



Inokulering med två hjorttryfflar på arginingödslade täckrotsplantor i Gideå plantskola



Foto: Lisa Edvardsson

Lisa Edvardsson

Sveriges Lantbruksuniversitet
Institutionen för skoglig mykologi och patologi

2009

Handledare: Elna Stenström

Bitr.handledare: Torgny Näsholm

Innehållsförteckning

SAMMANFATTNING	3
ABSTRACT	3
INLEDNING.....	4
MATERIAL OCH METOD	7
ODLINGSFÖRHÅLLANDEN	7
SVAMPATERIAL OCH INOKULERING AV PLANTORNA.....	9
URVAL AV PROVPLANTOR	10
MYKORRHIZA AVLÄSNING.....	10
MÄTNING AV STAMBASDIAMETER OCH SKOTTLÄNGD	11
SCANNING AV PLANTORNAS ROTSYSYSTEM	11
ROT/SKOTT KVOT BESTÄMNING.....	12
KVÄVEANALYS	12
DNA ANALYS	12
STATISTISK ANALYS	13
RESULTAT	14
MYKORRHIZA	14
DNA ANALYS	17
SKOTTILLVÄXT OCH STAMDIAMETER	18
ROT/SKOTTKVOT	19
SCANNING AV PLANTORNAS ROTSYSYSTEM	20
KVÄVEANALYS	21
MYKORRHIZAFÖREKOMST EFTER INOKULERING MED OLIKA KONCENTRATIONER AV SPORER.....	22
DISKUSSION	24
REFERENSER	26
TILLKÄNNAGIVANDEN	29

Sammanfattning

Mykorrhizaförekomst och tillväxt hos täckrotsplantor av tall och gran undersöktes efter inokulering med sporer från två mykorrhizabildande tryffel arter: Grynig hjorttryffel, (*Elaphomyces granulatus*) och marmorerad hjorttryffel, (*Elaphomyces muricatus*) samt jämfördes med en oinokulerad kontroll.

Vid DNA sekvenseringen av mykorrhizainfekterade rotspetsar från samtliga behandlingar hittades totalt 5 olika mykorrhizaarter. *Thelephora terrestris* var den mest frekvent förekommande arten på tall och *Tylospora asterophora* fanns i stor omfattning på gran. Dock hittades inte de inokulerade arterna. Om det beror på att de inte fanns där eller att sekvenseringen misslyckades gick inte att fastställa. Dock så hittades 2 morfotyper på de inokulerade plantorna som inte fanns på de övriga plantorna.

De inokulerade tallplantorna hade mindre antal mykorrhizainfekterade rotspetsar än kontrollen och plantorna inokulerade med marmorerad hjorttryffel hade både kortare skottlängd samt klenare stambasdiameter än kontrollen.

En jämförelse gjordes även mellan plantor som gödslats med två olika gödselmedel, ett innehållande aminosyran arginin – arGrow®complete och ett annat kommersiellt gödselmedel innehållande ammonium och nitrat -Wallco®.

De ammonium och nitrat gödslade tallplantorna hade både mindre antal rotspetsar och mindre andel mykorrhiza men längre skottlängd än argininplantorna.

Granplantorna visade inga skillnader mellan behandlingarna.

Abstract

The effect of inoculation on containerized pine and spruce seedlings in a nursery with two ectomycorrhizal fungi was investigated in regard to the development of mycorrhiza and plant growth. The fungi were *Elaphomyces muricatus* and *Elaphomyces granulatus* and the inoculated seedlings were compared to an uninoculated control. These seedlings were all fertilized with arginine.

Five mycorrhiza species were found after DNA sequencing of the mycorrhizal root tips with different found morphotypes on seedlings from all treatments. *Thelephora terrestris* was the type which had the greatest distribution on pine seedlings and *Tylospora asterophora* was found at big extent on spruce seedlings. The inoculated species was not found, if it was due to the species hadn't colonized the roots or if the DNA sequencing failed we can only speculate about. Two morphotypes were found on inoculated seedlings that were not found on the other seedlings.

Besides the inoculations, another study was done to compare two fertilizers which contained different nitrogen sources: ArGrow®complete with the aminoacid arginine and Wallco® with ammonium and nitrate.

The inoculated pine seedlings had lower number of mycorrhizal infected short roots than the control and the *E. muricatus* seedlings had both less shoot length and less stembase diameter than the control.

The pine seedlings fertilized with Wallco both had a lower number of tips and a lower share of mycorrhiza than the plants fertilized with arginine.

The spruce plants didn't show any differences between treatments.

Inledning

Mykorrhiza är betäckningen på en symbios mellan en svamp och en växtrot vilket ökar näringsupptagningsförmågan (Smith och Read 1997). Mykorrhiza betyder "svamprot" (Grekiska: mycos=svamp och rhiza=rot) och upptäcktes första gången 1885 av den tyska patologen A. B. Frank. Frank var den första som beskrev den nära symbiontiska relationen mellan svamp och träd och lade grunderna till den fortsatta forskningen om mykorrhiza (Frank 1885).

Nästan alla växter på jorden har mykorrhiza med några få undantag för vattenväxter och ruderalväxter (Castellano och Molina 1989) och i nordiska barrskogar finns runt 700 ektomykorrhiza svampar varav minst 220 stycken bildar symbios med tall (Dahlberg 2002). Samevolutionen mellan svamp och växt etablerade sig så tidigt som när de första växterna började växa på land, ungefär 300 miljoner år sedan (Pirozynski och Malloch 1975). De första landlevande växterna mötte ett hårt klimat, jorden innehöll inget organiskt material som kunde innehålla näring och hålla vatten. De första plantorna hade inte hunnit utveckla funktionella rötter och rothår ännu. Positivt var däremot att luften innehöll en stor mängd CO₂ och ljuset var ej begränsande för produktionen. Därför kom det sig att svampen och växten började samarbeta för att båda få ut en fördel av den andra parten. Växten delade med sig av fotosyntesprodukterna och svampen drog upp vatten och näringsämnen åt växten.

Flera miljoner år senare fungerar symbiosen likadant. Svampen och trädet idkar byteshandel. Svampen tar upp vatten och näringsämnen åt trädet medan trädet betalar med sockerarter och andra produkter som tillverkas vid fotosyntesen. I Skandinavien har det uppskattats att 10 -15% av trädets totala kolhydratproduktion åtgår till mykorrhizasymbiosen (Finlay och Söderström 1992).

Mykorrhizan ger en hel del fördelar både till den lilla plantan och sedan det stora trädet. En av de viktigaste funktionerna hos mykorrhiza är att det ökar näringsupptaget (Bowen 1973). Mycelet ökar den totala upptagningsytan 1000-100 000 gånger mer än vad trädet skulle kunna täcka in samma yta med att bygga ut egna rötter för samma energikostnad (Nylund och Kårén 1994). Tillväxten i boreala skogar är nämligen främst begränsad utav näring. Man har funnit att kväve är det ämne som till största del begränsar tillväxten i skogsmark (Tamm 1991). Allt levande på jorden innehåller kväve, både människor, djur och växter. Kväve är det grundämne som ingår i byggstenarna som bygger upp DNA och proteiner i alla organismer. Därför är det ett absolut krav för tillväxt och uppbyggnad (Lambert et al 1998).

Men kväve verkar finnas i nästan obegränsade mängder eftersom luften som vi andas innehåller ca 78 % N₂ och marken i en normal svensk barrskog är en stor pool av organiskt material som innehåller en stor mängd kväve. Det som gör det begränsade är därför inte mängden kväve som finns i skogsekosystemet utan beror istället på hur pass tillgängligt det är för växten att ta upp det. Det mesta av kvävet är hårt bundet i marken, främst i form av komplexa organiska föreningar t.ex. humusämnen och är därför otillgängligt för växten att tillgodogöra sig (Öhlund 2004).

Mycelet ökar rötternas totala absorptionsyta i marken och gör att trädet får tillgång till näringsämnen som rotsystemet inte kan ta upp själv. Vissa typer av mykorrhiza (ekto och erikoid) har visats utsöndra enzymer som kan bryta ned organiska föreningar (Chalot och Brun 1988). Mykorrhiza kan även vittra mineraler genom en kombination av fysisk kraft och kemisk aktivitet (Rosling och Finlay 2004). Svampen har en förmåga att utsöndra små organiska syror, t.ex. oxalsyra som försurar markmiljön runt hyferna och även bildar komplex med joner och som påskyndar vittringen av mineralet.

En annan viktig funktion som mykorrhiza har är att det skyddar trädet mot uttorkning. I ett torkexperiment jämfördes tallplantor med och utan mykorrhiza (Deacon 1997). Plantorna utsattes för torkstress som innebar att man slutade tillföra vatten till plantorna. När plantorna utan mykorrhiza

vissnade så fortsatte de mykorrhizainfektade plantorna att vara vitala. Detta berodde på att mycelsträngarna kunde tränga längre ner i torven och tillgodose plantan med vatten.

Vissa mykorrhiza arter har även visats vara effektiva att skydda plantor mot patogener (Marx 1969). I ett försök inokulerades tallplantor med några olika patogener och mykorrhizabildande svamp (Chakravarty och Unestam 1987). En av svamparna som användes var Laxskivling (*Laccaria laccata*) vilken visade sig skydda mycket bra mot patogenangrepp. Även andra svampar har bevisats ha effekt mot patogener på barrplantor såsom Ärttryffel, *Pisolithus tinctorius* (Marx 1972) och Tårfränsskivling, *Hebeloma crustuliniforme* (Perrin och Garbay 1983). Att mykorrhizainteraktionen kan skydda plantan mot patogener kan fungera på flera olika sätt genom att: a) utgöra en fysisk barriär mot infektioner b) använda kolhydratöverskottet och på så vis minska näringen som stimulerar patogenen c) bilda antibiotiska substanser som hämmar patogenen och d) tillsammans med roten upprätthålla en skyddande rhizosfärflora (Zak 1964).

Det finns sju olika typer av mykorrhiza som man hittills funnit, baserat på morfologiska karaktärer och med vilka värdväxter de bildar symbios med: Arbuskulär, erikoid, ekto, orchid, monotropoid, arbutoid och ektomykorrhiza (Finlay 2008). Gemensamt för alla typer är att de är beroende av kol som energikälla från värdväxten de lever med samt att växten är beroende av att få vatten och näringsämnen från svampen (Harley och Smith 1983). I boreala skogar bildar ektomykorrhizasvampar symbios med träd och vissa andra fleråriga vedartade växter. Bland gymnospermerna är alla arter inom familjen *Pinaceae* ektomykorrhizabildande. Även vissa lövträd bildar denna typ av mykorrhiza, ex björk, asp, bok och ek (Nylund 1980).

Ektomykorrhizan karakteriseras av att den inte penetrerar cellerna i rotspetsarna utan bildar ett nätverk runt dem istället. Detta nätverk kallas Hartigs nätverk efter dess upptäckare, Hartig. Det är via detta nätverk som utbytet av vatten, näringsämnen och energi sker mellan svamp och rot. En rotspets som är koloniserad av ektomykorrhiza är täckt av ett svamphölje som kallas mantel. Denna mantel, tillsammans med Hartigs nätverk, gör att roten blir förtjockad jämfört med oinfektade rötter. Från manteln växer svamptrådar (hyfer) ut i den omgivande marken och bildar ett stort nätverk av svampmycel i marken. Detta gör att trädet får en ökad upptagningsförmåga till lägre energikostnad än vad det skulle kosta att bygga ut ett större nätverk med rötter för att nå samma mängd näring. Den största fördelen med mykorrhiza är att den förbättrar växtens upptag av kväve och fosfor.

Man har länge trott att växter enbart kan tillgodogöra sig oorganiskt kväve: ammonium (NH_4^+) och nitrat (NO_3^-) och i vissa fall N_2 med hjälp av kvävefixerare (Tamm 1991). Ammonium och nitrat används som kvävekälla i de flesta av de gödslingsmedel som används idag. Senare tids forskning har dock visat på att växter även kan ta upp organisk kväve, såsom proteiner och aminosyror (Näsholm et al 1998, Persson et al 2006).

Ett projekt initierat av Torgny Näsholm ledde till framtagandet av ett nytt gödselmedel med aminosyran arginin som kvävekälla. Detta gödselmedel kom att kallas arGrow® complete. Produkten innehåller även alla andra mikro och makronäringsämnen som plantan behöver under tillväxtfasen (Öhlund och Näsholm 2001).

Vid gödning av aminosyran arginin har det observerats ett minskat kväveläckage samt att plantorna kan tillgodogöra sig kvävekällan bättre än vid gödning med konventionella gödselmedel som är baserade på ammonium och nitrat (Öhlund och Näsholm 2002). Därför har ett gödslingsförsök pågått på Holmens plantskola i Gideå där säsongen -08 är den sjunde där arGrow® complete har använts som gödselmedel i en del av produktionen. Vad som händer med mykorrhizan vid arginingsgödning är dock inte undersökt fullt ut och är därför intressant att studera närmare.

Det är av stor betydelse att plantor redan i plantskolan har tillfredsställande mängd mykorrhiza eftersom det kan öka plantöverlevnaden och tillväxten efter utplantering (Rudawska et al 2001). Vid utplantering av plantorna kommer de yttre faktorerna drastiskt att förändras, från en miljö där vattning och gödsling är optimal till den naturliga miljön där de abiotiska och biotiska faktorerna kontrollerar tillväxt och överlevnad. Plantor som inte har mykorrhiza kan växa mycket väl under plantskoletiden men klarar sig dåligt vid utplantering om de inte snabbt bildar mykorrhiza. Olika arter av mykorrhiza är bättre än andra på olika områden och den typiska ”plantskolemykorrhizan” skiljer sig från den i naturen. Vid tidigare studier har mykorrhiza som är etablerad på plantorna i plantskolan, gradvis bytts ut mot andra typer som är vanligare ute i fält vid utplantering. Dock har den ursprungliga mykorrhizan fortfarande funnits kvar på rötterna i uppemot 1,5 års tid efter utplantering (Stenström och Ek 1990).

Olika typer av mykorrhiza trivs i olika typer av miljöer och vissa klarar sig bättre än andra under vissa förhållanden. Det kan vara förhållanden som pH, fukt och näringstillgång (Molina et al 1992).

Tidigare undersökningar av mykorrhiza på plantskolor har visat att mykorrhiza uppkommer spontant utan att åtgärder måste utföras för att få dit dem (Castellano och Molina 1989). Detta beror på att svampsporer är mycket lättspredda och långtflygande sporer kommer in från omgivningen runt plantskolan. Plantskolan är ej steril och sporer kan finnas kvar från föregående år. Kassetter återanvänds och även efter rengöring kan sporer sitta kvar. Torven som används kan innehålla sporer. De arter man observerat förekomma spontant är framförallt vårtöra, *Thelephora terrestris* och laxskivling, *Laccaria laccata*.

I en tidigare studie av plantor från 28 plantskolor spridda över hela Sverige upptäcktes det att dessa arter dominerade eftersom den påträffades i 24 av 28 plantskolor som ingick i studien samt att drygt 70 % av totala andelen mykorrhizainfektade kortrötter var *Thelephora terrestris* och *Laccaria laccata* (Ackerholm 1992).

Intressant är att undersöka om plantan utvecklar bättre och effektivare mykorrhiza om man tillsätter sporer från kända mykorrhizabildande svampar i början av tillväxtperioden i plantskolan. Inokulering med mykorrhizasvampar i plantskolan kan möjligen öka plantöverlevnad och tillväxt efter utplantering enligt tidigare försök (Marx et al 1977).

Vi har i detta försök valt att inokulera tall (*Pinus sylvestris* L.) och granplantor (*Picea abies* (L.) Karst) med två tryffelsvampar: Grynig hjorttryffel (*Elaphomyces granulatus*) samt marmorerad hjorttryffel (*Elaphomyces muricatus*). Det är två tryffelsvampar som tillhör släktet hjorttryfflar. *Elaphomyces* är en grupp sporsäckssvampar som kallas för ”falska tryfflar” och som bildar mykorrhiza med olika träarter (Laing 1933). *Elaphomyces muricatus* är dokumenterad att den bildar symbios med tall (Miller, S och Miller, O 1984) Fruktkropparna växer under jord och brukar vara ca 2 cm i diameter. Sporer produceras i mitten av tryffeln. När de mognar formar de en svart pulvermassa som kan ha ett vätskefyllt hålrum. Vi valde dessa svampar med tanke på att de växer i barrskog, att de är relativt vanliga i Sverige, samt att det är lätt att använda dess sporer för storskalig inokulering i plantskolor.

Man kan tänka sig att den inokulerade svamparten har tre scenarier att möta: (I)=Att ensam komma att kolonisera rötterna, (II)= samexistera med andra arter, eller (III)= bli utkonkurrerad av den befintliga plantskolemykorrhizan (Dahlberg och Stenström 1991).

I tidigare försök med inokulering av skogsmykorrhiza på tallplantor så stimulerades tillväxten i fält även om bara en liten del av rotsystemet var koloniserat av den inokulerade svamparten. Effekten varade upp till några år efter utplanteringen (Stenström och Ek 1990).

Syftet med denna studie är att undersöka om inokulering med mykorrhizasvampar i plantskolan kan öka plantans vitalitet och tillväxt samt att undersöka vilken effekt olika gödselmedel har med avseende på mykorrhizabildning och plantans morfologi.

Material och metod

Odlingsförhållanden

Försöket utfördes på Gideå plantskola som ägs av Holmen Skog AB, Sverige. Plantorna som användes är tall från plantaget Slåttholmen T7 65'7 och gran 62'12 300 meter från beståndsfrö (*tabell 1*). Dessa plantor har gödslats med arGrow® complete vilket har aminosyran arginin som kvävekälla istället för konventionellt gödselmedel som har ammonium och nitrat. Som referenser användes tall och granplantor som gödslats med ett traditionellt gödselmedel med en oorganisk kvävekälla -Wallco®. Tallen är från plantaget Våge 125 och granen från plantaget Domsjöänget 130. Samtliga försöksplantor och deras referenser valdes med tanke på att de skulle vara så lika som möjligt. Både att de skulle härstamma från ungefär samma latitud och höjd men även att de skulle ha vattnats upp ungefär samtidigt och inte skilja i ålder.

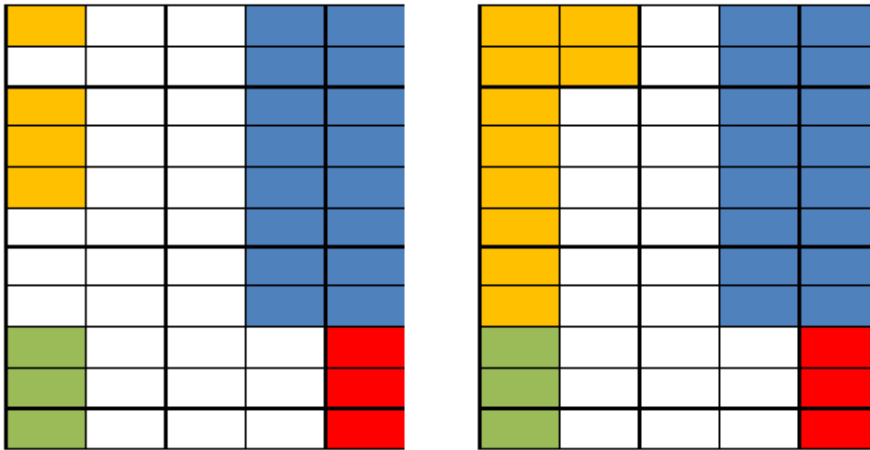
Plantorna för försöket har odlats upp och skötts i enlighet med plantskolans rutiner och här ges en översikt över rutinerna för den första av tre odlingsomgångar vid Gideå plantskola (Pers ref Hedman).

Först sås alla gran- och tallfrön i kassetter (Starpot 50 cm³ torrvolymer per planta, 60 pottor/plantor per kasset) med ogödslad, dolomitkalkad blocktorv. Färdigsådda kassetter förvaras i kylrum som längst 2 månader i +4° eller så ställs de nysådda kassetterna ut i växthus direkt. Efter kassetterna flyttats till växthus vattnas de upp. Uppvattning av den första odlingsomgången sker i april/maj månad. Där får tallen växa i ca 5 veckor fram till "långnattbehandlingen" som varar ca 4 veckor. Granen växer i växthus ca 7 veckor innan den ställs ut på frilandsbäddar. Gran långnattsbehandlas först till hösten. Vid långnattbehandlingen mörkläggs växthuset så att plantorna upplever en konstgjord höst, dvs. nätterna blir längre och skottet går in i vila. Tallen mörklägger man 16 timmar per natt och granen 12 timmar. Fördelen med långnattsbehandlingen är att plantan får en tjockare stambasdiameter, dubbelbarr bildas och den ettåriga plantan får ett hårdigare skott med samma utseende som en tvåårig. Direkt efter långnattsbehandlingen ställs plantorna ut på friland. I augusti/september långnattbehandlas granarna från första odlingsomgången i ungefär 4 veckors tid. Detta görs för att granarna ska bli jämnare och samtidigt stanna i tillväxten, bilda stora fina knoppar samt bli frosthärdade mot höstfrost och kyllagring. Beroende på efterfrågan säljs plantorna för plantering eller förvaras i kyllager till nästa år.

Alla behandlingar sker inte exakt vid samma tidpunkt varje år utan beror på väderleken, t.ex. temperatur, antal soltimmar, nederbörd mm samt plantornas proveniens.

Detaljer om bevattning, gödsling och ljusförhållanden tas inte med i denna rapport men allt har skötts enhetligt. Gödslingen sker i strävan mot att plantorna ska ha en kvävehalt i barren som är ca 2 % oavsett vilket gödslingsmedel som används. Detta uppnås genom kontinuerliga mätningar.

Plantorna odlades i kassetter som har plats för 9x7=63 plantor per kasset. Kassetterna placerades i ramar om 11x5 stycken. För försöket användes en ram tall och en ram gran. Totalt 3465 plantor per trädslag (*figur 1*). Försöksramarna stod tillsammans med de övriga arginingödslade plantorna med samma uppvattningsdatum som i det ordinarie sortimentet.



Figur 1. Schematisk bild över hur kassetterna var fördelade i ramarna. Den vänstra ramen är tall och den högra ramen är gran. Gul färg =Inokulerad med MHT (marmorerad hjorttryffel), Blå färg =inokulerad med GHT(grynig hjorttryffel), Vit =oinokulerad kontroll, Grön =Spädningsförsök MHT, Röd =Spädningsförsök GHT.

Tallkassetterna som skulle gödslas med arGrow ®complete vattnades upp 23/4 och tallkassetterna som skulle gödslas med Wallco® vattnades upp 14/5 ca 3 veckor senare (tabell 1).

Grankassetterna som skulle gödslas med arGrow ®complete vattnades upp 18/4 och grankassetterna som skulle gödslas med Wallco® vattnades upp 16/4 (tabell 1) så mellan dessa skiljde det endast 2 dagar. Normalt får granarna tillskottsljus under första månaden i växthuset vilket de arginingödslade granarna i detta försök inte fick eftersom de fick växa tillsammans med tallarna.

Tabell 1. Tall och granplantor och respektive härkomst och gödselmedel samt tidpunkter för uppvattning, lågnattsbehandling och utsättning på friland. Inokulering av plantorna och förkortningar av de olika behandlingarna.

Tall						
Gödsling	Härkomst	Uppvattning	Lågnattsbehandling	Friland	Inokulering	Förkortning
arGrow@complete (arginin)	Plantaget Slåttholmen T7	23/4	4/6-7/7	11/7	Marmorerad hjorttryffel	MHT
arGrow@complete (arginin)	”	”	”	”	Grynig hjorttryffel	GHT
arGrow@complete (arginin)	”	”	”	”	-	Kontroll
Wallco@ (ammonium, nitrat)	Plantaget Våge 125	14/5	-	13/6	-	Wallco
Gran						
arGrow@complete (arginin)	Beståndsfrö: 62'12 300	18/4	3/9-30/9	9/6	Marmorerad hjorttryffel	MHT
arGrow@complete (arginin)	”	”	”	”	Grynig hjorttryffel	GHT
arGrow@complete (arginin)	”	”	”	”	-	Kontroll
Wallco@ (ammonium, nitrat)	Plantaget Domsjöänget 130	16/4	3/6-3/7	10/6	-	Wallco

Svampmaterial och inokulering av plantorna

Vid försöket användes två tryffelarter från släktet *Elaphomyces*: marmorerad hjorttryffel, *Elaphomyces muricatus* (MHT) samt en annan *Elaphomyces*art som antogs vara grynig hjorttryffel, *Elaphomyces granulatus* (GHT)(figur 2). Fruktkroppar av grynig hjorttryffel hade insamlats från Stadsskogen i Uppsala i en barrblandskog dominerad av tall. Två fruktkroppar av marmorerad hjorttryffel hittades under tall och hasselbuskage vid fornborgen Broberg, Husby Långhundra i Uppsala län. Båda svamparna lokaliserades med hjälp av hundar under våren -08 och förvarats i frys fram till de skulle användas. Fruktkropparna artbestämdes genom sekvensering av den ribosomala ITS (internal transcribed spacer) regionen varefter en jämförelse gjordes i Unite (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm>) och i GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) enligt samma system som användes för mykorrhizorotbestämningen (se DNA analys nedan). *Elaphomyces muricatus* matchades till samma art men ingen har tidigare sekvenserat *Elaphomyces granulatus* och den kunde endast härledas till samma släkte. Den antogs då vara grynig hjorttryffel baserat på de morfologiska egenskaperna.

Vid två tillfällen inokulerades plantorna med spörlösningar från GHT och MHT. Detta skedde 8/5 och 28/5. Tallarna var två veckor gamla vid första inokuleringen och 6 veckor vid andra tillfället. Granarna var 3 respektive 7 veckor gamla vid inokuleringstillfällena eftersom de var en vecka äldre än tallarna vid start och alla behandlingar genomfördes samtidigt på plantskolan.

Spörlösningen tillreddes genom att spörmassan från respektive svampart vägdes upp och blandades i en bägare med vatten samt några droppar Tween 20 (Sigma). En ursprungslösning blandades och

sporkoncentrationen kontrollerades i efterskott genom att sporer räknades i en hemacytometer. I GHT ursprungslösningen var sporkoncentrationen 3×10^7 sporer/ml. I MHT ursprungslösningen var sporkoncentrationen $3,7 \times 10^7$ sporer/ml. Denna ursprungslösning späddes sedan ut tills lösningen innehöll 10^6 sporer/ml. Två ml spörlösning injicerades strax under torvytan vid varje planta med en dispenser (Nichiryo Model 2100DG). Under tiden stod lösningen på konstant omrörning av en magnetorrörare. Bland tallplantorna inokulerades 4 kassetter med MHT lösningen ($4 \times 63 = 252$ plantor), 8 kassetter med GHT lösningen ($8 \times 63 = 504$ plantor) medan 29 kassetter inte inokulerades utan blev kontroll ($29 \times 63 = 1827$ plantor). Bland granplantorna inokulerades 10 kassetter med MHT lösningen ($10 \times 63 = 630$ plantor), 16 kassetter med GHT lösningen ($16 \times 63 = 1008$ plantor) och 23 kassetter blev kontroll ($23 \times 63 = 1449$ plantor).

Vid sidan av det ordinarie försöket utfördes ett ”spädningsförsök” på ett mindre antal plantor för att se vilken koncentration av sporer som skulle tänkas ge en tillfredsställande mykorrhizainfektion av plantorna. Ursprungslösningen späddes ut till 5 olika koncentrationer (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 sporer/ml) samt en kontroll som lämnades oinokulerad. Totalt användes 6 kassetter per träslag, där 3 kassetter inokulerades med MHT och 3 kassetter inokulerades med GHT. Två plantrader i varje kassett ($2 \times 9 = 18$ plantor) inokulerades med varje koncentration där varannan rad lämnades oinokulerad.



Foto: Ola Kårén

Figur 2. Bild på hjorttryfflarna som användes i inokuleringsförsöket. Bilden t.v. är marmorerad hjorttryffel (*Elaphomyces muricatus*) och bilden t.h. är grymig hjorttryffel (*Elaphomyces granulatus*).

Urval av provplantor

Vid sex tillfällen från maj till och med oktober 2008 insamlades provplantor från plantskolan med ungefär en månads mellanrum: 28/5, 27/6, 24/7, 27/8, 23/9, och 20/10. Tjugo stycken plantor från respektive behandling togs vid de fyra första skördetillfällena och 40 plantor togs vid det femte tillfället. Vid sjätte skördetillfället insamlades 5 plantor. Provplantorna slumpades ut jämt över det antal kassetter som fanns och sedan plockades hela plantan inklusive rotsystem och torvklump och samlades i plastpåsar. Torven sköljdes sedan bort direkt på plantskolan och plantorna förvarades i fryskyl och/eller kyl fram till avläsningstillfällena. För spädningsförsöket insamlades 5 stycken provplantor slumpvis utvalda från respektive spädning den 20/10.

Mykorrhiza avläsning

I de fyra första provtillfällena slumpades 10 stycken plantor ut av totalt 20 stycken insamlade plantor från respektive behandling och blev numrerade 1-10. De övriga plantorna sparades i fryskyl. I femte provtagningssamlingen slumpades 20 plantor ut av totalt 40 stycken insamlade plantor och dessa blev numrerade 1-20. På var och en av dessa plantor undersöktes rötterna under stereolupp och mikroskop. En rot som har mykorrhiza är uppsvullen, saknar rothår och hos tall är rötterna ofta gaffelgrenade. En rot utan mykorrhiza är tunn, har rothår och saknar gaffelgreningar. I mikroskop kan man även se om

roten har en mantel, det ses genom att hyferna bildar ett mönster i provet som ligger ovanpå rotcellerna.

En bedömning gjordes av procentandelen kortrötter som var infekterade med olika typer av mykorrhiza. Klassningen av andelen mykorrhiza gjordes i 10 procent klasser. Om en planta hade mellan 1-10 % mykorrhiza hamnade den i klass 1, 11-20 % mykorrhiza klass 2 osv. (tabell 2). Mykorrhizatypen identifierades med hjälp av rotspetsarnas morfologiska utseende dvs. färg och form. Ett antal rotspetsar från varje typ togs ut och frystorkades för senare artbestämning med PCR (polymeras chain reaction).

Plantornas mykorrhizaförekomst lästes av från alla provtagningsomgångarna medan plantorna från femte provtagningen även användes för övriga avläsningar.

Spädningsförsöket användes endast till mykorrhiza avläsning. I spädningsförsöket slumpades 5 plantor ut för respektive inokulering (0, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 sporer/ml) Mykorrhizaförekomsten lästes av med samma metod som de övriga plantorna (se ovan).

Tabell 2. Klassning av mykorrhiza i olika klasser efter procentandelen täckningsgrad av den totala andelen kortrötter.

Procentandel	Klass
0 %	0
1-10%	1
11-20%	2
21-30%	3
31-40%	4
41-50%	5
51-60%	6
61-70%	7
71-80%	8
81-90%	9
91-100%	10

Mätning av stambasdiameter och skottlängd

Från femte provtagningen mättes stambasdiameter samt skottlängd för de 20 numrerade plantorna. Skottlängden mättes med linjal med 5 mm intervall från den översta sidoroten till toppen av skottet. Stambasdiametern mättes med ett digitalt skjutmått i mm med två decimalers noggrannhet.

Scanning av plantornas rotsystem

Från femte provtagningen användes plantnummer 1-10 från respektive behandlingsgrupp och dessa rotsystem scannades av. Rötterna avlägsnades från skottet vid första lateralroten och breddes ut i en vanna med vatten som täckte rötterna vid scanningen.

Scannern som användes var: Epson perfection V700 photo, dual lens system.

Beräkningar gjordes med hjälp av programmet WinRHIZO pro 2007, regent instruments for washed root measurements.

Följande parametrar beräknades:

Len (Length)=Längd (cm), Rötternas längd är den totala längden som alla rötter i rotsystemet utgör tillsammans.

SA (Surface area) = Yt area (cm²) Rötternas yt area är rötternas totala upptagningsyta, beräknas i programmet genom att programmet antar att alla rötter är cylinderformade och sedan beräkna hur stor arean skulle bli om alla rötter trycktes ut till ett cellager.

Vol (Volume) = volym (cm³), Rötternas totala volym

NTips (Number of tips) = totala antalet rotspetsar

Rot/skott kvot bestämning

Från femte provtagningsomgången användes 15 provplantor från respektive behandling (planta nr 1-15) till rot/skott mätning. Plantorna torkades i ugn 42 timmar i 65°C. Plantorna var då helt torra eftersom vikten ej förändrades över tid utan förblev konstant. Skottet och roten vägdes var för sig efter att roten avlägsnats från skottet vid första lateralroten. Vikten uppmättes med tre decimalers noggrannhet. Rot/skottkvoten beräknades genom att dela rotens vikt med skottets vikt.

Kväveanalys

Från femte provtagningsomgången plockades samtliga barr från planta nr 1-10 i varje behandling. Barren maldes ner med kulkvarn och sedan vägdes 3-4 mg av pulvret upp, placerades i små aluminiumtråg som sedan veks ihop. Proverna analyserades av Ann Selstedth, Umeå Plant Science Centre med Flash EA 1112 NC soil analyzer.

DNA analys

DNA extraktion

DNA extraherades från kortrötter som tidigare tagits ut vid mykorrhiza avläsningen (Henrion et al 1994). Totalt analyserades 48 stycken prover med mykorrhizainfektade rotspetsar från olika morfotyper och behandlingar. Proverna frystorkades samt maldes med mikropistill. Sedan tillsattes 500 µL CTAB extraktionsbuffert (2 % cetyltrimetylammoniumbromid (CTAB), 20mM EDTA (pH8), 100mM Tris-HCL (pH8), 1,4M NaCl) i rören. Proverna inkuberades 1 timme i vattenbad i +65°C och centrifugerades därefter vid 10 000 rpm för att partiklarna från rötterna skulle centrifugeras bort. Det övre skiktet i rören flyttades sedan över till nya rör. Därefter följde tvättning av provet där proteiner skulle renas bort med kloroform och isopropanol. 500 µL kloroform tillsattes och centrifugerades i 10 000 rpm. Det övre skiktet flyttades till ett nytt provrör och 600 µL isopropanol tillsattes. Proven lades i frys 60 minuter för att DNA skulle fälla ut och pelletades sedan med 20 minuters centrifugering i 13 000 rpm. Vätskan hölls därefter försiktigt ut så att pelleten stannade kvar i provröret. Pelleten tvättades därefter i 500 µL etanol (70 %). Provrören centrifugerades sedan i 13 000 rpm och därefter hölls etanolen bort. Pelleten lufttorkades och blandades med joniserat vatten tills den löstes upp.

PCR

PCR-*polymerase chain reaction* är en genetisk metod som används inom molekylärbiologin där det blir möjligt att inom några timmar göra ett stort antal kopior av ett önskat DNA segment. Detta vill man utnyttja för att kunna få tillräcklig mängd DNA för att vidare kunna sekvensera materialet. Det är naturligtvis till stor hjälp när man har så pass lite material som en mykorrhizarotspets.

Ett värmetåligt polymeras behövs eftersom DNA ska upphettas och kylas ner flera gånger för att DNA stängarna skal kunna klippas och bindas ihop igen. Det är i huvudsak tre steg i PCR som repeteras 20-40 gånger beroende på hur mycket material man vill få fram. Dessa steg utförs automatiskt i en PCR maskin. Först sker denaturering vid 95°C, när dubbelkedjorna delas till enkla kedjor. Sedan sker nedkylning till 55-60°C då de tillsatta primrarna fäster vid DNA kedjorna. Sist värms lösningen till

72°C då polymerast kan aktiveras och det bildas då två nya exakt likadana DNA kedjor som kan delas igen. Dessa steg upprepas 20-40 gånger och varje cykel sker en fördubbling av mängden DNA.

ITS regionen

ITS regionen (Internal Transcribed Spacer) är den region i svampar som är den mest sekvenserade och välkända DNA regionen. De primrar som användes var därför: ITS1F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA) och ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). Reaktionen utfördes i en thermal cyclus 2720 som började med denaturering i 95°C i 3 minuter, följt av 35 cykler med denaturering 94°C i 2 minuter, annealing av primer till DNA i 55°C i 30 sekunder och DNA polymerisering i 72°C i 10 minuter.

Elektrofores

Innan PCR produkten kan användas vidare så måste det kontrolleras att någon produkt har bildats, om produkten är av rätt storlek och om ett eller flera band har bildats. Alla PCR körningar lyckas inte, DNA kvalitén kan vara dålig, primrarna kanske inte passade eftersom de förmodligen passar på en annan del av genomet som inte finns med eller så finns det för mycket eller för lite material att fortsätta jobba med.

Sättet att testa produkten på är att separera och storleksbestämma dem med hjälp av elektrofores. I detta försök tillreddes 1 % agarose gel genom att blanda 1,5 g agarose och 150 ml 1X SB buffer (Sodium boric acid, Brody och Kern 2004) och smälta blandningen i mikrovågsugn. Därefter fick lösningen svalna till 60°C. Efter det hälldes lösningen upp i ett geltråg som fick stelna. 5 µl av varje produkt tillsattes i brunnar i gelen som sedan utsattes för en spänning på 250V, 400mA, 1 timme. Eftersom DNA kedjorna är olika långa och har olika elektrisk laddning rör de sig olika snabbt. Gelen fick sedan ligga i ett bad med etiumbromid som då binder till DNA-t. När gelen belyses med UV ljus kan man fotografera den och DNA-t blir synligt som små fluorocera band.

Innan DNA-t kan sekvenseras måste det amplifieras ytterligare en gång med en primer från varje håll. Det blir då lättare att finna en matchning mot i GenBank. Produkterna måste dock renas två gånger innan andra PCR körningen. I detta försök användes först PCR-MTMClean Up System med tillhörande guide och sedan med gjordes en rening med sephadex.

Sephadexlösningen tillreddes genom att blanda Sephadex, G50 fine och milliQ som autoklaverades och förvarades i kylskåp tills sephadexen sjönk till botten. Överskottsvätskan hälldes sedan ut, 400 µl av lösningen tillsattes en 96 hålsplatta som centrifugerades i 1500g. PCR produkterna blandades först med 15 µl vatten för att få en större vätskemängd än de 5 µl som sekvensreaktioner oftast är, sedan tillsattes hela produkten mitt på kolonnerna, plattan placerades på en beckman platta och proverna centrifugerades ned genom sephadexgelen i 1500g.

Sekvensering

Proverna kördes i en sekvenseringsmaskin – Beckman coulter ceqTM8000, genetic analysis systems och sekvenserna jämfördes med varandra och bearbetades manuellt i seqMan, DNA star. När sekvenserna var bearbetade så kollades matchningen upp mot GenBank. De sekvenser som matchade en art till minst 95 % dokumenterades.

Statistisk analys

Effekten av de fyra olika behandlingarna; GHT, MHT, kontroll och Wallco testades med en variansanalys: ANOVA – GLM (general linear model) med konfidensintervallet 95 % för att se om de

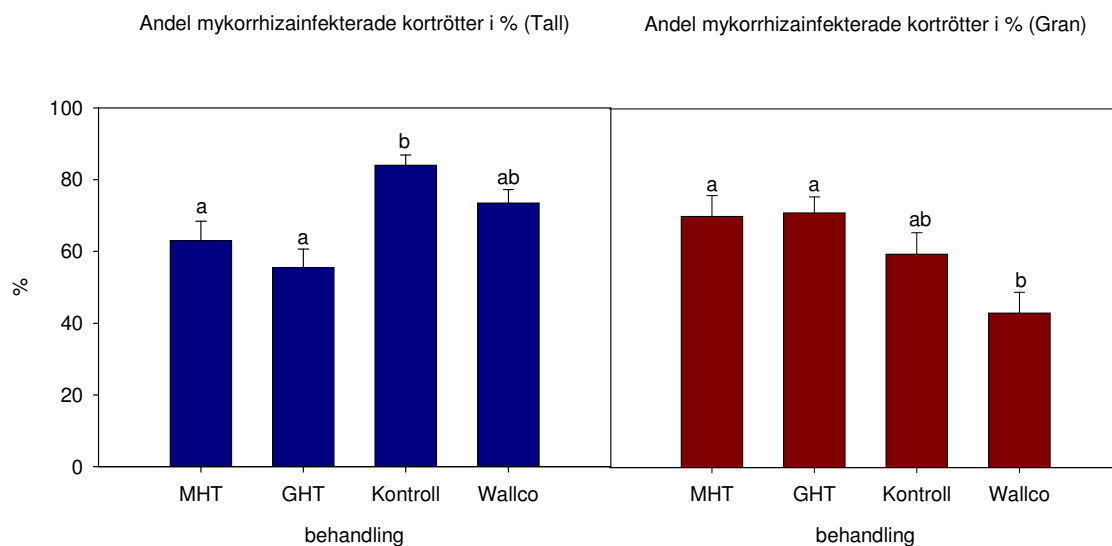
var statistiskt signifikant skilda ($p < 0,05$). Därefter testades behandlingarna med Tukey Simultaneous test för att göra en parvis jämförelse mellan behandlingarna.

Resultat

Mykorrhiza

Andelen mykorrhizainfektade korrötter hos de inokulerade plantorna (MHT och GHT) var signifikant lägre än kontrollen på tall (*figur 3*). Bland tallarna hade kontrollen i medeltal störst andel mykorrhiza (84 %) jämfört med MHT (63 %), GHT (56 %) och Wallco (74 %).

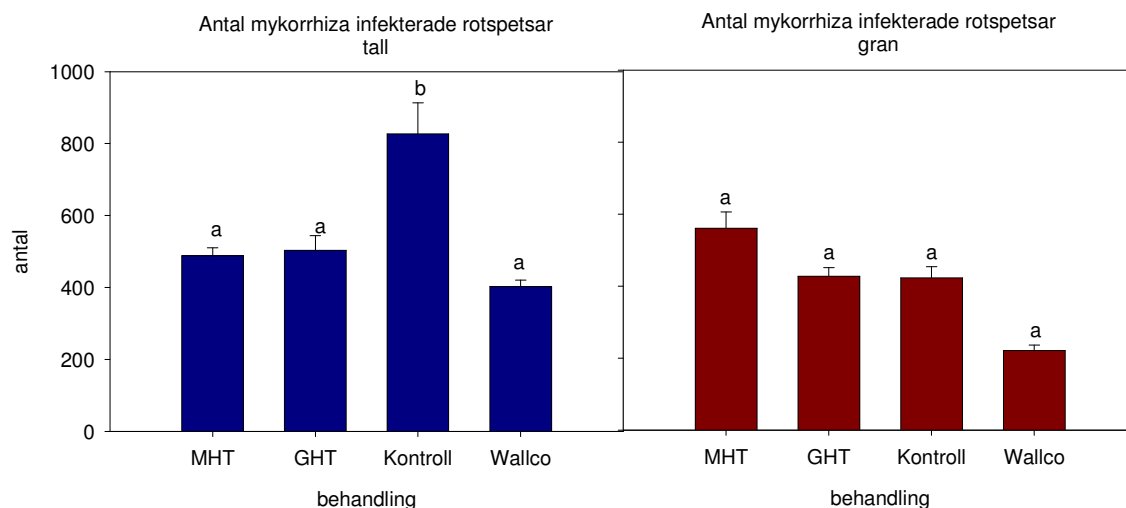
Bland granplantorna hade MHT och GHT högst andel mykorrhiza (70 % respektive 71 %) följt av kontroll (60 %) och Wallco (43 %).



Figur 3. Andel mykorrhizainfektade korrötter på fyra olika behandlingar: MHT, GHT, kontroll och Wallco på tall och granplantor. Värdena är medelvärden, felstaplar visar $\pm SE$, $n=20$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p > 0,05$).

Hos tallplantorna var medeltalet mykorrhizainfektade rotspetsar mycket lägre hos de inokulerade plantorna (MHT 488 st, GHT 503 st) än hos kontrollplantorna som hade 827 stycken (*figur 4*).

Antal mykorrhizainfektade rotspetsar hos tall skilde sig även mellan kontroll (827 st) och Wallco (403 st) (*figur 4*) där Wallcoplantorna hade mindre än hälften så många mykorrhizainfektade rotspetsar (*figur 4*). En liknande men ej signifikant skillnad fanns hos gran där Wallcoplantorna hade minst antal mykorrhizainfektade rotspetsar (*figur 4*).

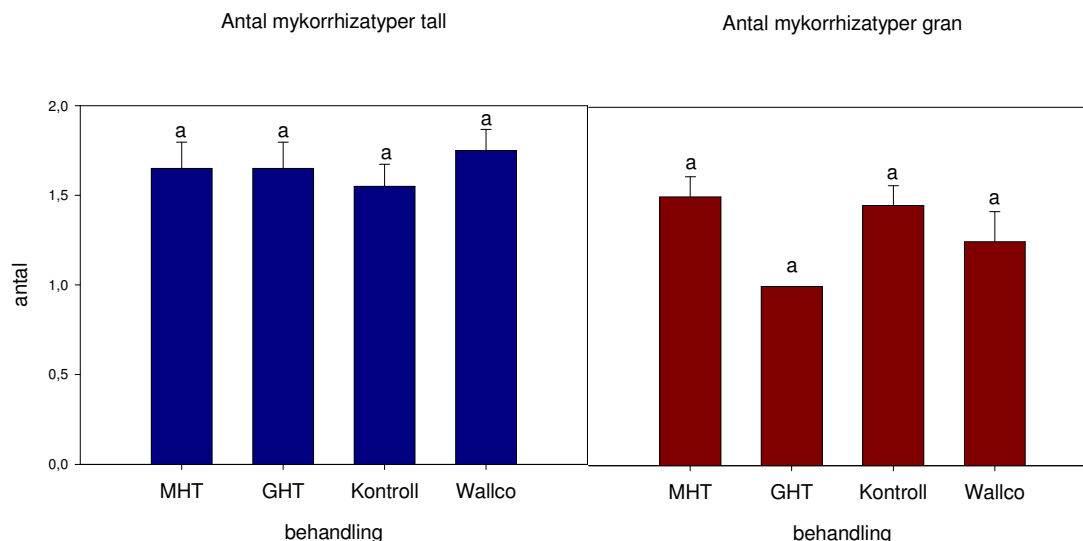


Figur 4. Antal mykorrhizainfekterade rotspetsar på fyra olika behandlingar: MHT, GHT, kontroll och Wallco på tall och granplantor. Värdena är medelvärden, felstaplar visar $\pm SE$, $n=20$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p>0,05$).

Flest antal mykorrhizatyper observerades på tall där 12 olika mykorrhizatyper kunde urskiljas (tabell 3). De funna typerna baserades på olika morfologiska karaktärer såsom färg och form (tabell 4). Några av mykorrhizatyperna återfanns på alla behandlingar och fanns även i stor mängd medan vissa typer endast fanns på någon enstaka planta. Mykorrhizatyp nr 1,3 och 4 återfanns på tallplantor i alla behandlingar och där nr 1 hittades i stor frekvens medan resten av typerna återfanns mera sparsamt. Det var två stycken typer som bara fanns på de inokulerade plantorna, mykorrhizatyp nr 2 och 10. Det var två typer som bara återfanns på Wallcoplantorna, nr 7 och 9.

På gran hittades fyra olika mykorrhizatyper (tabell 3). Nummer 1 återfanns i alla behandlingarna och var även den överlägset mest frekvent förekommande typen bland granplantorna. Nr 2 återfanns bara på de inokulerade plantorna men i låg frekvens.

Det fanns ingen signifikant skillnad mellan antalet funna mykorrhizatyper på vare sig tall eller gran (figur 5). Medeltalet av antal arter var ca 1,5 arter/planta.



Figur 5. Antal funna mykorrhizatyper på tall och granplantor i fyra olika behandlingar: MHT, GHT, kontroll och Wallco. Värdena är medelvärden, felstaplar visar $\pm SE$, $n=20$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p>0,05$).

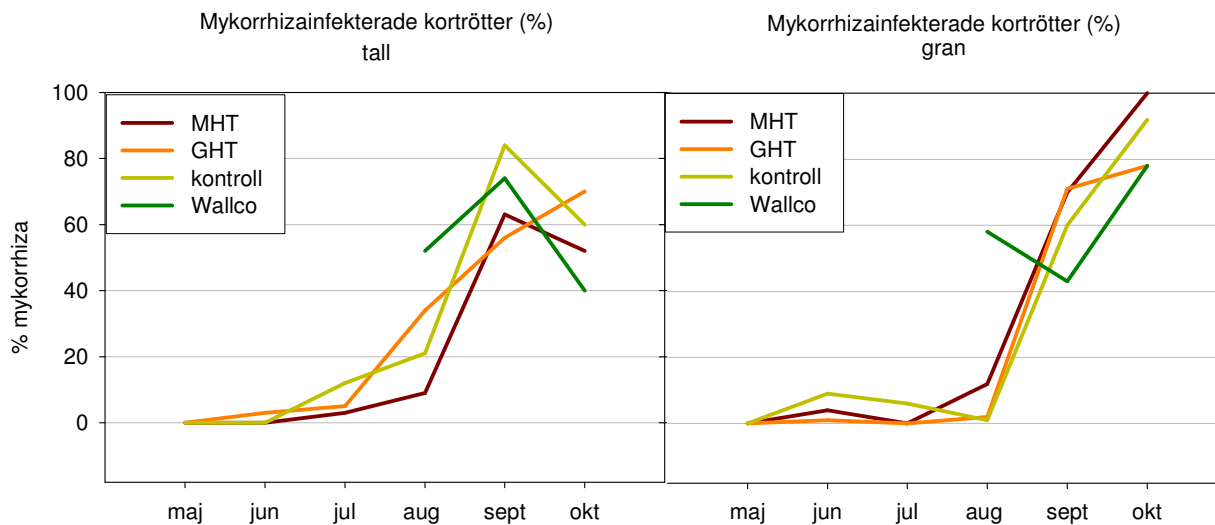
Tabell 3. Funna mykorrhizatyper på tall och granplantor i alla behandlingar (MHT, GHT, Kontroll och Wallco) och i alla provomgångar (nr 1-6). Typerna är baserade på morfologiska egenskaper (Se tabell 4 för nyckel till mykorrhizatyperna).

		Tall											
Nr		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MHT	X	X	X	X									X
GHT	X	X	X	X				X		X			
Kontroll	X		X	X	X	X							X
Wallco	X		X	X	X		X	X	X				
		Gran											
Nr		1	2	3	4								
MHT	X	X	X	X									
GHT	X	X	X										
Kontroll	X			X									
Wallco	X		X	X									

Andelen mykorrhizainfektade kortrötter var väldigt låg (0-5 %) på tall och granplantor som var insamlade i början av sommaren: i maj, juli och juli (figur 6).

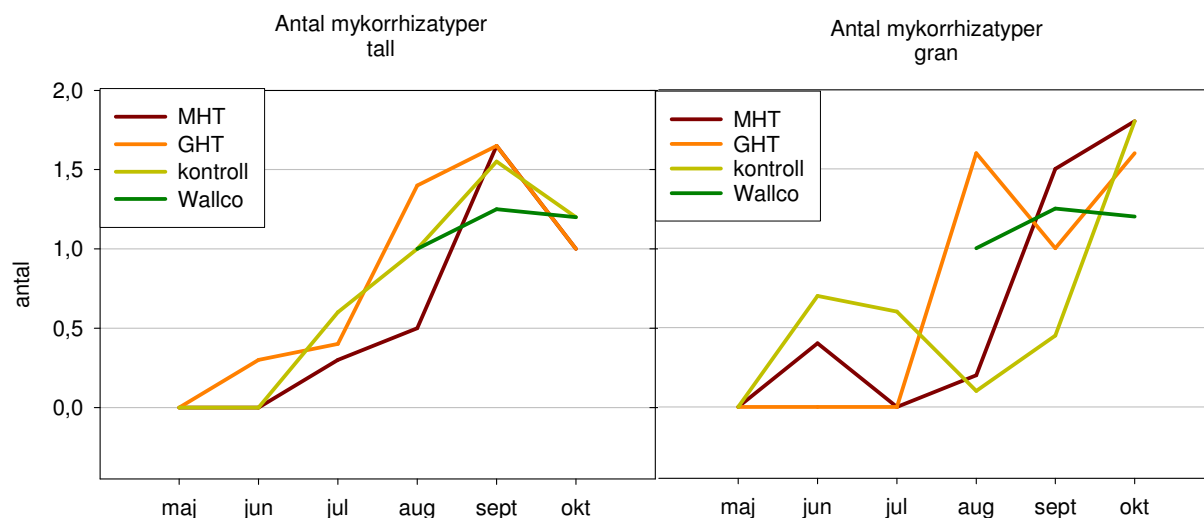
I augusti ökade andelen mykorrhiza på tallplantorna (GHT 34 %, kontroll 21 % Wallco 52 %) men plantorna inokulerade med MHT hade ökat minst (9 %) jämfört med de andra plantorna (figur 6). I september hade kontrollen mest mykorrhiza (84 %) följt av Wallco (74 %) MHT (63 %) och GHT (56 %). I oktober sjönk andelen mykorrhiza för alla behandlingar utom GHT.

Andelen mykorrhizainfektade kortrötter på gran var mycket jämnare mellan behandlingarna än på tall (figur 6). I augusti var andelen mellan 2-12 %, september 60-70 % och oktober 80-100 % på samtliga arginingödslade granar. Wallcogödslade granar hade mycket högre andel mykorrhiza än de övriga behandlingarna i aug (58 %) och sept (43 %) men hade minst mykorrhiza vid sista avläsningen i oktober (78 %).



Figur 6. Procent mykorrhizainfektade korrötter på 4 behandlingar av tall och granplantor insamlade under 6 tillfällen: 28/5, 27/6, 24/7, 27/8, 23/9, och 20/10. Värdena är medelvärden av 10 stycken plantor de fem första tillfällena, 20 plantor vid det femte tillfället och 5 plantor vid det sista tillfället. Wallcoplantorna är endast insamlade de tre sista tillfällena.

Antalet mykorrhizatyper följde samma utveckling som andelen mykorrhiza totalt och var låg i början av växtsäsongen (maj-juli) och steg sedan i aug/sept (figur 7). Som mest hittades på tall 1,75 typer (Wallco) och på gran 1,5 typer (MHT).



Figur 7. Antal mykorrhizatyper baserade på morfologiska egenskaper på tall och granplantor insamlade under 6 tillfällen under 2008: 28/5, 27/6, 24/7, 27/8, 23/9, och 20/10. Värdena är medelvärden av 10 stycken plantor de fem första tillfällena, 20 plantor vid det femte tillfället och 5 plantor vid det sista tillfället. Wallcoplantorna är endast insamlade de tre sista tillfällena.

DNA analys

Resultatet av DNA sekvenseringen visade att den mykorrhizatyp som återfanns på alla undersökta plantor på tall var *Thelephora terrestris* (tabell 4). Två *Suillus* arter kunde matchas mot GenBank:

Suillus luteus och *Suillus variegatus* som båda fanns på tall. Den vanligaste och mest frekvent förekommande mykorrhizotypen på gran matchades till 100 % likhet med *Tylospora asterophora*. Svårigheten att dela in mykorrhizaarter efter det morfologiska utseendet visade sig genom att några av de morfotypade rotspetsarna som hade observerats vara samma typ visade sig vara olika arter efter analys i GenBank. Rotspetsarna som bedömts tillhöra typ nr 1 artbestämdes vid DNA analysen till 3 olika arter: *Thelephora terrestris*, *Suillus luteus* och *Suillus variegatus*.

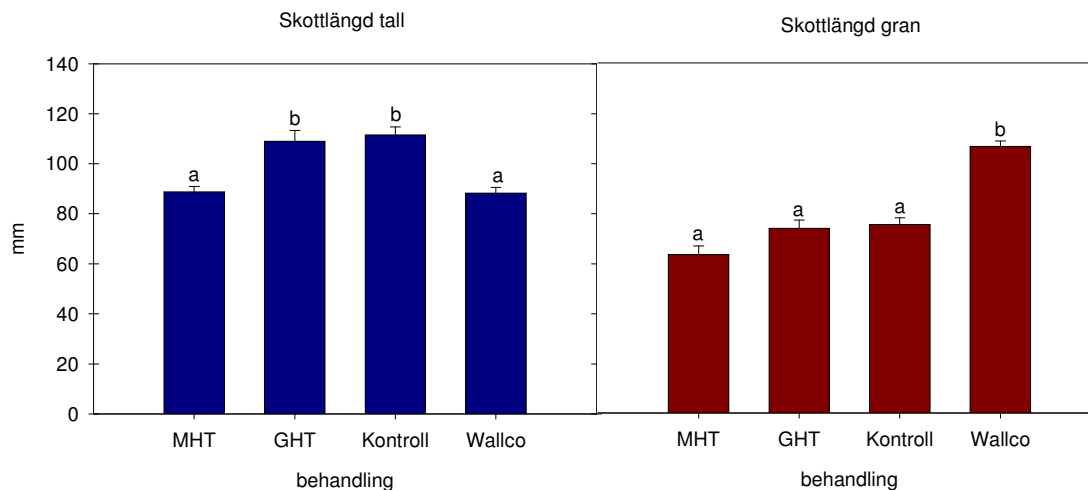
Tabell 4. Funna mykorrhizatyper på tall och granplantor i alla behandlingar (MHT, GHT, kontroll och Wallco) baserat på morfologiska egenskaper, dvs. form och färg samt resultat av matchning mot genbank och % likhet av DNA sekvensen

Nr	Morfologiska egenskaper	Mykorrhizaart enligt sekvenseringen	Likhet vid matchning i GenBank (%)
	Tall		
1	Gyllenbrun, något skimrande, slät.	<i>Thelephora terrestris</i> <i>Suillus luteus</i> <i>Suillus variegatus</i>	99 % 99 % 98 %
2	Mörkbrun, oregelbunden, korallformad, kalaspuff med rosa-vitt mycel.		
3	Brun, väldigt små ca 0,5 mm, genomskinliga i toppen.		
4	Vagt utvecklad mykorrhiza med väldigt tunn mantel, rothår saknas.		
5	Guldskimrande, trådlikt gulddaktigt mycel.		
6	Rosa/vit med svarta fläckar. Ofta flera grenar som sitter ihop.		
7	Svart, ofta i en klunga med ljusa rotspetsar.		
8	Svart korall med genomskinlig mykorrhiza.	<i>Suillus variegatus</i>	95 %
9	Rosa/röd med filtartad topp		
10	Vit korall med genomskinlig mykorrhiza		
11	Ljusbrun, flera grenar som sitter ihop.		
12	Svart/genomskinlig hårig mykorrhiza ofta i korall.	<i>Suillus luteus</i>	99 %
	Gran		
1	Ljusbrun med ljus topp, något svullen. Ser ut som en tops.	<i>Tylospora asterophora</i>	100 %
2	Vagt utvecklad mykorrhiza med väldigt tunn mantel, rothår saknas.		
3	Jämnbrown, släta, ser ut som knoppar.		
4	Brun med genomskinlig topp. Ser ut som en tändsticka.		
5	Korall		

Skotttillväxt och stamdiameter

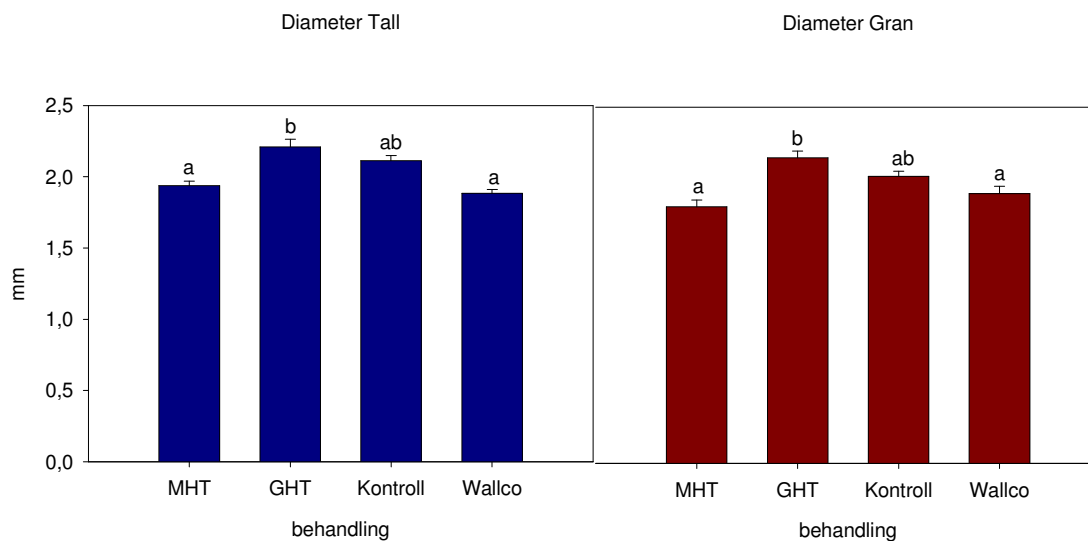
Skottlängden på de MHT behandlade tallarna var signifikant lägre än GHT och kontroll (*figur 8*). De Wallco gödslade tallarna var signifikant kortare än kontrollen som gödslats med arginin.

Skottlängden hos granarna som var gödslade med Wallco var klart mycket längre än kontrollen (*figur 8*).



Figur 8. Skottlängden hos tall och gran i de olika behandlingarna MHT, GHT, Kontroll och Wallco. Värdena är medelvärden, felstaplar visar \pm SE, $n=20$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p < 0,05$).

Stambasdiametern var signifikant lägre hos tallplantor inokulerade med MHT jämfört med GHT (figur 9). Samma skillnad fanns hos granplantorna där MHT var lägre än GHT. Plantorna inokulerade med MHT hos både tall och gran hade den minsta stambasdiametern av alla behandlingarna (1,9 mm resp. 1,8 mm) och störst var GHT hos både tall och gran som båda var 2,2 mm.

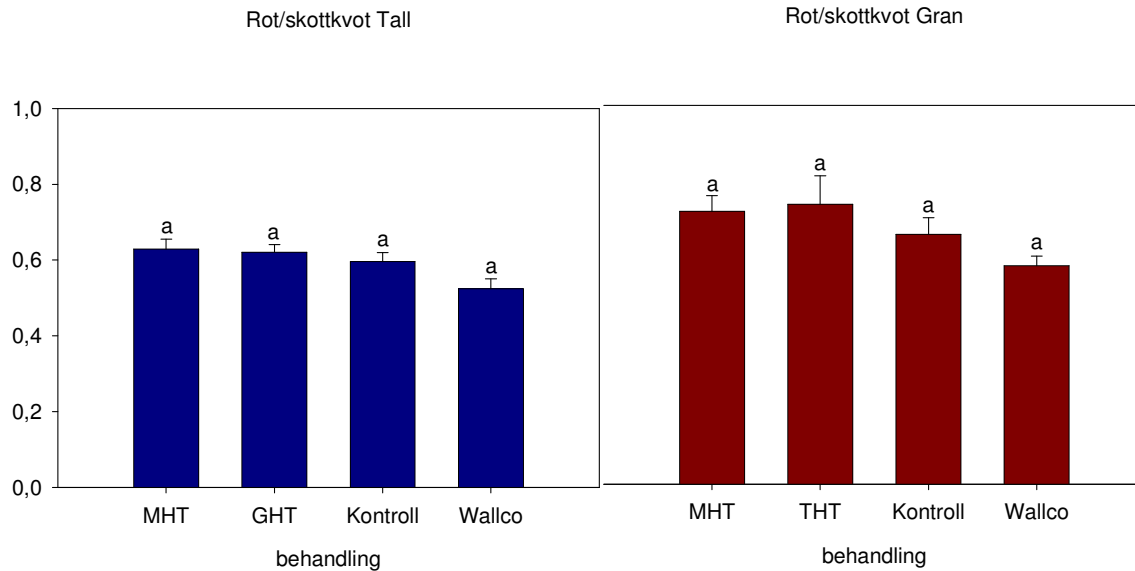


Figur 9. Stambasdiameter i mm hos tall och gran i de olika behandlingarna. Värdena är medelvärden, felstaplar visar \pm SE, $n=20$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p > 0,05$).

Rot/skottkvot

Tallplantorna hade i genomsnitt lägre rot/skottkvot än granplantorna (figur 10). Detta beror på att tallarna hade större skott jämfört med rotandelen. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan de olika behandlingarna i något av trädslagen. Tallarna var jämnare mellan behandlingarna och hade lägre

standardavvikelser inom respektive behandling. Gran hade större spridning mellan behandlingarna och större spridning inom behandlingarna.

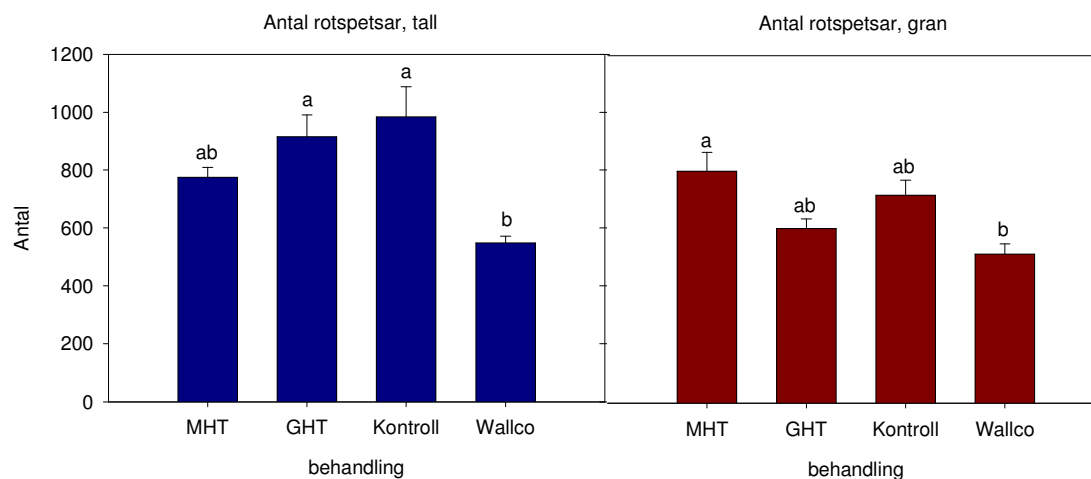


Figur 10. Rot/skottkvot hos tall och gran i de olika behandlingarna MHT, GHT, Kontroll samt Wallco. Värdena är medelvärden och felstaplarna visar $\pm SE$, $n=15$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p>0,05$).

Scanning av plantornas rotsystem

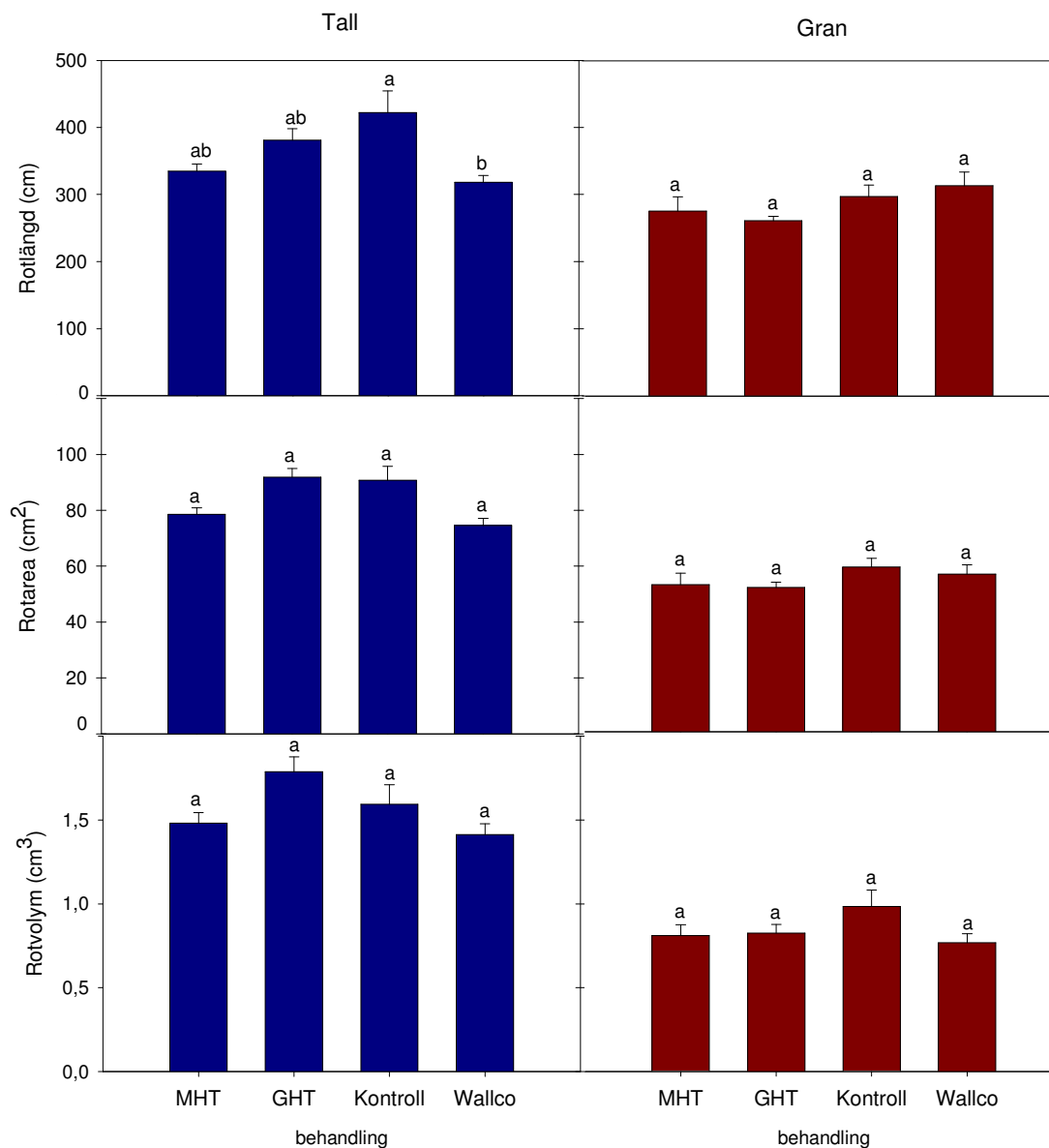
Bland tallplantorna var antalet rotspetsar signifikant lägre hos Wallco(549 st.) jämfört med kontroll som hade 984 st. (figur 11). Det fanns ingen signifikant skillnad mellan de inokulerade tallplantorna och kontrollen.

Hos gran fanns ingen signifikant skillnad mellan de inokulerade plantorna och kontrollen och inte heller mellan Wallcoplantorna och kontrollen (figur 11).



Figur 11. Antal rotspetsar hos tall och gran i fyra olika behandlingar: MHT, GHT, kontroll och Wallco. Värdena är medelvärden och felstaplarna visar $\pm SE$, $n=10$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p>0,05$).

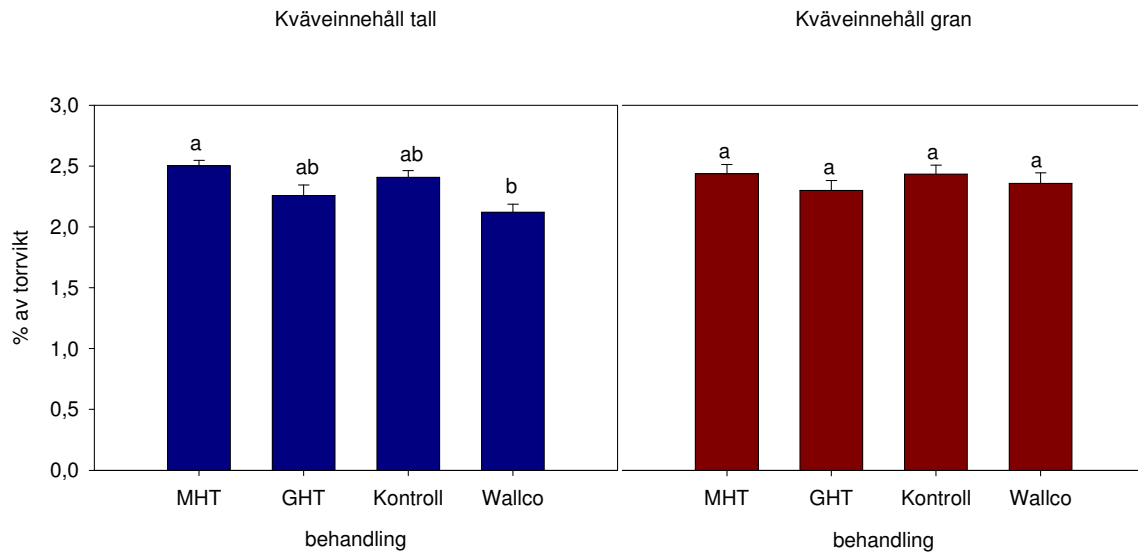
Hos tall var kontrollplantornas totala rotlängd signifikant högre än Wallco plantornas (figur 12). Det var den enda signifikanta skillnaden som hittades vid scanning av plantornas rotsystem. Tallens rotlängd, rotarea och rotvolym var i genomsnitt högre än granens.



Figur 12. Rotlängd, rotarea samt rotvolym för tall och gran i 4 olika behandlingar: MHT, GHT, kontroll och Wallco®. Värdena är medelvärden och felstaplarna visar \pm SE, $n=10$. Olika bokstäver motsvarar signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p<0,05$).

Kväveanalys

Kväveinnehållet skilde sig inte nämnvärt mellan de fyra olika behandlingarna vare sig inom respektive trädslag eller vid jämförelse av dem (figur 13). Alla plantor låg över 2 % kväveinnehåll av torrvikten vilket visar att alla plantor hade en god kvävestatus.

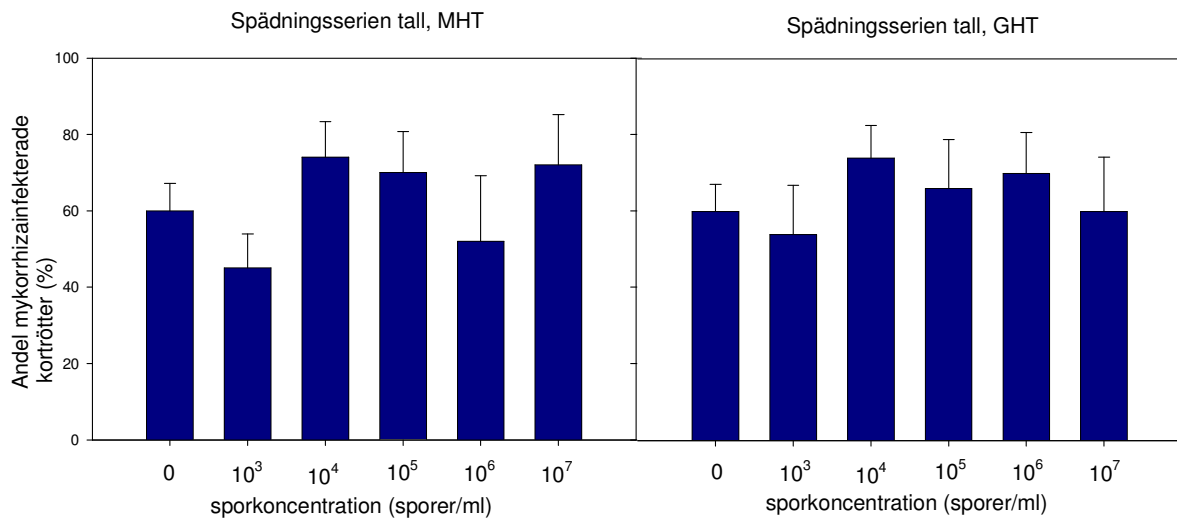


Figur 13. Barrens kväveinnehåll i % av torrsvikten i fyra behandlingar, MHT, GHT, Kontroll och Wallco på gran och tallplantor. Värdena är medelvärden och felstaplarna visar $\pm SE$, $n=10$. Olika bokstäver motsvarar signifikant skillnad mellan behandlingarna ($p>0,05$)

Mykorrhizaförekomst efter inokulering med olika koncentrationer av sporer

Tallplantorna som var inokulerade med 10^3 sporer/ml hade lägst andel mykorrhizainfektade korrötter (45 %) (figur 14). Högst andel mykorrhiza hade tallplantorna inokulerade med 10^4 sporer/ml (74 %).

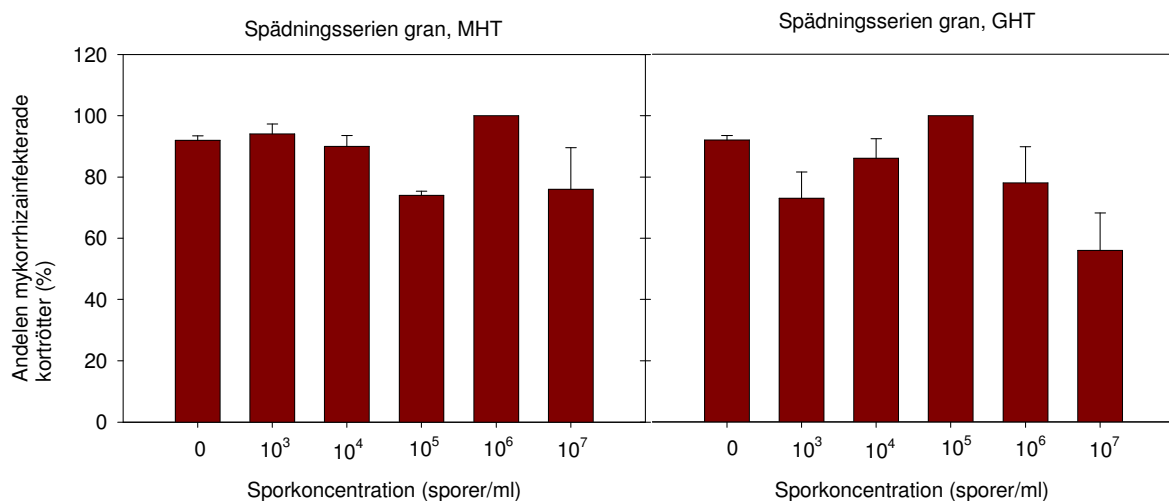
Av tallplantorna inokulerade med marmorerad hjorttryffel så hade de som fått 10^3 sporer/ml (figur 14) lägst andel mykorrhizainfektade korrötter (54 %). De plantorna som hade högst andel (74 %) var de som hade fått spörlösningen med 10^4 sporer/ml. Övriga spädningar hade alla mellan 60-70 % mykorrhizainfektade korrötter .



Figur 14. Andel mykorrhizainfektade korrötter (%) inokulerade med fem olika sporkoncentrationer (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 sporer/ml) av MHT (Marmorerad hjorttryffel) GHT (Grynig hjorttryffel) samt kontroll (0 sporer/ml). Värdena är medelvärden av 5 stycken tallplantor insamlade den 20/10-08.

Bland granplantorna inokulerade med marmorerad hjorttryffel så hade plantorna inokulerade med 10^6 sporer/ml högst andel mykorrhizainfektade korrötter (100%) och övriga plantor hade mellan 75-90 % mykorrhizainfektade korrötter (figur 15).

Bland granplantorna inokulerade med grynig hjorttryffel så hade plantorna inokulerade med 10^5 sporer/ml lägst andel mykorrhizainfektade korrötter (58 %) medan övriga plantor hade mellan 75-100% mykorrhizainfektade korrötter (figur 15).



Figur 15. Andel mykorrhizainfektade korrötter (%) inokulerade med fem olika sporkoncentrationer (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 sporer/ml) av MHT (Marmorerad hjorttryffel) GHT (Grynig hjorttryffel) samt kontroll (0 sporer/ml). Värdena är medelvärden av 5 stycken granplantor insamlade den 20/10-08.

Diskussion

De inokulerade tallplantorna hade båda klart mycket lägre antal mykorrhizainfektade rotspetsar än kontrollen. Eftersom DNA sekvenseringen misslyckades med de flesta rotspetsarna så vet vi inte om etableringen av de inokulerade arterna lyckats. Någon av de oidentifierade mykorrhizatyperna som endast fanns på de inokulerade plantorna kan eventuellt vara marmorerad eller gryning hjorttryffel. Kanske kan de tillsatta sporer till viss del hämma mykorrhizabildningen av de vanligaste förekommande plantskolemykorrhizatyperna. Det kan vara så att konkurrenssituationen på de inokulerade plantorna kan hålla tillbaka den totala utbredningen av mykorrhizan. Kanske är det så att de inokulerade svamparna är långsamma i starten och behöver ytterligare en växtsäsong på sig att kolonisera rötterna.

Flertalet undersökningar har visat att vissa mykorrhizaarter är vanliga i plantskolan (Ackerholm 1992). Dessa arter är specialiserade på att växa i den speciella miljön som råder där med höga näringsvärden och hög fuktighet i torven. *Thelephora terrestris* (vårtöra) är en av de vanligast förekommande mykorrhizaarterna i plantskolor, vilken också återfanns i stor omfattning i detta arbete. I denna undersökning dominerade ett fåtal mykorrhizatyper helt medan flertalet funna morfologiska typer bara återfanns i väldigt liten omfattning på någon enstaka planta. Det kan vara svårt för svampar som är anpassade att växa i näringsfattiga system i skogsmarken att konkurrera med arter som trivs i den kväverika miljön som finns i plantskolan. Kanske finns det också andra betingelser än konkurrens som gör att vissa arter inte koloniserar rötter på plantor i plantskolor. Bekämpningsmedel som används i plantskolan kan störa mykorrhizafloran som koloniserar rötterna och det kan tänkas att plantskolemykorrhizan är mera motståndskraftig och därför klarar av att leva där. För att förhindra för snabb mikrobiell nedbrytning av argininet tillsätts gödselmedlet en mindre mängd bensoatsyra. Även om koncentrationerna är låga kan det verka mer negativt för de studerade arterna än för plantskolemykorrhizan. På motsvarande sätt är det möjligt att dolomitblandningen i torven kan ha olika effekt på olika typer av svampar.

Skottlängden hos tallplantorna som inokulerats med MHT var lägre än kontrollplantorna. Att tillväxten blir lägre om plantorna inokulerats med mykorrhizasvampar i plantskolan har påvisats tidigare (Stenström och Ek 1991). En teori är att det är kostsammare för plantan med fler mykorrhizaarter som koloniserar rotsystemet. Vissa mykorrhizaarter kan även vara kostsammare att ha för plantan eftersom de kräver mer energi än andra arter. På plantskolan är vatten och näring inte begränsande och mykorrhizan kan då verka mer åt det parasitiska hållet för plantan eftersom den inte tillför så mycket nytta utan mest tar energi. Energin som åtgår till mykorrhizan är energi som skulle kunna åtgå till skottlängd istället och därför skulle det kunna tänkas att inokulerade plantor får lägre tillväxt i plantskolan.

Vid utplantering förändras de abiotiska och biotiska förhållandena och mykorrhizan kan vara direkt avgörande för plantans överlevnad. Det skulle då kunna vara en fördel att ha många olika arter mykorrhiza eftersom de kan ha olika funktioner. En art kan t.ex. vara väldigt bra på att vittra mineraler och ta upp näring till plantan (Rosling och Finlay 2004) medan andra arter kan vara bra på att skydda plantan mot rotpatogener (Barklund 1981, Sylvia 1983, Marx 1969). De olika funktionerna hos mykorrhiza och hur det fungerar i samverkan med andra arter är något som skulle kunna undersökas mer.

I framtiden vore det intressant att följa ett utplanteringsförsök av de inokulerade plantorna och jämföra tillväxt och överlevnad hos dem jämfört med kontrollplantorna. Det är vid utplantering som det visar sig om inokuleringen av dessa två hjorttryfflar ger plantorna någon fördel i form av ökad plantöverlevnad och tillväxt. Om det visar sig att inokulerade plantor ger högre överlevnad/ tillväxt i

fält så kan det vara ett alternativ för plantskolor att fortsätta inokulera plantor. För att se om inokuleringen lyckats så skulle man kunna göra om DNA extraktionen och därefter klona de prov som visade sig innehålla flera mykorrhizaarter.

Att inokulera plantor i plantskolan medför en viss kostnad, dels för att införskaffa sporer samt arbetet med att inokulera plantorna. Att pipettera ut sporslösning på varje planta är inte det mest tidseffektiva sättet. Vid sidan av detta examensarbete har inokulering även gjorts med vattning av sporslösningen med vattenkanna på arginingödslade plantor ur samma tall och granparti som de andra plantorna. Detta med tanken på att en jämförelse mellan tillvägagångssätten av olika inokuleringsmetoder skulle kunna göras. Resultaten från detta försök har inte hunnit bearbetas än men dessa plantor finns kvar på Gideå plantskola för fortsatta studier.

Skulle försöket upprepas på plantskolan så skulle man kunna fundera på om tidpunkten för inokuleringen skulle ändras. Eftersom mykorrhizabildningen inte satte fart förrän i augusti så kanske den första inokuleringen skulle kunna göras i maj samt en andra inokulering göras i augusti när rotsystemet är mera utvecklat. En lämplig sporkoncentration kan utifrån detta arbete antas vara omkring 10^4 - 10^5 sporer/ml. Det finns funderingar om vad som händer med sporer som tillsätts. De kan ha förstörts eller försvunnit men med tanke på att sporer ofta kan ligga intakta under många år i naturen så är nog den mest troliga förklaringen att de inte har grott alls eller har grott i liten omfattning.

Vid jämförelse mellan organiskt och oorganiskt gödselmedel så hade de Wallcogödslade tallplantorna nästan hälften så många mykorrhizainfektade rotspetsar som de arginingödslade kontrollplantorna. Samtidigt var antalet rotspetsar lägre hos Wallco. Några av de funna morfotyperna som fanns på kontrollplantorna hittades ej på Wallcoplantorna och tvärt om. Troligen så påverkar organiskt och oorganiskt kväve mykorrhizabildningen på olika sätt. Från försök i skogsmark har man visat att höga tillsatser av ammonium och nitrat minskar andelen mykorrhiza totalt men att det också påverkar sammansättningen av mykorrhizatyperna (Erland och Taylor 2002).

De Wallcogödslade tallplantorna var mindre än de arginingödslade kontrollplantorna. Tidigare studier har visat på att arginingödsling har en positiv inverkan på plantornas tillväxt jämfört med konventionell gödsling med ammonium och nitrat (Öhlund och Näsholm 2001). Situationen var omvänd hos granplantorna men orsaken till Wallcogranarnas mycket högre skottlängd är troligen att de stod i ett helt annat plantparti under växsäsongen och därför fick tillskottsljus under en månads tid vilket inte de andra granarna fick.

Jämförelser mellan plantor gödslade med konventionellt gödselmedel med ammonium och nitrat och plantor gödslade med arginin har gjorts tidigare (Öhlund och Näsholm 2001). Fördelarna med arginingödselmedel är framförallt ett minskat kväveläckage. Det medför att plantskolan inte behöver gödsla fullt så stora mängder och kan förenkla sina rutiner eftersom arginin inte sköljs bort vid ett regn såsom nitrat gör. Det vore även intressant att följa dessa plantor vid ett utplanteringsförsök men eftersom förutsättningarna för Wallco® och arGrow® plantorna var så olika redan från start så är det svårt att dra några generella slutsatser angående skillnader mellan dem.

Referenser

- Ackerholm, M. 1992. Mykorrhizasvampar i svenska plantskolor - en undersökning av täckrotsplantor av tall. Examensarbete, Institutionen för skoglig mykologi och patologi.
- Barklund, P. 1981. Mykorrhiza ger skydd mot rotpatogener. Växtskyddsnotiser. 45, 73-79.
- Bowen, G.D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: Marks, G.C. Kozlowski, T.T. Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. New York: Academic press. 151-205.
- Brody, J. R. och Kern, S. E. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. BioTechniques. 36, 214-216.
- Castellano, M. och Molina, R. 1989. The biological component: Nursery pests and mycorrhizae. The container tree nursery manual, volume five.
- Chakravarty, P. och Unestam, T. 1987. Differential Influence of Ectomycorrhizae on Plant Growth and Disease Resistance in *Pinus sylvestris* Seedlings. Phytopathology. 120, 104-120.
- Chalot, M. och Brun, A. 1988. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS microbiology reviews. 22, 21-44
- Dahlberg, A. 2002. Effects of Fire on Ectomycorrhizal fungi in Fenniscandian boreal forests. *Silva Fennica* 36, 69-80.
- Dahlberg, A. och Stenström, E. 1991. Dynamic changes in nursery and indigenous mycorrhiza of *Pinus sylvestris* seedlings planted out in forest and clearcuts. *Plant Soil*. 136, 73-86.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern Mycology*. Third edition Blackwell science. Oxford
- Erland, S. Taylor, A, F, S. 2002. Diversity of ectomycorrhizal communities in relation to the abiotic environment. The ecology of mycorrhizas, van der Heijden, M. Sanders, I. Ecological studies series. 157, 163-200. Springer verlag.
- Finlay, R. och Söderström, B. 1992. Mykorrhiza and carbon flow to the soil. *Mycorrhizal functioning*. Routledge, Chapman och Hall. New York.
- Finlay, R. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of experimental botany*. 59:5, 1115-1126.
- Frank, A. 1885. Über die auf Wurtzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unerirdische Pilze. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 3 128-145
- Harley, J. och Smith S. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press. London
- Henrion, B. Chevalier, G. och Martin, F. 1984. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98, 37-43.
- Laing, E.V. 1933. *Elaphomyces* sp. (false truffles) and tree roots. *Scottish forestry journal*. 47, 14-18.
- Lambers, H. Chapin, F. och Pons, T. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer Verlag New York.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi. *Phytopathology*. 59, 153-163.

- Marx, D.H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. *Ann. Rev. Phytopathology*. 10, 429-454.
- Marx, D.H. 1977. Manipulating of selected mycorrhizal fungi to increase forest biomass. *Tappi Forest Biology Conf. Wood Chemistry*. Madison. 139-149.
- Miller, S.L och Miller, O.K. 1984. Synthesis of *Elaphomyces muricatus* + *Pinus sylvestris* ectomycorrhizae. *Canadian journal of botany*. 62
- Molina, R. Massicotte, H. och Trappe J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. Allen, M.J. *Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process*. Chapman och Hall, New York, 357-423.
- Nylund, J. 1980. Mykorrhiza- Underjordiskt samarbete. *Fauna och flora*. 75, 147-152
- Nylund, J. Kårén, O. 1994. Den perfekte entreprenören. *Skog och forskning*. 4, 4-13.
- Näsholm, T. Ekblad, A. Nordin, A. Giesler, R. Hogberg, M. Hogberg, P. 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*. 392, 914-916.
- Perrin, R. och Garbay, J. 1983. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-inhibited soils and substrates. *Plant and Soil*. 71, 345-351.
- Persson, J. Gardeström, P. och Näsholm, T. 2006. Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *Journal of experimental botany*. 57, 2651-2659.
- Pirozynski, K. och Malloch, D. 1975. The origin of land and plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*. 6, 153-164
- Rosling, A. och Finlay, R. 2004. Mykorrhizasvampar kan vittra mineraljord. *Fakta skog*, 15.
- Rudawska, M., Leski, T. och Gornowicz, R, 2001. Mykorrhizal status in "Pinus sylvestris" L nursery stock in poland as influenced by nitrogen fertilization. *Dendrobiology*, 46, 49-58.
- Smith, S. och Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, second edition. Academic press, London
- Stenström, E. och Ek M. 1990. Field growth of *Pinus sylvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research*. 20, 914-918.
- Sylvia, D. 1983. Role of *Laccaria laccata* in protecting primary roots of Douglas-fir from root rot. *Plant and Soil*. 71, 299-302.
- Tamm, C-O. 1991. *Nitrogen in terrestrial ecosystems*. Springer Verlag. Berlin
- Vitousek, P. och Howarth, R. 1991. Nitrogen limitation on land and at sea: How can it occur? *Biogeochemistry*. 13, 87-115
- Zak, B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. *Ann rev phytopathol*. 2, 377-392.
- Öhlund, J. Näsholm, T. 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree physiology*. 21, 1319-1326.
- Öhlund, J. Näsholm, T. 2002. Low nitrogen losses with a new source of nitrogen for cultivation of conifer seedlings. *Environmental Scientific Technologies*. 36,(22) 4854-4859

Öhlund, J. 2004. Organic and inorganic nitrogen sources for conifer seedlings: abundance, uptake and growth. *Acta universitatis agriculturae sueciae. Silvestria* 312

Personlig referens. Hedman, Yvonne. Odlingsledare. Holmen skog, Gideå plantskola.

Tillkännagivanden

Detta examensarbete är gjort vid Institutionen för skoglig mykologi och patologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala på uppdrag av Holmen Skog AB som också finansierat studien. Arbetet har utförts under sommaren, hösten och vintern -08. Först vill jag tacka min handledare Elna Stenström som stöttat och hjälpt mig med största delen av arbetet samt synpunkter på manuskriptet från min examinator Nils Högberg. Jag vill tacka Ola Kårén, Holmen Skog som förutom att finansierat arbetet även var upphovsmannen till att detta arbete blev till. För tryffelspårningen tackar jag Welsh springer spaniel hundarna Freja och Higgins samt deras matte Susanne Björnefeldt. Tack till Linda Gruffman, doktorand på Institutionen för skogens genetik och skötsel SLU samt Jenny Wikberg, Swe Tree Technologies som har hjälpt mig med det praktiska arbetet med laborationer och mätningar. Tack till Torgny Näsholm, biträdande handledare för idéer och kritisk granskning av rapporten. Tack till Yvonne Hedman, odlingsledare på Gideå plantskola och annan personal för hjälp med alla praktiska bitar på plantskolan. Tack till Ann Sehlstedt för hjälp med kväveanalyttesten. Tack till Maria Jonsson för hjälp med inokuleringen av plantorna samt hjälp med DNA extraktions arbetet. Tack till Katarina Ihrmark för hjälp med DNA sekvenseringen. Tack till alla som var och lyssnade på min presentation och gav ytterligare idéer och feedback till min rapport.