

Dissertationes Forestales 75

# Kuusen karaistuminen boorinpuutoksessa

Mikko Räisänen

Metsätieteellinen tiedekunta, Joensuun yliopisto

Tohtorin väitöskirja

28.11.2008, Joensuun yliopisto, Sali C2

*Väitöskirjan otsikko:* Kuusen karaistuminen boorinpuutoksessa

*Kirjoittaja:* Mikko Räisänen

*Dissertationes Forestales* 75

*Väitöstutkimuksen ohjaajat:*

Dosentti Tarja Lehto  
Metsätieteellinen tiedekunta, Joensuun yliopisto  
Dosentti Tapani Repo  
Joensuun toimintayksikkö, Metsäntutkimuslaitos

*Esitarkastajat:*

MMT Jaana Luoranen  
Suonenjoen toimintayksikkö, Metsäntutkimuslaitos  
FT Sirkka Sutinen  
Joensuun toimintayksikkö, Metsäntutkimuslaitos

*Vastaväittäjä:*

Professori Marja-Liisa Sutinen,  
Rovaniemen toimintayksikkö, Metsäntutkimuslaitos

ISSN 1795-7389

ISBN 978-951-651-238-2 (PDF)

*Julkaisijat:*

Suomen Metsätieteellinen Seura  
Metsäntutkimuslaitos  
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto  
Metsätieteellinen tiedekunta, Joensuun yliopisto

*Toimitus:*

Suomen Metsätieteellinen Seura  
PL 18, 01301 Vantaa  
<http://www.metla.fi/dissertationes>

**Räisänen, M. 2008.** Cold acclimation of boron deficient Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Dissertationes Forestalis* 75. 26 p.  
Available at <http://www.metla.dissertationes/df75.htm>

Dieback of boron (B) deficient trees has interested scientists for decades. Although decreased freezing tolerance has been hypothesized to be one of the reasons for dieback, there is no experimental evidence supporting that hypothesis.

A field experiment with boron (B) and nitrogen (N) fertilization treatments was established in a young Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) stand with low B status. Freezing tolerance of experimental trees was studied during acclimation after one, three and five growing seasons after fertilization treatments. In addition, Norway spruce seedlings were cultivated at three B levels for two growing seasons prior to measuring freezing tolerance. Freezing tolerance of acclimated buds was also studied in three Norway spruce stands which differed in percentage of trees with growth disturbance. Freezing tolerance was studied by controlled freezing tests and electrolyte leakage (EL) and visual scoring, by differential thermal analysis (DTA) and by electrical impedance spectroscopy (EIS).

Cold hardiness in stem and bud (by DTA and EL) was decreased at B deficiency in cold hardened seedlings. Also results of EIS indicated that seedlings were more vulnerable to freeze drought at low B levels. In the field experiment, however, freezing tolerance of B deficient trees was not increased by B or N fertilization. In buds collected from field, no supercooling ability of buds was found when bud structure was malformed by B deficiency. There was also a slight effect of B on rapid dehardening and rehardening of cold hardened buds.

Freezing tolerance of cold hardy buds and stem in apical shoot was decreased when B status of spruce greatly below critical limits of B deficiency. However, since effect of B was found in this study only in a small part of data and at very low B level, the increased risk for freezing injury in B deficiency may not have a primary role in the outbreak of growth disturbance.

Keywords: Boron deficiency, Dieback, Freezing tolerance, Cold acclimation, Spruce, *Picea abies*

**Räisänen, M. 2008.** Kuusen karaistuminen boorinpuutoksessa. Dissertations Forestalis 75. 26 s. <http://www.metla.fi/dissertations/df75.htm>

Kärkikasvaimien kuoleminen boorinpuutoksessa on kiinnostanut tutkijoita usean vuosikymmenen ajan. Vaikka heikentynyt pakkaskestävyys liitetään usein latvakuolemiin boorinpuutoksessa, pakkaskestävyyttä boorinpuutoksessa ei ole aiemmin tutkittu perusteellisesti.

Tutkimusta varten perustettiin maastoon lannoituskoeala, jossa matalassa booritulassa kasvaneita kuusia (*Picea abies* L. Karst) lannoitettiin typpellä ja boorilla. Koepuiden pakkaskestävyyttä mitattiin yhden, kolme ja viiden kasvukauden jälkeen lannoituksista. Maastosta kerättiin myös näytteitä metsiköistä, joissa kasvuhäiriöisten puiden osuus vaihteli. Lisäksi kuusen taimia kasvatettiin siemenestä kaksi kasvukautta kolmella eri booritasolla ja tutkittiin boorinpuutoksen vaikutus karaistumiseen. Pakkaskestävyys tutkittiin pakkasaltistamalla näytteitä ja arvioimalla syntyvät vauriot näytteissä ionivuototestillä tai visuaalisen vauriotarkastelun avulla sekä silmun eksotermimittauksilla. Taimikokeessa rangan karaistumista seurattiin myös mittaamalla rangan sähköistä impedanssia.

Taimikokeessa rangan ja silmun pakkaskestävyys, ja todennäköisesti myös niiden kestävyys pakkaskuivumista vastaan, oli heikompi booripuutoksessa. Booripuutoksella oli myös lievä vaikutus taimien neulasten kasvukauden aikaiseen pakkaskestävyyteen. Maastokokeessa pakkaskestävyys ei parantunut merkittävästi boori- tai typpilannoituksella verrattuna puihin, joiden booritila vaihteli puutoksesta suboptimaaliseen. Kasvuhäiriöisten puiden epämuodostuneet silmut eivät kuitenkaan alijäähtyneet kuten terveen näköiset silmut, vaan silmun tuhoava jäätyminen tapahtui jo alhaisissa pakkaslämpötiloissa. Puiden booritasolla oli myös lievä vaikutus karaistuneiden silmujen nopeisiin pakkaskestävyyden muutoksiin.

Booripuutos vaikuttaa kuusen rangan ja silmun pakkaskestävyyteen, kun booritila on selvästi puutosrajan alapuolella. Koska boorinpuutos vaikutti pakkaskestävyyteen vain pienessä osassa aineistoa ja hyvin matalalla booritasolla, ei boorinpuutoksen lisäämä pakkasvaurioriski ole todennäköisesti tärkein tai ainoa kasvuhäiriöille altistava tekijä.

Avainsanat: Boorinpuutos, Kasvuhäiriöt, Pakkaskestävyys, Karaistuminen, Kuusi, *Picea abies*

## ESIPUHE

Tämän väitöskirjan tutkimustyö on tehty Suomen Akatemian tutkimushankkeissa (73515, 206898 ja 215683) ja Metsäntutkimuslaitoksen, Joensuun yliopiston ja Metsäkeskus Pohjois-Savon yhteistutkimushankkeessa ”Kaskikuusikoiden kasvuhäiriöt” (MMM 3297). Toisen ja kolmannen osajulkaisun sekä väitöskirjan viimeistelyyn on saatu rahoitusta Jenny ja Antti Wihurin rahastolta.

Kiitän ohjaajiani kärsivällisestä ja perinpohjaisesta ohjaamistyöstä väitöstutkimuksissani sekä lisäksi yhteistutkimushankkeen osapuolia hedelmällisestä tutkimusyhteistyöstä. Erityiskiitoksen ansaitsevat myös perheeni sekä ”Metsäpuiden boorinpuutos”-hankkeessa työskennelleet tutkijat ja Joensuun yliopiston laboratorio- ja kenttähenkilöstö käytännön avusta ja kannustavasta asenteesta.

## VÄITÖSKIRJAN OSAJULKAISUT

**I Räsänen, M., Repo, T., Rikala, R., Lehto, T. 2006. Does ice crystal formation in buds explain growth disturbances in boron-deficient Norway spruce? *Trees* 20: 441-448**

**II Räsänen M., Repo T., Lehto T. 2007. Cold acclimation was partially impaired in boron deficient Norway spruce seedlings. *Plant and Soil* 292:271-282**

**III Räsänen M., Repo, T., Lehto T. 2007. Cold acclimation of boron and nitrogen fertilised Norway spruce trees grown at suboptimal boron status. (Käsikirjoitus)**

**IV Räsänen M., Repo T., Lehto T. 2006. Effect of thawing time, cooling rate, and boron nutrition on freezing point of the primordial shoot in Norway spruce buds. *Annals of Botany* 97: 593-599**

Artikkelit I, III ja IV perustuvat Pyhäselän kokeesta kerättyyn aineistoon, jonka suunnittelusta vastasin yhdessä ohjaajieni Tarja Lehdon ja Tapani Revon kanssa. Osasta artikkeliin I kerätyn maastoaineiston suunnittelusta ja keruusta vastasi Risto Rikala. Samoin artikkelissa II esitetty taimikoe suunniteltiin yhdessä kaikkien kirjoittajien kanssa. Kokeiden käytännön järjestelystä, aineiston analysoinnista sekä artikkelin IV ideoinnista vastasin pääosin itse.

## SISÄLLYSLUETTELO:

<b>ESIPUHE</b> .....	<b>5</b>
<b>VÄITÖSKIRJAN OSAJULKAISUT</b> .....	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>9</b>
1.1 BOORINPUUTOS METSÄTALOUDEN ONGELMANA.....	9
1.2 METSÄPUIDEN KARAISTUMINEN JA PAKKASKESTÄVYYS.....	10
1.3 BOORINPUUTOS JA PAKKASKESTÄVYYS.....	10
1.4 TUTKIMUSTAVOITTEET.....	12
<b>2 TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>12</b>
2.1 KOKEET JA NÄYTTEENOTTO.....	12
2.1.1 <i>Kokeet</i> .....	12
2.1.2 <i>Pyhäselän lannoituskoe (I, II ja IV)</i> .....	13
2.1.3 <i>Rautalammin ja Suonenjoen tutkimusmetsiköt (I)</i> .....	13
2.1.4 <i>Taimikoe (II)</i> .....	13
2.2 PAKKASKESTÄVYYS.....	14
2.2.1 <i>Pakkasaltistukset (I, II, III, IV)</i> .....	14
2.2.2 <i>Ionivuototesti (II ja III)</i> .....	14
2.2.3 <i>Visuaalinen pakkasvaurion tarkastelu (I, III, IV)</i> .....	15
2.2.4 <i>Silmun DTA-mittaus (DTA)(I, II, III, IV)</i> .....	15
2.2.5 <i>Rangan sähköinen impedanssi (II)</i> .....	16
2.3 RAVINNEANALYYSIT.....	16
2.4 TAIMIEN KASVU.....	16
2.5 TULOSTEN ANALYSOINTI.....	16
<b>3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>17</b>
3.1 RAVINNETILA JA KUUSEN TAIMIEN KASVU.....	17
3.2 KARAISTUMINEN JA PAKKASKESTÄVYYS.....	18
3.3 TYPEN JA BOORIN VAIKUTUS PAKKASKESTÄVYYTEEN.....	19
<b>4 JOHTOPÄÄTÖKSET</b> .....	<b>21</b>
<b>LÄHDELUETTELO</b> .....	<b>22</b>





# 1 JOHDANTO

## 1.1 Boorinpuutos metsätalouden ongelmana

Boorinpuutos on metsäpuiden hivenravinnepuutoksista maailmanlaajuisesti tunnetuin ja yleisimmin tavattu (Shorrocks 1997). Suomessa boorinpuutosta tavataan yleisesti rehevillä kasvupaikoilla sisämaassa. Esimerkiksi Pohjois-Savon alueella lehdoista ja lehtomaisista metsiköistä noin 25 %:ssa tavattiin boorinpuutukseen viittavia kasvuhäiriöitä, latvavikoja ja rungon muotovikoja (Hynönen ym. 1999). Pohjois-Karjalan, Pohjois-Savon ja Keski-Suomen maakuntien alueilla yli 50 %:ssa kuusikoista booripitoisuuden havaittiin olevan puutosrajan alapuolella (Tamminen ja Saarsalmi 2004). Boorinpuutoksen aiheuttamat kasvuhäiriöt voivat laskea odotettavissa olevia metsätalouden tuloja merkittävästi (Hynönen ym. 1999), koska boorinpuutoksen aiheuttamien runkojen muotovikojen vuoksi sahapuuksi kelpaavien tukkien saanto vähenee huomattavasti. Yleisyytensä vuoksi boorinpuutoksella on Suomessa valtakunnallista merkitystä laadukkaan kuusisahatavaran raaka-aineen turvaamisen kannalta.

Suomen kallioperässä booria on vähän (Wikner 1983). Meriveden booripitoisuus on korkea, joten meren läheisyydessä merestä pizaroituvan veden boori nostaa sadeveden booripitoisuutta rannikkoseuduilla (Wikner 1983). Tämän vuoksi boorinpuutosalueet keskittyvät pääosin sisämaan kivennäismaille (Tamminen ja Saarsalmi 2004) tai turvemaille (Silfverberg 1979). Maan boorivarojen ja laskeuman vähäisyyden lisäksi myös runsas typen saatavuus suhteessa booriin voi lisätä boorinpuutosta. Typen kasvua lisäävä vaikutus laimentaa muiden ravinteiden pitoisuuksia puissa, booripitoisuus mukaan lukien (Mälkönen ym. 1990). Myös kaskeamisen ja karjan metsälaiduntamisen on arveltu lisänneen boorinpuutosta Itä-Suomessa. Kalkitus nostaa maan pH:ta, jolloin boorin liukoisuus ja samalla kasveille käyttökelpoisen boorin määrä maassa vähenee (Lehto ja Mälkönen 2001). Kalkituksen vaikutus boorin saatavuuteen Suomessa rajoittunee kuitenkin enimmäkseen pellonmetsityskohteisiin, sillä Suomessa metsämaan kalkitusta ei laajemmin ole tehty. Myös metsänhakuissa poistuu runsaasti booria, sillä runkopuun boorisältö on huomattava verrattuna koko metsikön boorisältöön (Helmisaari ym. 2008). Toistuvien hakkuiden seurauksena hyväkasvuisilta viljavilta metsätyypeiltä on poistunut siten runkopuun hakkuisia runsaasti booria. Lisääntyvä energiapuun korjuu voi myös lisätä boorinpuutosta, sillä oksat ja kannot sisältävät lähes puolet puuston boorista (Helmisaari ym. 2008). Toisaalta energiapuun korjuun yhteydessä poistuvan typen määrä on hyvin suuri (Helmisaari ym. 2008), joten kasvupaikan puuntuotoskyky voi jäädä alhaisemmaksi ja siten myös puuston boorin tarve voi vähentyä. Usein samalla alueella vaikuttaa useita boorinpuutukseen vaikuttavia tekijöitä, joten yksiselitteistä syytä boorinpuutokselle on vaikea osoittaa.

Näkyvin boorinpuutoksen tuntomerkki on puun latvan haaroittuminen ja pensastuminen. Aluksi latvavaurioita pidettiin sienitautien, kuivuuden tai pakkasvaurioiden aiheuttamana (Juutinen 1962, Yli-Vakkuri 1971). Pian kuitenkin havaittiin latvavaurioita syntyvän erityisesti boorinpuutoksen vaivaamilla alueilla (Silfverberg 1980, Veijalainen

ym. 1984). Viimeaikaisimpien tutkimuksien mukaan boorinpuutos ei heikentänyt suoranaisesti kuusen kuivuuden kestoa, mutta kuivuus vähensi boorin liikkumista latvakasvaimen (Möttönen 2004), ja siten kuivuus voi lisätä boorinpuutosta latvakasvaimessa ja olla aiheuttamassa kasvuhäiriöitä (Sutinen ym. 2006).

## 1.2 Metsäpuiden karaistuminen ja pakkaskestävyys

Vuodenaikojen välisten suurten lämpötilavaihteluiden vuoksi puiden täytyy borealisella kasvillisuusvyöhykkeellä sopeutua käyttämään kasvukauden aikana olosuhteet mahdollisimman tehokkaasti hyväksi, mutta myös karaistua riittävän aikaisin ja riittävästi talvea varten (Hänninen ja Kramer 2007). Puut aloittavat sopeutumisensa talveen kasvukauden aikana, kun yön pidentyminen kasvukaudella laukaisee kasvun päättymisen ja karaistumisen alkamisen. Karaistuminen etenee ja puut vaipuvat talvilepoon lämpötilan laskemisen myötä.

Karaistumisen aikana solutasolla solukalvon veden läpäisevyys lisääntyy (Senser ja Beck 1982) ja solujen kuivumiselta suojaavien proteiinien (Kontunen-Soppela 2001) ja sokereiden (Aronsson ym. 1976) määrä lisääntyy sekä soluseinien koostumus ja elastisuus muuttuvat (Renault ja Zwiazek 1997) ja alijäähtymiselle tärkeät rakenteet muodostuvat. Maksimaalinen pakkaskestävyys saavutetaan kuitenkin soluvälitilan jääntymisen myötä, kun syntyvät jääkiteet kuivattavat soluvälitilan ja syntyy hydrostaattinen veden imu solulimasta (Sakai ja Larcher 1987). Mikäli karaistuminen ei ole riittävää, puut altistuvat pakkasvaurioille. Pakkasvaurio alkaa karaistuneessa solukossa solukalvon vauriolla soluvälitilan jääntymisen aiheuttaman soluliman kuivumisen seurauksena (Palta ja Li 1978, Steponkus 1984). Suojautumista tällaista vauriota vastaan kutsutaan jääntymisen sietokyvyksi (freezing tolerance). Alijäähtyvissä silmuissa pakkasvaurio tapahtuu alijäähtyneiden alkeisversojen solujen nopean jääntymisen vuoksi (Sakai ja Larcher 1987). Keväällä kuusi kärsii usein myös hallavaurioista, kun talvilepo purkautuu liian aikaisin (Hannerz 1999).

## 1.3 Boorinpuutos ja pakkaskestävyys

Boorinpuutoksen vaikutusta pakkaskestävyyteen ei ole aiemmin mitattu, vaikka useiden maastohavaintojen mukaan pakkasvaurio olisi syy boorinpuutoksesta kärsivien kuusien (Braecke 1979) ja mäntyjen (Kaunisto 1984) latvakasvaimien ja silmujen kuolemiseen. Keskitalvella lauhan jakson aikana männyn silmuissa on myös mitattu entsyymiaktiivisuuden (6-fosfoglukonaatin dehydrogenaasi) lisääntymistä boorinpuutoksessa, ja on arveltu, että silmun talvilepo keskeytyisi lauvoissa sääoloissa (Pietiläinen 1984). Tämän perusteella silmut voisivat altistua pakkasvaurioille boorinpuutoksessa ja pakkasvauriot voisivat siten olla yksi kasvuhäiriöiden syy. Näiden tutkimusten lisäksi vanhemmissa tutkimuksissa on havaittu talven jälkeen latvakuolemia (Albrekton ym. 1977, Braecke 1979) ja sen vuoksi karaistumisen on arveltu olevan puutteellista boorinpuutoksessa (Braecke 1979). Näitä tuloksia ovat tukeneet lisäksi havainnot, joiden mukaan eukalyptuksen, aprikoosin ja pyökin taimien pakkasvauriot

talvella vähenivät boorikäsitellyissä puissa (Beltram 1958, Badanov 1965, Cooling 1967). Myös alttius kasvukauden aikaisille hallavaurioille väheni hedelmäpuissa, saarnen ja kuusen taimissa (Beltram 1956) sekä puutarhakasveilla (Beltram 1958), kun lehdet käsiteltiin booriliuoksella muutamia päiviä ennen hallaa. Aika boorikäsitelystä halloihin oli lisäksi osalla kokeista niin lyhyt, ettei suojaava vaikutus luultavasti voinut johtua aineenvaihdunnallisista syistä. Beltramin kokeissa jäi epäselväksi, johtuiko vaikutus boorinpuutostilan korjautumisesta lehtilannoitusten avulla, sillä kasvien booritulasta ei ole tietoa. Lisäksi käytetty boorimäärä oli huomattavasti korkeampi kuin hivenravinnelannoituksissa yleensä.

Boorin kemiallinen ominaisuus, kyky liittää yhteen kaksi cis-dioli asemassa olevaa OH-ryhmää tekee siitä tärkeän ravinteen kasvien kannalta (Loomis ja Durst 1992). Yksi tärkeimmistä ja tunnetuimmista sidoksista muodostuu soluseinän pektiinien välille; boori säätelee soluseinän rakennetta sitomalla pektiiniketjuja toisiinsa (Hu ja Brown 1994). Soluseinien huokoskoko on suurempi näiden sidoksien puuttuessa boorinpuutoksessa (Fleischer ym. 1999) tai korvattaessa boorisidos vain toispuoleisen sidoksen muodostavalla boronaatilla (Bassil ym. 2004). Boori vaikuttaa myös solukalvon toimintaan (Muhling ym. 1998, Brown ym. 2002). Boorin oletetaan muodostavan sidoksia sekä eläin- että kasvukunnan solukalvojen fosfolipidien tai sokereiden kanssa (Goldbach ja Wimmer 2007). Solukalvon ionivuodon on todettu lisääntyvän boorinpuutoksessa useilla lajeilla (Marschner 1995), mm. kurkulla erityisesti kylmissä olosuhteissa (Wang ym. 1999). Solukalvojen toimintahäiriöiden on oletettu olevan syynä viljelykasvien alentuneelle kylmänkestävyydelle boorinpuutoksessa (Huang ym. 2005). Boori voi vaikuttaa solukalvoon suoraan sekä välillisesti soluseinän rakenteen kautta (Muhling ym. 1998, Brown ym. 2002). Solukalvon sitoutuminen soluseinään heikkenee, mikäli boorin muodostamat sidokset puuttuvat (Bassil ym. 2004). Koska pakkasvaurio alkaa solukossa solukalvon vauriolla (Palta ja Li 1978, Steponkus 1984), voi boorinpuutos heikentää myös pakkaskestävyyttä solukalvon heikentyneen toiminnan tai heikentyneen soluseinään kiinnittymisen kautta. Erityisesti soluvälitilan jääntymisen aiheuttaman solun dehydraation kestäminen voi heikentyä boorinpuutoksessa, mikäli solukalvon liittyminen soluseinään heikkenee (Pearce 2001).

Vaikka solukalvo on usein nostettu pakkaskestävyytustutkimuksissa pääkohteeksi, myös soluseinällä on pakkaskestävyydessä ja karaistumisessa tärkeä osansa, erityisesti alijäähtyvissä kasvinosissa (Wisniewski 1995). Siten boorin rooli soluseinän rakenteessa voi suoraan vaikuttaa soluvälitilan jääntymiseen ja kiteytymisen etenemiseen soluvälitilassa. Kuusella on silmun alapuolella kollenkyymilevy (Bilkova ym. 1999), joka estää jääkiteiden kasvun rangasta silmun alkeisversoon. Tämän seurauksena alkeisverso alijäähtyy ja kuusen silmu jäätyy ekstraorgaanisesti (Sakai 1979). Kollenkyymilevyn tiivis rakenne ja huokosten pieni koko estää jään laajentumisen jääntymiselle herkkään silmun alkeisversoon ja mahdollistaa siten silmun alijäähtymisen ja selviytymisen pakkaslämpötiloissa (Ashworth ja Abeles 1984, Jones ym. 2000). Pitkäaikaisen jääntymisen yhteydessä silmun pakkaskestävyys kasvaa, kun alkeisverso kuivuu veden siirtyessä kollenkyymilevyn lävitse alkeisversosta silmuonteloon (Sakai ja Larcher 1987). DTA-mittauksissa (Differential Thermal Analysis) havaittavan matalan lämpötilan eksotermien (LTE, low temperature exotherm) kiteytymislämpötilaa on käytetty kukka- ja päätesilmujen sekä ksyleemin sädesolujen parenkyymsolukon tappavan jääntymisen merkkinä (George ym. 1974, Gusta ym. 1983, Pukacki 1987, Pukacki ja Pukacka 1987). Mikäli kollenkyymilevyä häiritään mekaanisesti tai hajottamalla pektiineitä entsyymaattisesti, LTE:n esiintymislämpötila DTA-mittauksissa nousee (Sakai ja Larcher 1987, Wisniewski ym. 1991) tai LTE:ä ei havaita

lainkaan (Jones ym. 2000). Etenkin kollenkyymilevyn puute tai silmun muut rakennehäiriöt voivat heikentää alijäähtymiskykyä tai estää alijäähtymisen kokonaan (Sutinen ym. 2006). Rakennehäiriöt voivat myös vaikuttaa jäätyamisen yhteydessä tapahtuvaan karaistumiseen, mikäli veden liikkuminen alkeisverson ja silmuontelon välillä muuttuu.

Pääravinteiden, erityisesti typen, vaikutusta kasvien pakkaskestävyyteen on tutkittu laajalti. Aiemmissa tutkimuksissa lisätypen vaikutus on ollut erilainen kasvien eri osissa ja on eronnut myös erilaisilla typpitasoilla. Matalilla typpitasoilla typen lisäys on parantanut neulasten pakkaskestävyyttä (*Picea rubens* (Sarg.), Dehayes ym. 1989, *Picea mariana* [Mill.] B.S.P. Bigras ym. 1996). Männyllä (*Pinus sylvestris* L.) pakkaskestävyys oli korkein, kun neulasten typpipitoisuus oli 12 - 18 g N kg<sup>-1</sup>, mutta oli heikompi tätä korkeammilla ja matalammilla neulasten typpipitoisuuksilla (Aronsson 1980). Pakkaskestävyys kuusen neulasissa (*Picea rubens*) parani L'Hirondellen ym. (1992) tutkimuksessa typpilannoituksella, kun neulasten typpipitoisuus nousi noin 15 g N kg<sup>-1</sup>:sta noin 25 g N kg<sup>-1</sup>:ssa, mutta samalla riski silmujen pakkasvauriolle lisääntyi.

Liiallinen typen saatavuus on johtanut aiemmissa tutkimuksissa booripitoisuuden laskuun (Aronsson 1983, Ferm ym. 1990, Mälkönen ym. 1990). Siten runsas typen saatavuus voi vaikuttaa pakkaskestävyyteen epäsuorasti lisäämälle muiden ravinteiden puutosta (Ferm ym. 1990, Jalkanen 1990, McNulty ym. 1996, Jönsson ym. 2004). Typen ja boorin yhteisvaikutus pakkaskestävyyden osalta on jäänyt tarkemmin tutkimatta, sillä yleensä typpilannoituksen vaikutusta tutkittaessa ei hivenravinteita ole analysoitu.

#### 1.4 Tutkimustavoitteet

Tutkimustavoitteina oli selvittää, a) vaikuttaako boorinpuutos kuusen karaistumiseen ja pakkaskestävyyteen (I ja II), b) lisääkö typpilannoitus pakkasvaurioriskiä boorinpuutoksen yhteydessä (III) ja c) kuinka nopeita pakkaskestävyyden vaihtelut kuusen silmussa ovat ja vaikuttaako boorinpuutos silmun pakkaskestävyysvaihteluihin talvella (IV).

## 2. TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT

### 2. 1 Kokeet ja näytteenotto

#### 2.1.1 Kokeet

Tutkimuksen aineisto kerättiin Pyhäselästä kasvuhäiriöistä lievästi kärsivään nuoreen kuusikkoon (*Picea abies* L. Karst.) perustetuilta typpi- ja boorilannoituskoealoilta, Rautalammilta ja Suonenjoelta tutkimusmetsiköistä, jotka erosivat kasvuhäiriöisten puiden osuuden suhteen sekä kasvatuskammioissa tehdystä taimikokeesta, jossa kuusen taimia (*P. abies*) kasvatettiin kolmella eri booritasolla.

### 2.1.2 Pyhäselän lannoituskoe (I, II ja IV)

Koalue sijaitsee Itä-Suomessa (62°25'N, 29°55'E, 90 m merenpinnan yläpuolella) noin 25-vuotiaassa kuusikossa, jossa sekapuuna on runsaasti harmaaleppää (*Alnus incana* (L.) Moench). Metsiköstä valittiin kokeeseen 144 yksittäistä kuusta, joiden pituus oli lannoitettaessa 3–8 metriä ja etäisyys toisistaan vähintään 7 metriä. Valitut puut jaettiin 18 lohkokon maanpinnan muotojen mukaan. Lohkossa olevat kahdeksan puuta jaettiin satunnaisesti neljään lannoituskäsittelyyn: lannoittamattomaan, typpi- (N) (tyypeä 180 kg ha<sup>-1</sup> ureana) ja boorilannoituskäsittelyyn (B) (booria 2 kg ha<sup>-1</sup> booraksina) sekä typpi- ja boorilannoitusten yhdistelmään (NB). Lannoitus tehtiin kesäkuussa 2000. Kokeen perustamisajankohtana koalueen puustossa oli runsaasti boorinpuutokseen viittaavia latvanvaihtoja, mutta pensastuneita latvoja havaittiin vain muutamassa puussa.

Kesäkuussa 2001 humuskerrokseen laitettiin juurisukkia 36 puun ympärille 75 cm etäisyydelle puun tyvestä (III). Juurisukkia laitettiin jokaisen puun ympärille neljä, eli yhdeksän juurisukkaa jokaiseen lannoituskäsittelyyn. Juurisukka oli nailonverkosta tehty 5 cm korkeudeltaan ja 5 cm läpimitaltaan oleva pussi, joka täytettiin koalueelta kerätyllä homogeenoidulla humuksella (kts. Makkonen ja Helmisaari 1999). Juurisukkien humus lannoitettiin pinta-alaan suhteutettuna samalla määrällä kuin koalat.

Syksyllä 2000 näytteitä silmun pakkaskestävyyssmittauksiin kerättiin (DTA-mittaukset) viitenä ajankohtana elokuusta joulukuuhun. Jokaiselta lohkolta otettiin yksi näyte jokaisesta lannoituskäsittelystä ylimpien oksakiehkuroiden kärkikasvaimesta (I). Oksanäytteiden keruu toistettiin 36 koepuusta vuonna 2002 ja lisäksi kerättiin kolmena erillisenä ajankohtana syksyllä 2002 juurinäytteitä juurisukkiin kasvaneista juurista (III). Oksan päätekasvaimen kärkisilmun pakkaskestävyys mitattiin DTA-mittauksin (I ja III).

Vuoden 2002 mittauksissa (III) määritettiin juurten, kärkikasvaimen neulasten ja rangan sekä oksan lateraalikiehkuroiden silmujen pakkaskestävyys pakkasaltistuksissa syntyneiden pakkasvaurioiden perusteella. Pakkasvauriot mitattiin ionivuotomenetelmän ja osassa aineistoa myös visuaalisten vauriotarkastelun avulla (Ryypö ym. 1998). Talvella 2003 ja 2005 kerättiin eri lannoituskäsittelyistä silmunäytteet, joista tutkittiin eripituisten sulamisajkojen ja eri jäähdytysnopeuksien vaikutuksia silmun pakkaskestävyyteen (IV).

### 2.1.3 Rautalammin ja Suonenjoen tutkimusmetsiköt (I)

Rautalammissa (62°36'N, 26°43'E, 95 m merenpinnan yläpuolella) oli kaksi vierekkäistä tutkimusmetsikköä, joista toisessa yli 90 %:lla puista ja toisessa alle 10 %:lla puista oli kasvuhäiriöitä. Suonenjoen tutkimusmetsikössä (62°42' N, 27°03' E, 170 m merenpinnan yläpuolella) puissa ei havaittu kasvuhäiriöitä. Metsiköistä kerättiin eksotermimittauksiin silmunäytteitä marraskuussa vuonna 2000. Kustakin metsiköstä otettiin kymmenestä puusta kaksi näytettä per puu.

### 2.1.4 Taimikoe (II)

Keskisuomalaista alkuperää olevia kuusen taimia kasvatettiin kasvatuskammioissa siemenestä kaksi kasvukautta ennen pakkaskestävyyssmittauksia. Kasvualustana

taimiastiassa oli kvartsihiekan (70 % tilavuudesta) ja metsähumuksen (30 % tilavuudesta) seos. Ensimmäisen kasvukauden pituus oli 14 viikkoa ja toisen 9 viikkoa. Kasvukausien (20/15 °C päivä/yö, 20 h valojakso) välissä oli 9 viikon mittainen lepokausi, jolloin taimet karaistiin lyhytpäiväkäsittelyn (8 tunnin valojakso) ja matalan lämpötilan (3–5 °C) avulla. Koejärjestely noudatti satunnaistettujen lohkojen koetta. Kaksi lohkoa neljästä oli sijoitettu yhteen kasvatuskammioon ja toiset kaksi toiseen kasvatuskammioon. Yhteensä kokeeseen käytettyjä taimia oli 1092 kappaletta.

Kasvukausien aikana korkeimman boorikäsittelyn (100B) taimet kasteltiin optimaalisella ravinneliuoksella (Riddoch ym. 1991). Keskimmaisella booritasolla, 30B-käsittelyssä, ravinneliuoksessa oli 30 % 100B-käsittelyn booripitoisuudesta ja matalimmalla booritasolla (0B) ravinneliuokseen ei lisätty booria lainkaan. Liuosten ravinnepitoisuudet nostettiin kasvukausien aikana taimien suhteellisen kasvun mukaan (Ingestad 1979). Liuoksen tyyppipitoisuudet vaihtelivat 5–198 mg N dm<sup>-3</sup> välillä ensimmäisen ja 13–138 mg N dm<sup>-3</sup> välillä toisen kasvukauden aikana.

Toisen kasvukauden jälkeen taimien karaistuminen aloitettiin lyhentämällä päivän pituus 8 tuntiin 39 vuorokauden mittaisen lyhytpäiväjakson ajaksi. Taimia karaistiin edelleen laskemalla lämpötilaa 41 vuorokauden mittaisen matalalämpötilajakson (+5 °C) ja edelleen 28 vuorokauden pakkaslämpötilajakson (-2,5 °C) aikana.

Taimien pakkaskestävyys määritettiin toisen kasvukauden jälkeen ja jokaisen sitä seuraavien kolmen karaisujakson jälkeen. Pakkasaltistuksia varten taimen kärkikasvaimesta eroteltiin neulas-, ranka- ja silmunäytteet ionivuototestiin. Juuret eroteltiin kasvualustasta pesemällä. Eri kasvinosista leikatut näytteet kostutettiin ja pakkasaltistettiin. Pakkasaltistettujen neulas-, ranka-, juuri- ja silmunäytteiden pakkasvauriot määritettiin ionivuototestillä. Taimen kärkisilmun pakkaskestävyys mitattiin myös DTA-menetelmällä. Lisäksi taimien karaistumista seurattiin impedanssimittauksin kolme kertaa jokaisen karaisujakson aikana.

## 2.2 Pakkaskestävyys

### 2.2.1 Pakkasaltistukset (I, II, III, IV)

Pakkasaltistuksessa jokaisen testattavan kasvinosan ja ravinnekäsittelyn näytteistä koottiin pakkasaltistussarja ohjelmoitavissa pakkasaltistuskaapeissa tehtäviä pakkasaltistuksia varten. Yhdessä pakkasaltistussarjassa käytettiin kolmesta seitsemään eri altistuslämpötilaa. Altistuslämpötilat vaihtelivat näytteen karaistumisasteen mukaan +5 ja -110 °C:een välillä. Jokaisen yksittäisen pakkasaltistuksen alku- ja loppulämpötila oli +5 °C. Altistuskaappia jäähdytettiin pakkasaltistuslämpötilaan nopeudella 5 °C h<sup>-1</sup> ja pidettiin altistuslämpötilassa neljä tuntia sekä lämmitettiin samalla nopeudella.

### 2.2.2 Ionivuototesti (II ja III)

Pakkasaltistuksen jälkeen koeputkiin, joissa näytteet olivat pakkasaltistuksen aikana, lisättiin deionisoitua vettä ja koeputkia pidettiin ravistelijassa 22 tuntia. Tämän jälkeen koeputkessa olevan nesteen johtokyky (L<sub>1</sub>) mitattiin ensimmäisen kerran. Näytteet

kuumennettiin vesihauteessa (92 °C, 15 min). Toisen 22 tunnin ravistelujakson jälkeen nesteen johtokyky ( $L_2$ ) mitattiin uudestaan. Suhteellinen ionivuoto (REL) laskettiin kaavan 1 mukaan.

$$\text{Kaava 1.} \quad REL = \frac{L_1}{L_2}$$

Pakkaskestävyys,  $LT_{50}$ -arvo, laskettiin REL-arvoihin sovitetun sigmoidikäyrän käännepisteenä (parametri C kaavassa 2) (Repo ja Lappi 1989). Kaavassa parametrit A ja D määrittelevät funktion ylä- ja ala-asymptootit ja B on kulmakerroin pisteessä C. Mikäli parametrien estimointi epäonnistui, niin estimoitavat parametrit A ja D korvattiin kontrollilämpötilan tai suurimman vaurion saavuttaneen lämpötilan REL-arvojen keskiarvolla.

$$\text{Kaava 2.} \quad y = \left( \frac{A}{(1 + e)^{B(C-x)}} \right) + D$$

### 2.2.3 Visuaalinen pakkasvaurion tarkastelu (I, III, IV)

Visuaaliseen vauriotarkasteluun kerätyt vuosikasvaimet pakkasaltistettiin kokonaisina. Pakkasaltistuksen jälkeen näytteitä pidettiin huonelämpötilassa auringon valossa (III, IV) tai loisteputkien valossa kasvatuskammiossa (I) yhdestä (IV) kahteen viikkoon (I, III). Tänä aikana estettiin näytteiden kuivuminen. Pakkasvaurioita tarkasteltiin visuaalisesti neulasissa sekä rangan ja silmun solukoissa tapahtuvan ruskettumisen perusteella. Pakkaskestävyys määriteltiin lämpötilana, jossa 50 % näytteiden solukoista oli vaurioitunut pakkasaltistuksissa.

### 2.2.4 Silmun DTA-mittaus (DTA)(I, II, III, IV)

DTA-mittaukset tehtiin Joensuun yliopiston metsätieteellisen tiedekunnan pakkasutkimuslaboratorioon rakennetulla laitteella (kuvaus osajulkaisussa I). Laitteella voidaan jäätymisessä vapautuvan lämmön perusteella havaita lämpötila, jossa silmun alkeisverso jäätyy ja kuolee. Pakkasaltistuskaappia, jossa mitattavat näytteet olivat, jäähdytettiin +5 °C:sta -48 (II, III), -49 (I, IV) tai -90 °C:een (IV) nopeudella 5 °C h<sup>-1</sup>. Minimilämpötilaa pidettiin yksi (I, IV), kolme (III) tai neljä tuntia (II, IV) ja lämmitettiin viidessä tunnissa (I, IV) tai nopeudella 5 °C h<sup>-1</sup> (I, II, III) +5 °C:een. Osajulkaisun IV aineistossa silmuja otettiin pakkasesta (-17 °C) sulamaan eri ajankohtina ennen DTA-mittauksia. Lisäksi pitkään sulaneita silmuja jäähdytettiin mittauksen aikana eri nopeuksilla 1–5 °C h<sup>-1</sup>.

DTA-näytteenä oli oksan kärkisilmu ja kappale kasvainrankaa (n. 10 mm), josta neulas oli leikattu pois. Näyte käärrittiin mittauksia varten joko alumiinifolioon (I, II, III) tai vaahtokumiteippiin (IV). Kasvainrankaan painettiin silmun alapuolelle varren suuntaisesti neulalla reikä, johon lämpötila-anturi asetettiin.

Syksyn 2000 mittauksissa (I) silmut halkaistiin DTA-mittauksen jälkeen ja luokiteltiin kasvuhäiriöisiksi tai terveiksi. Kasvuhäiriöisissä silmuissa oli heikosti kehittynyt alkeisverso, kollenkyymilevy tai silmuontelo (kts. Sutinen ym. 2006).

### *2.2.5 Rangan sähköinen impedanssi (II)*

Taimikokeessa karaistumista seurattiin rangan sähköisen impedanssin avulla ilman pakkasaltistuksia. (Repo ym. 2000). Impedanssimittaus tehtiin jokaisen karaisujakson lopuksi ja kahdesti karaisujaksojen aikana. Mittauksiin valmisteltiin näyte kärkikasvaimen rangasta kahdesta taimesta jokaisesta lohkoista ja käsittelystä. Näyte (10 mm) laitettiin mittauselektrodien väliin ja impedanssispektri mitattiin 46 eri taajuudella (20 Hz:stä 1 MHz:siin). Rangan soluvälitilan resistanssi laskettiin impedanssispektriin sovitetun sähkömallin parametrien perusteella (Repo ym. 2000).

## **2.3 Ravinneanalyysit**

Ravinneanalyysiin otettiin neulasnäytteet uusimmasta neulasvuosikerrasta puiden ylimmästä latvuskolmanneksesta marraskuussa 2000 sekä Pyhäselästä että Rautalammin ja Suonenjoen tutkimusmetsiköistä. Pyhäselästä otettiin tämän lisäksi näytteet helmimaaliskuun vaihteessa vuonna 2003. Näytteet kuivattiin 40 (II, III, IV) tai 45 °C:ssa (I) ja jauhettiin. Taimikokeen taimien (II) maanpäällisten osien ravinnepitoisuudet määritettiin toisen kasvukauden ja matalalämpötilajakson jälkeen. Neulasten typpipitoisuus mitattiin Kjeldahl-menetelmällä (I, II ja III) ja booripitoisuus spektrofotometrisesti Atsometriini-H-menetelmällä (Halonen ja Tulkki 1981) (I ja II) ja ICP:llä (III ja IV). Rautalammin ja Suonenjoen tutkimusmetsiköiden ravinnenäytteistä (I) typpipitoisuus mitattiin Leco-CHN-600 alkuaineanalyysointilaitteella ja booripitoisuus ICP:llä.

## **2.4 Taimien kasvu**

Taimikokeessa taimien pituus mitattiin ensimmäisen sekä toisen kasvukauden jälkeen. DTA-mittauksiin käytettyjen taimien runko ja neulaset jaettiin ikäluokittain taimien kuivapainon mittausta varten. Juuret eroteltiin maasta ja pestiin hellävaraisesti. Näytteet taimien eri osista kuivattiin 40 °C:ssa ja eri näytteiden kuivapainot punnittiin.

## **2.5 Tulosten analysointi**

Tulosten tilastollisessa analysoinnissa eri käsittelyryhmiä verrattiin käyttäen toistettujen mittausten varianssianalyysiä (I, III ja IV), kahden faktorin varianssianalyysiä (I-III) tai vertaamalla tilastollista eroa käsittelyryhmiin sovitettujen regressiomallien välillä F-testillä (IV) (Mead ja Curnow 1983). Taimikoe oli järjestetty lohkokokeeksi, kun taas



maastokokeessa lohkoketijä muotoutui kerrallaan kerättävästä ja valmistellusta näyteerästä, mikäli näytteitä kerättiin usealla eri kerralla saman mittausviikon aikana. Lisäksi testattiin yksittäisten puiden ravinnetilan ja pakkaskestävyyden välistä korrelaatiota (Ranta ym. 1992). Kasvuhäiriön tai silmun rakenteen vaikutusta tutkittiin T- ja G<sup>2</sup>-testeillä (Ranta ym. 1992) (I). Tulosten laskenta ja analyysit suoritettiin SPSS- ja Excel-ohjelmilla.

## 3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 3.1 Ravinnetila ja kuusen taimien kasvu

Taimikokeessa taimien booritila noudatti boorikäsittelyjä ja vaihteli käsittelyittäin selvästi boorinpuutoksesta (neulasten booripitoisuus 2,5 mg kg<sup>-1</sup> k.a. 0B-käsittelyssä) optimaaliseen (neulasten booripitoisuus 16,5 mg kg<sup>-1</sup> 100B-käsittelyssä) (II). Boorinpuutos näkyi myös taimien kasvussa; juurten kuivapaino sekä taimien pituuskasvu toisella kasvukaudella oli boorinpuutoksessa (0B) pienempi verrattuna korkeampiin boorikäsittelyihin (30B ja 100B). Boorinpuutoksen vaikutus kuusen juurten kasvuun on havaittu myös aiemmissa tutkimuksissa (Lehto 1994, Möttönen ym. 2001). Tutkimusmetsiköistä Rautalammin kokeen neulasten booripitoisuus (2,5 mg kg<sup>-1</sup>) oli alle boorinpuutosrajan (5 mg kg<sup>-1</sup>, Jukka 1988), kun taas booripitoisuus oli korkeampi (6 mg kg<sup>-1</sup>) Suonenjoen metsikössä, jossa ei havaittu kasvuhäiriöitä (I). Vuonna 2000 kerättyjen neulasnäytteiden perusteella Pyhäselän maastokokeessa lannoittamattomien ja typpilannoitettujen puiden neulasten booripitoisuus vaihteli selkeästi boorinpuutoksesta (neulasten booripitoisuus alle 3 mg kg<sup>-1</sup>) optimaaliseen (neulasten booripitoisuus yli 8 mg kg<sup>-1</sup>) (I). Boorilannoitetuissa puissa booripitoisuus oli selkeästi korkeampi kuin puissa, joita ei ollut lannoitettu boorilla (I).

Pitoisuus oli joissakin boorilannoitetuissa puissa Pyhäselän kokeella huomattavan korkea ensimmäisellä näytteenottokerralla lannoituksen jälkeen (korkeimmillaan 133 mg kg<sup>-1</sup>). Aiemmissa tutkimuksissa männnyssä on havaittu neulasten kärkekuolemia, kun neulasten booripitoisuus oli yli 53 mg kg<sup>-1</sup> ja neulasten varisemista esiintyi, mikäli booripitoisuus ylitti 114 mg kg<sup>-1</sup> (Braecke 1983). Kuusen taimilla kriittinen boorin myrkytysraja on kuitenkin todettu olevan huomattavasti korkeampi kuin männnyllä. Kuusen neulasten booripitoisuus voi olla jopa 400 mg kg<sup>-1</sup> ilman näkyviä myrkytysoireita (Rikala ja Konttinen 2007). Tässä tutkimuksessa ei havaittu maanpäällisten osien myrkytysoireita, kuten neulasten kärkien ruskettumista (Braecke 1983, Rikala ja Konttinen 2007).

Taimien neulasten booripitoisuuden selvästä erosta huolimatta vaihtelu rangan booripitoisuudessa oli vähäistä. Keskimääräinen rangan booripitoisuus ei laskenut alle 4 mg kg<sup>-1</sup>, ja se oli sekä 0B- että 30B-käsittelyssä sama neulasten booripitoisuudessa esiintyneestä erosta huolimatta (II). Boorinpuutoksessa havaittu rangan muita kasvinosia korkeampi booripitoisuus voi johtua johtosolukon huokosten pektiineihin sitoutuvasta boorista, sillä rangan johtojänteissä haihdunnan seurauksena kulkeva vesi on kosketuksessa pektiinipitoisen toruksen kanssa (Zwieniecki ym. 2001). Havupuilla huokosten pektiinit voivat sitoa booria ennen kuin se pääsee neulasiin, jolloin neulasten pitoisuus voi jäädä booripuutoksen seurauksena rankaa alhaisemmaksi. Suurin osa männyn rungon boorista sijaitsee puun kuoren sisäosassa, kun puu ei kärsi boorinpuutoksesta (Helmisaari ja Siltala 1989). Sen sijaan puutoksen seurauksena boorin jakautuminen eri solukoihin voi erota

tilanteesta, jossa puu ei kärsi puutoksesta. On arveltu, että boori–pektiini-kompleksit ovat muodostamassa soluseinää solun jakautumisen jälkeen tai soluseinän aktiivisen kasvun aikaan (Matoh 1997). Soluseinän sekundaarikerrosten syntyessä booria sitovan pektiiniyhdisteen pitoisuus soluseinässä laskee (Matoh 1997). Siten suuri osa rangan boorista ja myös suurin boorin tarve voi olla jälsisolukoissa, jossa solujakautuminen on vilkasta. Tässä tutkimuksessa ei selvitetty boorin jakautumista rangan eri solukkotyyppien välillä, joten aihe jää tulevien tutkimusten haasteeksi. Erityisesti rangan eri osissa booripitoisuus voi olla jyrkästi kahtia jakautunut, sillä ksyleemiin ravinteet tulevat juuristosta, kun taas jälteen pääosin lehtien kautta (Marschner 1995).

Neulasten typpipitoisuus oli lannoitusta seuraavana syksynä hieman korkeampi typpilannoitetuissa puissa ( $19 \text{ g N kg}^{-1}$ ) kuin puissa, joita ei lannoitettu typellä ( $17 \text{ g N kg}^{-1}$ ) (I). Myöhemmässä näytteenotossa typpipitoisuudessa ei ollut eroja lannoituskäsittelyjen välillä (III). Lannoituksessa käytettiin ureaa, jonka käyttöä yleensä vältetään keskikesällä, sillä urean typellä on korkea riski haihtua lämpimällä säällä (Lipas 1988). Maastokokeen lannoitusajankohtana kesäkuussa sää oli viileä ja sateinen, joten typen haihtuminen ei luultavasti ollut syynä siihen, että typpilannoituksen vaikutus neulasten typpipitoisuuteen jäi vähäiseksi. Todennäköinen selitys on, että saatavilla olevaan maan typpimäärään nähden lannoitetypen osuus oli vähäinen. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että lannoitettaessa reheviä kuusikoita typellä ei typpipitoisuus välttämättä nouse (Saarsalmi ja Tamminen 2005).

### 3.2 Karaistuminen ja pakkaskestävyys

Sekä kenttä- että taimikokeessa kuuset karaistuivat mittausjaksojen aikana. Neulaset ja ranka saavuttivat parhaan ja juuret heikoimman pakkaskestävyyden. Neulasten ja rangan saavuttamat pakkaskestävyydet olivat riittäviä verrattuna luonnossa mitattuihin minimilämpötiloihin. Sen sijaan maastokokeessa karaistuneiden silmujen (VS- ja DTA-mittaus) ja juurten (EL-mittaus) pakkaskestävyys oli heikompi verrattuna talviaikaisiin maan ja ilman lämpötiloihin (I, III).

Silmun osalta havaittiin, että silmun sulaessa sen pakkaskestävyys heikkenee hyvin nopeasti (IV). Silmuilla mitatut alhaiset pakkaskestävyydet johtuivatkin osaksi sulatuksesta laboratorioissa. Lämpötilan laskiessa alle soluväliinesteen jäätympisteen alkaa rangan solukoissa ja silmun alla olevassa silmuontelossa tapahtua jäätymistä. Silmun ulkopuolinen jäätyminen muodostaa höyrynpaine-eron silmun ja rangan solujen välille, jolloin silmun alkeisversosta siirtyy vähitellen osmoottisesti vettä silmuonteloon (Sakai ja Larcher 1987). Ontelo laajenee pitkäaikaisen pakkasaltistuksen seurauksena veden kertyessä ja jäätyessä yhtenäiseksi jäämassaksi. Jäätymätön nestefaasi silmussa konsentroituu ja silmun pakkaskestävyys paranee vähitellen (IV) ekstraorganisen jäätyneen seurauksena (Tumanov ja Krasavtsev 1959). Päinvastaisesti sulamisen yhteydessä jäätyneenä olleen silmun pakkaskestävyys laskee hyvin nopeasti (IV). Ilmeisesti silmuonteloon kertyneestä jäämassasta vapautuu jään sulaessa vettä, joka nopeasti kostuttaa kuivuneen kollenkymilevyn ja silmun alaosan. Kosteuspitoisuuden noustua näissä silmun osissa jään kiteytyminen voi edetä silmuun korkeammilla lämpötiloilla. Yleensä silmun pakkaskestävyyttä mitattaessa näyte sulatetaan (kuten myös osajulkaisuissa I ja III), jolloin tämän tutkimuksen tulosten mukaisesti pakkaskestävyys myös heikkenee. Tutkimuksessa saatujen alhaisten silmun pakkaskestävyydestulosten perusteella ei siten voi päätellä, että

silmuilla olisi erityisen suuri pakkasvaurioriski. Nopeita pakkaskestävyyden muutoksia karaistuneissa silmuissa tulisi tutkia kuitenkin perusteellisemmin. Lisäksi tulisi selvittää tarkemmin, voiko äärioloissa silmu altistua pakkasvaurioille lauhan jakson jälkeen.

Juurilla oli mittaustulosten mukaan myös korkea riski pakkasvaurioille (III), mutta keväällä kerätyissä juurinäytteissä elävien juurten osuus ei ollut kohonnut suhteellisesti maan pinnassa, missä juuret mahdollisesti altistuivat ääreille talviolosuhteille (Räisänen ym. 2006). Maasto-olosuhteissa kerättyjen näytteiden pakkaskestävyys on yleensä parhaimmillaan vasta keskitalvella, kun maa on ollut roudassa huomattavasti pidempään kuin maastokokeen tutkimusjaksolla (III) (Sutinen ym. 1998). Välttämättä maastokokeen juuret eivät olleet saavuttaneet maksimaalista pakkaskestävyyttään viimeiseen näytteenottoajankohtaan mennessä.

### 3.3 Typen ja boorin vaikutus pakkaskestävyyteen

Typpilannoitus ei vaikuttanut tutkimuksen aineistossa pakkaskestävyyteen missään mitatussa kasvinosassa (I, III). Tutkimuksissa, joissa typpipitoisuus on vaikuttanut kuusilla pakkaskestävyyteen, typpipitoisuudet ovat olleet korkeissa ravinnekäsittelyissä selvästi yli  $20 \text{ g N kg}^{-1}$  (L'Hirondelle ym. 1992, Dalen ja Johnsen 2004) tai matalimmilla typpitasoilla alle  $14 \text{ g N kg}^{-1}$  (DeHayes ym. 1989). Maastokokeessa puiden neulasten typpipitoisuudet olivat muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta näiden typpipitoisuuksien välillä, eikä puiden typpipitoisuuksissa ollut ensimmäisen syksyn jälkeen eroja.

Maastokokeessa boori ei vaikuttanut neulasten pakkaskestävyyteen minään näytteenottoajankohtana (III). Myöskään taimikokeessa boorikäsittelyjen välillä ei ollut eroa neulasten pakkaskestävyydessä karaistumisen aikana otetuissa tai karaistuneissa näytteissä (II). Ennen karaistumista, kasvukauden aikana, neulasten pakkaskestävyys oli taimikokeen 0B-käsittelyssä  $1,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  heikompi kuin 100B käsittelyissä (II). Yleensä hallat vaurioittavat kasvaimia silmun puhkeamisen jälkeen keväällä (Hannerz 1999), mutta pakkasvauriot kasvukauden loppupuolella ennen lyhyen päivän vaikutusta ovat harvinaisia. Tämän vuoksi taimikokeessa havaittu neulasten lisääntynyt pakkasvaurioriski boorinpuutoksessa ei todennäköisesti ole merkittävä tekijä kasvuhäiriöiden syntymiselle.

Boori ei vaikuttanut myöskään juurten pakkaskestävyyteen (II, III). Siten boorinpuutoksessa aiemmin havaittu muutos elävien ja kuolleiden juurten suhteessa (Möttönen ym. 2003) ei tämän tutkimuksen mukaan johtuisi alentuneesta pakkaskestävyydestä ja suuremmasta juurten kuolleisuudesta talvella.

Selkeimmät tulokset boorin vaikutuksesta silmun pakkaskestävyyteen saatiin taimikokeesta, jossa se oli pakkasjakson jälkeen heikompi 0B-käsittelyssä kuin 30B- ja 100B-käsittelyissä. Samankaltainen tulos saatiin taimien vuosikasvaimien kärjistä tehdyistä ionivuototestistä (II). Sen sijaan maastosta kerätyissä silmunäytteissä boorikäsittely ei vaikuttanut silmun pakkaskestävyyteen. Pyhäselän maastokokeen lannoittamattomien puiden ja Rautalammin ja Suonenjoen tutkimusmetsiköiden puiden neulasten booripitoisuus vaihteli boorinpuutoksesta suboptimaaliseen pitoisuuteen, joten yksittäisen puun booripitoisuuden ja silmun pakkaskestävyyden olisi voinut olettaa korreloivan. Neulasten booripitoisuus ei kuitenkaan korreloinut silmujen pakkaskestävyyden kanssa, eikä silmun pakkaskestävyys ollut alentunut matalimmillakaan neulasten booripitoisuuksilla (booripitoisuus  $< 3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Taimikokeen ja maastokokeiden

aineistojen välillä oli puiden iän lisäksi kaksi eroa, jotka saattoivat selittää eron maasto- ja taimikokeen tuloksissa suhteessa boorinpuutukseen. Ensiksi taimikokeen mittauksissa käytettiin taimien päätesilmuja, kun taas maastokokeilta kerättiin näytteiksi puiden ylimpien sivuoksien kärkisilmuja. Tämän lisäksi taimikokeessa mahdollinen taimien pakkaskuivuminen saattoi lisätä eroja boorikäsitteilyjen välillä.

Ne maastokokeilta kerätyt silmut, joiden rakenteessa havaittiin kasvuhäiriöitä, eivät DTA-mittausten perusteella alijäähtyneet, kuten silmut, joilla oli normaali silmurakenne (I). On kuitenkin huomattava, että boorinpuutoksen aiheuttamat rakenteelliset häiriöt silmuissa todennäköisesti estävät silmun kehittymisen kasvaimeksi seuraavalla kasvukaudella, vaikkei silmu kärsisikään pakkasvaurioista (Sutinen ym. 2006). Taimikokeen silmujen mikroskooppisessa tarkastelussa ei havaittu vakavia kasvuhäiriöitä eikä eroja silmuissa eri käsitteilyjen välillä (Sutinen 2008). Mikroskooppiseen tarkasteluun kerätyt silmut olivat kuitenkin eri silmuja kuin pakkasanalyysiin käytetyt, joten samankaltaista tarkastelua kasvuhäiriön ja matalan lämpötilan eksotermin (LTE) välillä, kuten tehtiin maastokokeessa, ei voitu tehdä.

Boorilla oli lievä vaikutus maastokokeen silmun pakkaskestävyyden muutokseen jäätyksen ja sulamisen yhteydessä (IV). Kun vuorokauden ajan sulana olleiden silmujen DTA-mittaus tehtiin käyttäen hidasta sulatusnopeutta ( $2\text{ °C h}^{-1}$ ), silmujen pakkaskestävyys oli boorilannoitetuissa puissa heikompi kuin lannoittamattomissa (IV) eli uudelleen karaistuminen sulatuksen jälkeen oli boorinpuutoksessa nopeampaa. Myös sulamisen yhteydessä tapahtuvassa pakkaskestävyyden muutoksessa oli tilastollisesti merkitsevä ero eri boorikäsitteilyjen välillä. Boorin vaikutus silmun pakkaskestävyyden muutokseen on kuitenkin niin pieni, että ilmiöllä ei liene merkitystä boorinpuutoksen aiheuttamien kasvuhäiriöiden syntyyn.

Taimikokeessa ionivuototestin mukaan taimien vuosikasvainten rangan pakkaskestävyys oli matalalämpötilajakson jälkeen merkitsevästi heikompi 0B-käsitteilyssä kuin 30B- ja 100B-käsitteilyssä. Pakkasjakson jälkeen rangan pakkaskestävyys oli sekä 0B-että 30B-käsitteilyssä heikompi kuin 100B-käsitteilyssä (II). Myös maastokokeessa boorikäsitteily vaikutti rangan pakkaskestävyyteen karaistumisen aikana kahdella viidestä mittaukserrasta (III). Maastokokeen ero ei kuitenkaan antanut selkeää näyttöä pakkaskestävyyden heikkenemisestä boorinpuutoksessa, sillä visuaalinen vauriotarkastelu ja ionivuotomenetelmät antoivat päinvastaisen tuloksen suhteessa puiden booritilaan. Maastokokeessa neulasten keskimääräinen booripitoisuus oli  $5\text{ mg kg}^{-1}$  ja vastasi kutakuinkin taimikokeen 30B-käsittelyn pitoisuutta, mutta 0B-käsitteilyssä booripitoisuus oli huomattavasti matalampi ( $2\text{ mg kg}^{-1}$ ). Rangan osalta boorinpuutoksen vaikutus rakenteeseen ja sitä kautta pakkaskestävyyteen jäi vielä selvittämättä tässä tutkimuksessa.

Pakkaskestävyyden heikkeneminen boorinpuutoksessa vain tietyissä osissa voi johtua boorin jakautumisesta puussa. Juurista boori kulkeutuu haihtumisvirtauksen mukana haihduttaviin kasvinosiin ja sieltä edelleen sokerinieluihin nilakuljetuksen sokerialkoholeihin sitoutuneena (Brown ja Shelp 1997). Tulokset alentuneesta pakkaskestävyydestä rangassa ja silmussa voivat olla seurausta rangan jälsisolukon ja silmun heikommasta booriravitsemustilasta suhteessa haihduttaviin neulasiin.

Boorin vaikutukset silmun pakkaskestävyyteen taimikokeessa sekä silmun pakkaskestävyyden muutokseen Pyhäselän kokeessa voivat liittyä myös booripektiinisidosten puuttumiseen kollenkyymilevyssä. Kollenkyymilevy toimii jäätymisesteenä alijäähtyvien silmujen alapuolisessa rakenteessa. Kun pektiinaasientsyymillä pilkotaan jäätymisesteen rakennetta, silmun ja rangan alijäähtymiskyky häviää ja alijäähtymällä suojautuva solukko jäätyy ja tuhoutuu

korkeammassa lämpötilassa (Jones ym. 2000). Alijäähtyvien solukoiden pakkaskestävyys voi alentua booripuutoksen seurauksena, mikäli puutos kasvattaa huokoskokoa jääkiteiden etenemistä estävissä rakenteissa. Silmua suojaavan kollenkyymlievyn rakenne voi vaikuttaa veden siirtymisnopeuteen silmun ja rangan solukoiden välillä. Boorin vaikutus silmun pakkaskestävyydessä tapahtuviin muutoksiin sulamisen ja uudelleen jäätyminen yhteydessä (IV) voikin olla seurausta boorin vaikutuksesta kollenkyymlievyn rakenteeseen. Huokoskoon muutoksia ei välttämättä havaita stereomikroskooppisessa tarkastelussa, joten booripuutoksen vaikutus huokoskokoihin eri solukoissa jää selvitettäväksi myöhemmissä tutkimuksissa.

Talvenkestävyyttä määrittelee myös kasvien pakkaskuivumisen sietäminen. Kasvainrangan impedanssimittauksissa havaittu erittäin korkea soluvälitilan resistanssi taimikokeen 0B- ja 30B-käsittelyissä viittaa taimien kuivuuden sietokyvyn heikentyneen boorinpuutoksen seurauksena (II). Pakkasvaurio syntyy usein soluvälitilan nesteen jääytymisestä seuraavan voimakkaan solunsisäinen dehydraation vuoksi (Pearce 2001). Solukalvon kiinnittyminen soluseinään voi heikentyä (Bassil ym. 2004) ja solut myös menettävät elastisuuttaan ja muuttuvat hauraiksi boorinpuutoksessa (Goldbach ym. 2000). Tämän vuoksi voi kasvaa riski, että jäätymisdehydraation seurauksena solukalvo irtoaa soluseinästä ja esimerkiksi voimakkaasti jäätyminen yhteydessä kuivuvat jälsi- ja nilasolut vaurioituvat (Zweifel ja Häsler 2000, Kuroda ym. 2003). Taimikokeesta saadun tuloksen ja kuusen pakkaskuivumisherkkyuden (Christersson ym. 1987) vuoksi olisi perusteltua tutkia boorinpuutoksen vaikutusta pakkaskuivumisen sietokykyyn tarkemmin.

#### **4. JOHTOPÄÄTÖKSET**

Tutkimuksessa ei havaittu boorinpuutoksen vaikutusta neulasten ja juurten karaistumiseen. Havaittu neulasten pakkaskestävyyden alentuminen boorinpuutoksessa kasvukauden aikana ei todennäköisesti lisää neulasten pakkasvaurioriskiä merkittävästi. Maastokokeessa ei havaittu myöskään typpilannoituksen vaikuttavan pakkaskestävyyteen.

Talvilevossa olevan silmun pakkaskestävyys vaihtelee nopeasti silmun sulamisen ja jäätyminen yhteydessä. Boorinpuutos vaikutti maastokokeessa silmun karaistumisnopeuteen sulaneen silmun jäätyessä uudelleen. Nopeat pakkaskestävyyden muutokset tulee ottaa huomioon tutkittaessa silmun pakkaskestävyyttä. Ilmiön merkityksestä kuusen silmun talvehtimiseen ei vielä tämän tutkimuksen perusteella voi tehdä varmoja johtopäätöksiä.

Karaistuneen rangan ja silmun pakkaskestävyys alentui, kun taimien booritila oli selvästi boorinpuutosrajan alapuolella. Vastaavaa ei kuitenkaan havaittu yhdelläkään maastokokeen näytteenotoista. Boorinpuutoksen vaikutus pakkaskestävyyteen tuli esiin hyvin matalissa pitoisuuksissa, joissa boorinpuutoksen aiheuttamat rakenteelliset häiriöt voivat myös aiheuttaa kärkikasvun päättymisen. Vaikka tutkimuksen perusteella kuusen pakkasvaurioriski lisääntyi booripuutoksen seurauksena osalla tutkimusaineistoa, on lisääntynyt riski pakkasvaurioille kasvuhäiriöiden syntymisen kannalta kuitenkin todennäköisesti pieni tekijä.

## Lähdeluettelo

- Albrektson, A., Aronsson, A. ja Tamm, C. O. 1977. The effect of forest fertilisation on primary production and nutrient cycling in the forest ecosystem. *Silva Fennica* 11: 233-239.
- Aronsson, A. 1980. Frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) - Hardiness during winter and spring in young trees of different mineral nutrient status. *Studia Forestalia Suecica* 155: 1-27.
- 1983. Growth disturbances caused by boron deficiency in some fertilized pine and spruce stands on mineral soils. Julkaisussa: Kolari, K. K. (toim.) Growth disturbances in forest trees. ss. 116-122.
- , Ingestad, T. ja Löf, L-G. 1976. Carbohydrate metabolism and frost hardiness in pine and spruce seedlings grown at different photoperiods and thermoperiods. *Physiologia Plantarum* 36: 127-132.
- Ashworth, E. N. ja Abeles, F. B. 1984. Freezing behaviour of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. *Plant Physiology* 76: 201-204.
- Badanov, A. P. 1965. O vlijanii stimulatorov rosta na povysenie morostoikosti sejantsev evkaliptsa. *Bulletin iz glavnaja botanitsheskaja sada* 50: 91-93.
- Bassil, E., Hu, H. ja Brown, P. H. 2004. Use of phenylboronic acid to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology* 136: 3383-3395.
- Beltram, V. 1956. Bor als Frostschutz. *Allgemeine Forstzeitshrift* 10: 147-148.
- 1958. Das Spurelement Bor. *Allgemeine Forstzeitshrift* 25/26: 323.
- Bigras, F. J., Gonzales, A., D' Aoust, A. L. ja Hebert, C. 1996. Frost hardiness, bud phenology and growth of containerized *Picea mariana* seedlings grown at three nitrogen levels and three temperature regimes. *New Forests* 12: 243-259.
- Bilkova, J., Albrechtova, J. ja Opatrna, J. 1999. Histochemical detection and image analysis of nonspecific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* 35: 1129-1138.
- Braekke, F. H. 1979. Boron deficiency in forest plantations on peatland in Norway. *Reports of the Norwegian Forest Research Institute* 35.3: 217-236.
- 1983. Micronutrients - prophylactic use and cure of forest growth disturbances. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 116: 159-170.
- Brown, P. H. ja Shelp, B. J. 1997. Boron mobility in plants. *Plant and Soil* 193: 85-101.
- , Bellaloui, N., Wimmer, M. A., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. ja Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology* 4: 205-223.
- Christersson, L., von Fricks, H. ja Sihe, Y. 1987. Damage to conifer seedlings by summer frost and winter drought. Julkaisussa: Li, P. H. (toim.) *Plant Cold Hardiness*. Alan R. Liss Inc., New York. s. 203-210.
- Cooling, E. N. 1967. Frost resistance in *Eucalyptus grandis* following the application of fertilizer borate. *Rhodesian, Zambian and Malesian Journal of Agricultural. Research* 5: 97-100.
- Dalen, L.S. ja Johnsen, Ø. 2004. CO<sub>2</sub> enrichment, nitrogen fertilization and development of freezing tolerance in Norway spruce. *Trees* 18: 10-18.
- DeHayes, D. H., Ingle, M. A. ja Waite, C. E. 1989. Nitrogen fertilisation enhances cold tolerance of red spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1037-1043.

- Ferm, A., Hytönen, J., Lähdesmäki, P. ja Pietiläinen, P. 1990. Effects of high nitrogen deposition on forests: Case studies close to fur animal farms. Julkaisussa: Kauppi, P., Anttila, P. ja Kenttämies, K. (toim.) Acidification in Finland. Springer-Verlag, Berlin. s. 635-668.
- Fleischer, A., O'Neill, M. A. ja Ehwald, R. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalactouronan II. *Plant Physiology* 121: 829-838.
- George, M. F., Burke, M. J., Pellet, H. M. ja Johnson, A. G. 1974. Low temperature exotherms and woody plant distribution. *Hortscience* 9: 519-522.
- Goldbach, H. E., ja Wimmer, M. A. 2007. Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 39-48.
- , Yu, Q., Wingender, R., Schulz, M., Wimmer, M., Findeklee, P. ja Baluska, F. 2000. Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164: 173-181.
- Gusta, L. V., Tyler, N. J. ja Chen, T. H. H. 1983. Deep undercooling in woody taxa growing north of the -40°C isotherm. *Plant Physiology* 72: 122-128.
- Halonen, O. ja Tulkki, H. 1981. Ravinneanalyysien työohjeet. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 36:1-23.
- Hannerz, M. 1999. Early testing of growth rhythm in *Picea abies* for prediction of frost damage and growth in the field. . (Väitöskirja) Metsägenetiikan laitos, Uppsalan yliopisto. 45 s.
- Hellergren, J. 1981. Frost hardiness development in *Pinus silvestris* seedlings in response to fertilization. *Physiologia Plantarum* 52: 297-301.
- Helmisaari, H-S. ja Siltala, T. 1989. Variation in nutrient concentrations of *Pinus sylvestris* stems. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4, 443-451.
- , Finer, L., Kukkola, M., Lindroos, A., Luiro, J., Piirainen, S., Saarsalmi, A., Smolander, A., Tamminen, P. 2008. Energiapuun korjuu ja metsän ravinnetase Julkaisussa: Kuusinen M. ja Ilvesniemi H. (toim.) Energiapuun korjuun ympäristövaikutukset. Tutkimusraportti, Tapion ja Metsäntutkimuslaitoksen julkaisuja. Saatavissa [www.metsavastaa.net/energiapuu/raportti](http://www.metsavastaa.net/energiapuu/raportti).
- Hu, H. ja Brown, P. H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. *Plant Physiology* 105: 681-689.
- Huang, L., Ye, Z., Bell, R. W. ja Dell, B. 2005. Boron nutrition and chilling tolerance of warm climate crop species. *Annals of Botany* 96: 755-767.
- Hynönen, T., Korhonen, K. T. ja Tammilehto, E. 1999. Kuusen kasvuhäiriöt Pohjois-Savon kangasmetsissä. *Metsätieteen aikakauskirja* 3: 577-581.
- Hänninen, H. ja Kramer, K. 2007. A framework for modelling the annual cycle of trees in boreal and temperate regions. *Silva Fennica* 41: 167-205.
- Ingestad, T. 1979. Mineral nutrient requirements of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiologia Plantarum* 45: 373-380.
- Jalkanen, R. 1990. Nitrogen fertilization as a cause of dieback of Scots pine at Paltamo, northern Finland. *Aquilo Series Botanici* 29: 25-31.
- Jones, K. S., MacKersie, B. D. ja Paroschy, J. 2000. Prevention of ice propagation by permeability barriers in bud axes of *Vitis vinifera*. *Canadian Journal of Botany* 78: 3-9.
- Jukka, L. 1988. Metsänterveysopas. Metsätuhot ja niiden torjunta. Samerka, Helsinki 138 s.
- Juutinen, P. 1962. Tutkimuksia metsätuhojen esiintymisestä männyn ja kuusen viljelytaimistoissa Etelä-Suomessa. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 54,5. 80 s.

- Jönsson, A. M., Ingerslev, M. ja Raulund-Rasmussen, K. 2004. Frost sensitivity and nutrient status in a fertilized Norway spruce stand in Denmark. *Forest Ecology and Management* 201: 199-209.
- Kaunisto, S. 1984. Yhteenveto lannoitustutkimuksista metsikön perustamisen ja taimikonhoidon yhteydessä turvemailla. *Suo* 35: 119-126.
- Kontunen-Soppela, S. 2001. Dehydrins in Scots pine: responses in annual rhythm, low temperature and nitrogen. (Väitöskirja), Biologian laitos, Oulun yliopisto. 44 s.
- Kuroda, K., Kasuga, J., Arakawa, K. ja Fujikawa, S. 2003. Xylem ray parenchyma cells in boreal hardwood species respond to subfreezing temperature by deep supercooling that is accompanied by incomplete desiccation. *Plant Physiology* 131: 736-744.
- L'Hirondelle, S. J., Jacobson, J. S. ja Lassoie, J. P. 1992. Acidic mist and nitrogen fertilization effects on growth, nitrate reductase activity, gas exchange, and frost hardiness of red spruce seedlings. *New Phytologist* 121: 611-622.
- Lehto, T. 1994. Effects of liming and boron fertilization on mycorrhizas of *Picea abies*. *Plant and Soil* 163: 65-68.
- ja Mälkönen, E. 2001. Effects of liming and boron fertilization on boron uptake of *Picea abies*. *Plant and Soil* 163: 55-64.
- Lipas, E. 1988. Typpilannoituksen ajankohta kangasmetsissä. *Folia Forestalia* 709: 1-22.
- Loomis, W. D. ja Durst, R. W. 1992. Chemistry and Biology of Boron. *BioFactors* 3: 229-239.
- Makkonen, K. ja Helmisaari, H-S. 1999. Assessing fine-root biomass and production in a Scots pine stand - comparison of soil core and root ingrowth core methods *Plant and Soil* 210: 43-50.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. 889 s.
- Matoh, T. 1997. Boron in plant cell walls. *Plant and Soil* 193: 59-70.
- McNulty, S. G., Aber, J. D. ja Newman, S. D. 1996. Nitrogen saturation in a high elevation New England spruce - fir stand. *Forest Ecology and Management* 84: 109-121.
- Mead, R. ja Curnow, R. N. 1983. Statistical methods in agriculture and experimental biology. Chapman and Hall. London. 335 s.
- Muhling, K. H., Wimmer, M. ja Goldbach, H. E. 1998. Apoplastic and membrane-associated  $Ca^{2+}$  in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiologia Plantarum* 102: 179-184.
- Mälkönen, E., Derome, J. ja Kukkola, M. 1990. Effects of nitrogen inputs on forest ecosystems - estimation based on long-term fertilisation experiments. Julkaisussa: Kauppi, P., Anttila, P. ja Kenttämies, K. (toim.) *Acidification in Finland*. Springer-Verlag, Berlin. s. 325-347.
- Möttönen, M. 2004. Boron supply and drought responses in Norway spruce (*Picea abies*). (Väitöskirja) Metsätieteellinen tiedekunta. Joensuun yliopisto. 50 s.
- , Lehto, T., Aphalo, P. J. 2001. Growth dynamics and mycorrhizas of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings in relation to boron supply. *Trees* 15: 319-326.
- , Lehto, T., Aphalo, P. J., Kukkola, M. and Mälkönen, E. 2003. Response of mature stands of Norway spruce (*Picea abies*) to boron fertilisation. *Forest Ecology and Management* 180: 401-412.
- Palta, J. P. ja Li, P. H. 1978. Cell membrane properties in relation to freezing injury. Julkaisussa: Li, P. H. ja Sakai, A. (toim.) *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. Academic Press. s 93-115.
- Pearce, R. S. 2001. Plant freezing and damage. *Annals of Botany* 87: 417-424.



- Pietiläinen, P. 1984. Foliar nutrient content and 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in vegetative buds of Scots pine on a growth disturbance area. *Communications Instituti Forestalis Fenniae* 123: 1-18.
- Pukacki, P. 1987. Deep supercooling shoot and bud tissues of *Picea abies*. *Forest Ecology and Management* 20: 97-103.
- ja Pukacka, S. 1987. Freezing stress and membrane injury of Norway spruce (*Picea abies*) tissues. *Physiologia Plantarum* 69: 156-160.
- Ranta, E., Rita, H. ja Kouki, J. 1992. Tilastotiedettä ekologeille. 8.painos. Yliopistopaino. Helsinki. 569 s.
- Renault, S. ja Zwiazek, J. J. 1997. Cell wall composition and elasticity of dormant and growing white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 101: 323-327.
- Repo, T. ja Lappi, J. 1989. Estimation of standard errors of impedance estimated frost resistance. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4: 67-74.
- , Zhang, G., Ryyppö, A. ja Rikala, R. 2000. The electrical impedance spectroscopy of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) shoots in relation to cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 21: 2095-2107.
- Ridloch, I., Lehto, T. ja Grace, J. 1991. Photosynthesis of tropical seedlings in relation to light and nutrient supply. *New Phytologist* 119: 137-147.
- Rikala, R. ja Kontinen, K. 2007. Uhkaako booripula taimia istutuksen jälkeen – auttaisiko booritankkaus tarhalla? *Taimiuutiset* 2/2007: 21-24.
- Ryyppö, A., Repo, T. ja Vapaavuori, E. 1998. Development of freezing tolerance in roots and shoots of Scots pine seedlings at nonfreezing temperatures. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 557-565.
- Räisänen, M., Repo, T. ja Lehto, T. 2006. Electrolyte leakage test in assessing of cold hardiness in roots. (Kokousesitys) COSTE38, Rovaniemi, 9.-13.9.2006.
- Saarsalmi, A. ja Tamminen, P. 2005. Boron, phosphorus and nitrogen fertilization in Norway spruce stands suffering from growth disturbances. *Silva Fennica* 39: 351-364.
- Sakai, A. 1979. Freezing avoidance of primordial shoots of very hardy conifer buds. *Biological Sciences* 37: 1-9.
- ja Larcher, W. 1987. Frost survival of plants. Springer-Verlag, Berlin. 321 s.
- Senser, M. ja Beck, E. 1982. Frost resistance in spruce (*Picea abies* (L.) Karst.): V influence of photoperiod and temperature on the membrane lipids of the needles. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 108: 71-85.
- Shorrocks, V. M. 1997. The Occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and Soil* 193: 121-148.
- Silfverberg, K. 1979. Männyn kasvuhäiriön ajoittuminen ja alkukehitys turvemaan boorinpuutosalueella. *Folia Forestalia* 396: 1-19.
- 1980. Kuusen kasvuhäiriö ja hivenravinteet. *Folia Forestalia* 432: 1-16.
- Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Reviews of Plant Physiology* 35: 543-584.
- Sutinen, M-L., Ritari, A., Holappa, T. and Kujala, K. 1998. Seasonal changes in soil temperature and in the frost hardiness of Scots pine (*Pinus sylvestris*) roots under subarctic conditions. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 946-950.
- Sutinen, S. 2008. Henkilökohtainen tiedonanto. Metsäntutkimuslaitos. Joensuu. 1.7.2008.
- , Vuorinen, M. ja Rikala, R. 2006. Developmental disorders in buds and needles of mature Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., in relation to needle boron concentrations. *Trees* 20: 559-570.

- Tamminen, P. ja Saarsalmi, A. 2004. Viljavien maiden nuorten kuusikoiden neulasten booripitoisuus Etelä-Suomessa. *Metsätieteen aikakauskirja* 3: 271-283.
- Tumanov, I. I. ja Krasavtsev, O. K. 1959. Zakalivanije severnyh drevesnyh rastenij otricateljnymi temperaturami (Hardening of woody plants by negative temperature treatment). *Fiziologija Rastenij* 6: 654-667.
- Veijalainen, H., Reinikainen, A. ja Kolari, K. K. 1984. Metsäpuiden ravinneperäinen kasvuhäiriö Suomessa. *Folia Forestalia* 601: 1-41.
- Wang, Z. Y., Tang, Y. L., Zhang, F. S. ja Wang, H. 1999. Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *Journal of Plant Nutrition* 22: 543-550.
- Wikner, B. 1983. Distribution and mobility of boron in forest ecosystems. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 116: 131-141.
- Wisniewski, M. 1995. Deep supercooling of woody plants and the role of cell wall structure. Julkaisussa: Lee, R. E., Warren, G. J. ja Gusta, L. V. (toim.) *Biological Ice and Its Applications*. American Phytopathological Society Press. s. 163-181.
- , Davis, G. ja Arora, R. 1991. Effect of macerases, oxalic acid, and EGTA on deep supercooling and pit membrane structure of xylem parenchyma of peach. *Plant Physiology* 96: 1354-1359.
- Yli-Vakkuri, P. 1971. Havaintoja latvakasvainten pakkasvaurioista kuusen taimistoissa Itä-Savossa. *Silva Fennica* 5: 96-104.
- Zweifel, R. ja Häslér, R. 2000. Frost-induced reversible shrinkage of bark of mature subalpine conifers. *Agricultural and Forest Meteorology* 102: 213-222.
- Zwieniecki, M. A., Melcher, P. J. ja Holbrook, N. M. 2001. Hydrogen control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* 291: 1059-1062.