



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for Miljøvitenskap og naturforvaltning

Stående og induserbart terpenforsvar hos natur- og kulturforyngelse av gran (*Picea abies*)

Standing and inducible terpenoid defense in
natural- and cultural rejuvenation of Norway spruce
(*Picea abies*)

Solveig Strålberg

Naturforvaltning

Forord

Med denne masteroppgaven avsluttes min studietid på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås. Det har vært fem hyggelige og lærerike år. Tre år med bachelor i økologi og naturforvaltning, og to år med master i naturforvaltning. Masteroppgaven er gjennomført i samarbeid med Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO), og med økonomisk støtte fra UMBs forskningfond gjennom UNIFOR, NIBIO og NMBU. Det har vært veldig interessant og lærerikt å være med å utføre et forskningsprosjekt fra start til slutt, med planlegging, praktisk utførelse av feltarbeid, laboratoriearbeid, terpenmålinger med GC-MS-maskin, databearbeiding, statistiske analyser og skriveprosess.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder professor Line Nybakken (NMBU) for inspirasjonen til valgt oppgave, for god tilrettelegging, oppfølging og veiledning, samt til hjelp med feltarbeidet. Stor takk også til Maren Lomsdal som var min samarbeidspartner i feltarbeidet. Hun stilte til disposisjon med skogeiendommen hvor feltarbeidet ble utført, transport og fri kost og losji. Maren tok seg også av den store innsamlings- og registreringsjobben av granplantene etter endt feltsesong. Takk for hyggelige og produktive dager ute i felt!

Takk til forsker Inger Sundheim Fløistad (NIBIO) og forsker Paal Krokene (NIBIO), som var med å planlegge feltarbeidet. Inger var også med på oppstarten av feltarbeidet, og hjalp til med gjennomlesing av oppgaven.

Jeg vil også rette en stor takk til min biveileder forsker Melissa Magerøy (NIBIO) for god starthjelp og opplæring i laboratoriearbeidet, samt god hjelp og oppfølging med oppgaven. Det opplevdes trivelig og trygt å jobbe på laben. Takk til Hans Ragnar Norli (NIBIO) for god hjelp med terpentesting i GC-MS og databehandling. Takk til min biveileder forsker Johan Asplund (NMBU) som hjalp meg med de statistiske analysene i R, og som alltid var rask til å hjelpe meg når jeg trengte statistikkrelatert assistanse.

Til slutt vil jeg takke venner og familie som har vært motivatorer, og hatt tro på at jeg ville komme i mål med masteroppgaven. Spesielt til mine venner og studiekamerater Andrea Helene Stensvold og Karoline Aasen Skryten for starthjelp med EndNote og R-studio, og for trivelige skrive dager. Takk til Sercan Sarigüzel for motivasjon, støtte og tålmodighet. Sist, men ikke minst takk til min tante Birgit Løkkeberg for korrekturlesing og motiverende ord.

Sammendrag

Terpener finnes i både det stående- og det induerbare forsvaret, og er som i likhet med hos mange andre bartrær en vesentlig del av det kjemiske forsvaret til gran (*Picea abies*).

Terpener kan fungere som et avskrekkende middel, eller være direkte giftig for insekter.

Gransnutebiller (*Hylobius abietis*) er den mest alvorlige årsaken til skade på småplanter av gran i Norge, og plantenes evne til å forsvare seg i ung alder kan være avgjørende for deres overlevelse i skoglandskapet. Det er rapportert større avgang hos kulturforyngelse enn hos naturlig foryngelse hos unge granplanter som følge av snutebillegnag. I denne masteroppgaven ønsket jeg derfor å undersøke terpenforsvaret hos natur- og kulturforyngelse hos gran for å se om det er forskjell i terpenkonsentrasjonen. Bedre kunnskap om grantrær sitt naturlige forsvar kan være til hjelp for å produsere sterkere, og mer forsvarsdyktige kulturplanter mot beiting fra gransnutebiller.

Konsentrasjonen av 17 mono-, seskvi- og diterpener i barken på unge granplanter av natur- og kulturforyngelse er blitt kvantifisert etter behandling med Metyljjasmonat, og ved mekanisk skade i barken (tilsvarende skade fra snutebillegnag) for å inducere forsvaret. Terpentestingen ble utført etter at plantene hadde stått ute en vekstsesong for å sammenligne dem etter at de har vært i sitt naturlige oppvekstmiljø, og for å kunne se på skadegrad fra snutebiller. Det var gjennomgående høyere konsentrasjon av terpener i den naturlige foryngelsen enn i kulturforyngelsen for alle terpengruppene (mono-, seskvi-, og diterpener). Det var også signifikant høyere innhold av karbon i naturlig foryngelse sammenlignet med kulturforyngelsen. Ti terpentyper som ble undersøkt hadde signifikant høyest konsentrasjon av terpener i naturforyngelsen. Terpentypen 3-Carene var eneste med signifikant høyere terpenkonsentrasjon i kulturforyngelsen. Det var ingen signifikant forskjell i preferanse hos snutebillene mellom natur- og kulturforyngelsen eller mellom de ulike behandlingene. Avgangen hos planter som følge av snutebillegnag i dette forsøket var imidlertid lavt med en avgangsprosent på kun 2.56%. Resultatene indikerte at terpenforsvar prioriteres høyere i naturlig foryngelse enn i kulturforyngelse. Grunnen til dette kan være det varierende oppvekstmiljøet til naturforyngelsen, som kan utsette plantene for ulike former for stress og som dermed øker produksjonen av sekundære metabolitter i form av forsvar.

Summary

Terpenes are found in both the standing and the inducible defences, and are, as with many other conifer types, an essential part of the chemical defences of Norway spruce (*Picea abies*). Terpenes can act as a deterrent or be directly toxic for insects. Pine weevils (*Hylobius abietis*) are the most serious cause of damage to Norway spruce seedlings, and the plants' ability to defend themselves at a young age can be crucial for their survival in the forest landscape. Greater declines have been reported in cultural rejuvenation than in natural rejuvenation in young Norway spruce plants as a result of gnaw from Pine weevils. In this master thesis I therefore wanted to investigate the terpene defence in natural- and cultural seedlings of Norway spruce to see if it's a difference in terpene concentration between them. Better knowledge about natural defence in Norway spruce can help to produce stronger and more defensible cultivated plants against grazing from Pine weevil.

The concentration of 17 mono- sesqui- and diterpenes in the bark of seedlings of Norway spruce of natural- and cultural rejuvenation has been quantified after treatment with Methyl jasmonate, and by mechanical damage to the bark (simulation of gnaw from Pine weevil) to induce the defence. The terpene testing was performed after the plants had been standing out for one growth season, to compare them after being in their natural environment, and to be able to look at the degree of damage from Pine weevils. There was a generally higher concentration of terpenes in natural rejuvenation than in the cultural rejuvenation for all the terpene groups (mono- sesqui- and diterpenes). There was also a significantly higher content of carbon in natural rejuvenation compared to the cultural rejuvenation. Ten types of terpenes that were examined had significantly the highest concentration of terpenes in natural rejuvenation. The terpene type 3-Carene was the only one with significantly higher terpene concentration in the cultural rejuvenation. There was no significant difference in preference in plant type for the Pine weevil or between the different treatments. However, the mortality of plants as a result to Pine weevil gnaw in this experiment was low, with a mortality rate of only 2,6%. The results indicated that terpene defence is given higher priority in natural rejuvenation than in cultural rejuvenation. This may be due to the varying growth environment of the natural rejuvenations, which can expose the plants to various forms of stress and thereby increase the production of secondary metabolites in the form of defence.

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning.....	6
2.0 Materiale og metode.....	10
2.1. Studieområdet.....	10
2.2. Forsøksoppsett.....	11
2.3. Gjennomføring av behandlingene	13
2.4. Analyser av karbon- og nitrogenkonsentrasjoner.....	14
2.4.1. Prøvefeil	14
2.5. Terpenprøver.....	14
2.6. Statistiske analyser.....	15
3.0 Resultater.....	17
3.1. Vekst.....	17
3.2. Karbon- og nitrogenkonsentrasjoner	18
3.3. Snutebillegnag	20
3.4. Terpener.....	22
4.0 Diskusjon.....	27
5.0 Konklusjon.....	31
Referanser.....	32
Appendix.....	35
Nitrogen- og karbonanalyse.....	35
Terpener	37

1.0 Innledning

Forsvar er svært viktig for planter fordi de blir utsatt for en rekke stressfaktorer, og evnen til å forsvare seg kan være helt avgjørende for overlevelse. Bartrær har utviklet både mekaniske og kjemiske forsvarsformer for å takle herbivori og patogene angrep, som utgjør de største farene (Zulak & Bohlmann, 2010). Gransnutebiller (*Hylobius abietis*) er den mest alvorlige årsaken til skade på småplanter av gran (*Picea abies*) i Norge, og er også antatt å være den største skadegjøreren på utplantede bartreplanter i hele Skandinavia (Nilsson et al., 2010) samt i resten av Nord- og Vest-Europa (Day et al., 2007). Dette fordi gransnutebiller beiter på barken til unge granplanter, noe som fører til høy dødelighet (Örlander & Nilsson, 1999). Det er fortsatt ikke funnet noen tilstrekkelig god løsning på dette problemet, men granplantenes iboende kjemiske forsvar kan muligens bidra til å redusere skadeomfanget.

Eksempler på former for kjemisk forsvar bartrær produserer er alkaloider, fenoler og terpenener (Mattson et al., 2012). Terpenener, som er den forsvarsformen jeg skal studere nærmere i denne masteroppgaven, er hos gran som i likhet med hos mange andre bartrær en vesentlig del av det kjemiske forsvaret (Zulak & Bohlmann, 2010). Terpenener finnes i kvae, og kan fungere som et avskrekkende middel, eller være direkte giftig for insekter (Zulak & Bohlmann, 2010). De bygges opp ved sammenkobling av isoprengrupper, et molekyl med fem karbonatomer (C₅) (UiO, 2015), og grupperes etter antallet karbon- (C) og hydrogenbindinger (H). I denne oppgaven har jeg kvantifisert terpenener som tilhører gruppene monoterpenener (C₁₀ H₁₆), seskviterpenener (C₁₅ H₂₄) og diterpenener (C₂₀ H₃₂). Ved insektsangrep er diterpenener oppløst med monoterpenener i kvae en lengevarende kjemisk og fysisk barriere på det angrepne stedet. Seskviterpenener utgjør en mindre del i kvae, men har likevel en enorm strukturell diversitet som overgår den store diversiteten til mono- og diterpenene (Martin et al., 2004).

Hvor godt kjemisk forsvar planter har påvirkes av genetikk (Donaldson & Lindroth, 2007(*Populus tremuloides*)) og miljøfaktorer som temperatur, vanntilgang og næring (kilde). Vanning like etter utplantning virker positivt på plantene (Heiskanen & Rikala, 2000 i Nilsson et al., 2010). Når det kommer til næringstilgang er begrenset tilgang til nitrogen (N) som oftest den primære begrensende faktoren for vekst i boreale skoger, da det her ofte er naturlig

lavt innhold av N i jorda (Tamm, 1991; Binkley and Fisher, 2013 i Nybakken et al., 2018). Lav nitrogentilgjengelighet fører til ansamling av fotosyntater (resulterende produkt av fotosyntesen), som ifølge hypotesen om karbonnæringsbalansen (Bryant et al., 1983) og den relaterte vekstdifferensieringshypotesen (Loomis, 1932; Herms og Mattson, 1992 i Nybakken et al., 2018) står for produksjon av sekundære metabolitter. Det er godt kjent at økt nitrogeninnhold direkte forbedrer skogproduktiviteten med økt vekst (Meunier et al., 2016), og dermed øker karbonopptaket i plantene (see e.g., Gundale et al., 2014 i Nybakken et al., 2018). Dette påvirker dermed karbontilgjengeligheten for andre metabolske prosesser, som karbonbaserte sekundære metabolitter (Nybakken et al., 2018).

Gran har, som mange andre planter, to grunnleggende former for planteforsvar; stående og induserbart (Krokene, 2018). Blant bartrær er arter av granslekten de best studerte når det gjelder det genomiske grunnlaget for stående og indusert forsvar med terpener (Zulak & Bohlmann, 2010). Det stående forsvar er på plass hele tiden, og består blant annet av barken og kvaer lagret i kvaekanaler i barken og i veden (Krokene, 2018). Kvaer er en viktig del av begge formene for forsvar (Krokene, 2018). Mono- og diterpener står for flertallet av stående og induserte metabolitter i forsvar med kvaer i bartrær (Martin et al., 2004). Den kjemiske sammensetningen i kvaer er dynamisk, og kan endres med typen stress fra miljøet som treet blir utsatt for (Zulak & Bohlmann, 2010). Det induserbare forsvaret aktiveres først når treet blir angrepet (Krokene, 2018), da aktiveres resistensgener hos trærne, og det kjemiske forsvaret blir satt i gang (UiO, 2015). Biosyntese av kjemisk forsvar er en energikrevende prosess, med høy kostnad for plantene (Mattson et al., 2012). Det er derfor hensiktsmessig for plantene å ikke bruke mer energi enn nødvendig på dette.

Naturlig foryngelse vokser opp i et varierende miljø i skogen, hvor de utsettes for både biotisk og abiotisk stress under oppveksten og variasjon i næringstilgang ut ifra bonitet. De har begrenset tilgang til N, og det kan derfor forventes at de har høy produksjon av sekundære metabolitter som planteforsvar. Kulturforyngelse har derimot sitt første (eller sine to første) leveår i et beskyttet miljø på planteskolene med god næringstilgang den tiden de er der. Kulturforyngelsen trenger derfor ikke å bruke energi på forsvar i tiden de er på planteskolen, og har rask vekst. Dette kan føre til at kulturforyngelsen blir mindre rustet mot herbivori etter utplantning i skogen enn det den naturlige foryngelsen på stedet er. Utplantet kulturforyngelse

er rapportert å ha en høyere dødelighet som følge av herbivori fra snutebiller enn naturlig foryngelse med samme diameterstørrelse på stammebasen har (Hannerz et al., 2002 i Nilsson et al., 2010). En studie på effekt av snutebiller på granplanter ved ulike skogplantingsmetoder fant at kulturplanter (uten behandling mot snutebiller) på 1-2 år gamle ubehandlede hogstflater hadde en dødelighet på hele 60% (Örlander & Nilsson, 1999). Det har blitt brukt insektmidler for å prøve å forebygge snutebilleangrep, men det er blitt rettet et kritisk blikk til bruken på grunn av miljø- og helsefarene de utgjør (Nilsson et al., 2010). Insektmidler som DDT, lindane og pyrethroid har dessuten blitt forbudt på grunn av skadelige virkninger på miljøet og på granplantene. Ønske om å redusere bruken av insektmidler har ført til at det har blitt initiert forskning på alternativer (Nilsson et al., 2010).

Det er i nyere tid gjort forskning på «vaksinering» av bartrær med ytre påføring av Metyljasmonat (MeJa), som i studien til Magerøy et al. (2019). MeJa er den flyktige metylesteren i signalmolekylet jasmonsyre (Zulak & Bohlmann, 2010), og induserer forsvar ved å delta i signalveiene til planter (UiO, 2015). Det er et plantehormon som finnes naturlig i planter og er involvert i prosesser som fotosyntese, vekst og insekts- og sykdomsresistens (Creelman & Mullet, 1997 i Heijari, 2005). I gran har behandling med MeJa vist seg å indusere komplekse kjemiske og biokjemiske forsvarsresponser med terpenener (Martin et al., 2004). Ved ytre påføring på bartrær er MeJa en ikke inngripende behandling, som også har vist seg å være en god etterligning av beiting fra insekter (Martin et al. 2002, 2003 i Zulak & Bohlmann, 2010). I studien til Sampedro (2010) viste påføring av MeJa gode resultater for redusert angrep av gransnutebiller. Studien til Magerøy et al. (2019) viste at ytre påføring av MeJa hadde en klar positiv effekt i form av redusert herbivori på grantrær.

I denne masteroppgaven har jeg kvantifisert konsentrasjonen av ulike mono-, seskvi- og diterpener i barken på unge granplanter ved induserbart forsvar med behandling av MeJa, og ved å skade barken (tilsvarende skade fra snutebillegnag) av både naturlig foryngelse og utplantet kulturforyngelse av gran, for å sammenligne dem etter at de har stått ute i sitt vanlige oppvekstmiljø. I tillegg til analyser av terpenforsvaret, registrerte jeg høyde og diametertilveksten hos plantene, skadegrad som følge av gnag fra snutebiller, og konsentrasjonene av karbon og nitrogen i barken.

Jeg satte opp følgende problemstillinger med hypoteser:

- 1) Har naturlig foryngelse et høyere innhold av kjemisk forsvar i form av terpenener enn kulturplanter har?

Hypotese: Naturlig foryngelse av gran har et høyere innhold av terpenener enn kulturplanter.

- 2) Viser snutebillene en preferanse for natur- eller kulturforyngelsen?

Hypotese: Det vil være betydelig flere og større skader fra snutebiller på den utplantede kulturforyngelsen enn på den naturlige foryngelsen.

- 3) Vil skading og ytre påføring av MeJa på foryngelse av gran gi økt konsentrasjon av terpenener?

Hypotese: Både skading og påføring av MeJa vil føre til økt konsentrasjon av terpenener i plantene.

- 4) Vil skading og ytre påføring av MeJa indukere det kjemiske forsvaret i stor nok grad til at de blir mindre attraktive for snutebiller?

Hypotese: Det vil være færre skader på planter som er skadet og påført MeJa enn hos ubehandlede kontrollplanter.

2.0 Materiale og metode

2.1. Studieområdet

Feltekspperimentet ble anlagt i Hov, Søndre Land kommune i Innlandet fylke ($60^{\circ} 36' 7.246''$ N, $10^{\circ} 18' 0.393''$ S) (Figur 1). Søndre Land ligger i mellomboreal sone. Det er forholdsvis varme somre ($11,1^{\circ}\text{C}$) og kalde vintre ($-6,9^{\circ}\text{C}$) (oppgitte grader er absoluttverdier for middeltemperatur 1971-2000 på Østlandet) (Norsk klimaservicesenter). I året feltforsøket ble utført var gjennomsnittstemperaturen på $1,2^{\circ}\text{C}$ over normalen (Norsk klimaservicesenter). Nedbørsmengden dette året var omtrent 106 mm i juni, og 0 mm for de resterende månedene feltekspperimentet varte (NIBIO).



Figur 1: Studieområdet ble anlagt i Hov, Søndre land. Der feltarbeidet ble anlagt er markert med «1-tall» (kart hentet fra 1881.no).

Skogtypen i området er produktiv barskog av furu (*Pinus sylvestris*) og gran. Forsøket ble anlagt på to år gamle hogstflater hvor det var utført flatehogst i 2017, med G20 bonitet ifølge skogbruksplanen.

2.2. Forsøksoppsett

Denne studien tok utgangspunkt i 400 individer av gran. Halvparten av plantene var naturlig foryngelse på tre til fire år (Figur 2). Andre halvpart var ett år gamle pluggplanter fra Skogplanter Østnorge av proveniens fra Huse frøplantasje (Figur 3). Dette er frø egnet for bruk i lavere høydelag på Østlandet (Skogfrøverket, 2017). Ingen av plantene var på forhånd utsatt for noen form for beskyttelse mot snutebiller. Plantematerialet er det samme som i masteroppgaven til Maren Lomsdal (2020) hvor hun har studert fenolforsvaret til plantene.

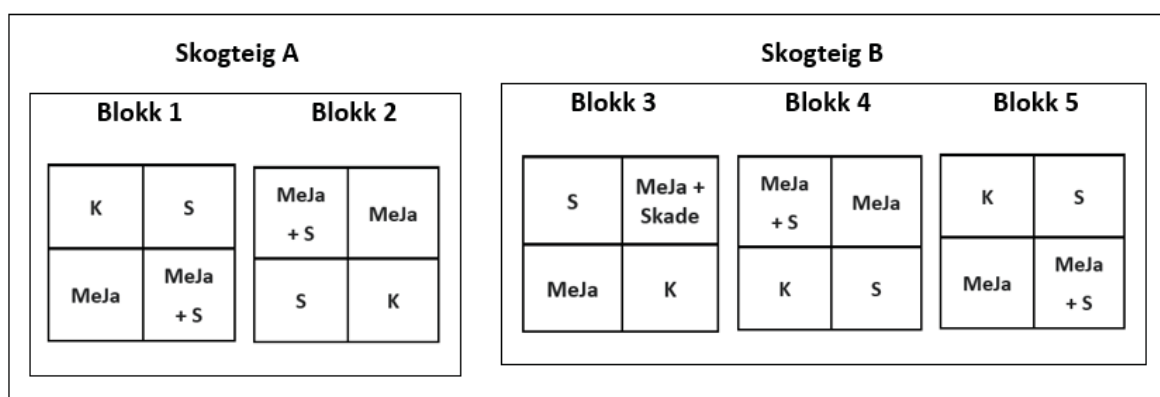


Figur 2: Naturlig foryngelse av gran.



Figur 3: Utplantet kulturforyngelse av gran.

Vi satte opp et randomisert blokkdesign på to hogstflater (på ulike skogteiger) der vi la ut henholdsvis to og tre blokker. Hver av blokkene ble delt inn i fire forsøksruter på 3x3 meter, som hver fikk en av fire behandlinger: 1. kontroll (K), 2. skading av barken (S), 3. påføring av MeJa (MeJa) og 4. påføring av MeJa og skading av barken (MeJa + S) (Figur 4). Hvilken forsøksrute innenfor hver blokk som ble tildelt hvilken behandling ble tilfeldig valgt.



Figur 4: Kart over blokkdesignet med behandlingene; kontroll (K), skade (S), Metyljamonat (MeJa) og MeJa + S, fordelt på fem blokker i to ulike skogteiger.

Plasseringen av blokkene ble valgt ut ifra tilstedeværelsen av tilstrekkelig mengde granplanter av naturlige foryngelse på stedene. Kulturplantene ble plantet ut mellom den naturlige foryngelsen på starten av vekstsesongen, 15. mai 2019. Hver blokk inneholdt totalt 80 granplanter, med 10 planter av hvert slag (natur/kultur) per forsøksrute.

Feltregistreringer ble utført som beskrevet av Wallerts et al. (2016). Den 15. og 19. mai registrerte vi høyde, diameter og skuddskyting (om plantene hadde startet årets vekst eller ikke). Høyde ble målt fra bakkenivå til toppen av planten med en nøyaktighet på 0,5 cm. Diameter ble målt 3-5 cm opp på rothalsen, med en nøyaktighet på 0,1 mm. Behandlingene ble utført to uker etter utplantingen av kulturplantene, den 29. mai 2019. Vi registrerte da også bortgang, og skadeomfanget fra eventuelle gnag fra snutebiller med følgende gradering; ingen skade, ubetydelig/tvilsom, noe skadd, hardt skadd, livstruende skade, og død. Skadegraden ble kategorisert ut ifra gnagstørrelsen. Det ble tatt nye mål og gjort tilsvarende registreringer ved innsamlingen av plantene (30. august til 1. september). På grunn av unøyaktige diametermålinger fikk vi negative verdier på diametertilveksten for noen av plantene.

2.3. Gjennomføring av behandlingene

Plantene som skulle få skadebehandling fikk skåret vekk to ruter på ca. 0,5 cm x 0,5 cm i ytter- og innerbarken med skalpell, slik at yteveden ble blottet. Skadene ble påført på motsatt side av hverandre, i himmelretning øst og vest, ca. 5 og 10 cm opp fra bakken. De ble påført i ulik høyde for å unngå ringbarkingseffekt. Skadene skulle være simulering av gnag fra snutebiller for å stresse planten, men ikke så store at planten ikke ville overleve. MeJa (Sigma-Aldrich, produktnummer: 392707) ble penslet med en løsning bestående av 50 mM MeJa og Tween-20 på nederste del av stammen (ca. 1/3), på begge sider for å dekke barken hele veien rundt. Før påføringen la vi tilpassede bomullspads nederst rundt stammeroten for at løsning som eventuelt rant av skulle samles opp og fortsatt kunne tas opp av planten, og for å beskytte vegetasjonen mot eventuelt søl. Plantene som skulle få MeJa- og skadebehandling ble påført skaden før pensling med MeJa samme dag. Plantene i kontrollblokkene ble penslet på samme måte som plantene som fikk MeJa-behandlingen, men med en blanding av Tween-20 og vann (1 dråpe Tween-20 per 1 Liter vann), slik at de skulle ha mest mulig lik behandling som de andre plantene og være en god kontroll.

Etter at behandlingene var utført stod plantene uten noen inngripen over sommeren.

Den 1.- 4. september ble halvparten av plantene (fem planter av hver type fra hver rute) høstet inn for laboratorieanalyse. For å få et jevnest mulig sammenligningsgrunnlag ble bare overlevende planter med tilnærmet lik størrelse valgt ut. Plantene ble klippet ved rothalsene, og stammene ble splittet i to. Den ene halvdel av stammene ble pakket friske i felt, i aluminiumsfolie, og fryst direkte i flytende N₂, for deretter å bli lagt i en fryser som holdt -80 °C frem til videre preparering.

2.4. Analyser av karbon- og nitrogenkonsentrasjoner

Det ble gjennomført en analyse av mengdeinnholdet nitrogen (N) og karbon (C) av det innsamlede plantematerialet (7. og 8. januar 2020), for å kunne si noe om næringsverdien i plantene. 5 mg ($\pm 0,5$ mg) barkpulver ble veid, pakket inn i tinnfolie og analysert i en Micro Cube elementanalysator (Elementar Analyse, Hanau, Tyskland). Alle prøvene, inkludert 7 prøver med lite prøvemateriale, ble tatt med videre i statistiske analyser.

2.4.1. Prøvefeil

Plante nr. 98 fra blokk 2 med MeJa+ skadebehandling er en feilregistrering det ikke ble tatt høyde for i C/N-analysene. Planten registrert som nr. 98 kultur, er egentlig nr.86 natur. Numrene er fra samme blokk og type behandling, men av ulik plantetype. På grunn av denne omstokkingen er plante nr. 91 fra samme blokk og behandling blitt feilregistrert til å være natur selv om den er en kulturplante.

2.5. Terpenprøver

Bark ble skåret vekk fra planteprovne (ca. 100 mg bark per prøve), overført til prøveglass hvor de lå dynket i 1 ml løsning av Hexane/Pentadecane (100 $\mu\text{g/mL}$) (Fra Sigma-Aldrich, ordrenummer: 650552), og satt til risting i romtemperatur på et ristebrett i omtrent 24 timer. Etter ekstraksjon ble væsken fra hver prøve overført til hvert sitt nye prøveglass, og oppbevart i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Barken ble tørket og veid for å regne ut eksakt tørrvekt for bark brukt i hver prøve.

Hexane ekstraksjonen ble analysert ved bruk av GC-MS (Gasskromatografi-massespektrometri) Produsent «Hewlett packard» (HP), type Varian 3400 gasskromatografi, utstyrt med med DB-wax kapillarsøyle (30m $\times$ 0,25mm $\times$ 0,25mm, J&W Scientific, CA, USA), og koblet til en Finnigan SSQ 7000 massespektrometer. Terpentypene ble identifisert

og kvantifisert ved å søke etter komponentene som var funnet av programmet AMDIS, i databasebiblioteket NIST (National Institute of Standards and Technology).

For å tilpasse konsentrasjonen i prøvene til GC-MS-maskinen ble hver enkelt prøve fortynnet 1:10 med Hexane. For å beregne mengdeinnholdet (oppgitt i «nanogram per gram tørrvekt») til hvert terpen per prøve, ble arealet terpen (TP) delt på arealet til Pentadecane (PD) (ganget med 10 for å utligne prøvesvaret i samsvar med fortynningen), og delt på tørrvekten (TV) til hver enkelt prøve. Formelen ble følgende:

$$X = \frac{(TP/PD) \times 10}{TV} = ng/gTV$$

En utvelgelse av terpen for kvantifisering var nødvendig siden det totale antallet ulike terpen i gran er for stort, og utgjør en så liten mengde, at det ikke var gunstig bruk av ressurser å skulle identifisere og registrere alle. Utvelgelsen ble gjort på bakgrunn av terpen som var godt representert i både mengde og andel planter, og som det finnes en generelt god kjennskap til.

2.6. Statistiske analyser

De statistiske analysene ble gjennomført ved hjelp av programmet R-Studio (versjon 3.5.3). Til variansanalysene av næring, vekst og terpen ble benyttet jeg toveis ANOVA-tester, Linear mixed-effects models, med pakken «lme4» (Bates, 2015). Post hoc-test, med pakken «emmeans» (Lenth, 2020), ble utført på resultatene som viste signifikant sammenheng (over 95% konfidensintervall) for type behandling, for å se hvilke av behandlingsformene som var ulike. Til å utforme figurer brukte jeg Windows Excel.

For høyde- og diametervekst hos plantene ble Linear Mixed-Effects Models (Lmr) og anova-test benyttet for å undersøke om det var signifikant forskjell i vekst hos planter med ulik behandling (fire behandlinger), plantetype (natur/kultur), og/eller i interaksjonen mellom disse. Hvilken blokk plantene hørte til (1-5), plantetype (1-2) og behandling (1-4) ble brukt

som hovedfaktorer, og vekstraten til høyden og diameteren ble brukt som varierende faktor. Det totale plantematerialet med overlevende planter som hadde vedvarende merking etter endt tid ute i felt, er med i datagrunnlaget for høyde- og diametervekst (387 planter).

For plantene det var blitt utført næringsanalyse av, ble Linear Mixed-Effects Models (Lmr) og anova-test benyttet for å undersøke om det var signifikant forskjell i mengdeinnhold C, N og/eller C:N-ratioen i planter med ulik behandling, plantetype (natur/kultur), og/eller i interaksjonen mellom disse. Hvilken blokk plantene hørte til (1-5), plantetype og behandling ble brukt som hovedplottfaktorer, og C, N og C: N-ratioen som sub-plot(varierende) faktor. De samme testene ble benyttet til å undersøke signifikans i C, N og C:N-ratioen i plantetype med og uten snutebillegnag. Blokk, plantetype og gnag/ikke gnag ble brukt som hovedplottfaktorer, og C, N og C: N-ratioen som sub-plot(varierende) faktor. Det var to usikre prøver (uten gnagsskader) grunnet dobbelnummerering. Disse ble ikke tatt med i C/N-analysene. Derfor ble totalen planter i C/N-datasettene 196 stykk.

Til analysen av snutebillegnagene ble det utført Fixed Effects Omnibus Test. Graden av skade fra snutebiller ble brukt som responsvariabel. Kulturplante nr. 131, som fikk skadebehandling, var den eneste planten det ble registrert gnag fra snutebiller på før behandlingene ble utført. Planter med bortgang forårsaket av andre årsaker enn fra snutebillegnag; seks døde planter som følge av tørke, en forsvunnet, og to unøyaktige registreringer, ble ikke tatt med i snutebillegnagstatestikken.

Jeg undersøkte om det var signifikant forskjell i konsentrasjon terpenener i planter med ulik behandling, mellom natur- og kulturforyngelsen, og/eller i interaksjonen mellom disse. Blokk 1-5, plantetype (natur/kultur) og behandling (K, S, MeJa og MeJa+S) ble brukt som hovedplottfaktorene, og enkeltterpentypene ble brukt som sub-plot faktor. Lmr-, log- eller kvadratrot-test ble benyttet ut ifra hvilken av testene som var nærmest idealet i Qq-plot for hvert enkelt terpen. Post hoc-test ble utført på terpenene; 3-Carene, Eucalyptol, Limonene og para-Cymene. Der Post hoc-testen viste hvilken behandling som skilte seg ut, er dette vist i figurene for de gjeldende terpentypene. På grunn av svinn av to kulturplanter, ble det totale antallet planter jeg utførte terpenanalyse på 198. Plantene som manglet var begge fra felt 4, med MeJa- og MeJa + Skadebehandling.

3.0 Resultater

3.1. Vekst

Det var ingen forskjell i høydetilveksten hos kontroller av naturforyngelse (NF) og kulturforyngelse (KF) etter endt sesong ute i felt ($F(p)=2,13$ (0,145)) (Tabell 1). Det var imidlertid en negativ effekt av MeJa på høydetilvekst, men bare hos KF (signifikant Behandling $\times$ Plantetype) (Tabell 1). For diametertilveksten hadde både behandling og plantetype signifikant betydning. Diametertilveksten var større hos KF sammenlignet med kontrollen, i forhold til NF og deres kontrollplanter. Planter med skadebehandling hadde høyere diametertilvekst sammenlignet med de andre behandlingene og kontrollene hos begge plantetyper (Tabell 1). 44 av plantene hadde tørr topp, 15 av disse var med gnagsskade.

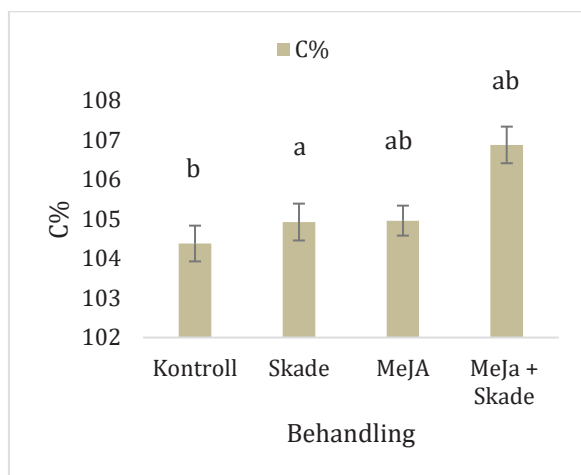
Tabell 1: Total gjennomsnittlig høyde- og diametertilvekst $\pm$ standardfeil (SE) fra medio mai til starten av september, for natur- og kulturplanter med de ulike behandlingene kontroll, skade, Metyljjasmonat (MeJa) og MeJa + skadebehandling. Signifikante resultater er markert med fet skrifttype. Antall (n) frihetsgrader (F) for bruk i en Chi square-tabell.

<i>Plantetype</i>	<i>Behandling</i>	<i>Høyde (cm)</i>	<i>Diameter (cm)</i>
		Gjennomsnitt $\pm$ SE	Gjennomsnitt $\pm$ SE
Natur	Kontroll	6,1 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2
	Skade	6,2 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,1
	MeJa	5 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,1
	MeJa + Skade	6,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,1
Kultur	Kontroll	7 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,1
	Skade	5,1 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,1
	MeJa	3,9 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1
	MeJa + Skade	5,7 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1
Plantetype	F*(p)	2,13 (0,145)	23,27 (<0,001)
Behandling	F**(p)	9,17 (<0,001)	7,88 (<0,001)
Interaksjon	F***(p)	2,78 (0,041)	2,32 (0,075)

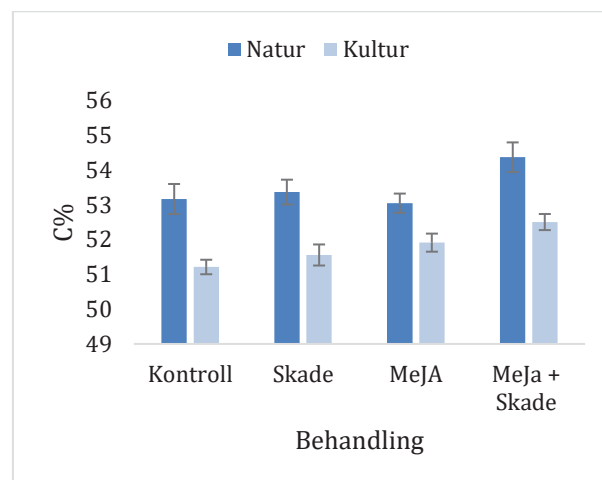
<i>Antall frihetsgrader F[n]</i>				
F*	Natur=F[1,193]	Kultur=F[1,192]		
Behandling	Kontroll	Skade	MeJa	MeJa +skade
F**	F[3,95]	F[3,98]	F[3,93]	F[3,97]
F*** Natur	F[7,45]	F[7,48]	F[7,48]	F[7,49]
F*** Kultur	F[7,49]	F[7,49]	F[7,44]	F[7,47]

3.2. Karbon- og nitrogenkonsentrasjoner

Behandlingen skade ga signifikant høyere C-konsentrasjon i barken sammenlignet med kontrollen (Figur 5 og Tabell 2). Det var signifikant høyere innhold av karbon (C) i naturlig foryngelse sammenlignet med kulturforyngelsen (Figur 6 og Tabell 2).



Figur 5: Gjennomsnittlig konsentrasjon av karbon (C) oppgitt i prosent for alle plantene med behandlingene; Kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa), og MeJa + skadebehandling. Usikkerhetsstopler er standardfeil av gjennomsnittet. Ulike bokstaver over stolpene viser signifikante forskjeller mellom behandlingene.



Figur 6: Gjennomsnittlig konsentrasjon av karbon (C) oppgitt i prosent for planter av natur og kulturforøngelse med behandlingene; Kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa), og MeJa + skadebehandling. Usikkerhetsstopler er standardfeil av gjennomsnittet.

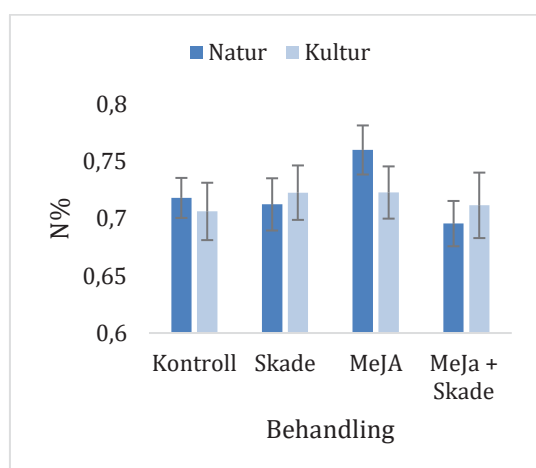
Det var ikke signifikant forskjell i nitrogenkonsentrasjon (Figur 8 og Tabell 2) eller i C:N-ratioen (Figur 7 og tabell 2) i barken hos natur- og kulturforøngelse, eller mellom de ulike behandlingene sammenlignet med kontrollen.

Tabell 2: F- og p-verdier av Nitrogen (N), karbon (C) og C:N-ratioen hos Plantetypene; natur og kulturforøngelse, ved de ulike behandlingene; Kontroll, Skade, Metyljasmonat (MeJa) og MeJa + skadebehandling og interaksjonene mellom disse.

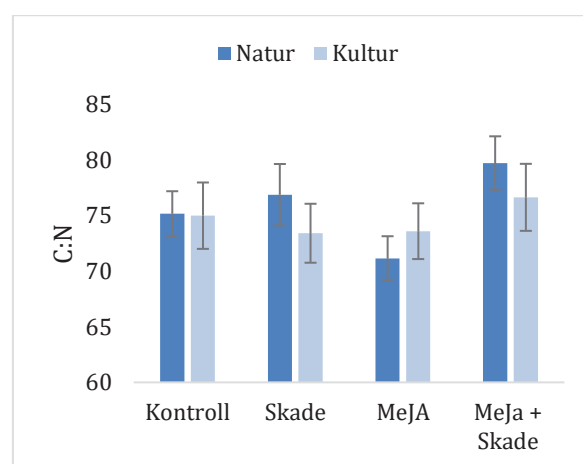
		<i>Nitrogen</i>	<i>Karbon</i>	<i>C:N-ratio</i>
Plantetype	F*(p)	0,19 (0,666)	64,28 (<0,001)	0,27 (0,608)
Behandling	F**(p)	1,03 (0,382)	6,82 (<0,001)	1,84 (0,141)
Interaksjon	F*** (p)	0,53 (0,66)	0,92 (0,429)	0,63 (0,6)

Antall frihetsgrader $F[n]$

F*	F[1,98]			
Behandling	<i>Kontroll</i>	<i>Skade</i>	<i>MeJa</i>	<i>MeJa + skade</i>
F**	F[3,49]	F[3,48]	F[3,48]	F[3,49]
F*** Natur	F[7,24]	F[7,23]	F[7,24]	F[7,24]
F*** Kultur	F[7,24]	F[7,24]	F[7,23]	F[7,24]



Figur 7: Gjennomsnittlig konsentrasjon av nitrogen (N) for planter av natur og kulturforøngelse med behandlingene; Kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa), og MeJa + skadebehandling. Usikkerhetsstolper er standardfeil av gjennomsnittet.



Figur 8: C:N-ratioen av konsentrasjonen karbon (C) og nitrogen (N) for planter av natur og kulturforøngelse med behandlingene; Kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa), og MeJa + skadebehandling. Usikkerhetsstolper er standardfeil av gjennomsnittet.

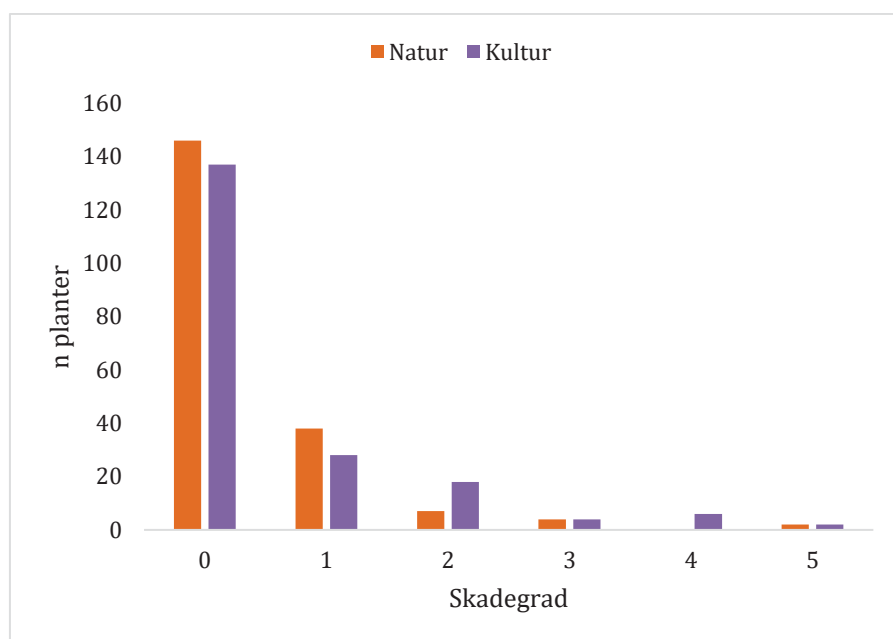
3.3. Snutebillegnag

Det var ingen signifikant forskjell i preferanse hos snutebillene mellom natur- og kulturforøngelsen, mellom de ulike behandlingene, eller i interaksjonen mellom disse (Tabell 3). 27,88% av alle plantene hadde skade som følge av gnag fra snutebiller i ulik

alvorlighetsgrad (Figur 10). Skadeprosenten til NF var 25.89%, og for KF 29.74%. Om man går ut fra at plantene med livstruende skade (kategori 4) ikke overlever, var overlevelsesprosenten for denne vekstsesongen (skadegrad 0-3) for NF 98.98%, og for KF 95.9%, og den totale avgangen var på 2.56% (Figur 10).

Tabell 3: X^2 , F og P -verdiene for skadegrad 0-5 forårsaket av snutebiller for plantetyper; kulturforryngelse (K) og naturforryngelse (N)), behandling; kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa), og MeJa + skade, og interaksjonen mellom plantetype og behandling. Skadegradene er: 0 = Ingen skade, 1 = Ubetydelig/tvilsom, 2 = Noe skadd, 3 = Hardt skadd, 4 = Livstruende skade og 5 = død.

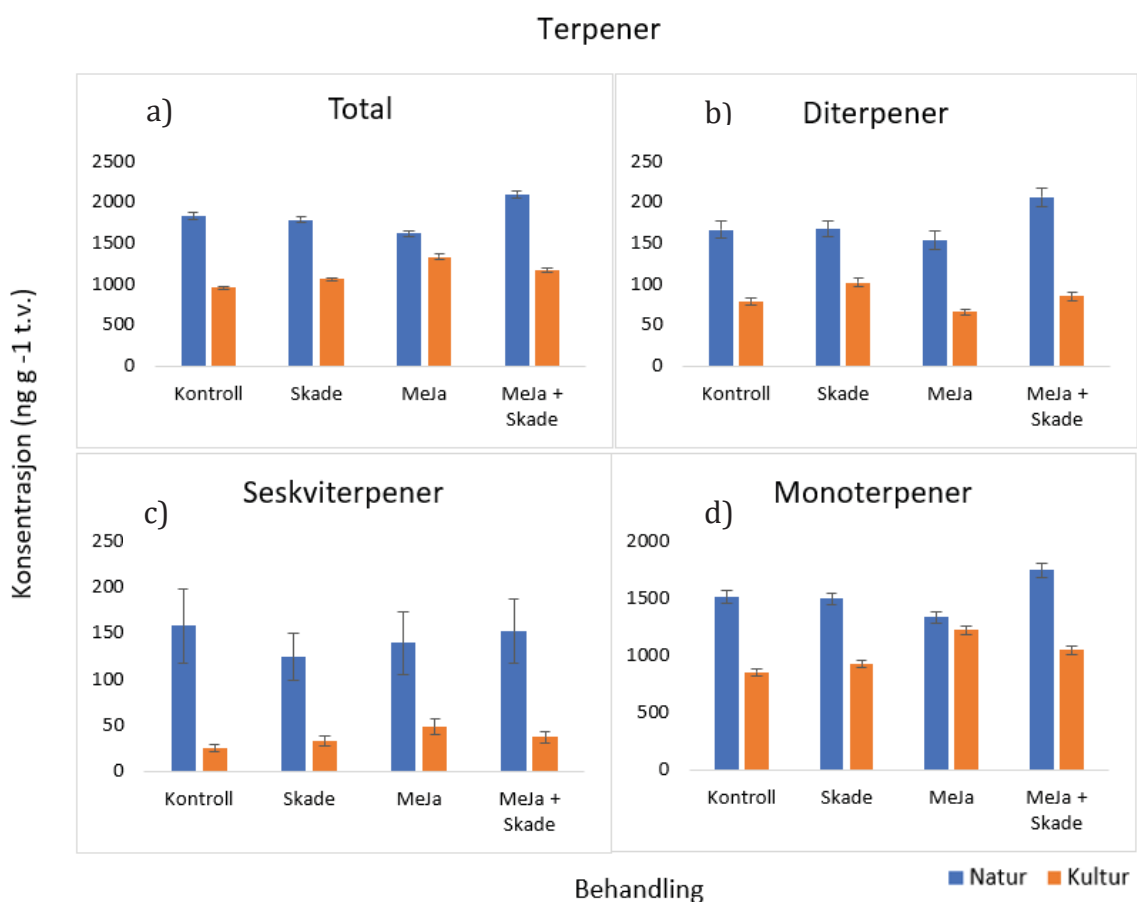
	X^2	df	P
Plantetype F*	0,00745	1	(0,931)
Behandling F**	4,39594	3	(0,222)
Interaksjon F***	0,19019	3	(0,979)



Figur 9: Antall (n) granplanter av natur- og kulturforryngelse med ulik skadegrad 0-5 forårsaket av snutebiller. 0 = Ingen skade, 1 = Ubetydelig/tvilsom, 2 = Noe skadd, 3 = Hardt skadd, 4 = Livstruende skade og 5 = død.

3.4. Terpener

Totalt tolv monoterpener, tre seskviterpener og to diterpener ble kvantifisert (Tabell 4. Appendix 3). Det var gjennomgående høyere konsentrasjon av terpener i den naturlige foryngelsen (NF) enn i kulturforyngelsen (KF) for mono-, seskvi-, og diterpener (Figur 11). Monoterpener utgjorde den største andelen av konsentrasjonen. (Figur 11).



Figur 10: Gjennomsnittskonsentrasjon terpener undersøkt i barken for a) total terpener og grupperingene b) diterpener, c) seskviterpener og d) monoterpene hos natur- (blå) og kulturforyngelse (oransje) med de ulike behandlingene; Kontroll, Skade, Metyljasonat (MeJa) og MeJa + skadebehandling. Usikkerhetsstolper er standardfeil for det totale antallet terpener.

Elleve av terpentypene som ble undersøkt hadde signifikant forskjellig konsentrasjon i NF og KF (Tabell 4). 3-Carene var eneste terpenet med signifikant høyere konsentrasjon i KF sammenlignet med NF (Figur 12). De andre ti terpentypene hadde signifikant høyere konsentrasjon av terpenet i NF (Figur 12, 13 og 14).

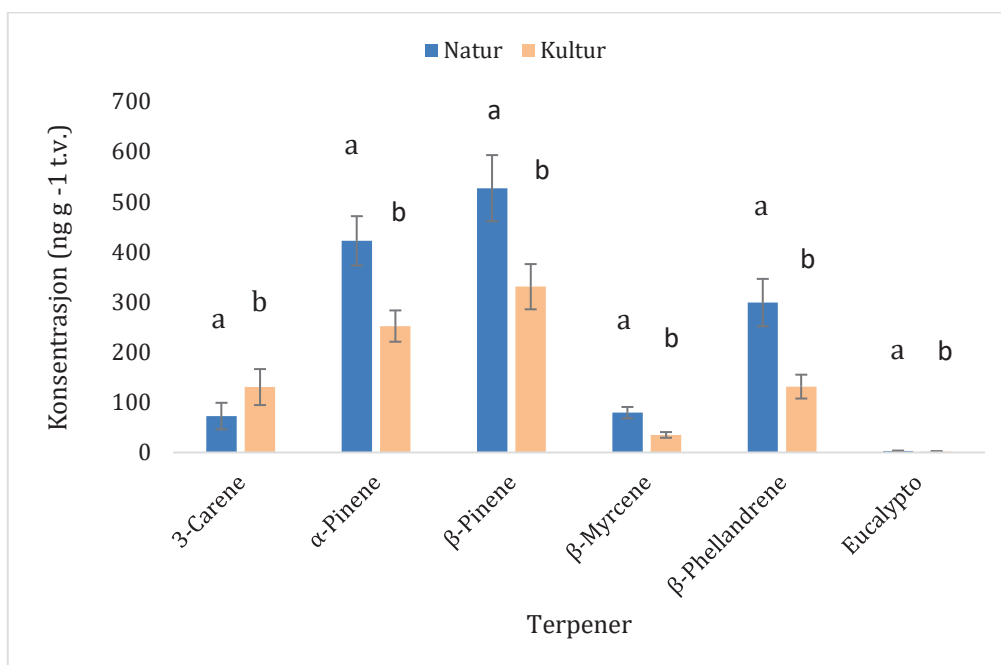
Tabell 4: F- og p-verdier av plantetype (kultur/natur) og behandling (kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa) og MeJa + skade), og interaksjonen mellom plantetype-behandling hos 17 ulike terpenet. Verdiene med signifikans er markert i fet skrift.

<i>Gruppe</i>	<i>Terpener</i>	<i>Plantetype</i>	<i>Behandling</i>	<i>Interaksjon</i>
<i>Verdier</i>		F*(p)	F**(p)	F***(p)
monoterpener	3-Carene	6,52 (0,011)	4,74 (0,003)	0,81 (0,488)
	alfa-Pinene	33,71 (<0,001)	1,53 (0,208)	0,58 (0,629)
	beta-Pinene	23,54 (<0,001)	1,85 (0,140)	0,67 (0,573)
	beta-Myrcene	57,56 (<0,001)	0,33 (0,806)	0,76 (0,517)
	beta-Phellandrene	48,42 (<0,001)	0,29 (0,832)	0,75 (0,526)
	Camphene	2,93 (0,089)	0,21 (0,891)	0,47 (0,705)
	Eucalyptol	8,97 (0,003)	12,18 (<0,001)	0,56 (0,64)
	gamma-Terpinene	0,001 (0,977)	1,59 (0,194)	0,77 (0,513)
	Limonene	0,79 (0,375)	3,25 (0,023)	0,84 (0,476)
	para-Cymene	1,07 (0,302)	4,68 (0,004)	1,99 (0,117)
	Sabinen	0,88 (0,351)	2,27 (0,082)	1,13 (0,338)
	Terpinolen	0,37 (0,547)	1,35 (0,259)	0,98 (0,401)
seskviterpener	alfa-Gurjunene	37,98 (<0,001)	2,03 (0,111)	1,67 (0,176)
	alfa-Longipinene	13,19 (<0,001)	2,00 (0,116)	0,829 (0,480)
	Germacrene D	59,63 (<0,001)	0,79 (0,5)	0,19 (0,906)
diterpener	Thunbergene	41,61 (<0,001)	0,91 (0,435)	0,23 (0,878)

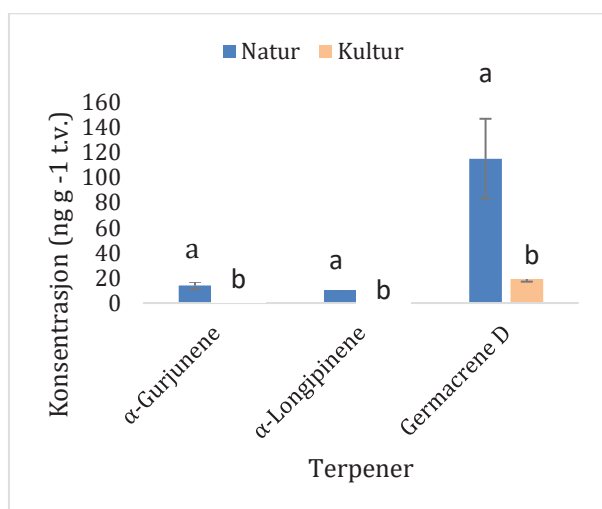
	Verticiol	38,79 (<0,001)	1,31 (0,273)	0,18 (0,909)
--	-----------	----------------	--------------	--------------

Antall frihetsgrader F[n]

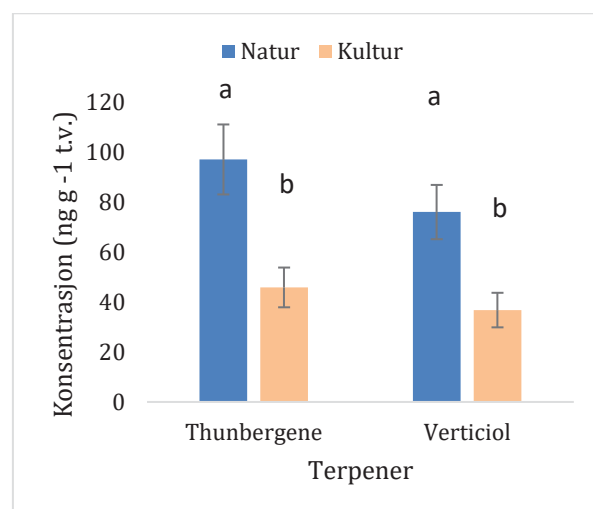
F*	Natur F[1,99]	Kultur F[1,97]		
Behandling	Kontroll	Skade	MeJa	MeJa +skade
F**	F[3,49]	F[3,49]	F[3,48]	F[3,48]
F*** Natur	F[7,24]	F[7,24]	F[7,24]	F[7,24]
F*** Kultur	F[7,24]	F[7,24]	F[7,23]	F[7,23]



Figur 11: Gjennomsnittskonsentrasjon terpenener i nanogram (ng) per gram (g) tørrvekt (t.v.) til monoterpenene; 3-Carene, α-Pinene, β-Pinene, β-Myrcene, β-Phellandrene og Eucalyptol. Usikkerhetsstolper er standardfeil av gjennomsnittet. Ulike bokstaver over stolpene viser signifikante forskjeller mellom plantetyperne.

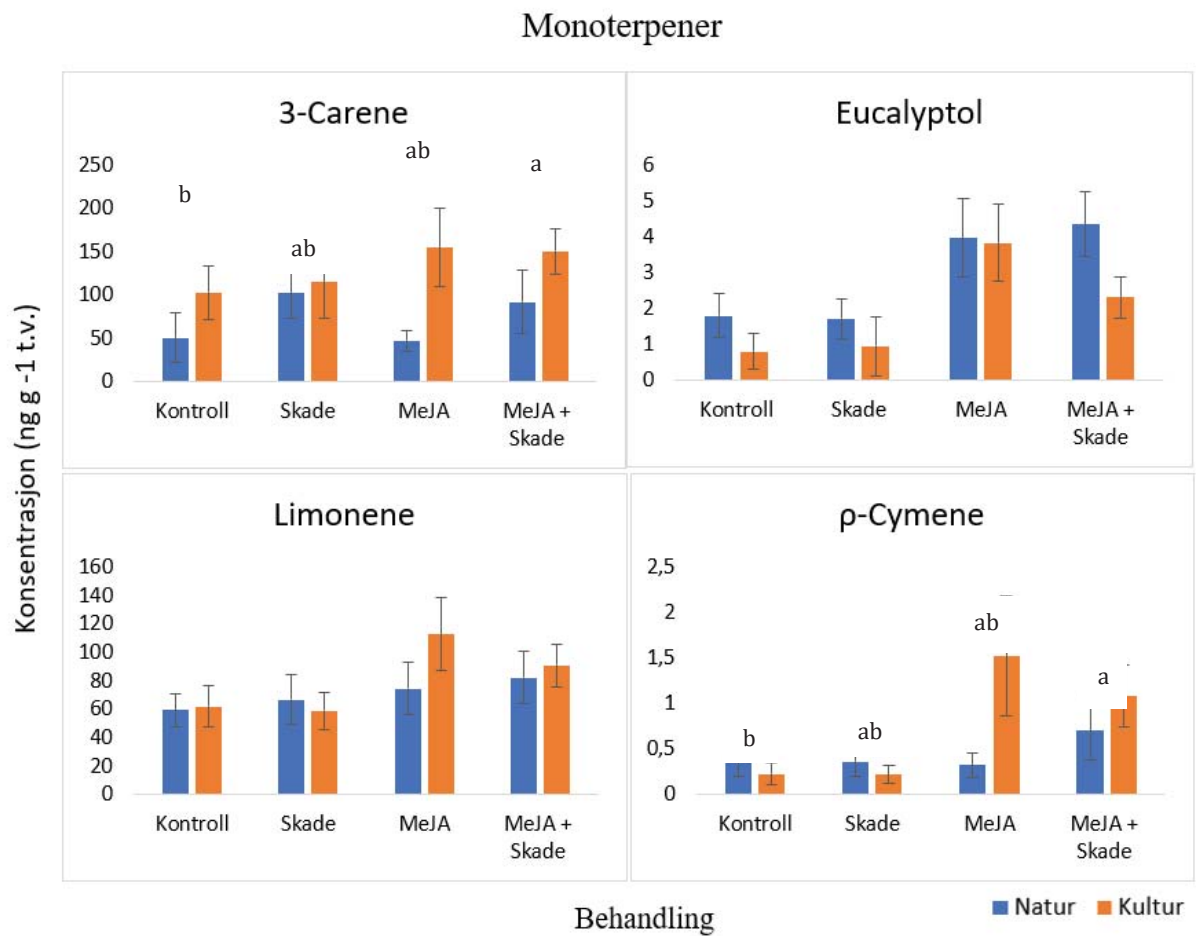


Figur 12: Gjennomsnittskonsentrasjonen terpenener oppgitt i nanogram (ng) per gram (g) tørrvekt (t.v.) til seskviterpenene; α -Gurjunene, α -Longipinene og Germacrene D, hos natur- og kulturplanter. Usikkerhetsstolper er standardfeil av gjennomsnittet. Ulike bokstaver over stolpene viser signifikante forskjeller mellom plantetyperne.



Figur 13: Gjennomsnittskonsentrasjon, oppgitt i nanogram (ng) per gram (g) tørrvekt (t.v.), til diterpenene Thunbergene og Verticilol hos natur- og kulturplanter. Usikkerhetsstolper er standardfeil av gjennomsnittet. Ulike bokstaver over stolpene viser signifikante forskjeller mellom plantetyperne.

Monoterpenene 3-Carene, Eucalyptol, Limonene og para-Cymene hadde signifikant forskjellige konsentrasjoner i planter med ulike behandling (Figur 15). 3-Carene og para-Cymene hadde signifikant høyere konsentrasjoner i «MeJa + skade» sammenlignet med kontroller (Figur 15). For Eucalyptol og Limonene var det høyere konsentrasjoner i planter behandlet med MeJa (figur 15). Kun for stoffene 3-Carene og Eucalyptol var det signifikant effekt av plantetype og behandling (Tabell 6, Figur 12 og 15). 3-Carene har stor forskjell mellom plantetyperne ved MeJa behandling, og KF har høyest innhold. Eucalyptol har stor forskjell mellom plantetyperne for behandlingen MeJa + Skade, med høyest innhold i NF. Ingen av seskvi- og diterpenene ble signifikant påvirket av behandlingene (Tabell 6).



Figur 14:

Gjennomsnittskonsentrasjon til monoterpener (3-Carene, Eucalyptol, Limonene og p-Cymene) med signifikant ulikhet i konsentrasjon terpener for behandling (Kontroll, Skade, Metyljasonat (MeJa) og MeJa + skadebehandling) hos natur- og kulturforryngelse.. «a» og «b» viser signifikant ulikhet i terpenkonsentrasjon mellom behandling. Usikkerhetsstolper er gjennomsnittlig standardfeil. Ulike bokstaver over stolpene viser signifikante forskjeller mellom behandlingene.

4.0 Diskusjon

I tråd med min første hypotese var konsentrasjonen av terpenener totalt, og for de fleste enkeltstoffer høyere i naturlig foryngelse (NF) enn i kulturforyngelse (KF). Dette kan tyde på at forholdene den naturlige foryngelsen vokser opp under gjør at terpenforsvar prioriteres høyere enn i KF. Dette grunnet et varierende oppvekstmiljø som kan utsette plantene for ulike former for stress, og den naturlige begrensede tilgang til nitrogen.

Det var imidlertid ingen forskjeller i nitrogeninnhold i bark mellom NF og KF da dette ble målt på slutten av sesongen. Selv om det ikke var forskjell i barken, kan det ha vært forskjeller i nålene der fotosyntesen foregår slik at det kan ha påvirket syntesen av forsvarsstoffer. Det var signifikant høyere innhold av karbon i NF sammenlignet med kulturforyngelsen. Dette samsvarer med hypotesen om karbonnæringsbalansen (Bryant et al., 1983). I studien til Muzika (1993) antydte resultatene at ikke alle karbonbaserte kjemikalier svarer på samme måte på miljøvariasjon, og at karbon /næringsstoffbalansehypotesen ikke tilstrekkelig forklarer alle mønstre av miljømessig induisert variasjon i sekundær metabolisme. Stress påvirker nok konsentrasjonen med terpenener mer enn næringstilgangen gjør.

Av de overlevende plantene hadde 44 stykker tørr topp, resten av plantene var friske. Det var ingen forskjell i høydertilveksten mellom plantetypene. Selv om det ikke var noen målbar forskjell i nitrogeninnhold mellom plantetypene viste plantetype signifikant betydning for diametertilveksten, med størst tilvekst hos KF sammenlignet med kontrollen.

Min tredje hypotese gikk ut på at skade på trærne og behandling med MeJa ville føre til økt konsentrasjon av terpenener. For den totale konsentrasjonen av terpenener var det størst økning i mengde terpenener sett opp imot kontrollen for MeJa + skade i NF og for MeJa-behandling i KF. Skadebehandling alene hadde ingen økning i terpenkonsentrasjon. Behandling med MeJa hadde signifikant høyere konsentrasjon av terpenene Eucalyptol og Limonene med kontroller. Limonene er kjent for å frastøte snutebiller (Nilsson et al., 2010). Skade- + MeJa-behandling hadde signifikant høyere konsentrasjon av terpenene 3-Carene og para-Cymene sammenlignet med kontroller. For disse fire terpentypene hadde behandlingen MeJa og MeJa + skade en effekt på terpenforsvaret i form av økt konsentrasjon terpeninnhold som hypotisert.

I og med at det kun ga utslag i terpenkonsentrasjonen i fire av de sytten terpenstoffene som ble undersøkt har ikke behandlingene trigget terpenforsvaret i noen betydelig grad. Det kan være at skadegraden ikke har vært stor nok, og/eller at konsentrasjonen MeJa påført ikke har vært høy nok.

Det kan hende at behandlingene har hatt en større effekt på terpenforsvaret i dette forsøket, men at effekten har avtatt med tiden frem til terpenkonsentrasjonene ble målt. I andre tilsvarende studier har man undersøkt konsentrasjonen av terpen i forsøk etter kortere tid enn det jeg har gjort i dette forsøket. Som for eksempel i forskningen til Sampedro et al. (2010) ble harpiksinnhold i stammen testet seksti dager etter MeJa-påføring.

Det er ulike forskningsresultater på økning av konsentrasjonen til seskviterpener ved behandling med MeJa. Ifølge Martin et al. (2004) har seskviterpener vist seg å utgjøre den viktigste bestanddelen av induserte flyktige utslipp ved behandling med MeJa, mens i forskningen til (Miller et al., 2005) hadde planter med MeJa-behandling ingen økt konsentrasjon av seskviterpener. Planter med snutebillegnag i samme forsøk hadde derimot økt konsentrasjon av seskviterpener, I mine resultater var det ingen signifikant forskjell mellom seskviterpenene utifra behandling, I denne oppgaven har jeg bare undersøkt konsentrasjonen av terpen i ytterbarken, men det kunne også vært interessant å undersøke stammevevet og nålene for å se på terpenkonsentrasjonen der.

Hypotesen om at det ville være et betydelig større skadeomfang fra snutebiller på kulturforryngelsen enn på den naturlige forryngelsen gjorde seg ikke gjeldende. Selv om det var noen flere planter av KF som ble beitet på av snutebiller, og flere av disse fikk større skadeomfang enn planter av NF, var det ingen signifikant ulikhet i beitepreferanse mellom plantetyperne i dette forsøket. Beiting og avgang som følge av snutebiller var lavere i denne studien enn dokumentert avgang fra andre studier, med beiteskader på 27,88% og avgang på 2.56%. I feltforsøk til Wallertz (2016) hadde gjennomsnittlig 39% av granplantene blitt angrepet av snutebiller, og dødeligheten var på 3,9% for kulturplanter uten behandling mot snutebiller etter en vekstsesong i Norge. I artikkelen til Örländer & Nilsson (1999) hadde kulturplanter (uten noen behandling mot snutebiller) en dødelighet på hele 60%. Da det var få planter med skade fra gnag blir også usikkerheten i materialet større.

Den lave beitefrekvensen kan tyde på at det var få snutebiller i forsøksområdene. Faktorer som kan påvirke antall snutebiller er blant annet jordtemperatur og næringstilgang (Nilsson et al., 2010).

Det var ingen signifikant forskjell i beitepreferansene til snutebillene mellom planter med ulik behandling og kontrollene. I og med at skading og MeJa-behandlingene ikke hadde høyere terpenkonsentrasjoner for de fleste plantene, og antall planter med gnag var såpass lavt, faller hypotesen om at det ville være færre skader på planter med disse behandlingene ut.

Det kan være verdt å påpeke at siden 3-Carene og para-Cymene hadde signifikant høyere konsentrasjoner i MeJa + skade- behandling sammenlignet med kontroller, og for Eucalyptol og Limonene var det høyere konsentrasjoner i planter behandlet med MeJa, kan det hende at økningen i konsentrasjonen av disse terpenene gjør plantene mindre attraktive for beiting fra snutebiller. 3-carene har en viktig rolle for forsvaret til bartrær (Zulak & Bohlmann, 2010), og Limonene er kjent for å frastøte gransnutebiller (Sampedro et al., 2010). Limonene har også en antiinflammatorisk virkning for plantene (Miguel, 2010).

Bruk av MeJa har både fordeler og ulemper. Plantehormonet har vist seg å fremme forsvaret hos plantene, men ved indusering hemmer det også veksten til plantene (Heijari, 2005). Derfor blir det en «trade off» om man ønsker rask vekst, eller et mer robust forsvar. Induksjon med MeJa viste seg å være effektiv mot gnag fra snutebiller i forsøket til Sampedro et al. (2010). Induserte frøplanter var 21% mindre skadet enn kontrollplanter. Behandlede planter med MeJa hadde 40% større harpiksinhold i stammen, men hadde reduserte høydevekst sammenlignet med kontrollplanter. I mitt forsøk hadde behandling med MeJa en negativ effekt på høydetilvekst hos KF.

Plantene med skadebehandling derimot hadde størst diametertilveksten for begge plantetypene. Det kan ha vært sårvev etter skadingen som har gjort utslaget, men det kan også hende diametervekst var en respons mot herbivori fra granplantene sin side (**forskning på vekst som forsvar**).

Hemmet vekst kan føre til at plantene er tiltrekkende for snutebiller i et lengre tidsrom, da snutebiller ser ut til å ha en preferanse for planter med tynn bark. Økning i barktykkelse og diameter på stammen gjør plantene mer tolerante overfor snutebilleangrep (Wallertz et al., 2016). Det er derfor gunstig for plantene å komme raskt opp i størrelse for å opparbeide seg tykkere og mer motstandsdyktig bark.

På grunn av ulik alder og utgangsstørrelse på den naturlige foryngelsen og kulturforyngelsen, var ikke sammenligningsgrunnlaget mellom beitepreferansene til snutebillen på de ulike plantetyperne brukt i dette forsøket optimalt, i og med at snutebiller viser preferanse for granplanter av en viss diameterstørrelse (kilde).

Tidligere forskning har vist at behandling med MeJa ikke er kostnadsfritt for plantene da det påvirker høydeveksten, noe som også går utover fitnessen til plantene (Baldwin 1998 (*Pinus sylvestris*) i Sampedro et al., 2010).

I mine resultater var det signifikant forskjell mellom natur- og kulturforyngelsen i konsentrasjonen av alle de tre seskviterpenene, hvor det var naturforyngelsen som hadde høyest konsentrasjon. I forskningen til (Miller et al., 2005) hadde planter med snutebillegnag økt konsentrasjon av seskviterpener, mens de med MeJa-behandling ikke hadde det, noe som ifølge Zulak og Bohlmann (2010) antyder at seskviterpenene har en spesiell rolle i forsvarsresponsen mot insekter. Om hypotesen til Zulak og Bohlmann stemmer, burde den høyere andelen av seskviterpener i NF i dette forsøket også hjelpe plantene til å være bedre rustet mot insektsangrep enn det den KF er.

I en artikkel fra Wallertz (2009) om beiting fra gransnutebille på naturlig foryngelse av gran og furu observerte hun at behandlinger som utsetter starten på beiting fra snutebiller forbedret plantene til å motstå skade fra snutebiller senere, sannsynligvis som et resultat av redusert stress som muliggjør en raskere etablering av plantene. Andre tiltak som har vist effekt på å redusere gnag fra snutebiller på utplantet gran er markberedning (Nilsson et al., 2010; Wallertz et al., 2016), best effekt om plantene har kun jord rundt seg, uten annen vegetasjon (Wallertz et al., 2016), og voksbehandling (Nilsson et al., 2010). Det er ikke så mange kulturplanter som blir behandlet med voks siden det er dyre investeringskostnader knyttet til denne behandlingsformen (Wallertz et al., 2016).

Dette forsøket gikk over kun en vekstsesong, kanskje det vil være tydeligere beitepreferanser om det også blir gjort registreringer etter at plantene har stått ute en vekstsesong til. Det kunne blitt brukt 2 år gamle kulturplanter i stedet for ettåringer i dette forsøket, og blitt prøvd valgt ut enda mindre planter av naturforyngelse, for å få planter av natur- og kulturforyngelse i mer lik størrelse for et bedre sammenligningsgrunnlag for beitepreferanse. Gitt det samme arealet av bark som konsumeres, påvirkes også større planter mindre fordi mer bark må

konsumeres før plantene blir dødelig skadet, oftest først ved ringbarking av stammen (Selander 1993; Örlander & Nilsson 1999; Nordlander et al. 2011 i Wallertz et al., 2016).

5.0 Konklusjon

Konsentrasjonen av terpenener i dette forsøket var høyere i naturlig foryngelse enn i kulturforyngelse. Dette kan tyde på at forholdene den naturlige foryngelsen vokser opp under gjør at terpenforsvar prioriteres høyere enn i planter av kulturforyngelse, og at dette er årsaken til at planter av kulturforyngelse blir hyppigere beitet på enn den naturlige foryngelsen. Selv om resultatene i dette forsøket ikke viste beitepreferanse mellom natur og kultur, kan man ikke utelukke at det er en forskjell.

Bedre kunnskap om grantrær sitt naturlige forsvar kan være til hjelp for å produsere sterkere, og mer forsvarsdyktige kulturplanter mot beiting fra gransnutebiller. Det kan forskes mer på om økt terpenmengde alene er tilstrekkelig til å stoppe snutebillegnag, og hva som er mest gunstig av å få plantene til å forsvare seg, eller å vokse raskt så de blir store nok til å ikke bli preferert for beiting fra snutebiller. Gran spiller en viktig økologisk og økonomisk rolle. Det vil være veldig økonomisk besparende å finne en måte å minske skadeomfanget som følge av snutebillegang.

Referanser

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using {lme4}. 67 (1): 1-48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- Day, K., Nordlander, G., Kenis, M. & Halldorson, G. (2007). General biology and life cycles of bark weevils. I: *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, s. 331-349: Springer.
- Donaldson, J. R. & Lindroth, R. L. (2007). Genetics, environment, and their interaction determine efficacy of chemical defense in trembling aspen. *Ecology*, 88 (3): 729-739.
- Heijari, J., Nerg, A-M. , Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M., and 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: 117-124. doi: doi/epdf/10.1111/j.1570-7458.2005.00263.x.
- Krokene, P. (2018). *Trærnes forsvar*. Ås: NIBIO. Tilgjengelig fra: <https://www.nibio.no/tema/skog/skoghelse/traernes-forsvar>.
- Lenth, R. (2020). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*.
- Lomsdal, M. (2020). *Stående og induserbart fenolforsvar hos kulturplanter og naturlig foryngelse av gran (Picea abies)*: NMBU.
- Mageroy, M. H., Christiansen, E., Långström, B., Borg-Karlson, A. K., Solheim, H., Björklund, N., Zhao, T., Schmidt, A., Fossdal, C. G. & Krokene, P. (2019). Priming of inducible defenses protects Norway spruce against tree-killing bark beetles. *Plant, Cell & Environment*, 43 (2): 420-430.
- Martin, D. M., Fäldt, J. & Bohlmann, J. (2004). Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant physiology*, 135 (4): 1908-1927.

Mattson, W. J., Leveux, J. & Bernard-Dagan, C. (2012). *Mechanisms of woody plant defenses against insects: search for pattern*: Springer Science & Business Media.

Meunier, C. L., Gundale, M. J., Sánchez, I. S. & Liess, A. (2016). Impact of nitrogen deposition on forest and lake food webs in nitrogen-limited environments. *Global Change Biology*, 22 (1): 164-179.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15 (12): 9252-9287.

Miller, B., Madilao, L. L., Ralph, S. & Bohlmann, J. (2005). Insect-induced conifer defense. White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce. *Plant Physiology*, 137 (1): 369-382.

Muzika, R.-M. (1993). Terpenes and phenolics in response to nitrogen fertilization: a test of the carbon/nutrient balance hypothesis. *Chemoecology*, 4 (1): 3-7.

NIBIO. Norsk institutt for bioøkonomi.

Nilsson, U., Luoranen, J., Kolström, T., Örlander, G. & Puttonen, P. (2010). Reforestation with planting in northern Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 25 (4): 283-294.

Norsk klimaservicesenter. Tilgjengelig fra:

<https://klimaservicesenter.no/faces/desktop/article.xhtml?uri=klimaservicesenteret/klima-og-hydrologiske-data/datagrunnlag-klimafremskrivninger>.

Nybakken, L., Lie, M. H., Julkunen-Tiitto, R., Asplund, J. & Ohlson, M. (2018). Fertilization Changes ChemicalDefense in Needles of MatureNorway Spruce (*Picea abies*). *Frontiers in Plant Science*, 9. doi: doi: 10.3389/fpls.2018.00770.

Sampedro, L., Moreira, X. & Zas, R. (2010). Resistance and response of *Pinus pinaster* seedlings to *Hylobius abietis* after induction with methyl jasmonate. *Plant Ecology*, 212 (3): 397-401.

Skogfrøverket. (2017). *Bruksområder frøplantasjer GRAN*.

UiO. (2015). Forsvar: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra:

<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/f/forsvar.html>.

Wallertz, K. (2009). *Pine weevil feeding in Scots pine and Norway spruce regenerations*, b. 2009.

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.

Zulak, K. G. & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (1): 86-97.

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.

Appendix

Nitrogen- og karbonanalyse

Chi square-tabell benyttes for frihetsgrader (F).

Appendix 1: Gjennomsnittskonsentrasjon av Nitrogen (N), karbon (C) og C:N-ratioen for natur-, og kulturforyngelse (plantetype) av gran for behandlingene; kontroll, skade, Metyljasmonat (MeJa) og MeJa + skade. F- og p-verdiene (f (p)) for plantetype, behandling og interaksjonen mellom disse.. Signifikante resultater markert med fet skrift.

		Nitrogen (N)	Karbon (C)	C:N-ratio
Naturlig foryngelse	Kontroll	0,72 ± 0,02	53,17 ± 0,43	75,16 ± 2,03
	Skade	0,71 ± 0,03	53,37 ± 0,36	76,88 ± 2,76
	MeJa	0,76 ± 0,02	53,05 ± 0,28	71,14 ± 2
	MeJa + skade	0,7 ± 0,02	54,37 ± 0,42	79,72 ± 2,41
Kulturforyngelse	Kontroll	0,71 ± 0,03	51,21 ± 0,21	74,99 ± 2,99
	Skade	0,72 ± 0,02	51,56 ± 0,3	73,41 ± 2,65
	MeJa	0,72 ± 0,02	51,91 ± 0,26	73,6 ± 2,51
	MeJa + skade	0,71 ± 0,03	52,51 ± 0,23	76,64 ± 3,01
Plantetype	F*(p)	0,19 (0,666)	64,28 (<0,001)	0,27 (0,608)
Behandling	F**(p)	1,03 (0,382)	6,82 (<0,001)	1,84 (0,141)
Interaksjon	F***(p)	0,53 (0,66)	0,92 (0,429)	0,63 (0,6)

	Frihetsgrader (F)			
<i>F*</i>	Natur F[1,99]		Kultur F[1,97]	
	<i>Kontroll</i>	<i>Skade</i>	<i>MeJa</i>	<i>MeJa + Skade</i>
<i>F**</i>	F[3,49]	F[3,48]	F[3,48]	F[3,49]
<i>F***</i>	F[7,]			
<i>F****</i>				

Appendix 2: Gjennomsnittskonsentrasjon av Nitrogen (N), karbon (C) og C:N-ratioen for natur- og kulturforvngelse (plantetype av gran med eller uten gang fra snutebiller (gnag/ ikke gnag). F- og p-verdiene (f (p)) for plantetype med og uten gang, gnag/ ikke gnag samt interaksjonen mellom disse. Signifikante resultater markert med fet skrift.

		Nitrogen (N)	Karbon (C)	C:N-ratio
<i>Naturlig forvngelse</i>	Gnag	0,74 ± 0,03	53.53 ± 0.5	74.2 ± 2.9
	Ikke gnag	0,72 ± 0,01	53.48 ± 0.21	76.15 ± 1.28
<i>Kulturforvngelse</i>	Gnag	0,72 ± 0,03	52.26 ± 0.3	75.02 ± 2.8
	Ikke gnag	0,71 ± 0,01	51.62 ± 0.14	74.54 ± 1.6
<i>Plantetype</i>	F* (p)	0,43 (0,515)	34.84 (<0.001)	0.01 (0.924)
<i>Gnag</i>	F**(p)	1,5 (0,222)	0.09 (0.763)	1.01 (0.317)
<i>Interaksjon</i>	F*** (p)	0,27 (0,605)	1.64 (0.202)	0.43 (0.512)
	Frihetsgrader (F)			
<i>F*</i>	F[1,98]			
<i>F**</i>	F[1,48]			

	<i>Gnag</i>	<i>Skade</i>
<i>F**** Natur</i>	F[3,21]	F[3,76]
<i>F**** Kultur</i>	F[3,26]	F[3,71]

Terpener

Appendix 3: Gjennomsnittlig konsentrasjon til de 17 ulike terpentypene undersøkt i granplanter av natur- og kulturforryngelse, med de ulike behandlingene; kontroll, skade, Metyljamonte (MeJa) og MeJa + skade. Svarene er oppgitt i nanogram (Ng) per gram (g) tørrvekt (TV).

Konsentrasjon terpener (Ng g ⁻¹ TV)								
	Natur				Kultur			
Terpener	Kontroll	Skade	MeJa	MeJa + Skade	Kontroll	Skade	MeJa	MeJa + Skade

3-Carene	50,3	101,5	46,9	91,8	102,3	114,5	154,6	150,4
alfa-Pinene	440	370,3	409,6	468,8	212,4	240,2	309,1	246,9
beta Pinene	515,9	511,6	452,4	629,1	287,2	286,6	386,9	362,2
beta.-Myrcene	80,4	86,1	64,5	86,5	30,5	35,9	41,8	31,7
beta.-Phellandrene	316,9	306	243,2	330,1	116,4	140,9	158,9	109,3
Camphene	15,7	12,2	10,6	12,2	12,9	13,5	15,7	13,9
Eucalyptol(1,8-Cineol)	1,8	1,7	4	4,4	0,8	0,9	3,8	2,3
gamma-Terpinene	0,8	1,7	0,8	1,4	0,9	1,4	1,7	1,2
Limonene	58,9	66,2	74,2	81,9	61,4	58,4	112,5	90,5
para-Cymene	0,4	0,6	0,3	0,7	0,2	0,2	1,5	1,1
Sabinen	14,4	18,2	13,1	20,2	11,5	13,9	18,0	16,9
Terpinolen	13	19,8	10,9	18,1	14	16,7	16,9	16,6
alfa-Gurjunene	11,8	14,0	11,5	18,3	2,7	3,2	7,1	4,6
alfa-Longipinene	12,5	17,1	13,2	13,3	5,1	7,7	7,8	8
Germacrene D	133,2	92,7	114,5	120,1	16,8	21,7	32,9	24,2
Thunbergene	93,5	92,9	87,7	114,6	43,2	56,7	36,5	47,
Verticiol	72,6	74,5	65,5	91,8	35,1	45,4	29,2	37,7



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway