

METSÄNTUTKIMUSLAITOKSEN  
SUONTUTKIMUSOSASTON TIEDONANTOJA

4/1980

Astiakoe lannoituksen vaikutuksesta männyn  
(Pinus sylvestris L.) taimien alkukehitykseen  
ja juuriston monosakkaridipitoisuuksiin rahka-  
turvealustalla

Kimmo K. Kolari

Helsinki 1980



Astiakoe lannoituksen vaikutuksesta männyn  
(Pinus sylvestris L.) taimien alkukehitykseen  
ja juuriston monosakkaridipitoisuuksiin  
rahkaturvealustalla

Kimmo K. Kolari

---

Kolari, Kimmo K.  
Pro gradu -tutkielma  
Kasvitieteen laitos  
8.10.1980  
tarkastaja prof.Liisa Simola

HELSINGIN YLIOPISTO

Kasvitieteen laitos

KOLARI, KIMMO K.: Astiakoe lannoituksen vaikutuksesta männyn (Pinus sylvestris L.) taimien alkukehitykseen ja juuriston monosakkaridipitoisuuksiin rahkaturvealustalla.

Pro gradu 45 s.

Kasvifysiologia

Lokakuu 1980

Tutkimuksessa selvitettiin astiakokeena lannoituksen ja pohjaveden tason vaikutusta männyn (Pinus sylvestris L.) taimien alkukehitykseen, juurten monosakkaridikoostumukseen ja -pitoisuuksiin sekä näiden välisiin suhteisiin turvealustalla.

Juurten alkoholiliukoisten pelkistyvien monosakkaridien määrittämisessä käytettiin kaasukromatografista analyysimenetelmää, jossa kaasunestekromatografiaan perustuen monosakkaridit analysoitiin vastaavina alditoliasetaatteina. Käytetty menetelmä osoittautui juuristomateriaalin analysoinnissa huonoksi aineiston sisältämän fruktoosin takia, koska sen pelkistymistuotteet sorbitoli ja mannitoli vaikeuttivat glukoosin ja mykoritsan sieniperäisen mannitolin sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tulkintaa.

Analysoidut männyn juuret sisälsivät kromatogrammien perusteella tulkittuna männyllä aiemmin havaituista liukoisista pelkistyvistä monosakkarideista glukoosia, fruktoosia ja arabinoosia sekä lisäksi ksyloosia, jota ei aiemmin ole ilmoitettu löytyneen männyn juurista. Lisäksi ainakin lannoittamattomien taimien juuret sisälsivät mykoritsasta (sen sieniosakkaasta) peräisin olevaa mannitolia.

Juurten kokonaismonosakkaridipitoisuudet vaihtelivat keskimäärin 3,7-29,6 %:iin, ksyloosipitoisuudet 0,03-0,73 %:iin ja arabinoosipitoisuudet 0,02-0,2 %:iin (kuivapainosta) lannoituskäsittelystä ja pohjaveden tasosta riippuen.

Typpilannoituksella (NPK) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus taimien pituuskasvuun, juurten kuivapainoon, juurten kokonaismonosakkaridipitoisuuteen sekä pituuskasvu/juurten monosakkaridipitoisuuteen ja juurten kuivapaino/juurten monosakkaridipitoisuuteen. Typpilannoitus paransi taimien pituuskasvua vesitalouden ollessa hyvä ja lisäsi juurten kuivapainoa sekä alensi juurten monosakkaridipitoisuuksia vesitalouden ollessa huono.

Typpilannoittelajeista keskimääräisesti parhaan pituuskasvutuloksen antoi ammonium-nitraatti-typpilannoitus (kalkkiammonsalpietari) ja heikoimman tuloksen urealannoitus, joka kuitenkin antoi paremman tuloksen kuin pelkkä PK-lannoitus.

Typpilannoitus paransi PK-urealannoitusta lukuunottamatta selvästi männyn taimien alkukehitystä, pituuskasvua ja juurten muodostusta sekä vähensi juurten liukoisten monosakkaridien pitoisuuksia, mikä viittasi epäsuorasti mykoritsanmuodostuksen vähentymiseen.

## ALKUSANAT

Tämän tutkimuksen aineisto on ollut osa vt.prof. Paavilaisen ja MMK Marjut Norlamon (nyk. Karsisto) tutkimuksesta (1975) "Typpilannoitelajien vaikutus koivun, kuusen ja männyn alkukehitykseen". Tutkimuksen kenttätöitä on suoritettu Metsäntutkimuslaitoksen Parkanon tutkimusaseman Alkkian kenttäaseman kasvihuonetiloissa kesällä 1973 ja juurten monosakkaridianalyysit Helsingin yliopiston kasvitieteen laitoksen fysiologisen laboratorion ja Helsingin teknillisen korkeakoulun puunjalostuslaboratorion tiloissa syksyllä 1974 - talvella 1975.

Edellämainittujen henkilöiden lisäksi tekijä haluaa kiittää työn alulle saattajaa prof. Veijo Wartiovaaraa, työn tarkastanutta prof. Liisa Simolaa, laboratoriotekniikassa arvokkaita neuvoja antaneita lab.ins. Yrjö Tuomista ja DI Eino Seppälää, ATK-sovelluksissa avustanutta FK Riitta Heinosta sekä työn puhtaaksi kirjoituksen suorittanutta Maija Tuuria.

Helsingissä 8.10.1980

Kimmo K. Kolari

## SISÄLLYSLUETTELO

	Sivu
1. JOHDANTO .....	4
2. AINEISTO JA MENETELMÄT .....	7
21. Aineisto .....	7
22. Menetelmät .....	11
221. Kasvutekijät .....	11
222. Juurten monosakkaridialyysi .....	11
3. TULOKSET .....	19
31. Juurten monosakkaridit .....	19
311. Kvalitatiivinen analyysi .....	19
312. Kvantitatiivinen analyysi .....	21
32. Pituuskasvu ja juurten monosakkaridit .....	25
33. Juurten kuivapainot ja monosakkaridit .....	28
4. TULOSTEN TARKASTELU .....	31
41. Monosakkaridien analyysimenetelmä .....	31
42. Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen monosakkaridi- analyysi.....	33
43. Lannoitusvaikutukset .....	34
431. Monosakkaridit .....	34
432. Pituuskasvu/monosakkaridi -suhde .....	36
433. Juurten kuivapaino/monosakkaridi -suhde .....	37
44. Yhteenveto .....	37
5. TIIVISTELMÄ .....	39
KIRJALLISUUSLUETTELO .....	42

## 1. JOHDANTO

Metsäpuilla on juuriston hiilihydraatteja (sokereita) koskevia tutkimuksia tehty vähän. BJÖRKMAN (1942) sekä HANDLEY ja SANDERS (1962) mm. tutkivat männyn (Pinus sylvestris L.) männyn taimien mykorrhizaisten juurten liukoisia pelkistyviä sokereita selvittäessään mykorrhizan l. sienijuuren muodostusta ja siihen vaikuttavia tekijöitä, ts. onko hiilihydraattien kasautuminen juuriin mykorrhizan muodostuksen syy (BJÖRKMAN 1942) vai seuraus (HANDLEY ja SANDERS 1962).

Vähitellen tutkimuksissa kiinnitettiin huomiota enemmän juurten ja mykorrhizan (sen sieniosan) väliseen hiilihydraattiaineenvaihduntaan, varsinkin kun MELIN ja NILSSON (1957)  $^{14}\text{C}$ -tekniikkaa hyväksikäyttäen osoittivat fotosynteettisten hiiliyhdisteiden kulkeutuvan männyllä juurista mykorrhizan sieniosakkaan muodostamaan vaippaan. LEWIS ja HARLEY (1965a) havaitsivat pyökin (Fagus sylvatica L.) juurianalyysissä mykorrhizan sisältävän alkoholiin liukenevista sokereista glukoosia, fruktoosia, sakkaroosia, trehaloosia sekä kahta syklistä polyolia (inositoleja) että erästä asyklistä polyolia - mannitolia. Pyökin infektoitumattomat (mykorrhizasattomat) juuret sisälsivät samoja sokereita paitsi trehaloosia ja mannitolia, minkä vuoksi he katsoivat jälkimmäisten sokereiden olevan mykorrhizasassa peräisin sen sienirihmastosta. Lisäksi LEWIS ja HARLEY (1965b) osoittivat pyökin mykorrhizaisten juurten absorboivan  $^{14}\text{C}$ -glukoosia, -fruktoosia ja -sakkaroosia n. 2,5 kertaa nopeammin kuin infektoitumattomat juuret sekä syntetisoivan trehaloosia ja glykogeenia glukoosista sekä mannitolia fruktoosista. LEWIS ja HARLEY (1965c) osoittivat edelleen pyökin mykorrhizan absorboivan ja metaboli-

soivan helposti mannitolia ja trehaloosia infektoitumattomiin juuriin verrattuna, mikä varmensi mannitolin alkuperän mykoritsan sieniosakkaasta.

Havupuista on männyillä havaittu juurten sisältävän useita liukoisia hiilihydraatteja. Strobusemänny (Pinus strobus L.) mykoritsaisista juurista on monosakkarideista löydetty glukoosia ja fruktoosia sekä disakkarideista sakkaroosia ja raffinoosia (LISTER ym. 1968). Loblollymänny (P. taeda L.) infektoitumattomista (mykoritsattomista) juurista on löydetty sekä fruktoosia että sakkaroosia, mutta ei glukoosia (MARX ym. 1977). Lisäksi tunnetaan männyillä steriilien juurten kasvualustaan erittämiä liukoisia sokereita: strobusemännyllä glukoosi ja arabinoosi (SLANKIS ym. 1964), amerikan punamännyllä (P. resinosa Ait.) glukoosi, fruktoosi ja arabinoosi (AGNIHOTRI ja VAARTAJA 1967), sokerimännyllä (P. lambertiana Dougl.) glukoosi, fruktoosi, ramnoosi ja sakkaroosi, pikimännyllä (P. rigida Mill.) glukoosi, ramnoosi ja sakkaroosi, banksinmännyllä (P. banksiana Lamb.) ja montereynmännyllä (P. radiata D. Don) glukoosi (SMITH 1969). Mannoo- sia ei näissä tutkimuksissa löydetty alkoholiliukoisesta frak- tioista.

Metsäpuita koskevissa juuristotutkimuksissa on liukoisten hiili- hydraattien kvalitatiivisina analyysimenetelminä käytetty pape- rikromatografiaa (LEWIS ja HARLEY 1965a, AGNIHOTRI ja VAARTAJA 1967, LISTER ym. 1968) ja ohutkerroskromatografiaa (SMITH 1969).

Kvantitatiivisissa määrityksissä on taas pääasiallisesti käytetty kolorimetrisiä menetelmiä (BJÖRKMAN 1942, 1944, HANDLEY ja SANDERS 1962, RICHARDS ja WILSON 1963, LEWIS ja HARLEY 1965a, SMITH 1969, SHOULDERS 1972, MARX ym. 1977).



Analyysimenetelmien kehityksen myötä on kehitetty sopivia kaasukromatografisia menetelmiä hiilihydraattien sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista määrittystä varten. Kaasu-neste-kromatografiassa sokerit (tässä monosakkaridit) muutetaan metyloimalla kvantitatiivisesti derivaateiksi, jotka kaasukromatografiassa käytetyissä lämpötiloissa ovat sekä haihtuvia että stabiileja. Tässä menetelmässä liikkuvana faasina toimii kaasu ja stationäärisenä faasina neste. Monosakkarideja voidaan analysoida joko O-trimetyyliderivaatteina (SWEeley ym. 1963, FORD 1974, ERICSSON ym. 1978, HANSEN ym. 1978) tai alditoliasetaatteina (SWARDEKER 1965, SJÖSTRÖM ym. 1966, CROWELL ja BURNETT 1967).

Metsäpuilla lannoituksen ja juurten hiilihydraattipitoisuuksien välistä suhdetta on aiemmin tutkimuksissa tarkasteltu lähinnä mykoritsan muodostuksen ja sen merkityksen kannalta (BJÖRKMAN 1942, 1944, 1970a,b, HATCH 1937, MITCHELL ym. 1937, MEYER 1962, 1965, HANDLEY ja SANDERS 1963, RICHARDS ja WILSON 1963, MARX ym. 1977). Ks. myös HARLEY (1969), MARKS ja KOZLOVSKI (1973) sekä MEYER (1974), jotka ovat laajemmin käsitelleet aihetta.

Lannoituksen, juurten hiilihydraattipitoisuuksien ja mykoritsaisten männyntaimien kasvun välisistä suhteista on tiedossa yksi tutkimus (LISTER ym. 1968), jossa on tutkittu eri typpi- ja fosforimäärien vaikutusta mm. taimien biomassan tuottoon, mykoritsan muodostukseen fotosynteesien ja liukoisten sokerien pitoisuuksiin juurissa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää astiakokeena lannoituksen ja pohjaveden tason vaikutusta männyn (Pinus sylvestris L.)

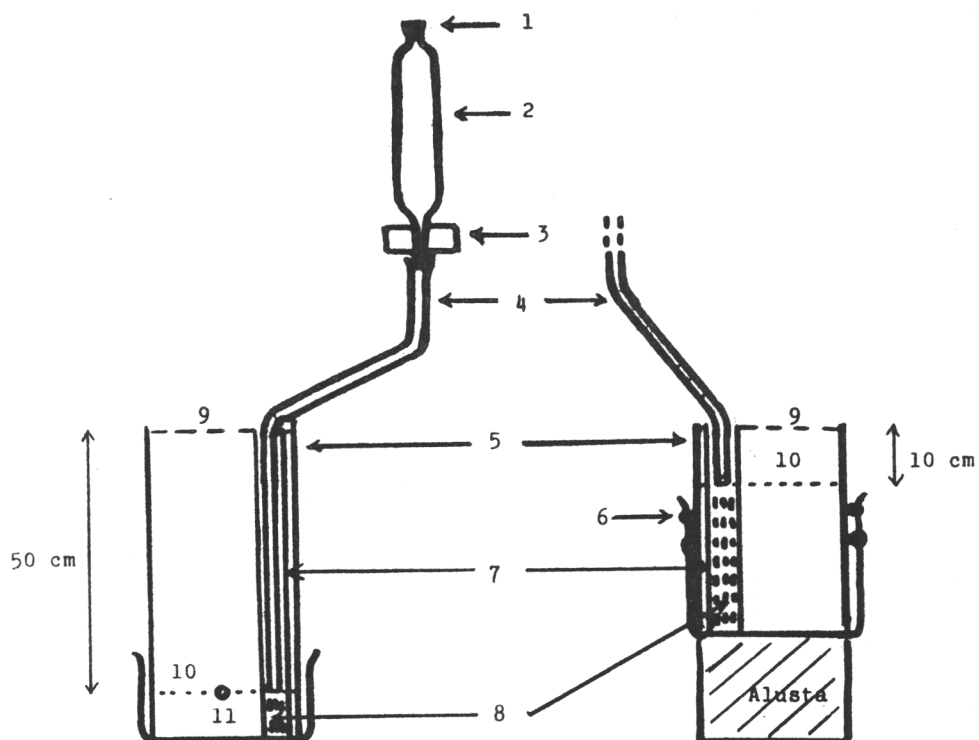
taimien alkukehitykseen, juurten monosakkaridikoostumukseen ja -pitoisuuksiin sekä näiden välisiin suhteisiin turvealustalla käyttäen monosakkaridianalyysissä hyväksi kaasukromatografista alditoliasetaatteihin perustuvaa menetelmää.

## 2. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 21. Aineisto

Tutkimus suoritettiin Parkanon tutkimusaseman Alkkian kenttäkoeasemalla kasvihuoneessa. Koeastioissa käytettiin taimien kasvualustana typpiköyhää rahkanevaturvetta. Turpeenotossa ja pohjaveden säännöstelyssä käytettiin JUUSELAN ym. (1969) kehittämää menetelmää ja välineistöä, jossa turvenäyte siirrettiin turpeen rakennetta rikkomatta muovisiin halkaisijaltaan 190 mm:n koeastioihin, ja jossa pohjaveden taso (etäisyys) pinnasta voitiin säätää käytetyiksi 10 ja 50 cm:ksi (kuva 1). Pohjaveden tason säätely tapahtui tässä menetelmässä siten, että pohjaveden tason aletessa turvepylväessä, ts. veden haihtuessa siitä, uutta vettä tuli vesisäiliöstä automaattisesti tilalle niin, että pohjaveden taso pysyi alkuperäisessä säännöstellyssä tasossa.

Tutkittavana puulajina oli mänty (Pinus sylvestris), jonka siemenet kylvettiin 10.4.1973 ravinneköyhään multaun. Sirkkataimet siirrettiin koeastioihin 26.6.1973, 10 tainta koeastiaa kohti.



KUVA 1. Työssä käytetty pohjaveden tason säännöstelyjärjestelmä.

Selitys: 1= tulppa, 2= vesisäiliö, 3= kannatinpuu, 4= muoviletku,  $\varnothing$  13mm, 5= polyeteeniputki,  $\varnothing$  190mm, 6= kumirenkaastiiviste, 7= finndur-muoviputki,  $\varnothing$  25mm, 8= rakoja finndur-putkessa, 9= turpeen pinta, 10= pohjaveden taso (pinnasta), 11= valumareikä. Kuva JUUSELAN ym. 1966 mukaan.

Lannoituskäsittelyt koeastioissa olivat kahtena toistona seuraavat:

1. Lannoittamaton kontrolli (0)
2. PK-lannoitus (PK)
3. Nitraatti-liuoslannoitus + PK (NO)
4. Ammonium-liuoslannoitus + PK (NN)
5. Nitraatti-ammonium-liuoslannoitus + PK (NN)
6. Urea-liuoslannoitus + PK (U)

Koeastioita oli kokeessa täten yhteensä: lannoituskäsittelyt (6) x pohjaveden taso (2) x toistot a ja b (2) = 24 kappaletta.

Lannoitteena käytettiin suometsien PK-lannosta annettuna turpeen pintaan yhtenä eränä (27.6.1973) 150 kg  $P_2O_5$ /ha ja 94 kg  $K_2O$ /ha vastaavina määrinä. Typpilannoitteina käytettiin kalkkisalpietaria (NO), ammoniumsulfaattia (NH), oulunsalpietaria (NN) ja ureaa. Typpilannoitus suoritettiin liuoslannoituksena siten, että kutakin lannoitetta liuotettiin 100 x koeastian annettava määrä litraan tislattua vettä. Saadut liuokset injektoitiin ruiskulla turpeeseen taimien juurikerrokseen yhteensä 10 ml (10 x 1 ml) kahdessa 75 kg N/ha erässä (27.6. ja 27.7.1973) seuraavasti:

Koeastian pinta-ala oli 289 cm<sup>2</sup>. Typpeä annettiin kaksi kertaa molemmilla kerroilla 75 kg/ha alkuaineena ts. 0,75 mg/cm<sup>2</sup> eli 216,75 mg/koeastia vastaten oulunsalpietarina (26 % N) 0,834 g, kalkki-ammonsalpietarina (15,5 % N) 1,398 g, ammoniumsulfaattina (20,5 % N) 1,057 g, ureana (46,3 % N) 0,468 g. Fosforia ja kalia annettiin suometsien PK-lannoksena 150 kg/ha, (26 %  $P_2O_5$  ja 15 %  $K_2O$ ) 1,806 g/astia.

Koeastioiden taimet saivat pintakastelun aluksi kolme kertaa viikossa ja myöhemmin tarpeen mukaan kuitenkin vähintään kerran viikossa. Pohjaveden säännöstelyyn käytetyt vesisäiliöt täytettiin päivittäin aamupäivisin. Sekä kasteluun että pohjaveden säännöstelyyn käytetty vesi oli lähdevettä.

Kokeen aikana mitattiin ilman lämpötila (klo 7.30) koeastioiden yläpinnan tason korkeudelta sekä turpeen lämpötila (klo 7.30 ja 14.30) 5 cm:n syvyydestä. Ilmalämpömittareita oli kokeessa kolme kappaletta (yksi varjostettu) ja maalämpömittareita kahdeksan kappaletta, joista neljä kappaletta koeastioissa, joissa pohjavede taso oli säännöstelty 10 cm:ksi ja neljä kappaletta koeastioissa, joissa pohjaveden taso oli säännöstelty 50 cm:ksi. Kokeen aikana (28.6.-30.8.1973) mitatut ilman ja maan lämpötilat olivat seuraava (ks. myös PAAVILAINEN ja NORLAMO 1975, s. 9):

		Mittarit		
		1	2	3
- ilman lämpötila (+C <sup>o</sup> )	min	10,8	9,4	11,1
	max	40,1	35,4	33,0
	$\bar{x}$	25,5	22,4	22,1
		10 cm:n taso		50 cm:n taso
- maan lämpötila (+C <sup>o</sup> )	klo 7.30	18,4		17,4
	" 14.30	24,4		23,8
	$\bar{x}$	21,4		20,6

## 22. Menetelmät

### 221. Kasvutekijät

Taimien pituuskasvua seurattiin kokeen aikana viikottain mittaamalla kustakin koeastiasta kolmen pisimmän taimen pituus mm:n tarkkuudella. Kokeen lopussa (30.8.1973) taimet katkaistiin juurenniskasta. Saadut juuret puhdistettiin varovasti turpeesta juoksevalla vedellä (samaa kuin kasteluvesi) ja taltioitiin analyysijä ja kuivapainopunnituksia varten lasisissa säilöntäpurkeissa 150 ml:ssa 70 %:sta etyylialkoholia vastaavassa Solventol-liuoksessa (Alkon sulfiittispriitä, jossa asetonia 5 g/kg ja metyyli-isobutyryliketonia 10 g/kg,  $C_6H_{10}O_6$ , mp. 100,16).

Juurten kuivapainot mitattiin monosakkaridialyysin yhteydessä kuivattamalla ne lämpökaapissa  $+105^{\circ}C$ :ssa 1 vrk, minkä jälkeen ne punnittiin.

Juurten mykoritsojen lukumäärää ei tämän tutkimuksen aineistosta (toistot a ja b) laskettu, mutta kaikkien taimien juuret todettiin mykoritsaisiksi ns. A-tyyppin mykoritsojen (esim. MIKOLA & LAIHO 1962) esiintymisen perusteella.

### 222. Juurten monosakkaridialyysi

Juurten monosakkaridialyysissä käytettiin Teknisen korkeakoulun puunjalostusosaston kaasukromatografialaitteistoa. Tutkimuksessa käytetty kaasukromatografi oli tyyppiä Perkin-Elmer 900 varustettuna liekki-ionisaatiodektektorilla ja kytkettynä Perkin-Elmer 165 piirturiin, johon oli liitetty CRS-100 (Infotronics) -integraattori sekä Victor-digitalmatic laskuri.

Kolonni, jonka ulkohalkaisija oli 1/8 tuumaa ja pituus 2 m, oli täytetty seoksella, jossa Gas-Chrom P:hen (100-120 mesh) oli lisätty 6 % etyleeni-syanoetyylisilikoni-sukkinaattia (ECNSS-M). Kolonnin lämpötila oli 170°C, injektioblokin 250°C ja liekki-ionisaatio-detektorin 250°C. Kantajakaasuna käytettiin typpeä ja sen virtausnopeus oli 40 ml/min. Mittauksiin käytetyt asetukset kromatografia-ajojen aikana olivat seuraavat: range 1, vaimennus (attenuation) 64, 256 tai 512.

Liukoisten monosakkaridien analyysiin sovellettiin FORDin (1974) ja SJÖSTRÖMin (1966) käyttämää menetelmää. Monosakkaridistandardeina olivat L-arabinoosi, D-ksyloosi, D-mannoosi, D-fruktoosi ja D-glukoosi sekä sisäisenä standardina meso-inositoli. Kaikki käytetyt standardit olivat pro-analyysituotteita (Merck). Kvalitatiivista analyysiä varten standardisokereista (paitsi fruktoosista) valmistettiin liuos, joka sisälsi kutakin sokeria 0,2 mg/0,5 ml:ssa tislattua vettä. Fruktooristandardiliuos sisälsi fruktoosia 1 mg/0,5 ml:ssa tislattua vettä. Sisäistä standardia varten tehtiin kvantitatiivista analyysiä varten liuos, joka sisälsi meso-inositolia 0,2 mg/0,2 ml tislattua vettä.

Solventol-liuoksessa säilytetyt juuret jatkokäsiteltiin vasta syksyllä 1974 (johtuen oaksi tilatun ja myös vääräksi osoittautuneen kolonnin viivästymisestä sekä tätä seuranneesta sopivan analyysipaikan ja -ajan löytämiseen kuluneesta viivästyksestä). Juuristot jauhettiin säilytysliuoksessaan Bühler-myllyllä ja suodatettiin ja niiden kuivapainot punnittiin.

Saadut suodokset otettiin pesuliuoksineen (70% etanolia) talteen sokerianalyysia varten. Suodoksiin lisättiin 70 % etanolia siten, että lopulliseksi tilavuudeksi tuli 200 ml. Tästä tilavuudesta otettiin ravistelun jälkeen koeputkiin kutakin näytettä 10 ml, joka haihdutettiin kuiviin  $+35^{\circ}\text{C}$ :ssa lämpökaapissa. Haihdutuksen jälkeen näytteet liuotettiin 0,3 ml:aan tislattua vettä ja saatuun liuokseen lisättiin meso-inositoli-liuosta 0,2 ml sisäiseksi standardiksi kvantitatiivista määrittystä varten, jolloin näytteen kokonaistilavuudeksi tuli 0,5 ml sisältäen 0,2 mg meso-inositolia vastaten 0,4  $\mu\text{g}$  inositolia 1  $\mu\text{l}$ :ssa liuosta.

Pelkistys suoritettiin siten, että sokeristandardiliuoksiin tai näytteisiin (sisäisine standardeineen) lisättiin 15 mg natriumborohydridiä ( $\text{NaBH}_4$ ) ja niiden annettiin seistä suljetuissa 10 ml:n kierrekorkeilla varustetuissa koeputkissa (Kimax) 4 tuntia huoneenlämmössä. Natrium poistettiin ajamalla liuokset kationinvaihtajalla (Dowex 50-W x  $8\text{H}^+$ ) täytetyn pylvään läpi. Tähän käytettiin lasista alapäästään lasivillalla tukittua Pasteur-pipettiä. Pylväs pestiin tämän jälkeen 4 kertaa 0,5 ml:lla metanoli ( $\text{MeOH}$ ). Boorihappo poistettiin metyyliesterinä näytteistä lisäämällä näytteeseen pisara jääetikkaa ( $\text{AcOH}$ ), 3 ml metanolia sekä haihduttamalla se kuiviin typpikaasulla ( $\text{N}_2$ ). Metanolikäsittely haihdutuksineen toistettiin kolme kertaa.

Näytteet asetyloitiin siten, että niiden päälle pipetoitiin 200  $\mu\text{l}$  pyridiiniä ja 200  $\mu\text{l}$  asetanihydridiä ts. 1:1:een. Seoksen annettiin seistä huoneenlämmössä suljetussa putkessa yön yli. Tämän jälkeen näytteet haihdutettiin kuiviin typpellä,



niihin lisättiin 0,5 ml asetonia ja ne haihdutettiin uudelleen kuiviin tyypellä, minkä jälkeen ne vietiin koeputkiin suljettuina säilytystä varten pakkahuoneeseen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Standardit ja näytteet analysoitiin Teknillisen korkeakoulun puunjalostusosaston laboratoriossa tammikuussa 1975. Tällöin ne liuotettiin kaasukromatografiaa varten 0,5 ml:aan metanolia. Kutakin näytettä injektoidiin injektioruiskulla (S.G.E.; PTY Ltd) 1  $\mu\text{l}$ .

Juuristonäytteiden monosakkaridit määritettiin kvalitatiivisesti vertaamalla liuotinpiikistä laskettuja kromatogrammi-  
piikkien retentioaikoja standardiajossa saatujen monosakkaridien retentioaikoihin (kuvat 2 ja 3). Näytteistä tunnistettujen monosakkaridien pitoisuudet määritettiin vertaamalla kunkin ajon monosakkaridipiikkien pinta-aloja (integraattorilukuja) sisäisen standardin (meso-inositolin, INO) pinta-alaan. Mikäli jokin monosakkaridi (sen pinta-ala) ei integroitunut, sen ja sisästandardin pinta-  
alat laskettiin kolmiomenetelmällä kaavasta  $1/2 \times (\text{piikin leveys} \times \text{korkeus})$ , jolloin saatuja pinta-aloja ja sisästandardin integraattorilukua käyttäen laskettiin piikkiä vastaava luku.

Monosakkaridipitoisuuksien laskentaperiaate oli seuraava:

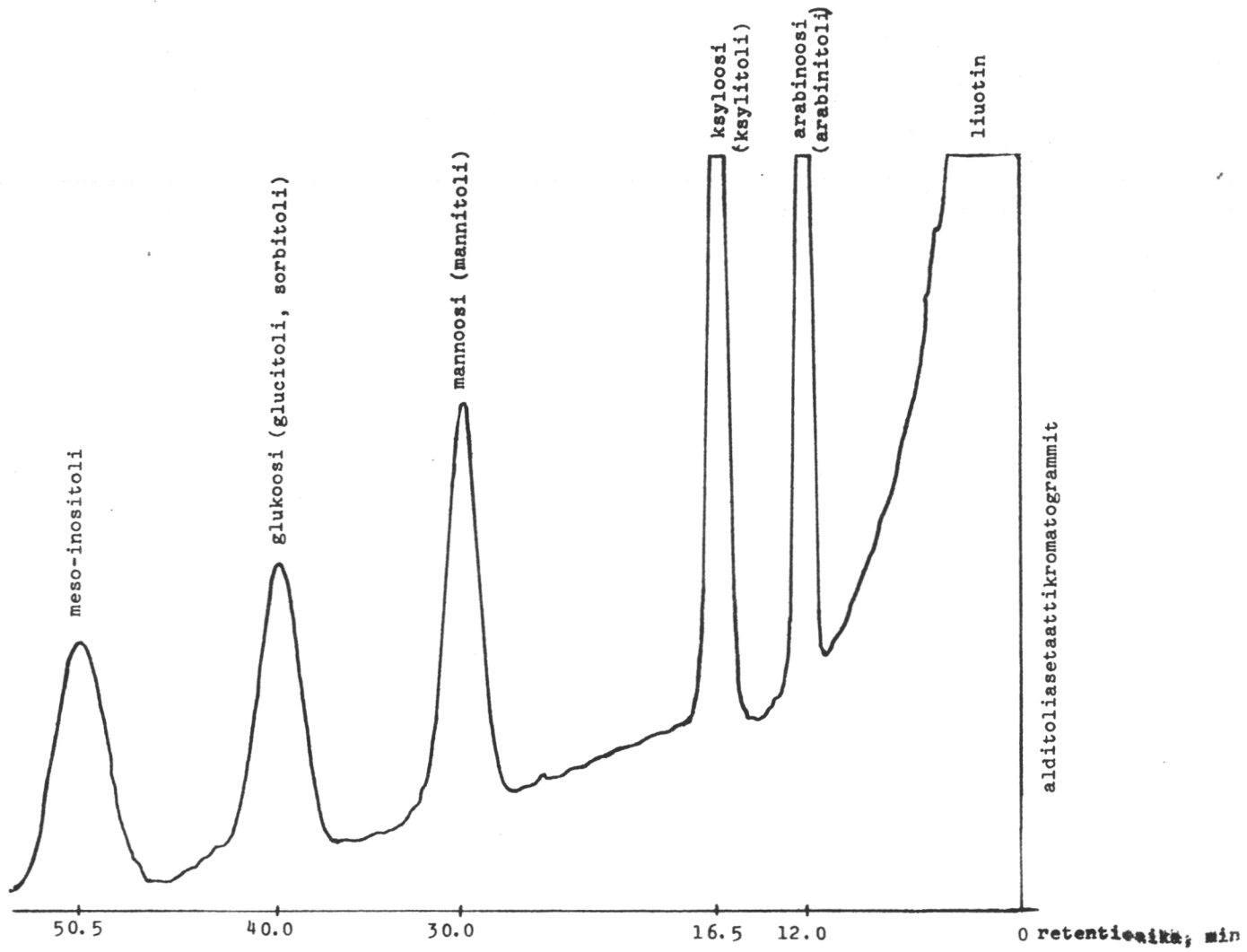
$$\frac{A \times B \times C}{D} = \text{mg sokeria/g kp., jossa}$$

$$A = \frac{\text{pinta-ala x}}{\text{pinta-ala INO}} \times \text{pitoisuus INO ;}$$

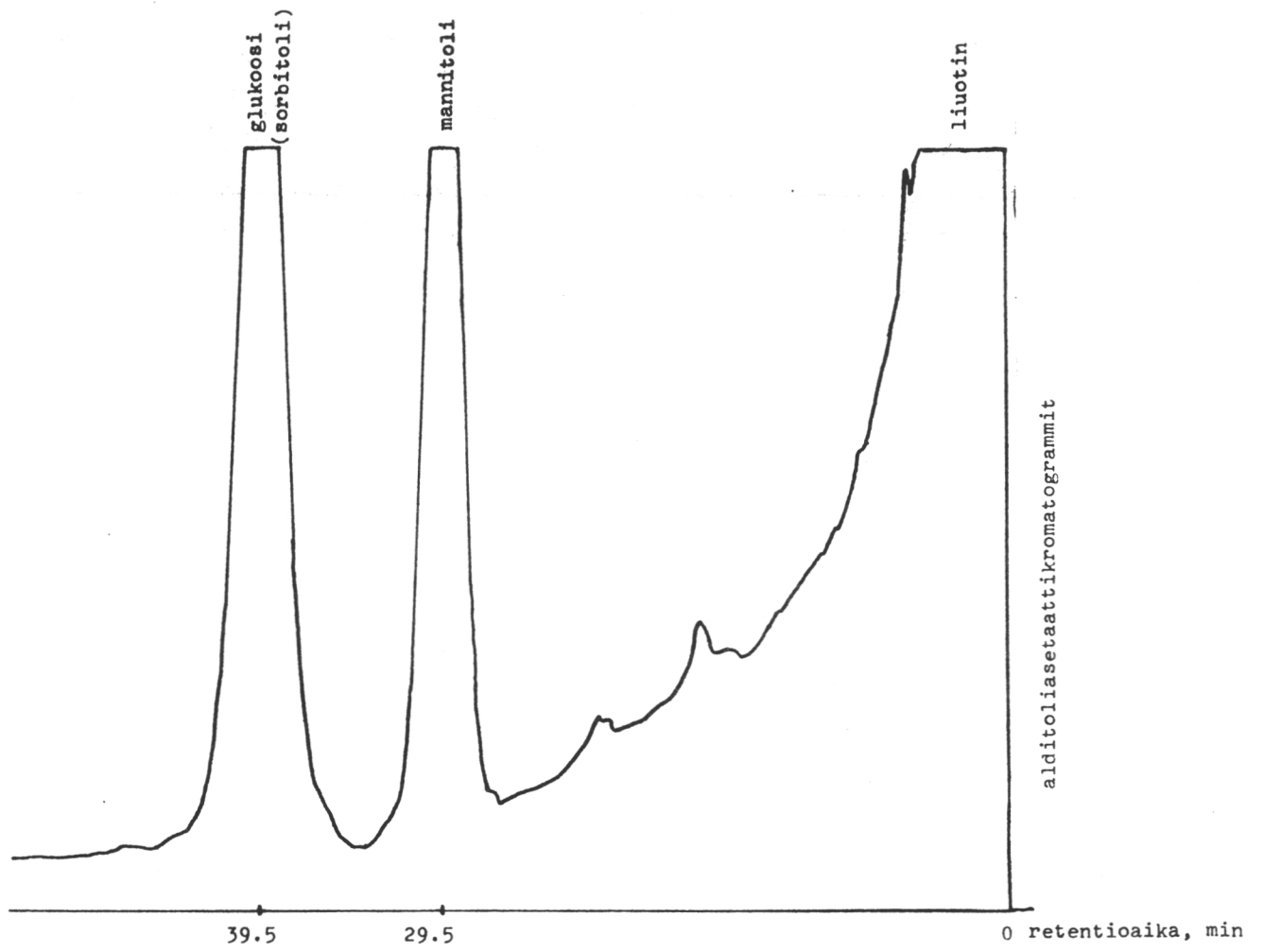
$$B = 500 \text{ (pitoisuus 10 ml:ssa = 0,5 ml/1 } \mu\text{l)}$$

$$C = 20 \text{ (pitoisuus 200 ml:ssa alkuperäistä näytettä) ja}$$

$$D = \text{näytteen juurten kuivapaino (kp.)}$$



KUVA 2. Monosakkaridien standardiajo 17.1.1975, vaimennus x64, range 1.



KUVA 3. Fruktosiajo 16.1.1975, vaimennus x64, range 1.

Tulosten (taulukko 1) laskennassa käytettiin Metsäntutkimuslaitoksen matemaattisen osaston varianssianalyysiohjelmaa malleilla  $Y = A + L + P + LP + ERR$  ja  $Y = A + L + ERR$ , joissa  $Y$  = selitettävä muuttuja,  $A$  = vakio (yleiskeskisarvo),  $L$  = lannoituskäsittely,  $P$  = pohjaveden taso,  $LP$  = yhdysvaikutus ja  $ERR$  = jäännösvaihtelu (koevirhe). Ohjelma tulosti kustakin selitettävästä muuttujasta varianssitaulun (vaihtelun lähteet, vakio  $A$ ,  $L/A$ ,  $P/A, L$ ,  $LP/A, L, P$  ja jäännös; neliösummat, vapausasteet, keskineliöt,  $F$ -arvot ja riski-%:t), Tukeyn testitaulukon tasokeskiarvoerotuksineen 1 % ja 5 % riskitasoilla sekä keskiarvotaulukon yleiskeskisarvoineen ja hajontoineen sekä mahdollisine yhdysvaikutusten tasoyhdistelmien keskiarvoineen.

Tilastollisessa tarkastelussa nollahypoteesejä (lannoituskäsittely, pohjaveden taso ja niiden välinen yhdysvaikutus) testattiin ohjelma  $F$ -testillä ja Tukeyn testillä. Mikäli luokkatekijöillä ( $L$  ja  $P$ ) oli tilastollisesti merkitsevä ( $P < 0,05$ ) yhdysvaikutus testattiin  $P$ :n eri tasot (10 ja 50 cm) samalla ohjelmalla yksinkertaisella varianssianalyysillä mallilla  $Y = A + L + ERR$  ja Tukeyn testillä. Muuttujien välisiä suhteita tarkasteltaessa ohjelmassa käytettiin suhdelukujen arcsin  $\sqrt{x}$ -muunnosta.

TAULUKKO 1. Aineiston tietokonekäsitelyssä käytetty tiedosto.

01111130038254766002990162  
 02112100021681157705330248  
 03121133049080578608720528  
 04122107035550703207080408  
 05211210088001173907690497  
 06212243085480670310980648  
 07221360088610469516080790  
 08222467104230529617270806  
 09311350152170418016821100  
 10312293155290412815451118  
 11321663085970516520990741  
 12322617111300409722830949  
 13411463127040444718820973  
 14412543133470460820080980  
 15421683115020597519760798  
 16422767087961252814320481  
 17511630203500326826041445  
 18512493178960425819891183  
 19521557190590396722011266  
 20522653144460340625971188  
 21611587171410441621381136  
 22612397112590508916190855  
 23621373058420790812540493  
 24622377045820636614080584

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Selitys: 1: näytteen numero

2: lannoituskäsittely

1= lannoittamaton

2= PK-lannoitus

3= PK + NO<sub>3</sub>-N -lannoitus

4= PK + NH<sub>4</sub>-N -lannoitus

5= PK + NO<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>-N -lannoitus

6= PK + urea-N -lannoitus

3: pohjaveden taso

1= 10cm pinnasta

2= 50cm pinnasta

4: toistot

1= toisto A

2= toisto B

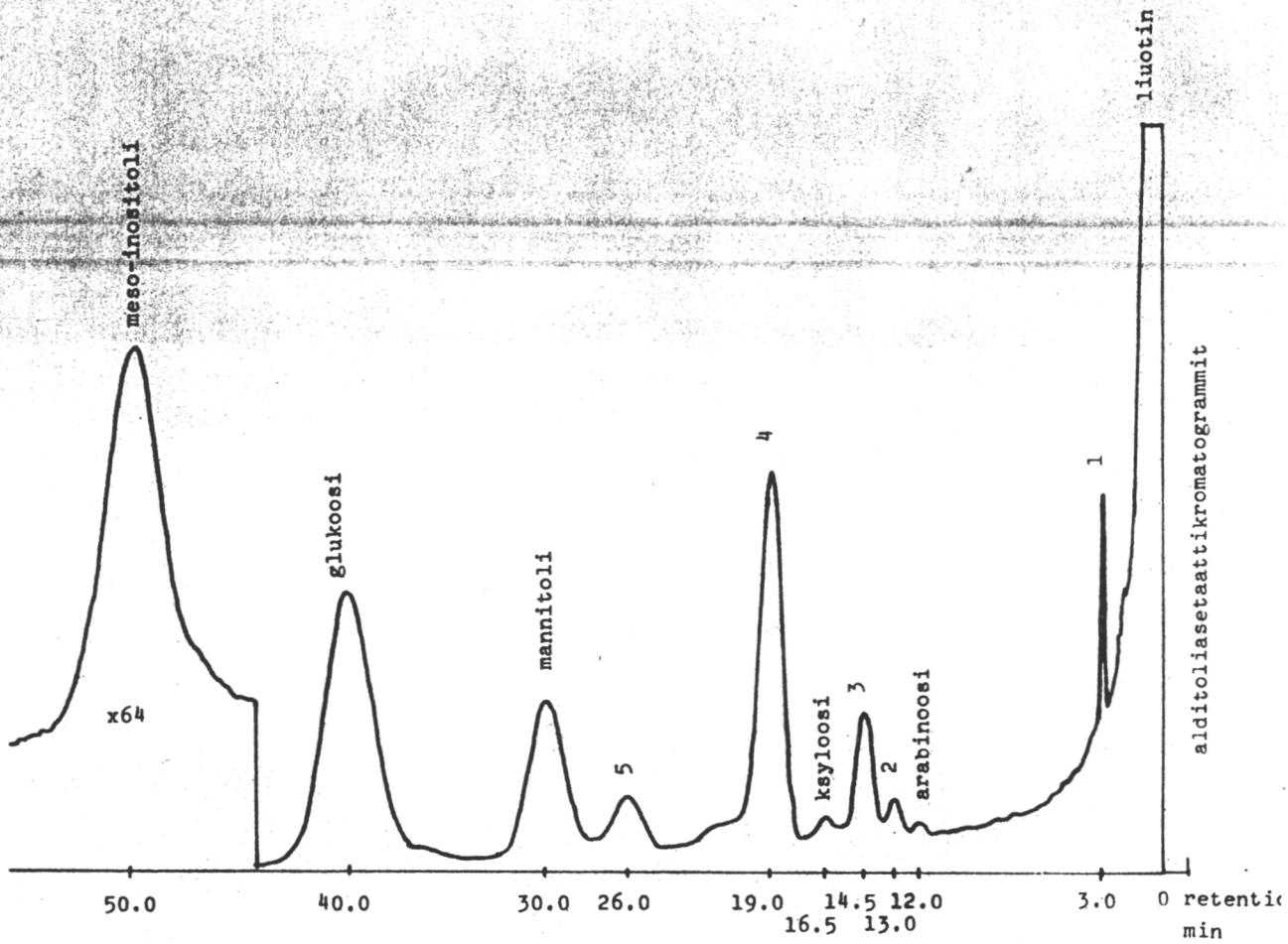
5: taimien pituuskasvu (0.00cm)

6: juurten kuivapaino (0.000g)

7: juurten monosakkaridipitoisuus (000.00mg/g  
kuivapainosta)

8: pituuskasvu/monosakkaridi -suhde (00.00,  
arcsin√x)

9: juurten kuivapaino/monosakkaridi -suhde  
(00.00, arcsin√x)



KUVA 4. Näyteajo PK10B 17.1.1975, vaimennus x512, range 1. PK= fosfori- ja kalilannoitus, 10= 10cm:n pohjaveden taso, B= toisto, 1-5= tunnistamattomat monosakkaridit.

Ksyloosi- ja arabinoosipiikit eivät olleet kaikissa näytteissä erotettavissa taustasta tai ne eivät pienuutensa takia integroituneet johtuen glukoosin suhteen asetetusta vaimennuksesta (range 1, attenuation 254, tai 512). Tämän johdosta eivät näytteiden O10A, U10A ja B, NO50B, NH50A ja B, NN50A ja B ksyloosi- ja näytteiden O10B, U10B, O50A ja B, PK50A, NO50A, NH50A ja B, U50A ja B arabinoosipitoisuudet olleet määritettävissä.

Standardimonosakkarideja vastaavien piikkien lisäksi näytteissä esiintyi viisi tuntematonta monosakkaridipiikkiä (1-5, kuva 4), joista 1 sijaitsi lähellä liuotinpiikkiä, 2 ja 3 arabinoosi- ja ksyloosipiikkien välissä sekä 4 ja 5 ksyloosi- ja mannitoli- piikkien välillä. Näiden monosakkaridien laatu jäi tässä työssä selvittämättä, joskin piikki n:o 1 saattaisi olla jokin trioosi, mahdollisesti erytroosi.

### 312. Kvantitatiivinen analyysi

Juuristonäytteet, joista arabinoosi- ja ksyloosipitoisuudet olivat määritettävissä, sisälsivät lannoituskäsittelystä ja pohjaveden tasosta riippuen arabinoosia 0,02-0,2 % ja ksyloosia 0,03-0,73 % juurten kuivapainosta. Arabinoosi- ja ksyloosipitoisuudet olivat suurimmat lannoittamattomien taimien juurissa, mutta ksyloosipitoisuus oli suuri myös PK-lannoituksen saaneiden taimien juurissa. 50 cm:n pohjaveden tasolla oli juurten ksyloosipitoisuuksia lisäävä vaikutus.

Juurten glukoosi- ja fruktoosipitoisuuksia ei kromatogrammeista voitu laskea, mutta jos jätetään ottamatta huomioon mykoritsaisten juurten sisältämä mahdollinen mannitoli, voidaan tuloksista

huomioiden fruktoosin pelkistyminen sorbitoliksi ja mannitoliksi (50% + 50%) arvioida juurten sisältäneen karkeasti ottaen glukoosia noin 1 % ja fruktoosia noin 1,5 % kuivapainosta.

Lannoituksella ja pohjaveden tasolla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta juurten kokonaismonosakkaridipitoisuuksiin (taulukko 2 ).

Tarkasteltaessa lannoituskäsittelyjen kokonaisvaikutuksia sekä vaikutuksia pohjaveden eri tasoilla (kuva 5) olivat monosakkaridipitoisuudet (laskettuna %:ina kuivapainosta) seuraavat:

Kokonaisvaikutus		Vaikutus pohjaveden eri tasoilla			
	%	10 cm	%	> 50 cm	%
O	18,0	0	29,6	NH	9,2
PK	7,1	PK	9,2	U	7,1
NH	6,9	U	4,8	O	6,4
U	5,9	NH	4,5	PK	5,0
NO	4,4	NO	4,2	NO	4,6
NN	3,7	NN	3,8	NN	3,7

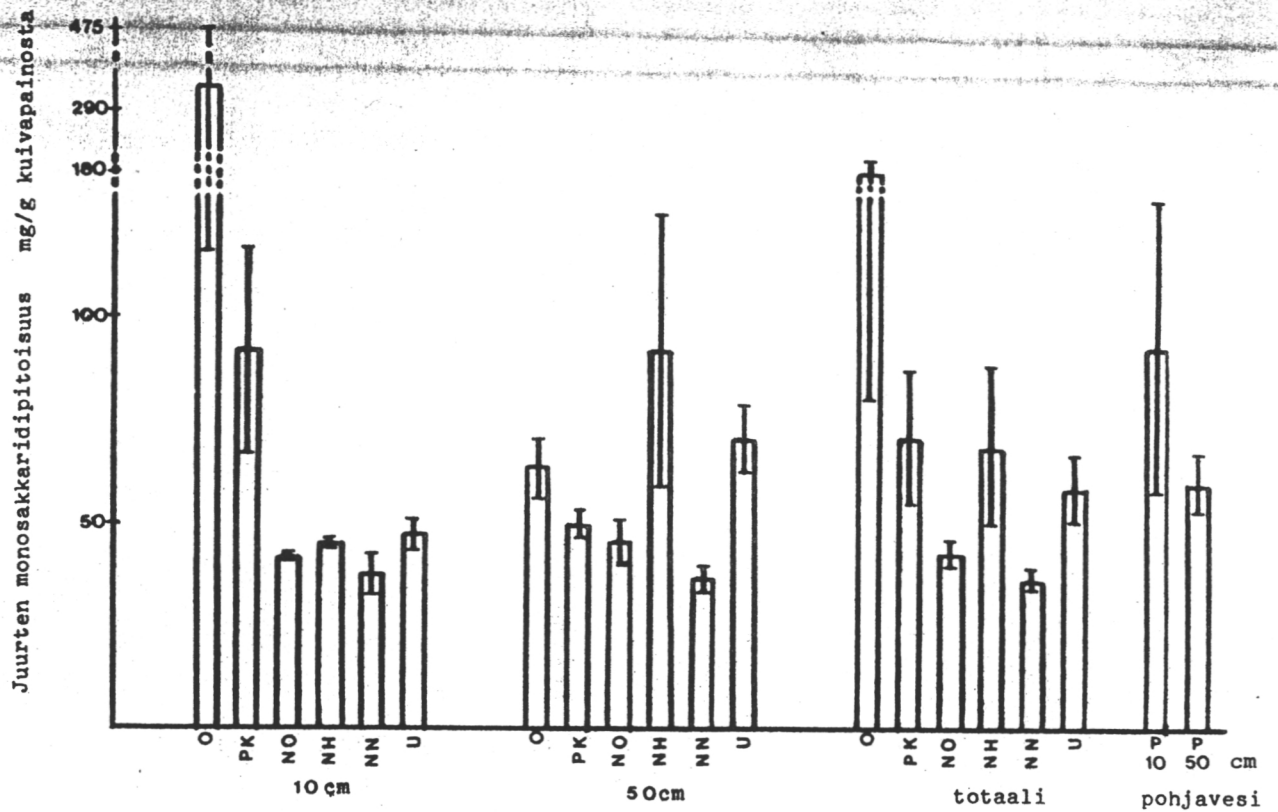
Lannoittamattomien taimien juurten kokonaismonosakkaridipitoisuudet olivat selvästi lannoitettuja taimia suuremmat, mutta suuren hajontansa vuoksi (ka. 180,01 mg/gkp, S.D.† 199,20) ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Typpilannoituksen saaneiden taimien juurten monosakkaridipitoisuudet olivat keskimäärin lannoittamattomia ja PK-lannoitettuja taimia pienemmät. Typpilannoitetuista taimista juurten monosakkaridipitoisuudet olivat pienimmät typpi-seoksella lannoitetuilla taimilla. 50 cm pohjaveden tasolla pitoisuus oli suurin ammoniumtyyppellä (NH) lannoitettujen taimien juurissa.



TAULUKKO 2. Turvealustalla kasvaneiden männyntaimien kasvua ja juuristoja koskevia tuloksia.

MUUTTUJAT	LANNOITUS												P-ARVO		
	O		PK		NO		NH		NN		U		L	P <sub>0</sub>	LxP <sub>0</sub>
	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50			
Taimien pituuskasvu, cm / taimi	1.15	1.20	2.26	4.14	3.22	6.40	5.03	7.25	5.62	6.05	4.92	3.75	xxx	xxx	xx
Juurten kuivapaino mg / taimi	30.0	42.3	86.7	96.4	153.7	98.6	130.3	101.5	191.2	167.5	142.0	62.1	xxx	xx	x
Juurten monosakkaridit, mg / g kuivapainosta	296.2	64.4	92.2	50.0	41.5	46.3	45.3	92.5	37.6	36.9	47.5	71.4	1.91	1.15	1.81
Pituuskasvu/monosakkaridi -suhde, arcsin√x	4.2	7.9	9.3	16.7	16.1	21.9	19.4	17.0	23.0	24.0	18.8	13.3	xxx		x
Juurten kuivapaino/monosakkaridi-suhde, arcsin√x	2.0	4.7	5.7	8.0	11.1	8.4	9.8	6.4	13.1	12.3	10.0	5.4	xxx	x	xx

Selitys: O= lannoittamaton, PK= fosfori- ja kalilannoitus, NO= PK + nitraattityppilannoitus, NH= PK + ammoniutyppilannoitus, NN= PK + nitraatti-ammonium-typpilannoitus, U= PK + ureatyyppilannoitus, L= lannoitus P<sub>0</sub> pohjaveden taso, LxP<sub>0</sub> lannoituksen ja pohjaveden tason välinen yhdysvaikutus.



KUVA 5. Juurten monosakkaridipitoisuudet lannoitusten kokonais- ja osavaikutuksineen.

$\bar{x} \pm s_x$ ;  $s_x^2$   
keskiarvon keskivirhe

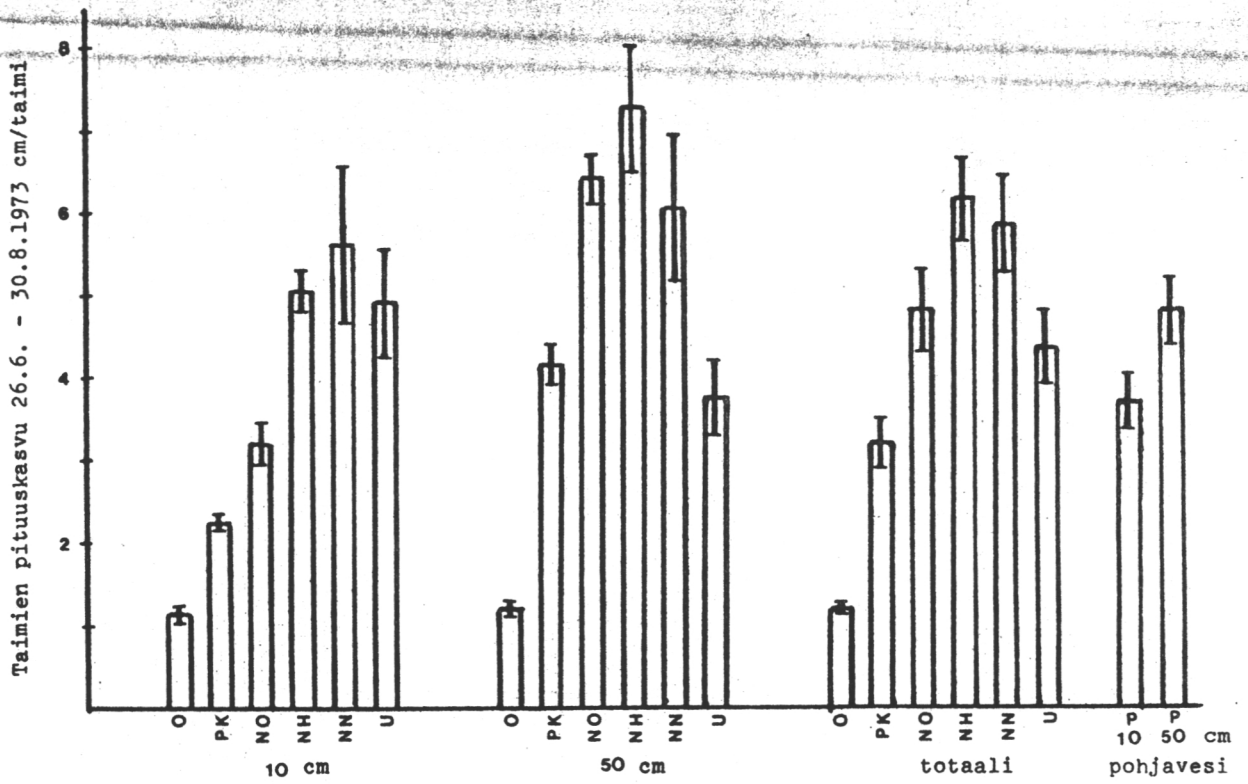
Juurten monosakkaridipitoisuudet olivat lannoittamattomilla ja pelkän PK-lannoituksensaaneilla taimilla 10 cm:n pohjaveden tasolla suurempia kuin 50 cm:n pohjaveden tasolla. Typpilannoitetuilla taimilla sensijaan monosakkaridipitoisuudet olivat 50 cm:n pohjaveden tasolla suurempia kuin 10 cm:n pohjaveden tasolla.

### 32. Pituuskasvu ja juurten monosakkaridit

Lannoituksella oli erittäin merkitsevä ( $p < 0,001$ ) vaikutus sekä taimien pituuskasvuun (kuva 6) että taimien pituuskasvun ja juurten monosakkaridipitoisuuksien väliseen suhteeseen. Pohjaveden tasolla oli erittäin merkitsevä vaikutus vain taimien pituuteen. Lannoituksen ja pohjaveden tason välisellä yhdysvaikutuksella oli taimien pituuteen merkitsevä ( $p < 0,01$ ) ja pituuden ja pitoisuuksien suhteeseen jokseenkin merkitsevä vaikutus ( $p < 0,05$ ). (taulukko 2.)

Lannoituskäsittelyjen vaikutukset taimien pituuskasvuun olivat kokonais- ja osavaikutuksineen sekä tilastollisesti merkitsevine eroineen seuraavat:

Kokonaisvaikutus	cm	Vaikutus pohjaveden eri tasoilla			
		10 cm	***	50 cm	
NH	6,1	NN	5,6 cm	NH	7,2 cm
NN	5,8	NH	5,0	NO	6,4
NO	4,8	U	4,9	NN	6,0
U	4,3	NO	3,2	PK	4,1
PK	3,2	PK	2,3	U	3,8
O	1,2	O	1,2	O	1,2
$p < 0,05$ (*)		O < NH, U; PK < NN		O < U; PK < NO; U < NO, NN	
$p < 0,01$ (**)		O < NN		O < NH, NO, NN, PK PK < NN; U < NH	



KUVA 6. Taimien pituuskasvutulokset lannoitusten kokonais- ja osavaikutuksineen.

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  ; ( $s_{\bar{x}}$  = keskiarvon keskivirhe)

Tuloksista nähdään, että pituuskasvu oli heikoin lannoittamattomilla taimilla, ja että lannoitus paransi selvästi taimien pituuskasvua. Typpilannoitteista parhaimmat tulokset antoivat 10 cm:n pohjaveden tasolla typpiseos ja 50 cm:n pohjaveden tasolla ammoniumnitraatti. Näistä huonoimman tuloksen 10 cm:n pohjaveden tasolla antoi nitraattityppi ja 50 cm:n pohjaveden tasolla urea.

Lannoituskäsittelyjen vaikutus taimien pituuskasvu/juurten monosakkaridi -suhteeseen oli kokonais- ja osavaikutuksineen suurimmasta pienimpään sekä tilastollisine merkitsevyyksineen seuraava:

Kokonaisvaikutus	Vaikutus pohjaveden tasoilla	
	10 cm	< 50 cm
NN	NN	NN
NO	NH	NO
NH	U	NH
U	NO	PK
PK	PK	U
O	O	O
p<0,05 (*)	O<U,NO; PK<NN	O<NH,PK; U<NN,NO
p<0,01 (**)	O<NN,NH	O<NN,NO

Lannoitetuilla taimilla taimien pituuskasvu/juurten monosakkaridi -suhde oli 10 cm:n pohjaveden tasolla suurin typpiseoslannoituksen saaneilla ja pienin PK-lannoituksen saaneilla taimilla. Ero näiden lannoitusten välillä oli jokseenkin merkitsevä. 50 cm:n pohjaveden tasolla tämä suhde oli suurin typpiseoksella ja nitraattitypellä lannoitetuilla ja pienin urealannoitetuilla taimilla. Erot näiden lannoitusten välillä olivat myös jokseenkin merkitsevät.

### 33. Juurten kuivapainot ja monosakkaridit

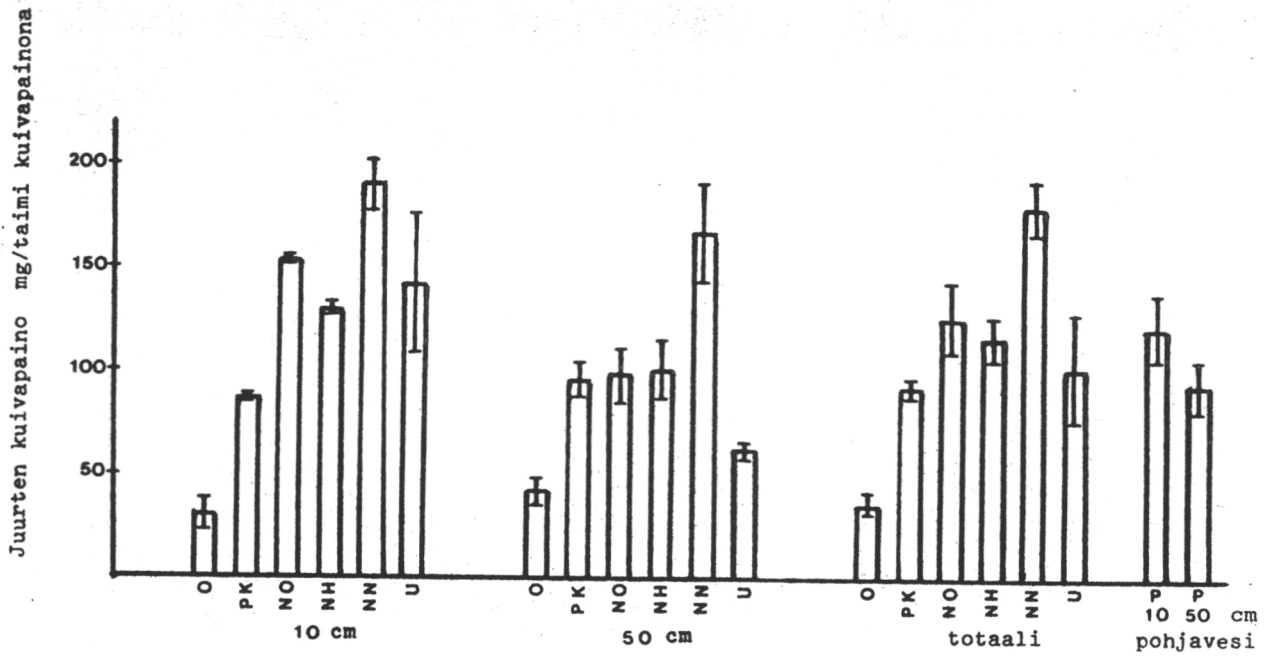
Lannoituksella oli juurten kuivapainoihin erittäin merkitsevä ( $p < 0,001$ ) vaikutus. Lisäksi lannoituksen ja pohjaveden tason välisellä yhdysvaikutuksella oli jokseenkin merkitsevä ( $p < 0,05$ ) vaikutus juurten kuivapainoihin (taulukko 2, kuva 7).

Lannoitusten ja pohjaveden tasojen vaikutukset juurten kuivapainoihin (mg/taimi) olivat tilastollisine eroineen seuraavat:

Kokonaisvaikutus		Pohjaveden tasojen vaikutus			
	mg	10 cm	* > *	50 cm	
NN	179,4	NN	191,2 mg	NN	167,5 mg
NO	126,2	NO	153,7	NH	101,5
NH	115,9	U	142,0	NO	98,6
U	102,1	NH	130,3	PK	96,4
PK	91,6	PK	86,7	U	62,1
O	36,1	O	30,0	O	42,3
	$p < 0,05$ (*)		O < NH; PK < NN		
	$p < 0,01$ (**)		O < NN, NO, U		O < NN; U < NN

Lannoitus lisäsi juurten määrää. Molemmilla pohjaveden tasoilla parhaan tuloksen antoi nitraatti-ammonium-typnoseos. Lannoituskäsittelyistä oli heikoin 10 cm:n pohjaveden tasolla pelkkä PK-lannoitus ja 50 cm:n tasolla urealannoitus. Molempien lannoitusten ero typnoseoslannoitukseen verrattuna oli jokseenkin merkitsevä.

Juurten kuivapainot olivat 10 cm:n pohjaveden tasolla merkitsevästi ( $p < 0,01$ ) suuremmat kuin 50 cm:n pohjaveden tasolla.



KUVA 7. Juurten kuivapainot lannoitusten kokonais- ja osavaikutuksineen.

$$\bar{x} \pm s_{\bar{x}} ; (s_{\bar{x}} = \text{keskiarvon keskivirhe})$$

Lannoituksella oli juurten kuivapaino/monosakkaridipitoisuus -suhteeseen erittäin merkitsevä vaikutus. Lannoituksen ja pohjaveden tason välisellä yhdysvaikutuksella oli myös merkitsevä vaikutus tähän suhteeseen. Pohjaveden tason vaikutus oli jokseenkin merkitsevä (taulukko 2).

Lannoitusten kokonais- ja osavaikutukset juurten kuivapaino/monosakkaridi -suhteeseen olivat suurimmasta pienimpään sekä tilastollisine eroineen seuraavat:

Kokonaisvaikutus	Pohjaveden tasojen vaikutukset	
	10 cm	50 cm
NN	NN	NN
NO	NO	NO
NH	U	PK
U	NH	NH
PK	PK	U
O	O	O
	10 cm	50 cm
p < 0,05 (*)	PK<NO	NH<NN
p < 0,01 (**)	O<NN,NO,U,NH; PK<NN	O<NN; U<NN

Juurten kuivapaino/monosakkaridi -suhde oli suurin nitraatti-ammonium-typpiseosta saaneilla taimilla molemmilla pohjaveden tasoilla. Lannoitetuista taimista suhde oli pienin 10 cm:n pohjaveden tasolla pelkän PK-lannoituksen saaneilla taimilla ja 50 cm:n pohjaveden tasolla urealannoitetuilla taimilla. Ero edellisten ja typpiseoksen saaneiden taimien välillä oli merkitsevä. Lisäksi 10 cm:n pohjaveden tasolla pelkkä PK-lannoitus erosi nitraatti-typpilannoituksesta ja 50 cm:n pohjaveden tasolla ammonium-typpilannoitus typpiseoslannoituksesta jokseenkin merkitsevästi. Suhde oli 10 cm:n pohjaveden tasolla suurempi kuin 50 cm:n pohjaveden tasolla.



#### 4. TULOSTEN TARKASTELU

##### 41. Monosakkaridien analyysimenetelmä

käytetyn kaasukromatografisen menetelmän heikkoutena voidaan pitää tässä työssä sen huonoa soveltuvuutta juuristomateriaalin kvalitatiivis-kvantitatiiviseen monosakkaridianalyysiin. Syynä tähän on se että analysoitaessa monosakkarideja alditoliasetaatteina juurten liukoinen fruktoosi muuttuu pelkistettäessä kahdeksi sokerialkoholiksi sorbitoliksi (glucitoliksi) ja mannitoliksi uuden asymmetrise hiiliatomin ilmaantumisen vuoksi prosessissa (WEST ym. 1966, sivu 192). Syntyneet pelkistystuotteet näkyvät kromatogrammissa sekä sorbitoli-(glukoosi) että mannitoli-(mannoosi)piikkinä (kuva 3). Tämän vuoksi olisi tässä työssä pitänyt juuriston kvalitatiiviseen monosakkaridianalyysiin käyttää trimetyylisilyyli-eetterimenetelmää (FORD 1974, ERICSSON ym. 1978), jossa kuitenkin esiintyy myös analyysin tulkintaan nähden tiettyjä omia hankaluuksia. Sen, kuten alditoliasetaattimenetelmän, etuna on raakaetanoliuutteen käyttökelpoisuus, mutta haittana se, että kukin monosakkaridi voi tuottaa jopa neljän syklisen sokerikomponentin seoksen. Tämän rengasisomerisaation ja pyranosidien ja furanosidien  $\alpha$ - ja  $\beta$ -anomeerimuodostuksetä kukin komponentti voi muodostaa kromatogrammiin oman piikkins mikä taas aiheuttaa erottamis- ja määrittäsongelmia. Alditoliasetaattimenetelmässä anomeerien muodostus voidaan välttää, sillä alditolit eivät anomerisoidu (SAVARDEKER ym. 1965, SJÖSTRÖM ym. 1966).

Monosakkaridien lopullisessa tunnistamisessa tulisi lisäksi käyttää hyväksi massaspektometriaa, johon tämän työn yhteydessä ei kuitenkaan ollut mahdollisuuksia.

Inositolin käyttöä sisäisenä standardina voidaan kritisoida, koska sitä esiintyy luonnossa mm. männyn neulasissa ja versoissa (ERICSSON ym. 1978) sekä pyökin juurissa (LEWIS ja HARLEY 1965a). Lisäksi alditoliasetaattimenetelmässä on havaittu puumassan hiilihydraattianalyysin yhteydessä inositolissa sitä sisäisenä standardina käytettäessä selektiivistä häviötä puumassan neutralointi ja konsentroituvaiheessa, mihin syynä pidetään inositolin heikkoliukoisuutta veteen (CROWELL ja BURNETT 1967). CROWELL ja BURNETT (1967) pitävät inositolia lisäksi epäsojivana itse pelkistysreaktiolle, koska inositoli jo itsessään on alditoli, johon monosakkaridien pelkistyksellä pyritään.

Tässä työssä ei näytteitä ajettu kaasukromatografisesti ilman sisäistä standardia inositolia, joten mahdollista männyn juurten sisältämää myo-inositolia ei voitu todentaa eikä myöskään huomioida kvantitatiivisissa määrityksissä (vrt. ERICSSON ym. 1978).

Verrattaessa tämän työn standardimonosakkarideista saatuja kromatogrammi- ja pinta-alojen ts. pitoisuuksien suhteen (ottaen lisäksi huomioon näiden sokerien monomeeriderivaattien väliset erot detektoriherkkydessä) ei inositoli osoittanut pitoisuushäviötä. Vaikka näyteajojen kromatogrammeista ei mahdollista sisäiseen standardipiikkiin sisältyvän juuristoperäisen inositolin olemassaoloa voitu kumota, tekijä ei katsonut tämän estävän tulosten tulkintaa, varsinkin kun tiedot inositoli-havainnoista mäntyjen juurista toistaiseksi puuttuvat, ja kun tarkastelu perus-

tuu lähinnä monosakkaridipitoisuuksien suhteellisiin eroihin.

#### 42. Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen monosakkaridianalyysi

Männyn taimien mykoritsaiset juuret sisälsivät männyillä aiemmin tunnetuista liukoisista monosakkarideista glukoosia, fruktoosia ja arabinoosia (SLANKIS ym. 1964, AGNIHOTRI ja VAARTAJA 1967, LISTER ym. 1968, MARX ym. 1977) sekä männyillä aiemmin juurista analysoimatonta ksyloosia ja mannitolia. Ksyloosia on löydetty eukalyptuksen (Eucalyptus pilularis Sm.) juurten eritteistä (CARTWRIGHT 1967). Mannitolin, jota on löydetty pyökin mykoritsoista, katsotaan olevan peräisin mykoritsan sieniosakkaan rihmastosta (LEWIS ja HARLEY 1965a).

Tässä työssä männyllä lannoittamattomien taimien juurista havaitun mannitolin onkin nykyisten tietojen perusteella katsottava olevan peräisin niiden mykoritsojen sienirihmastosta, sillä puiden juurissa ei ole havaittu liukoista mannoosia (LEWIS ja HARLEY 1965a). Saatutulos kuvastaisi näinollen epäsuorasti niiden mykoritsaisuutta.

Aiemmat männyn juurten hiilihydraattipitoisuuksia koskevat tutkimukset ovat perustuneet kolorimetrisiin määrityksiin. BJÖRKMANIN (1942-1944) mukaan yksivuotiaiden männynntaimien liukoisten hiilihydraattien pitoisuudet vaihtelivat 1,1-5,8 %:iin (glukoosina laskettuna) kuivapainosta. BJÖRKMANIN (1942) koetta jäljittelevässä tutkimuksessa HANDLEY ja SANDERS (1962) havaitsivat männyllä mykoritsattomien juurten hiilihydraattipitoisuuksien vaihtelevan 7,1-8,9 %:iin kuivapainosta. Muilla mäntylajeilla on etelänkeltamännyn (Pinus eliottii) yksivuotiaiden taimien mykoritsaisten juurten ilmoitettu sisältäneen liukoisia pelkistyviä sokereita 6,2 % juurten kuivapainosta.

Tässä työssä havaitut juurten sisältämien alkoholiliukoisten monosakkaridien pitoisuudet, jotka vaihtelivat lannoituksesta ja pohjaveden tasosta riippuen 3,7-29,6 %:iin (ka. 7,7 %) kuivapainosta, käyvät melko hyvin yksiin aiempien liukoisia pelkistyviä hiilihydraatteja koskevien tutkimustulosten kanssa lukuunottamatta näytettä 010A (lannoittamaton, pohjaveden taso 10 cm). Tälle näytteelle saatu konsentraatio 47,7 % kuivapainosta on ehkä selitettävissä näytteen pelkistysvaiheen aikana natriumin poistovaiheessa esiintyneestä runsaasta kuohumisesta ja vaalean vaahdon muodostumisesta sekä tätä seuranneesta kromatogrammi- ja piikkien huonosta eriytymisestä, mikä lisäsi piikkien kokonaispinta-alaa.

Ksyloosista ja arabinoosista tunnetaan männyn juurista arabinoosin osalta vain kvalitatiivisia havaintoja, kun taas ksyloosista ei ole kvalitatiivisia eikä kvantitatiivisia tietoja. Analyysissä käytettyjen (glukoosi- ja mannitolipiikkien suhteen sovitettujen) vaimennusten takia saadut ksyloosi- ja arabinoosipitoisuudet ovat lähinnä suuntaa-antavia, joskin tuloksista voidaan laskea niiden pitoisuuksien olevan noin 5-35 kertaa pienempiä kuin arvioidut glukoosi- ja fruktoosipitoisuudet.

### 43. Lannoitusvaikutukset

#### 431. Monosakkaridit

Lannoituksen on männyllä havaittu vaikuttavan juurten liukoisten hiilihydraattien pitoisuuksiin. BJÖRKMANin (1942, koe 4) tulosten mukaan yksivuotiailla männyn taimilla juurten pelkistävien hiilihydraattien konsentraatiot pienenevät typpilannoitusmäärien kasvaessa. Fosforilannoituksen vaikutus oli tyyppeen nähden selvästi vähäisempi. Suurimmat pitoisuudet löytyivät lannoittamattomien taimien juu-

rista. Tämän ja toisen tutkimuksensa perusteella BJÖRKMAN (1942, 1944) päättelikin, että typpilannoitus vähentäessään juurten liukoisten hiilihydraattien määrää samalla vähentää tai jopa estää mykoritsanmuodostusta juurissa.

RICHARDS ja WILSON (1963) eivät havainneet yksivuotiailla karibiankeltamännnyillä (Pinus caribaea Mor.) korrelaatiota juurten liukoisten hiilihydraattien ja mykoritsojen määrän välillä, mutta kylläkin mykoritsa-%:n ja juurten liukoiset hiilihydraatit/juurten totaali-typpi -suhteen välillä. LISTER ym. (1968, taulukot 9 ja 10) eivät kolmivuotiailla strobustumännyn (P. strobus) taimilla havainneet eri typpi- ja fosforilannoitusmääriä käytettäessä selvää korrelaatiota juurten mykoritsanmuodostuksen ja yksittäisten hiilihydraattien (sakkaroosi, raffinoosi ja glukoosi)  $^{14}\text{C}$  -pitoisuuksien välillä. Heidän tuloksensa osoittivat kuitenkin, että pelkällä typpellä lannoitettaessa typpimäärän lisäys alensi juurten kokonaishiilihydraattipitoisuuksia. Typpellä ja fosforilla lannoitettaessa näiden määrien lisäys alensi kylläkin juurten kokonaishiilihydraattipitoisuuksia, mutta lisäsi glukoosi- ja fruktoosipitoisuuksia. Lisäksi ovat MARX ym. (1977) havainneet yksivuotiailla loblollymännnyillä (P. taeda) niiden steriileissä juurissa negatiivista korrelaatiota suurten typpi- ja fosforimäärien ja lyhytjuurten mykoritsanmuodostuksen välillä sekä myös lyhytjuurten sakkaroosipitoisuuksien (ei-pelkistytävä sokeri) välillä, muttei fruktoosipitoisuuksien (pelkistytävä sokeri) välillä.

Tässä työssä tulokset olivat BJÖRKMANin (1942,1944) tulosten kanssa samansuuntaisia siinä, että juurten liukoisten monosakkaridien pitoisuudet olivat suurimmat lannoittamattomilla ja pelkän PK-

lannoituksen saaneilla taimilla, ja että typpilannoitteet vähensivät juurten monosakkaridipitoisuuksia (taulukko 2). Tosin erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

#### 432. Pituuskasvu/monosakkaridi -suhde

Pituuskasvun ja juurten liukoisten hiilihydraattien pitoisuuksien välistä suhdetta ei aiemmissa tutkimuksissa ole varsinaisesti tarkasteltu. Vertailtaessa aiempien tutkimusten pituuskasvu- ja hiilihydraattituloksia ei männyntaimilla BJÖRKMANin (1944) ja HANDLEYn ja SANDERSin (1962) tulosten mukaan näiden välillä esiinny korrelaatiota, kun taas SHOULDERSin (1972) tulosten mukaan etelänkeltamännyllä (Pinus elliottii) juurten sekä kokonaishiilihydraattien että pelkistyvien sokereiden pitoisuudet sekä taimien pituuskasvu olivat mykoritsattomissa taimissa suuremmat kuin mykoritsaisissa taimissa. BJÖRKMANin (1942) tuloksista typpi- ja fosforimäärien lisäys näkyi sekä mykoritsaisten juurten hiilihydraattipitoisuuksien vähentymisenä että verson kuivapainon kasvuna.

BJÖRKMANin (1942) tulokset ovat tämän työn tulosten kanssa hyvin samansuuntaisia, sillä typpilannoitus vähensi juurten liukoisten kokonaismonosakkaridipitoisuutta ja paransi taimien pituuskasvua (taulukko 2). Erot taimien pituuskasvu/juurten hiilihydraatti -suhdessa tuovatkin hyvin esiin typpilannoituksen paremmuuden pelkkään PK-lannoitukseen verrattuna. Myös ammonium -typen nitraatti-tyyppiä parempi vaikutus kasvualustan vesitalouden ollessa huono (10 cm:n pohjaveden taso) näkyy myös koko aineistoa (toistot a-d)koskevissa pituuskasvutuloksissa (PAAVILAINEN ja NORLAMO 1975).

#### 433. Juurten kuivapaino/monosakkaridi -suhde

BJÖRKMANin (1942) tuloksia tarkasteltaessa havaitaan, että typen määrän lisäys vähensi männyn taimilla sekä juurten hiilihydraattipitoisuuksia että juurten kuivapainoja. Fosforimäärien lisäys alensi myös juurten hiilihydraattipitoisuuksia, mutta lisäsi juurten kuivapainoja. SHOULDERSin (1972) tulosten mukaan etelänkeltamännyllä (Pinus elliottii) kuivapainoltaan pienemmät mykoritsattomat juuret sisälsivät enemmän hiilihydraatteja kuin kuivapainoltaan suuremmat mykoritsaiset juuret.

Tästä työstä saadut tulokset ovat osaksi edellisten kanssa samankaltaisia typpilannoituksen juurten monosakkaridipitoisuuksia vähentävän ja kuivapainoja lisäävän vaikutuksen suhteen lukuunottamatta urealannoitusta, jonka vaikutus vesitalouden ollessa hyvä (50 cm:n pohjaveden taso) poikkesi muista typpilannoitelajeista.

#### 44. Yhteenveto

Tulosten mukaan typpilannoitus yhdessä fosfori- ja kalilannoituksen kanssa annettuna paransi taimien pituuskasvua ja juurten muodostusta. Kasvualustan vesitalouden ollessa hyvä (50 cm:n pohjaveden taso) oli urealannoituksen vaikutus kuitenkin pelkkää PK-lannoitusta heikompi, joskin näiden välinen ero ei ollut merkitsevä. Selityksenä ureatypen heikompaan kasvuvaikutukseen ovat PAAVILAINEN & NORLAMO (1975) esittäneet havaintonsa, missä ureatypellä oli muihin typpilannoitelajeihin verrattuna ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{+NH}_4\text{-N}$ ) turpeen kokonaisbakteerimääriä selvästi lisäävä vaikutus aiheuttaen runsaampaa typen biologista sitoutumista turpeeseen, mikä taas vuorostaan näkyi männyntaimien heikompana kasvuna.

Kasvualustan vesitalouden merkitys tuli näkyviin tässä aineistossa etenkin typpilannoitettujen taimien kohdalla. Typpilannoitettujen taimien hyvä pituuskasvu ja kohtalainen juurten muodostus vesitalouden ollessa hyvä (50 cm:n pohjaveden taso) kuvastaa ravinteiden hyvää saatavuutta kasvualustasta, kun taas näiden huono pituuskasvu ja runsas juurten muodostus vesitalouden ollessa huono kuvastaa taimien reaktiota hyödyntää olosuhteiden heikentämä kasvutilanne mahdollisimman hyvin. Tulokset ovatkin yhdenmukaisia HUIKARIN ja PAARLAHDEN (1967) ekologisten kenttäkoetulosten kanssa, joiden mukaa lannoitus antaa parhaan kasvutuloksen vain, kun kasvualustan vesitalous on kunnossa ts. sen ei ollessa kasvua rajoittavana tekijänä.

Lannoituksen ja juurten liukoisten monosakkaridien välistä suhdetta on vaikeampi tulkita. Verrattaessa PAAVILAISEN ja NORLAMON (1975, taulukko 7) mykoritsoja koskevia tuloksia (toistot c ja d) tämän työn (sama koe, toistot a ja b) tuloksiin havaitaan typpilannoituksen (PK + ureatyppilannoitusta lukuunottamatta) parantaneen taimien kasvua, ehkäisseen juurten mykoritsanmuodostusta, vähentäneen juurten liukoisten monosakkaridien pitoisuuksia sekä suurentaneen sorbitoli- ja mannitolipiikin välistä suhdetta. Monosakkaridipitoisuuksien vähentymistä sekä glukoosi(sorbitoli)/mannitolipiikki -suhteen suurentumista on voitava pitää eräänä osoituksena typpilannoituksesta aiheutuneesta mykoritsanmuodostuksen vähenemisestä. Etenkin tämän suhteen ilmaisema sieniperäisen mannitolin vähentymisen viittaa tähän.



## 5. TIIVISTELMÄ

Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään astiakokeena lannoituksen ja pohjaveden tason vaikutusta männyn (Pinus sylvestris L.) taimien alkukehitykseen, juurten monosakkaridikoostumukseen ja -pitoisuuksiin sekä näiden välisiin suhteisiin turvealustalla. Juurten monosakkaridimäärityksissä käytettiin alditoliasetaattimääritykseen perustuvaa kaasukromatografista menetelmää.

Tutkimus suoritettiin kasvihuonekokeena käyttäen koeastioissa kasvualustana typpiköyhää rahkanevaturvetta. Käytetyt pohjaveden säännöstelytasot olivat 10 ja 50 cm. Lannoitteina käytettiin pintaan annettuna suometsien PK-lannosta (150 kg P<sub>2</sub>O/ha) sekä liuoksena injektioruiskulla taimien juurikerrokseen kahdessa erässä annettuna (kummallakin kerralla 75 kg N/ha) kalkkisalpietaria (NO<sub>3</sub>-N), kalkkiammonsalpietaria (NH<sub>4</sub>-NO<sub>3</sub>-N), ammoniumsulfaattia (NH<sub>4</sub>-N) ja ureaa. Kokeessa oli kuusi lannoituskäsittelykahtena toistona (neljä typpilannoittelajia + PK-lannoitus, pelkkä PK-lannoitus sekä lannoittamaton vertailu), kaksi pohjaveden säännöstelytasoa (10 ja 50 cm) yhteensä 24 koeastiaa. Kuhunkin koeastiaan istutettiin 10 sirkkatainta 26.6.1973 ja koe päätettiin 30.8.1973.

Alkoholiliukoisten pelkistyvien monosakkaridien tutkimiseen käytetty kaasukromatografinen analyysimenetelmä, jossa kaasu-nestekromatografiaan perustuen monosakkaridit analysoitiin vastaavina alditoliasetaatteina, osoittautui juuristomateriaalin analysoimisessa huonoksi siinä suhteessa, että mikäli aineisto sisältää fruktoosia sen pelkistymistuotteet sorbitoli ja mannitoli vaikeuttavat glukoosin ja mykoritsan sieniperäisen mannitolin sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tulkintaa.

Männyn juuret sisälsivät männyillä aiemmin havaituista liukoisista pelkistyvistä monosakkarideista glukoosia, fruktoosia ja arabinoosia sekä lisäksi ksyloosia, jota ei aikaisemmin ole ilmoitettu löytyneen männyillä. Lisäksi juuret (ainakin lannoittamattomien taimien) sisälsivät mykoritsasta (sen sieniosakkaasta) peräisin olevaa mannitolia.

Juurten kokonaismonosakkaridipitoisuudet vaihtelivat (%:na kuivapainosta) keskimäärin 3,7-29,6 %:iin, ksyloosipitoisuudet 0,03-0,73 %:iin ja arabinoosipitoisuudet 0,02-0,2 %:iin lannoituskäsittelystä ja pohjaveden tasosta riippuen.

Typpilannoituksella (NPK) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus taimien pituuskasvuun, juurten kuivapainoon, juurten kokonaismonosakkaridipitoisuuteen sekä pituuskasvu/juurten monosakkaridi- että juurten kuivapaino/juurten monosakkaridi -suhteeseen. Typpilannoitus paransi taimien pituuskasvua parhaiten vesitalouden ollessa hyvä (50 cm:n pohjaveden taso), lisäsi juurten kuivapainoa ja alensi juurten monosakkaridipitoisuuksia vesitalouden ollessa huono (10 cm:n pohjaveden taso).

Typpilannoittelajeista keskimääräisesti parhaan pituuskasvutuloksen antoi ammonium-nitraatti-typpilannoitus (kalkkiammonsalpietari) ja heikoimman tuloksen urealannoitus, joka kuitenkin antoi paremman tuloksen kuin pelkkä PK-lannoitus.

Tulosten mukaan typpilannoitus PK-urealannoitusta ehkä lukuunottamatta paransi selvästi männyn taimien alkukehitystä, pituuskasvua ja juurten muodostusta sekä vähensi juurten liukoisten monosakkaridien pitoisuuksia, mikä viittasi epäsuorasti mykoritsanmuodostuksen vähentymiseen.

## KIRJALLISUUSLUETTELO

- AGNIHOTRI, V.P. & VAARTAJA, O. 1967. Root exudates from red pine seedlings and their effects on Pythium ultimum. *Canad. J. Bot.* 45:1031-1040.
- BJÖRKMAN, E. 1942. Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. *Symb. Bot. Upsala* 6(2):1-191.
- \_\_\_\_\_. 1944. The effect of strangulation on the formation of mycorrhiza in pine. *Svensk Bot. Tidskr.* 38(1):1-14.
- \_\_\_\_\_. 1970a. Forest tree mycorrhiza - the conditions for its formation and the significance for tree growth and afforestation. *Plant & Soil* 32:589-610.
- \_\_\_\_\_. 1970b. Mycorrhiza and tree nutrition in poor forest soils. Sammanfattning: Mycorrhiza och näringsupptagning hos skogsträd i mager skogsjord. *Stud. For. Suec.* 83:1-23.
- BOWEN, G.D. & THEODOROÛ, C. 1973. Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots. In: Marks, G. C. & Kozlowski, T.T. (Eds.) *Ectomycorrhizae - their ecology and physiology*. Academia Press. New York, p. 107-150.
- CARTWRIGHT, J.B. 1967. A study on the interaction between Cylindrocarpon radicum Wr. and the roots of blackbutt (Eucalyptus pilularis Sm.). Ph. D. thesis University of Sydney. (Sit. Bowenin ja Theodoroun 1973 mukaan.)
- CROWELL, E.P. & BURNETT, B.B. 1967. Determination of the carbohydrate composition of wood pulps by gas chromatography of the alditol acetates. *Anal. Chem.* 39(1):121-124.
- ERICSSON, A., HANSEN, J. & DALGAARD, L. 1978. A routine method for quantitative determination of soluble carbohydrates in small samples of plant material with gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 86: 552-560.
- FORD, C.W. 1974. Semimicro quantitative determination of carbohydrates in plant material by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 57:413-420.
- HANDLEY, W.R.C. & SANDERS, C.J. 1962. The concentration of easily soluble reducing substances in roots and the formation of ectotrophic mycorrhizal associations - a re-examination

- of Björkman's hypothesis. *Plant & Soil* 16(1):42-61.
- HANSEN, J., STRÖMQUIST, L-H. & ERICSSON, A. 1978.  
Influence of the irradiance on carbohydrate content and rooting  
of cuttings of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.)  
*Plant physiol.* 61:975-979.
- HARLEY, J.L. 1969. *The biology of mycorrhiza*. 2nd ed. Leonard  
Hill. London. 334 p.
- HATCH, A.B. 1937. The physical basis of mycotrophy in *Pinus*.  
*Black Rock Forest. Bull.* 6:1-168.
- HUIKARI, O. & PAARLAHTI, K. 1967. Results of field experiments  
on the ecology of pine, spruce and birch. *Seloste: Kenttä-*  
*kokeiden tuloksia männyn, kuusen ja koivun ekologiasta.*  
*Commun. Inst. For. Fenn.* 64(1):1-135.
- JUUSELA, T., KAUNISTO, S. & MUSTONEN, S. 1969. Turpeesta tapah-  
tuvaan haihduntaan vaikuttavista tekijöistä. Summary: On  
factors affecting evapotranspiration from peat. *Commun.*  
*Inst. For. Fenn.* 67(1):1-45.
- LEWIS, D.H. & HARLEY, J.L. 1965a. Carbohydrate physiology of  
mycorrhizal roots of beech. I. Identity of endogenous sugars  
and utilization of exogenous sugars. *New Phytol.* 64(2):224-237.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ 1965 b. Carbohydrate physiology of  
mycorrhizal roots of beech. II. Utilization of exogenous  
sugars by uninfected and mycorrhizal roots. *New Phytol.*  
64(2):238-255.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ 1965c. Carbohydrate physiology of  
mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between  
host and fungus. *New Phytol.* 64(2):256-269.
- LISTER, G.R., SLANKIS, V., KROTKOV, G. & NELSON, C.D. 1968.  
The growth and physiology of *Pinus strobus* L. seedlings as  
affected by various nutritional levels of nitrogen and  
phosphorus. *Ann. Bot.* 32:33-43.
- MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. (Eds.), 1973. *Ectomycorrhizae*  
- their ecology and physiology. Academic Press. New York.  
444 p.

- MARX, D.H., HATCH, A.B. & MENDICINO, J.F. 1977. High soil fertility decreases sucrose contents and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by Pisolithus tinctorius. *Canad. J. Bot.* 55:1569-1574.
- MELIN, E. & NILSSON, H. 1957. Transport of C<sup>14</sup>-labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. *Svensk Bot. Tidsskr.* 51:166-186.
- MEYER, F.H. 1962. Der Buchen- und Fichtenmycorrhiza in verschiedenen Bodentypen, ihre Beeinflussung durch Mineraldünger sowie für die Mycorrhizabildung wichtige Faktoren. *Mitt. Bundesforsch. Anst. Forst- u. Holzwirtschaft.* 54:1-73.
- 1965. Die Mycorrhiza der Waldbäume. *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.* 62:54-58.
- 1974. Physiology of mycorrhiza. *Ann. Rev. Pl. Phys.* 25:567-86.
- MIKOLA, P. & LAIHO, O. 1962. Mycorrhizal relations in the raw humus layer of northern spruce forests. *Commun. Inst. For. Fenn.* 55(18):1-13.
- MITCHELL, H.L., FINN, R.F. & ROSENDAHL, R.O. 1937. The relation between mycorrhizal and the growth and nutrient absorption of conifer seedlings in nursery beds. *Black Rock For. Pap.* 1:58-73.
- PAAVILAINEN, E. & NORLAMO, M. 1975. Effect of various nitrogen fertilizers on the initial development of birch, spruce and pine. *Seloste: Tyypilannoitelajien vaikutus koivun, kuusen ja männyn alkukehitykseen.* *Commun. Inst. For. Fenn.* 86(2):1-43.
- RICHARDS, B.N. & WILSON, G.L. 1963. Nutrient supply and mycorrhiza development in caribbean pine. *For. Sci.* 9(4):405-412.
- SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H. & JEANES, A. 1965. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gasliquid chromatography. *Anal. Chem.* 37(12):1602-1604.
- SHOULDERS, E. 1972. Mycorrhizal inoculation influences survival, growth and chemical composition of slash pine seedlings. *U.S. For. Serv. Res. Pap.* SO-74:1-13.

- SJÖSTRÖM, E., HAGLUND, P. & JANSON, J. 1966. Quantitative determination of carbohydrates in cellulosic materials by gas-liquid chromatography. Svensk Papp.Tidn. 69(11):381-385.
- SLANKIS, V. 1971. Formation of ectomycorrhiza of forest trees in relation to light, carbohydrates, and auxins.  
In: HacsKaylo, E. (Ed.) Mycorrhizal - Proc. 1st North Amer. Conf. on Mycorrhizal, April 1969. Misc. Publ. 1189. U.S.D.A. For. Serv. p. 151-167.
- , RONECKLES, V.C. & KROTKOV, G. 1964. Metabolites liberated by roots of white pine (Pinus strobus L.) seedlings. *Physiol. Plant.* 17:301-313.
- SMITH, W.H. 1969. Release of organic materials from the roots of tree seedlings. *For. Sci.* 15(2):138-143.
- SWEeley, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. & WELLS, W.W. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2497-2507.
- WEST, E.S., TODD, W.R., MASON, H.S. & BRUGGEN, J. T. van 1966. *Textbook of biochemistry*. 4th ed. Macmillan Co. New York. 1595 p.





