

Puun vesipotentiaalin komponenttien
vuorokautinen vaihtelu ja nilan osmoottisen
potentiaalin mittaaminen - mittaussarja
männyllä (*Pinus sylvestris L.*) sekä koemittauksia
pilaritervalepällä (*Alnus glutinosa F. pyramidalis*)

Teemu Paljakka
Pro gradu-tutkielma

Metsätieteiden laitos
Helsingin yliopisto
huhtikuu 2013

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous- metsätieteellinen		Laitos/Institution– Department Metsätieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Teemu Paljakka			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Puun vesipotentiaalin komponenttien vuorokautinen vaihtelu ja nilan osmoottisen potentiaalin mittaaminen – mittaussarja männyllä (<i>Pinus sylvestris</i> L.) sekä koemittauksia pilaritervalepällä (<i>Alnus glutinosa</i> F. <i>pyramidalis</i>)			
Oppiaine /Läroämne – Subject Metsäekologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro Gradu		Aika/Datum – Month and year 04.04.2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 59
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Transpiraation seurauksena vettä liikkuu kasvukauden aikana suuria määriä puun juurista sen lehtien kautta pois. Vesi liikkuu puun sisällä muutenkin kuin juurista latvaa kohti, sillä sitä tarvitaan mm. elävien solujen ylläpitoon ja nilakuljetukseen. Veden liikkeet puun sisällä saa aikaiseksi vesipotentiaaliero. Tämän seurauksena vesi liikkuu aina kohti pienempää vesipotentiaalia. Vedenkuljetuslukoissa eli ksyleemissä vesi liikkuu kohti pienempää painetta, koska siellä paineen muutos on käytännössä ainoa ksyleemin vesipotentiaaliin vaikuttava muuttuja. Myös nilakuljetus toimii teorian mukaan veden nilaan muodostaman paine-eron avulla. Nilakuljetukseen tarvittava vesi virtaa ksyleemistä nilaan, kun nilan vesipotentiaali laskee ksyleemin vesipotentiaalia alhaisemmaksi. Teorian mukaan nilan kuljetus käynnistyy kun siihen lähteessä, esim. yhteyttävistä lehdistä, lastataan kuljetettavia sokereita, mikä taas nostaa nilan osmoottista vahvuutta tällä kohtaa. Nilan vesipotentiaali muuttuikin pääasiassa sen osmoottisen vahvuuden muutosten mukaan. Puun solujen vesipotentiaaliin vaikuttavat siis käytännössä vain paine ja osmoottinen vahvuus.</p> <p>Nilassa kuljetetaan sokereiden lisäksi monia muita puulle tärkeitä yhdisteitä. Monien sieltä löytyneiden yhdisteiden merkitystä ei edes tiedetä. Myös veden ja sokereiden kuljetuksen dynamiikka puussa on tutkijoille vielä tänäkin päivänä suuri kysymys, johon kuumeisesti etsitään vastausta. Veden ja sokereiden kuljetuksen ymmärtäminen on tärkeää, sillä niiden arvellaan vaikuttavan samanaikaisesti puun muihin fysiologisiin toimintoihin, kuten ilmarakojen käyttäytymiseen ja solujen kasvuun. Nilan tutkiminen on ollut hyvin haastavaa, sillä puhdasta näytettä sen sisällöstä on vaikea saada. Nilan solut käynnistävät lukuisia vastareaktioita, kun sen toiminta näytteitä kerätettäessä häiriintyy. Joitain menetelmiä nilan tutkimiseen on ollut käytössä mutta nämä menetelmät ovat rajoittuneet laboratorio-olosuhteisiin tai tiettyihin puulajeihin. Etenkin kenttätutkimuksia on nilan toiminnasta melko vähän, sillä siellä käytettävät menetelmät ovat puuta vahingoittavia. Lupaava menetelmä, mikä ei häiritse puun toimintaa tutkimuksen aikana, voisi olla nilassa tapahtuvien muutosten mallintaminen mitattujen nilan ja ksyleemin läpimitan muutosten avulla. Ksyleemin läpimitan muutosten on osoitettu seuraavaan transpiraation muutoksia. On myös arvioitu, että nilassa tapahtuvat vesipotentiaalin muutokset voisivat olla havaittavissa läpimittoja tarkastelemalla. Mallinnuksissa oleellinen puuttuva palanen on kvantitatiivinen tieto nilan osmoottisista vahvuuksista. Tämän tutkielman aiheena on puun vesipotentiaalin komponenttien vuorokautinen käyttäytyminen. Painopiste on nilan osmoottisen vahvuuden tutkimisessa ja sen mittaamiseen soveltuvan menetelmän tarkastelussa.</p> <p>Mittauksia tehdään pääasiassa männyllä (<i>P. sylvestris</i> L.) mutta koemittauksia tehdään myös pilaritervalepällä (<i>A. glutinosa</i> F. <i>pyramidalis</i>). Mittauksia tehdään eri kohdista puuta kerätystä nilapaloista sekä lehdistä. Lehdistä mitataan myös ksyleemin vesipotentiaalia, mitä tarkastellaan ksyleemin läpimitanmuutosten valossa. Näitä vertaillaan mm. nilasta ja lehdistä mitattuun osmoottiseen vahvuuteen ja vesipitoisuuteen. Nilan tutkimiseen käytetään menetelmää, jota ei kirjallisuuden perusteella nähtävästi ole aiemmissa julkaisuissa käytetty. Menetelmässä näyte erotellaan nilapaloista mekaanisesti sentrifugilla. Erona kirjallisuudesta löytyviin menetelmiin on nilapalojen jäädytys ja sulatus ennen näytteiden preparoimista sentrifugilla. Menetelmä näyttäisi tuottavan teorian mukaisia tuloksia nilan osmoottisesta vahvuudesta. Saatavat arvot saattavat tosin olla hieman todellisuutta alhaisempia. Tulosten mukaan männyn nilan vesipotentiaalin vaihtelut näyttäisivät muuttuvan ksyleemin vesipotentiaalin kanssa samalla tavalla. Männyllä vahvin yhteys ksyleemin vesipotentiaaliin löydettiin latvuksen alapuolelta kerätystä nilasta ja heikoin yhteys rungon alaosasta kerätystä nilasta. Oksan nilan vesipotentiaalin vaihtelut olivat vaikeimmin selitettävissä. Neulasten osmoottinen vahvuus ja vesipitoisuus olivat vahvasti yhteydessä ksyleemin vesipotentiaaliin. Tulokset tukevat teoriapohjan mukaista ajatusta ksyleemin ja nilan tiivistä vuorovaikutuksesta.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords vesipotentiaali, osmoottinen potentiaali, osmoottinen vahvuus, nila, ksyleemi, läpimitanmuutos, mänty, pilaritervaleppä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Esipuhe

Kiitokset perheelle ja ystäväilleni kannustuksesta, Anu Riikoselle avusta Viikin koekadun mittauksissa, Eija Juuroselle käytännön vinkeistä, professori Heikki Häniselle avusta solun jäätymiseen liittyvien kysymysten pohdinnassa, Hannu Ritalle avusta tilastokysymyksissä ja Tuula Jyskeelle männyn mikroskooppikuvista. Kiitos professori Eero Nikinmaalle ja Tuula Jyskeelle työn tarkastuksesta. Erityiset kiitokset professori Eero Nikinmaalle ja Teemu Höltälle hyvästä ohjauksesta, tinkimättömästä ja kannustavasta palautteesta sekä mielenkiintoisesta graduaiheesta.

Helsingissä 4.4.2013

Teemu Paljakka

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
Esipuhe	3
Sisällysluettelo.....	4
1 Johdanto	5
2 Tutkimuskysymykset	6
3 Tutkimuksen teoreettinen viitekehys	6
3.1 Vesipotentiaali	6
3.1.1 Vesipotentiaalin tekijät ja osmoottinen vahvuus.....	6
3.1.2 Turgor-paine ja transpiraatio	7
3.2 Ksyleemi	8
3.2.1 Ksyleemin rakenne.....	8
3.2.2 Ksyleemin negatiivinen paine (jännitys).....	9
3.2.3 Ksyleemin läpimitan muutokset.....	10
3.3 Nila.....	11
3.3.1 Nilan rakenne ja esinilaväylä.....	11
3.3.2 Nilan kuljetus – lähde ja nielu sekä apoplastiset ja symplastiset nilan lastaajat	13
3.3.3 Nilanesteen koostumus	14
3.4 Nilan kuljetusnopeus ja ksyleemi	15
3.5 Münchin vastavirtaus ja nielen vuodenaikainen vaihtelu.....	17
3.6 Osmoottinen vahvuus männyn neulasissa ja nilassa	17
3.7 Lehden vesipotentiaalin mittaaminen.....	20
3.8 Nilan mittausten taustaa	20
3.9 Jäädettämisen vaikutus solujen sisältöön ja solukalvoihin	21
4 Aineisto ja menetelmät	23
4.1 Tutkimuskohteet	23
4.2 Vesipotentiaalimittaukset.....	23
4.3 Ksyleemin läpimitanmuutosten mittaukset	25
4.4 Esikoe nilapaloilla.....	25
4.5 Lepän lehtien sekä esikokeen neulasten osmoottisen vahvuuden mittaaminen.....	26
4.6 Männyn mittaussarja – nila- ja neulasnäytteiden osmoottinen vahvuus ja vesipitoisuus.....	27
4.7 Tilastolliset menetelmät	28
5 Tulokset	29
5.1 Esikoe nilapaloilla.....	29
5.2 Ksyleemin vesipotentiaali pilaritervalepällä.....	30
5.3 Tervalepän lehtien osmoottinen vahvuus	34
5.4 Männyn mittaussarja	36
5.4.1 Vesipotentiaali ja läpimitta	36
5.4.2 Nilapalojen ja neulasten osmoottiset vahvuudet.....	37
5.4.3 Vesipitoisuus neulas- ja nilanäytteissä	40
5.4.4 Muuttujien kootut selitysasteet puuyksilöiden välillä.....	41
5.4.5 Nilanäytteiden preparointimenetelmän vaikutus	42
6 Tulosten tarkastelu.....	43
6.1 Ksyleemin läpimitta ja vesipotentiaali.....	43
6.2 Ksyleemin ja nilan vesipotentiaali	44
6.3 Neulasten ja lehtien osmoottinen vahvuus	46
6.4 Jäädetyttyjen nilanäytteiden preparointi sentrifugilla – menetelmän vaikutus tuloksiin	48
7 Johtopäätökset	49
8 Lähteet.....	50
9 Liitteet.....	56

1 Johdanto

Veden erityiset ominaisuudet ovat pääosassa ekosysteemien toiminnassa, niin ekosysteemin läpi kulkevan energian liikkeissä kuin aineenvaihdunnallisissa prosesseissakin, jotka myös pitkälti ovat kemiallisen energian tasapainottelua soluissa ja solukoissa. Katsoessa vienosti kevyessä tuulessa huojuvaa puuta tulee harvemmin ajatelleeksi, miten paljon puun sisällä alati tapahtuu, ja miten nerokkaasti puiden rakenne on muodostunut hyödyntämään veden ominaisuuksia. Kasvukauden aikana suuria määriä vettä liikkuu puun juurista vedenkuljetussolukkoa, ksyleemiä, pitkin kohti haihduttavia lehtiä. Matkan varrella vesi kiertää myös puun sisällä, sillä sitä tarvitaan mm. solujen aineenvaihdunnan ylläpitoon, solujen kasvuun, ravinteiden kuljetukseen ja lukuisten yhdisteiden kuljetukseen nilassa (Taiz ja Zeiger 2010). Vesi kiertää puussa myös silloin, kun puu ei haihduta (Hölttä ym. 2006). Sen liikkeet puun sisällä saa aikaiseksi vesipotentialin eroavaisuudet solujen ja solukkojen välillä.

Nilan on puun yhteytystuotteita ja lukuisia muita yhdisteitä kuljettava solukko, joka ylettyy pienimmistä juurista runkoa pitkin aina pienimpiin lehtisuoniin. Sen kuljetustoiminnan edellytyksenä on vuorovaikutus ksyleemin kanssa, johon oleellisesti vaikuttavat nilaan lastattavat kuljetettavat tuotteet sekä ksyleemissä kulkevan veden jännitys. Sokereiden ja sokerialkoholien lastaamisella nilaan saadaan osmoottista vahvuutta nostettua kun taas puun haihdutuksen aste vaikuttaa veden jännitykseen ksyleemissä niin, että suuremmassa jännityksessä oleva vesi myös tiukemmin pysyy ksyleemissä (Hölttä ym. 2009). Nilan vesipotentialin on siis näiden muuttujien valossa oltava ksyleemin vesipotentialia alhaisempi, jotta vesi siirtyisi ksyleemistä nilaan ja tuotteiden kuljetusta tapahtuisi. Nilan ja ksyleemin vesipotentialit ovat siis kytköksissä toisiinsa. Ne ovat kytköksissä myös ympäristöönsä, jonka vuoksi niiden vaikutus heijastuu ympäröiviin soluihin ja taas niitä ympäröiviin soluihin vesipotentialin muutosten välityksellä. Veden ja sokereiden kuljetuksen ymmärtäminen onkin hyvin tärkeää, sillä se samanaikaisesti vaikuttaa myös kasvin muihin prosesseihin, kuten solujen kasvuun ja ilmarakojen käyttäytymiseen (de Schepper ja Steppe 2010).

Nilan sisältöä on hankala tutkia, sillä sen soluissa käynnistyy useita reaktioita nilan vahingoittuessa. Yksikään kehitetty tutkimusmenetelmä ei anna selkeää näkemystä nilan sisällöstä (Turgeon ja Wolf 2009). Paljon nilaan liittyvää tutkimusta on tehty koppisiemenisillä kasveilla, koska sisältöä luotettavimmin kuvaavat menetelmät ovat olleet mahdollisia vain tietyillä koppisiemenisillä. Lisäksi näistä tutkimuksista suuri osa on tehty ruohovartisilla kasveilla (Jensen 2012). Myös paljassiemenisten nilan toiminnasta on viime aikoina ilmestynyt joitakin tutkimuksia, jotka ovat valaisseet aihetta (esim. Liesche ym. 2011, Fu ym. 2011, Liesche ja Schulz 2012). Nilasolukon herkkyyden vuoksi näytteiden kerääminen siitä häiritsee tai vahingoittaa puun toimintaa, mikä myös tutkimuksessa sotkee nilan luonnollisen tilan tarkastelua. Niinpä sen sisällön muutoksista on etenkin kenttäkokeista saatua tietoa hyvin vähän.

Nilan toimintaa on pyritty hahmottamaan erilaisilla malleilla, jotka ovat perustuneet suurelta osin teoriaan (esim. Thompson ja Holbrook 2003, Hölttä ym. 2006, 2009). Nilan

toimintaa kuvaavien mallien täydentäminen kaipaa kuitenkin vielä paljon kvantitatiivista dataa (Knoblauch ja Peters 2010). Lupaava puuta vahingoittamaton menetelmä on heijastaa nilan toimintaa rungon ja ksyleemin päältä mitattujen läpimitan muutosten avulla. Sevanto ym. (2003) ovat osoittaneet männyllä tehdyissä laskelmissa nilassa kuljetettavien sokereiden määrien muutosten voivan hyvinkin aiheuttaa sellaisia paineen muutoksia, jotka näkyisivät myös rungon läpimittaa kuvaavissa mittauksissa. Yksi tuntematon tekijä tässä mallissa on kvantitatiivinen tieto nilan sisällön osmoottisesta vahvuudesta. Mikäli tämä saataisiin luotettavasti selvitettyä ja yhdistettyä läpimitan muutoksia hyödyntävään malliin, voisi nilan toiminnan seuraaminen merkittävästi helpottua ja sen tutkimiseen aueta uusia mahdollisuuksia.

2 Tutkimuskysymykset

Tässä tutkimuksessa tarkastellaan männyn (*Pinus sylvestris* L.) nilan vesipotentialin vuorokausittaisia muutoksia, etsitään sen tutkimiseen soveltuvaa menetelmää ja tutkitaan tämän menetelmän luotettavuutta. Tämän lisäksi tarkoituksena on myös mitata luotettavasti ksyleemin vesipotentialia. Tutkimuksen painopiste on kuitenkin nilan vesipotentialin tarkastelussa, sillä siitä on selvästi vähemmän tietoa kuin ksyleemin vesipotentialin vaihteluista. Nilan ja ksyleemin vesipotentialiaaleja tutkimalla pyritään siis ymmärtämään veden ja sokereiden kuljetusta puussa. Tiedolla ksyleemin vesipotentialista voidaan teorian mukaan peilata nilan vesipotentialiaaleja, ja siten saada tukea nilamittauksille. Pääasiallisina muuttujina tarkastellaan osmoottista vahvuutta nilassa ja ksyleemin paineen muutoksia, koska nämä käytännössä vaikuttavat nilan ja ksyleemin vesipotentialiin. Näihin liittyviä koemittauksia tehdään myös pilaritervalepällä (*Alnus glutinosa* F. *pyramidalis*). Näihin haetaan tukea vielä mitatuista puun läpimitan muutoksista sekä mittaamalla lehtien osmoottista vahvuutta ja nilan sekä lehtien vesipitoisuutta. Ellei erikseen ole mainittu, tarkoitetaan männyllä aina metsämäntyä (*P. sylvestris*). Tekstissä tullaan myös usein käyttämään käsitteitä koppi- ja paljassiemeniset. Männyt kuuluvat paljassiemenisten ja pilaritervaleppä koppisiemenisten kasviryhmään.

3 Tutkimuksen teoreettinen viitekehys

3.1 Vesipotentialiaali

3.1.1 Vesipotentialin tekijät ja osmoottinen vahvuus

Veden polaarinen molekyylirakenne saa vesimolekyylit järjestäytymään niin, että hieman negatiivisesti varautunut happiatomi on sidoksissa hieman positiivisesti varautuneeseen viereisen vesimolekyylin vetyatomiin. Tämän ns. kovalenttisen sidoksen vuoksi vesimolekyylit kestävät suuria jännityksiä ja liikkuvat yhtenäisesti pitoisuuserojen tasoittuessa. Vesipotentialiaali tarkoittaa käytännössä vapaata energiaa, joka saa veden liikkumaan. Solun vesipotentialin laskiessa suhteessa sen ympäristöön, se vetää puoleensa vettä. Sen sijaan vesipotentialin nousu ympäristöön nähden saa veden tasapainottumaan ympäristöönsä. Systeemi siis pyrkii aina alhaisimmalle energiatasolle eli tasapainotilaan

(Taiz ja Zeiger 2010). Puoliläpäisevän kalvon, esim. solukalvon, läpi tapahtuvaa veden tasapainottavaa liikettä kutsutaan osmoosiksi, mikä siis tarkoittaa passiivista pitoisuuksien tasoittumista veden avulla. Kasvisoluja tarkasteltaessa vesipotentiaali koostuu osmoottisesta potentiaalista ja hydrostaattisesta paineesta. Vesipotentiaali voidaan ilmaista yhtälöllä (yhtälö 1), missä ψ_w tarkoittaa vesipotentiaalia, ψ_s osmoottista potentiaalia ja ψ_p hydrostaattista painetta. Näiden yksiköt ilmaistaan usein muodossa megapascal (MPa) (Taiz ja Zeiger 2010).

$$\psi_w = \psi_s + \psi_p \quad (\text{yhtälö 1})$$

Osmoottinen potentiaali noustessaan laskee vesipotentiaalia, eli se on negatiivinen tekijä, kun taas paineen nousu nostaa vesipotentiaalia. Vesipotentiaalin kaavassa on mukana myös muita tekijöitä, kuten painovoima, mutta ne eivät nilan kuljetusta tarkasteltaessa merkittävästi vaikuta tulokseen. Painovoiman vaikutus on vähäinen solujen välisten lyhyiden etäisyyksien vuoksi. Erittäin korkeilla puilla myös painovoiman ottaminen huomioon voi olla perusteltua (Taiz ja Zeiger 2010).

$$\psi_s = -RTc_s \quad (\text{yhtälö 2})$$

Osmoottinen vahvuus ilmaisee molekyylien määrää tilavuutta kohden. Kaikki liuenneet yhdisteet nostavat liuoksen osmoottista vahvuutta (Wolfe ja Bryant 1999). Osmoottista vahvuutta voidaan muuttaa joko muuttamalla yhdisteiden osmoottista vaikutusta tai lisäämällä osmoottista vahvuutta nostavien molekyylien määrää (Peltier ym. 1997). Yhdisteiden osmoottista vaikutusta voi muuttaa mm. muuttamalla suurempia molekyyliä useammaksi pienemmäksi molekyyliksi. Tislattun veden osmoottinen vahvuus on nolla, sillä se ei sisällä mitään liuenneita aineita. Vesipotentiaalin toinen tarkasteltava tekijä, osmoottinen potentiaali, voidaan teoreettisessa ideaalitulanteessa laskea yhtälöllä (yhtälö 2), jossa ψ_s on osmoottinen potentiaali (MPa), R on kaasuvakio ($8,32 \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T on lämpötila (Kelvin) ja c_s on liuenneiden yhdisteiden pitoisuus eli tässä tutkimuksessa osmoottinen vahvuus (mol m^{-3}) (Taiz ja Zeiger 2010). Osmoottisen vahvuuden yhteydessä käytetään tässä tutkimuksessa yksikköä mol/l tai mol/kg, jotka molemmat tarkoittavat samaa asiaa.

3.1.2 Turgor-paine ja transpiraatio

Elävien solujen välisen veden liikkeen saa aikaiseksi vesipotentiaali-ero, joka muodostuu solunsisäisen paineen tai solun sisältämien yhdisteiden pitoisuuden muutoksista ympäristöönsä nähden, ja jonka seurauksena vesi taas liikkuu kohti pienempää vesipotentiaalia (Taiz ja Zeiger 2010). Osmoottisen vahvuuden muutokset vaikuttavat siis vesipotentiaaliin ja veden pitoisuuseroja tasapainottavasta liikkeestä johtuen myös paineen muutoksiin kasvisoluissa. Veden kerääntyminen soluun nostaa painetta solun sisällä, ja tätä positiivista hydrostaattista painetta kutsutaan turgor-paineeksi. Kasvisolut erottaa eläinsoluista erityisesti niiden soluseinän vuoksi. Tämän soluseinän ansiosta kasvisolu sietää suuriakin paine-eroja ympäristöönsä nähden, kun eläinsolussa paineet pyrkivät tasoittumaan samantien (Bagnasco ym. 1986). Elävät kasvisolut tarvitsevat turgor-painetta, sillä se auttaa pitämään niiden rakennetta yllä ja sitä tarvitaan mm. solujen kasvussa (Taiz ja

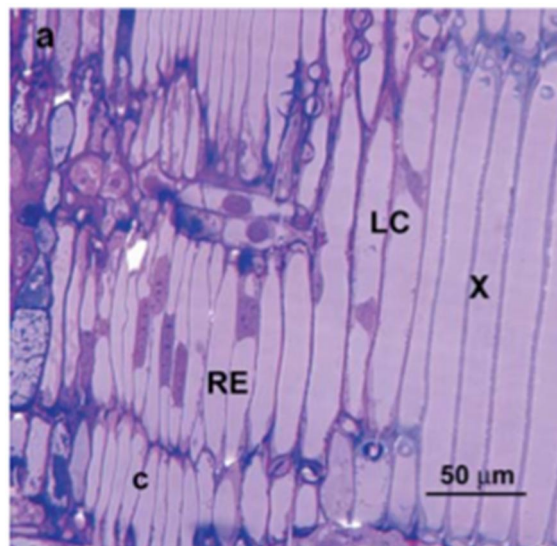
Zeiger 2010). Kun solun turgor-paine lähestyy nollaa, alkaa kasvisolun rakenne vahingoittua. Tämän seurauksena mm. huolimattomasti kasteltu huonekasvikin lakastuu. Elävissä soluissa on siis alati oltava riittävä vesipitoisuus, jotta ne pysyvät toiminnallisina (Teskey ym. 2008).

Puun haihduttaminen eli transpiraatio on seurausta veden liikkeestä kohti pienempää painetta, joka voidaan ilmaista myös vesipotentiaalina. Käytännössä suhteellinen vesipitoisuus ja vesipotentiaali lehden ulkopuolella ovat aina pienemmät puun sisällä vallitseviin olosuhteisiin verrattuna, ja transpiraation voidaan siis sanoa johtuvan veden liikkeestä kohti pienempää vesipotentiaalia. Puun haihduttaessa hydrostaattinen paine on ksyleemissä negatiivinen (Taiz ja Zeiger 2010).

3.2 Ksyleemi

3.2.1 Ksyleemin rakenne

Ksyleemin, eli vettä kuljettavan puusolukon, rakenne kestää itseisarvoltaan hyvinkin suuria paineita. Sen solukko rakentuu kuolleista kasvisoluista, joiden seinät ovat lujittuneet veden kuljetusta varten. Paljassiemenisillä ksyleemin solukko koostuu trakeideista. Näistä jää solun kehityksen päätteeksi jäljelle solujen seinät, joita vahvistaa ligniini. Trakeidien soluseinissä on lukuisia huokosia, joita pitkin vesi pääsee liikkumaan trakeidien välillä (Taiz ja Zeiger 2010). Veden johtavuus näissä solukoissa on syystäkin hyvä, sillä transpiraation aste saattaa vaihdella voimakkaasti päivän mittaan. Ksyleemi ulottuu nilan tavoin aina pienimmistä juurista lehtien pienimpiin suoniin. Transpiraation liikuttama vesimolekyylien ketju lähtee liikkeelle koko rungossa, aina juurista lehtiin saakka (de Schepper ja Steppe 2010).

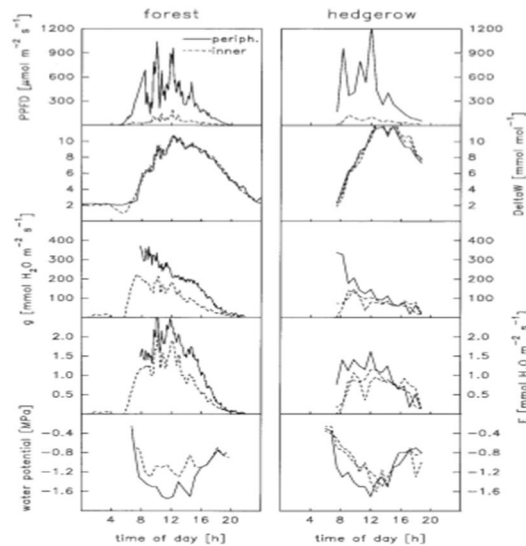


Kuva 1. Pitkittäissuunnassa otettu valomikroskooppikuva kontortamännyn (*Pinus contorta*) ksyleemin trakeideista (X), kehitysvaiheessa olevista trakeideista (RE ja LC), jälsisolukosta (c) sekä jälsisolukon vasemmalla puolella näkyvästä nilasolukosta (Samuels ym. 2002).

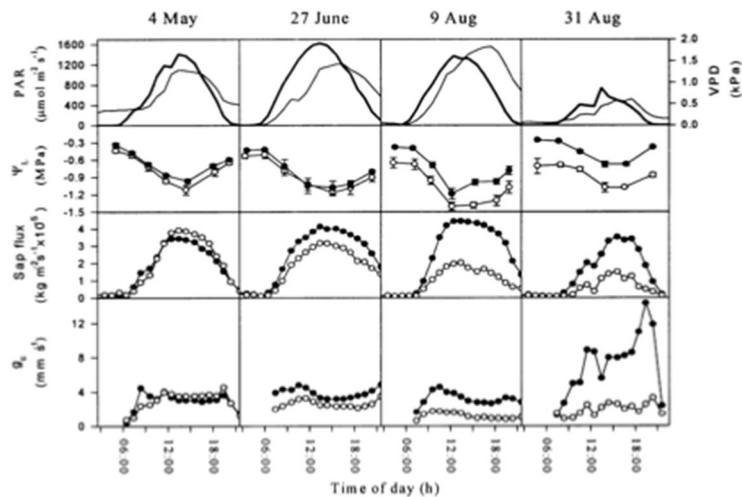
3.2.2 Ksyleemin negatiivinen paine (jännitys)

Puu pitää ilmarakojaan auki, jotta se voisi saada hiilidioksidia fotosynteesiin. Jokaista sidottua hiilidioksidiatomia kohti lehden ilmaraoista haihtuu puulajista riippuen jopa 400 vesimolekyyliä ilmaan (Taiz ja Zeiger 2010). Vesi virtaa ksyleemiä pitkin kohti lehtien ilmarakoja ja ulkoilmaa, koska lehtien ulkopuolella on puuhun nähden lähes aina vesihöyryn kyllästysvajausta. Vesihöyryn kyllästysvajausta, eli VPD (*englanniksi vapour pressure deficit*), kuvaa tietyssä lämpötilassa ilmatilavuutta kohti olevan veden määrän vajetta sataprosenttiseen suhteelliseen kosteuteen verrattuna. Vuorokauden aikana VPD seuraa vahvasti lämpötilan muutoksia ja puun ilmarat taas seuraavat herkästi VPD:n muutoksia (Irvine ym. 1998). Suuremmalla VPD:llä ilmaan siirtyy enemmän vesimolekyyliä ja lehden sisällä ilmarakojen lähellä olevaan vesipintaan kohdistuu myös kovempi jännitys. Tämä jännitys välittyy ksyleemissä kulkevaan vesimolekyyliketjuun. Matkalla juurista lehtien ilmarakoihin vesimolekyylien ketju kohtaa kuitenkin resistanssia eli vastusta, jonka seurauksena ksyleemiin muodostuu lisää negatiivista painetta, siis lisää jännitystä. Resistanssia muodostuu erityisesti ksyleemin trakeidien huokosista veden siirtyessä trakeidien välillä (Sperry ym. 2006). Resistanssia muodostuu myös trakeidien sisäseinistä ja veden siirtyessä juurten soluista ksyleemiin tai ksyleemistä lehden soluihin (Jarvis 1976). Lehtien muodostaman resistanssin arvioidaan olevan jopa 30 % puun koko vedenkuljetukseen muodostuvasta resistanssista, mikä on suuri osuus ottaen huomioon lyhyen matkan lehden ksyleemistä sen ilmarakoon verrattuna veden matkaan rungossa (Sack ja Holbrook 2006).

Ksyleemiin saattaa muodostua hyvinkin suuria jännityksiä, jotka voivat männyllä olla jopa -20 bar (Poyatos ym. 2007). Maksimijännitykset ovat yleensä suurimmat kuivempiin alueisiin sopeutuneilla puulajeilla, sillä niiden tiheämpi puuaine kestää suurempia jännityksiä (Hacke ym. 2001). Paineiden arvot ksyleemissä voivat siis olla hyvin alhaisia vahvojen soluseinien vuoksi. Puu voi kuitenkin säännöstellä jännityksen suuruutta säätämällä ilmarakojensa aukioloastetta, jotta vesimolekyyliketjut eivät katkeaisi ja veden kuljetus juurista lehtiin pysyisi toiminnassa. Tähän ilmarakojen säätelyyn on myös muita syitä, joihin palataan myöhemmin osiossa "Nilan kuljetus ja ksyleemi". Etenkin tervaleppä on herkkä sulkemaan ilmarakojaan transpiraation voimistuessa (Peltier ym. 1997). Lehden vesipotentiaalin ja transpiraation vuorokautinen käyttäytyminen on kuitenkin samanlaista sekä leppällä että männyllä vaikka mänty onkin sopeutunut leppää kuivempiin olosuhteisiin (kuvat 2 ja 3) (Peltier ym. 1997, Irvine ym. 1998). Puu varautuu vuorokautisiin transpiraation muutoksiin myös keräämällä ilta- ja yöaikana runkoon vesivarastoja, joita se taas kuluttaa päiväsaikaan (Zweifel ym. 2001). Kuvissa 2 ja 3 on nähtävissä leppän ja männyn lehden vesipotentiaalin ja transpiraation välinen yhteys sekä näiden verrattavuus myös muihin fysiologisiin muuttujiin. Tämän tutkimuksen kannalta kuvissa oleellista on kuvaajien, etenkin vesipotentiaalin ja transpiraation, samanmuotoisuus, minkä vuoksi kuvaajien eri yksiköihin ei ole tarvetta kiinnittää huomiota.



Kuva 2. Tervalepän lehden vesipotentiaali ja sen yhteys joihinkin puun fysiologiaan vaikuttaviin tekijöihin metsässä (forest) ja pensasaidassa (hedgerow) vuorokauden aikana elokuun puolivälissä (Eschenbach ja Kappen 1999). Kuvia ylhäältä alaspäin mentäessä on irradianssi (PPFD photosynthetically active photon flux density), lehden ja ilman välinen vesihöyryn paineen erotus (DeltaW), lehden konduktanssi (g), transpiraatio (E) ja lehden vesipotentiaali (water potential).



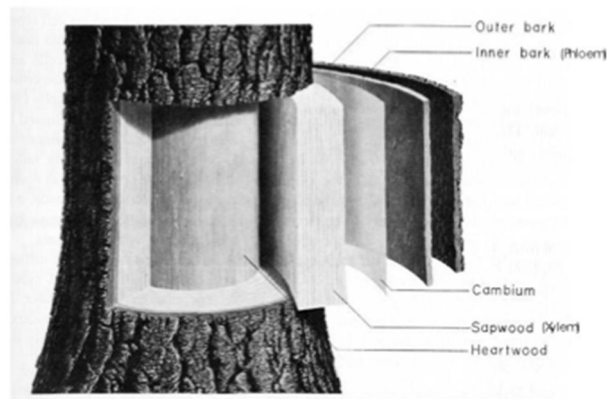
Kuva 3. Männyn vesipotentiaali ja sen yhteys joihinkin puun fysiologiaan vaikuttaviin tekijöihin vuorokauden aikana eri aikoihin kasvukaudesta (Irvine ym. 1998). Muuttujat kuvassa ylhäältä alaspäin mentäessä: PAR (photosynthetic active radiation)-säteily, VPD (oikealla akselilla), lehden vesipotentiaali (Ψ_L), transpiraatio (Sap flux) ja latvuksen ilmarakojen konduktanssi (g_L).

3.2.3 Ksyleemin läpimitan muutokset

Veden kulutus saa rungon sisällä aikaiseksi paineiden muutoksia, jotka ovat rungon ulkopuolella havaittavissa puun läpimitan muutoksina (Perämäki ym. 2001). Mitatut läpimitan muutokset ovat olleet hyvin verrattavissa mitattuihin transpiraation muutoksiin eli ns. "sap flux"- mittauksiin (Sevanto ym. 2002). Läpimitan muutokset johtuvatkin haihdutuksen seurauksena ksyleemiin välittyvistä jännityksen muutoksista, joiden seurauksena puu tulee käyttäneeksi myös aiemmin mainittuja puun sisäisiä vesivarantoja (Perämäki ym. 2005). Tämä voidaan nähdä kesäisenä poutapäivänä selkeästi, kun puun läpimita on aina päivän kuumimpaan aikaan pienimmillään ja palautuu iltaa kohti

suunnilleen edellisen yön tasolle. Transpiraation lisäksi läpimitan muutoksiin vaikuttaa myös maassa saatavilla olevan veden määrä, mikä myös vaihtelee päivittäin (Sevanto ym. 2011). Läpimitan muutosten vaihteluväli vuorokauden aikana on hyvin pieni, männyllä korkeintaan vain noin millin kymmenesosa, mutta ne voidaan havaita selkeästi niitä mittaavilla antureilla (Sevanto ym. 2002).

Männyn läpimitan muutoksista on pitkät mittaussarjat metsän ja ilman ainevirtauksien tutkimiseen erikoistuneella SMEAR2-aseamalla Hyytiälässä. Näistä mittaussarjoista on läpimitassa havaittu säännöllistä vuorokautista ja pidempien ajanjaksojen olosuhteisiin sekä kasvuun mukautuvaa käyttäytymistä. Ksyleemistä saatu data on selkeää ja johdonmukaista. Nilan päällä oleva anturi mukailee ksyleemin läpimittaa ja luonnollisesti sisältää myös puun läpimitan kasvun (Perämäki ym. 2001, Sevanto ym. 2002). Nilan läpimittaa kuvaavaa dataa on mallintamalla pyritty siistimään näistä ylimääräisistä, ksyleemin toiminnasta johtuvista muutoksista, jotta se kuvaisi nilan sisällä tapahtuvia ilmiöitä (Mencuccini ym. 2013).



Kuva 4. Ksyleemin ja nilan solukot puun rungossa. Nilan (phloem) ja ksyleemin (xylem) välissä on jälsi (cambium) (Kramer ja Kozlowski 1979).

3.3 Nila

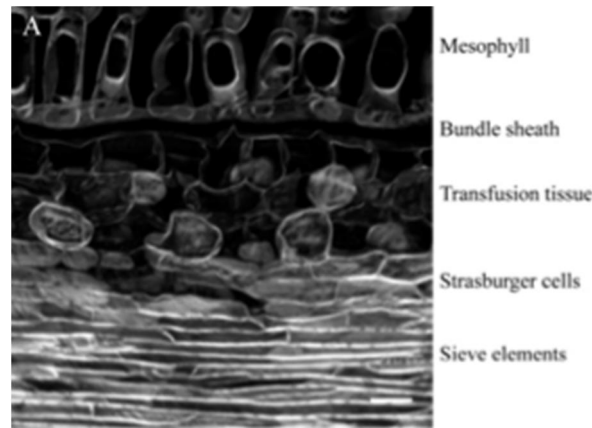
3.3.1 Nilan rakenne ja esinilaväylä

Nilan rakenne vaihtelee kasviryhmittäin, ja sen kuljetukseen erikoistuneet solut poikkeavat muista kasvisoluista. Solut ovat eläviä mutta niiden kehittyessä niistä jää pois joitakin eläville kasvisoluille oleellisia soluelimiä, kuten solun ydin, golgin laite ja ribosomit (Taiz ja Zeiger 2010). Niistä nilan soluista, joissa tuotteiden kuljetus pääasiassa tapahtuu, käytetään kirjallisuudessa termiä "siiviläelementti". Tämä käsite pitää sisällään paljas- ja koppisiemenisten erilaiset siiviläsolutyypit (Taiz ja Zeiger 2010). Koppisiemenisten soluja, jotka ovat hyvin erikoistuneita, kutsutaan siiviläputkiksi. Paljassiemenisten nilan solut ovat vähemmän erikoistuneita, ja niistä käytetään myös tässä tutkimuksessa nimitystä siiviläelementti. Kaikilla tutkituilla paljassiemenisillä on löydetty samanlainen nilan toiminnallinen rakenne, minkä vuoksi eri puulajeilla tehdyillä tutkimuksilla voidaan peilata myös männyn nilan anatomiaa (Liesche ym. 2011).

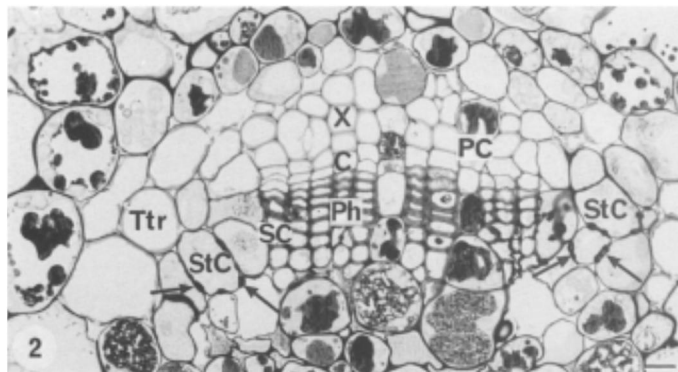
Koppisiemenisillä siiviläelementtien yhteydessä on aina seurasolu, jolla on monien siiviläelementeistä puuttuvien soluelimien lisäksi mm. solun ydin. Seurasolun toiminta ja koko suhteessa siiviläelementtiin vaihtelee nilan sijainnin tai tehtävän mukaan, minkä johdosta näitä nilan toiminnallisia eroavaisuuksia on luokiteltu yhteytystuotteiden keruu-, kuljetus- ja purkunilaksi (van Bel 1996). Edelliset käsitteet on tätä tutkimusta varten vapaasti suomennettu sanoista "collection phloem", "transport phloem" ja "release phloem". Keruunilaa on mm. lehtien pienimmissä suonissa. Kuljetusnilaa taas on suuremmissa lehtisuonissa sekä -ruodissa ja rungon nilassa sekä suuremmissa juurissa. Luovutusnilaksi on luokiteltu nielujen, kuten kasvavien solukkojen, yhteydessä oleva nila. Koppisiemenisten seurasolussa tapahtuu nilan solukoille tärkeitä aineenvaihdunnallisia toimintoja, sillä siiviläputkesta itsestään puuttuu useita tärkeitä soluelimiä (Taiz ja Zeiger 2010). Paljassiemenisillä, eli tässä tutkimuksessa männyllä, siiviläelementin yhteydessä on Strasburger-solu. Tämän solun rakenne ja tehtävät ovat samankaltaiset kuin koppisiemenisten seurasoluilla (Liesche ym. 2011). Toisin kuin seurasolut, Strasburger-solut eivät synny saman soluyksilön kehityksessä siiviläelementin kanssa ja ne ovat vain osittain yhteydessä siiviläelementtiin (Liesche ym. 2011). Siiviläelementtien yhteydessä on myös parenkymisoluja, joissa varastoidaan solujen ylläpitoon käytettävää energiaa (van Bel 2003).

Vaikka nilan rakenne kokonaisuutena tarkasteltuna on monimutkaisempi, osallistuu itse nilakuljetukseen pääasiassa siiviläelementeistä koostuva solukko (Taiz ja Zeiger 2010). Tämä kuljetusnila on eristyksissä ympäröivistä soluista niin, ettei passiivista kuljetettavien tuotteiden siirtymistä ympäröiviin soluihin helposti tapahdu. Kuljetuksen aikana ns. yhdisteiden vuotamista saattaa kuitenkin tapahtua ympäröiviin soluihin tai sieltä siiviläelementteihin. Niinpä nilanesteen koostumus voi muuttua jonkin verran kuljetuksen aikana (Minchin 2007). Siiviläelementit ovat paljassiemenisillä yhteydessä toisiinsa solujen välissä olevien huokosten välityksellä. Kuljetettavat tuotteet pääsevät siis helposti kulkemaan niiden välillä (Taiz ja Zeiger 2010).

Männyn neulasessa keruunila ja ksyleemi ovat eristettynä lehden sisätilasta eli mesofyllistä transfuusio- ja jännetuppisolukolla (Liesche ym. 2011). Pienimmissä lehtisuonissa on solukalvojen välille muodostuneita kanavia, joiden runsauden perusteella usein luokitellaan ns. symplastiset ja apoplastiset nilan lastaajat (Liesche ja Schulz 2012). Puulajeilla on usein runsaasti näitä solukalvojen välisiä kanavia, ja ne yleensä luokitellaankin symplastisiksi lastaajiksi. Apoplastisten ja symplastisten lastaustapojen toiminnasta kerrotaan tarkemmin seuraavassa osiossa. Männyllä keruunilan ympärillä ns. esinilaväylällä, eli väylällä lehden mesofyllistä nilaan, on ainakin seitsemän solujen välistä pintaa, joita rajaa solukalvo (Liesche ja Schulz 2012). Tämän väylän solut ovat hyvin yhteydessä toisiinsa aina mesofyllistä nilaan asti, minkä vuoksi yhteytystuotteet pääsevät, ainakin teoriassa, kulkemaan passiivisesti nilaan. Purkunilassa kuljetettavien tuotteiden nilasta purkamisen arvellaan toimivan samalla tavalla passiivisesti. Passiivinen yhdisteiden siirtyminen ei vaadi soluilta energiaa vaan saa voimansa pitoisuuserosta. Tässä tekstissä aiemmin esille tulleella käsitteellä "nilan lastaus" tarkoitetaan kuljetettavien tuotteiden siirtymistä siiviläelementteihin. Nilan lastamisesta kerrotaan enemmän luvussa "Nilan kuljetus".



Kuva 5. "Esinilaväylä" männyn neulasessa pitkittäisestä leikkauksesta kuvattuna (Liesche ja Schulz 2012). Sana "mesophyll" tarkoittaa mesofyllisoluja, "bundle sheath" jännetuppea, "transfusion tissue" transfuusiosolukkoa, "Strasburger cells" Strasburger-soluja ja "sieve element" siiviläelementtiä.



Kuva 6. Poikittain leikattu putkilojänne paljassiemenisellä kiinanpunapuulla (*Metasequoia glyptostroboides*). Kuvassa näkyy jälsisolukko (C) ksyleemin (X) ja nilan (Ph) välissä sekä nilan siiviläsoluja (SC), Strasburger-solu (StC) ja transfuusio-trakeideja (Ttr). Nuolet osoittavat Strasburger-solujen soluseiniin (Glockmann ja Kollmann 1996).

3.3.2 Nilan kuljetus – lähde ja nielu sekä apoplastiset ja symplastiset nilan lastaajat

Nilan kuljetus on viime vuosina ollut aktiivisen tutkimuksen kohde. Sen toiminnasta on paljon oletuksia, joista puuttuu kuitenkin kvantitatiivinen tieto (Knoblauch ja Peters 2010). Nilakuljetuksen periaatteena pidetään Ernst Münchin (1930) kuuluisaksi tekemää ajatusta paine-erosta. Ilmeisesti ajatus painegradientista nilakuljetuksessa oli hautunut tutkijoiden keskuudessa jo ennen Münchia, mutta hän onnistui muotoilemaan asian yleisesti ymmärrettäväksi (Knoblauch ja Peters 2010). Münchin mallia ei tänäkään päivänä ole vedenpitävästi onnistuttu kasveilla kokeellisesti todistamaan vaikka sille on saatu vahvasti kuitenkin tukea (Knoblauch ja Peters 2010, van Bel 2003). Tämä ns. Münchin hypoteesin mukaan nilan vesipotentiaalin lasku vetää ksyleemistä vettä nilaan. Veden kertyminen nilaan nostaa hydrostaattista painetta sillä kohtaa, mikä saa kuljetettavan massan siirtymään kohti pienempää painetta. Tässä yhteydessä käytetään usein käsitteitä lähde ja nielu. Lähteellä tarkoitetaan yleensä yhteyttäviä lehtiä tai puun varastoja. Nielu on kuljetuksen määränpää, missä sokereita kulutetaan mm. kasvuun, hengitykseen tai

varastointiin. Hyvin yksinkertaistetussa systeemissä nilaan lastataan lähteessä kuljetettavia tuotteita, jotka määränpäässä siirtyvät nilasta pois, nieluun. Tuotteiden, useimmiten sakkaroosin, lastaaminen nilaan nostaa osmoottista vahvuutta, mikä taas laskee nilan vesipotentiaalia. Kun nilan vesipotentiaali laskee alle ksyleemin vesipotentiaalin, alkaa vettä siirtyä nilaan. Nilan purkaminen nieluun on lastaamiseen verraten päinvastainen reaktio. Tuotteiden siirtyessä nieluun nilan osmoottinen vahvuus laskee ja siis vesipotentiaali nousee, jolloin vesi lopulta siirtyy kohti pienempää vesipotentiaalia, kohti ksyleemiä.

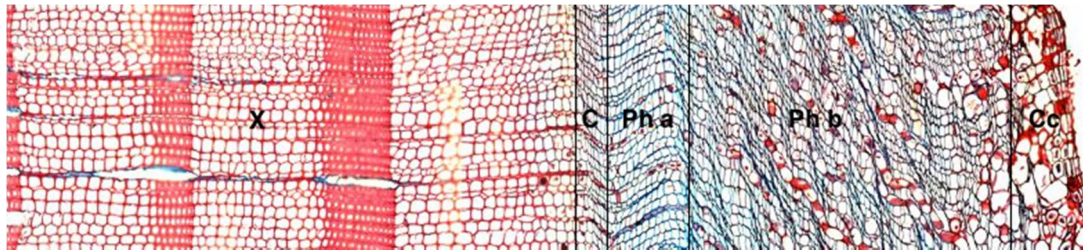
Vielä on epävarmuutta etenkin siitä, mikä saa kuljetuksen käynnistymään lähteestä nieluun. Kuljetuksen on ajateltu käynnistyvän aktiivista, passiivista tai molempia hyödyntävästä nilan lastaamisesta. Aktiiviseen lastaukseen tarvitaan energiaa, sillä siinä yhdisteiden siirtymiseen tarvitaan energiaa vieviä mekanismeja. Passiivinen lastaus sen sijaan ei sitä vaadi, sillä se saa energiansa pitoisuuserosta (Liesche ja Schulz 2012). Aktiivisesti nilaa lastaavat luokitellaan usein vielä apoplastisiksi nilan lastaajiksi, joita ovat monet koppisiemeniset kasvit. Apoplastisessa nilan lastauksessa tuotteet eivät kulje koko matkaa solusta toiseen solukalvojen kautta kun taas symplastisessa nilan lastauksessa tuotteet kulkevat nilaan soluja pitkin (Taiz ja Zeiger 2010). Symplastisessa nilan lastauksessa sokereiden kulku mesofyllistä nilaan tapahtuu suurelta osin passiivisesti eli diffuusiolla (Davidson ym. 2011). Sen arvellaan olevan ainakin joidenkin paljassiemenisten tapa lastata nilaa (Liesche ja Schulz 2012). Aktiivisesti nilaa lastaavat ovatkin usein ruohovartisia kasveja ja monet puulajit passiivisia nilan lastaajia (Turgeon 2010). Fu ym. (2011) ovat todenneet vielä, että passiivisesti lastaavilla puulajeilla on matala hydraulinen johtavuus, eli niillä muodostuu vedenkuljetuksen yhteydessä enemmän resistanssia, sekä lehdissä korkea osmoottinen vahvuus ja sokereiden konsentraatio. Aktiivisesti lastaavilla olisi heidän mukaan päinvastaisesti korkea hydraulinen johtavuus ja lehdissä matala osmoottinen vahvuus. Puita ja ruohovartisia kasveja vertaavassa tutkimuksessa puiden lehdissä oli suhteessa nilakuljetukseen jopa 50-kertainen määrä sakkaroosia kuin ruohovartisten lehdissä (Turgeon 2010). Mänty (*P. Sylvestris*) näyttäisi olevan symplastinen nilan lastaaja, sillä sen neulasten osmoottinen vahvuus on huomattavan korkea (Liesche ja Schulz 2012). Männyllä passiiviseen lastaukseen tarvittava pitoisuusero näyttäisi ainakin lehdessä muodostuvan sakkaroosin pitoisuuserosta lehden mesofyllin ja nilan välille (Turgeon 2010, Liesche ja Schulz 2012). Tässä tutkimuksessa on tehty mittauksia myös pilaritervalepällä (*Alnus glutinosa* F. *pyramidalis*), joka vuorostaan on Fu ym. (2011) mukaan apoplastinen nilan lastaaja.

3.3.3 Nilanesteen koostumus

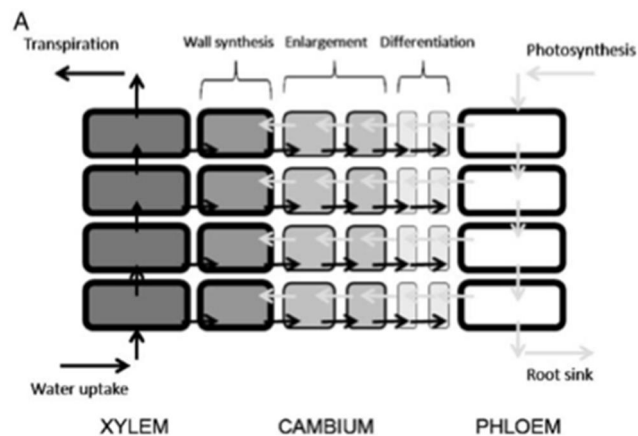
Münchin hypoteesin mukaan koko nilan sisältöä kuljettavan paine-eron syntymiseen vaikuttaa pääasiallisesti sakkaroosin kertyminen nilaan (Lalonde ym. 2004). Myös kalium saattaa olla tärkeä tekijä osmoottisen vahvuuden muutoksissa (Vreugdenhil 1985). Sakkaroosi soveltuu kuljetettavaksi sokeriksi, sillä se ei reagoi muiden yhdisteiden kanssa herkästi vaan liukenee helposti veteen (Taiz ja Zeiger 2010). Nilaneste sisältääkin pääasiassa sokeriyhdisteitä. Sokereiden ja sokerialkoholien lisäksi siinä on mm. hormoneja, aminohappoja, orgaanisia happoja, ioneja sekä lukuisia muita yhdisteitä (Turgeon 2010). Vaikka jotkut puulajit kuljettavat myös sokerialkoholeja, näyttäisi männyllä nilaneste

kuitenkin koostuvan pitkälti sakkaroosista (Devaux ym. 2009, Liesche ym. 2011). Näin näyttäisi olevan myös tervalepällä, mikäli se luokitellaan nilan lastaustavan mukaan lumikellopuun (*Halesia tetraptera*) kanssa samaan luokkaan, kuten Fu ym. (2011) ovat tehneet. Lumikellopuulla nilassa kuljetettavat sokeryhdisteet koostuivat käytännössä kokonaan sakkaroosista ("Osmoottinen vahvuus männyn neulasissa ja nilassa" kuva 10).

3.4 Nilan kuljetusnopeus ja ksyleemi



Kuva 7. Männyn (*P. sylvestris*) nila-, jälsi- ja ksyleemisolukkoa mikroskooppisesti kuvattuna poikittain leikatusta rungosta. Ksyleemi (X) kuvassa vasemmalla, nila (Ph) oikealla ja jälsi (C) niiden välissä pystyjanoilla rajattuna sekä korkkijälsisolukkoa äärimmäisenä oikealla (Cc). Kuvassa kirjoittajan tekemä korkkijälsisolukon raja on osunut hieman vasemmalle, sillä korkkijälsisolukko sijaitsee rajatun alueen oikealla laidalla. Jälsisolukko on kuvan näytteessä hieman litistynyt ja viistosuuntaisesti kulkeva kuten myös nilasolukkokin. Kuvassa erottuu pystyjanoilla rajattuna myös nilan kuljettavaa solukkoa (Ph a) laajentuneita tylppysoluja sisältävää ei-kuljettavaa solukkoa (Ph b). Kuvaa on muokattu alkuperäisestä (kuva: Tuula Jyske, METLA).



Kuva 8. Veden ja sokereiden kulku ksyleemissä (xylem) ja nilassa (phloem) eli mallikuva kuvan 7 solukkojen toiminnasta. Mustat nuolet kuvaavat veden kulkua solukoissa. Harmaat nuolet kuvaavat sokereiden kulkua. Vesi kulkee myös nilasta jälsisolukon (cambium) läpi ksyleemiin. Teorian mukaan vesi alkaa siirtyä ksyleemistä nilaan sen vesipotentiaalin ollessa ksyleemin vesipotentiaalia alhaisempi, jolloin nilaan muodostuu paine-ero ja sokereit alkavat siellä liikkua kohti pienempää painetta (kuva: Hölttä ym. 2010).

Sekä ksyleemin että nilan kuljetus perustuvat siis painegradienttiin ja nämä molemmat kuljetussysteemit ovat yhteydessä toisiinsa siten, että vesi pääsee kulkemaan niiden välillä. Niiden välissä on ainakin jälsikerros (kuvat 7 ja 8) ja kenties myös joitakin solukalvoja (Sevanto ym. 2011). Näiden solukkojen läpi, aina nilasta sydänpuuhun saakka, kulkee myös ydinsäteitä, joita pitkin liikkuu vettä puun sisemmistä osista nilaan ja yhdisteitä nilasta puun

sisempiin osiin (Fagerstedt ym. 1996). Nilassa kuljetettavan massan liikkumisen ajatellaan muodostuvan nilan ja ksyleemin vesipotentialien tasapainottelusta. Nilan vesipotentiali mukautuu nopeasti ksyleemin vesipotentialiin muutoksiin (Hölttä ym. 2006). Ksyleemin vesipotentialista puhuttaessa tarkoitetaan käytännössä ksyleemin paineen eli jännityksen muutoksia, sillä osmoottinen vahvuus ksyleemissä kulkevassa vedessä on matala ja se vaihtelee vain vähän (Taiz ja Zeiger 2010).

Yksinkertaisuudessaan nilan kuljetusnopeus voidaan ilmaista yhtälöllä, missä J kuvaa nilakuljetuksen nopeutta, k konduktanssia, mikä on resistanssin käänteisluku, ja ΔP paine-eroa (Silk ja Wagner 1980, Sevanto ym. 2011).

$$J = k * \Delta P \quad (\text{yhtälö 3})$$

Hölttä ym. (2009) mukaan osmoottinen vahvuus nilassa on oltava suurempi ksyleemin jännitystä ja kuljetettavan liuoksen viskositeetin aiheuttamaa resistanssia. Heidän mukaan viskositeetti on osmoottisen vahvuuden funktio ainakin silloin, kun nilassa kuljetetaan sakkaroosia. Voimakkaan haihdutuksen aikaan ksyleemi vetää vettä nilasta, mikä laskee nilan vesipotentialia. Tämä myös saattaa nostaa nilanesteen viskositeettia ja heikentää siten nilakuljetusta, ainakin hetkellisesti (Hölttä ym. 2006). Tässä tapauksessa viskositeetin nousu tarkoittaisi sokेरipitoisuuden nousua nesteessä, minkä seurauksena neste olisi tahmeampaa ja heikommin liikkuvaa. Sokereita kerääntyisi silloin nilan lastauskohtaan ja gradientti nilan ja lehden mesofyllin välillä heikkenisi. Tällöin yhteytystuotteet siirtyvät lehdessä aiempaa hitaammin pois uusien tieltä ja myös uusien sokereiden tuotanto hidastuu. Lopputuloksena voi olla lehden sisä- ja ulkoilman välisen hiilidioksidigradientin pieneneminen, jolloin ilmarakoja ei tarvitsisi pitää auki (Hölttä ym. 2006). Etenkin männyn kohdalla nilan toiminta saattaa vaikuttaa edellä kuvatulla tavalla myös hetkelliseen yhteytystuotokseen ja ilmarakojen aukioloasteeseen männyn passiivisen sokereiden lastaustavan johdosta. Sokereiden kertyminen nilaan sekä lähteen soluihin auttaa samalla eläviä soluja nilassa ja lehdissä pitämään turgor-painetta yllä kovemman haihdutuksen aikaan (Peuke ym. 2001, Fu ym. 2011). Hölttä ym. (2006) mukaan nilakuljetus rajoittuu kohtalaisen haihdutuksen nousun myötä kuitenkin vain vähän.

Nilanesteen vesipotentiali näyttäisi ainakin koppisiemenisillä olevan nilaa ympäröivän apoplastin kanssa samaa luokkaa, sillä näiden siiviläputket erottaa apoplastista, eli solujen välisestä tilasta, vain solukalvot (Thompson ja Holbrook 2004). Ksyleemin vesipotentialin muutosten kanssa nila hakeutuu, tai oikeastaan, päättyy tasapainoon (Hölttä ym. 2009). Esimerkiksi, kovemman haihdutuksen aikaan nilakuljetukseen tarvittavan veden saanti ksyleemistä on vaikeampaa ja sokereiden kuljetus hidastuu, jolloin lähteiden läheisyydessä kertyy sokereita nilaan ja osmoottinen vahvuus niillä kohdin nousee. Myös veden määrän väheneminen nilassa nostaa osmoottista vahvuutta (de Schepper ja Steppe 2010). Osmoottisen vahvuuden noustessa nilan vesipotentiali laskee ja alkaa lähestyä ksyleemin vesipotentialia. Vastaavasti vähäisemmän haihdutuksen aikaan veden saatavuus ksyleemistä on parempi ja nilaan ei ehdi kerääntyä sokereita kun vesipotentiali siellä jo laskee alle ksyleemin vesipotentialiin. Tällöin myös osmoottinen vahvuus nilassa pysyy alhaisempana. Nielun kohdalla vesipotentiali alkaa nilassa taas nousta, kun kuljetettavia

tuotteita käytetään aineenvaihdunnassa tai niitä muutetaan osmoottisesti vähemmän aktiiviseen muotoon mm. sakkaroosista tärkkelykseksi (Minchin 2007).

Peuke ym. (2001) mukaan nilakuljetus ilmeisesti pysyy tasaisena vuorokauden aikana. Samassa tutkimuksessa sakkaroosin määrä pieneni risiinillä (*Ricinus communis*) nilassa yöaikaan, ja todennäköisesti tuolloin myös osmoottinen vahvuus pieneni. Devaux ym. (2009) rannikkomännystä (*Pinus pinaster*) kerätyissä nilanäytteissä ei merkittäviä muutoksia sokereiden yksittäis- tai kokonaismäärissä havaittu kuin kuukausittaisella tasolla. Windt ym. (2006) arvioivat tasaisen kuljetuksen johtuvan nilanesteen säätelystä. Kuljetus nilassa voi olla järkevää pitää tasaisena läpi vuorokauden, jotta elävien solujen turgor-paine pysyisi yllä (Peuke ym. 2001). Symplastisilla nilan lastaajilla myös lehtien sokeripitoisuuksien tulisi olla riittävän korkeita, jotta gradientti lehden ja nilan välillä pysyisi tehokkaasti yllä ksyleemin jännityksen muutoksista huolimatta (Hölttä ym. 2009).

Nilan kuljetusnopeuksista on saatu mittaustuloksia ns. hiilen isotooppi-menetelmällä. Brandes ym. (2007) saivat tuolla menetelmällä männylle (*P. sylvestris*) nilan kuljetusnopeudeksi noin 0,5 m/h. Rannikkomännyn (*P. pinaster*) kuljetusnopeus nilassa oli 8 – 10-metrisillä puilla 0,09 – 0,21 m/h sen ollessa keskimäärin 0,15 m/h (Dannoura ym. 2011).

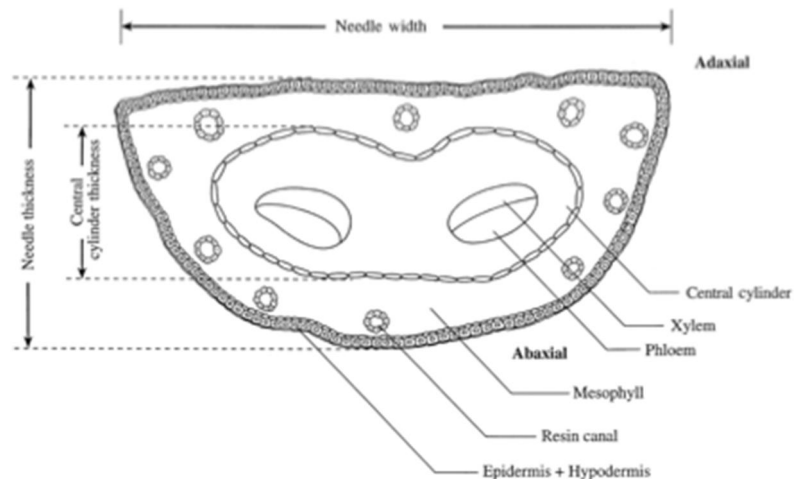
3.5 Münchin vastavirtaus ja nielun vuodenaikainen vaihtelu

Muiden tekijöiden ollessa tasapainossa, pitäisi transpiraation muutosten siis heijastua ksyleemistä nilaan (Hölttä ym. 2009). Yhteytystuotteet näyttäisivät kulkevan nilassa myös, etenkin yöaikaan, ns. Münchin vastavirtauksella (*vapaa suomennos käsitteestä "Münch's counterflow"*) (esim. Windt ym. 2006). Tätä virtausta ksyleemin ja nilan välillä ajaa osmoottisen vahvuuden erot nilassa. Yhteytystuotteita voidaan siis kuljettaa lähteestä nieluun vaikka transpiraatiota ei tapahtuisikaan. Transpiraatio enemmänkin vaikeuttaa nilakuljetusta. Nielujen voimakkuudet vaihtelevat vuoden mittaan, ja sokereiden kuljetuksen suunta määräytyy nielun voimakkuuden perusteella (Kozlowski 1992, Hansen ja Beck 1994). Keväällä ja alkukesästä hiiltä kuljetetaan mm. verson ja neulasten kasvuun ja keskikesällä runkoon (Hansen ja Beck 1994). Sevanto ym. (2003) mukaan rungon kasvu loppui 20. – 25. elokuuta vuosina 2001 ja 2002. Tässä tutkimuksessa mitatut männyt ovat samoja puita kuin Sevannon ym. tutkimuksessa tuolloin, ja mittaussarja näillä puilla on tehty 29.8. – 2.9. Rungon kasvu tuolloin näyttäisi siis olevan loppunut, jolloin hiiltä kuljetetaan vähenevissä määrin runkoon ja enenevissä määrin juuriin (Hansen ja Beck 1994).

3.6 Osmoottinen vahvuus männyn neulasissa ja nilassa

Lehden turgor-painetta pidetään yllä välttämällä veden menetystä transpiraation yhteydessä, vedenkuljetusväylän korkealla hydraulisella konduktanssilla ja korkeilla yhdisteiden pitoisuuksilla lehdessä (Fu ym. 2011). Veden karkaamista puu voi säädellä ilmarakojensa avulla mutta hydraulinen konduktanssi määräytyy pitkälti puulajin ominaisuuksien perusteella. Korkeilla yhdisteiden pitoisuuksilla saadaan lehden vesipotentialiaalia laskettua vastaamaan ksyleemin alhaisempia vesipotentialiaaleja (Fu ym.

2011). Niinpä, korkeammat pitoisuudet lehdessä auttavat kestämaan myös korkeampia jännityksiä, ja puu voi siis sopeutua transpiraation muutoksiin myös lehden solujen yhdisteiden pitoisuuksia muuttamalla. Solunsisäiset osmoottiset vahvuudet vaihtelevat suuresti lajien kesken, myös olosuhteet vaikuttavat niihin. Useiden tutkimusten mukaan solunsisäisten yhdisteiden koostumus ja suhteet ovat kuitenkin samanlaisia nilan lastaustavasta huolimatta (Voitsekhovskaja ym. 2006). Passiivisilla nilan lastaajilla on Fu ym. (2011) mukaan matala hydraulinen konduktanssi eli niiden lehtiin muodostuu haihdutuksen yhteydessä herkemmin suuria jännityksiä. Tämän vuoksi niiden lehtien yhdisteiden pitoisuuksien on myös oltava korkeampia.

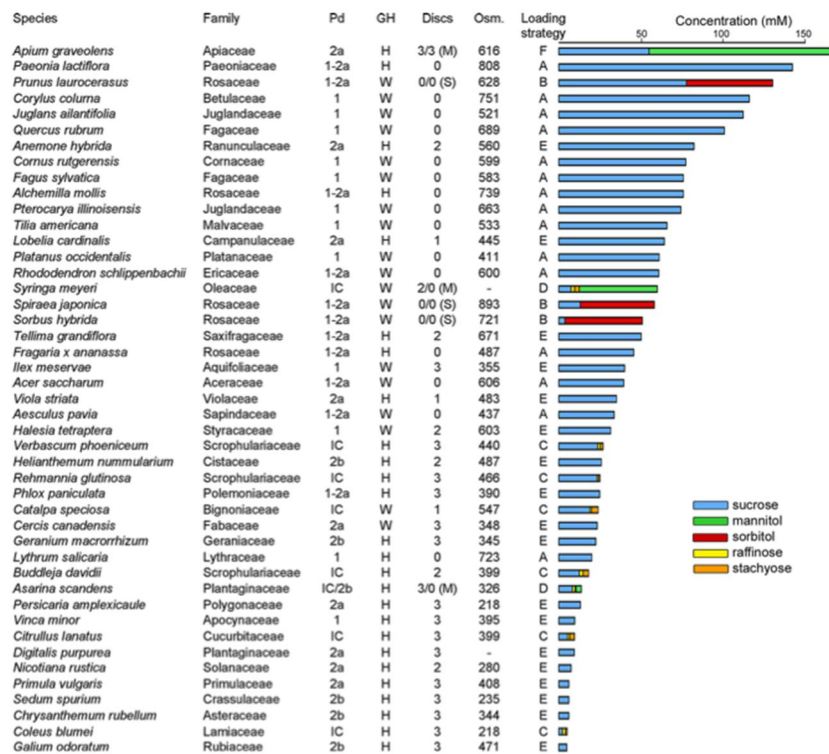


Kuva 9. Männyn neulasen poikkileikkaus. Kuvassa näkyvät ksyleemi (xylem), nila (phloem), pihkatiehyet (resin canal), epidermi sekä mesofylli (Lin ym. 2001).

Liesche ja Schulz (2012) mukaan mänty teoriassa näyttäisi olevan passiivinen nilan lastaaja, jolla on neulasissa korkea yhdisteiden pitoisuus nilan lastaamiseen tarvittavan gradientin pitämiseksi yllä. Kasvihuoneolosuhteissa kasvaneiden männyn taimien neulasnesteen osmoottinen vahvuus oli keskimäärin 0,8 mol/kg (Liesche ja Schulz 2012). Kun tätä arvoa verrataan kuvassa 10 näkyviin Rennie ja Turgeon (2009) esittelemiä mittauksiin, jossa osmoottisen vahvuuden arvot ovat millimoolissa kilogrammaa kohti, voidaan huomata sen tosiaan olevan korkea pitoisuuden arvo. Nilassa kuljetettava sokeri on männyllä sakkaroosia, minkä vuoksi juuri sakkaroosin pitoisuuden tulisi neulasessa olla riittävän suuri. Teorian mukaan pitoisuuseron tulisi kuitenkin muodostua ennen kaikkea neulasen mesofyllin ja nilan välille, jotta passiivinen kuljetus nilaan toimisi (Turgeon 2010, Liesche ja Schulz 2012). Koska sakkaroosia kertyy lehdessä yleensä mesofyllisolujen sytosoliin, eli solun sisällä vapaasti vellovaan nesteeseen, olisi passiivisilla lastaajilla muiden solun osien, kuten vakuolin, osmoottinen vahvuus tasapainotettava muilla yhdisteillä. Neulasista kerättävän nesteen osmoottiseen vahvuuteen vaikuttanevat siis merkittävästi myös muut yhdisteet kuin sakkaroosi. Solujen pitoisuudet saattavat kuitenkin siis heijastaa sytosolin sakkaroosipitoisuuksia. Fu ym. (2011) mukaan lehden osmoottisesta vahvuudesta suuri osa saattaisi johtua ns. polaarista yhdisteistä, joista tarkempaa tietoa ei tähän tutkimukseen ole tarjolla. Brandes ym. (2006) taas havaitsivat tärkkelyksen, eli varastointiin käytettävän

sokerin, pitoisuuksissa vuorokautista rytmiä kuluvan vuoden neulasissa 38-vuotiailla männyillä. Aamulla tärkkelyksen määrä lehdissä oli pienin ja illalla suurin. Yöaikana se muutettiin lehdistä pois kuljetettavaksi sakkaroosiksi, jolloin lehden tärkkelyspitoisuus luonnollisesti laski. Männyn neulasten osmoottiseen vahvuuteen vaikuttavat edellä mainittujen lisäksi mm. solujen sisällä olevat monosakkaridit, kuten glukoosi, sekä oligosakkaridit eli sakkaroosia suuremmat sokeryhdisteet. Hansen ja Beck (1994) mukaan männyn neulasten sisältämistä hiilhydraateista suurin osuus on monosakkarideja. Niiden osuus kuitenkin vaihtelee vuoden mittaan.

Mikäli männyn neulasessa nilaan lastaaminen tapahtuu pitoisuusgradientin avulla, pitäisi osmoottisen vahvuuden olla neulasen mesofyllissä suuri ja nilassa mesofylliin nähden pieni (Fu ym. 2011). Männyn nilan osmoottisista vahvuuksista ei oikeastaan ole vertailuaineistoa tarjolla. Pajulla (*Salix babylonica* L.), joka myös käyttää passiivista lastaustapaa, nilan osmoottinen vahvuus oli 0,235 mol/kg, mikä on myös alhaisimpia mitattuja nilan osmoottisia vahvuuksia (Turgeon ja Medville 1998, Fu ym. 2011).



Kuva 10. Lehden osmoottinen vahvuus (Osm.) ja eri sokereiden konsentraatiot. Osmoottisen vahvuuden arvot ovat mMol/kg. Taulukossa kasvilajit on luokiteltu myös solulimasäikeiden määrän (Pd) mukaan niin, että "1" tarkoittaa runsasta määrää, "1-2a" kohtalaista ja "2" alhaista määrää. "1C" tarkoittaa siiviläelementin yhteydessä olevaa seurasolutyyppiä. "GH" tarkoittaa kasvutapaa, joka voi olla joko ruohomainen "H" tai puumainen "W". Nilan lastaustavat ("loading strategy") näkyvät kuvassa niin, että "A" ja "B" viittaavat passiiviseen lastaukseen, "C" ja "D" viittaavat ns. "polymer trapping"-lastaustapaan ja "E" ja "F" viittaavat aktiiviseen lastaustapaan. "Polymer trapping" on joillakin kasvilajeilla esiintyvä lastaustapa, joka ei liity tämän tutkimuksen kasvilajeihin, ja josta lisätietoja saa esim. julkaisusta Rennie ja Turgeon (2009). Tapauksissa "B", "D" ja "F" nilassa kuljetettavina tuotteina on myös sokerialkoholeja (esim. "mannitol" ja "sorbitol"). Muissa tapauksissa nilassa kuljetettava tuote on käytännössä sakkaroosi (sucrose). Kuvan kaikkia symboleja ei tässä yhteydessä ole selitetty, koska ne eivät ole oleellisia tämän tutkimuksen kannalta. Lisätietoja symboleista on löydettävissä viitteestä (Rennie ja Turgeon 2009).

3.7 Lehden vesipotentialin mittaaminen

Lehden vesipotentialia on laajalti mitattu ns. painekammio-tekniikalla (Dixon 1914, Scholander ym. 1965). Menetelmässä kasvin osa asetetaan ilmatiiviisti painekammioon niin, että osa siitä jää kammion ulkopuolelle. Painetta lisätään kammioon niin kauan, että vettä alkaa ilmestyä kammion ulkopuolella olevan osan leikkauspintaan. Ulkopuolella olevaan kasvinosaan tehdään tuore leikkauspinta, jotta veden työntymiselle ei olisi mitään ylimääräistä estettä. Kammiossa olevan paineen suuruus veden ilmestymisen hetkellä kuvaa kasvinosan sisällä olevaa negatiivista painetta. Kun lehti irrotetaan puusta, karkaa vesi sen ksyleemistä ympäröiviin soluihin. Mikäli mittaukseen on kerätty haihduttava lehti, kuvaa saatava vesipotentiali lehden kokonaispotentialia (Turner 1988). Jos lehden annetaan totuttautua ilmatiiviissä pussissa ennen irrottamista puusta, tai jos lehti ei haihduta, ehtivät ksyleemiä ympäröivät solut totuttautua ksyleemin vesipotentialiin. Tällöin painekammioilla saatava paine kuvaa ksyleemin vesipotentialia (Plant Physiology Online 2010).

3.8 Nilan mittaamenetelmien taustaa

Nilanäytteiden kerääminen on hyvin haastavaa, koska nilan solukko reagoi herkästi vahingoittumiselle ja nilan poistaminen häiritsee kasvin toimintaa (Ehlers ym. 2000). Puhtaimmillaan näytteitä nilan sisällöstä on voitu kerätä nilanestettä ravintona käyttävien kirvojen pistimien avulla sekä vuodattamalla sitä suoraan rungosta. Kirvojen pistimillä kerääminen on kuitenkin vaativaa ja se onnistuu vain laboratorio-olosuhteissa (Yoneymana ym. 1997, Gessler ym. 2004). Ei myös tiedetä, miten paljon menetelmässä hyönteiset muuttavat nilanesteen koostumusta. Ainakin aminohappokoostumuksen tiedetään muuttuneen kirvojen pistimillä kerätyssä nesteessä (Turgeon ja Wolf 2009). Vuodatustekniikan käyttäminen taas rajoittuu vain tiettyihin puulajeihin, joilla sattuu myös olemaan sileä kaarna (Gessler ym. 2004). Nilan sisällön tutkimiseen on usein sovellettu EDTA-uutostekniikkaa, jossa nilapaloja liuotetaan tietyn vahvuudessa useita tunteja (King ja Zeevart 1974, Rennenberg ym. 1996). Tässä uutostekniikassa käytettävän aineen ajatellaan estävän nilasolujen huokosten tukkeutumista, minkä pitäisi edistää yhdisteiden liukenemista näytepaloista. Nilanäytteiden liuottamiseen on käytetty myös tislattua vettä (Gessler ym. 2004, Devaux ym. 2009). Gessler ym. (2004) pyökillä tekemän tutkimuksen mukaan EDTA-uutostekniikka on vertailukelpoinen vuodatustekniikalla saatujen näytteiden kanssa. Tislattulla vedellä liuottamalla sokereiden kokonaismäärä oli tutkimuksen mukaan kuitenkin huomattavasti alhaisempi. Devaux ym. (2009) tekemän vertailun mukaan ei ollut väliä, käytettiinkö rannikkomännällä (*P. pinaster*) tislattua vettä vai EDTA-liuosta. Monosakkaridien löytymistä nilanesteestä on pidetty merkinä epäonnistuneesta nilanäytteestä (Turgeon ja Wolf 2009). Amiard ym. (2004) mukaan monosakkarideja on ollut EDTA-näytteessä merkittävästi useammin kuin kirvoista saadussa näytteessä.

Uutosmenetelmien voidaan sanoa erottelevan nilan sisällöstä näytettä osmoosin avulla. Devaux ym. (2009) vertailivat uutosmenetelmiin myös mekaanista näytteen keräämistä, jossa neste eroteltiin jäädyttämättömistä nilapaloista sentrifugilla. Tässä vertailussa sentrifugi-menetelmällä saatiin systemaattisesti eroteltua vain 50 prosenttia

uutosmenetelmällä saaduista yhdistemääristä. Sokereiden suhteet näiden menetelmien välillä olivat kuitenkin kohtalaisen samankaltaisia (taulukko 1).

Taulukko 1. Nilanäytteen keräysmenetelmien eroavaisuudet rannikkomännyn (P. pinaster) sokeripitoisuuksissa (Devaux ym. 2009). Luvut ovat kuiva-ainepitoisuuksien keskiarvoja, joiden perässä olevat luvut (+/-) kuvaavat keskivirhettä. Anthrone-reaktio on menetelmä määrittää karbohydraattien määrää, jota tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan käsitellä. Kuvassa "centrifugation" tarkoittaa sentrifugi-menetelmää ja "exudation" tarkoittaa uutosmenetelmää, jossa uutteenä on käytetty tislattua vettä.

	Phloem sap compound contents (mg g ⁻¹ DW)						
	Sucrose	Glucose	Fructose	Pinitol	Sugars + Pinitol	Anthrone	Anthrone - Sugars
Centrifugation	35.9 ± 2	6.4 ± 0.4	7.3 ± 0.4	3.5 ± 0.2	53.1 ± 2.7	48.5 ± 1.8	9.5 ± 2.6
Exudation	57.7 ± 3.6	12.2 ± 0.6	16.1 ± 0.6	6.0 ± 0.4	92.0 ± 4.6	102.1 ± 3.3	35.2 ± 6.3
Method	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001
Time	ns	ns	ns	ns	ns	0.001	0.001
Method * time	0.01	ns	0.05	ns	0.01	0.001	0.01

3.9 Jäädymisen vaikutus solujen sisältöön ja solukalvoihin

Tässä tutkimuksessa jäädytetään näytteet, joista mitataan osmoottista vahvuutta. Jäätymisen aiheuttamat muutokset ja vauriot soluissa eivät niinkään johdu alhaisesta lämpötilasta vaan ennemminkin solujen kuivumisesta (Wolfe ja Bryant 1992). Jään kemiallinen potentiaali laskee lämpötilan myötä ja sitä vastaava osmoottinen vahvuus voidaan suurin piirtein laskea yksinkertaisella yhtälöllä, jossa ψ_s tarkoittaa osmoottista vahvuutta ja T lämpötilaa (Kelvin) (yhtälö 4) (Steponkus 1984).

$$\psi_s = (273-T) / 1,86 \quad (\text{yhtälö 4})$$

Jäätymisen alkaa solujen ulkopuolelta ja se laskevan kemiallisen potentiaalinsa vuoksi vetää vettä solujen sisältä, jolloin jäätyvää vettä kertyy entisestään solujen ulkopuolelle (Steponkus 1984). Solukalvo suojaaa solun sisäisiä osia jäätymiseltä jäähtymisen asteesta riippuen. Mikäli lämpötila laskee tasaisesti ja hitaasti, laskee myös solunsisäinen osmoottinen vahvuus edellä mainitun kaavan mukaisesti. Tällöin myös solunsisäisten osien jäätymispiste on alhaisempi. Vesi pitää solukalvoja yhtenäisenä ja etenevä jäätymisen sekä samalla laskeva solun vesipitoisuus johtaa lopulta solukalvon rakenteen vahingoittumiseen (Wolfe ja Bryant 1992). Noin -40 °C-asteessa myös solun sisältö alkaa viimeistään jäätymään, ellei jäädytys tapahdu hallitusti (Rasmussen ja MacKenzie 1972, Fuller 2004). Solunsisäisten osien jäätymisen riippuu vahvasti siitä, miten nopeasti jäähtymisen tapahtuu (Mazur 1963, Steponkus 1984, Fuller 2004). Radikaalin lämpötilan laskun yhteydessä solukalvon ominaisuuksia ei ehkä ehditä sopeuttamaan nopeaan muutokseen (Fuller 2004, Steponkus 1984). Mikäli solunsisäistä jään muodostumista pääsee tapahtumaan, on seurauksena useimmiten solun kuolema (Mazur 1961). Tällaista vahingoittumista seuraavaa solujen kuoliota, nekroosia, ajatellaan seuraavan sytoplasman laajeneminen sekä solukalvon asteittainen hajoaminen ja yhdisteiden vapautuminen ympäristöön (van Breusegem ja Dat 2006). Jo jäätyneen solukon sulaessa on havaittu ionien ja yhdisteiden vuotamista apoplastiin johtuen kenties solukalvon viallisesta toiminnasta (Pearce 2001 ja siinä olevat artikkelit, Ryyppö ym. 1997 ja siinä olevat artikkelit). Nekroosia seuraavia solussa tapahtuvia muutoksia on arvuuteltu tähän päivään asti. Esimerkiksi, Palta ja Li (1980) mukaan ionien vuotaminen solusta johtuisi solukalvon proteiinien vioittumisesta. Edelleen

on kuitenkin epäselvää, mitä solussa nekroosin yhteydessä tarkalleen ottaen tapahtuu (van Doorn ym. 2011).

Ball ym. (2004) jäädyttivät kylmään tottuneita ja siihen tottumattomia eukalyptuksen (*Eucalyptus pauciflora*) lehtiä ja seurasivat lehdissä tapahtuvia muutoksia jäädytyksen aikana ja lehtien sulaessa jäädytyksen jälkeen. Näytteet jäädytettiin lämpötilaa asteittain laskien. Tulosten mukaan vesi oli jäätyksen seurauksena vetäytynyt kylmään tottumattomien lehtien mesofyllisoluista pois ja jää oli muodostunut solujen väliseen tilaan. Ball ym. (2004) arvion mukaan jää etenee solujen välisessä tilassa alentaen kemiallista potentiaalia, jolloin vesi alkaa vetäytyä soluista ja jää kasvattaa kokoaan entisestään. Solut kutistuivat tutkimuksessa jäätyksen seurauksena huomattavasti normaalikokoaa pienemmiksi. Solujen sulaessa monet vioittumiset jäivät pysyviksi. Mesofyllisolujen koko palautui vain osittain ja ne imivät osan soluista vetäytyneestä vedestä takaisin. Nilan ja jälleen solukot suurelta osin kuolivat ja niissä esiintyi myös solunsisäistä jäätymistä. Osa lehden solukoista ei palautunut ollenkaan ja joitakin solunsisäisiä yhdisteitä saattoi päästä näiden kuolleiden solujen ulkopuolellekin. Tosin vahvaa todistusta tälle ei tutkimuksessa saatu. Veden määrä solujen välisessä ja jäätyksen seurauksena muodostuneessa tilassa oli merkittävästi suurempi verrattuna jäätymistä edeltäneeseen tilaan.

Näytteet käyvät tässä tutkimuksessa läpi samankaltaisen jäädytyskäsittelyn kuin Ball ym. (2004) tekemässä tutkimuksessa, sillä jäädytettäviä näytteitä ei ole totutettu kylmään. Tosin jäädytyskäsittely on huomattavasti radikaalimpi, sillä lehti- ja nilanäytteet jäädytetään nestemäisellä tyypellä. Näytteet sulatetaan ennen sentrifugia, josta kerrotaan lisää "Aineisto ja menetelmät"-osiossa. Ball ym. (2004) tutkimuksessa nilan solut, erityisesti sen parenkyymisolut, kokivat siis nekroosiksi kutsutun solukuoleman. Edellä mainittujen taustojen perusteella jäädytetyissä nila- ja lehtinäytteissä kenties olisi odotettavissa kuitenkin suurempia vesipitoisuuksia kuin solukkojen normaalitilassa, sillä solukalvojen ulkopuolelle näyttäisi pääsevän enemmän vettä kuin solunsisäisiä yhdisteitä (Ball ym. 2004). Näytteistä saatavat osmoottiset vahvuudet ovat siten todennäköisesti myös todellisia vahvuuksia alhaisempia.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Tutkimuskohteet

Vesipotentiaalimittauksia tehtiin Helsingissä kesä-elokuussa 2011 ja Hyytiälän SMEAR 2- asemalla Juupajoella elo-syyskuussa samana vuonna. Helsingissä mittaukset tehtiin Helsingin yliopiston perustamalla kaupunkipuiden toimintaa tutkivalla koekadulla, joka sijaitsee Norkkokujalla Viikissä (60° 13' 35,747"; 25° 1' 53,199"). Sinne on vuonna 2002 istutettu pilaritervaleppiä (*Alnus glutinosa* F. *pyramidalis*), joiden toimintaa on seurattu mittalaittein vuodesta 2003 lähtien. Näiden puiden läpimitta mittausten aikaan oli noin 16 cm ja pituus noin 10 m. SMEAR 2- asemalla (61° 50' 50,685"; 24° 17' 41,206"; 179 m merenpinnan yläpuolella) tehdyt mittaukset tehtiin aseman seurannan alaisessa 49-vuotiaassa männikössä (*Pinus sylvestris* L.), jonka valtapituus oli lähes 18 m ja läpimitta rinnankorkeudelta noin 20 cm.

Lehtinäytteet vesipotentiaalimittauksiin kerättiin lepistä noin kahden metrin korkeudelta ja neulasnäytteet männystä noin 17 metrin korkeudelta puuta. Lepän lehdet olivat vaihtelevassa valoympäristössä, viereisten talojen vuoksi pääosin suoralta auringon paisteelta varjossa. Puut sijaitsivat puita hieman korkeampien talojen seinustojen vieressä kadulla, jonka leveys oli noin kymmenen metriä. Männystä kerätyt neulaset sijaitsivat runsaassa valoympäristössä mäntyjen latvassa. Leppien kasvualusta oli kaupunkipuulle tyypillinen, kovien pintarakenteiden rajoittama, käytännössä ruukkumainen kasvualusta. Tutkimusleppien kasvualusta ei myös ollut runsasravinteinen ja maa-aines siinä oli karkeahkoa, suurelta osin hiekkaa (Riikonen ja Nikinmaa 2010). Männyt kasvoivat VT-tyyppisellä kasvupaikalla, jossa metsikön latvus on sulkeutunut.

Helsingin koekadun pilaritervalepät ja SMEAR 2- aseman männikkö valittiin tutkimuksen kohteiksi niistä saatavilla olevan läpimitanmuutosdatan vuoksi, jota on seurattu molemmissa tapauksissa jo useita vuosia. Kokeilevia nilamittauksia tehtiin lepällä ja männyllä Helsingissä. Männyn mittaussarja tehtiin SMEAR 2- aseman männystä elokuussa 28.8 – 2.9.2011 kerätyillä nilapaloilla ja neulasnäytteillä.

4.2 Vesipotentiaalimittaukset

Vesipotentiaalia mitattiin Helsingissä kolme kertaa päivässä, aamulla, puolenpäivän aikaan ja kovimman haihdutuksen aikaan. Kesän aikana vesipotentiaalia mitattiin pari kertaa myös illalla ja yöllä. Aamumittauksissa pyrkimyksenä oli saada vesipotentiaaliarvo ennen haihdutuksen alkamista. Lepällä tehdyissä mittauksissa lähes aina puun haihdutus oli kuitenkin ehtinyt alkaa ennen aamumittausten suorittamista. Männyn neulasten aamumittaukset Hyytiälässä tehtiin aikaisemmin, juuri päivän haihdutuksen alkaessa. Männyllä tehdyt vesipotentiaalimittaukset tehtiin kaksi kertaa päivässä, päivän alhaisimman ja kovimman haihdutuksen aikaan. Alhaisimman ja kovimman haihdutuksen mittauksilla pyrittiin selvittämään vesipotentiaalilin vuorokautisia ääripäitä. Päivän haihdutuksen alkamisen ja kovimman haihdutuksen aika saatiin selville puun läpimitanmuutosdatasta. Haihdutus oli alhaisimmillaan noin klo 7 aamulla ja se oli suurimmillaan noin klo 15.

Helsingin mittauksissa pilaritervalepistä kerättiin painemittauksiin aina kaksi lehteä erillisiin suljettaviin pienikokoisiin minigrip-pusseihin. Kolmas lehti otettiin mukaan niin ikään vastaavaan erilliseen pussiin vesipitoisuusmittausta varten. Myöhemmin otettiin kolmannen lehden mukana myös neljäs lehti lehden osmoottisen vahvuuden selvittämiseksi. Lepistä kerätyt lehdet olivat totuttautuneet pussin sisäiseen kosteuteen useita tunteja ennen irrottamista puusta. Mitattavat lehdet asetettiin pussiin totuttautumaan aina heti edellisen mittauksen aikoihin. Lehdet eivät siis päässeet haihduttamaan tuona noin kolmena tuntina, mikä on ollut ajanjakso näiden mittausten välillä. Aamulla tehty mittauserä oli totuttautunut pussiin edellisen päivän viimeisestä mittauserästä lähtien. Pussit asetettiin lehtien päälle pussin suu mahdollisimman suljettuna. Myös Hyytiälän männystä kerätyt neulasotat kerättiin suljettaviin minigrip-pusseihin, joihin otettiin aina kymmenkunta neulasta painemittaukseen. Neulasotat totuttautuivat pussin sisältöön 15 minuuttia ennen keräämistä, jotta saatava tulos paineesta kuvaisi lehden ksyleemin vesipotentialiaalia eikä lehden kokonaispotentialiaalia (Turner 1988). Myös neulasotista otettiin jokaisella keräyskerralla osa punnitukseen vesipitoisuuden selvittämiseksi. Lehtien vesipitoisuus selvitettiin punnitsemalla lehdet tuoreena, eli juuri pussista otettuna, ja kuivatuksen jälkeen. Kuivatus tehtiin pitämällä lehtiä lämpökaapissa 70 °C- asteessa 48 h.

Vesipotentialimittauksia tehtäessä noudatettiin samoja menetelmiä, kuten Turner (1988) on julkaisussaan kuvaillut. Vesipotentialimittaukset tehtiin ns. painekammioilla (1505D Pressure Chamber Instrument, PMS Instrument Company, Albany, USA). Sekä leppälehdistä että männyn neulasotista leikattiin terävällä kirurginveitsellä tuore leikkauspinta juuri ennen painemittauksia. Mittaus tehtiin mahdollisimman nopeasti pussista ottamisen jälkeen, jotta huoneen ilman kosteus ei ehtisi vaikuttaa lehden vesipitoisuuteen. Painetta laskettiin tasaisesti kunnes leikkauspintaan alkoi ilmestyä lehden ksyleemistä vettä. Neulasotia otettiin painemittauksiin useampi sillä niiden leikkauspinnasta valuva pihka vaikeuttaa neulasotien ksyleemistä tulevan veden havainnoimista. Neulasotien painearvot muodostettiin viiden varman mittauksen keskiarvosta. Painemittaukset leppälehdistä tehtiin tunnin sisällä keräyshetkestä. Neulasotien painemittaukset tehtiin 1 – 1,5 tunnin päästä keräyshetkestä.

Hyytiälän SMEAR 2-aseamalla tehdyissä mittauksissa on mitattu kolmea eri mäntyä. Tässä tutkimuksessa viralliset vesipotentialin mittauserät ovat "puu 1" ja "puu 2". Nämä numeroinnit ovat samat kuin näistä puista SMEAR2-tutkimusasemalta saatavissa läpimittadatoissa, eli puu nro 1 tarkoittaa kaksiaaraista mäntyä mittauserän edessä ja nro 2 paksumpaa mäntyä mittauserän takana. Näissä puissa myös sijaitsevat läpimittan muutoksia mittaavat anturit. "Nilapu" tarkoittaa mäntyä, josta on kerätty neulasot- ja nilanäytteet niiden osmoottisen vahvuuden tutkimiseen. Nilapuun vesipotentialimittaukset poikkeavat puiden 1 ja 2 vesipotentialimittauksista siten, että havainnot on tehty välillä vain kahden mittauksen perusteella. Lisäksi yksi mittauserä puuttuu siitä kokonaan. Nilapuun vesipotentialimittausten oli alun perin tarkoitus vain antaa karkeasti tukea puiden 1 ja 2 mittauksille. Puilla 1 ja 2 havainnot oli aina viisi, mikä lisää niiden vesipotentialiarvojen luotettavuutta nilapuhun verrattuna.

Tulosten tarkastelussa käytetään ksyleemin paineista käsitettä "lehden vesipotentiali" tai "neulasten vesipotentiali", sillä paineet käytännössä kuvaavat lehden ksyleemin vesipotentialia.

4.3 Ksyleemin läpimitanmuutosten mittaukset

Puiden läpimitan muutoksia on seurattu sekä Helsingin pilaritervalepillä että Hyytiälän männyillä jo useita vuosia. Läpimittaa seurataan herkillä jousiantureilla (LVDT; malli AX/5.0/5; Solartron inc. Bognor Regis, West Sussex, UK), jotka on kiinnitetty lepillä noin metrin korkeuteen ja männyillä reilun kahden metrin korkeuden lisäksi noin 10 metrin korkeuteen. Antureita on yhdessä kohtaa aina kaksi kappaletta, ksyleemiä sekä nilaa vasten. Ksyleemiä mittaavan anturin pää tukeutuu ksyleemiin kiinnitettyyn pieneen ruuviin, ja nilaa mittaava anturi lepää kuoren pintaa vasten. Anturit mittaavat läpimitan muutoksia lepillä kahden ja männyillä viiden minuutin välein. Samoista puuyksilöistä samalla menetelmällä tehtyihin läpimitanmuutosmittauksiin perustuen on julkaistu aiemmin useita artikkeleita (esim. Sevanto ym. 2002). Läpimitan muutoksista saatavaa dataa hyödynnettiin tarkastelemalla ksyleemin läpimitan muutoksia keräysajankohdan ajalta.

4.4 Esikoe nilapaloilla

Helsingin nilamittausten päätarkoitus oli löytää sopiva menetelmä nilanäytteiden keräämiseen ja osmoottisen vahvuuden mittaamiseen. Niinpä nilapaloja kerättiin lepästä ja männystä satunnaisesti eri puista valiten. Tavoitteena oli riittävän näytemäärän saaminen ja luotettavien tulosten löytäminen. Tässä nilapaloja kerättiin erikokoisina, eri aikoihin päivästä ja eri kohdista oksia. Nilapalojen pituus vaihteli 1-3 cm välillä ja niiden leveys oli aina noin 1 cm. Nilapaloja kerättiin oksista sillä niiden kerääminen aiheuttaisi runkoon suurta vahinkoa. Niitä kerättiin useimmiten oksan kärjestä sen kantaa kohti. Tällä yritettiin löytää johdonmukaisuutta mitatuissa osmoottisissa vahvuuksissa. Sekä lepästä että männystä on tästä vaiheesta joitakin tuloksia. Männystä tuloksia on kattavammin, sillä nilapalojen irrottaminen siitä oli selkeämpää ja helpompaa kuin lepästä. Nilapaloista tehtiin koemittauksia liuksilla, joissa käytettiin EDTA-liuosta ja tislattua vettä. Näiden menetelmien vertailusta on enemmän "Nilan mittausmenetelmien taustaa"-osiossa. Tässä tutkimuksessa päädyttiin kuitenkin käyttämään mekaanista näytteiden erottelua nilapaloista, sillä liuotusmenetelmien käyttö ei tuottanut toivottua tulosta ja mekaanisella erottelutavalla on mahdollista kätevästi käsitellä useita näytteitä kerralla. Lisäksi, mekaanisesti eroteltuun näytteeseen ei tarvitse lisätä ylimääräistä vaan näyte on täysin nilapalan omia yhdisteitä ja nestettä, kuten myös Devaux ym. (2009) ovat todenneet.

Nilapalat kerättiin irrottamalla oksa ensin puusta ja sitten kirurgin veitsellä leikaten. Kuorta poistettiin palan päältä mahdollisimman paljon, mutta kuitenkin varoen nilan poistamista. Palat leikattiin 1-2 cm pituisiksi sillä ne kerättiin suunnilleen vastaavan kokoiisiin putkiin. Putket olivat pieniä, sillä tässä vaiheessa kaikki mahdolliset vesipitoisuuteen vaikuttavat tekijät haluttiin sulkea pois. Nilapalat eivät putkien sisällä päässeet suuresti reagoimaan ilman kanssa, ja niiden vesipitoisuus siis pysyisi samana kuin putkeen laitettaessa.

Nilapalat otettiin juuri ennen jäädytystä pois putkista ja asetettiin teräksiseen mukiin. Varsinainen jäädytys tehtiin kaatamalla nestemäistä typpeä mukiin palojen päälle. Palat otettiin mukista jäädytyksen jälkeen noin kahdeksi minuutiksi huoneenlämpöön sulamaan. Tämän jälkeen ne asetettiin suodattimilla varustettuihin Eppendorf-putkiin, joita tarvitaan sentrifugia käytettäessä. Paloja asetettiin kaksi noin 1 cm kokoista kappaletta yhtä putkea kohti heti, kun ne sulaessaan alkoivat antaa periksi, ja olivat siis asetettavissa putkiin. Palat vietiin sentrifugiin (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), jossa niitä käytettiin tässä vaiheessa tutkimusta 13000 g viiden minuutin ajan. Sentrifugin jälkeen Eppendorf-putken pohjalla oli vaihteleva määrä punertavaa näytettä.



Kuva 11. Tutkimuksessa käytetty sentrifugi



Kuva 12. Osmometri

Osmoottisen vahvuuden mittaaminen osmometrillä (Osmomat 030 cryoscopic osmometer, Gonotec, Berlin, DE) tehtiin sentrifugin jälkeen mahdollisimman nopeasti eli noin 15 minuutissa. Näytteet oli siirrettävä pipetillä Eppendorf-putkista osmometrissä käytettäviin putkiin. Pipettejä oli käytössä useita sillä ne täytyi huuhdella jokaisen siirron jälkeen ja huuhteluvesi ei tullut pipetin sisältä heti pois. Näin pienillä näytemäärillä pieninkin vesipitoisuuden muutoksen pelättiin vaikuttavan näytteen osmoottiseen vahvuuteen. Osmometri oli kalibroitu tislatulla vedellä ja 300 mmol/kg kalibrointiliuoksella.

4.5 Lepän lehtien sekä esikokeen neulasten osmoottisen vahvuuden mittaaminen

Myös leppälehdistä ja männyn neulasista mitattiin osmoottista vahvuutta. Lepän lehdistä kerättiin näytteet aina 15.7. saakka painepommin avulla lehden kannasta. Lehti jäädytettiin, jonka jälkeen se asetettiin painepommiin. Painetta nostettiin hieman, jolloin lehden kannasta voitiin pipetillä kerätä näytettä osmometriin asetettaviin putkiloihin. Mittausjaksosta 19. – 26.7. eteenpäin nämä mittaukset tehtiin vastaavalla tavalla nilapalojen kanssa. Kerätyt neulaset tai lehti asetettiin jäädytettävään teräsmukiin, johon

kaadettiin nestemäistä tyypeä päälle. Jäätynyt lepän lehti rikottiin tässä vaiheessa pienemmiksi palasiksi, jotka asetettiin Eppendorf-putkiin. Neulaset leikattiin kahtia ennen jäädytystä ja asetettiin jäädytyksen jälkeen leikkauspinta alaspäin Eppendorf-putkiin, jotka käytettiin sentrifugissa. Näytteet siirrettiin osmometriin mittaukseen aiemmin kuvatulla tavalla. Hyytiälässä tehdyssä huolellisessa mittaussarjassa neulaset preparoitiin ennen osmoottisen vahvuuden mittaamista hieman eri tavalla, kuten seuraavasta osiosta käy ilmi.

4.6 Männyn mittaussarja – nila- ja neulasnäytteiden osmoottinen vahvuus ja vesipitoisuus

Kesän aikana Helsingissä tehdyissä kokeissa vakiintui menetelmä kerätä nilanäytteitä ja mitata nilan osmoottista vahvuutta. 29.8. – 2.9.2011 tehtiin Hyytiälässä SMEAR 2-aseman männikössä hyväksi havaitulla käytännöllä huolellinen mittaussarja nilan osmoottisista vahvuuksista ja vertailupuiden vesipotentiaalista. Mittausjakso oli viisi päivää, jonka aikana näytteitä kerättiin samasta puusta kolmesta kohdasta kahtena ajankohtana päivässä. Nilapalojen kerääminen tehtiin siis päivän haihdutuksen alkamisen aikoihin, jolloin rungon läpimitta oli vielä kutakuinkin yön lukemissa, ja päivän kovimman haihdutuksen aikoihin, jolloin rungon läpimitta oli pienimmillään.

Kerätyt nilapalat olivat kooltaan 1 cm x 2 cm, ja niitä kerättiin kaksi kappaletta osmoottisen vahvuuden mittaamiseen sekä kolmas pala vesipitoisuuden määrittämiseen. Kolmas pala, josta määritettiin vesipitoisuus, otettiin kahden muun palan keskeltä. Nilapaloja kerätessä oli otettava huomioon nilan vahingoittamisen vaikutus puun toimintaan ja siten myös tutkimuksen onnistumiseen. Tämän vuoksi näytepaloja ei enempää voitu kerätä. Samasta syystä nilapalat eri ajanhetkiltä kerättiin satunnaisesti rungon ympäriltä ja pystysuunnassa noin 20 cm vaihteluväliltä välttäen edellisten keräyskohtien läheisyyttä. Palat irrotettiin puusta pystysuunnassa eli 1 cm leveysuunnassa näytettä kohti niin, että 6 cm:n pituinen pala jaettiin kolmeen osaan. Nilapalat kerättiin noin 16, 10 ja 2 metrin korkeudelta. Ylimmäinen pala otettiin vajaan senttimetrin paksuisesta oksasta, keskimäinen nilanäytepala elävän latvan alapuolelta ja alimmainen pala suunnilleen alimpien läpimitanmuutosta mittaavien antureiden korkeudelta. Nämä anturit sijaitsivat samassa männikössä sijaitsevilla samankaltaisissa puissa. Vesipotentiaali- ja läpimittamittaukset olivat siis näistä samankaltaisista puista kuin nilanäytteet. Ylimmäisen palan kohdalla irrotettiin koko oksa puusta, josta raaputettiin aluksi pois korkkikuori nilan päällä olevaan vihreään osaan asti. Tämän jälkeen oksasta leikattiin kirurginveitsellä kolme 2 cm mittaista palaa. Latvuksen alapuolelta ja kahden metrin korkeudesta palat irrotettiin luonnollisesti suoraan rungosta, kun kuori oli ensin palan alueelta poistettu varovasti. Kaikkea kuorta ei saatu lähtemään kahden metrin korkeudelta kerätyistä paloista, sillä samalla olisi mukaan lähtenyt nilaa, joka oli tiukasti kuoressa kiinni. Kuoren määrä pyrittiin kuitenkin mahdollisuuksien mukaan minimoimaan. Myös neulasista kerättiin tässä vaiheessa näytteet osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden mittauksiin.

Heti puusta irrotettua nilapalat asetettiin suljettaviin 5 ml cryo-putkiin (Nunc, Thermo Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat), jotka säilöttiin nestetyyppipulloon odottamaan näytteiden preparoimista Helsingissä. Putkiin palat asetettiin heti puusta irrottamisen

jälkeen ja nestetyypipulloon ne säilöttiin heti, kun viimeinen näytepala kolmesta oli kerätty puusta. Tuore- ja kuivapainopunnitukset tehtiin näillä näytteillä paikan päällä Hyytiälässä. Kuivatus tehtiin uunissa 70 °C-asteessa 48 h. Punnitsemisessa käytettiin puntarin päällä petrimaljaa, johon näytteet asetettiin punnituksen ajaksi. Kerätyt nilapalat kuljetettiin nestetyypipullossa Helsinkiin, jossa ne säilytettiin -20 °C-asteessa.

Nilapaloista ja neulasista preparoitiin näytteet ja mitattiin osmoottinen vahvuus kuukauden kuluttua keräysajankohdasta. Yhden näytteen preparoimiseen kuului useita vaiheita, joten nilapaloja otettiin pakkasesta kahdeksan kerrallaan. Tämä sen vuoksi, jotta näytteet pääsisivät sulaessaan mahdollisimman nopeasti osmometriin mitattavaksi, ja jotta näytteitä toisaalta olisi järkevä määrä kerralla analysoitavaksi. Näytteet olivat siis olleet nestetyypipullossa hyvin alhaisessa lämpötilassa, jonka jälkeen pakkasessa -20 °C-asteessa. Nilapalojen annettiin sulaa huoneenlämmössä 15 minuuttia ennen putkien avaamista. Cryo-putkista palat siirrettiin seuraavaksi suodattimella varustettuihin Eppendorf-putkiin. Ennen jälkimmäisiin putkiin asettamista, eli ennen sentrifugia, palat kuitenkin vielä punnittiin. Yhteen putkeen asetettiin aina yksi 1 cm x 2 cm pala. Nilapalat olivat sentrifugissa 10 minuuttia (14000 g), kuten julkaisussa Devaux ym. (2009).

Sentrifugista saatiin reilusti kullanuskeaa näytettä osmometriin mitattavaksi. Seuraavaksi näytteet siirrettiin pipetillä Eppendorf-putkista osmometriin asetettaviin putkiin. Jokaiselle näytteelle oli siirtoa varten oma kuiva pipetti, jotta huuhteluvesi pipetin sisällä ei vaikuttaisi näytteen osmoottiseen vahvuuteen. Jokaiseen osmometriin asetettavaan näytteeseen mitattiin saman verran näytettä. Tämä näytemäärä oli merkitty valmiiksi pipetteihin, ja pipeteiksi oli valittu samanmuotoiset ja -kokoiset pipetit. Osmometriin asetettavan näytteen paino oli noin 80 mg. Näytemäärää ei punnittu näytteiden kohdalla erikseen, sillä pienillä näytemäärien eroavaisuuksilla ei koemittausten perusteella havaittu tulokseen olevan vaikutusta. Eppendorf-putkien suodattimien päälle jääneet nilapalat myös punnittiin osmometriin asetettavia näytteitä preparoitaessa. Osmometri oli kalibroitu tislatus veden ja 300 mmol/kg kalibrintiliuoksen mukaan, kuten laitteen ohjeessa oli neuvottu. Osmometrin sensori huuhdeltiin tislatus vedellä ja kuivattiin jokaisen mittauksen jälkeen. Sekä keräysvaiheessa että analysointi- ja mittausvaiheessa näytteitä käsiteltiin suojahansikkain näytteeseen kuulumattomien epäpuhtauksien välttämiseksi. Kahdeksan näytteen matka pakastimesta sentrifugin kautta osmometriin kesti yhteensä aina noin 1 h 15 min.

Myös kerätyistä neulasista mitattiin osmoottinen vahvuus. Tällöin neulaset leikattiin niiden sulaessa kahtia ja asetettiin Eppendorf-putkiin leikkauspinta alaspäin. Yhteen Eppendorf-putkeen asetettiin aina viisi paria neulasia, joista sai reilusti kirkkaanväristä näytettä. Myös neulaset punnittiin ennen ja jälkeen sentrifugilla käytön. Neulaset kävivät sentrifugissa saman ohjelman kuin aiemmin mainitut nilapalat, 10 min 14000 g.

4.7 Tilastolliset menetelmät

Tutkimuksessa tarkasteltiin myös kahden muuttujan välistä lineaarista riippuvuutta. Tuloksia arvioitiin muuttujien muodostamasta pisteparvesta selitysasteen ja tilastollista merkitsevyyttä kuvaavan p-arvon avulla. Merkitsevyyttä tarkasteltiin korrelaatiokerroimen

kaksisuuntaisena testinä. Suuntaa antavana merkitsevyytasona pidettiin yleisesti käytettyä $p < 0,05$. Korrelaatiokertoimen testaus tehtiin SPSS 15.0-tilasto-ohjelmalla.

5 Tulokset

5.1 Esikoe nilapaloilla

Esikokeen tarkoituksena oli löytää toimiva nilanäytteiden mittaussuunnitelma sekä selvittää siihen ja nilanäytteiden keräämiseen vaikuttavia tekijöitä. Kuten "Johdanto"-luvussa on kerrottu, vesi liikkuu ksyleemissä kohti pienempää vesipotentiaalia eli alhaisempaa painetta. Nila taas mukautuu nopeasti ksyleemin vesipotentiaalin muutoksiin (Hölttä ym. 2006). Nilanäytteiden koemittauksia tehtiin oksilla, ja näiden mittaussuunnitelmassa pyrittiin soveltamaan edellä mainittuja oletuksia. Oksan haihduttavia osia kohti mentäessä ksyleemin vesipotentiaalin tulisi siis laskea ja nilan vesipotentiaalin mukautua näihin muutoksiin korkeammalla osmoottisella vahvuudella. Jäädettämättömistä nilapaloista saatiin vain vähän havaintoja ja joissain näissä havainnoissa näytettä on saatu kerättyä vain vähäinen määrä. Näytteen keräämisen hankaluus jäädettämättömistä nilapaloista oli yksi syy, miksi tässä tutkimuksessa päädyttiin käyttämään nilapalojen jäädettystä ennen näytteen erottelua sentrifugilla.

Taulukko 2. Eri kohdista männynoksia mitattujen nilan (A1 - A4) ja neulasten (N1 ja N2) osmoottisten vahvuuksien keskiarvot. Nilanäytteissä numerot kuvaavat näytteen sijaintia oksassa niin, että 1 on lähinnä oksan kärkeä ja 4 lähinnä oksan kanta. Symboli "A" viittaa jäädettyskäsittelyyn ennen näytteen preparointia. "Liitteet"-osiossa on tarkemmin nähtävissä nila- ja neulasnäytteiden sijainnit oksissa (liitteet 1-8). Liitteissä on käytössä samat symbolit kuin alla olevassa taulukossa. Sijaintien A1, A2 ja A4 keskiarvo muodostuu 10 havainnosta. Muiden sijaintien keskiarvoissa havaintoja on 4-6.

näytteen sijainti	A1	A2	A3	A4	N1	N2
osmoottinen vahvuus, mol/kg	0,544	0,521	0,498	0,511	0,626	0,616

Tulokset näistä mittauksista näyttäisivät noudattavan teoriapohjaa, jossa nilan vesipotentiaali mukautuu ksyleemin vesipotentiaalin muutoksiin. Lähimpänä oksan kärkeä on aina suurin osmoottinen vahvuus ja oksissa on useimmiten nähtävissä gradientti oksan kärjestä kantaan, kuten taulukon 2 keskiarvoista voi jo nähdä. Neulasten osmoottiset vahvuudet ovat aina korkeammat kuin nilassa, kuten myös Liesche ja Schulz (2012) ovat havainneet. Liitteissä 1-8 on tarkemmin nähtävissä oksista kerättyjen nilapalojen ja neulasnäytteiden sijainnit. Näissä kokeellisissa mittauksissa myös havaittiin, että osmometristä saatu arvo ei sulamisen jälkeen merkittävästi muutu, eikä mittaamiseen siten näytteen sulamisen jälkeen ole suurta kiirettä. Devaux ym. (2009) myös havaitsivat tutkimuksessaan, ettei sokereiden määrä ja laatu muuttunut vastaavissa näytteissä 24 tunnin aikana.

Esikokeen mittauksissa tarkasteltiin myös mahdollisia osmometrillä saataviin tuloksiin vaikuttavia asioita, kuten näytteen määrän vaikutusta mittaustuloksiin. Tässä vaiheessa nilanäytteiden mittauksissa oli vielä paljon epävarmuuksia, joita tällaisilla koemittauksilla pyrittiin sulkemaan pois. Kokeissa tarkasteltiin myös, saadaanko samasta kohdasta nilaa myös samanlaisia arvoja eri näytteissä. Oksan keräyskohdasta johtuvat arvojen vaihtelevuudet näyttävät olevan kuitenkin suurempia kuin näytteen määrästä johtuvat eroavaisuudet (liitteet 1-4). Koemittauksissa samasta kohdasta nilaa tuli samanlaisia arvoja ja näytemäärän vaihtelulla ei ollut suurta vaikutusta. Näytemäärällä näytti olevan vaikutusta silloin, kun osmometriin saatava näytemäärä oli lähellä mittauksen onnistumisen minimirajaa eli 15 µl.

Taulukko 3. Päivän eri aikoina kerättyjen leppä- ja männyn nilanäytteiden koemittaus ja kaulauskoe. Nilanäytteissä numerot kuvaavat näytteen sijaintia oksassa niin, että 1 on lähinnä oksan kärkeä ja 3 lähinnä oksan kanta. "Yläpuoli" on oksan kärjen puolella ja "alapuoli" oksan kannan puolella kaulausta. 25.7. iltapäivällä kerätyt nilanäytteet 1 ja 2 jouduttiin yhdistämään vähäisen näytemäärän vuoksi. Nilapalat on ensin jäädytetty ja näytteet sitten eroteltu nilapaloista sentrifugilla. Aamun sekä puoli- ja iltapäivän nilapalat on kerätty samasta puusta eri oksista. Oksat ovat olleet samankaltaisia.

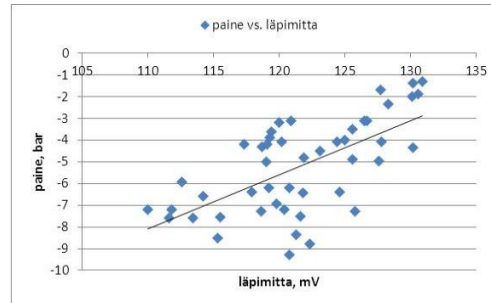
	25.7.	Leppä Osmoottinen vahvuus, mol/kg	26.7.	Leppä Osmoottinen vahvuus, mol/kg	Mänty Osmoottinen vahvuus, mol/kg
Aamu	1	0.472		0.420	0.600
	2	0.452		0.408	0.568
	3	0.443			
Puolipäivä	1	0.384		0.434	0.584
	2	0.494		0.450	0.598
	3	0.453			
Iltapäivä	1 + 2	0.544		x	0.626
				x	0.649
Kaulaus	yläpuoli	0.472		0.470	0.678
	alapuoli	0.445		0.457	0.616

Taulukossa 3 on esimerkki nilapaloilla tehdystä koemittauksesta. Leppä- ja männyn nilapalojen osmoottisissa vahvuuksissa 25. ja 26.7. ei päivän mittaan ilmene selkeää gradienttia oksan kärjestä kantaan. Männyn nilapalojen osmoottiset vahvuudet ovat kuitenkin selkeästi suuremmat verrattuna leppään. Näinä päivinä tehdyissä kaulauskokeissa sen sijaan näyttäisi olevan johdonmukaisuutta leppällä ja männyllä, sillä kaikissa tapauksissa kaulauksen yläpuolelle jääneen näytteen arvo oli korkeampi. Kaulauksen yläpuolelle jäi oksassa olevat neulaset ja alapuolelle vain sen vartta, joten yläpuolella olevaan nilaan ajateltiin kenties keräytyvän nilassa kuljetettavia sokereita. Tämä kaulauskoe jäi kuitenkin ainoaksi, joten suurempia johtopäätöksiä näistä tuloksista ei kannata tehdä.

5.2 Ksyleemin vesipotentiaali pilaritervalepällä

Leppä- ja männyn vesipotentiaalimittaukset toimivat sekä koesarjana että männyllä tehtyjen mittausten vertailukohtana selvitettyä vesipotentiaalin ja läpimitan muutosten yhteyttä. Seuraavissa osioissa on nähtävissä aikasarjakuvaaja pilaritervaleppä- ja männyn ksyleemin läpimitasta

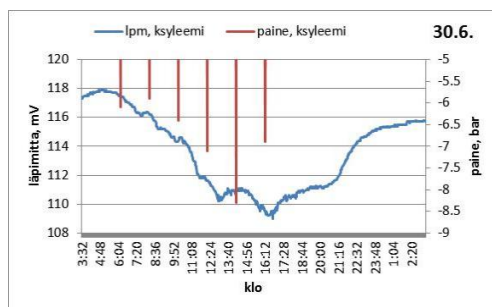
sekä sen vesipotentialista ja lehden osmoottisesta vahvuudesta, sillä näillä on aiemmin havaittu säännönmukaista vuorokautista käyttäytymistä (Perämäki ym. 2001, Peltier ym. 1997). Aikasarjakuvaajilla pyritään ymmärtämään myös olosuhteiden vaikutusta näihin muuttujiin.



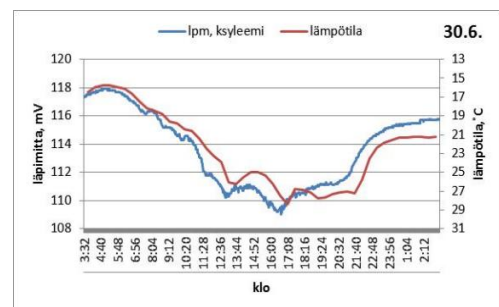
Kuva 13. Lehestä mitattu vesipotentiali ja läpimitta tervalepällä tehdyissä mittauksissa. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,407$; $n=47$; $p<0,01$.

Lepän vesipotentialin on aiemmin havaittu seuraavan kohtalaisen hyvin haihdunnan muutoksia (Eschenbach ja Kappen 1999). Lepän lehden vesipotentiali seurasi läpimitan käyttäytymistä kohtalaisesti tai hyvin kaikkien mittausjaksojen aikana myös tässä tutkimuksessa. Välillä vesipotentialin ja läpimittojen muutokset sopivat yhteen jopa erinomaisesti (kuva 17). Joidenkin mittausjaksojen aikana (kuvat 16 ja 20) taas vesipotentialin ja läpimittojen yhteys ei ollut yhtä yksiselitteinen. Vaihteluun voivat vaikuttaa maan vesipitoisuuden vaihtelut (kuva 19) tai mitattavien lehtien pieni otos. Mittausten mukaan kuitenkin läpimitan muutosten ja lehden vesipotentialin välillä on selkeä yhteys (kuva 13).

Lehden vesipotentiali sekä osmoottiset vahvuudet on aikasarjakuvaajissa kuvattu pylväillä, jotta niiden käyttäytyminen olisi paremmin hahmotettavissa, vaikka ne tosiasiaassa ovat kahden yksittäisen havainnon keskiarvoja. Mittausten hajontaa on nähtävissä kahdelta mittausjaksolta kuvassa 21. Läpimitta on kuvaajissa suoraan mittalaitteesta saatavassa yksikössä *millivolteissa*. Tässä yhteydessä ollaan absoluuttisten arvojen sijaan kiinnostuneita läpimittojen käyttäytymisestä.

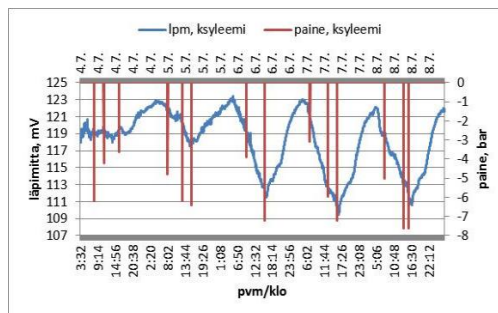


Kuva 14. Lepän lehestä mitattu vesipotentiali (punainen pylväs) ja rungon läpimitan muutos päivän aikana 30.6.

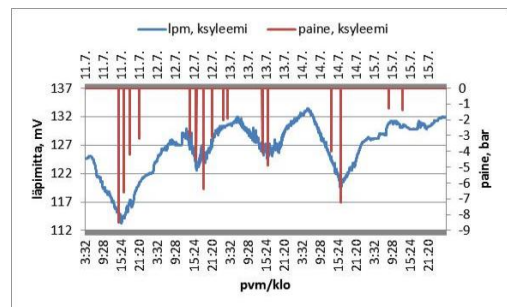


Kuva 15. Rungon läpimitan ja lämpötilan muutos päivän aikana 30.6.

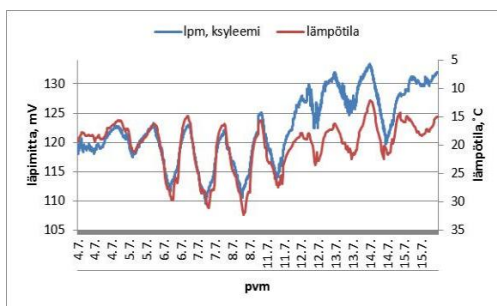
Lämpötilakuvaajista (esim. kuva 18) voidaan nähdä että läpimitta seuraa mittausjakson aikana vahvasti VPD:n muutoksia, sillä VPD on kytköksissä lämpötilaan. Teoriapohjan mukaan transpiraatiokin seuraa VPD:n muutoksia ("Tutkimuksen teoreettinen viitekehys" kuva 2). Päivinä, jolloin lämpötila on hellelukemissa, haihdutuksen ollessa suurempi myös läpimitta ja lehden vesipotentiaali ovat alhaisemmat. Vastaavasti taas sateisina päivinä, kuten 12. – 13.7. (kuva 17), sekä läpimitan että vesipotentiaalin arvot ovat huomattavasti korkeammat ja päivän vaihteluväli on huomattavasti pienempi. Kuvan 14 päivä 30.6. oli helteinen eikä vettä ollut satanut useaan päivään. Rungon läpimitta seuraa tuolloin lämpötilan muuttumista aina päivän kuumimpaan hetkeen saakka. lehden vesipotentiaali mukaillee läpimitan muutoksia mutta näyttäisi siltä, että lehden reaktio olosuhteisiin näkyy muutamaa tuntia rungon läpimittaa aiemmin. Päivinä 4. ja 5.7. (kuva 16) lehden vesipotentiaali ei muutu läpimitan kanssa samassa suhteessa. Näitä päiviä edelsi ainakin kolme hellepäivää. Alhaisin vesipotentiaaliarvo osuu sopivasti läpimitan alhaisimman arvon kohtaan kuvissa 16 ja 17. Tämä johtuu myös siitä, että näytelehti on kerätty juuri alhaisimman läpimitan aikoihin. Kahden viimeisen vesipotentiaalimittauksen välillä on 8.7. vain kaksi tuntia eroa, mistä voi johtua niiden samankaltainen arvo. Tuo sama päivä oli myös jakson lämpimin.



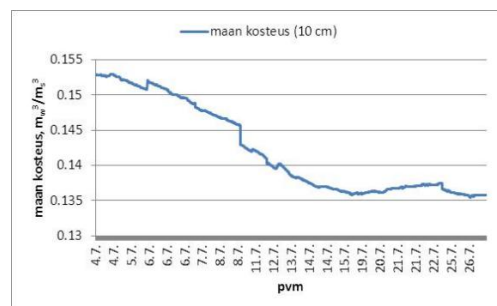
Kuva 16. Lepän lehdestä mitattu vesipotentiaali (punainen pylväs) ja rungon läpimitan muutos 4. – 8.7.



Kuva 17. Lepän lehdestä mitattu vesipotentiaali (punainen pylväs) ja rungon läpimitan muutos 11. – 15.7.



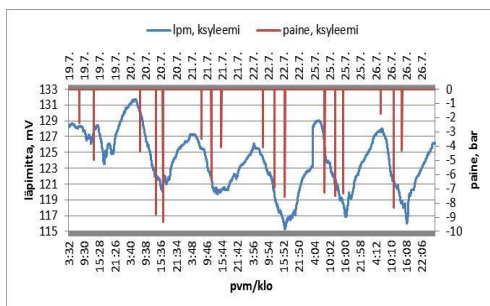
Kuva 18. Lepän läpimitan ja lämpötilan käyttäytyminen jaksojen 4. – 8.7. ja 11. – 15.7. aikana



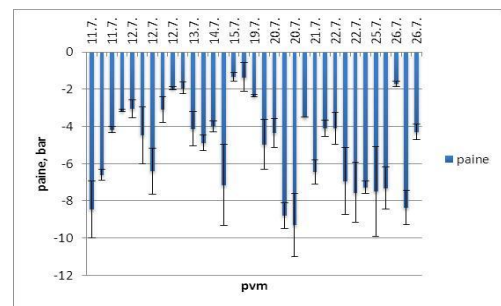
Kuva 19. Maan kosteus (m_w^3/m_s^3 eli veden tilavuus maatilavuudesta) kasvualueella 10 cm syvyydellä mittausjaksojen 4. – 8.7.; 11. – 15.7. ja 19. – 26.7. aikana

Kuvan 17 mittausjaksolla tehtiin 11.7. ja 12.7. iltamittaus sekä 12.7. iltamittauksen lisäksi kaksi yömittausta. Molempina päivinä aamumittaus jätettiin väliin. Lämpimitta näyttäisi seuraavan lämpötilan muutoksia aina 11.7. iltaan asti, jolloin sää alkoi muuttua sateiseksi (kuva 18). Lämpimitta näyttäisi siis erkanevan lämpötilakuvaajasta ainakin kovalla haihdutuksella, kuten 30.6., ja kosteammissa olosuhteissa, kuten 11.7. Ensimmäinen vesipotentiaalimittaus 11.7., joka oli noin klo 14:30, sekä läpimitan arvo ovat suunnilleen samalla tasolla kuin aiempien mittausjaksojen hellepäivien lukemat. Päivä 12.7. alkoi aamun jälkeen poutaantua, minkä vuoksi alhaisin lehden vesipotentiaalin lukema havaitaan vasta klo 18:30 aikoihin. Yömittaukset näyttävät ksyleemin jännityksen olevan tuona yönä tasaisesti noin -2 bar. Echenbach ja Kappen (1999) saivat tervalepällä korkeimmaksi lehden vesipotentiaalin arvoksi noin -3 bar ja Peltier ym. (1997) noin -2 bar, joten näiden tulosten valossa havaittu korkea vesipotentiaalin lukema voi hyvinkin olla mahdollinen. Yömittauksilla päästään tässä tutkimuksessa ensimmäistä kertaa tarkastelemaan tilannetta, jossa rungon vuorokautiset vesivarastot ovat olosuhteiden mukaan täytettynä eikä haihduntaa suuresti tapahdu. Sateinen viikko nostaa läpimitan päivän minimi- ja maksimitasoa hellepäivien lukemista. Sateisen viikon myötä rungon sisäiset vesivarastot ehtivät kertyä jonkin verran, mikä näkyy korkeampana läpimitan maksimitasona eli korkeampana yöllisenä tasona.

Päivät 13. ja 14.7. (kuva 17) olivat olosuhteiltaan samankaltaisia päiviä mutta läpimitta käyttäytyy niiden aikana eri tavalla. Jälkimmäisen päivän läpimitan alhaisemmat arvot saattaisivat johtua rungon sisäisten vesivarastojen vähenemisestä. Myös viimeksi mainitun päivän yötaso on selvästi edellisen yön tasoa alempana. Lehden vesipotentiaali näyttäisi seuraavan läpimitan muutoksia erinomaisesti mittausjaksolla 11. – 15.7. Mittausjakson aikana ei läpimitan ja lehden vesipotentiaalin välillä ole juurikaan viivettä. Myös eri päivien välillä lehden vesipotentiaali vaihtelee läpimitan kanssa oikeannäköisessä suhteessa.



Kuva 20. Lepän lehdestä mitattu vesipotentiaali (punainen pylväs) ja rungon läpimitan muutos 19. – 22.7. ja 25. – 26.7.

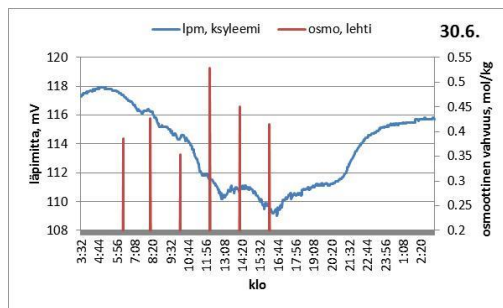


Kuva 21. Vesipotentiaalimittausten hajonta mittausjaksoilla 11. – 15.7. ja 19. – 26.7.

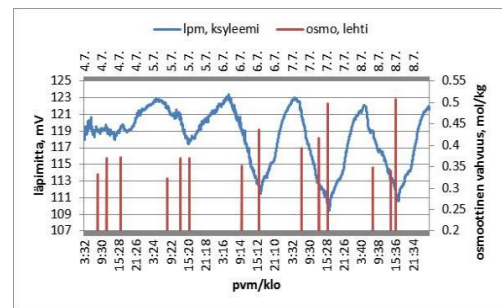
Lämpimitan maksimitaso on mittausjakson 19. – 26.7. (kuva 20) alussa suunnilleen samalla tasolla kuin sateisena mittausjaksona 11. – 15.7. (kuva 17). Tuo maksimi- ja minimitaso laskee hellepäivien myötä ja nousee taas 23.7. esiintyneiden sateiden myötä. Lehden vesipotentiaali sen sijaan ei käyttäydy yhtä johdonmukaisesti. Päivän 20.7. lehden vesipotentiaali on alhaisempi kuin seuraavina päivinä, joina myös lämpötila oli korkeampi ja läpimitan arvot alhaisemmat. Päivän 21.7. lehden vesipotentiaali on päivän kuumimpaan

aikaan lähes aamun tasolla, mikä voi myös johtua ilmarakojen toiminnasta. Mitatut lepät kasvoivat ruukkumaisella kasvualustalla, kuten kaupunkipuille on tyypillistä. Maan vesipitoisuus tuolla kohtaa voi käyttäytyä eri tavalla kuin alustalla, jossa satava vesi voi imeytyä maahan laajemmalla alalla. Maan kosteuden vaikutusta vesipotentiaaliin on kuitenkin tällä aineistolla vaikea arvioida, sillä maan vesipotentiaali tai läpimitta eivät johdonmukaisesti näyttäisi muuttuvan ainakaan pintamaan kosteuden mukaan (kuva 19). Pintamaan kosteus koko ajan laskee mittausjaksojen aikana ja on alimmillaan kuvan 20 jakson aikana. Kuivemmat olosuhteet saattaisivat kuitenkin olla osasyynä lehden vesipotentiaalin epäjohdonmukaiselle käyttäytymiselle tuolla mittausjaksolla.

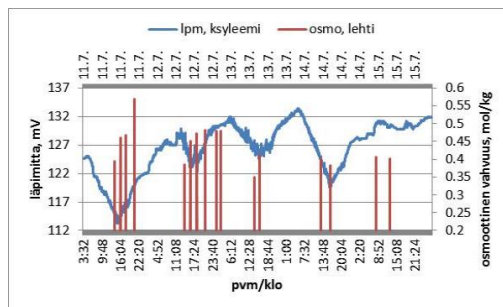
5.3 Tervalepän lehtien osmoottinen vahvuus



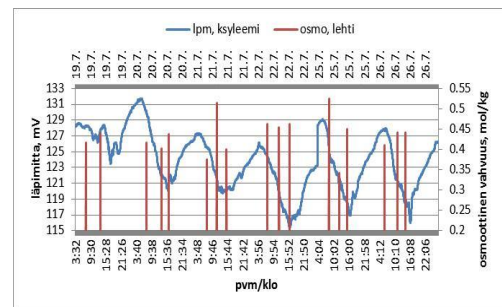
Kuva 22. Lepän läpimitta ja saman puun lehden osmoottinen vahvuus 30.6.



Kuva 23. Lepän läpimitta ja saman puun lehden osmoottinen vahvuus 4. – 8.7.



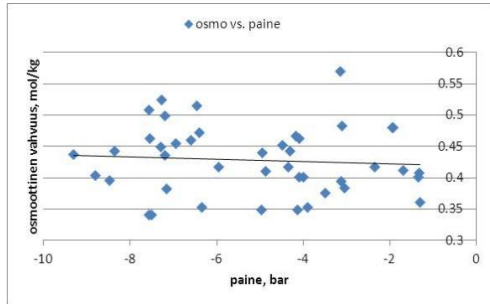
Kuva 24. Lepän läpimitta ja saman puun lehden osmoottinen vahvuus 11. – 15.7.



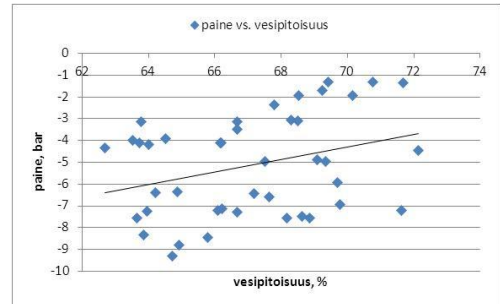
Kuva 25. Lepän läpimitta ja sen lehden osmoottinen vahvuus 19. – 26.7.

Osmoottinen vahvuus on pienin useimmiten aamuisin. Se vaihtelee kaikilla esitellyillä mittausjaksoilla välillä 0,320 – 0,570 mol/kg. Useimmiten päivän aikana saatu korkein arvo on 0,45 – 0,5 mol/kg. Päivän maksimiarvo on suurimmillaan kuumina poutapäivinä ja pienimmillään sateisina päivinä. Useimpina päivinä korkein mitattu osmoottinen vahvuus sattuu lähelle läpimitan alhaisimpia lukemia. Illalla ja yöllä (kuva 24) tehdyissä mittauksissa osmoottinen vahvuus on kuitenkin noussut tasaisesti iltaa kohti ja on tuolloin ollut suurimmillaan yöllä. Useampi tällainen mittausarja olisi todennäköisesti antanut

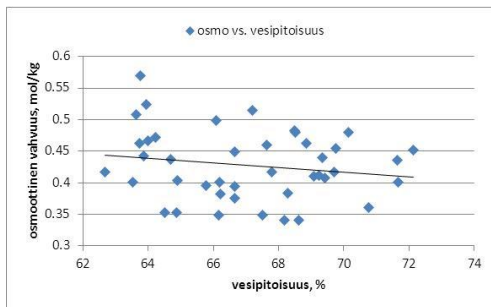
paremman käsityksen päivän maksimiarvoista. Lehtien osmoottinen vahvuus muuttuu kuitenkin eri tavalla esimerkiksi 30.6, jolloin se on suurimmillaan selvästi ennen päivän maksimihaihdutuksia ja näyttäisi pienenevän iltaa kohti (kuva 22). Mittausjaksoilla 4. – 8.7. ja 11. – 15.7. lehtien osmoottinen vahvuus kasvaa iltaa kohden ja tasaantuu yöaikaan (kuvat 23 ja 24). Osmoottisen vahvuuden muutos taas näyttäisi sattumanvaraiselta 19. – 26.7. (kuva 25).



Kuva 26. Lepän lehden osmoottisen vahvuuden ja vesipotentiaalilin riippuvuus 6. – 15.7. ja 19. – 26.7. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,008$; $n=42$; $p=0,585$.



Kuva 27. Lehden vesipotentiaalilin ja vesipitoisuuden riippuvuus toisistaan 6. – 15.7. ja 19. – 26.7. välisenä aikana. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,103$; $n=42$; $p<0,05$.

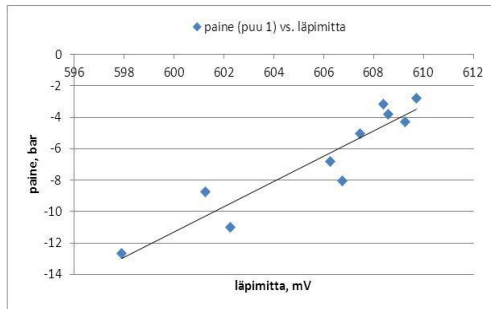


Kuva 28. Lehden osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden riippuvuus mittausjaksoilla 6. – 15.7. ja 19. – 26.7. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,029$; $n=42$; $p=0,279$.

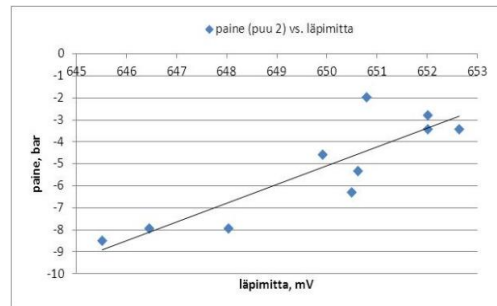
Tervalepällä tehdyissä mittauksissa lehtien osmoottiselle vahvuudelle ja lehden vesipotentiaalille ei löydetty minkäänlaista yhteyttä (kuva 26). Suurempi jännitys lehden ksyileemissä tarkoittaa pienempää vesipotentiaalia, jolloin ympäröivien solujen tulisi myös laskea omaa osmoottista potentiaaliaan turgor-paineen pitämiseksi yllä (Peltier ym. 1997). Tämä osmoottisen potentiaalilin lasku saataisiin aikaiseksi nostamalla solujen osmoottista vahvuutta. Jonkinlainen yhteys osmoottisen vahvuuden ja vesipotentiaalilin välillä siis oletusten mukaan tulisi olla. Lehtien osmoottisessa vahvuudessa on kuitenkin aikasarjakuvaajien perusteella nähtävissä johdonmukaisuutta ainakin 15.7. asti, sillä arvot usein nousevat päivän mittaan (kuvat 22-25). Sen sijaan lehden vesipotentiaalilin ja vesipitoisuuden tai vesipitoisuuden ja lehden osmoottisen vahvuuden välillä ei tällä aineistolla näyttäisi olevan mainittavaa riippuvuutta (kuvat 27 ja 28).

5.4 Männyn mittaussarja

5.4.1 Vesipotentiaali ja läpimitta

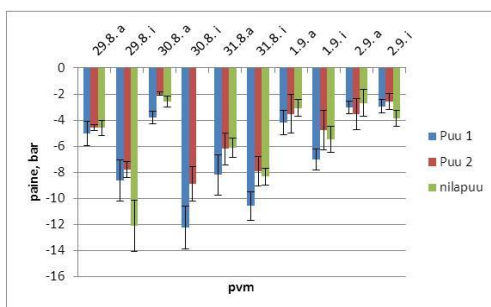


Kuva 29. Neulasten vesipotentiaali ja läpimitta männyllä nro 1 tehdyissä mittauksissa. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,879$; $n=10$; $p<0,01$.

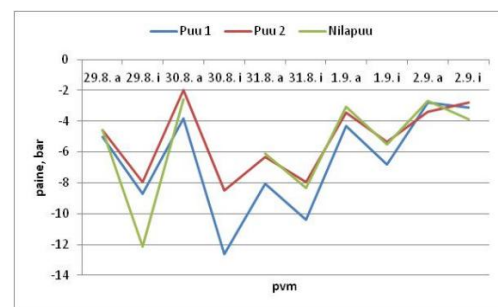


Kuva 30. Neulasten vesipotentiaali ja läpimitta männyllä nro 2 tehdyissä mittauksissa. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,770$; $n=10$; $p<0,01$.

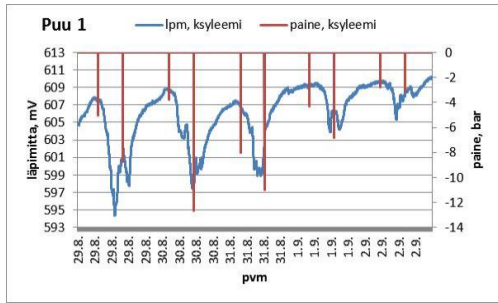
Neulasten vesipotentiaali seuraa läpimitan muutoksia johdonmukaisesti ja vielä molemmilla mittausspuilla 1 ja 2 samalla tavalla (kuvat 29 ja 30). "Nilapuulla" tehdyt mittaukset ovat huonompilaatuisia, sillä yhden puuttuvan mittaustuloksen lisäksi toisessa mittauksessa (29.8. iltapäivä) näytemäärä on vähäinen sekä näistä näytteistä saatujen arvojen hajonta suuri (kuva 31). Näitä kahta mittaussajankohtaa lukuun ottamatta nilapuu seuraa kuitenkin vahvasti puun nro 2 vesipotentiaalia. Kaikkien kolmen puun vesipotentiaalilla on vahva riippuvuus, mikä kuvastaa metsikön johdonmukaista käyttäytymistä vallitseviin olosuhteisiin. Puiden 1 ja 2 välinen riippuvuus vesipotentiaalimittauksissa on erittäin voimakas. Neulasten vesipotentiaali seuraa myös selkeästi ksyleemin läpimitan muutoksia eli käytännössä transpiraatiota. Vesipotentiaalimittaukset neulasista näyttäisivät siis kuvaavan ksyleemin vesipotentiaalia.



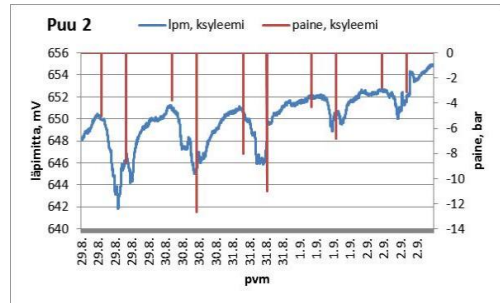
Kuva 31. Männyllä tehtyjen vesipotentiaalimittausten hajonta.



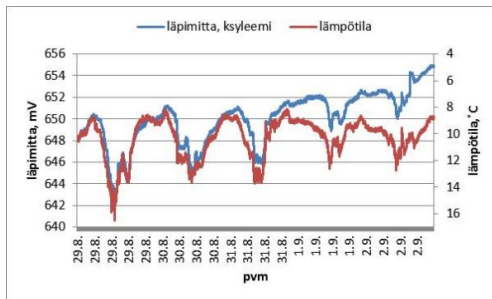
Kuva 32. Mäntyjen 1 ja 2 sekä "nilapuun" neulasista mitatun vesipotentiaalimittauksen käyttäytyminen jakson aikana. Symboli "a" tarkoittaa aamumittausta (n. klo 6:30 -7:00) ja "i" iltapäivämittausta (n. klo 15:00).



Kuva 33. Männyn nro 1 rungon läpimitta ja neulasista mitattu vesipotentiaali (punainen pylväs)



Kuva 34. Männyn nro 2 rungon läpimitta ja neulasista mitattu vesipotentiaali (punainen pylväs)

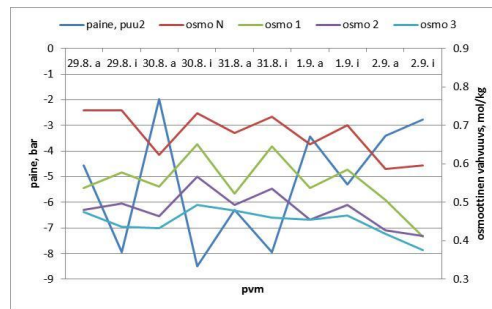


Kuva 35. Rungon läpimitan (puu 2) ja ilman lämpötilan käyttäytyminen jakson aikana.

Kaikkien kolmen puun vesipotentiaali näyttäisi käyttäytyvän samalla tavalla, aamulla lukema on pienempi kuin iltapäivällä (kuvat 32-34). Nilapuu seuraa puun nro 2 vesipotentiaalia melko tarkasti 29.8. iltapäivän poikkeavaa mittausta ja 30.8. iltapäivän puuttuvaa mittausta lukuun ottamatta. Molemmissa puissa 1 ja 2 neulasten vesipotentiaali on alhaisimmillaan toisena ja kolmantena päivänä, jolloin oli vielä poutaista. Viikon loppua kohden neulasten vesipotentiaali alkaa nousta kosteampien olosuhteiden myötä.

5.4.2 Nilapalojen ja neulasten osmoottiset vahvuudet

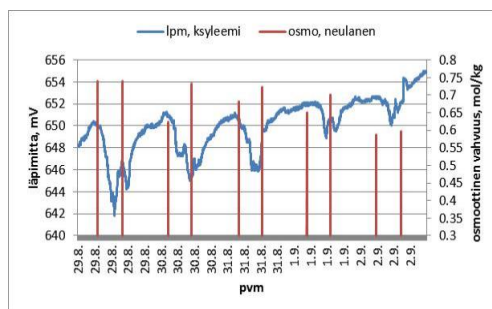
Osmoottiset vahvuudet neulasissa ja nilassa vaihtelevat neulasten vesipotentiaalin kanssa samalla tavalla (kuva 36). Kun vesipotentiaalin arvot ovat alhaisemmat, myös osmoottiset vahvuudet neulasissa ja kaikissa nilapaloissa ovat suuremmat. Arvot muuttuvat myös siten samassa suhteessa, että 31.8. sekä neulasten vesipotentiaalin arvo on alhaisimmillaan että kaikkien nilapalojen osmoottiset vahvuudet ovat mittausjaksolla suurimmillaan. Viikon loppua kohden olosuhteet kävivät sateisemmiksi, mikä näkyy ksyleemissä suurempana vesipotentiaalina ja näytteissä pienempinä osmoottisina vahvuuksina. Nilapalojen osmoottiset vahvuudet näyttäisivät jakson viimeisissä mittauksissa lähestyvän samaa arvoa. Tuolloin, jakson viimeisessä mittauksessa, neulaset näyttäisivät käyttäytyvän kuitenkin hieman eri tavalla. Osmoottiset vahvuudet neulasissa olivat keskipäivällä 0,7 – 0,75 mol/kg lukuun ottamatta viimeisen päivän mittauksia, jolloin neulasten osmoottinen vahvuus oli noin 0,6 mol/kg. Tuona viimeisenä mittauspäivänä oli hyvin sateista ja lämpötila oli alhainen (kuva 35).



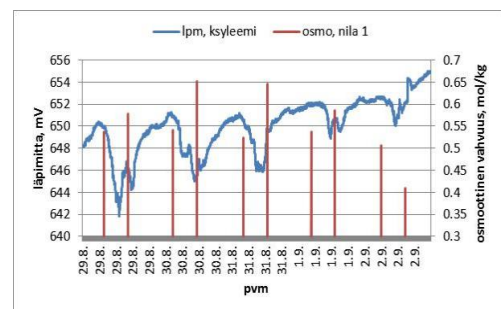
Kuva 36. Männyn nro 2 neulasten vesipotentiaali ("paine") sekä nilapuun neulasten ja nilapalojen osmoottiset vahvuudet. Symboli "a" tarkoittaa aamua ja "i" iltapäivää. Symboli "N" tarkoittaa neulasta ja numerot 1-3 nilapalan sijaintia puussa eli oksan nilaa (1), latvuksen alta kerättyä nilaa (2) ja kahden metrin korkeudelta rungosta kerättyä nilaa (3).

Osmoottisen vahvuuden arvot laskevat johdonmukaisesti puuta alaspäin mentäessä (kuva 36). Neulasissa arvot ovat suurimmat, seuraavaksi oksassa, rungossa elävän latvuksen alla ja pienimmät arvot ovat rungon alaosassa kahden metrin korkeudella. Alaspäin mentäessä myös päivittäinen vaihtelu pienenee. Voimakkainta päivittäinen vaihtelu näyttäisi olevan oksan nilassa. Rungon alaosasta kerättyssä nilapalassa vaihtelu ei enää ole yhtä selkeää kuin neulasissa tai muissa nilapaloissa. Kaikkien nilapalojen osmoottisten vahvuuksien minimi- ja maksimiarvot on saatu samoina mittaushetkinä. Myös kaikkien nilapalojen osmoottiset vahvuudet alkavat laskea viikon loppua kohden. Viikon viimeisissä mittauksissa ne lähestyvät samansuuruista osmoottista vahvuutta, noin 0,35 – 0,4 mol/kg.

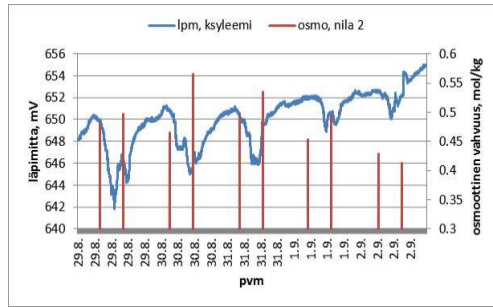
Seuraaviin vertailuihin on otettu päivien välistä käyttäytymistä kuvaamaan puun nro 2 läpimittadata, sillä nilapuun neulasten vesipotentiaali seurasi vahvasti puun nro 2 vesipotentiaalia, ja muuttujien riippuvuuskuvaajiin puiden 1 ja 2 paineiden keskiarvo



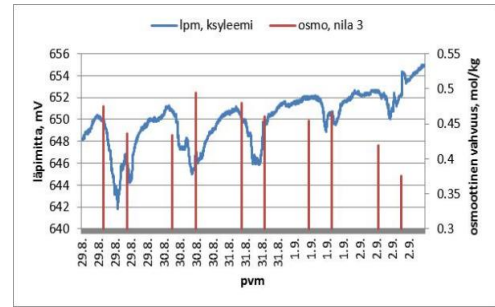
Kuva 37. Männyn nro 2 läpimitta ja "nilapuun" neulasen osmoottinen vahvuus. Aamumittaus on kuvassa nähtävistä päivittäisistä palkkipareista vasemmanpuolimmainen.



Kuva 38. Männyn nro 2 läpimitta ja "nilapuun" oksan nilapalan (nila 1) osmoottinen vahvuus. Aamumittaus on kuvassa nähtävistä päivittäisistä palkkipareista vasemmanpuolimmainen.

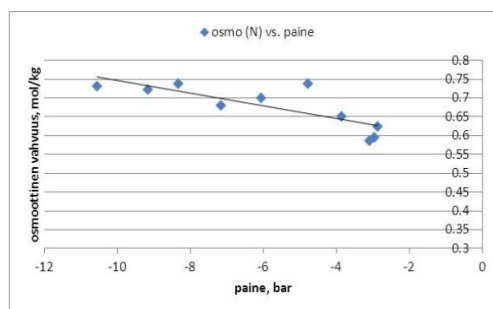


Kuva 39. Männyn nro 2 läpimitta ja "nilapuun" elävän latvuksen alapuolelta rungosta kerätyn nilapalan osmoottinen vahvuus. Aamumittaus on kuvassa nähtävistä päivittäisistä palkkipareista vasemmanpuolimmainen.

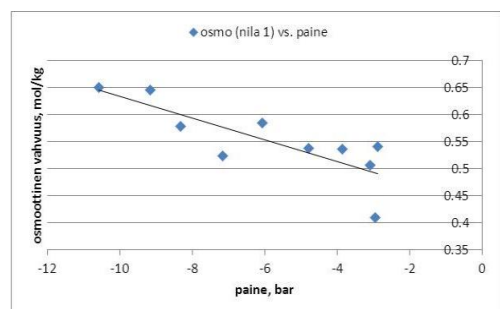


Kuva 40. Männyn nro 2 läpimitta ja "nilapuun" rungosta kahden metrin korkeudelta kerätyn nilapalan osmoottinen vahvuus. Aamumittaus on kuvassa nähtävistä päivittäisistä palkkipareista vasemmanpuolimmainen.

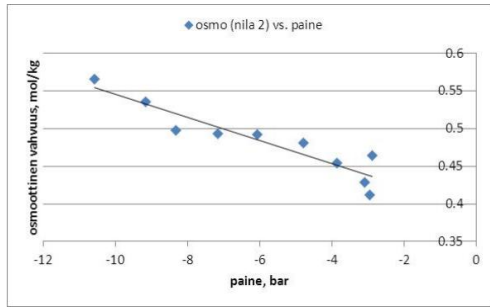
Osmoottinen vahvuus näyttäisi käyttäytyvän muiden paitsi rungon alaosaan kerätyn nilan (nila 3) kohdalla samankaltaisesti (kuvat 37-40). Neulasten sekä oksan ja latvuksen alaosaan nilan osmoottinen vahvuus on aamuisin pienin mittausjakson viimeistä aamua lukuun ottamatta. Sen sijaan rungon alaosaan nilan osmoottinen vahvuus on useimpina aamuina iltapäivän arvoa suurempi. Näytteiden osmoottisilla vahvuuksilla ja neulasten vesipotentiaalilla huomattiin useita vahvoja lineaarisia riippuvuuksia (kuvat 41-44). Neulasten ja oksasta kerätyn nilan osmoottisen vahvuuden riippuvuudet neulasten vesipotentiaalilla kanssa ovat samankaltaiset ja huomattavan voimakkaat (kuvat 41 ja 42). Oksan nilassa osmoottinen vahvuus vaihtelee kaikista voimakkaimmin. Vahvin riippuvuus neulasten vesipotentiaalilla kanssa on latvuksen alta kerätyssä nilassa (kuva 43). Tästä kohtaa kerätyllä nilalla on vahvin yhteys myös vesipitoisuuden kanssa, kuten seuraavassa osiossa käy ilmi. Rungon alaosaan nilan ja neulasten vesipotentiaalilla välinen riippuvuus on heikko.



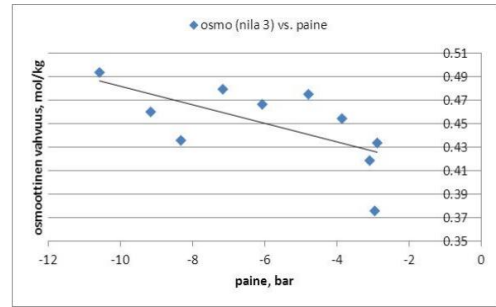
Kuva 41. "Nilapuun" neulasen osmoottisen vahvuuden ja puiden 1 ja 2 neulasten vesipotentiaalilla riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,641$; $n=10$; $p<0,01$.



Kuva 42. "Nilapuun" oksasta kerätyn nilapalan (nila 1) osmoottisen vahvuuden ja puiden 1 ja 2 neulasten vesipotentiaalilla riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,653$; $n=10$; $p<0,01$.

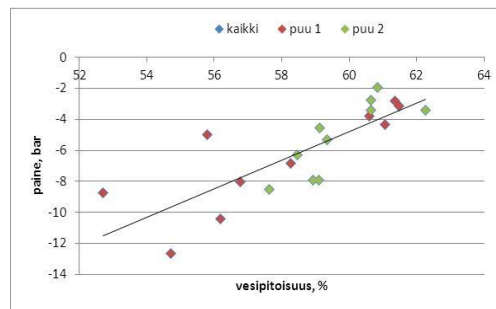


Kuva 43. Nilapuun latvuksen alapuolelta kerätyn nilapalan (nila 2) osmoottisen vahvuuden ja puiden 1 ja 2 neulasten vesipotentialin riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,866$; $n=10$; $p<0,01$.



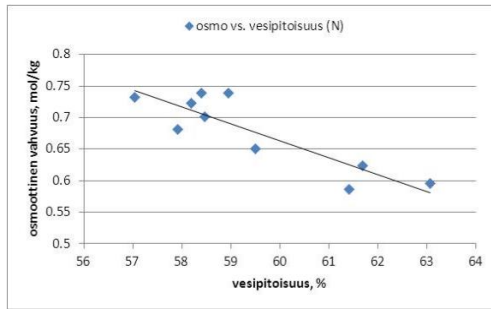
Kuva 44. Nilapuun rungosta kahden metrin korkeudelta kerätyn nilapalan (nila 3) osmoottisen vahvuuden ja puiden 1 ja 2 neulasten vesipotentialin riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2= 0,416$; $n=10$; $p<0,05$.

5.4.3 Vesipitoisuus neulas- ja nilanäytteissä

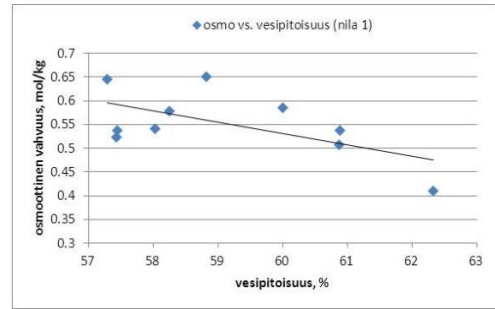


Kuva 45. Mäntyjen 1 ja 2 neulasista mitatun vesipotentialin ja näiden neulasten vesipitoisuuden välinen riippuvuus. Kuvassa "kaikki" tarkoittaa molempien puiden 1 ja 2 havaintoja, jotka sijaitsevat punaisten ja vihreiden pisteiden alla. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,645$; $n=20$; $p<0,001$.

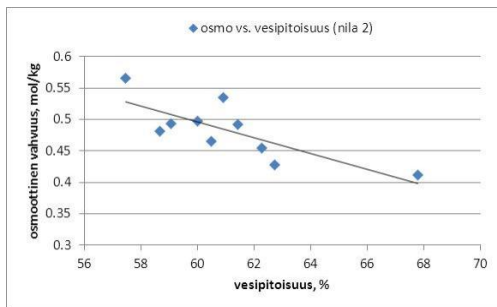
Puiden 1 ja 2 neulasten vesipitoisuuden ja neulasten vesipotentialin vertaileminen osoittaa huomattavan voimakasta riippuvuutta näiden muuttujien välille (kuva 45). Vielä vahvemmin kytköksissä toisiinsa näyttäisivät olevan neulasten vesipitoisuus niiden osmoottisen vahvuuden kanssa (kuva 46). Sen sijaan oksan nilalla (kuva 47) on heikko ja rungon alaosan nilalla (kuva 49) merkityksetön riippuvuus nilapalan vesipitoisuuden kanssa. Latvuksen alapuolelta kerätyn nilan (kuva 48) osmoottisella vahvuudella on lähes tilastollisestikin merkitsevää riippuvuutta nilan vesipitoisuuteen verrattuna. Vesipitoisuuden ja osmoottisen vahvuuden välillä ei ilmene riippuvuutta, kun vertailussa on mukana kaikki nilapalat. Sen sijaan nilapaloja yksitellen, etenkin latvuksen alta kerättyä nilaa, tarkastellessa riippuvuutta on nähtävissä (kuvat 47 – 49). Poikkeava havainto pisteparvikuvaajissa johtunee viimeisen mittauspäivän hyvin sateisista olosuhteista.



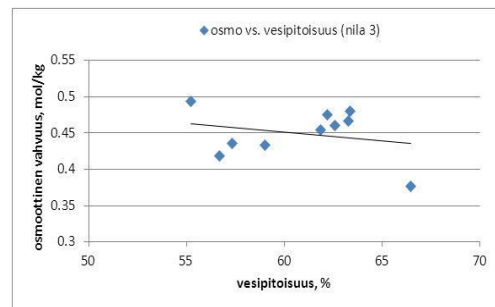
Kuva 46. Neulasten osmoottisen vahvuuden ja niiden vesipitoisuuden riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,764$; $n=10$; $p=0,001$.



Kuva 47. Oksasta kerätyn nilapalan (nila 1) osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,358$; $n=10$; $p=0,068$.



Kuva 48. Latvuksen alapuolelta kerätyn nilapalan (nila 2) osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,609$; $n=10$; $p<0,01$.



Kuva 49. Rungon alaosa kerätyn nilapalan (nila 3) osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2=0,064$; $n=10$; $p=0,479$.

5.4.4 Muuttujien kootut selitysasteet puuyksilöiden välillä

Alla olevassa taulukossa voidaan havaita yksittäinkin yhteisiä piirteitä kolmesta mitatusta männystä (taulukko 4). Vesipotentialimittausten voidaan havaita käyttäytyvän hyvin samalla tavalla eri puiden kesken. Osmoottisia vahvuuksia ja neulasten vesipotentialia verrattaessa on kaikilla kolmella puulla lähes suurin tai suurin selitysaste latvuksen alta kerätyllä nilalla (nila 2). Lisäksi, kaikilla kolmella puulla rungon alaosa kerätyllä nilapalalla selitysaste on kaikkein pienin. Taulukkoa tarkasteltaessa päädytään todennäköisesti kuitenkin lopulta kehäpäätelmään, sillä puiden kesken vertailtavat nilan osmoottiset vahvuudet ovat samoista, nilapuusta kerätyistä, nilapaloista. Vesipotentialimittaukset on kuitenkin tehty jokaisesta puusta erikseen. Jos nilan vesipotentialilla, käytännössä siis sen osmoottisilla vahvuuksilla, on riippuvuutta neulasten vesipotentialin kanssa, ja jos nilapuun sekä muiden puiden neulasten vesipotentialien välillä on myös vahva riippuvuus, on tuloksena nilan vesipotentialin riippuvuus kaikkien puiden välillä. Kuten aiemmin tekstissä on mainittukin, nilapuun vesipotentialin muutokset mittausjakson aikana olisivat todennäköisesti hyvin lähellä puun nro 2 mittauksia. Niinpä selitysasteita kannattaneen tarkastella puuhun nro 2 verraten.

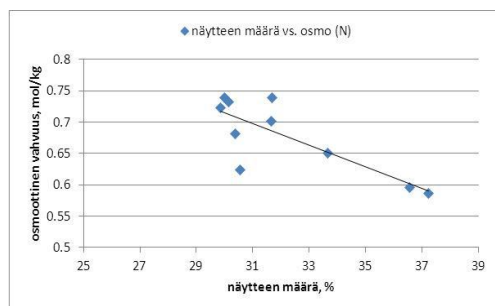
Taulukko 4. Selitysasteet, joissa on mitattujen yksittäisten puiden neulasten vesipotentiaali ("paine") verrattuna toisista puista mitattuihin vesipotentiaaleihin ja "nilapuun" nilapalojen sekä neulasten osmoottisiin vahvuuksiin ja vesipitoisuuteen. Nilapuu (9) sisältää yhdeksän havaintoa painemittauksista, sillä yhdeltä ajankohdalta tuo mittaus puuttuu. Vesipitoisuus puiden 1 ja 2 kohdalla (kaksi ensimmäistä riviä) on mitattu puiden 1 ja 2 neulasista. Muut vesipitoisuusmittaukset on tehty nilapuun näytteistä. Tilastollinen merkitsevyys: $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$ (erittäin merkitsevä).

	paine, puu 1	paine, puu 2	paine, nilapuu (9)	vesipitoisuus
paine, puu 1	1	$R^2 = 0,9011***$	$R^2 = 0,678**$	$R^2 = 0,648**$
paine, puu 2	$R^2 = 0,900***$	1	$R^2 = 0,825***$	$R^2 = 0,670**$
osmo, neulanen	$R^2 = 0,600**$	$R^2 = 0,658**$	$R^2 = 0,534*$	$R^2 = 0,764***$
osmo, nila 1	$R^2 = 0,697**$	$R^2 = 0,574*$	$R^2 = 0,285$	$R^2 = 0,358$
osmo, nila 2	$R^2 = 0,913***$	$R^2 = 0,754**$	$R^2 = 0,455*$	$R^2 = 0,609**$
osmo, nila 3	$R^2 = 0,435*$	$R^2 = 0,350$	$R^2 = 0,044$	$R^2 = 0,064$

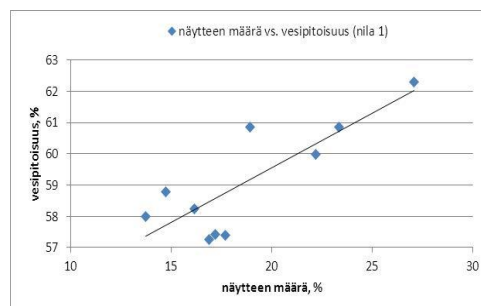
5.4.5 Nilanäytteiden preparointimenetelmän vaikutus

Taulukko 5. Selitysasteet, joissa on verrattu sentrifugilla nilapalasta ulos saatavan näytteen määrän riippuvuutta osmoottisen vahvuuden ja näytteiden vesipitoisuuden kanssa. "NM vs. Osm." tarkoittaa ulos tulevan näytteen määrän ja osmoottisen vahvuuden riippuvuutta ja "NM vs. VP" ulos tulevan näytteen ja vesipitoisuuden riippuvuutta. Tilastollinen merkitsevyys: $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$.

	Neulanen	nila 1	nila 2	nila 3
NM vs. Osm	$R^2 = 0,641**$	$R^2 = 0,474*$	$R^2 = 0,121$	$R^2 = 0,000$
NM vs. VP	$R^2 = 0,532*$	$R^2 = 0,670**$	$R^2 = 0,284$	$R^2 = 0,352$



Kuva 50. Näytteen määrän ja neulasten osmoottisen vahvuuden välinen riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2 = 0,641$; $n = 10$; $p < 0,01$.



Kuva 51. Näytteen määrän ja oksasta kerätyn nilan vesipitoisuuden riippuvuus. Kuvan muuttujien yhteisvaihtelun voimakkuus: $R^2 = 0,670$; $n = 10$; $p < 0,01$.

Nilapalat ja neulaset punnittiin ennen ja jälkeen sentrifugin, jotta nähtäisiin niistä ulos tulevan näytteen määrä. Tämä painojen erotus on suhteutettu nilapalan alkuperäiseen painoon ja verrattu taulukossa 6 osmoottiseen vahvuuteen sekä vesipitoisuuteen.

Neulasten osmoottisella vahvuudella ja näytteen määrällä näyttäisi olevan voimakas riippuvuus siten, että suuremmalla määrällä osmoottinen vahvuus laskee (kuva 50). Nilojen 2 ja 3 kohdalla näytteiden preparointiin käytetyllä menetelmällä ei näyttäisi olevan yhteyttä tulokseen. Oksasta kerätty nila on vaikeimmin tulkittavissa sekä taulukossa 5 että aiemmin taulukossa 4. Tästä kohtaa kerätyissä nilapaloissa on voimakas riippuvuus näytteen määrän ja vesipitoisuuden välillä (kuva 51) sekä kohtalainen riippuvuus näytteen määrän ja osmoottisen vahvuuden välillä.

6 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksen tavoitteena oli kerätä männyn nilasta sen sisältöä kuvaava näyte, ja mitata siitä osmoottista vahvuutta. Tiedolla nilan osmoottisesta vahvuudesta saataisiin tukea malleihin, joissa käytetään mitattua dataa ksyleemin ja nilan läpimitan muutoksista. Osittain tästä syystä selvitettiin myös, kuvaavatko ksyleemin läpimitan muutokset sen vesipotentialiaalia. Tieto ksyleemin vesipotentialista tukisi myös nilan vesipotentialin, eli käytännössä sen osmoottisten vahvuuksien, tulkintaa. Näille mittauksille haettiin vielä tukea mittaamalla nilapaloista vesipitoisuutta sekä lehdistä osmoottista vahvuutta ja vesipitoisuutta.

6.1 Ksyleemin läpimitta ja vesipotentialiaali

Läpimitan ja vesipotentialin muutokset on aiemmissa tutkimuksissa yhdistetty transpiraation muutoksiin. Sevanto ym. (2002) mukaan läpimitan muutokset kuvasivat ainakin männyllä hyvin myös transpiraation muutoksia (*sap flux*) ja Irvine ym. (1998) havaintojen mukaan myös neulasen vesipotentialin ja transpiraatiomittausten (*sap flux*) välillä oli lineaarista riippuvuutta. Lisäksi, Perämäki ym. (2005) ovat mallintamalla saaneet yhdistettyä läpimitan muutokset ksyleemin paineen muutoksiin niin, että samassa männikössä kuin tämän tutkimuksen puut. Myös tervalepän lehden vesipotentialin ja transpiraation välillä on aiemmin havaittu selkeä yhteys (Eschenbach ja Kappen 1999).

Lepällä ja etenkin männyllä ksyleemin läpimitta ja lehdestä mitattu ksyleemin vesipotentialiaali muuttuivat tässä tutkimuksessa samalla tavalla niin, että alhaisemmalla vesipotentialialla myös ksyleemin läpimitta oli pienempi lähes samassa suhteessa. Tervalepällä saaduissa tuloksissa voi olla enemmän vaihtelua kuin todellisuudessa, sillä kuvissa nähtävät mittaukset muodostuvat vain kahden lehden keskiarvosta, ja mittauksissa

on havaittavissa kohtalaista hajontaa. Lisäksi, maan kosteuden vaihteluilla voi olla vesipotentialiin vaikutusta, jota tämän tutkimuksen aineistolla ei kuitenkaan onnistuttu havaitsemaan. Nämä on tervalepällä saatuja arvoja tarkasteltaessa hyvä ottaa huomioon. Saadut tervalepän lehden vesipotentialit ovat tässä tutkimuksessa keskimäärin pienempiä kuin Eschenbach ja Kappen (1999) tekemässä tutkimuksessa. Peltier ym. (1997) taas saivat Ranskassa heinäkuussa tehdyssä tutkimuksessa tervalepän lehtien keskimääräiseksi vesipotentialiksi ennen aamunkoittoa -2,2 bar ja keskipäivällä -10 bar. Tässä tutkimuksessa yöllä mitattu vesipotentiali oli -2 bar eikä se päivällä yleensä laskenut alle -9 bar:in. Tämän tutkimuksen mittaukset lepällä vastaavat siis melko hyvin Peltier ym. (1997) tekemiä vesipotentialimittauksia. Aamun vesipotentialit ovat männyllä välillä -8 ja -2 bar, ja ne näyttäisivät tyydyttävästi sopivan samaan luokkaan Irvine ym. (1998) havaintojen kanssa. Heillä männyn aamunkoittoa edeltävä vesipotentiali (englanniksi *predawn water potential*) oli Skotlannissa elokuun lopussa noin -5 bar ja -2,5 bar välillä normaaleissa maan vesiolosuhteissa ja noin -8 bar ja -3 bar välillä kuivuuden vaivaamalla kasvualustalla.

Tulosten perusteella voidaan lehdestä mitatut ksyleemin vesipotentialin muutokset yhdistää transpiraation ja ksyleemin läpimitan muutoksiin tervalepällä kohtalaisesti ja männyllä erinomaisesti. Männyllä saadut tulokset tukevat siis myös Sevanto ym. (2002) sekä Perämäki ym. (2005) tekemiä havaintoja, joista mainittiin tämän osion alussa. Toisin sanoen, tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella lehdistä mitattu ksyleemin vesipotentiali on erityisesti männyllä vahvasti yhdistettävissä rungon ksyleemin vesipotentialiin, mikä voidaan ottaa huomioon nilan vesipotentialia tarkasteltaessa. Männyn tuloksia tarkasteltaessa on otettava kuitenkin huomioon myös mittausjakson lyhyt kesto, jolla voi olla vaikutusta tulosten yleistettävyyteen.

6.2 Ksyleemin ja nilan vesipotentiali

Nilanäytteiden osmoottisissa vahvuuksissa havaittiin ksyleemin vesipotentialin mukaista käyttäytymistä. Osmoottinen vahvuus oli suurin neulasissa ja se laski järjestyksessä runkoa tyveä kohti mentäessä niin, että pienin arvo oli rungon alaosasta kerätyssä nilassa. Vahvimmat riippuvuudet ksyleemin vesipotentialin kanssa saatiin latvuksen alapuolelta kerätystä nilasta ja neulasista. Heikoimmat riippuvuudet olivat kaikilla verrattavilla tekijöillä rungon alaosasta kerätyssä nilassa. Vesipitoisuuden ja osmoottisen vahvuuden riippuvuus oli voimakasta neulasissa ja kohtalaisen voimakasta latvuksen alapuolelta kerätyssä nilassa. Nila- ja neulasnäytteiden sokereiden määrien muutoksista ei ole tehty mittauksia tässä tutkimuksessa. Ei voida siis sanoa, johtuuko osmoottisissa vahvuuksissa selittämättä jäänyt vaihtelu sokerimäärien muutoksista.

Ksyleemin vesipotentialin ja osmoottisen vahvuuden välinen riippuvuus näyttäisi siis olevan voimakasta erityisesti neulasissa ja latvuksen alapuolelta kerätyssä nilassa. Tälle saadaan vielä vahvistusta, kun mukaan tarkasteluun otetaan vesipitoisuus. Vesipitoisuus näyttäisi muuttuvan melko samalla tavalla ksyleemin vesipotentialin kanssa, kun näitä verrataan neulasten tai latvuksen alta kerätyn nilan osmoottiseen vahvuuteen. Kovemman transpiraation aikaan ksyleemin alhaisempi vesipotentiali näyttäisi vetävän vettä nilasta, jolloin nilan vesipotentiali myös laskee. De Schepper ja Steppe (2010) mallinsivat tammella

(*Quercus robur* L.) ja euroopanpyökillä (*Fagus sylvatica* L.) ksyleemin ja nilan toimintaa hyödyntämällä mittauksia lehden kokonaisvesipotentiaalista ja ksyleemin vesipotentiaalista sekä rungon läpimitan muutoksista. Heidän mukaan osmoottinen vahvuus nilassa nousi sokereiden lastaamisen lisäksi vesipitoisuuden pienenemisen johdosta. Heidän tuloksensa myös vahvistivat aiempia havaittuja teorioita, joiden mukaan nilan paine muuttuu ksyleemin paineiden muutosten mukaan, ja että nilakuljetusta ajaisi pieni painegradientti. Nämä havainnot vaikuttavat järkeviltä myös tässä tutkimuksessa saatujen havaintojen perusteella. Myös Peuke ym. (2001) mukaan osmoottisen vahvuuden muutokset johtuisivat nilan vesimäärän muutoksista. Heidän mukaan sokereiden kuljetus olisi järkevää pitää tasaisena, sillä sokereiden läsnäolo nilassa auttaisi nilan soluja pitämään turgor-painetta yllä. Devaux ym. (2009) havaintojen mukaan nilanesteen sisältö ei rannikkomännnyllä (*P. pinaster*) muuttunut vuorokauden aikana tai edes päivittäisellä tasolla, mikä myös tukee teoriaa tasaisesta nilakuljetuksesta.

Suurin vaihtelu nilan osmoottisissa vahvuuksissa oli havaittavissa oksan nilassa. Brandes ym. (2006) ja Kodama ym. (2008) ovat havainneet hiilen isotooppijälkeä ($\delta^{13}\text{C}$) tarkastelevissa tutkimuksissaan, joilla selvitetään juuri yhteytetyn hiilen kulkua nilassa, oksan nilan ja neulasten isotooppijäljen välillä merkittävää korrelaatiota. Oksan nilan ja neulasten osmoottiset vahvuudet muuttuvat hyvin samalla tavalla ksyleemin vesipotentiaalin kanssa myös tässä tutkimuksessa. Muutokset oksan nilassa ovat kuitenkin selvästi heikommin yhteydessä vesipitoisuuteen kuin neulasissa tapahtuvat muutokset. Tämän lisäksi, suuret vaihtelut oksan nilassa herättävät kysymyksen, voisiko muutosten takana olla myös nilassa kuljetettavien sokereiden pitoisuuksien muutokset. Kovemalla haihdutuksellahan sokereiden kuljetus saattaisi hidastua viskositeetin nousun myötä (Hölttä ym. 2009), jolloin sokeripitoisuus lähteiden lähellä, kuten oksan nilassa, saattaisi korostua. Nilan osmoottisen vahvuuden muutoksiin näyttäisi ksyleemin vesipotentiaali vaikuttavan tässä tutkimuksessa kuitenkin sen verran vahvasti, että sokereiden kuljetukseen tarvittavaa paine-gradienttia on näistä mittauksista vaikea havaita. Mahdollista juuristoa kohti suuntautuvaa nilakuljetusta ei siis näistä mittauksista voi todennäköisesti nähdä. Rungon alaosaan kerätyn nilapalan osmoottinen vahvuus oli kuitenkin useimpina aamuina iltapäivän arvoa suurempi. Brandes ym. (2006) mukaan mänty keräsi päivisin neulasiinsa tärkkelystä, jota se yöaikaan kuljetti nilassa sakkaroosina. Tätä ajatellen rungon alaosaan suurempi osmoottinen vahvuus aamuisin voisi mahdollisesti johtua siis sokereiden kuljetukseen liittyvästä viiveestä latvasta rungon alaosaan. Tämä sekä muutokset oksan nilassa jäivät tässä tutkimuksessa kuitenkin vain arvailevan pohdinnan tasolle.

Nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet laskevat järjestyksessä latvasta tyvelle. Puun haihduttaessa vesi liikkuu kohti pienempää vesipotentiaalia, kuten osioissa "Turgor-paine ja transpiraatio" sekä "Ksyleemin negatiivinen paine (jännitys)" on käsitelty. Mikäli ksyleemin vesipotentiaali selittää rungon ylemmissä osissa hyvin tai kohtalaisesti myös osmoottisen vahvuuden muutoksia, ja mikäli vesipotentiaali siis suurenee runkoa alaspäin mentäessä, olisi johdonmukaista myös nilan vesipotentiaalin olla suurempi rungon alemmissä osissa. Latvuksen alaosaan kerättyssä nilapalassa on pienempi osmoottinen vahvuus kuin oksassa ja suurempi vahvuus kuin rungon alaosaan, mikä edellä mainittujen oletusten mukaan on järkevää. Merkittävästi tässä kohtaa nila on kuitenkin voimakkaimmin yhteydessä ksyleemin vesipotentiaaliin, jopa voimakkaammin kuin neulaset. Vesipitoisuus ei tässäkään

tapauksessa ole yhteydessä kuin osittain nilan osmoottisen vahvuuden muutoksiin, toisin kuin neulasissa. Tässä kohtaa runkoa nila oli myös huomattavan paljon paksumpaa kuin rungon alaosassa. Nila on kenties latvuksen alapuolella oltava paksumpi, sillä rungon alaosassa nila levittäytyy suuremmalle pinta-alalle ja kuitenkin juuristoa kohti kuljetettavien tuotteiden pitää kulkea molempien rungon osien kautta. Toisin sanoen, samanpaksuinen nila latvuksen alaosassa aiheuttaisi kenties pullonkaulan nilakuljetukseen. Nila ja ksyleemin vesipotentialin voimakas yhteys tässä kohtaa runkoa jää tällä erää kuitenkin selvittämättä. Kenties koko latvuksen veden tarve ja sokereiden kuljetus kohdistuvat suhteellisesti eniten tähän aivan latvuksen alapuolella olevaan puun nilaan.

Rungon alaosassa nilan osmoottinen vahvuus on kaikkein pienin mutta myös osmoottisen vahvuuden ja vesipitoisuuden riippuvuus lehdestä mitattuun ksyleemin vesipotentialiin verrattuna on siellä merkittävästi heikompi kuin muissa nilanäytteissä. Yhden mahdollisen selityksen voisi tarjota Sevanto ym. (2002) tekemä tutkimus, jonka mukaan rungon alaosasta mitattu ksyleemin läpimita tuli rungon ylempiä osia aina jäljessä. Tämä viive oli ksyleemin läpimitassa puun ylä- ja alaosan välillä rungon kapenemisen, eli haihdunnan voimistumisen, aikoihin noin 30 minuuttia. Rungon päältä, jossa siis myös nila on mukana, mitatun läpimitan viive puun yläosaan nähden oli vielä suurempi. Kerätessä nilapaloja tässä tutkimuksessa viive nilapalojen 1 ja 3 välillä oli noin 20 minuuttia sekä palojen 2 ja 3 välillä noin 10 minuuttia. Voi siis olla mahdollista, että rungon yläosassa tapahtuvat vesipotentialin muutokset eivät ehdi välittyä rungon alaosaan nilapaloja kerätessä. Brandes ym. (2006) tutkivat juuri yhteytetyn hiilen isotooppijäljen ($\delta^{13}\text{C}$) kulkua nilassa. Heidän mukaan nilasta löytyvän isotooppijäljen korrelaatio heikkeni, mitä kauemmas latvuksesta mentiin. Tuossa tutkimuksessa korrelaatio lehtien isotooppijäljen ja rungon alaosan kanssa parani vielä vuorokauden ajan. Heidän mukaan juuri yhteytetyllä hiilellä kestää siis noin vuorokauden ajan kulkea lehdistä rungon alaosaan. Mikäli otetaan huomioon Peuke ym. (2001) ja Devaux ym. (2009) tekemät päätelmät nilakuljetuksen tasaisuudesta, ei juuri yhteytetyn hiilen kulkua voida nilassa todennäköisesti havaita pelkästään osmoottisia vahvuuksia mittaamalla.

6.3 Neulasten ja lehtien osmoottinen vahvuus

Symplastisilla lastaajilla, eli passiivisesti nilaa lastaavilla, on Fu ym. (2011) mukaan matala hydraulinen konduktanssi. Niiden lehtien osmoottisen vahvuuden on siis oltava korkea, jotta niiden solut kestäisivät transpiraation lisäksi heikommasta vedenkuljetusväylän johtavuudesta seuraavia suurempia jännityksiä. Apoplastisilla lastaajilla on taas korkea hydraulinen konduktanssi eikä niillä ole sen vuoksi tarvetta pitää lehdistä yllä korkeaa osmoottista vahvuutta. Apoplastisten lastaajien ei nilakuljetuksen kannaltakaan ole tarvetta pitää yllä gradienttia lehden mesofyllisoluista nilaan, kuten symplastisilla nilan lastaajilla. Symplastista nilan lastaajaa tässä tutkimuksessa edusti mänty ja apoplastista lastaajaa pilaritervaleppä.

Rennie ja Turgeon (2009) keräsivät jäädytyksen jälkeen sulaneista lehdistä lehtien nestettä ja mittasivat niistä osmoottista vahvuutta. Lehdet kerättiin puolenpäivän aikaan kesä-, heinä- ja elokuussa. Heidän tutkimuksessaan ei ollut mukana tervaleppää mutta mukana oli

lumikellopuu (*Halesia tetraptera*), jonka Fu ym. (2011) ovat luokitelleet nilan lastaustavan ja kuljetettavien tuotteiden mukaan samaan luokkaan tervalepän kanssa. Lumikellopuun lehtien osmoottinen vahvuus oli luokkaa 0,6 mol/kg. Tervalepän lehtien osmoottinen vahvuus vaihteli tämän tutkimuksen mittausjaksojen aikana välillä 0,320 – 0,570 mol/kg kun männyllä neulasten osmoottinen vahvuus vaihteli välillä 0,6 – 0,75 mol/kg. Liesche ja Schulz (2012) tekemässä tutkimuksessa passiivisilla nilan lastaajilla lehden osmoottinen vahvuus oli yli kaksinkertainen apoplastisiin lastaajiin verrattuna. Tuossa tutkimuksessa männyn taimien neulasten osmoottiset vahvuudet olivat iltapäivällä tehdyissä mittauksissa keskimäärin 0,8 mol/kg. Tässä tutkimuksessa männyn neulasen osmoottinen vahvuus ei aivan yhtä selkeästi ollut lepän lehden osmoottista vahvuutta korkeampi. Tervalepällä tehdyt mittaukset tehtiin alku- ja keskikesällä, jolloin lämpötila oli selvästi korkeampi loppukesällä tehtyihin männyn mittauksiin verrattuna. Tämä männyn ja lepän arvojen erilainen suhde voi ainakin osittain siis johtua näistä mittausajankohtien eroista. Männyn neulasten osmoottinen vahvuus oli kuitenkin iltapäivämittauksissa muina ajankohtina aina lähes 0,75 mol/kg paitsi viikon viimeisessä mittauksessa, jolloin olosuhteet olivat hyvin kosteat. Männyn nilan ja neulasten osmoottinen vahvuus muistutti samaa, kuin mitä teoriapohjan mukaisella symplastisella nilan lastaajalla voisi arvojen kuvitella olevan. Neulasista mitattu osmoottinen vahvuus oli selkeästi oksan nilasta saatuja arvoja korkeampi, mikä tukee myös ajatusta pitoisuusgradientista neulasista nilaan.

Peltier ym. (1997) tutkimuksessa useimpien tarkasteltujen puulajien lehden osmoottinen vahvuus nousi päivän mittaan. Myös tervalepällä havaittiin samanlaista käyttäytymistä. Tervaleppä sääti muihin puulajeihin verrattuna lehtiensä osmoottista vahvuutta päivän mittaan kuitenkin vain vähäsen. Se mukautui kovempaan transpiraatioon ennemmin sulkemalla ilmarakojaan kuin säätämällä lehden solujen osmoottista vahvuutta. Tervalepän lehden osmoottinen vahvuus on tässäkin tutkimuksessa useimmiten aamumittauksissa pienimmillään. Lehden osmoottisella vahvuudella ja vesipotentiaalilla ei kuitenkaan ole tässä tutkimuksessa yhteyttä. Ilmarakojen säätö voi osittain tarjota selityksen, miksi näiden välillä yhteyttä ei nähdä.

Männyn neulasten osmoottinen vahvuus ja vesipotentiaali ovat samaa suuruusluokkaa kuin Irvine ym. (1998) tekemässä tutkimuksessa, mikäli osmoottinen vahvuus muutetaan osmoottiseksi potentiaaliksi teoreettisiin olosuhteisiin pätevällä kaavalla (yhtälö 2). Irvine ym. (1998) tutkimuksessa Skotlannissa elokuun 31. päivä männyn neulasten suurin keskipäivän jännitys oli puulle suotuisissa olosuhteissa -6,8 bar ja kuivissa olosuhteissa -10,8 bar. Neulasten osmoottinen paine tuossa tutkimuksessa oli -1,57 MPa suotuisissa ja -1,72 MPa kuivissa olosuhteissa. Neulasten keskipäivän jännitys tässä tutkimuksessa oli alhaisimmillaan -8,5 bar ja neulasten osmoottinen paine vaihteli välillä -1,78 MPa ja -1,42 MPa. Neulasten osmoottinen vahvuus oli vahvasti yhteydessä niiden vesipitoisuuden muutoksiin. Niiden vesipitoisuus oli myös vahvasti yhteydessä ksyleemin vesipotentiaalain muutoksiin. Neulasten osmoottisten vahvuuksien muutokset näyttäisivät tässä tutkimuksessa siis johtuneen pääasiassa transpiraation vaihtelujen aiheuttamista muutoksista neulasten solujen vesipotentiaaliin.

6.4 Jäädetytjen nilanäytteiden preparointi sentrifugilla – menetelmän vaikutus tuloksiin

Nilanäytteet jäädetyttiin ja sulatettiin ennen sentrifugissa käyttöä, kuten osiossa "Aineisto ja menetelmät" on kuvailtu. Johdannon osiossa "Jäädetyksen vaikutus solujen sisältöön ja solukalvoihin" pohdittiin jäädetyksen vaikutusta myös näytteen koostumukseen. Jäädetyksen vaikutus näytteiden koostumukseen jäi toistaiseksi avoimeksi. Jäädetyksen toivottiin rikkovan solukalvoja niin, että ulos saataisiin hyvin sekoittunut liuos nilan sekä nilan solujen sisältöä. Voisi kuitenkin olla mahdollista, että kaikki solujen sisältö ei soluista pääsisi ulos, ja että jäädetyksen seurauksena solujen ulkopuolelle jäisi enemmän vettä kuin sitä siellä oli nilapalojen keräyshetkellä. Siten myös osmoottinen vahvuus näytteissä saattaisi olla todellisuutta alhaisempi.

Menetelmän vaikutuksen tarkastelussa näytemäärät on suhteutettu niiden tuorepainoon, joten suuremmalla nilapalan vesipitoisuudella saatava suurempi näytteen määrä lienee luontevaa. Erikoista kuitenkin on, että tuo näytteen määrän yhteys sen osmoottiseen vahvuuteen vaihtelee suuresti näytteiden kesken. Näytteen määrä on siis mitattu samasta nilapalasta kuin on mitattu osmoottinen vahvuus. Jos osmoottinen vahvuus on vahvasti yhteydessä näytteen määrään saattaa vedellä silloin olla näytettä laimentava vaikutus, sillä hyvin sekoittuneella näytteellä osmoottinen vahvuus tulisi olla sama näytteen määrästä riippumatta. Osittain näytteen määrän ja osmoottisen vahvuuden välinen yhteys saattaa johtua yksinkertaisesti näytteen korkeammasta vesipotentiaalista, jolloin osmoottisen vahvuuden kuuluu ollakin pienempi.

Neulasten osmoottisen vahvuuden vaihteluihin näyttäisi myös tämän vertailun perusteella vahvimmin vaikuttavan vesipitoisuuden muutokset. Neulasten vesipitoisuudella on vahva riippuvuus osmoottisen vahvuuden, ksyleemin vesipotentiaalin sekä näytteen määrän kanssa. Koska ksyleemin vesipotentiaalimittaukset ovat kuitenkin yhteydessä ksyleemin läpimittaan ja neulasten vesipitoisuus- tai osmoottisen vahvuuden mittaukset on kaikki tehty erillisillä neulasilla, ja koska neulasten osmoottisella vahvuudella ja vesipitoisuudella on molemmilla kuitenkin tilastollisesti merkitsevä riippuvuus ksyleemin vesipotentiaalin kanssa, lienee pohjimmainen syy näihin neulasten muutoksiin ennemmin ksyleemin vesipotentiaalin muutokset kuin menetelmän aiheuttama vaikutus. Sen sijaan latvuksen alta kerätyllä nilalla on kaikista nilapaloista voimakkain riippuvuus ksyleemin vesipotentiaalin kanssa ja kuitenkin merkityksetön riippuvuus näytteen määrän ja osmoottisen vahvuuden välillä. Sen vesipitoisuuden ja näytteen määrän yhteys on myös heikko. Rungon alaosaan kerätty nila on myös mielenkiintoinen, sillä sen osmoottiseen vahvuuteen ei näytä vaikuttavan käytetty menetelmä tai nilapalan vesipitoisuus. Sillä kuitenkin on heikko yhteys ksyleemin vesipotentiaaliin, ja näytteen suhteellinen määrä näyttäisi luontevasti hieman kohoavan korkeamman vesipitoisuuden myötä. Oksan nilan osmoottinen vahvuus muuttuu samankaltaisesti nilapalan vesipitoisuuden kanssa. Näytteen määrällä ja osmoottisella vahvuudella myös on jonkinlainen yhteys. Menetelmän vaikutuksen arviointi oksan nilan osmoottiseen vahvuuteen on kuitenkin näytteistä vaikeimmin tulkittavissa. Oksan nilan osmoottinen vahvuus oli myös suhteessa muihin muuttujiin hankalasti arvioitavissa, mikä saattaisi kuvata menetelmän tuloksia häiritsevää vaikutusta.

7 Johtopäätökset

Teoriapohja ksyleemin ja nilan vesipotentialien tasapainottelusta sekä vesipitoisuuden ja näytteiden osmoottisen vahvuuden yhteys siihen näyttää toimineen hyvänä oletuksena tutkimuksen taustalla. Nilan osmoottinen vahvuus, eli sen osmoottinen potentiaali, näyttäisi männyllä seuraavan vahvasti ksyleemin vesipotentialin muutoksia. Myös neulasista mitatut osmoottiset vahvuudet sopivat teoriataustaan, jossa männyllä on paljassiemeniselle tyypilliset passiivisesti nilaa lastaavan tyyppin ominaisuudet. Lisäksi, lepän lehtien ja männyn neulasten osmoottisten vahvuuksien ja vesipotentialien arvot näyttävät olevan samaa suuruusluokkaa kuin kirjallisuudesta löydetyt aiemmat havainnot. Näytteiden osmoottisten vahvuuksien arvot saattavat olla hieman todellisuutta pienemmät johtuen näytteiden preparoimiseen käytetystä menetelmästä. Siinä veden määrä näytteissä saattaa korostua, kun ne jäädytyksestä sulamisen jälkeen erotellaan sentrifugilla. Kirjallisuudessa saatuihin arvoihin verrattuna lehtien osmoottiset vahvuudet eivät kuitenkaan, etenkin männyllä, suuresti poikkea. Tarkemmat johtopäätökset tervalepän ksyleemin vesipotentialin ja läpimitan yhteydestä vaativat lisää tutkimusta, sillä tässä aineistossa lepällä tehdyissä mittauksissa keskiarvo muodostui vain kahden lehden perusteella. Mäntymittaukset sen sijaan vahvistivat jo aiemmin kirjallisuudessa esiintyneitä näkemyksiä ksyleemin vesipotentialin ja läpimitan muutosten vahvasta yhteydestä vaikka tarkasteltava jakso oli melko lyhyt. Ksyleemin läpimitan muutoksista saatiin siis hyvin tukea ksyleemin vesipotentialin tarkasteluun, josta taas saatiin tukea nilan vesipotentialimittausten tulkintaan.

Mittaukset nilan osmoottisista vahvuuksista olivat onnistuneet erityisesti siksi, että neulasista mitattu ksyleemin vesipotentiali muuttui samalla tavalla läpimitanmuutosten sekä eri osista puuta kerättyjen nilanäytteiden osmoottisen vahvuuden kanssa. Eri osista puuta kerätyt nilanäytteet osoittivat ksyleemin vesipotentialin muutosten todennäköisesti vaikuttavan nilan toimintaan kohtalaisen nopeasti myös muissa osissa puuta. Mittausten onnistumiseen vaikutti oleellisesti se, että asiaa lähestyttiin useasta näkökulmasta. Tutkimusta aloitettaessa ei tiedetty, miten männyn nilapaloista saataisiin kerättyä näytettä, ja mitä näytteestä saatava osmoottinen vahvuus pitäisi sisällään. Osmoottisen vahvuuden ajateltiin kenties paljastavan sokereiden määrien muutoksia nilassa, joita tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan onnistuttu varmuudella havaitsemaan. Tämän tutkimuksen menetelmillä saatujen tulosten perusteella siis nilan osmoottinen potentiaali näyttäisi muuttuvan pääasiassa ksyleemin vesipotentialin muutosten mukaan ja nuo osmoottisen potentiaalin vaihtelut johtunevat suurelta osin vesimäärien muutoksista nilassa. Osmoottinen potentiaali nilassa ei ole täsmälleen sama asia kuin nilan vesipotentiali. Nilan vesipotentialin pääasiallisena tekijänä se kuitenkin antaa hyvän käsityksen nilan vesipotentialin muutoksista.

Tutkimuksessa avoimiksi kysymyksiksi jäivät erityisesti latvuksen alapuolelta kerätyn nilan voimakas yhteys ksyleemin vesipotentialin muutoksiin sekä rungon alaosan heikko yhteys

näihin muutoksiin. Lisäksi, nilänäytteiden preparointiin käytettävän menetelmän vaikutuksen arviointi vaatisi muilla menetelmillä saatuja vertailtavia arvoja männyn nilan osmoottisista vahvuuksista. Sokereiden määrien suhteellisten muutosten havaitseminen nilan osmoottisia vahvuuksia mittaamalla voisi onnistua silloin, kun puu ei haihduta ja ksyleemin vaikutus nilan vesipotentiaaliin on huomattavasti pienempi. Tutkimuksessa käytetyt tilastolliset menetelmät olivat suuntaa antavia ja oletukset niiden taustalla yksinkertaistuksia tarkasteltavasta systeemistä. Yksinään niiden perusteella ei siis vielä voi tehdä varmoja johtopäätöksiä tarkasteltujen muuttujien syy-yhteyksistä. Tulevat tutkimukset kenties valaisevat enemmän, voisiko nilan vesipotentiaalin muutoksia havaita luotettavasti pelkästään ksyleemin ja nilan läpimittoja tutkimalla.

8 Lähteet

- Amiard, V., Morvan-Bertrand, A., Cliquet, J., Billard, J., Huault, C., Sandstrom, J. & Prud'homme, M. 2004. Carbohydrate and amino acid composition in phloem sap of *Lolium perenne* L. before and after defoliation. *Can J Bot* 82(11): 1594-1601.
- Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H., Yang, Y. & Burg, M. 1986. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J Biol Chem* 261(13): 5872-5877.
- Ball, M., Canny, M., Huang, C. & Heady, R. 2004. Structural changes in acclimated and unacclimated leaves during freezing and thawing. *Functional plant biology : FPB*. 31(1): 29-40.
- van Bel, A. J. E. 1996. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *Journal of experimental botany* 47: 1129-1140.
- van Bel, A. J. E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* 26(1): 125-149.
- Brandes, E., Wenninger, J., Koeniger, P., Schindler, D., Rennenberg, H., Leibundgut, C. ym. 2007. Assessing environmental and physiological controls over water relations in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stand through analyses of stable isotope composition of water and organic matter. *Plant, Cell & Environment* 30(1): 113-127.
- Brandes, E., Kodama, N., Whittaker, K., Weston, C., Rennenberg, H., Keitel, C. ym. 2006. Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris*: effects of photosynthetic and postphotosynthetic carbon isotope fractionation. *Global Change Biology* 12(10): 1922-1939.
- van Breusegem, F. & Dat, J. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141(2): 384-390.

- Dannoura, M., Maillard, P., Fresneau, C., Plain, C., Berveiller, D., Gerant, D. ym. 2011. In situ assessment of the velocity of carbon transfer by tracing ^{13}C in trunk CO_2 efflux after pulse labelling: variations among tree species and seasons. *New Phytologist* 190(1): 181-192.
- Davidson, A., Keller, F. & Turgeon, R. 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* 248(1): 153-163.
- De Schepper, V. & Steppe, K. 2010. Development and verification of a water and sugar transport model using measured stem diameter variations. *Journal of experimental botany* 61(8): 2083-2099.
- Devaux, M., Ghashghaie, J., Bert, D., Lambrot, C., Gessler, A., Bathellier, C. ym. 2009. Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23(16): 2511-2518.
- Dixon, H. H. 1914. *Transpiration and the ascent of sap in plants*. MacMillan, London.
- Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. & Woltering, E. J. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* 18: 1241-1246.
- Ehlers, K., Knoblauch, M. & Bel, A. J. E. 2000. Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: Minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* 214(1-2): 80-92.
- Eschenbach, C. & Kappen, L. 1999. Leaf water relations of black alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growing at neighbouring sites with different water regimes. *Trees* 14(1): 28-38.
- Fagerstedt, K., Pellinen, K., Saranpää, P. & Timonen, T. 1996. *Mikä puu - mistä puusta*. 1st edition. Yliopistopaino, Helsinki. 180-15 p.
- Fu, Q., Cheng, L., Guo, Y. & Turgeon, R. 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiol* 157(3): 1518-1527.
- Fuller, B. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25(6): 375-388.
- Gessler, A., Rennenberg, H. & Keitel, C. 2004. Stable Isotope Composition of Organic Compounds Transported in the Phloem of European Beech - Evaluation of Different Methods of Phloem Sap Collection and Assessment of Gradients in Carbon Isotope Composition during Leaf-to-Stem Transport. *Plant Biology* 6(6): 721-729.
- Glockmann, C. & Kollmann, R. 1996. Structure and development of cell connections in the phloem of *Metasequoia glyptostroboides* needles I. Ultrastructural aspects of modified primary plasmodesmata in Strasburger cells. *Protoplasma* 193(1-4): 191-203.

- Hacke, U. G., Sperry, J. S., Pockman, W. T., Davis, S. D. & McCulloh, K. A. 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126(4): 457-461.
- Hansen, J. & Beck, E. 1994. Seasonal changes in the utilization and turnover of assimilation products in 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Trees* 8(4): 172-182.
- Hölttä, T., Mencuccini, M. & Nikinmaa, E. 2009. Linking phloem function to structure: Analysis with a coupled xylem-phloem transport model. *Journal of theoretical biology* 259(2): 325-337.
- Hölttä, T., Vesala, T., Sevanto, S., Perämäki, M. & Nikinmaa, E. 2006. Modeling xylem and phloem water flows in trees according to cohesion theory and Münch hypothesis. *Trees* 20(1): 67-78.
- Hölttä, T., Mäkinen, H., Nöjd, P., Mäkelä, A. & Nikinmaa, E. 2010. A physiological model of softwood cambial growth. *Tree physiology* 30(10): 1235-1252.
- Irvine, J., Perks, M. P., Magnani, F. & Grace, J. 1998. The response of *Pinus sylvestris* to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. *Tree physiology* 18(6): 393-402.
- Jarvis, P. G. 1976. The Interpretation of the Variations in Leaf Water Potential and Stomatal Conductance Found in Canopies in the Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 273(927): 593-610.
- Jensen, K. H., Liesche, J., Bohr, T. & Schulz, A. 2012. Universality of phloem transport in seed plants. *Plant, Cell & Environment* 35(6): 1065-1076.
- King, R. & Zeevaart, J. 1974. Enhancement of Phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol* 53(1): 96-103.
- Knoblauch, M. & Peters, W. S. 2010. Münch, morphology, microfluidics - our structural problem with the phloem. *Plant, Cell & Environment* 33(9): 1439-1452.
- Kozlowski, T. T. 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *The Botanical Review* 58(2): 107-222.
- Kramer, P. J. & Kozlowski, T. T. 1979. *Physiology of woody plants*.
- Lalonde, S., Wipf, D. & Frommer, W. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55: 341-372.
- Liesche, J. & Schulz, A. 2012. In vivo quantification of cell coupling in plants with different phloem-loading strategies. *Plant Physiology* 159(1): 355-365.
- Liesche, J., Martens, H. & Schulz, A. 2011. Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma* 248(1): 181-190.
- Lin, J., Jach, M. E. & Ceulemans, R. 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO₂. *New Phytologist* 150(3): 665-674.

- Mazur, P. 1961. Physical and temporal factors involved in the death of yeast at subzero temperatures. *Biophys J* 1247-264.
- Mazur, P. 1963. Kinetics Of Water Loss From Cells At Subzero Temperatures And The Likelihood Of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47: 347-369.
- Mencuccini, M., Hölttä, T., Sevanto, S. & Nikinmaa, E. 2013. Concurrent measurements of change in the bark and xylem diameters of trees reveal a phloem-generated turgor signal. *New Phytologist*.
- Minchin, P. E. H. 2007. Mechanistic modelling of carbon partitioning. *Julkaisussa: Vos, J.; Marcelis, L.F.M.; de Visser, P.H.B.; Struik, P.C.; Evers, J.B. Functional-structural plant modelling in crop production. Dordrecht, the Netherlands: Springer* 113-122.
- Münch, E. 1930. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze. s.n.]*, Jena.
- Palta, J. P. & Li, P. H. 1980. Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory. *Physiologia Plantarum* 50(2): 169-175.
- Pearce, R. S. 2001. Plant Freezing and Damage. *Annals of Botany* 87(4): 417-424.
- Peltier, J. P., Marigo, D. & Marigo, G. 1997. Involvement of malate and mannitol in the diurnal regulation of the water status in members of Oleaceae. *Trees* 12(1): 27-34.
- Perämäki, M., Vesala, T. & Nikinmaa, E. 2005. Modeling the dynamics of pressure propagation and diameter variation in tree sapwood. *Tree physiology* 25(9): 1091-1099.
- Perämäki, M., Nikinmaa, E., Sevanto, S., Ilvesniemi, H., Siivola, E., Hari, P. & Vesala, T. 2001. Tree stem diameter variations and transpiration in Scots pine: an analysis using a dynamic sap flow model. *Tree physiology* 21(12-13): 889-897.
- Peuke, A. D., Rokitta, M., Zimmermann, U., Schreiber, L. & Haase, A. 2001. Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant, Cell & Environment* 24(5): 491-503.
- Poyatos, R., Llorens, P., Pinol, J. & Rubio, C. 2008. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) to soil and atmospheric water deficits under Mediterranean mountain climate. *Annals of Forest Science* 65(3): 306-306.
- Rasmussen, D. H. & MacKenzie, A. P. 1972. Effect of solute on ice-solution interfacial free energy; calculation from measured homogeneous nucleation temperatures. *Julkaisussa: Jellinek, H.H.G. Water structure at the water-polymer interface.* 126-145.
- Rennenberg, H., Schneider, S. & Weber, P. 1996. Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field. *Journal of experimental botany* 47(10): 1491-1498.

- Rennie, E. A. & Turgeon, R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(33): 14162-14167.
- Riikonen, A. & Nikinmaa, E. 2010. Viikin katupuuhanke - seurantaraportti. Helsingin kaupungin rakennusviraston julkaisut 1: 10.
- Ryypö, A., Sutinen, S., Mäenpää, M., Vapaavuori, E. & Repo, T. 1997. Frost damage and recovery of Scots pine seedlings at the end of the growing season. *Canadian Journal of Forest Research* 27(9): 1376-1382.
- Sack, L. & Holbrook, N. 2006. Leaf hydraulics. *Annu Rev Plant Biol* 57: 361-381.
- Samuels, A., Rensing, K., Douglas, C., Mansfield, S., Dharmawardhana, D. & Ellis, B. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216(1): 72-82.
- Scholander, P., Bradstreet, E., Hemmingen, E. & Hammel, H. 1965. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148(3668): 339-346.
- Sevanto, S., Vesala, T., Perämäki, M. & Nikinmaa, E. 2002. Time lags for xylem and stem diameter variations in a Scots pine tree. *Plant, Cell & Environment* 25(8): 1071-1077.
- Sevanto, S., Vesala, T., Perämäki, M. & Nikinmaa, E. 2003. Sugar transport together with environmental conditions controls time lags between xylem and stem diameter changes. *Plant, Cell & Environment* 26(8): 1257-1265.
- Sevanto, S., Hölttä, T. & Holbrook, N. M. 2011. Effects of the hydraulic coupling between xylem and phloem on diurnal phloem diameter variation. *Plant, Cell & Environment* 34(4): 690-703.
- Silk, W. & Wagner, K. 1980. Growth-sustaining Water Potential Distributions in the Primary Corn Root: A Noncompartmented continuum model. *Plant Physiol* 66(5): 859-863.
- Sperry, J. S., Hacke, U. G. & Pittermann, J. 2006. Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *Am J Bot* 93(10): 1490-1500.
- Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol. (US)* 35: 543-584.
- Taiz, T. & Zeiger, E. 2010. *Plant physiology. (International edition)*: 67-78, 88-102, 272-279.
- Taiz, T. & Zeiger, E. 2010. Topic 3.6: Measuring Water Potential. *Plant Physiology Fifth Edition Online*. <http://5e.plantphys.net/> 2012(12/10): .
- Teskey, R. O., Saveyn, A., Steppe, K. & McGuire, M. A. 2008. Origin, fate and significance of CO₂ in tree stems. *New Phytologist* 177(1): 17-32.
- Thompson, M. V. & Holbrook, N. M. 2003. Scaling phloem transport: water potential equilibrium and osmoregulatory flow. *Plant, Cell and Environment* 26(9): 1561-1577.

- Thompson, M. V. & Holbrook, N. M. 2004. Scaling phloem transport: information transmission. *Plant, Cell and Environment* 24(4): 509-519.
- Turgeon, R. 2010. The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiol* 152(4): 1817-1823.
- Turgeon, R. & Wolf, S. 2009. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 60: 207-221.
- Turgeon, R. & Medville, R. 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(20): 12055-12060.
- Turner, N. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* 9(4): 289-308.
- Voitsekhovskaja, O. V., Koroleva, O. A., Batashev, D. R., Knop, C., Tomos, A. D., Gamalei, Y. V. et al. 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant Physiology* 140(1): 383-395.
- Vreugdenhil, D. 1985. Source-to-sink gradient of potassium in the phloem. *Planta* 163(2): 238-240.
- Windt, C. W., Vergeldt, F. J., De Jager, P. Adrie & Van As, H. 2006. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant, Cell & Environment* 29(9): 1715-1729.
- Wolfe, J. & Bryant, G. 1992. Physical principles of membrane damage due to dehydration and freezing. *Julkaisussa: Karalis, T.K. (toim.). Mechanics of Swelling: From Clays to Living Cells and Tissues. NATO ASI Series H 64: 205-224.*
- Wolfe, J. & Bryant, G. 1999. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane - Solute - Water Systems. *Cryobiology* 39(2): 103-129.
- Yoneyama, T., Handley, L. L., Scrimgeour, C. M., Flisher, D. B. & Raven, J. A. 1997. Variations of the natural abundances of nitrogen and carbon isotopes in *Triticum aestivum*, with special reference to phloem and xylem exudates. *New Phytologist* 137(2): 205-213.
- Zweifel, R., Item, H. & Häsler, R. 2001. Link between diurnal stem radius changes and tree water relations. *Tree physiology* 21(12-13): 869-877.

9 Liitteet

Liitteiden kuvissa ja taulukoissa symboli "A" tarkoittaa nestetypellä jäädytettyä, "B" jäädyttämätöntä nilapalaa ja "N" neulasia. Numeroinnit kuvaavat nilapalan sijaintia oksassa siten, että "1" on lähimpänä oksan kärkeä ja kuvan suurin numero lähimpänä oksan kantaa. Nilapalan sijainnin perässä voi olla myös toinen numero, esim. "2.2", mikä tarkoittaa samalta sijainnilta kerättyä toista nilanäytettä. Tarkemmin nilapalojen sijainnit on esitetty taulukoiden vieressä olevissa kuvissa.

Liite 1. Männynoksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet. Näissä koemittauksissa toinen mittaus on tehty 3h myöhemmin samasta näyteputkilosta kuin ensimmäinen mittaus. Oksan pituus tässä tapauksessa oli noin 30 cm.

* Näyte B1 jouduttiin yhdistämään näytteen B2 kanssa, josta tuli siis yhdistelmä oksan kärjen ja kannan nilaa.

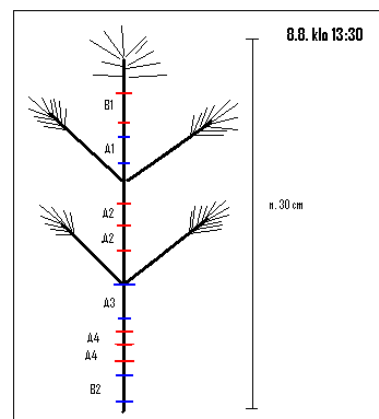
pvm	näyte	mittaus1 mol/kg	mittaus 2 mol/kg
3.8.	A1	0.654	0.685
	A2	0.604	0.601
	A3	0.622	0.657
4.8.	A1	0.581	0.594
	B1	0.564*	
	A2	0.385	0.388
8.8.	B2		
	A1	0.508	0.503
	A2	0.510	0.506
	B	0.534	

Liite 2. Kuvan L1 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet. Osmoottinen vahvuus on sarakeissa 1 ja 2. Sarakkeessa 2 osmoottinen vahvuus on mitattu 3h kuluttua uudestaan samoista näytteistä ja näyteputkista kuin ensimmäisessä mittauksessa. Symboli "A" tarkoittaa jäädytettyä nilapalaa, "B" jäädyttämätöntä ja numerot 1-4 kuvaavat nilapalan sijaintia oksassa, kuten kuvassa on näytetty ja osion alussa on aiemmin mainittu.

* Näytteestä A4 osa jäi osmometrin anturiin kiinni ensimmäisen mittauksen yhteydessä

** Näytteessä B1 oli hyvin vähän näytettä, mikä voi näkyä osmoottisessa vahvuudessa liian suurena arvona.

näyte	mittaus 1 mol/kg	mittaus 2 mol/kg
A1	0.549	0.547
A2	0.490	0.495
A2	0.480	0.467
A3	0.473	0.478
A4*	0.479	0.492*
A4	0.447	0.450
B1**	0.693**	
B2	0.432	0.428
B2	0.395	0.384



Kuva L1. Nilanäytteiden sijainti männynoksassa.

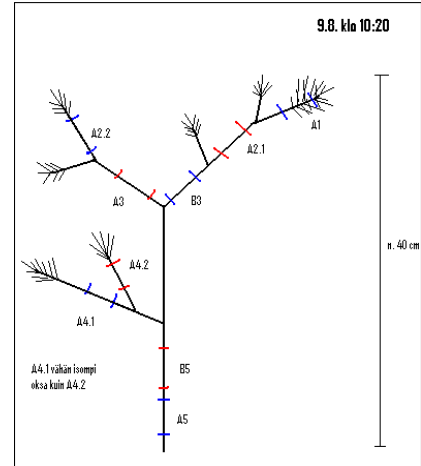
Liite 3. Kuvan L2 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet.

* Samaa näytettä eri putkilossa kuin ensimmäisessä mittauksessa, mitattu 3 h myöhemmin

** Heti ensimmäisen mittauksen jälkeen mitattu samaa näytettä eri putkilossa

*** Heti ensimmäisen mittauksen jälkeen mitattu samaa näytettä mutta toisessa putkilossa ja eri näytemäärällä

näyte	mittaus 1 mol/kg	mittaus 2 mol/kg
A1	0.571	0.560*
A2.1	0.558	0.541**
A2.2	0.569	0.576***
A3	0.533	0.543*
A4.1	0.539	
A4.2	0.505	
A5	0.472	
B3	0.382	

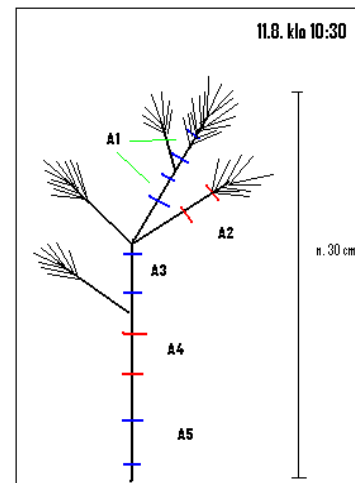


Kuva L2. Nilanäytteiden sijainti männynoksassa.

Liite 4. Kuvan L3 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet.

* Samasta nilapalasta saatu näyte toisessa putkilossa

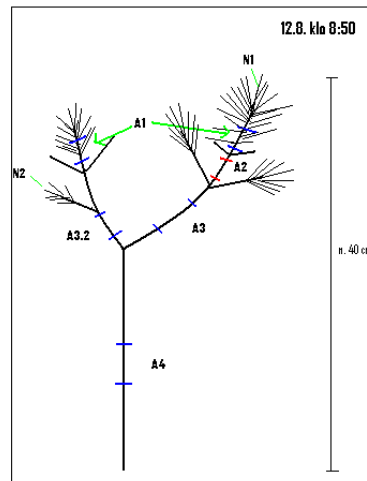
keräysaika	näyte	mittaus 1 mol/kg	mittaus 2 mol/kg
10:30	A1	0.502	
	A2	0.480	
	A3	0.462	
	A4	0.492	0.496*
	A5	0.467	



Kuva L3. Nilanäytteiden sijainti männynoksassa

Liite 5. Kuvan L4 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet. Olosuhteet olivat keräyshetkellä viileät ja sumuiset. * Näytteeseen jouduttiin yhdistämään kahden eri nilapalan näytettä kuvan L4 mukaisesti.

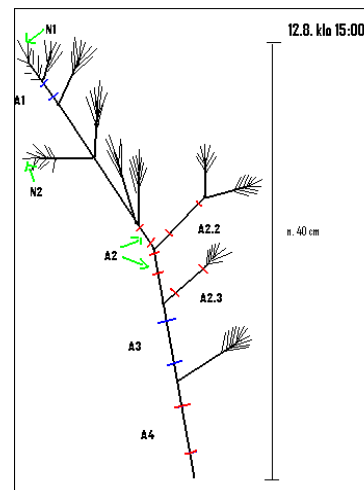
keräysaika	näyte	mol/kg
8:50	A1+2*	0.536
	A2	0.568
	A3	0.522
	A3.2	0.53
	A4	0.527
	N1	0.603
	N2	0.588



Kuva L4. Nilanäytteiden sijainti männynoksassa.

Liite 6. Kuvan L5 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet.

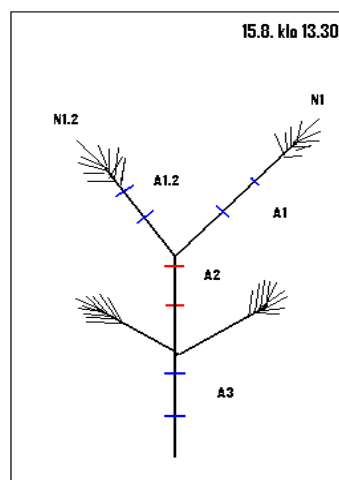
keräysaika	näyte	mol/kg
15:00	A1	0.573
	A2	0.562
	A2.2	0.543
	A2.3	0.569
	A3	0.536
	A4	0.527
	N1	0.692
N2	0.681	



Kuva L5. Nilanäytteiden sijainti männynoksassa.

Liite 7. Kuvan L6 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet. Olosuhteet olivat keräyshetkellä ja sitä ennen pilviset ja tiheäsaiteiset.

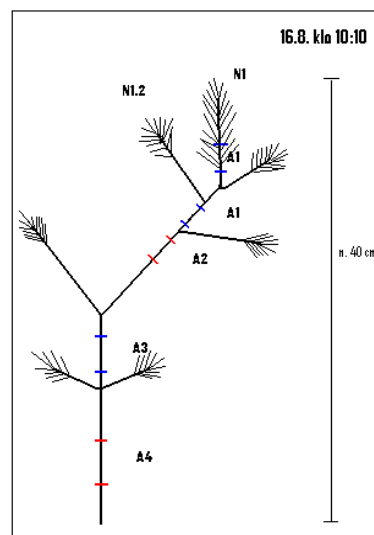
keräysaika	näyte	mol/kg
13:30	A1	0.476
	A1.2	0.460
	A2	0.481
	A3	0.497
	N1	0.602
	N1.2	0.631



Kuva L6. Nila- ja neulasnäytteiden sijainti männynoksassa.

Liite 8. Kuvan L7 oksasta kerättyjen nilanäytteiden osmoottiset vahvuudet. Olosuhteet olivat pilviset ja sumuiset.

keräysaika	näyte	mol/kg
10:10	A1	0.484
	A2	0.478
	A3	0.457
	A4	0.466
	N1	0.606*
	N2	0.563



Kuva L7. Nila- ja neulasnäytteiden sijainti männynoksassa.