmonate as Chemical Elicitor of Induced Responses and Anti-Herbivory Resistance in Young Conifer Trees. I: Mérillon, J. M. & Ramawat, K. G. (red.) *Plant Defence: Biological Control*, s. 345-362. Dordrecht: Springer Netherlands.

- Nagy, N. E., Krokene, P. & Solheim, H. (2006). Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiology*, 26 (2): 159-167. doi: 10.1093/treephys/26.2.159.
- Nordlander, G., Nordenhem, H. & Hellqvist, C. (2009). A flexible sand coating (Conniflex) for the protection of conifer seedlings against damage by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 11 (1): 91-100. doi: 10.1111/j.1461-9563.2008.00413.x.
- Norges vassdrags- og energidirektorat. (2020).
- Nybakken, L., Hörkkä, R. & Julkunen-Tiitto, R. (2012). Combined enhancements of temperature and UVB influence growth and phenolics in clones of the sexually dimorphic *Salix myrsinifolia*. *Physiologia Plantarum*, 145 (4): 551-564. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01565.x.
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28 (1): 489-521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.
- Royle, D. (1975). *Structural features of resistance to plant diseases*. Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships: Proceedings of the Phytochemical Society Symposium University of Hull, England April.
- 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. doi: 10.1007/s11258-010-9830-x.
- Seldal, T., Hegland, S. J., Rydgren, K., Rodriguez-Saona, C. & Töpper, J. P. (2017). How to induce defense responses in wild plant populations? Using bilberry (*Vaccinium myrtillus*) as example. *Ecology and Evolution*, 7 (6): 1762-1769. doi: 10.1002/ece3.2687.
- Skogbrukslova. (2006). *Lov om skogbruk av 27. mai 2005 nr. 31*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2005-05-27-31> (lest 20.03.2020).
- Statistisk sentralbyrå. (2019). *Skogkultur 9. april 2020*. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/skogkultur> (lest 09.04.2020).
- Stiftelsen Det norske Skogfrøverk. (2018). *Frøplantasje nr. 1114 Sanderud I*.
- Stiftelsen Det norske Skogfrøverk. (2020). *Leverte planter fra norske skogplanteskoler i perioden 1994-2019*.
- Thorsén, Å., Mattsson, S. & Weslien, J. (2001). Influence of Stem Diameter on the Survival and Growth of Containerized Norway Spruce Seedlings Attacked by Pine Weevils (*Hylobius spp.*). *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16 (1): 54-66. doi: 10.1080/028275801300004415.
- Tudoran, M.-M., Marquer, L. & Jönsson, A. M. (2016). Historical experience (1850–1950 and 1961–2014) of insect species responsible for forest damage in Sweden: Influence of climate and land management changes. *Forest Ecology and Management*, 381: 347-359. doi: 10.1016/j.foreco.2016.09.044.
- Turtola, S., Manninen, A. M., Rikala, R. & Kainulainen, P. (2003). Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 29 (9): 1981-1995. doi: 10.1023/a:1025674116183.
- Virjamo, V., Julkunen-Tiitto, R., Henttonen, H., Hiltunen, E., Karjalainen, R., Korhonen, J. & Huitu, O. (2013). Differences in Vole Preference, Secondary Chemistry and Nutrient Levels Between Naturally Regenerated and Planted Norway Spruce Seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 39 (10): 1322-1334. doi: 10.1007/s10886-013-0352-6.
- Wallertz, K., Holt Hanssen, K., Hjelm, K. & Sundheim Fløistad, I. (2016). Effects of planting time on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to Norway spruce seedlings.

- Scandinavian Journal of Forest Research*, 31 (3): 262-270. doi: 10.1080/02827581.2015.1125523.
- Zas, R., Bjorklund, N., Sampedro, L., Hellqvist, C., Karlsson, B., Jansson, S. & Nordlander, G. (2017). Genetic variation in resistance of Norway spruce seedlings to damage by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Tree Genetics & Genomes*, 13 (5): 12. doi: 10.1007/s11295-017-1193-1.
- Örlander, G. & Nilsson, U. (1999). Effect of Reforestation Methods on Pine Weevil (*Hylobius abietis*) Damage and Seedling Survival. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 14 (4): 341-354. doi: 10.1080/02827589950152665.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway