



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultetet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA)

Professor Line Nybakken

Effekt av skoggjødsling på det kjemiske forsvaret hos gran (*Picea abies*)

Effect of fertilization on the chemical defense of
Norway spruce (*Picea abies*)

Ruben Nikolai Selmer

Master skogfag

Fakultetet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA)

Forord

Denne masteroppgaven er en milepel i mitt utdanningsløp. Det har vært to krevende, men givende år på Ås med pendling i fra småbruket i Telemark og en familie som har vokst fra tre til fem i løpet av disse to årene.

Oppgaven er skrevet ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) under Fakultet for miljø og naturforvaltning (MINA) og under studielinjen skogfag master. Feltarbeid ble utført i et av Norsk institutt for bioøkonomi (NIBO) sine gjødslingsfelt lokalisert på den ærverdige Bærøe gård i Østfold, Hobøl kommune.

Jeg vil rette en takk til hovedveileder professor Line Nybakken. Du har virkelig stilt opp og gjort denne reisen fantastisk! Forsker Holt Hanssen (NIBIO), takk for at jeg fikk lov til å bruke deres gjødslingsfelt, og takk for dine råd underveis. Forsker Johan Asplund (NMBU), uten dine råd og din veiledning ville jeg fremdeles ha sittet med statistikken. Førsteamanuensis Christian Bianchi Strømme (HIN), uten dine klatreegenskaper ville jeg hengt oppe i tretoppene i Bærøeskogen den dag i dag. Videre vil jeg takke overingeniør Annie Aasen. Du har virkelig stilt opp langt ut over det man kan forvente. Og sist og ikke minst overingeniør Claus D Kreibich, takk for at du hjalp meg med de prøvene som måtte tas på nytt etter maskinsvikt. Retter også en takk til grunneierne Lise og Erik Mollatt.

Av finansielle bidragsytere vil jeg rette en takk til Unifor og Naturviternes legat for deres støtte.

Til slutt vil jeg takke NRK P2 med alle sine sendinger fra kl.05.00 om morgen, uten dere ville alle timene i bilen som pendler vært fordummende!

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

Ås, 13 juli 2018

Ruben Nikolai Selmer

Sammenfatning

For at Norge skal nå målene i klimameldingen har staten gitt tilskudd til skoggjødsling som et av flere virkemidler. Innen skogbruket har gjødsling blitt godt mottatt og blitt en av de mest lønnsomme investeringene etter at staten gikk inn med betydelige tilskudd. Gjødsling gir derfor en svært samfunnsøkonomisk og ikke minst klimamessig gevinst ved økt karbonopptak. Samtidig har gjødsling også noen miljøkonsekvenser som bør legges på vektskåla for å kunne ta bærekraftige beslutninger. Denne oppgaven har som mål å undersøke hvilken effekt gjødsel har på det kjemiske forsvaret hos Norsk gran (*Picea abies*). Følgende hypoteser er utarbeidet for å avklare dette spørsmålet: I) N-gjødsling fører til økt nitrogeninnhold i nålene. II) Askegjødsling fører til økt nitrogeninnhold i nålene. III) Gjødsling reduserer granas produksjon av kjemiske forsvarstoffer. IV) Det er høyere konsentrasjon av fenoler i fjorårets nåler sammenlignet med årets.

Studieområdet var en granskog i Hobøl/Østfold plantet på 1950-tallet for så senere tynnet i 2006/2007. Skogen ble så gjødslet i 2013 med aske, nitrogen og kombinasjonen aske + nitrogen. Nåler av årets og fjorårets årgang ble samlet inn. Disse ble så merket, tørket, veid og pulverisert før videre analyse av karbon (C), nitrogen (N), lavmolekylære fenoler og kondenserte tanniner. Fenolkonsentrasjonen var høyere i fjorårets nåler sammenlignet med årets. N-gjødsling økte både N% og C% i nålene, men fordi økningen i N% var størst ble C/N redusert. Askegjødsling reduserte N%, og dermed økte C/N. Askegjødsling, N-gjødsling og kombinasjonen av disse reduserte den totale konsentrasjonen av flavonoider, mens totalkonsentrasjonen av stilbener og fenolsyrer økte. Kombinert gjødsling med askegjødsel og N-gjødsel reduserte de MeOH-løselige kondenserte tanninene i begge årganger, men kun for årets nåler av de MeOH-uløslige tanninene. Askegjødsel reduserte konsentrasjonen i årets nåler av MeOH-løslige og MeOH-uløslige tanniner. Utenom dette hadde ikke gjødslingsregimene noen effekt på det kjemiske forsvaret. Siden totalkonsentrasjonen av fenoler ikke ble påvirket av gjødslingen kan mine resultater tyde på at trærne ikke reduserer, men omprioriterer sitt kjemiske forsvar ved økt næringstilgang. Jeg kan derfor konkludere med at gjødsel har ulike virkninger på granas forsvarssystem etter hvilken gjødsel som blir brukt og hvilken årgang nålene er analysert i fra. Dette vil kunne ha en betydning for hvor motstandsdyktig skogen vil være i en sårbar situasjon hvor skadegjørere kan få et konkurransefortrinn.

Nøkkelord: *Picea abies*, gran, skoggjødsling, nitrogen, aske, fenol, kjemisk forsvar, HPLC-analyse, elementanalyse

Abstract

In order for Norway to reach the targets of climate change, the government has established a subsidy for fertilizing forest as one of several instruments. Together with the forestry fund is one of the most profitable investments for forest owners. Fertilizing therefore provides a very socioeconomic and, not least, climate-friendly gain from increased carbon footprint. At the same time fertilizing also has some environmental consequences that should be emphasized in order to make sustainable decisions. This thesis aims to investigate the effect of fertilizing on the chemical defense of Norway spruce (*Picea abies*). The following hypotheses have set up/put forward to clarify this question: I) Fertilization results in increased nitrogen content in the needles. II) Fertilization results in increased nitrogen content in the needles. III) Fertilization reduces the production of chemical defenses in spruce. IV) There is higher concentration of phenols in last year's needles compared to those from the current year.

The field of study was a spruce forest in Hobøl/Østfold planted in the 1950s and later thinned in 2006/2007. The forest was then divided for different treatments in 2013. The plots was fertilized with ash, nitrogen and the combination of ash + nitrogen and control plots. Needles of the current year and previous year were collected. These were further labeled, dried, weighed and powdered prior to further analysis of carbon (C), nitrogen (N), low-molecular phenolics and condensed tannins. The results show a difference in phenolic concentration between the current year and previous year needles. N-fertilization had an increased effect on N% in the needles. Nitrogen also seemed to increase the C% but decreasing on C/N. Ash as fertilization seemed to decrease at N% but was the treatment that increased C/N. Fertilization reduced the concentration of the flavonoids and condensed tannins groups while the stilbene and phenolic groups increased in concentration. This may indicate that the trees do not reduce but, if possible, re-prioritize their chemical defense through increased nutrition. Combined fertilization with ashes + nitrogen seemed decreasing for both years of the MeOH-soluble condensed tannins. Ash fertilization seems to reduce the concentration of MeOH-insoluble tannins current year needles. Therefore, I can conclude that fertilization has varying effects on the spruce defense system according to which fertilization is being used and what year needles are analyzed from. This could have an impact on how resistant the forest will be in an exposed situation where harmmarkers get a competitive edge.

Keywords: *Picea abies*, spruce, fertilization, nitrogen, ash, phenol, chemical defense, HPLC analysis, elemental analysis

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENFATNING	II
ABSTRACT	III
1 INNLEDNING	1
2 MATERIALE OG METODE	4
2.1 STUDIEOMRÅDET	4
2.2 PRØVEINNSAMLING	6
2.3 PRØVEOPPARBEIDING OG EKSTRAKSJON	7
2.4 HPLC	7
2.5 KONDENSERTE TANNINER (CT)	8
2.6 DATA ANALYSE	8
3 RESULTATER	9
3.1 C OG N KONSENTRASJONER	9
3.2 FENOLER I FJORÅRETS OG ÅRETS NÅLER	11
3.3 FENOLGRUPPER OG KONDENSERTE TANNINER	15
4 DISKUSJON	18
5 OPPSUMMERING OG KONKLUSJON	21
LITTERATUR	22

1 Innledning

Norge har inngått internasjonale forpliktelser på klimamål hvor kutt i utslipp av karbondioksid (CO₂) er sentralt. Gjennom ratifisering av Parisavtalen 2015 har Norge som mål å redusere de antropogene CO₂-utslippene med 40 % innen 2030 (Miljødirektoratet, 2017). Som et klimatiltak har Solberg-regjeringen etablert en tilskuddsordning for gjødsling av skog. Sammen med skogfond er dette en av de mest lønnsomme investeringene for skogeier. Med en tilskuddsordning på 40 % ble de avsatte bevilgningene raskt brukt opp ved oppstart i 2016 (Landbruksdirektoratet, 2017).

Vanlig gjødslingspraksis i Norge er 15 kg nitrogen (N) per dekar (150 kg per hektar) ti år før planlagt avvirkning. Det gjødsles fortrinnsvis fra helikopter og med gjødseltypen Opti-KAS skog (YARA) som er tilsatt kalk for å redusere forsuring. Opti-KAS inneholder 27 % nitrogen (N) hvor halvparten er nitrat (NO₃) og halvparten er ammonium (NH₄⁺), 5 % kalsium (Ca), 2,4 % magnesium (Mg) og 0,2 % bor (B) (Haugland et al., 2014). Nitrogen som grunnstoff er livsnødvendig for kretsløpet mellom det uorganiske og organiske liv på jorden (Deiwiche, 1970). Nitrogen utgjør ca. 80 % av lufta som N₂ gass, men nitrogen i denne formen er utilgjengelig for de fleste planter. Det kreves energi for å omdanne den stabile nitrogenmolekylet (N₂) til de mer energigunstige formene; ammoniakk (NH₃), ammonium (NH₄⁺) og nitrat (NO₃) hvor plantene tar opp NH₃ og NH₄⁺. Nitrogenet blir gjort tilgjengelig for plantene ved hjelp av mikroorganismer i jorden, eller ved lynnedslag som spalter N₂ og hydrogengass (H₂) til enkelte atomer som reagerer med hverandre og vanddamp (Galloway & Cowling, 2002).

Nitrogen er ofte en begrensende faktor for vekst i den boreale barskogen (Binkley & Fisher, 2013). N-gjødsling sammen med tynning har derfor vært ansett som et godt tiltak i skogbrukssammenheng (Tamm, 1991; Ståhl & Bergh, 2013). N-gjødsling har vist å gi god tilvekst i de fleste tilfeller (Bergh, et al., 2014). I tillegg har det blitt gjort funn av langtidseffekter fra N-gjødsling, dette ga økt produksjon i starten av en ny generasjonen etter avvirkning (Bergh et al., 2014; From, Strengbom & Nordin, 2015). Videre har nitrogen vist å ha en direkte gjødsel-effekt ved rask tilvekst av bladverk som igjen gir økt fotosyntese/karbonopptak (Högberg et al., 2006; Pregitzer et al., 2008; Thomas et al., 2010; De Vries et al., 2014; Gundale et al., 2014). Tester utført av Binkley & Högberg (2016) viser at gjødsling med mineraler har liten effekt uten tilføring av nitrogen. I Norge er tradisjonelt gran (*Picea abies*) mindre gjødslet enn furu

(*Pinus sylvestris*), ifølge Haugland et al. (2014), sannsynligvis fordi grana vokser på mer næringsrike områder (Bergquist et al., 2005). Studier av langtidseffektene av N-gjødsling på gran og furuskog viste ingen signifikant volumtilvekst for gran på gode boniteter (Bergh et al., 2014; From et al., 2015). Det vil derfor trolig være i de mindre næringsrike områdene vi kan oppnå en økt volumtilvekst hos gran etter N-gjødsling.

Miljøeffektene av skoggjødsling er ikke nødvendigvis ensidig positive, derfor setter skogstandarder noen begrensninger på hvor man får lov til å gjødsle (PEFC, 2016). Økt nitrogen i skog endrer floraen, slik at planter som trives under mer nitrogen-begrensede miljøer, blir utkonkurrert av de nitrofile plantene. Dette kan føre til redusert biologisk mangfold i skogen (Maunier et al., 2015; Binkley & Högberg, 2016). Videre finnes det indikasjoner på effekter på flere trofiske nivåer. En studie av insekter som matfat til fugler viser endringer i antall, tid og rom hos nebbmunner (Hemiptera), midd (Acari) og spretthaler (Collembola) etter skoggjødsling (Edenius et al., 2012).

Aske har tradisjonelt vært lite i bruk som skoggjødsel i Norge i motsetning til i våre naboland Sverige og Finland (Haugland et al., 2014). Askegjødsel i skog er i dag ikke tillatt i Norge, da det inneholder for store mengder tungmetaller som kvikksølv (Hg), bly (Pb), krom (Cr), nikkel (Ni), vanadium (V), arsen (As) og kadmium (Cd) (Forskrift om organisk gjødsel, 2003, § 10; Lindkvist, 2000). Næringsstoffer i aske er hovedsakelig kalsium (Ca), da nitrogen (N) forsvinner under forbrenningen. Videre inneholder aske makronæringsstoffene magnesium (Mg), kalium (K) og mikronæringsstoffene fosfor (P), kobber (Cu), sink (Zn), bor (B), mangan (Mn), kobolt (Co) og molybden (Mo) (Lindkvist, 2000). Ved bruk som skoggjødsel brukes herdet bunnaske fra flisfyringsanlegg, da flygeasken (den asken som svever med røyken) inneholder den største konsentrasjon av tungmetaller (Narodoslawsky & Obernberger, 1996). Forsøk utført i Norge, Sverige og Finland har vist at askegjødsling på lave boniteter førte til redusert tilvekst, men derimot økt tilvekst ved høyere boniteter (Jacobsen, 2003; Sikström et al., 2009). Videre er det funnet en økt tilvekst og lengre effekt av N-gjødsel i kombinasjon med askegjødsel i en finsk studie (Saarsalmi et al., 2012). I Sverige anbefales det å gjødsle med anslagsvis 3 tonn aske pr hektar og maksimalt to ganger innen et omløp for å oppnå det beste kompromisset mellom økt tilvekst og miljøhensyn (Skogstyrelsen, 2008).

Planter produserer kjemiske forbindelser som beskyttelse mot en rekke stressfaktorer. Disse stoffene tilhørere mange ulike kjemiske klasser, men blant de mest utbredte hos bartrær er fenoler, stilbener og kondenserte tanniner (Nybakken et al., 2018). Fenolenes funksjon hos planter har vist å ha flere viktige roller, som UV-beskyttelse (Reuber *et al.*, 1996; Shirley, 1996., & Rozema *et al.*, 1997), frostherdighet (Chalker-Scott & Krahmer, 1989) og beskyttelse mot tørkestress (Pizzi & Cameron, 1986; Moore *et al.*, 2004). Videre omtales fenolene som viktige antibeitestoff av Bryant et al. (1983); Coley et al. (1985), men dette er ikke entydig da det finnes et fåtall spesialiserte insekter som klarer å omdanne disse giftstoffene til sin egen fordel hvor de lagrer giftstoffene for bruk til selvforsvar mot rovdyr (Simmonds, 2003). Stilbener har vist seg å ha antisopp egenskaper. Høye konsentrasjoner av stilbene isorhapontin i granbark har vist å kunne motvirke blåvedsopp (*Ceratocystis polonica*), som er av de hyppigste patogenene hos gran (Brignolas et al., 1998; Leutier et al., 2003). Videre har nyere forskning vist at flere stilbener er forbundet med høyere resistens mot rustsopp (*Chrysomyxa rhododendri*) hos gran (Ganthaler et al. 2017b). Det hevdes også at enkelte stilbener har allelopatiske egenskaper. Taylor & Shaw (1983) viste at selv små mengder av stilbenene astringin og isorhapontin fra barkstrø hindret konkurrenter i å spire under engelmansgran (*Picea engelmannii*). Videre har også kondenserte tanniner vist seg å være viktige som antibeite- og antisoppforbindelser (Barbehenn & Constabel, 2011; Chalker-Scott og Krahmer, 1989).

Koricheva et al. (1998) fant i en metaanalyse at N-gjødsling førte til at planter generelt responderte med en redusert fenolproduksjon. Dette kan ses i lys av økologisk teori (Bryant et al., 1983; Blodgett et al., 2005), samt gjødslingsforsøk med mange ulike arter, hvor det antydes at planter under nitrogenbegrensende forhold vil prioritere vekst og bruke mindre ressurser på kjemisk forsvar når de blir gjødslet. Det er imidlertid svært begrenset med tidligere studier hvor det er gjort analyser av hvilken effekt gjødsling har på nålekjemien hos voksne bartrær. De forsøk som tidligere er utført har dreid seg om yngre trær (Virjamo et al. (2014), eller studier der en ikke har tatt hensyn til trærne og nålenes alder (Edenius et al., 2012). Videre undersøkte Kytö et al., (1996) og Blodgett et al. (2005) kun effekten av den totale fenolkonsentrasjon, men ikke enkeltstoffer. Nybakken et al. (2018) testet nylig effekten av ekstremgjødsling (årlig N-gjødsling over 13 år) på 220 år gammel granskog i Kittilbu. Her fant de blant annet en økt N% som følge av N-gjødsling i begge årganger. Videre var totalkonsentrasjonen av lavmolekylære fenoler mer enn tre ganger så stor i fjorårets kontroll-nåler enn årets. Likevel var det stor variasjon mellom reduserende og økende konsentrasjon som en respons av N-gjødsel (Yara

Mila Fullgjødning). Forskjell i konsentrasjoner mellom årgang hos enkeltstoffer og grupper viste også stor variasjon. Dette kom for eksempel til uttrykk i stilbenegruppen, hvor konsentrasjonen økte i fjorårets nåler kontra årets nåler som ble redusert som følge av N-gjødsel. Dette støtter funnene til Blodgett et. al. (2005) hvor de fant en betydelig reduksjon av lignin og total mengde fenoler etter gjødsling. I lys av Nybakken et al. (2018) sine funn og at det finnes overraskende lite kunnskap om disse effektene, ønsket jeg å gjøre et liknende eksperiment, men med gjødselmengder som er mer relevante for det som brukes i det praktiske skogbruket. I tillegg til N-gjødsel har jeg målt effektene av askegjødning og kombinasjonen av aske- og N-gjødsel. Gran er av svært stor betydning både økonomisk og økologisk, derfor vil kunnskap om hvordan gjødning påvirker forsvarskemien være nyttig for et bærekraftig skogbruk.

Jeg satte opp følgende hypoteser:

- I. N-gjødsling fører til økt nitrogen innhold i nålene
- II. Askegjødning fører til økt nitrogen innhold i nålene.
- III. Gjødsling reduserer granas produksjon av kjemiske forsvarsstoffer.
- IV. Det er høyere konsentrasjon av fenoler i fjorårets nåler sammenlignet med årets.

2 Materiale og metode

2.1 Studieområdet

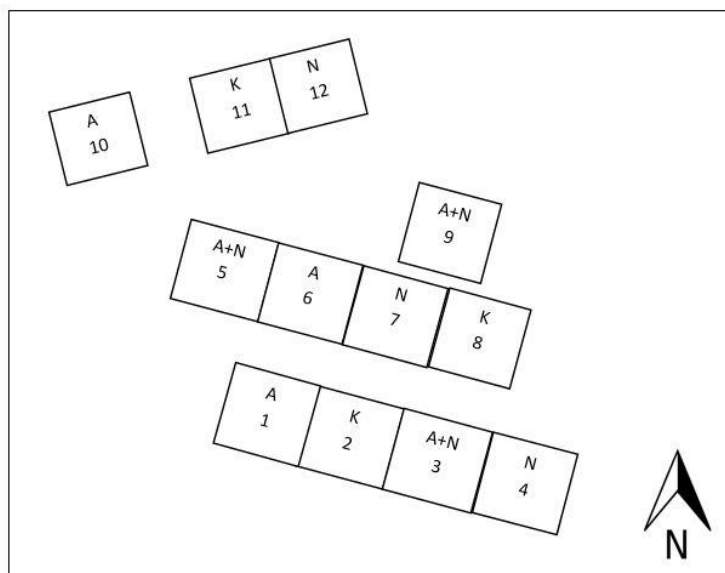
Prøvene ble samlet inn fra et gjødslingseksperiment som startet i 2013 på Bærøe gård i Hobøl, Østfold (59.56° N, 10.95° Ø, 195-215 moh.).

Granbestandet ble plantet på 1950-tallet etter hogst og senere tynnet i årene 2006 og 2007. Boniteten estimert etter H40-systemet viste G17 - G20. Gjennomsnittlig overhøyde på trærne er målt til 18,5 m. Det er avsatt 3 blokker med 4 behandlinger i hver: (1) ugjødslet kontroll, (2) askegjødning (ca. 3t/ha), (3) N-gjødsel (150 kg/ha), samt (4) askegjødning + N-gjødsel. Prøveflatene ble gjødslet med ammoniumnitrat - Opti-KAS skog (Yara) i slutten av mai 2013 og med askegjødning i slutten av juni 2013. Prøveflatene var 20 m × 20 m, inkludert en 5 m buffersone mellom prøveflatene. Det var 13-23 trær i hver innerrute på 15 × 15 m. Innen hver blokk ble det tatt 5 1m² prøver av humuslaget. I disse prøvene ble det målt pH, total karbon (C) og N, før og etter gjødsling i oppstartsåret. Videre ble det tatt jordprøver ved en dybde på 40

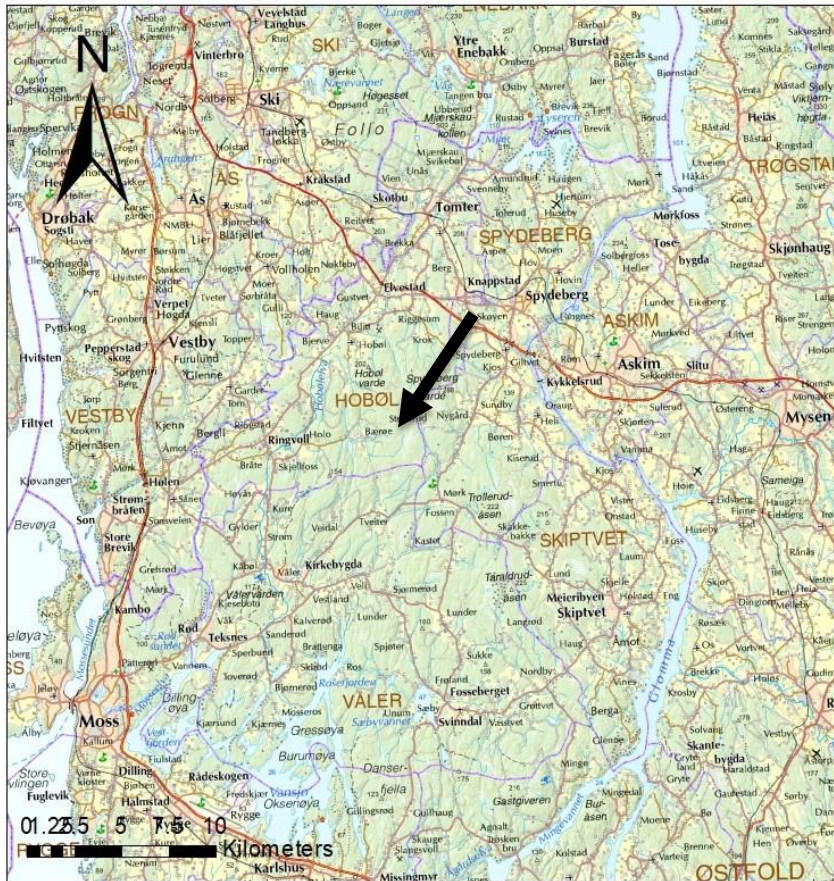
cm (utvaskingssjiktet). N-gjødsel førte til signifikant økning av Mg. Det ble ikke funnet noen signifikant økning av karbon (C) og N i humuslaget etter askegjødsling eller kombinasjons-gjødsling med askegjødsling + N-gjødsel. Mobiliteten til aluminium (Al), kobolt (Co), jern (Fe), nikkel (Ni), bly (Pb) og sink (Zn) var begrenset som følge av økt pH etter askegjødsling. Ved 40 cm jorddybde ble det funnet en kortvarig økt konsentrasjon av kalsium (Ca), magnesium (Mg), kobolt (Co), nikkel (Ni) og sink (Zn) samt redusert pH som følge av N-gjødsel. I tillegg ble det gjort en oppmåling av alle trærne (Clarke et al., 2017).

Tabell 1. Værdata for Bærøe Hobøl (Østfold) under forsøksperioden sammenliknet med gjennomsnittet de siste 30 årene (MET, 2018).

Dato	Temperatur C ⁰		Nedbør
	Gjennomsnitt	Normalavvik	
Mai 2017	6,0 ⁰	1,2 ⁰	126,6%
Mai 2016	6,3 ⁰	1,5 ⁰	125,4%



Figur 1. Skisse over forsøksfeltet med 3 blokker hvor prøveflatene er på 25 × 25 m med en sentrert prøveflate på 15 × 15 m. Behandlinger: A=askegjødsling, N=N-gjødsel, A+N=askegjødsling+N-gjødsel og K=kontroll.



Figur 2. Bærøe gård, Høbøl kommune i Østfold fylke.

2.2 Prøveinnsamling

Prøveinnsamlingen ble utført 29-30 mai 2017. For å oppnå et representativt datamateriale ble det samlet inn 230 prøver fra 115 individuelle trær. I hver prøveflate ble det tatt nåleprøver fra årets og fjorårets nåler av 10 trær. I prøveflate nr.10 (Fig. 1) ble det besluttet å tillegge en ekstra buffersone på 5 m som følge av en tilgrensende hogstflate. Dette resulterte i at det bare var 5 kvalifiserte prøvetrær tilgjengelig på denne flaten. Prøvene er hentet fra så like trær som mulig i en høyde på 8-10 m ved kompassretning nord. Nålene ble pakket inn i papirposer med 5 ml silicagel og lagt i tørkeskap samme dag, ved temperatur 30°C og en tørketid på 48 timer. Prøvene ble deretter pakket i plastposer og satt i fryser med -18°C.

2.3 Prøveopparbeiding og ekstraksjon

Som forberedelse til kjemisk analyse ble nålene lagt i 2,0 ml eppendorfrør med 1 stk. stålkule i bunn. Plantematerialet ble så pulverisert ved bruk av en kulemølle (Retsch MM400, Haag, Tyskland) med en vibrasjonsfrekvens på 30Hz i 180 sekunder. Hver prøve fikk videre en ny ID (1-230) slik at prøvene ikke skulle gjenkjennes før de statistiske analysene ble utført. Det finmalte plantematerialet ble så benyttet til å finne totalt C og N med en Micro Cube (Elementar Analyse, Hanau, Tyskland) ved oppveide prøver av 5mg +/- 0,5 mg. Til fenol- og tanninanalyse ble det benyttet ytterligere 10 mg± 0,5 mg pulverisert plantematerialet. Dette ble ekstrahert med 600 µl metanol (MeOH) i rør med skrukork av typen Precellys CK28-R (Bertin Technologies, Montignyle-Bretonneux, Frankrike) og 3-5 teflonkuler, så homogenisert ved 5000 rpm i 20 sekunder på en Precellys 24-homogenisator (Bertin Technologies, Montignyle-Bretonneux, Frankrike). Deretter ble prøvene lagt 15 minutter i isbad før de ble sentrifugert ved 15000 rpm i 3 minutter (Eppendorf sentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble så pipetert ut til nye 10 ml plastrør for så å gjenta prosessen med ekstrahering 4 ganger uten sekvensen med 15 min i isbad. De samla supernatantene ble så avdampet i vakuumsentrifuge (Eppendorf concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) før de ble forseglet med kork og lagret i fryser med (-18°C). Restene fra ekstraksjonen ble liggende som sediment i Precellys-rørende, og ble avdampet i avtrekk over natta, før de ble forseglet og lagt i fryser (-18°C).

2.4 HPLC

De avdampede supernatantene ble tatt ut av fryseren for å romtempereres i 20 min. før de ble tilført 200 µl MeOH og 200 µl ultrarent vann (USF ELGA Maxima HPLC; Veolia Water Technologies, Saint-Maurice, Frankrike). Løsningen ble videre oppløst med ultralydbad (mod.nr. USC200TH, VWR International LLC, Randor, USA). Videre ble prøvene helt over i 2 ml. Eppendorf-rør og sentrifugert med 15000 rpm i 3 min. før de ble helt over i HPLC ampuller og forseglet. Injeksjonsvolumet til HPLC-analysen var 20µl. Analysen ble kjørt med en gradient for analyse av fenoler (Nybakken et al. 2012) på en Agilen HPLC (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland) med en G1312A binærpumpe, en G1329A autosamler, en G1315D diode-array detektor. Kolonne av typen Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) i dimensjonen 50 × 4.6mm og ODS Hypersil for partikkelstørrelse 3µm ble brukt. Følgende to løsninger ble brukt i gradienten: A: 0,25%

ortofosforsyre, 1,5% tetrahydrofuran i ultrarent vann og B: 100% metanol (85149 WWR International). For kvantifisering av fenoler ble absorpsjons-spekteret ved 320nm benyttet, og identifisering ble gjort ved hjelp av retensjonstiden og sammenligning av UV-spektre med kommersielle standarder. Jeg har ikke identifisert de ulike glykosidene av flavonoidene quercetin, kaempferol og myricetin. De refereres derfor til med nummer (f.eks. quercetinglyc I, kaempferolglyc II, II og III etc), der laveste nummer har laveste retensjonstid.

2.5 Kondenserte tanniner (CT)

Kondenserte tanniner ble analysert fra HPLC-ekstraktene (MeOH-løslige) og fra restene etter ekstraksjonen (MeOH-uløslige). MeOH-løslige tanniner fra HPLC ekstrakter ble analysert innen 48 timer etter HPLC-analysen. Forseglingen på ampullene ble brutt. Av hver prøve ble det tatt ut to prøver a 50-100µl. Dette ble ført over i to 10ml glassrør (duplikatprøver). Videre ble det tilført MeOH, opptil 0,5ml inklusiv prøven, 100µl jernreagens og 3ml butanolsyre (950ml butanol + 50 ml kons. HCl). To rør for referanse ble samtidig blandet uten prøve hvor prøven ble erstattet med MeOH og de andre kjemikalierne i lik mengde. Rørene ble så forseglet med tett lokk og blandet godt før de ble satt i kokevann i 50 min. For analyse av MeOH-uløslige tanniner ble det veid inn duplikater av 1-3mg av restmaterialet fra ekstraksjonen, og ført over i 25ml glassrør. Den tilsatte løsningen av kjemikalier og koketid var videre identisk som for analysene av MeOH-løselige tanniner. Etter koking ble prøvene avkjølt for så å bli målt i spektrofotometer (UV-1800, Shimadu Corp., Kyoto, Japan) ved 550 nm. For statistiske analyser benyttet jeg gjennomsnittsverdien av duplikatene.

2.6 Data analyse

Rådata ble omregnet til relative stoffmengder ved bruk av formler i programmet Microsoft Excel for de ulike stoff.

Følgende formler ble benyttet: MeOH-løslige tanniner = $(\text{Corr} \times 400) / (\text{DW}, \text{mg} \times 100)$; MeOH-uløslige tanniner = $((\text{Absorbans} - 0,02112) / 0,008) / \text{vekt på rest innveid}$ og konsentrasjonen av fenoler = $C \text{ (mg g}^{-1} \text{ DW)} = (A \times \text{RF} \times \text{Volum}_{\text{dissolved}}) / \text{Volum}_{\text{injected}} \times \text{DW}$.

Statistiske analyser ble så utført i programmet R-Studio versjon 3.3.4. Data hadde store spredninger og ble klassifisert som ikke normalfordelt. Normalfordelingen ble ikke tilstrekkelig selv etter å ha transformert med kvadratrott og logaritme. Statistiske analyser som ble benyttet til de individuelle fenolene var: ANOVA permuteringstest m/99999 permuteringer (R funksjon: `lmPerm` før `summary aovp`). For fenolgrupper, C/N-data og kondenserte tanniner: ANOVA permuteringsmodell m/999 permuteringer (R funksjon: `linear mixed effects models «lme»` med blokkene som randomiserende faktor før en `lmPerm`). Videre var responsvariablene de ulike stoffene som ble målt konsentrasjonen/effekten av, og forklaringsvariablene som er brukt er de ulike behandlingene.

Siden variasjonen i hvilke individuelle flavonoidglykosider som ble identifisert varierer mye mellom de to nåleårgangene, har jeg valgt å kjøre to ulike analyser. Individuelle forbindelser er analysert for faktorene nitrogen og aske. I tillegg har jeg kategorisert forbindelsene i følgende grupper av fenoler: flavonoider, stilbener, fenolsyrer og kondenserte tanniner (MeOH-løslige og MeOH-uløslige), disse er analysert både for effekt av behandling og for effekt av nålealder.

3 Resultater

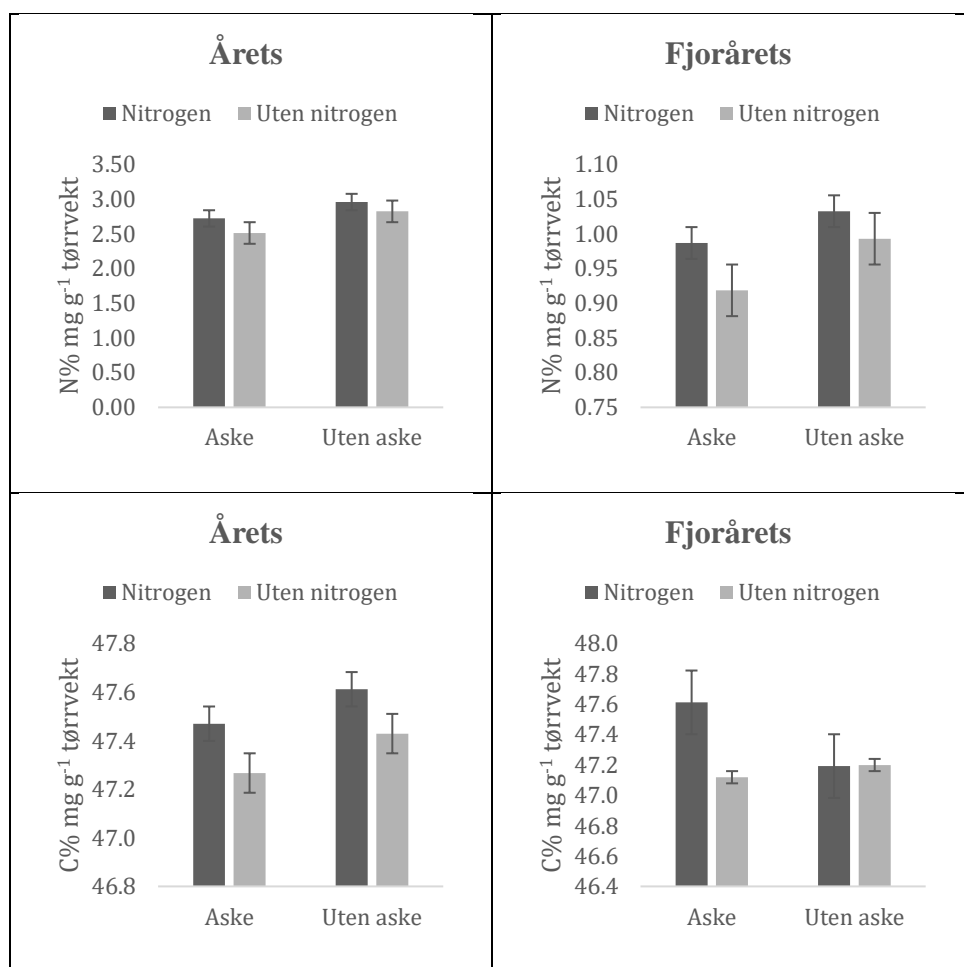
3.1 C og N konsentrasjoner

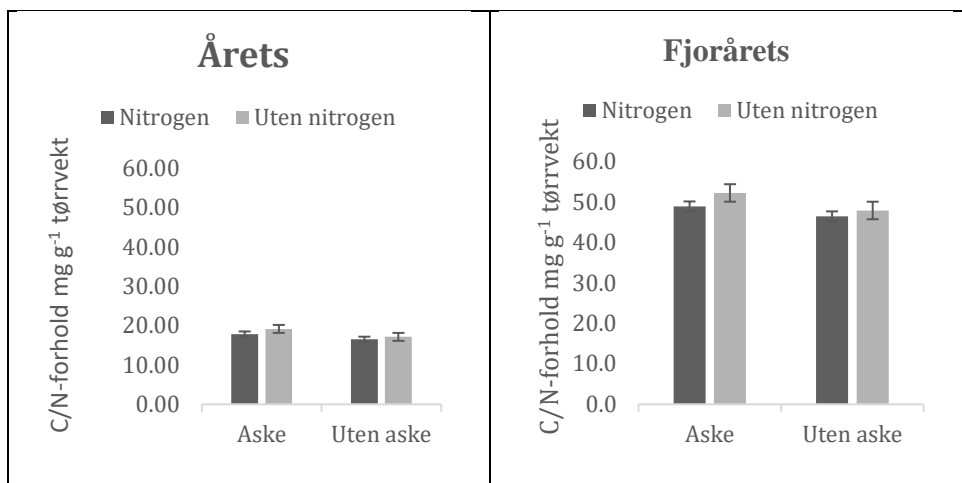
Årets nåler fra kontrolltrær hadde 2,8 ganger høyere N% enn fjorårets. N% var 1,05 ganger høyere ved N-gjødsling kontra kontroll i årets nåler og 1,04 ganger høyere ved fjorårets nåler. N-gjødsling hadde en signifikant positiv effekt på C%. Den signifikante interaksjonen aske × nitrogen viser at askegjødning reduserte N-gjødsling sin effekt på C% i årets nåler. C/N forholdet ble signifikant påvirket av N-gjødsling. C/N var 1,25 ganger høyere etter askegjødning enn etter N-gjødsling i fjorårets nåler og 1,16 ganger høyere i årets nåler. Videre var alle behandlingene summert for C/N 2,8 ganger større i fjorårets nåler sammenlignet med årets nåler (tabell 2 og figur 3).

Tabell 2. ANOVA fra element-analyse med Perm. P-verdier fra F-test. Kjørt med 999 permuteringer og faktorene alder, aske og nitrogen.

	C%	N%	C/N
Alder (Al)	0.196	0.001***	0.194
Nitrogen (N)	0.001***	0.001***	0.001***
Aske (As)	0.998	0.001***	1.000
Al x As	0.614	0.030*	0.595
Al x N	0.067	0.072	0.066
As x N	0.015*	0.202	0.007**
Al x As x N	0.165	0.586	0.189

Signif. koder: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05





Figur 3. Konsentrasjon (%) av C og N, samt C/N for årets nåler og fjorårets nåler under de ulike behandlingsregimene.

3.2 Fenoler i fjorårets og årets nåler

Fjorårets nåler

I fjorårets nåler førte kombinert gjødsling med både N-gjødsel og askegjødsel til en signifikant reduksjon i konsentrasjonen av piceatannol glucoside og dihydroquercetin. N-gjødsel alene, på den annen side, ga en signifikant reduksjon i konsentrasjon av resveratrol aglycon, methyl-piceatannol glucoside, mono-coumaroylastragallic acid og dicoumaroylastragallic acid I. Askegjødsling ga en signifikant reduksjon i konsentrasjonen av kaempferolglykosid II, men økte konsentrasjonen av coumarin. Kombinert gjødsling med både N-gjødsling og askegjødsling ga en signifikant reduksjon av MeOH-løslige tanniner, men signifikant økning av MeOH-uløslige tanninene. Videre ga N-gjødsling en signifikant økning i på MeOH-løslige tanniner mens askegjødsling signifikant reduserte de MeOH-uløslige tanninene (tabell 3).

Årets nåler

I årets nåler førte kombinert gjødsling med N-gjødsel og askegjødsel til en signifikant reduksjon i konsentrasjonen av flavonoidene gallic acid, apigenin-7-glucoside I, kaempferol-glyc- II, -III og -IV, myricetin-glyc. Samtidig økte konsentrasjonen av kaempferol-3-glucoside. N-gjødsel alene økte signifikant konsentrasjonen av quercetin-glyc I og kaempferol-glyc II. Askegjødsel alene økte konsentrasjonen av stilbenet iso-rhapontin og flavonoidene kaempferol-glyc- I, -III,

og -V, men reduserte konsentrasjonen av flavonoidene quercetinglyc I, kaempferol-glyc II og myricetinglyc I. Kombinert gjødsling med N-gjødsel og askegjødsel ga en signifikant reduksjon av de MeOH-løslige tanninene (tabell 3).

Tabell 3. Fjoråret og årets nåler med identifiserte fenoler og kondenserte tanniner målt med gjennomsnitts mg g⁻¹ tørrvekt SE± for de ulike gjødslings/behandlingsregimer (nitrogen, aske, nitrogen + aske og kontroll). *P*-verdi er regnet ut med to faktorer (nitrogen og aske) med en ANOVA permuteringstest (99999 permuteringer). For summering av fenol- og kondenserte tanningrupper se *tabell 4*.

Fjorårets nåler <i>Stilbener</i>	Nitrogen		Uten nitrogen		<i>P-verdi</i>		
	Aske	Uten aske	Aske	Uten aske	N	A	N×A
Piceatannol glucoside	5.55±0.77	7.94±0.79	6.15±0.87	4.57±0.50	0.076	0.281	0.010
Piceatannol glucoside	2.31±0.22	2.29±0.27	2.14±0.37	2.66±0.29	0.313	0.268	0.232
Resveratrol glucoside	8.54±2.07	8.76±1.24	11.88±1.74	7.96±1.36	0.524	0.869	0.312
Resveratrol aglycon	0.21±0.06	0.31±0.06	0.66±0.28	0.52±0.11	0.027	0.490	0.325
Methylpiceatan-nol glucoside	0.92±0.14	0.98±0.16	1.38±0.25	1.49±0.32	0.020	0.376	0.346
Isorhapotin	0.26±0.06	0.49±0.08	0.34±0.09	0.49±0.12	0.248	0.742	0.330
<i>Sum, stilbener</i>	<i>17.79±3.32</i>	<i>20.77±2.60</i>	<i>22.55±3.60</i>	<i>17.69±2.70</i>			
Flavonoider							
Dihydroquercetin	0.83±0.14	1.44±0.51	0.93±0.16	0.79±0.35	1.000	0.559	0.025
Kaempferol-gluc I	0.26±0.03	0.32±0.09	0.39±0.03	0.21±0.03	1.000	0.174	0.908
Kaempferol-gluc II	0.16±0.02	0.17±0.04	0.19±0.02	0.22±0.03	0.199	0.025	1.000
Kaempferol-gluc III	0.16±0.02	0.19±0.05	0.24±0.10	0.23±0.07	0.480	0.739	0.066
Isorhamnetin	0.55±0.06	0.61±0.17	0.72±0.07	0.56±0.09	1.000	0.692	0.612
Mono- coumaroylstragallin	0.14±0.02	0.11±0.02	0.15±0.01	0.24±0.08	0.040	0.258	1.000
Dicoumaroylstragallin I	0.75±0.24	0.69±0.20	0.77±0.22	0.98±0.25	0.047	0.133	0.668
Dicoumaroylstragallin II	0.35±0.13	0.65±0.22	0.31±0.11	0.21±0.07	1.000	0.097	0.280

Apigenin7glucoside	0.10±0.02	0.11±0.04	0.11±0.02	0.16±0.03	0.426	0.714	0.669
Gallocatechin	4.84±1.48	4.55±2.18	0.94±0.27	4.85±1.36	0.330	0.202	0.127
<i>Sum, flavonoider 2017</i>	<i>7.31±2.02</i>	<i>7.40±3.52</i>	<i>3.82±0.85</i>	<i>8.45±2.01</i>			
<i>Andre fenoler</i>							
Lignan	8.87±3.32	11.79±3.48	10.98±3.37	7.76±0.92	0.628	0.928	0.867
Acetphenone	0.18±0.02	0.20±0.03	0.31±0.06	0.19±0.04	0.082	0.991	0.820
Coumanin	0.24±0.05	0.26±0.07	0.34±0.08	0.12±0.05	0.405	0.050	0.163
<i>Sum, lavmolekylære fenoler</i>	<i>9.29±3.39</i>	<i>12.25±3.58</i>	<i>11.63±3.51</i>	<i>8.07±1.01</i>			
<i>Fenolsyrer</i>							
HCA I	1.64±0.38	0.90±0.25	1.45±0.34	1.02±0.49	0.520	0.284	0.820
HCA II	0.10±0.01	0.08±0.01	0.20±0.02	0.06±0.01	0.076	0.690	0.361
HCA III	0.07±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01	0.10±0.01	0.063	0.827	0.363
<i>Sum, Fenolsyrer</i>	<i>1.81±0.40</i>	<i>1.05±0.40</i>	<i>1.69±0.37</i>	<i>1.18±0.51</i>			
<i>Kondenserte tanniner</i>							
MeOH løslige	39.63±2.02	46.88±2.15	52.03±2.04	43.59±1.75	0.025	0.550	<0.001
MeOH uløslige	19.47±1.54	22.25±1.24	18.87±1.37	19.36±1.33	0.066	0.030	0.027
<i>Sum, kondenserte tanniner</i>	<i>59.10±3.56</i>	<i>69.13±3.39</i>	<i>70.90±3.41</i>	<i>62.95±3.08</i>			

Årets nåler	Nitrogen		Uten nitrogen		P-verdi		
	Aske	Uten aske	Aske	Uten Aske	N	A	N×A
<i>Stilbener</i>							
Isorhapotin	0.10±0.04	0.18±0.04	0.25±0.05	0.15±0.05	0.569	0.794	0.589
Isorhapotin	0.51±0.12	0.19±0.07	0.19±0.05	0.17±0.05	0.564	0.010	0.378
Stilben-uspeifisert	NA	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.300	0.127	0.865
Lepi-gallocatechin	3.83±1.15	3.51±0.96	7.78±2.09	11.23±6.82	0.444	0.187	0.589
<i>Sum, stilbener 2016</i>	<i>4.44±1.30</i>	<i>3.89±1.08</i>	<i>8.23±2.19</i>	<i>11.56±6.91</i>			
<i>Flavonoider</i>							

Gallocatechin	0.84±0.15	2.09±0.94	0.67±0.12	1.06±0.14	0.768	0.573	0.016
Kaempferol-gluc	0.05±0.01	0.11±0.03	0.15±0.07	0.22±0.12	0.817	0.915	0.201
Quercetinglyc I	0.35±0.11	0.65±0.11	0.41±0.07	0.49±0.07	0.717	0.194	0.169
Epigallo-catechin	0.04±0.04	0.20±0.12	0.15±0.09	0.71±0.31	0.918	0.697	0.089
Quercetinglyc I	0.03±0.03	0.13±0.10	0.20±0.12	0.39±0.15	0.596	0.501	0.143
Quercetinglyc II	0.64±0.16	1.49±0.96	0.51±0.15	1.16±0.35	0.532	0.020	0.755
Quercetinglyc III	0.17±0.24	1.07±0.23	0.55±0.19	0.91±0.17	0.010	0.576	0.813
Apigenin7glucoside I	0.27±0.04	0.33±0.08	0.35±0.09	0.64±0.12	0.670	0.670	0.025
Apigenin7glucoside II	0.20±0.04	0.23±0.05	0.16±0.02	0.29±0.06	0.229	0.080	0.907
Kaempferol-gluc I	8.52±0.68	7.11±0.46	10.35±0.62	6.97±0.65	0.830	<0.001	0.120
Kaempferol-gluc II	2.76±0.58	6.79±2.62	1.10±0.10	3.61±0.57	0.030	<0.001	<0.001
Kaempferol-gluc III	0.05±0.01	0.05±0.02	0.09±0.01	0.07±0.02	0.144	0.010	0.037
Kaempferol-gluc IV	0.07±0.03	0.06±0.01	0.11±0.03	0.84±0.51	0.438	0.360	0.018
Myricetinglyc	0.09±0.02	0.07±0.02	0.06±0.02	0.21±0.07	0.173	0.05	<0.001
Kaempferol-gluc V	0.09±0.02	0.16±0.04	0.18±0.02	0.07±0.02	0.898	0.030	0.588
Kaempferol-gluc VI	0.14±0.03	0.01±0.03	0.08±0.02	0.25±0.12	0.166	0.477	0.140
Kaempferol-glucoside	0.14±0.02	0.06±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.236	0.994	0.010
<i>Sum, flavonoider 2017</i>	<i>14.45±2.21</i>	<i>20.61±5.84</i>	<i>15.21±1.76</i>	<i>17.98±3.47</i>			
<i>Andre fenoler</i>							
Cumarine	27.79±11.16	17.40±4.78	12.47±3.14	36.55±10.88	0.622	0.743	0.442
<i>Fenolsyrer</i>							
Hydro-cycinnamic acis	0.51±0.11	0.78±0.21	0.65±0.11	0.32±0.09	0.247	0.101	0.204
<i>Kondenserte tanniner</i>							

MeOH løslige	55.03±4.00	67.37±5.76	67.68±4.62	60,4±5.07	0.823	0.411	0.028
MeOH uløslige	36.76±2.59	44.06±3.73	37.72±2.63	43.43±4.06	0.973	0.173	0.642
<i>Sum, kondenserte tanniner</i>	<i>91.79±6.63</i>	<i>111.43±9.49</i>	<i>105.4±7.21</i>	<i>103.83±9.13</i>			

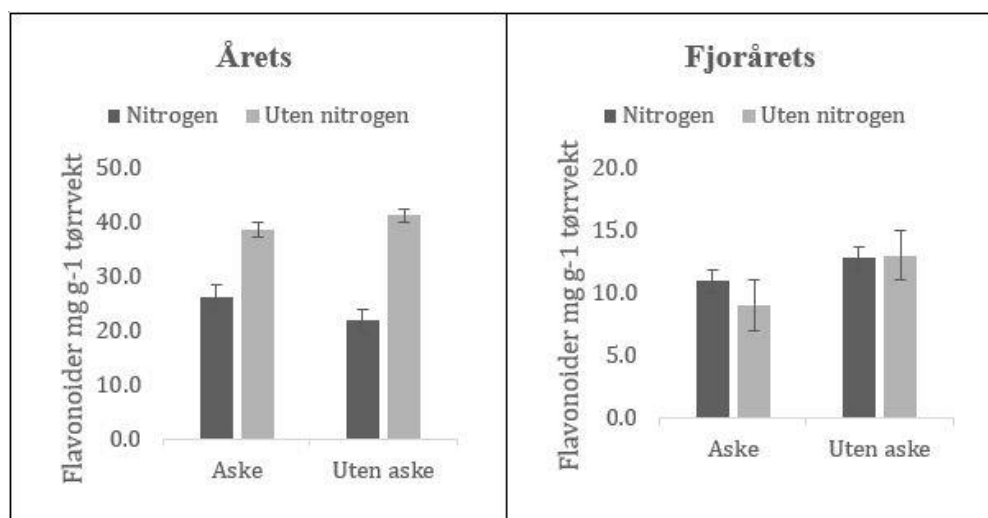
3.3 Fenolgrupper og kondenserte tanniner

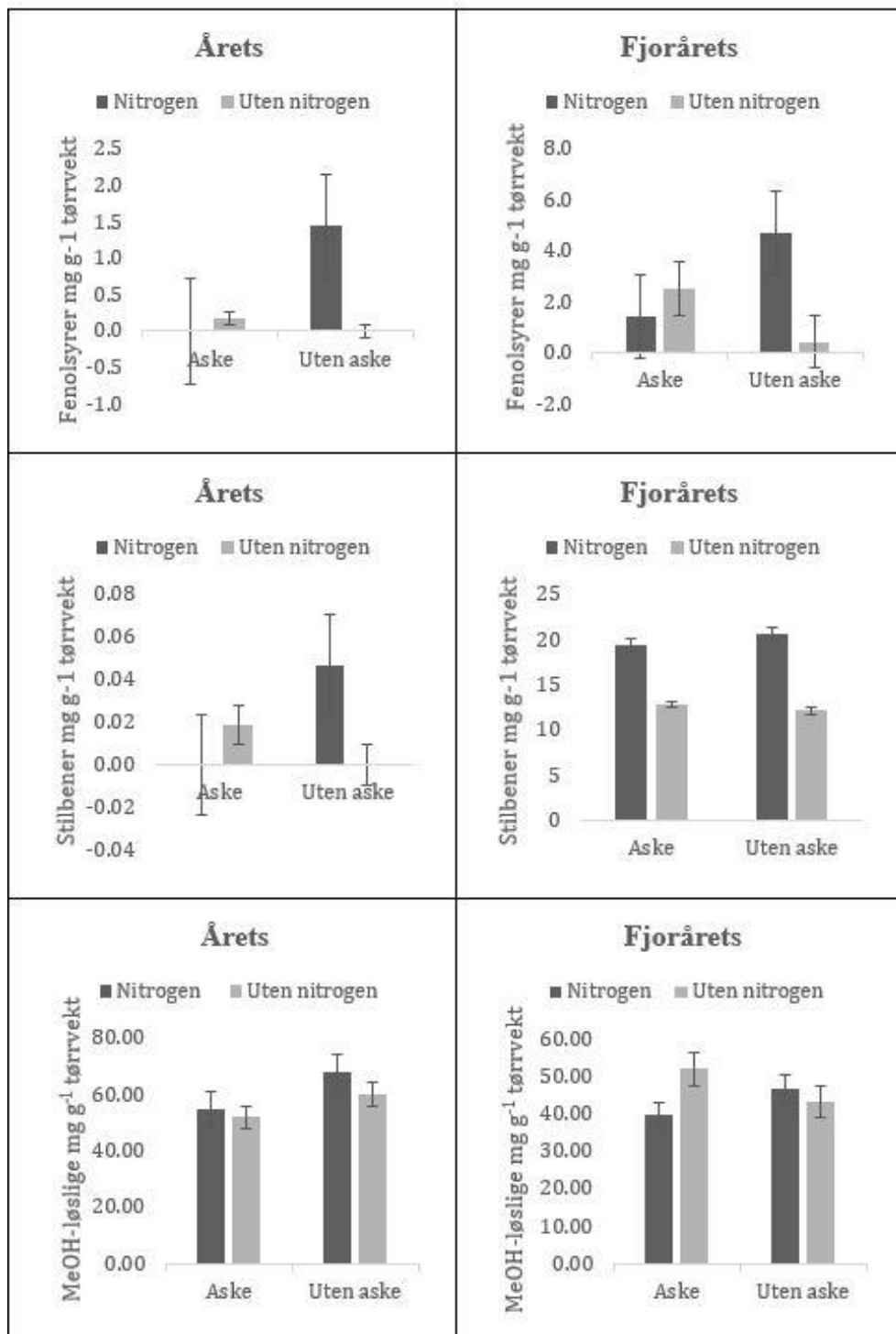
De individuelle fenolene fra HPLC-analysene ble gruppert etter kjemisk tilhørighet. Videre ble summene av konsentrasjonene for hver gruppe analysert for å kunne sammenligne effektene av behandlingene mellom de to nåleårgangene. Alle fenolgrupper og begge typer kondenserte tanniner var signifikant forskjellige mellom fjorårets og årets nåler. Årets nåler fra kontrolltrær hadde 3,2 ganger høyere konsentrasjon av flavonoider enn fjorårets. Årets nåler fra kontrolltrær hadde -28,1% mindre MeOH-løselige tanniner, men 128,6% mer av MeOH-uløslige tanninener enn fjorårets nåler. På den annen side hadde fjorårets nåler (alle behandlinger summert) omtrent 1000 ganger så høyt innhold av stilbener og 5,6 ganger så høyt innhold av fenolsyrer. N-gjødsling reduserte konsentrasjonen av flavonoider sterkest i årets nåler (-47,0%), men effekten var også signifikant for fjorårets nåler (-1,5%). Askegjødsling ga økt konsentrasjon av flavonoider, stilbener, samt MeOH-uløslige tanniner i årets nåler. Videre viste interaksjonen alder × aske at askegjødsling reduserte årets flavonoider med -15,4% og fjorårets nåler med -54,8%. Askegjødsling viste videre -28,8% reduksjon på årets stilbener, men en økt effekt på 27,5% i fjorårets stilbener. Kombinert gjødsling med askegjødsling og N-gjødsling viste en signifikant reduserende effekt på de MeOH-løslige tanninene for begge nåleårganger. Det var ingen signifikant effekt av noen av behandlingene på den totale konsentrasjonen av lavmolekulære fenoler (alle individuelle forbindelser summert) (tabell 2 og figur 4).

Tabell 4. ANOVA med Perm.P-verdi av fenolgrupper og kondenserte tanniner (tannin.u=MeOH-uløslige og tannin.l=MeOH-løslige). Kjørt med 999 permuteringer og faktorene alder, aske, nitrogen.

	Flavonoider	Fenol-syrer	Stilbener	Sum. Fenoler	Kond. tannin.l.	Kond. tannin.u.
Al	0.001**	0.003**	0.001**	0.027**	0.001**	0.001**
N	0.001**	0.596	0.886	0.611	0.978	0.804
As	0.005**	0.329	0.003**	0.765	0.956	0.037*
Al × As	0.003**	0.118	0.004**	0.259	0.443	0.143
Al × N	0.067	0.826	0.488	0.354	0.533	0.786
As × N	0.011	0.629	0.785	0.514	0.001**	0.206
Al × As × N	0.089	0.399	0.206	0.743	0.531	0.942

Signif. koder: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05





Figur 4. Fenol og kondenserte tanningrupper fordelt på årets nåler, fjorårets nåler og de ulike behandlingsregimene: nitrogen, aske, nitrogen + aske og kontroll. Vær oppmerksom på forskjell på størrelsen av verdiene i y-akse på årets og fjorårets nåler.

4 Diskusjon

Dette studiet viste at skoggjødsling har en effekt på konsentrasjonen og sammensetningen av kjemiske forsvarsstoffer hos gran. Sammensetningen og konsentrasjonen av ulike stoffer var imidlertid ulik mellom nåleårganger og mellom gjødseltype. Dette kan ha betydning for interaksjon mellom trofiske nivåer og økosystemets sammensetning.

I tråd med min første hypotese om at *N-gjødsling øker nitrogeninnholdet i nålene*, ga N-gjødsling en økning i N% på henholdsvis 17,9% og 11,9% i årets og fjorårets nåler, sammenliknet med kontrollnålene. Dette er sammenlignbart med tidligere studier, f.eks. Nybakken et al. (2018) og Throop & Lerdau (2004), hvor sistnevnte målte en gjennomsnittlig økt N% i barnålene med 22% som en respons på N-gjødsling. Videre hadde N-gjødsling en positiv effekt på C%, men totalt en reduserende effekt på C/N (altså totalt en større effekt på N). Dette støtter også tidligere teori om at nitrogen gir en direkte gjødseffekt i form av økt karbonopptak (Högberg et al., 2006; Pregitzer et al., 2008; Thomas et al., 2010; De Vries et al., 2014; Gundale et al., 2014).

Askegjødsling viste den største effekten på C/N-forholdet i begge nåleårganger, men tydeligst for fjorårets nåler. Dette kan ses i lys av Jacobsen, (2003) og Sikström et al. (2009), som viste at askegjødsling gir en økt tilvekst ved gode boniteter og redusert tilvekst i lave boniteter. I min studie hadde askegjødsling en negativ effekt på N% (tabell 2 og figur 3). Min hypotese II om at *askegjødsling fører til økt innhold av nitrogen*, støttes derfor ikke av dette datasettet. Dette var ikke forventet da studien til Persson et al. (1990/1991) viste at askegjødsling påvirket netto nitrogenopptak som igjen fører til økt plantetilgjengelig nitrogen. En mulig årsak til at askegjødsling ikke hadde økt effekt på N% i denne studien kan være at boniteten var for lav.

Hypotese III, *gjødsling reduserer granas produksjon av kjemiske forsvarsstoffer*, har sitt utspring i ulike studier: Virjamo et al. (2014) som undersøkte forsvarskjemien til små granplanter etter nitrogengjødsling, Bobbink et al. (2010) som viste til økosystemendringer som følge av N-avsetning og Koricheva et al. (1998) med sin sammenfatning av studier gjort på effekter av N-gjødsling på planteforsvar. Mine resultater viser imidlertid ingen effekt av

gjødsling på det totale innholdet av lavmolekylære fenoler, men jeg fant endringer i konsentrasjoner både av enkeltstoffer (tabell 3) og grupper av fenoler i begge nåleårganger (tabell 4). Det totale innholdet av flavonoider som gruppe ble redusert som følge av gjødsling i begge nåleårganger (figur 4). Dette samsvarer med de funn som ble gjort av Nybakken et al. (2018). De to enkeltstoffene som hadde størst signifikant effekt, fikk dette ved aske som gjødsel. Kaempferol-gluc I økte, mens kaempferol-gluc II ble redusert (tabell 3). I følge Closen & McArthur (2002) er flavonoider ofte lokalisert ved vakuoler i epidermis og kan derfor se ut til å ha en viktig rolle som beskyttelse mot skadelig ultrafiolett (UV) lys. Videre hevdes det at variasjonen av flavonoid-konsentrasjoner ikke nødvendigvis er en respons på tilgjengelig ressurser, men en respons av hvor utsatt planten er for å få UV-skader. I studiene til Ryan et al. (1998) og Nybakken et al. (2012) viste Quercetiner og kaempferoler å øke konsentrasjonen ved økt mengde UV-lys. Det kan også tenkes at denne lysbeskyttelsen vil være viktigst for nye nåler som ennå ikke har fått et tykt vokslag og hvor epidermis fortsatt er tynn (Turunen et al., 1999). Flavonoider ser også ut til å ha en rolle som antibakte på samme måte som de kondenserte tanninene. Disse to gruppene hadde høye konsentrasjoner i årets nåler som kan ses i lys av studien til Bryant et al. (1983) hvor flavonoider viste å ha en rolle som antibakte og Barbehenn & Constabel (2011) sin studie hvor også kondenserte tanniner viste å ha den samme rollen. Den reduksjonen jeg fant av flavonoider som følge av gjødsel vil derfor kunne påvirke granas lysbeskyttelse og antibakte, særlig ved nitrogengjødsling for årets nåler av flavonoider (figur 4). I samsvar med resultatene til Nybakken et al. (2018) viste stilbener som gruppe en større konsentrasjonen etter gjødsling (figur 4). Det kan derfor stilles spørsmål om grana gjør en endring i sin forsvarsstrategi ved å øke soppresistensen? Kanskje trærne ikke reduserer, men omprioriterer forsvaret etter gjødsling? Stilbenene er plassert i den midtre del av grannåla og øker konsentrasjonen utover vekstsesongen det første året (Solhaug, 1990), de spiller derfor trolig liten rolle som UV-beskyttelse (Harju et al., 2009). Derimot ser det ut til at stilbenene har en rolle som soppbeskyttelse, dette er begrunnet med at de ofte blir funnet i økte konsentrasjoner ved soppangrep (Chong et al., 2009; Jeandet et al., 2010; Ganthaler et al., 2017a). Mine resultater viser at gruppen med fenolsyrer hadde en økt total konsentrasjon som følge av gjødsel. Den største forskjellen var imidlertid mellom årganger, hvor fjorårets nåler hadde størst konsentrasjon. Det totale bildet er altså mer komplisert enn det jeg la til grunn for min hypotese.

Videre undersøkte jeg nålenes konsentrasjon av kondenserte tanniner. Kondenserte tanniner er polyfenoler, store, kompliserte molekyler bygd opp av flere flavonoid-enheter, og er viktige

som antibeite og beskyttelse mot sopp og bakterieangrep (Barbehenn & Constabel, 2011; Hagerman, 2002). For de MeOH-uløselige kondenserte tanninene var konsentrasjonen størst i årets nåler (figur 4). Effekten av kombinert gjødsling med askegjødsel og N-gjødsel var signifikant reduserende for konsentrasjonen av de MeOH-løselige kondenserte tanninene for begge årganger og støtter hypotese III: *Gjødsling reduserer granas produksjon av kjemiske forsvarsstoffer* (tabell 4). I Nybakken et al. (2018) sin studie hadde de kondenserte tanninene størst konsentrasjon ved nitrogen gjødsling. Denne effekten hadde nitrogen også i min studie med unntak for de MeOH-løslige tanninene fra fjorårets nåler hvor askegjødsel ga størst konsentrasjon. Resultatene tyder også på at askegjødsel virket reduserende for konsentrasjonen av MeOH-uløslige tanniner i fjorårets nåler (figur 4).

Videre hypotetiserte jeg at det er høyere konsentrasjoner av fenoler i fjorårets nåler sammenliknet med årets. Resultatene viste at den totale fenolkonsentrasjonen var størst i fjorårets nåler, men dette varierte mellom de ulike gruppene: stilbener, fenolsyrer og gruppen «andre fenoler» hadde høyest konsentrasjon i fjorårets nåler, mens flavonoider og kondenserte tanniner hadde høyest konsentrasjoner i årets nåler (tabell 3 og figur 4).

Det er også viktig å trekke frem at den kombinerte gjødslingen med askegjødsel og N-gjødsel er nokså overdrevet i forhold til vanlig norsk praksis. Likevel er gjødselmengden av aske (3t/ha) og nitrogen (150kg/ha) innenfor den praksis som utøves i Sverige og Finland, og for nitrogen i Norge (Haugland et al., 2014; Hanssen et al., 2014). Denne studien er derfor unik med tanke på en realistisk gjødselmengde i motsetning til Nybakken et al. (2018) hvor de hadde gjødslet med nitrogen (150kg/ha) årlig over 13 år.

Resultatene viser til varierende effekter av askegjødsel på det kjemiske forsvaret, men flere eksperimenter med reduserte mengder av askegjødsel ville trolig gitt større variasjon av effekter. I en finsk studie utført av Saarsalmi et al. (2012) viste askegjødsel i kombinasjon med N-gjødsel seg å gi forlenget tilveksteffekt av N-gjødselen. Dette vil trolig også forlenge den reduserte effekten på de MeOH-løselige kondenserte tanninene. I rapporten til Hanssen et al. (2014) har de utarbeidet en oversikt over hvilke vegetasjonstyper som egner seg best for askegjødsling i henhold til ønsket effekt og minimale miljøkonsekvenser. Innføring av

askegjødsling som lovlig skoggjødning bør derfor vurderes ut ifra askens effekt på granas kjemiske forsvar samt andre produksjons- og miljøeffekter.

5 Oppsummering og konklusjon

Skoggjødsling har en effekt på konsentrasjonen og sammensetningen av kjemiske forsvarstoffer hos gran. Disse effektene og hvilken betydning de har for granas forsvar kan være nyttig kunnskap med tanke på de klimaendringene vi kan møte. Ved mildere og våtere vintre samt mer ekstremtørke kan skadedyr og patogener få konkurransefortrinn. Dette vil kreve en robust skog med intakt selvforsvar. Gjødning av skog kan gi oss gode klimagevinster. Sammen med mer kunnskap om hvilken effekt dette har på økologien, vil vi kunne stå mer rustet i et ekstremt klima hvor trærnes forsvarskjemi blir satt på prøve.

Videre undersøkelser innen dette feltet og med varierende klima, boniteter og gjødselmengder vil kunne gi oss flere svar på hvilken effekt gjødsling har på granas forsvarskjemi. Hva med å teste om bar/nåler fra gjødsle skog er mer attraktivt for «beitere»/skadegjørere?

Litteratur

- Barbehenn, R. V., & Constabel, C. P. (2011). Tannins in plantherbivore interactions. *Phytochemistry* 72(13), 1551-1565.
- Bergh, J., Nilsson, U., Allen, H. L., Johansson, U. & Fahlvik, N. (2014). Long-term response of Scots pine and Norway spruce stands in Sweden to repeated fertilization and thinning. *Forest Ecology and management* 320, 118-128.
- Bergquist, J., Ekö, P. M., Elfing, B., Johansson, U. & Thuresson, T. (2005). Jämförelse av produktionspotential mellan tall, gran och björk på samma ståndort. *Skogsstyrelsen. Rapport* 2005(19).
- Blinkley D., & Fisher, R. F. (2013). *Ecology and Management Of Forest Soils, 4th Edn.* Chichester: Wiley-Blackwell.
- Blinkley, D. & Högberg, P. (2016). Tamm Review: Revisiting the influence of nitrogen deposition on Swedish forest. *Forest Ecology and Management* 368, 222-239.
- Blodgett, J. T., Herms, D. A., & Bonello, P. (2005). Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* 208, 373-382.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, R., Alkemade, R., Ashmore, M., ... De Vries, W. (2010). Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, 20, 30-59.
- Brignolas, F., Lieutier, F., Sauvard, D., Christiansen, E., & Berryman, A. A. (1998). Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera:Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. *Can. J. For. Res.* 28, 720-728.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S., & Klein, D. R. (1983). Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40, 357-368.
- Chalker-Scott, L. & Krahmer, R. L. (1989). Microscopic studies of tannin formation and distribution in plants tissues. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. New York: Plenum Press, pp. 345-368.

- Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plan. Sci.* 177,143-155.
- Clarke, N., Økland, T., Hanssen, K. H., Norbakken, J. F. & Wasak, K. (2017). Short-term effects of hardened wood ash and nitrogen fertilisation in a Norway spruce forest on soil solution chemistry and humus chemistry studied with different extraction methods. *Scandinavian Journal of Forest Research* 33:1, 32-39.
- Close, D. C., & McArthur, C. (2002). Rethinking the role of many plant phenolics-protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99, 166-172.
- Coley, D. D., Bryant, J. P., & Chapin, F. S. III. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230, 895-899.
- Delwiche, C. C. (1970). Journal article, The Nitrogen Cycle. *Scientific American* 223: 3, 136-147.
- De Vries, W., Du, E., & Butterbach-Bahl, K. (2014). Short and long-term impacts of nitrogen deposition on carbon sequestration by forest ecosystems. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 9-10, 90-104.
- Edenius, L., Mikusinski, G., Witzell, J. & Bergh, J. (2012). Effects of repeated fertilization of young Norway spruce on foliar phenolics and arthropods: Implications for insectivorous birds' food resources. *Forest Ecology and Management* 277:38-45.
- Forskrift om organisk gjødsel. (2003). Forskrift om gjødselvarer mv. Av organisk opphav. 2003-07-04-951. Hentet fra <https://lovdata.no/pro/#document/SF/forskrift/2003-07-04-951?searchResultContext=1509>
- From, F., Strengbom, J., & Nordin, A. (2015). Residual Long-Term Effects of Forest Fertilization on Tree Growth and Nitrogen Turnover in Boreal Forest. *Forest* 6, 1145-1156.
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and The World: 200 years of changes. *Ambio* 31, 64-71.
- Ganthaler, A., Stöggl, W., Kranner, L., & Mayr, S. (2017a). Foilar phenolic compounds in norway spruce with varying susceptibility to *Chrysomyxa rhododendri*: analyses of seasonal and infection-induced accumulation patterns. *Front. Plant Sci.* 8:1173.

- Ganthaler, A., Stöggl, W., Mayr, S., Kranner, I., Schüler, S., Wischnitzki, E., Sehr, E. M., Fluch, S. & Trujillo-Moya, C. (2017b). Association genetics of phenolic needle compounds in Norway spruce with variable susceptibility to needle bladder rust. *Plant Molecular Biology* 94, 229-251.
- Gundale, M. J., From, F., Bach, L. H., & Nordin, A. (2014). Anthropogenic nitrogen deposition in boreal forest has a minor impact on the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 20, 276-286.
- Hanssen, K. H., Clarke, N., & Dibdiakova. (2014). Tilbakeføring av treaske til skog; egenskaper, effekter og metoder. *Nors insittutt for skog og landskap Rapport 09/2014*.
- Harju, A. M., Venäläinen, M., Laakso, T., & Saranpää, P. (2009). Wounding response in xylem of Scots pine seedlings shows wide genetic variation and connection with the constitutive defence of heartwood. *Tree Phys.* 29, 19-25.
- Haugland, H., Backer, E. B., Løbersli, E. M., Selboe, O. K., Gunnardottir, H., Granhus, A., Sjøgaard, G., Hanssen, K. H., Terum, T. & Sørli, H. A. (2014). Måltrettet gjødsling av skog som klimatiltak. Egne arealer og miljøkriterier. *Miljødirektoratet, Rapport M174 – 2014*, 1-146.
- Högberg, P., Fan, H., Quist, M., Binkley, D. A. N., & Tamn, C.O. (2006). Tree growth and soil acidification in response to 30 years of experimental nitrogen loading on boreal forest. *Global Change Biology*, 12, 489-499.
- Jacobson, S. (2003). Addition of stabilized wood ashes to Swedish coniferous stand on mineral soils – Effects on stem growth and needle nutrient concentrations. *Silva Fennica* 37, 437-450.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, s., et al. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors* 36, 331-341.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., & Keinänen, M. (1998). Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: Hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos* 83, 212-226.
- Kytö, M., Niemelä, P., & Annala, E. (1996). Vitality and bark beetle resistance of fertilized Norway spruce. *For. Ecol. Manag.* 84, 149-157.

- Landbruksdirektoratet. (2017, 20.03). *Mer penger til gjødsling i 2017*. Lastet ned fra <https://www.landbruksdirektoratet.no/no/eiendom-og-skog/skog-og-klima/gjodsling-som-klimatiltak/gjodsling>
- Lieutier, F., Brignolas, F., Sauvard, D., Yart, A., Galet, C., Brunet, M. & Sype, H. (2003). Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 23, 247-256.
- Lindkvist, L. (2000). Aska från biobränsle. Produktions- och kvalitetsaspekter beträffande näringskompensasjon och vitalisering av skogmark. *Skogstyrelsen, Rapport 5/2000*, Jönköping. 31 s.
- Meteorologisk institutt. (2018, 30.04). *Været som var (Klima)*. Lastet ned fra <https://www.yr.no/sted/Norge/%C3%98stfold/Hob%C3%B8/B%C3%A6r%C3%B8/klima.m%C3%A5ned05.html>
- Meunier, C. L., Gundale, M. J., Sánchez, I.S & Liess, A. (2015). Impact of nitrogen deposition on forest and lake food webs in nitrogen-limited environments. *Global Change Biology* 22, 164-179.
- Miljødirektoratet. (2017, 20.03). *Parisavtalen*. Lastet ned fra <http://www.miljostatus.no/parisavtalen/>
- Moore, J. P., Westall, K. L., Ravenscroft, N., Farrant, J. M., Lindsey, G. G., & Brandt, W. F. (2004). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical induced oxidation. *Polyphenols Communications Helsinki* 2004, 79.
- Narodoslawsky, M. & Obernberger, I. (1996). From waste to raw material – the route from biomass till wood ash for admium and other heavy metals. *Journal of Hazardious Materials* 50, 157-168.
- Nybakken, L., Julkunen-Tiitto, R., & Hörkä, R. (2012). Combined enhancements of temperature and UVB influence growth and phenolics in clones of the sexually dimorphic *Salix myrsinifolia*. *Physiologia Plantarum* 145, 551-564.
- Nybakken, L., Lie, M. H., Julkunen-Tiitto, R., Asplund, J., & Ohlson, M. (2018). Fertilization Changes Chemical Defence in Needles of Mature Norway Spruce (*Picea abies*). *Frontier in Plant Science* 9, 770.

- PEFC. (2017, 10.04). *PEFC Norge, den reviderte standarden*. Lastet ned fra http://www.pefcnorge.org/artikkel.cfm?ID_art=190
- Persson, T., Wiren, A. & Andersson, S. (1990/1991). Effects of liming on carbon and nitrogen mineralization in coniferous forests. *Water Air Soil Pollution* 54, 351-364.
- Pizzi, A. & Cameron, F. A. (1986). Flavonoid tannins – structural wood components for drought-resistant mechanisms of plants. *Wood Science and Technology* 20, 119.
- Pregitzer, K. S., Burton, A. J., Zak, D. R., & Talhelm, A. F. (2008). Simulated chronic nitrogen deposition increases carbon storage in Northern Temperate forest. *Global Change Biology*, 14, 142-153.
- Reuber, S., Bornman, J. F., & Weissenböck, G. (1996). Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* 97, 160-168.
- Rozema, J., VanDeStaaaj, J., Björn, L. O., & Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Tree* 12, 22-28.
- Ryan, K. G., Markham, K. R., Bloor, S. J., Bradley, J. M., Mitchell, K. A., & Jordan, B. R. (1998). UVB radiation induced increase in quercetin: Kaemferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochem Photobiol.* 68, 323-330.
- Saarsalmi, A., Smolander, A., Kukkola, M., Moilanen, M. & Saramaki, J. (2012). 30- Year effect of wood ash and nitrogen fertilization on soil chemical properties, soil microbial processes and stand growth in a Scot pine stand. *Forest Ecology and Management* 278, 63-70.
- Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science* 1, 377-382.
- Sikström, U., Jacobson, S., Johansson, U., Kukkola, M., Saarsalmi, A. & Hanssen, K. H. (2009). Långtidseffekter på skogproduktion efter askåterföring och kalking – Preliminära resultat från en pilotstudie. *Värmforsk Rapport* 1107, 22.
- Simmonds, M. S. J. (2003). Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64, 21-30.

- Solhaug, K. A. (1990). Stilbene glucosides in bark and needles from *picea* species. *Scan. J. For. Res.* 5, 59-67.
- Skogsstyrelsen. (2008). Rekommendationer vid uttag av avverkningsrester och askåterföring. Meddelande 2/08, 33.
- Stamp, N. (2003). Out of the quagmire of plant defence hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 78, 23-55.
- Ståhl, H. P. & Bergh, J. (2013). Skogsskötselserien - Produktionshöjande åtgärder. *Jönköping: Skogsstyrelsens förlag* 16:1-87
- Tamm, C.O. (1991). *Nitrogen in Terrestrial Ecosystems: Questions of Productivity, Vegetational Changes, and Ecosystem Stability*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Taylor, R. J. & Shaw, D. C. (1983). Allelopathic effects of Engelmann spruce bark stilbenes and tannin-stilbene combinations on seed germination and seedling growth of selected conifers. *Canadian Journal of Botany*, 61(1), 279-289.
- Thomas, R. Q., Canham, C. D., Weathers, K. C., & Goodale, C. L. (2010). Increased tree carbon storage in response to nitrogen deposition in the US. *Nature Geoscience*, 3, 13-17.
- Throop H. L., & Lerdau M. T. (2004). Effects of nitrogen deposition on insect herbivory: implications for community and ecosystem processes. *Ecosystems*, 7, 1009-133.
- Turunen, M., Heller, W., Stich, S., Sandermann, H., Sutinen, M. L., & Norokorpi, Y. (1999). The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environ. Poll.* 106, 219-228.
- Virjamo, V., Sutinen, S., & Julkunen-Titto, R. (2014). Combined effect of elevated temperature and fertilization on growth, needle structure and phytochemistry of young Norway spruce (*Picea abies*) seedlings. *Global Change Biol.* 20, 2252-2260.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway