



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning
Paal Krokene

Vaksinering av gran – fysiologiske og morfologiske effekter av metyljasmonat

Vaccinating Norway spruce – physiological and
morphological effects of Methyl jasmonate

Thomas Olufsen Skrautvol

Master i skogfag
Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning

Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på min mastergrad i skogfag ved Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA) og Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Denne oppgaven har gitt meg muligheten til å være med på spennende prosesser, og møte trivelige og interessante mennesker i ulike fagmiljøer ved Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO). Dette har virkelig vært en lærerik opplevelse!

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, Inger S. Fløistad (NIBIO), Melissa H. Magerøy (NIBIO) og Paal Krokene (NIBIO og NMBU) god hjelp, støtte og veiledning i over et år. Jeg har vært veldig heldig som har fått lov til å ha så dyktige og oppmuntrende veiledere. Takk også til andre tilknyttet NIBIO for hjelpen i prosessen med å gjøre denne oppgaven (Helge Meissner, Nina Elisabeth Nagy og Samuel Wilkinson).

Denne oppgaven gjøres i tilknytning til NIBIO, og har mottatt finansiering fra Borregaards Forskningsfond og NIBIO. Takk for støtten.

Jeg vil gjerne takke mine medstudenter for god oppmuntring og gode diskusjoner underveis. Avslutningsvis takker jeg mine nærmeste venner for god hjelp og støtte igjennom hele oppgaven. Også en stor takk til mine foreldre som har vært støttende hele veien.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 13. juni 2018

Thomas Olufsen Skrautvol

Sammendrag

Gran (*Picea abies*) er det viktigste økonomiske treslaget i Norge, og foryngelsen av dette treslaget kan i noen tilfeller være problematisk som en følge av skadegjørere i planteskoler og plantefelt. Vanlig gråskimmel (*Botrytis cinerea*) er en av de mest alvorlige skadegjørerne knyttet til planteskoler. I denne studien ser vi på effekten behandlinger og konsentrasjoner metyljasmonat (MJ) har på unge granplanters vekst, hvilken påvirkning MJ har på granplantenes motstandsevne mot gråskimmel, og hvorvidt MJ medfører oppregulering av ulike forsvarsrelaterte gener i gran. MJ-behandlingen førte til redusert høydevekst og årringbredde, dannelse av traumatiske kvaekanaler (TD) og redusert vekst av grove røtter. Samtidig observerte vi en økning i den organiserte innerbarken. Våre resultater viser dessuten at MJ-behandling har potensiale til å øke granas motstandsevne mot gråskimmel. Ved hjelp av «Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction» (qPCR) kvantifiserte vi mengden til seks forsvarsrelaterte gentranskripter. Foruten en forskjell i transkriptmengde for «*TPS-Car*» mellom to ulike MJ-behandlinger, fant vi ingen signifikante forskjeller ved MJ-behandling.

Abstract

Norway spruce (*Picea abies*) is in economic terms the most important tree in Norwegian forestry, and the rejuvenation of this species might in some cases become problematic because of harmful organisms in nurseries and recently established plantings. *Botrytis cinerea* is one of the most severe harmful organisms associated with nurseries. In this study, we investigate the effects of treatments and concentrations of Methyl jasmonate (MJ) on the growth of Norway spruce seedlings, the influence MJ has on the seedling resistance to *B. cinerea*, and whether MJ causes an upregulation of various defence related genes in Norway spruce. MJ treatment led to reduced height growth and growth of sapwood, formation of traumatic resin ducts (TD) and reduced growth of fresh coarse roots. We also observed an increase in the primary phloem tissue. Our results also suggest that MJ treatment has a potential to increase Norway spruce seedling resistance to *B. cinerea*. By applying the Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), we quantified the amount of six defence-related gene transcripts. Except a difference in the "*TPS-Car*" transcript between two different MJ treatments, we were unable to reveal a significant difference by MJ treatment.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1 Introduksjon	1
2 Metode.....	4
2.1 Påføring av metyljasmonat	4
2.2 Fenologiske registreringer	5
2.3 Inokulering med gråskimmel.....	5
2.4 Prøvetaking	6
2.5 Målinger av røtter og sideskudd	9
2.6 Anatomiske analyser av stammeskiver.....	9
2.7 Molekylærbiologiske analyser.....	10
2.7.1 RNA-ekstrahering og cDNA-syntese	10
2.7.2 qPCR.....	11
2.8 Statistikk	13
3 Resultater.....	14
3.1 Skuddskytingsfaser	14
3.2 MJ-effekter på vekst og biomasse	15
3.3 Symptomer etter inokulering med gråskimmel	22
3.4 Effekt av MJ på oppregulering av forsvarsrelaterte gener.....	23
4 Diskusjon.....	25
5 Konklusjon	29
6 Referanser.....	30

1 Introduksjon

Gran (*Picea abies*) er det viktigste treslaget i norsk skogbruk, og utgjør i dag over 40 % av stående kubikkmasse i norske skoger (Statistisk sentralbyrå, 2017). Videre utgjør granplanter som har vært dyrket ett til to år i planteskole, 95 % av den foryngelsen som er foretatt ved planting i Norge (Det norske Skogfrøverk, 2017). Den største andelen, 80-85 %, er toårige pluggplanter. Flere utfordringer er knyttet til dyrking av skogplanter, deriblant forekomst av skadegjørere i planteskolen. Vanlig gråskimmel (*Botrytis cinerea*) er i denne sammenheng en av de mest problematiske patogenene ved produksjon av gran (Petaisto, 2006). Soppen kan smitte planter både gjennom spalteåpninger, og sår og dødt vev på overflaten (Kamoen, 1992), og kan i en planteskole være en problematisk skadegjører på gran både i veksthus (Petaisto et al., 2004) og i forbindelse med vinterlagring (Petaisto, 2006).

En annen utfordring når gran forynges med planting, er gnag fra gransnutebille (*Hylobius abietis*) (Örlander & Nilsson, 1999). Gnaget fra denne snutebillen kan føre til at stammen blir ringbarket, og planten dør som en følge av dette. Gransnutebillen er en vanlig skadegjører i skandinaviske skogplantefelt, og dette er en av insektartene som over tid har gjort betydelig skade på barskog (Tudoran et al., 2016). Vanlig praksis for å redusere insektskader har ofte inkludert bruk av insektmidler, men av helse- og miljøhensyn har flere insektmidler blitt forbudt å bruke de siste tiårene (Luoranen et al., 2017). Forsøk har påvist høy mortalitet blant unge granplanter som ikke var påført insektmidler etter angrep fra gransnutebille (Luoranen et al., 2017; Örlander & Nilsson, 1999).

Trærs forsvarsevne påvirkes av en rekke biotiske og abiotiske faktorer. Eksempler på dette er økte mengder forsvarsstoffer hos planter etter gnag eller beiting fra insekter og andre planteetere, eller etter infeksjon av patogener. Produksjonen av forsvarsstoffer kalles også for induserbart forsvar. Dette induserbare forsvaret blir aktivert ved eksternt stress som gnag, beiting eller sykdom, og består av flere metoder som styrker de enkelte træs fremtidige forsvarsevne (Eyles et al., 2010; Pastor, 2013; Sampedro et al., 2011b; Wasternack & Hause, 2013). Når forsvaret induseres, innebærer det samtidig kostnader for planten. Ressurser som ellers brukes til vekstrelaterte prosesser blir heller allokert til det økte forsvaret, og resulterer i redusert vekst (se blant annet Steppuhn og Baldwin (2008) og Wasternack og Hause (2013)). Ekstern tilførsel av kjemiske elisitorer, som for eksempel jasmonsyre og dets metylester metyljasmonat (MJ), kan indusere forsvarsresponser tilsvarende responser etter angrep av insekter eller patogener (e.g. Pauwels et al. (2009), Schiebe et al. (2012) og Zhao et al.

(2011)). Smitte av sopp er i flere undersøkelser gjort som en modell for å teste plantenes responser etter tilførsel av slike elisitorer (e.g. Krokene et al. (2008) og Yaqoob et al. (2012)). Forsvarsrelaterte responser kan ligge latent i planten og aktiveres raskere etter et angrep (sammenfatning hos Martinez-Medina et al. (2016)), og kan sammenliknes med vaksinerings mot sykdommer. En kan si at trærne «vaksineres» mot fremtidige angrep.

Ved å påføre bartrær MJ har flere forsvarsresponser blitt påvist, deriblant dannelse av traumatiske kvaekanaler («traumatic resin ducts», TD) i stamme og røtter (Heijari et al., 2005; Huber et al., 2005; Hudgins et al., 2004; Martin et al., 2002; Schmidt et al., 2011). Disse kvaekanalene inneholder flere forbindelser som oppreguleres og bidrar i trærnes forsvar, primært mono- og diterpener (Heijari et al., 2005; Huber et al., 2005; Martin et al., 2002; Moreira et al., 2012b). Mono- og diterpener er blant komponentene i oleoresin, den seigtflytende væsken som kan observeres ved sår og infeksjoner på plantene (e.g. Phillips og Croteau (1999); Schmidt og Gershenzon (2007)). Videre har en tidligere observert at MJ påvirker andre fysiologiske trekk, som redusert høyde- og diametervekst og lavere skudd- og rotbiomasse (sammenfattet av Moreira et al. (2012b)). Samtidig har også en økning av finrøtter blitt observert etter MJ-behandling (Moreira et al., 2012b).

Flere gener som koder for ulike typer forsvar har blitt påvist oppregulert hos planter behandlet med MJ (Creelman & Mullet, 1997; Schmidt et al., 2011). I gran er *Chi4*, *TPS-Car* og *C4H*, eksempler på ulike gener som er oppregulert etter behandling med MJ (Fossdal et al., 2012; Hietala et al., 2004; Zulak et al., 2009). *Chi4* oppreguleres primært etter soppangrep, og bidrar til degradering og ytterligere forsvar mot disse (Hietala et al., 2004). *TPS-Car* er også påvist induert etter soppangrep, og dette genet bidrar i syntetiseringen av oleoresin (Martin et al., 2002; Zulak et al., 2009). *C4H* er et av flere gener involvert i produksjonen av monolignoler, som utgjør komponenter i produksjonen av lignin (Fossdal et al., 2012). Økte nivåer av lignin og gener tilknyttet ligninproduksjon i gran er tidligere påvist etter skade og inokulering (Koutaniemi et al., 2007). Antifungal ginkbilobin og Defensin er begge relatert til forsvarsresponser mot sopp (Magerøy et al., 2018). Metallothionen oppreguleres ved abiotisk stress og som en forsvarsrespons sammen med andre stressrelaterte gener (Magerøy et al., 2018; Yakovlev et al., 2006). I forbindelse med analyser av gran er ofte gener som *Actin* og *Alpha-Tubulin (α-Tub)* benyttet som referanser («housekeeping genes»), da disse er relativt konstant tilstede i gran uavhengig av behandling (Hietala et al., 2004; Yakovlev et al., 2006).

Målet med denne studien var å undersøke effekten av induisert forsvar med MJ på unge granplanters utvikling, og samtidig vurdere om dette har en effekt på grans forsvarssystemer i møte med skadegjørere i en planteskole eller et plantefelt. Ved å utføre kontrollerte forsøk på unge granplanter, kan vi undersøke hvordan MJ påvirker disse med hensyn på vekst og motstandsevne. Forskningsspørsmålene var: (1) Hvordan kan ulike behandlinger og konsentrasjoner av MJ påvirke plantenes utvikling? (2) Kan vi forvente at MJ øker unge granplanters motstandsevne mot en skadegjører som vanlig gråskimmel? (3) Vil MJ føre til en oppregulering i forskjellige kjente forsvarsrelaterte gener hos gran? Ved å besvare disse spørsmålene vil vi kunne bidra til økt kunnskap om hvorvidt induisert forsvar kan benyttes i bekjempelse av sykdommer og skadedyr på et tidlig og kritisk stadium i granas liv.

2 Metode

Planter som var dyrket ved Telemark Skogplanter AS, ble den 22. mai 2017 plantet i enkeltpotter (9 x 9 x 10 cm). Totalt var det 180 gran av typen toårig M60 (75 cm³ pottevolum og tetthet 500 planter per m²). Plantene var forhåndsbehandlet med insektmiddelet Merit Forest (virksomt stoff: imidacloprid) i planteskolen. Tjærbo plantejord (gjødslet torv) ble benyttet i pottene. Plantene ble fordelt på tolv brett, med 15 potter på hvert brett. Brettene ble plassert i et vekstroom ved Senter for klimaregulert planteforskning, ved konstant temperatur og fuktighet (20 °C, 60 % relativ fuktighet) og 20 timers daglengde. Hver plante ble vannet med omtrent 1-2 desiliter vann tre ganger per uke i hele forsøksperioden, og brettene ble rullert (alle brett ble flyttet en plass mot høyre) ved hver vaning for å minimere effekten av ulike lysforhold i vekstroomet.

Forsøket gikk over en periode på omtrent tre måneder, fra slutten av mai til midten av august: Den 31. mai 2017 ble plantene behandlet med ulike konsentrasjoner av metyljasmonat (MJ) (Sigma-Aldrich® 392707, USA) i løsning med vann og Tween20 (TW20) (Sigma-Aldrich® P9416, USA), for å aktivere forsvaret. Omtrent fem uker senere (3. juli) ble halvparten av plantene inokulert med sopp for å teste resistens etter behandling. Morfologiske egenskaper som skuddskyting og høyde ble målt ved oppstart av forsøket (31. mai), og i forbindelse med inokulering. Omtrent en måned etter inokulering (den 10. august) ble plantenes resistens skalert og vurdert. Avslutningsvis (den 10. august) tok vi prøver for å vurdere effekter av MJ på plantenes vekst, samt ulike vevsprøver til molekylærbiologiske analyser.

2.1 Påføring av metyljasmonat

Behandlingene ble gjennomført den 31. mai og besto i å gi plantene én av seks behandlinger; til sammen to brett med totalt 30 planter for hver behandling (tabell 1). Både løsningene med og uten MJ ble tilsatt 1 % TW20. Denne surfaktanten bidrar til at MJ løses opp i vann og får en jevnere spredning i løsningen. Da det er påvist en svak forsvarsinduserende effekt av Tween (Moreira et al., 2009), ble også kontrollplantene behandlet med TW20. Ved vaning ble 100 ml løsning vannet ovenfra, og ved spray ble 30 ml løsning påført jevnt over hele planten med en sprayflaske. Behandling med spray ble foretatt utendørs, og etter behandling fikk overflødig væske fordampe før plantene ble flyttet tilbake til vekstroomet.

Tabell 1: To år gamle granplanter ble påført metyljasmonat (MJ) ved én av seks behandlinger. Behandling nr. 1 og 4 utgjør kontroll for hhv. påføring gjennom å vanne og spraye plantene. Alle behandlingene inneholdt 1 % Tween 20 (TW20). Ved vanning ble hver potte tilført 100 ml løsning ovenfra, mens ved spray ble hver plante sprayet jevnt med til sammen 30 ml løsning. Totalt var det 15 planter per brett, og to brett per behandling.

Behandling nr.	Behandling	Konsentrasjon (mM MJ)	Mengde løsning per behandling (ml)
1	Vanning	0 (kontroll)	100
2	Vanning	10	100
3	Vanning	50	100
4	Spray	0 (kontroll)	30
5	Spray	10	30
6	Spray	50	30

Alle plantene ble den 1. juli tilført nitrogen (N) ved vanning ovenfra av en kalsiumnitratløsning ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) med 15,5 % nitrogenkonsentrasjon.

2.2 Fenologiske registreringer

I dette forsøket ble skuddskyting registrert to ganger, den 31. mai og 6. juli. Skuddskyting ble registrert av én person ved visuell inspeksjon med bruk av linjal, etter Fløistad og Kohmann (2001): 0 = hvilende knopper; 1 = knoppene er litt svullet; 2 = knoppene er svullet, men knoppskjellene dekker nålene; 3 = nye nåler er avdekket men har ikke strukket seg; 4 = nye nåler har strukket seg inntil 5 mm, men er fremdeles samlet; 5 = nålene har strukket seg mellom 5 og 10 mm og nålene spriker; 6 = nålene har strukket seg mellom 10 og 15 mm; 7 = nålene har strukket seg mellom 15 og 20 mm; 8 = skadd knopp, toppknopp bryter ikke; 9 = død plante. Hver plantes høyde ble målt to ganger i forsøksperioden: 31. mai og 9. juli.

2.3 Inokulering med gråskimmel

Vanlig gråskimmel fra isolat (nr. 1983-145/1 ved soppkultursamling ved Norsk institutt for bioøkonomi), ble etablert på petriskåler med potet-dekstrose-agar (PDA) og lagret ved omtrent 20 °C frem til bruk. Sporene ble løst ved å pipettere en løsning med destillert vann (H_2O) og 0,02 % TW20 på soppkulturen og deretter skrape kulturen forsiktig med spatel. Løsningen ble så filtrert gjennom dobbelt filter (engelsk: «double gauze») for å unngå

soppmycelet. Deretter ble løsningen fortynnet med potet-dekstrore-buljong (PDB, Sigma-Aldrich® P6685, USA) til 5×10^5 sporer/ml. Løsningen ble så inkubert ved 28 °C i én time.

Små sår ble laget på hver enkelt stamme ved å rive av fem nåler fra et samlet område øverst på fjorårsskuddet. Dette ble foretatt den 3. juli. Bomullstykker med en størrelse omtrent lik 2 cm x 7 cm ble vætet med 4 ml løsning, og bomullen ble så plassert rundt stammen slik at den dekket sårene og hang fast. Deretter ble en plastpose (6 liter i volum) tredd over planten, og en strikk plassert utenpå posene nederst på hver stamme stammen holdt dette på plass.

Plastposer ble benyttet for å oppnå høyere luftfuktighet. Av alle brett med ulike MJ-behandlinger, ble ett brett per behandling inokulert som beskrevet med gråskimmel. Som kontroll ble resterende brett behandlet tilsvarende med bomull vætet med 4 ml løsning av PDB og 0,02 % TW20. Plastposene ble fjernet 14. juli, etter elleve dager. Brett med planter med og uten smitte ble heretter holdt adskilt for å unngå smitte.

Skade etter inokulering ble registrert av én person ved visuell inspeksjon etter om lag fem uker (den 10. august). De registrerte skadene ble fordelt i følgende kategorier: 0 = Ingen skader (maks enkelte døde eller misfargede nåler); 1 = sideskudd er døde eller synlig infiserte; 2 = toppskudd og øvre grenkrans er døde; 3 = mer enn halvparten av planten er død eller synlig infisert.

2.4 Prøvetaking

På grunn av døde planter ved vanning av MJ og lite respons ved inokulering av gråskimmel, valgte vi ved forsøket slutt (10. august) å ta vevsprøver av plantene som verken var inokulert med gråskimmel eller vannet med MJ (figur 1). Årets toppskudd ble klippet av, og skuddspissen med sideknopper ble fjernet. Toppskuddet ble deretter dyppet i flytende nitrogen, slik at nålene lettere kunne løsnes. Alle nålene ble samlet, pakket i aluminiumsfolie, lagt på flytende nitrogen og senere lagret i fryser ved -80 °C. Barken ble separert fra veden, lagt i aluminiumsfolie og behandlet på samme måte som beskrevet for nålene. Ved dobbeltopper ble det kun tatt prøver av det høyeste toppskuddet.

De ti øverste av årets sideskudd ble klippet av, lagt i papirposer og satt i romtemperatur i inntil fem måneder. Døde sideskudd uten nåler ble ekskludert. For å oppnå totalt ti skudd per plante ble også årets skudd på de øverste av fjorårets sideskudd i enkelte tilfeller benyttet.

Stammen ble så klippet rett ovenfor overgangen mellom 2015- og 2016-skuddene. Alle nåler fra nederst på 2016-stammen opp til første sideskudd ble samlet og lagret på samme måte som

nålene fra toppskuddet. Stammeprøvene, som utgjorde nederste del av 2016-skuddet (ca. 1 cm), ble lagret i fryser ved -26 °C for senere anatomiske analyser.

Pottene med stubber og røtter ble lagret kjølig (ca. 4 °C) i opptil to måneder. Pottene ble så fjernet, jordklumpen ble delt i to like deler før halve jordvolumet ble vasket bort og all ny rotvekst utenfor den opprinnelige rotpluggen ble klippet av, lagt i vann og lagret opptil to dager ved ca. 4 °C.

Det ble ikke tatt prøver av døde planters røtter, nåler og skudd.



Figur 1: Det ble tatt prøver og utført målinger av ulike deler av plantene: Årets toppskudd (1.) ble høstet, og nåler, bark og ved deretter separert. Ved dobbelttopp ble det kun tatt prøver av det høyeste skuddet. Videre høstet vi de ti øverste av årets sideskudd (2.). I noen tilfeller ble også årets skudd på de øverste av fjorårets sideskudd høstet. Den nederste biten (ca. 1 cm) av fjorårets vekst (3.) ble høstet for anatomiske analyser av stammen. Også de nederste av nålene på stammen fra 2016 ble høstet (også 3.). Til sist benyttet vi også årets rotvekst (rotsystemet/potten markert som nr. 4) til videre analyser.

2.5 Målinger av røtter og sideskudd

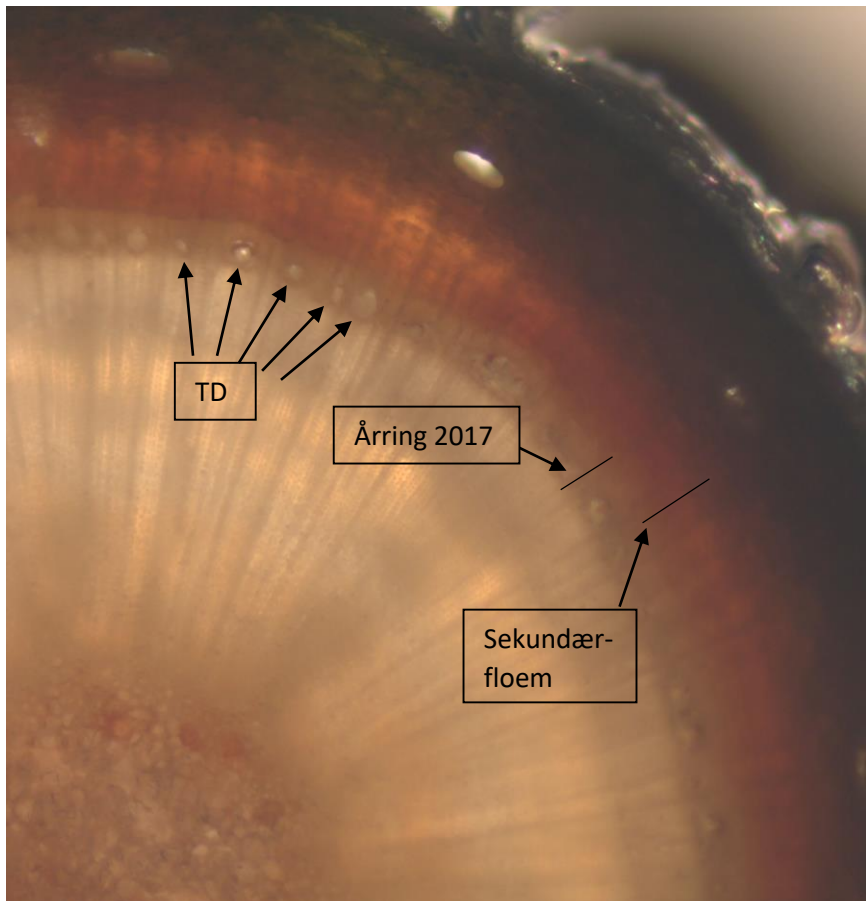
Rotprøvene ble lagt i vannbad og scannet med en Epson Expression 11000XL (Epson America Inc.), deretter analysert med programmet WinRhizo V2013a (Régent Instruments Inc., Canada). Ved hjelp av WinRhizo ble røttenes lengder målt og deretter klassifisert i følgende klassert etter røttenes diameter: 0-0,39 mm; 0,4-0,79 mm; 0,8-1,19 mm; 1,2-1,59 mm; 1,6-1,99 mm; ≥ 2 mm. Røttene ble så lagt i papirposer og satt i romtemperatur i inntil fire måneder.

For å bestemme tørrvekt, ble røtter og sideskudd tørket i et lufttørkeskap ved 65 °C i 24 timer. Deretter ble de temperert i én time før veiing med en Mettler-Toledo PB602 (Mettler-Toledo GmbH, Sveits) vekt med målenøyaktighet 0,01 g.

2.6 Anatomiske analyser av stammeskiver

Stammeprovne ble kuttet med barberblad i tynneste mulige tverrsnitt, og lagt på objektglass uten vann og dekkglass. Deretter ble de analysert under mikroskop (Leica Type 020-525.732, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Tyskland) med hjelp av datamaskin med måleverktøy i programmet Leica Application Suite V4.0 (Leica Microsystems Limited, Sveits). Prøvene fra behandling 6 (50 mM MJ spray) ble analysert under 5x forstørrelse, de øvrige to (kontroll og 10 mM MJ) ble analysert under 2,5x forstørrelse. Målinger av ulike parametere tok hensyn til ulikhetene i forstørrelse.

Den runde stammen ble tilfeldig plassert på objektglasset, og den del av mikroskopibildet som dekket $\frac{1}{4}$ av snittet fra 0° til 90° ble undersøkt. Den tangentielle bredden av det undersøkte området (fra 0° til 90°) ble målt. For traumatiske kvaekanaler (TD) i 2017-årringene ble den tangentielle bredden av alle TD i det samme området målt. Radial lengde for årringen fra 2017, samt tykkelsen på det sekundære floemet (den organiserte innerbarken), ble også målt. Dette er illustrert i figur 2.



Figur 2: ¼ av et tverrsnitt i 2,5x forstørrelse. Følgende målinger ble foretatt i ¼ av tverrsnittet: den tangentielle bredden av alle traumatiske kvaekanaler (TD) dannet i 2017; 2017-årringens bredde (radiallengde); tykkelsen (radiallengden) på den organiserte innerbarken (sekundærfloem). I tillegg ble den tangentielle bredden av 2017-årringen i hele det undersøkte området målt.

2.7 Molekylærbiologiske analyser

«Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction» (qPCR) ble brukt for å kvantifisere mengden av utvalgte forsvarsrelaterte gentranskripter i enkelte prøver. For å begrense antallet prøver, analyserte vi tre typer vev (årets nåler, fjorårets nåler, bark) fra tre planter sprøytet med tre ulike konsentrasjoner av MJ (0, 10 og 50 mM).

2.7.1 RNA-ekstrahering og cDNA-syntese

Prøvene ble tatt opp fra -80 °C fryseren og knust til et fint pulver ved hjelp av pistill og morter nedkjølt av flytende nitrogen. RNA ble ekstrahert fra omtrent 5 mg av pulveret ved

bruk av MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre®, USA) i henhold til produsentens protokoll, men med følgende endringer:

8E – «Tissue Samples»:

2. Benyttet 600 µl istedenfor 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution, pluss 1.5 mg Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Sigma Chemical P-5288, USA) og 3µl 2-Mercaptoethanol (βMe) (Sigma M3148, Tyskland).
4. Tilsatte 605 µl Tissue and Cell Lysis Solution samt Proteinase K, PVP og βMe i mikrosentrifugerøret med ca. 5 mg pulver, istedenfor 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution og Proteinase K.
5. Inkuberte ved 56 °C, istedenfor 65 °C. Deretter sentrifugert ved 4 °C i 10 minutter, og overførte supernatant til nytt rør.

8F – «Precipitation of Total Nucleic Acids»:

1. Tilsatte 250 µl MPC Protein Precipitation Reagent til supernatant, istedenfor 150 µl.
4. Tilsatte 900 µl istedenfor 500 µl isopropanol.
8. Resuspenderte nukleinsyrene i 35 µl nukleasefritt vann (H₂O).

Konsentrasjonen av isolert RNA ble målt med et NanoDrop™ 2000 spektrofotometer (NanoDrop Technologies, Inc., USA). Deretter syntetiserte vi cDNA ved å bruke Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (Thermo Fisher Scientific Inc. K1671, USA) i henhold til medfølgende protokoll. Innledningsvis ble prøvene normalisert slik at hver prøve inneholdt 2 µg RNA (i henhold til protokoll), med unntak av én prøve som maksimalt inneholdt 1,35 µg RNA.

2.7.2 qPCR

Mengdene av hvert transkript ble bestemt med qPCR. Vi startet med å lage et arbeidslager for cDNA: alle prøvene ble fortynnet i vann til 14 ng cDNA per prøve. Deretter lagde vi et arbeidslager for hvert av de åtte primerne (tabell 2), med en konsentrasjon tilsvarende 1µM forward og reverse primer. Reaksjonene ble utført med totalt volum på 15 µl: 3,5 µl cDNA (14 ng), 4 µl forward og reverse primer (1 µM), og 7,5 µl Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, Litauen).

RT-PCR-maskinen ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) ble brukt med en plate med 96 brønner. Følgende sykluser ble benyttet: 95 °C i 20 sekunder, 95 °C i 1 sekund i 40 sykler, 60 °C i 20 sekunder, 95 °C i 15 sekunder, 60 °C i 60 sekunder, og til slutt

95 °C i 15 sekunder. To tekniske replikaer ble benyttet for hver prøve. Som kontroll på hvert brett ble fem brønner (én brønn per primer) ble tilsatt 3,5 µl H₂O istedenfor cDNA, og én brønn per brett tilsatt kun 15µl H₂O.

Av resultatene fra RT-PCR-maskinen, benyttet vi Ct-verdiene videre. En Ct-verdi angir det antall sykluser som må til før fluorescensen i en prøve har passert den terskelverdien som kan oppdages av RT-PCR-maskinen. Det innebærer at høye Ct-verdier angir lite transkriptmengde i prøven som måtte kopieres opp gjennom mange sykluser. Tilsvarende angir lave Ct-verdier høy transkriptmengde, som ikke måtte oppkopieres igjennom mange sykluser for å nå terskelverdien. For brønner hvor transkriptmengden aldri nådde terskelverdien i RT-PCR-maskinen, benyttet vi 40 som Ct-verdi. Dette fordi maskinen kjørte 40 sykluser.

Referansegenene («housekeeping genes») som ble benyttet var *Actin* og *Alpha-tubulin*. Transkriptmengden (Δ Ct) og den relative endringen i transkriptmengde ($\Delta\Delta$ Ct) ble beregnet etter komparativ Ct-metodikk, som beskrevet i (Applied Biosystems, 2008). Ct-verdiene vi brukte er gjennomsnittet for tre biologiske replikaer (som utgjøres av gjennomsnittet av de to tekniske replikaene). Den relative endringen i transkriptmengde ble beregnet ved å subtrahere Δ Ct-verdiene til kontroll (0 mM MJ) fra Δ Ct-verdiene til henholdsvis 10 mM MJ og 50 mM MJ.

Tabell 2: Primersekvensene for de seks forsvarsrelaterte gentranskriptene, samt referansegenene Actin og Alpha-tubulin, som ble brukt i qPCR. Primere er oppgitt i retningen 5'-3'.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Referanse
<i>Actin</i>	TGAGCTCCCTGATGGGCAGGTGA	TGGATACCAGCAGCTTCCATCCCAAT	(Yakovlev et al., 2006)
<i>Alpha-tubulin (a-Tub)</i>	GGCATAACGGCAGCTCTTC	AAGTTGTTGGCGG CGTCTT	(Hietala et al., 2004)
<i>Chitinase 4 (Chi4)</i>	GCGAGGGCAAGGGATTCTAC	GTGGTGCCAAAT CCAGAAA	(Hietala et al., 2004)
<i>Terpene synthase 3-carene (TPS-Car)</i>	GGTGGTACCAGGCAGACAGG	CAGTGTAGCCATCTCGATAATTGT	(Zulak et al., 2009)
<i>Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)</i>	GCGATTCTTCGAGGAGGAGAA	CCCCACACCGAAGGGTAGA	(Fossdal et al., 2012)
<i>c244192_g1_i1 (Antifungal ginkbilobin)</i>	GGGGTTTGCAAGCAGTCAAT	GCTCGTAGCGGATGAAACAG	(Magerøy et al., 2018)
<i>asmb1_179419 (Metallothionen)</i>	GAACAGCCAAGGCGGTATCT	ACCGTCTATCTGGAAGCCCT	(Magerøy et al., 2018)
<i>asmb1_217836 (Defensin)</i>	CCAAGGGAGTTGGAAACCGA	GGAAATCCCTCAGTTCGGCA	(Magerøy et al., 2018)

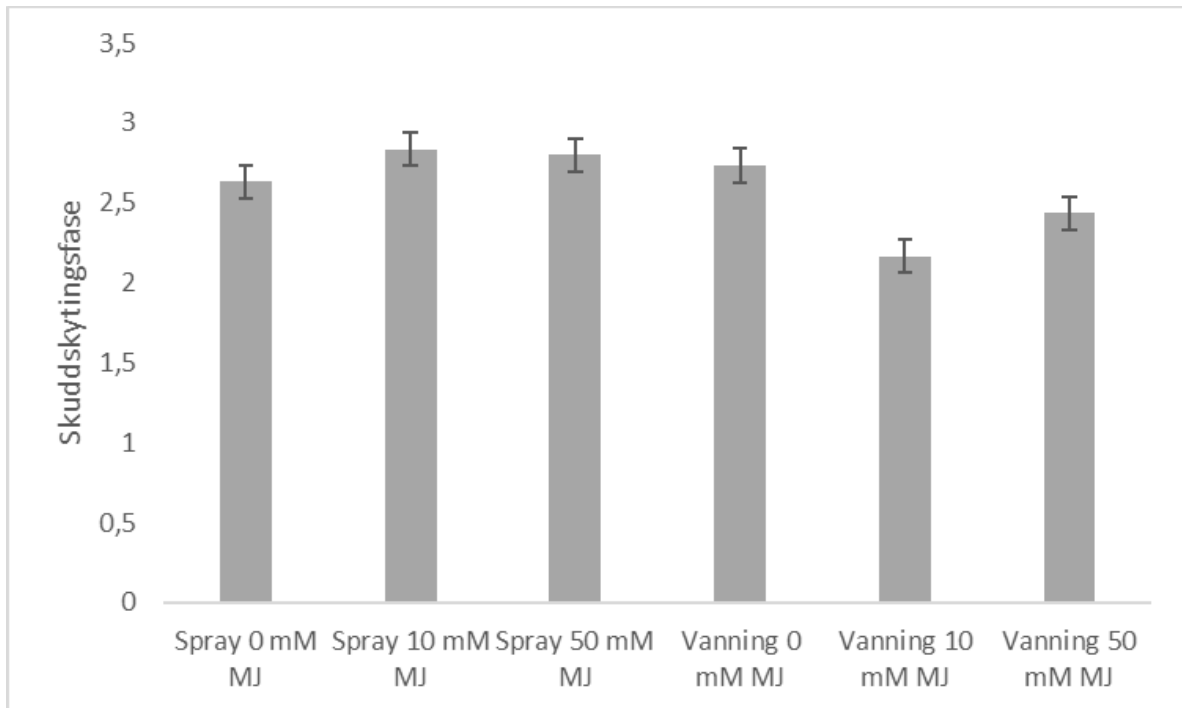
2.8 Statistikk

Alle statistiske tester ble gjennomført i R Studio (RStudio, USA). Alle residualer ble testet for normalfordeling med en Shapiro-Wilk normalitetstest. Ved $p > 0,05$ er det ingen påvist forskjell mellom fordelingen av egne data og en normal fordeling, og en kan anta at dataene er normalfordelte. Med normalfordelte data, ble enveis variansanalyse (ANOVA) benyttet. Verdier ble her ansett som signifikante når $p < 0,05$. Videre ble Tukey's HSD test brukt for å identifisere statistiske forskjeller mellom ulike behandlinger. For data som ikke var normalfordelte, ble Wilcoxon test og Kruskal-Wallis enveis ANOVA benyttet for henholdsvis to og flere parametere. Videre benyttet vi «Pairwise Wilcoxon test» for å identifisere statistiske forskjeller mellom ulike data etter Kruskal-Wallis enveis ANOVA.

3 Resultater

3.1 Skuddskytingsfaser

Ingen signifikante forskjeller kunne påvises i tidspunkt for bryting ved tidspunkt for første behandling (figur 3). Gjennomsnittsfasen var mellom to og tre for alle behandlinger og konsentrasjoner, hvilket utgjør fasene før nye nåler strekker seg.

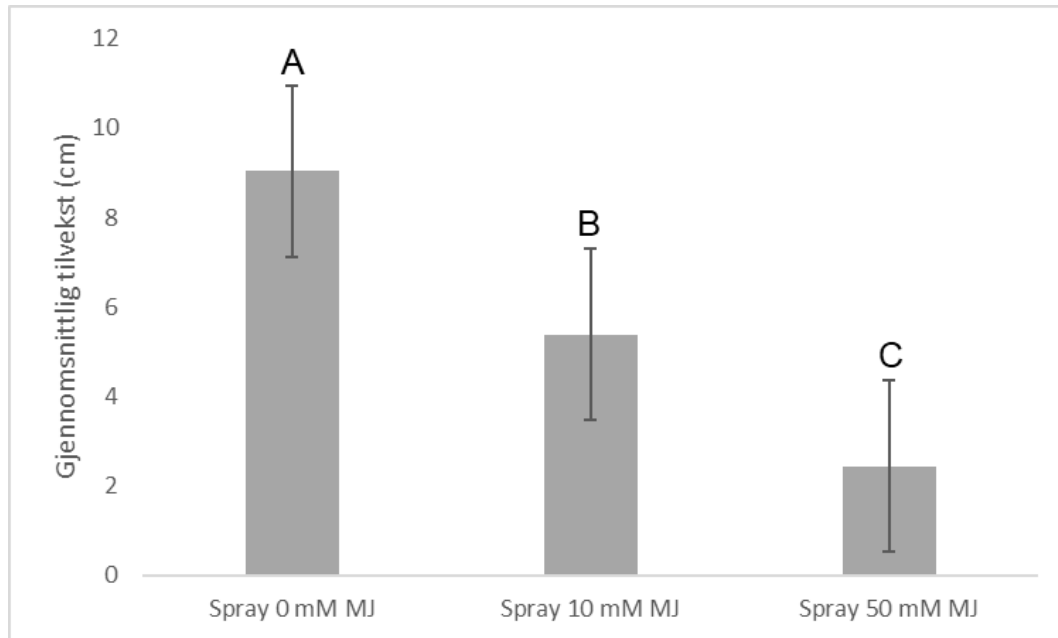


Figur 3: Gjennomsnittlig skuddskytingsfase (på en skala fra 0 til 9, se metodedelen for detaljer) for toårige granplanter samme dag som plantene ble behandlet med metyljasmonat (MJ). Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil for 30 planter per behandling. Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlinger ($P = 0,213$ etter Kruskal-Wallis).

Den 9. juli, ved andre gangs registrering av skuddskyting, var alle plantene vannet med 50 mM MJ enten døde eller hadde skadde skadd toppknopp (henholdsvis fase 9 og 8 etter Fløistad & Kohman (2001)). Mange av plantene vannet med 10 mM MJ var også skadde eller døde på samme vis (47 %). Videre undersøkelser ble derfor kun gjort på plantene behandlet med spray, hvor mortaliteten var vesentlig lavere (henholdsvis 0 % og 13 % for 10 og 50 mM MJ).

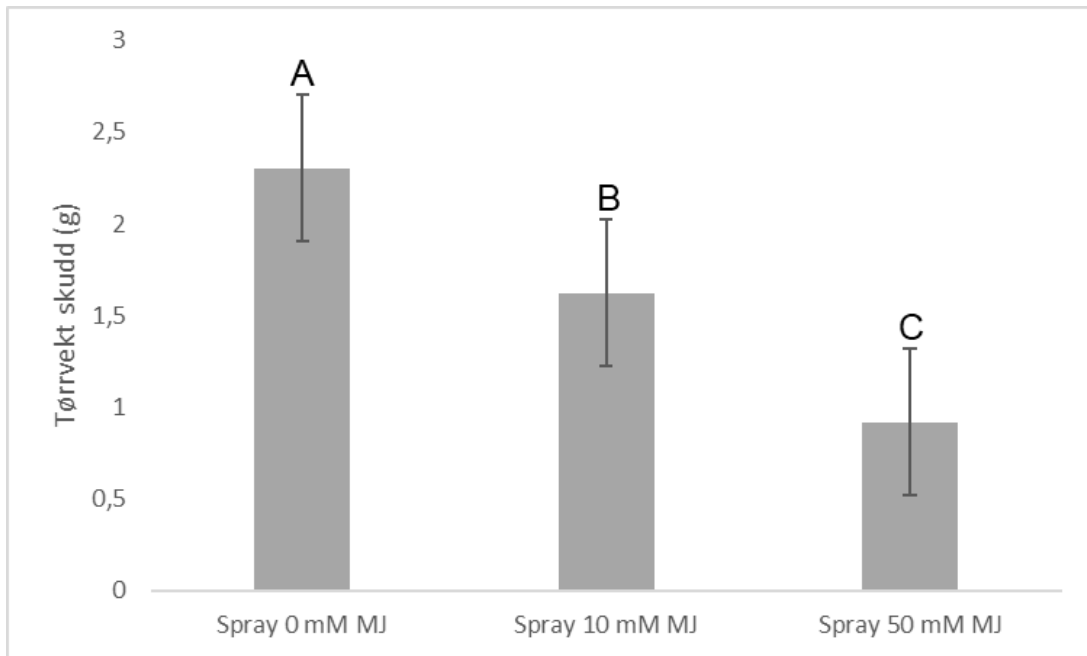
3.2 MJ-effekt på vekst og biomasse

Høydetilvekst i perioden mellom påføring av MJ og ny måling i juli, var signifikant lavere ved høyere konsentrasjon av MJ. Alle tre behandlinger viste signifikante forskjeller i vekst (figur 4).



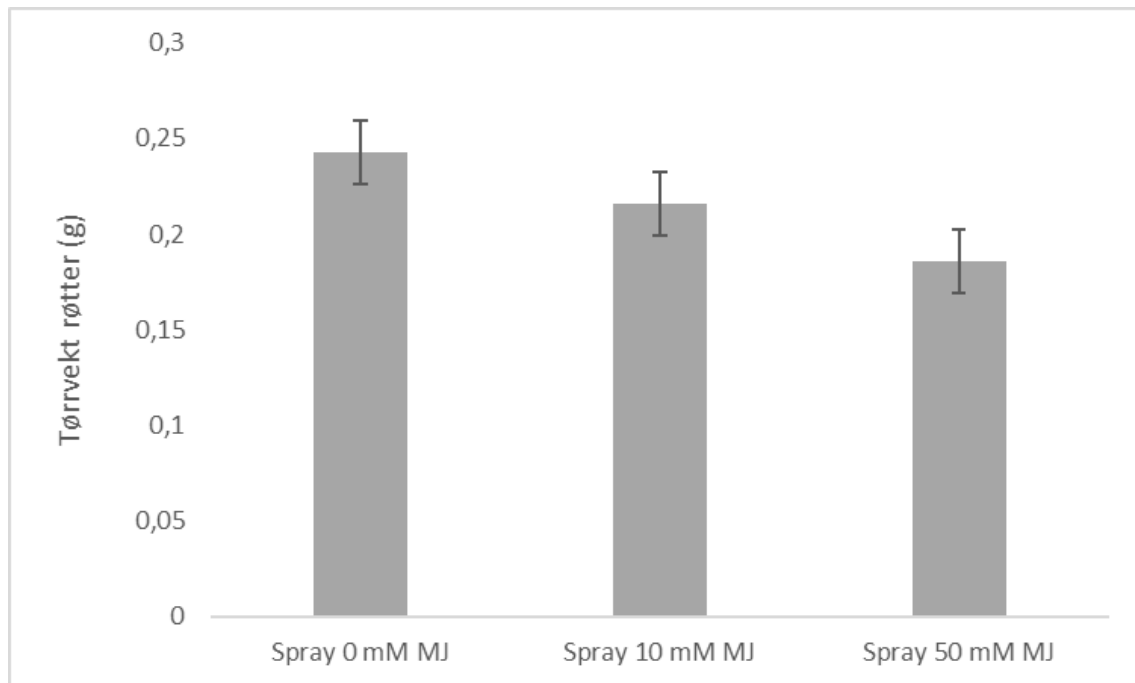
Figur 4: Høydetilvekst for kontroll og ulike behandlinger metyljasmonat (MJ) i perioden 31. mai 2017 - 9. juli 2017. Søylen viser gjennomsnittsverdier og standardfeil for 30 planter per behandling. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA, og Tukey's HSD test ved $P < 0,05$).

Gjennomsnittlig tørrvekt for sideskudd var signifikant forskjellig mellom alle behandlinger (figur 5). Høyere konsentrasjon MJ ga betydelig lavere vekt av sideskudd, og tørrvekten i planter sprøytet med 50 mM MJ var kun 40 % av vekten i kontrollplantene.



Figur 5: Tørrvekt (g) av ti sideskudd per plante, for kontroll og ulike konsentrasjoner av metyljasmonat (MJ). Søylene viser gjennomsnittsverdier og standardfeil for 15 planter per behandling (14 planter for 50 mM MJ). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA, og Tukey's HSD test ved $P < 0,05$).

Planter sprøytet med ulike konsentrasjoner av MJ hadde en svak reduksjon i tørrvekt av årets nye rotvekst sammenliknet med ubehandlede kontrollplanter, men det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene (figur 6).



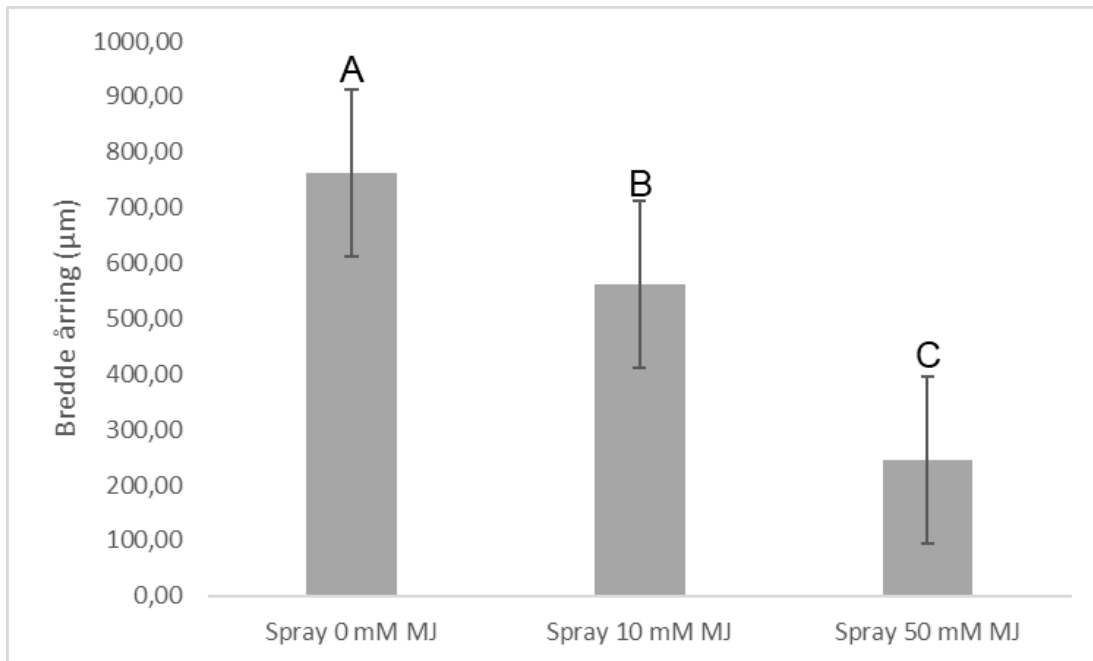
Figur 6: Tørrvekt (g) av halvparten av årets nye rotvekst, fordelt på ulike behandlinger av metyljasmonat (kontroll, 10 og 50 mM MJ). Søylene angir gjennomsnittsverdier og standardfeil for 14 planter per behandling (15 planter for 0 mM MJ). $P = 0,475$ etter ANOVA.

Totalt sett var det ingen signifikante forskjeller mellom lengden på årets rotvekst ved ulike konsentrasjoner MJ. Etter behandling av MJ var det ingen signifikant forskjell på røttenes lengde mellom de fineste diameterklassene (rotdiameter < 0,8 mm; tabell 3). Ved diameterklasse 0,8 - 1,19 mm var derimot konsentrasjonene 10 og 50 mM MJ signifikant forskjellige fra hverandre, men ikke fra 0 mM MJ. For grovere røtter var gjennomsnittlig lengde langt kortere ved 50 mM MJ enn ved 0 mM MJ.

Tabell 3: Gjennomsnittlig lengde \pm standardfeil for ulike diameterklasser og ulike behandlinger (kontroll, 10 og 50 mM metyljasmonat). Hver behandling hadde 15 planter (14 planter for 50 mM MJ). Ulike bokstaver innen hver diameterklasse tilsvarer en signifikant forskjell mellom behandlingene (Kruskal-Wallis, og Pairwise Wilcoxon test ved $P < 0,05$).

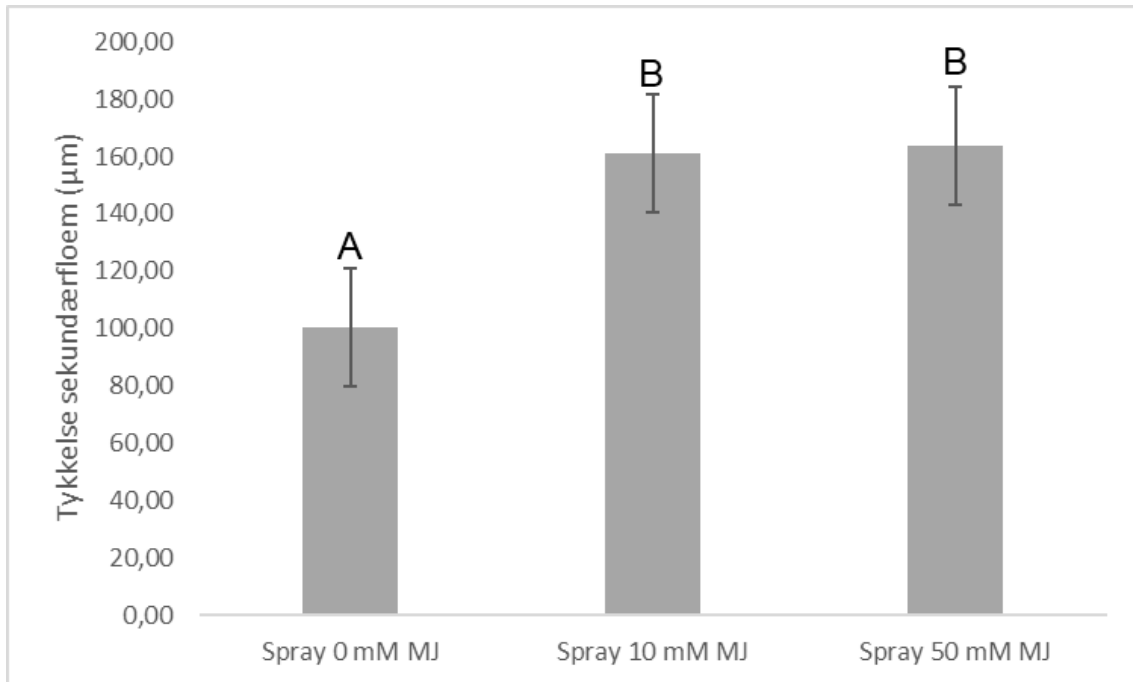
Diameterklasser (mm)	Konsentrasjon			P
	0 mM MJ	10 mM MJ	50 mM MJ	
0 - 0,39	448,4 \pm 38,0 A	381,8 \pm 39,0 A	301,1 \pm 58,0 A	0,0567
0,4 - 0,79	309,3 \pm 22,4 A	318,8 \pm 26,9 A	236,0 \pm 36,4 A	0,2302
0,8 - 1,19	78,9 \pm 8,1 AB	90,1 \pm 12,3 A	45,0 \pm 9,3 B	0,0294
1,2 - 1,59	16,6 \pm 2,5 A	14,7 \pm 2,8 A	7,1 \pm 2,0 B	0,0089
1,6 - 1,99	6,6 \pm 1,0 A	3,8 \pm 0,8 AB	1,9 \pm 0,7 B	0,0005
≥ 2	4,9 \pm 0,9 A	1,9 \pm 0,5 B	0,8 \pm 0,3 B	0,0003
Totalt	864,7 \pm 65,5 A	811,0 \pm 71,2 A	592,0 \pm 103,0 A	0,0499

Årringbredder for alle MJ-konsentrasjoner var signifikant forskjellige, og bredden var lavere ved høyere konsentrasjon (figur 7). Eksempelvis hadde planter behandlet med 50 mM MJ kun 32 % av årringbredden til kontrollplantene.



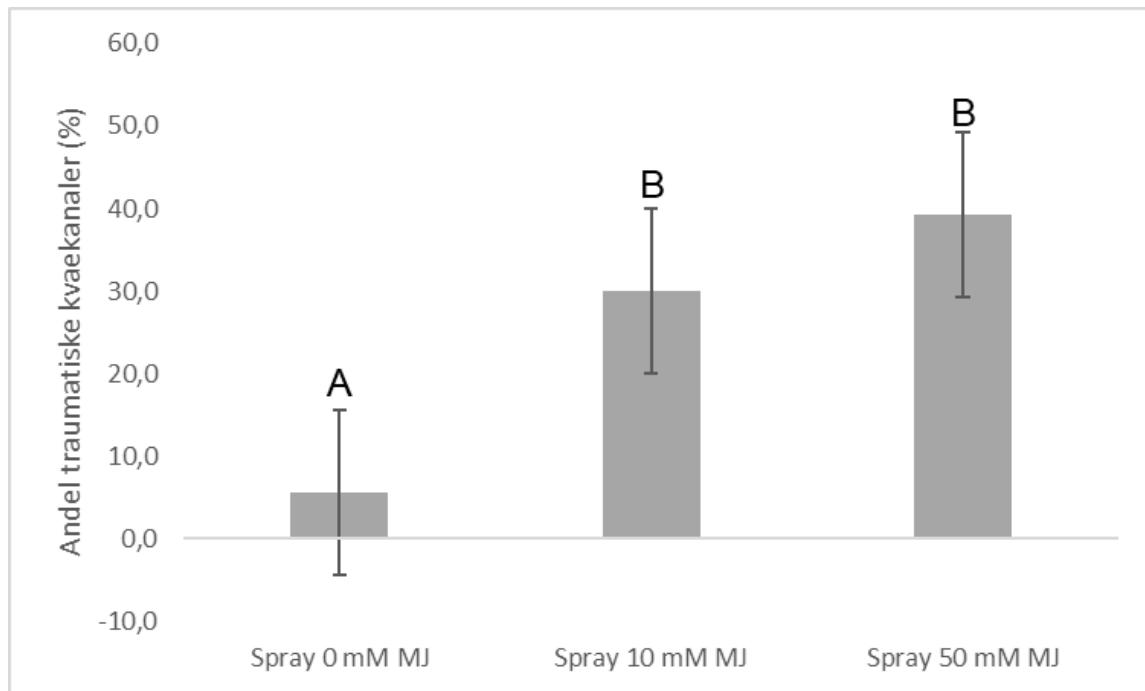
Figur 7: Radial lengde av siste års tilvekst av yteved (årringbredd), fordelt på ulike behandlinger (kontroll, 10 og 50 mM metyljasmonat). Søylene viser gjennomsnittsverdier og standardfeil for 15 planter per behandling. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA, og Tukey's HSD test ved $P < 0,05$).

Tykkelse av den organiserte innerbarken (sekundærfloem) ved påføring av MJ var signifikant større enn kontrollbehandlingen (0 mM MJ), men ingen forskjell ble påvist mellom 10 mM MJ og 50 mM MJ (figur 8). Den organiserte innerbarken til kontrollplantene hadde kun 61 % av tykkelsen til plantene som var behandlet med 50 mM MJ.



Figur 8: Den organiserte innerbarkens (sekundærfloem) tykkelse, fordelt på ulike behandlinger (kontroll, 10 og 50 mM metyljasmonat). Søylene viser gjennomsnittsverdier og standardfeil for 15 planter per behandling. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA, og Tukey's HSD test ved $P < 0,05$).

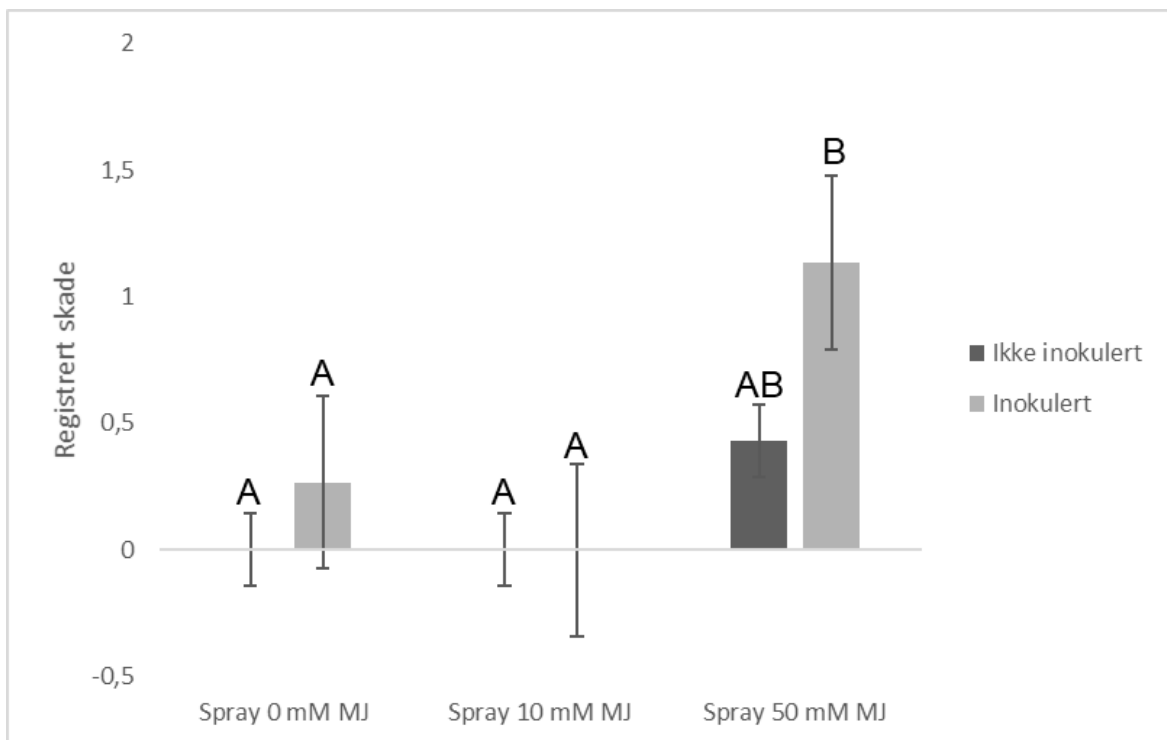
Behandlingene med MJ ga signifikant større dekning av TD enn kontrollbehandlingen (figur 9). Ingen signifikant forskjell ble påvist mellom 10 og 50 mM MJ.



Figur 9: Prosentvis dekning av traumatiske kvaekanaler (TD), fordelt på ulike behandlinger (kontroll, 10 og 50 mM metyljasmonat). Søylene viser gjennomsnittsverdier og standardfeil for 15 planter per behandling. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene (ANOVA, og Tukey's HSD test ved $P < 0,05$).

3.3 Symptomer etter inokulering med gråskimmel

Planter som var inokulert med soppen gråskimmel hadde noe mer symptomer enn ikke-inokulerte kontrollplanter (figur 10). Det var kun signifikante forskjeller i skade mellom inokulerte planter behandlet med 50 mM MJ og andre planter med lavere eller ingen konsentrasjon av MJ. For kontroll og 10 mM MJ var det ingen signifikante forskjeller i symptomer mellom inokulerte og ikke-inokulerte planter, men en trend med noe høyere skade hos inokulerte kunne observeres. Skalaen strekker seg fra 0 til 3, og de fleste registrerte skadene er innen kategori 1 (synlig infeksjon eller døde sideskudd). Enkelte skader innen kategori 2 (bl.a. døde toppskudd) kunne også observeres blant de inokulerte plantene med den høyeste dosen MJ.

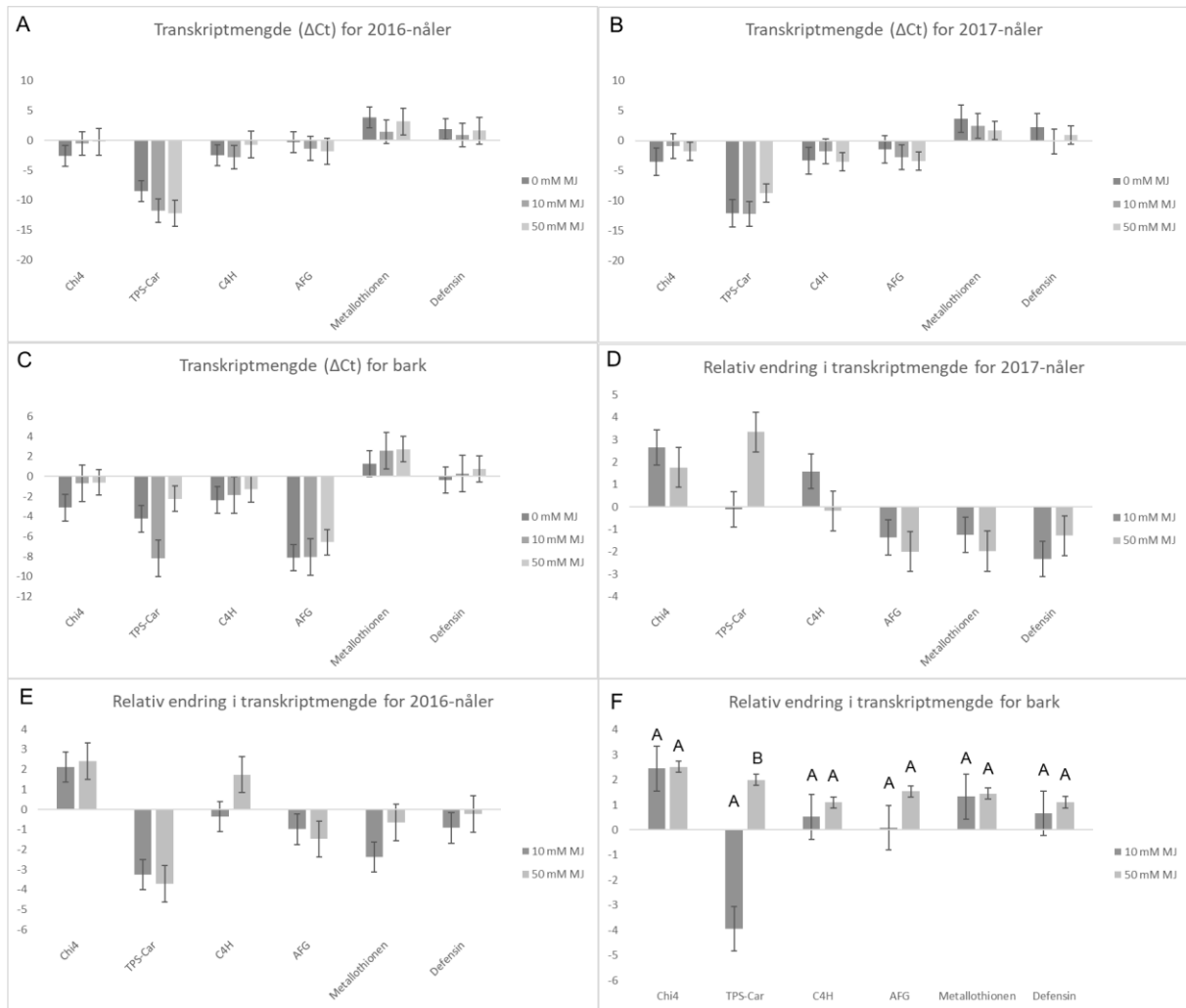


Figur 10: Skade registrert på 2 år gamle granplanter etter inokulering av gråskimmel (*Botrytis cinerea*) på en skala som går fra 0 (ingen skader) til 3 (>50 % av planten er død eller synlig infisert). Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil for 15 planter per behandling (n = 14 for 50 mM MJ, ikke inokulert). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller (Kruskal-Wallis og Pairwise Wilcoxon test).

3.4 Effekt av MJ på oppregulering av forsvarsrelaterte gener

Ingen signifikant oppregulering av forsvarsrelaterte gener ble funnet etter behandling med MJ for ΔCt , når *α -Tub* ble benyttet som referansegenet (Figur 11 A-C). Ved sammenlikning av forskjeller mellom oppregulerte gener i kontrollbehandling og henholdsvis 10 mM MJ og 50 mM MJ for disse verdiene ($\Delta\Delta\text{Ct}$), fant vi signifikante forskjeller for *TPS-Car* i prøvene fra bark (figur 11 F). Her var det større mengde oppregulerte gener ved 10 mM MJ enn ved 50 mM MJ (lavere Ct-verdi). Ingen andre gentranskripter viste signifikante forskjeller ved $\Delta\Delta\text{Ct}$ (figur 11 D-F).

Actin hadde svært høye Ct-verdier; mange Ct-verdier over 30 (data ikke vist). Derfor valgte vi å ikke utføre videre analyser med dette referansegenet.



Figur 11: Transkriptmengder (ΔCt) (11 A-C) og relative endringer i transkriptmengder ($\Delta\Delta Ct$) (11 D-E) for ulike gentranskripter (se metod delen for detaljer). Referansegnet *α -tubulin* er benyttet for å beregne ΔCt . Den relative endringen i transkriptmengde er beregnet ved å subtrahere ΔCt for 0 mM MJ fra henholdsvis 10 mM MJ og 50 mM MJ (D-F). Søylen viser gjennomsnitt for tre biologiske replikaer (hver replika er beregnet som gjennomsnittet av to tekniske replikaer), samt standardfeil. Signifikante forskjeller mellom behandlinger innen samme gentranskript indikeres av ulike bokstaver (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Øvrige verdier var ikke signifikante (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$).

4 Diskusjon

Resultatene i denne oppgaven viser tydelig at unge granplanter responderer på MJ-behandling. MJ resulterer for eksempel i både redusert høydevekst og skuddvekt, samt økt produksjon av traumatiske kvaekanaler og redusert årringbredde. Mindre tydelige var responsene knyttet til rotbiomasse og oppregulering av forsvarsrelaterte gener. Vi starter med å diskutere effektene påføring av MJ har hatt på de ulike vekstparameterne, før vi ser nærmere på trernes motstandsevne mot inokulert gråskimmel. Deretter diskuterer vi effekten MJ har hatt på oppregulering av enkelte forsvarsrelaterte gener.

Skuddskytingsfaser ble registrert ved forsøksstart, for å sikre at plantene i de ulike behandlingene var kommet like langt i veksten. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller mellom ulike behandlinger (figur 3), og vi kan derfor anta at senere ulikheter i vekst skyldes behandlingene. Vi gjennomførte senere en ny registrering av skuddskytingsfasene tilsvarende den første, men fokuset her var primært å registrere mortaliteten etter behandling av MJ. Det viste seg at behandlingene hvor plantene ble vannet med MJ medførte høy mortalitet, spesielt gjaldt dette plantene som ble vannet med 50 mM MJ. Dette stemmer overens med observasjoner av høye MJ-konsentrasjoner i undersøkelser utført av andre (Heijari et al., 2005). At plantene som ble sprayet med MJ ikke hadde like høy avgang, kan trolig skyldes at mengden MJ som faktisk kom inn i plantene var langt lavere enn konsentrasjonen i løsningen som ble sprayet på (Hudgins et al., 2004). Samtidig kan mengden løsning som plantene fikk ha påvirket utfallet: plantene som ble sprayet ble tilført 70 ml mindre løsning enn plantene som ble vannet.

MJ reduserte høydetilveksten markant, og forskjellene var signifikante både mellom de to konsentrasjonene av MJ og kontrollen (figur 4). Undersøkelser på andre bartrær har også observert en reduksjon i høydevekst (Moreira et al., 2012a; Sampedro et al., 2011b), og i flere tilfeller er større vekstreduksjoner påvist ved høyere MJ-konsentrasjoner (Gould et al., 2009; Heijari et al., 2005; Zas et al., 2014). For gran er resultatene mer tvetydige: Zas et al. (2014) observert ingen signifikant reduksjon av vekst ved påføring av MJ, mens Fedderwitz et al. (2016) observert signifikante forskjeller. Den generelle trenden er at MJ medfører en reduksjon i høydetilvekst, hvilket støttes av funnene i denne oppgaven.

Tørrvekten av ti sideskudd var tydelig redusert hos planter som fikk påført MJ, og reduksjonen i vekt var større ved høyere dose (figur 5). Reduksjon av biomassens vekt er også tidligere observert, dog ved MJ-behandling av andre treslag. Ved forsøk utført på strandfuru

(*Pinus pinaster*) var det tydelig forskjell mellom 22 mM MJ og kontroll (Moreira et al., 2012a), mens en ved forsøk med to ulike MJ-konsentrasjoner på furu (*Pinus sylvestris*) kun påviste signifikante forskjeller ved den høyeste konsentrasjonen (100 mM MJ) (Heijari et al., 2005). En undersøkelse gjort på montereyfuru (*Pinus radiata*) hadde varierende resultater, men viste en signifikant reduksjon i tørrvekt av skudd etter tre påføringer med 18 mM MJ (Gould et al., 2009). Resultatene fra denne undersøkelsen viser dog at i alle fall for gran kan en markant reduksjon i biomasse forekomme ved så lav konsentrasjon som 10 mM MJ.

Til tross for at vi observerte en svak negativ trend i rotbiomasse ved økende MJ-konsentrasjon, ble det i denne oppgaven ikke påvist noen signifikante forskjeller (figur 6). Heijari et al. (2005) fant en tydelig nedgang i rotbiomasse, men kun ved påføring av 100 mM MJ. Det kan være verdt å merke seg at nevnte studie undersøkte furu, mens denne oppgaven har fokusert på gran. Ulike resultater kan skyldes forskjeller mellom artene som er undersøkt.

Tidligere har Moreira et al. (2012a) vist at mengden fine røtter (røtter med diameter < 2 mm) øker, mens mengden grove røtter (røtter med diameter > 2 mm) reduseres etter MJ-behandling. Heijari et al. (2005) kunne ikke påvise forskjeller i rotlengder mellom kontroll og ulike MJ-behandlinger. Våre resultater indikerer ingen signifikante forskjeller i total rotlengde mellom ulike behandlinger (tabell 3). Derimot er det en signifikant negativ effekt på MJ-behandlingene ved lengden på grove røtter, samt grovere finrøtter (diameter mellom 1,2 mm og 2 mm). Vi fant ingen forskjell mellom de fineste finrøttene. Resultatene for rotlengder i denne oppgaven strider dermed med funnene gjort av Moreira et al. (2012a). Igjen kan ulike resultater skyldes forskjeller mellom artene, men det er også en mulighet for at en andel av de aller fineste røttene løsnet og ble vasket bort før målingene ble foretatt. En bør derfor ikke konkludere kun basert på resultatene for de fineste diameterklassene i denne oppgaven.

Tilveksten i siste års yteved (årringbredden) var signifikant forskjellig mellom både kontroll og de to ulike MJ-konsentrasjonene, og det var en negativ trend ved økende konsentrasjon (figur 7). Resultatene for den organiserte innerbarken viste en signifikant forskjell mellom kontroll og påføring av MJ, men ingen signifikans mellom MJ-konsentrasjonene (figur 8). Resultatene for yteveden er konsistente med en tidligere undersøkelse på gran, som har rapportert om 30 % lavere vekst i det gjeldende årets yteved ved påføring av MJ (Krokene et al., 2008). En tidligere studie utført på furu viste en signifikant reduksjon i barktykkelse hos planter behandlet med 100 mM MJ sammenliknet med kontrollplantene, men ingen signifikant forskjell mellom kontroll og 10 mM MJ selv om det fantes en negativ trend (Heijari et al., 2005). En undersøkelse på gran har vist en signifikant reduksjon i trærnes

diameter behandlet med 25 mM MJ, men ikke ved lavere MJ-konsentrasjoner (Zas et al., 2014). For andre bartrær er det også rapportert om en signifikant reduksjon i diametertilvekst ved påføring av MJ (Moreira et al., 2012a; Sampedro et al., 2011a; Zas et al., 2014). I denne oppgaven er kun den organiserte innerbarken målt, og ikke hele barktykkelsen som ved flere av de nevnte studiene. Det, og artsforskjeller, kan delvis forklare de ulike resultatene.

Når det gjelder dannelsen av traumatiske kvaekanaler, hadde behandling med MJ en tydelig effekt (figur 9). Signifikante forskjeller fantes mellom kontrollen og MJ-behandlingene, men ikke mellom de ulike konsentrasjonene. Det var likevel en trend med økende prosentvis dekning av TD ved høyere konsentrasjon av MJ. En økning i TD ved påføring av MJ er konsistent med tidligere resultater for gran (Krokene et al., 2008; Martin et al., 2002) og andre bartrær (Heijari et al., 2005; Moreira et al., 2009). I tillegg kunne Sampedro et al. (2011b) vise til en økning på 40 % i mengden kvaee etter MJ-behandling av strandfuru.

Våre resultater viser at det er en signifikant forskjell i unge granplanters resistens mot gråskimmel som er behandlet med MJ (figur 10). Vi fant ingen signifikante forskjeller mellom inokulerte og ikke-inokulerte planter som var behandlet med 50 mM MJ, og heller ikke mellom kontrollplantene og de som var behandlet med 10 mM MJ. Det vi derimot fant, var signifikante forskjeller mellom inokulerte planter som var behandlet med 50 mM MJ og både kontrollplantene og plantene behandlet med 10 mM MJ. Effekter av MJ-behandling på resistens mot gråskimmel hos gran er lite studert, men forsøk gjort på druer (Wang et al., 2015) og vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*) (Thomma et al., 2000) viser en økt motstandsevne mot gråskimmel etter MJ-behandling. Studier som er foretatt med andre sopparter på bartrær, viser også til en økt resistens ved påføring av MJ (Gould et al., 2009; Krokene et al., 2008).

Vi fant ingen signifikante forskjeller i transkriptmengdene for de seks ulike gentranskriptene (figur 11 A-C). For den relative endringen i transkriptmengdene, var det kun signifikante forskjeller mellom 10 mM MJ og 50 mM MJ for *TPS-Car* i bark (figur 11 D-F). *TPS-Car* har tidligere blitt påvist oppregulert i bark hos gran (Zulak et al., 2009), så det kan være en sammenheng mellom den studien og resultatene i denne oppgaven som viser en signifikant forskjell i nettopp bark. Videre viste Yaqoob et al. (2012) til en tydelig oppregulering i *Chi4* etter MJ-behandling, både i bark og ved. Resultatene i denne oppgaven har utover *TPS-Car* ikke vist noen signifikant endring blant forsvarsrelaterede gentranskripter. Til forskjell fra blant annet Schmidt et al. (2011) og Yaqoob et al. (2012), kan vi ikke påvise tydelig påvirkning av

genuttrykket ved bruk av MJ. Dersom antallet gjentak hadde vært større, kunne vi trolig fått mer signifikante resultater.

Enkelte deler av metodene som er benyttet kan ha innvirket på resultatene. Som en følge av oppbevaring (ut og inn av fryser gjentatte ganger) ble barken på stammeprøvene vi analyserte svært løs, og løsnet i flere tilfeller delvis fra stammen. Det vanskeliggjorde arbeidet med å måle tykkelse på den organiserte innerbarken, og men i de aller fleste tilfeller klarte vi å måle tykkelsen på en god måte. Som nevnt tidligere kan også mengden finrøtter ha blitt redusert ved rens og vask i forbindelse med analyser av røttene, men dette var likt på tvers av alle behandlinger. Ved gjennomføringen av qPCR burde antall gjentak per behandling vært høyere, da tre gjentak per behandling er for lite til å gi sikre resultater. Fremtidige undersøkelser bør etterstrebe å ha et mer solid datagrunnlag med flere gjentak.

Inokuleringsmetoden for gråskimmel som ble benyttet i denne studien er noe uvanlig sammenliknet med andre undersøkelser med gran og gråskimmel (Petaisto et al., 2004; Petaisto, 2012). For å oppnå mer sammenliknbare resultater bør en ved fremtidige studier vurdere å inokulere plantene slik Petaisto et al. (2004) har beskrevet. Vi har vist at MJ har potensiale til å begrense skadeomfanget av gråskimmel på gran, men våre resultater kan ikke indikere hvilken effekt lavere MJ-konsentrasjoner har på forsvaret. Moreira et al. (2012b) har anbefalt å bruke så lav konsentrasjon som mulig på unge trær for å unngå alvorlige skader eller død, og det bør være et mål for ytterligere undersøkelser på MJ-behandling av gran mot gråskimmel. Dette er særlig relevant i planteskoler, hvor en med forholdsvis enkle metoder kan implementere MJ som et ledd i plantebehandlingen før eksempelvis vinterlagring.

5 Konklusjon

Resultatene fra denne studien tyder på at MJ reduserer granplantenes utvikling betydelig på kort sikt. Flere av resultatene tyder også på at dette er avhengig av konsentrasjonen plantene får tilført, for eksempel primær- og sekundærvekst (høyde- og diametertilvekst). Lavere doser kan gi tilstrekkelige forsvarsrespons, uten å påvirke vekstparameterne i like stor grad som høyere doser vil gjøre. For høye doser har dessuten potensiale til å ta livet av de små plantene. Vi har også observert en reduksjon i både grove røtter og grove finrøtter, men ingen endring i finere røtter. Vi har påvist at MJ påvirker granas forsvar når den inokuleres med gråskimmel, og anbefaler at fremtidige studier bør fokusere på forsvarsresponsen lavere MJ-konsentrasjoner medfører. Resultatene våre kan ikke påvise noe tydelig endring i genuttrykk etter påføring av MJ, men det kan samtidig skyldes svakt datagrunnlag som en følge av få gjentak. Det er potensiale for å kunne implementere MJ i planteproduksjon, men ytterligere undersøkelser på granas forsvarsrespons bør foretas for å sikre så få og små negative konsekvenser som mulig.

6 Referanser

- Applied Biosystems. (2008). *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*. Tilgjengelig fra: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf (lest 28.05.2018).
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 355-381. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.355.
- Det norske Skogfrøverk. (2017). *2016 med tall for godkjent import fra andre aktører enn skogplanteskoler*. Tilgjengelig fra: <http://skogfroverket.no/userfiles/files/Bibliotek/Statistikk/Levert-2016.pdf> (lest 07.06.2018).
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. & Mohammed, C. (2010). Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*, 185 (4): 893-908. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x.
- Fedderwitz, F., Nordlander, G., Ninkovic, V. & Bjorklund, N. (2016). Effects of jasmonate-induced resistance in conifer plants on the feeding behaviour of a bark-chewing insect, *Hylobius abietis*. *Journal of Pest Science*, 89 (1): 97-105. doi: 10.1007/s10340-015-0684-9.
- Fløistad, I. S. & Kohmann, K. (2001). Effects of thawing procedure on frost hardiness, carbohydrate content and timing of bud break in *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16 (1): 30-36. doi: 10.1080/028275801300004389.
- Fossdal, C. G., Nagy, N. E., Hietala, A. M., Kvaalen, H., Slimestad, R., Woodward, S. & Solheim, H. (2012). Indications of heightened constitutive or primed host response affecting the lignin pathway transcripts and phenolics in mature Norway spruce clones. *Tree Physiology*, 32 (9): 1137-1147. doi: 10.1093/treephys/tps073.
- 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.pmpp.2009.10.002.
- 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.
- Hietala, A. M., Kvaalen, H., Schmidt, A., Johnk, N., Solheim, H. & Fossdal, C. G. (2004). Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7): 3948-3953. doi: 10.1128/aem.70.7.3948-3953.2004.
- Huber, D. P. W., Philippe, R. N., Madilao, L. L., Sturrock, R. N. & Bohlmann, J. (2005). Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. *Tree Physiology*, 25 (8): 1075-1083. doi: 10.1093/treephys/25.8.1075.
- Hudgins, J. W., Christiansen, E. & Franceschi, V. R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiology*, 24 (3): 251-264. doi: 10.1093/treephys/24.3.251.
- Kamoen, O. (1992). *Botrytis cinerea*: host-pathogen interactions. I: Verhoeff, K., Malathrakis, N. E. & Williamson, B. (red.) *Recent advances in Botrytis research*, s. 39-47. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers.
- Koutaniemi, S., Warinowski, T., Karkonen, A., Alatalo, E., Fossdal, C. G., Saranpaa, P., Laakso, T., Fagerstedt, K. V., Simola, L. K., Paulin, L., et al. (2007). Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Molecular Biology*, 65 (3): 311-328. doi: 10.1007/s11103-007-9220-5.
- Krokene, P., Nagy, N. E. & Solheim, H. (2008). Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of Norway spruce: anatomically based defense responses and increased resistance against fungal infection. *Tree Physiology*, 28 (1): 29-35. doi: 10.1093/treephys/28.1.29.
- Luoranen, J., Viiri, H., Sianoja, M., Poteri, M. & Lappi, J. (2017). Predicting pine weevil risk: Effects of site, planting spot and seedling level factors on weevil feeding and mortality of Norway spruce seedlings. *Forest Ecology and Management*, 389: 260-271. doi: 10.1016/j.foreco.2017.01.006.
- Magerøy, M. H., Cross, H., Fossdal, C. G., Tengs, T., Vivian-Smith, A., Zhao, T. & Krokene, P. (2018). *Transcriptional response to defense priming with Methyl jasmonate in Norway spruce (Picea abies)*. Upublisert manuskript.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J. & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in

- developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiology*, 129 (3): 1003-1018. doi: 10.1104/pp.011001.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. J., Pozo, M. J., Ton, J., van Dam, N. M. & Conrath, U. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*, 21 (10): 818-822. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
- 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. (2012a). Genetic variation and phenotypic plasticity of nutrient re-allocation and increased fine root production as putative tolerance mechanisms inducible by methyl jasmonate in pine trees. *Journal of Ecology*, 100 (3): 810-820. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01938.x.
- Moreira, X., Zas, R. & Sampedro, L. (2012b). Methyl Jasmonate as Chemical Elicitor of Induced Responses and Anti-Herbivory Resistance in Young Conifer Trees. I: Méridon, J. M. & Ramawat, K. G. (red.) *Progress in Biological Control, Plant Defence: Biological Control*, s. 345-362: Springer Netherlands.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 46-56. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.02.013.
- Pauwels, L., Inze, D. & Goossens, A. (2009). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science*, 14 (2): 87-91. doi: 10.1016/j.tplants.2008.11.005.
- Petaisto, R. L., Heiskanen, J. & Pulkkinen, A. (2004). Susceptibility of Norway spruce seedlings to grey mould in the greenhouse during the first growing season. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19 (1): 30-37. doi: 10.1080/02827580310019581.
- Petaisto, R. L. (2006). *Botrytis cinerea* and Norway Spruce Seedlings in Cold Storage. *Baltic Forestry*, 11 (2): 24-33.
- Petaisto, R. L. H., J. . (2012). Needle Damage Development in Norway Spruce Seedlings as Affected by Humidity, Temperature, and Gray Mold: A Preliminary Study. *ISRN Forestry*, 2012: 9. doi: 10.5402/2012/810675.
- Phillips, M. A. & Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4 (5): 184-190. doi: 10.1016/s1360-1385(99)01401-6.

- Sampedro, L., Moreira, X. & Zas, R. (2011a). Costs of constitutive and herbivore-induced chemical defences in pine trees emerge only under low nutrient availability. *Journal of Ecology*, 99 (3): 818-827. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01814.x.
- Sampedro, L., Moreira, X. & Zas, R. (2011b). Resistance and response of *Pinus pinaster* seedlings to *Hyllobius abietis* after induction with methyl jasmonate. *Plant Ecology*, 212 (3): 397-401. doi: 10.1007/s11258-010-9830-x.
- Schiebe, C., Hammerbacher, A., Birgersson, G., Witzell, J., Brodelius, P. E., Gershenson, J., Hansson, B. S., Krokene, P. & Schlyter, F. (2012). Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia*, 170 (1): 183-198. doi: 10.1007/s00442-012-2298-8.
- Schmidt, A. & Gershenson, J. (2007). Cloning and characterization of isoprenyl diphosphate synthases with farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate synthase activity from Norway spruce (*Picea abies*) and their relation to induced oleoresin formation. *Phytochemistry*, 68 (21): 2649-2659. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.05.037.
- Schmidt, A., Nagel, R., Krekling, T., Christiansen, E., Gershenson, J. & Krokene, P. (2011). Induction of isoprenyl diphosphate synthases, plant hormones and defense signalling genes correlates with traumatic resin duct formation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 77 (6): 577-590. doi: 10.1007/s11103-011-9832-7.
- Statistisk sentralbyrå. (2017). *Landsskogtakseringen*. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/lst/aar> (lest 06.06.2018).
- Steppuhn, A. & Baldwin, I. T. (2008). Induced Defenses and the Cost-Benefit Paradigm. I: Schaller, A. (red.) *Induced Plant Resistance to Herbivory*, s. 61-83. Dordrecht: Springer.
- Thomma, B., Eggermont, K., Broekaert, W. F. & Cammue, B. P. A. (2000). Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (5): 421-427. doi: 10.1016/S0981-9428(00)00756-7.
- Tudoran, M. M., Marquer, L. & Jonsson, 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.
- Wang, K. T., Liao, Y. X., Kan, J. Q., Han, L. & Zheng, Y. H. (2015). Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different

- concentrations in grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 194: 32-39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.006.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111 (6): 1021-1058. doi: 10.1093/aob/mct067.
- Yakovlev, I. A., Fossdal, C. G., Johnsen, O., Junttila, O. & Skroppa, T. (2006). Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries. *Tree Genetics & Genomes*, 2 (1): 39-52. doi: 10.1007/s11295-005-0031-z.
- Yaqoob, N., Yakovlev, I. A., Krokene, P., Kvaalen, H., Solheim, H. & Fossdal, C. G. (2012). Defence-related gene expression in bark and sapwood of Norway spruce in response to *Heterobasidion parviporum* and methyl jasmonate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 77 (1): 10-16. doi: 10.1016/j.pmpp.2011.11.001.
- Zas, R., Bjorklund, N., Nordlander, G., Cendan, C., Hellqvist, C. & Sampedro, L. (2014). Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest, *Hylobius abietis*. *Forest Ecology and Management*, 313: 212-223. doi: 10.1016/j.foreco.2013.11.014.
- Zhao, T., Borg-Karlson, A. K., Erbilgin, N. & Krokene, P. (2011). Host resistance elicited by methyl jasmonate reduces emission of aggregation pheromones by the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Oecologia*, 167 (3): 691-699. doi: 10.1007/s00442-011-2017-x.
- Zulak, K. G., Lippert, D. N., Kuzyk, M. A., Domanski, D., Chou, T., Borchers, C. H. & Bohlmann, J. (2009). Targeted proteomics using selected reaction monitoring reveals the induction of specific terpene synthases in a multi-level study of methyl jasmonate-treated Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Journal*, 60 (6): 1015-1030. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04020.x.
- 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.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway