

SILVA FENNICA

Vol. 8 1974 N:o 3

Sisällys
Contents

- SIRKKA KUPILA-AHVENNIEMI, SIRKKA HANKONEN ja SEPPO SIVONEN: Kokeita röntgenmikroanalyysimenetelmän käyttökelpoisuudesta eräiden alkuaineiden määrittämisessä männyn silmuissa 145
Summary: Experiments on the determination of certain elements in the buds of the Scots pine by means of the electron probe X-ray microanalyser 158
- REIJO SOLANTIE: Kesän vesitaseen vaikutus metsä- ja suokasvillisuuteen ja linnustoon sekä lämpöolojen välityksellä maatalouden toimintaedellytyksiin Suomessa 160
Summary: The influence of water balance in summer on forest and peatland vegetation and bird fauna and through the temperature on agricultural conditions in Finland 172
- LASSE LOVÉN: Maisemanhoitomallien käyttö metsätalouden maan aluevaraus suunnittelussa 185
Summary: Regional landscape planning on forest areas 203
- HEIKKI WUORENRINNE: Suomen kekomuurahaisten (*Formica rufa* COLL.) ekologiasta ja levinneisyydestä 205
Summary: About the distribution and ecology of Formica rufa -group in Finland 214

SUOMEN METSÄTIETEELLINEN SEURA
SOCIETY OF FORESTRY IN FINLAND

Silva Fennica

A QUARTERLY JOURNAL FOR FOREST SCIENCE

PUBLISHER:

THE SOCIETY OF FORESTRY IN FINLAND

OFFICE:

Unioninkatu 40 B, SF-00170 Helsinki 17, Finland

EDITOR:

MATTI KÄRKKÄINEN

EDITORIAL BOARD:

YRJÖ VUOKILA (Chairman), EERO PAAVILAINEN (Vice Chairman), J. E. ARNKIL, VELI-PEKKA JÄRVELÄINEN, MATTI LEIKOLA, MATTI NUORTEVA, and KUSTAA SEPPÄLÄ (Secretary).

Silva Fennica is published quarterly. It is a sequel to the Series, vols. 1 (1926)—120(1966). Its annual subscription price is 20 Finnish marks. The Society of Forestry in Finland also publishes *Acta Forestalia Fennica*. This series appears at irregular intervals since the year 1913 (vol. 1).

Orders for back issues of the publications of the Society, subscriptions and exchange inquiries can be addressed to the office.

Silva Fennica

NELJÄNNESVUOSITTAIN ILMESTYVÄ METSÄTIETEELLINEN
AIKAKAUSKIRJA

JULKAISIJA:

SUOMEN METSÄTIETEELLINEN SEURA

TOIMISTO:

Unioninkatu 40 B, 00170 Helsinki 17

TOIMITTAJA:

MATTI KÄRKKÄINEN

TOIMITUSKUNTA:

YRJÖ VUOKILA (puheenjohtaja), EERO PAAVILAINEN (varapuheenjohtaja), J. E. ARNKIL, VELI-PEKKA JÄRVELÄINEN, MATTI LEIKOLA, MATTI NUORTEVA ja KUSTAA SEPPÄLÄ (sihteeri).

Silva Fennica, joka vuosina 1926—66 ilmestyi sarjajulkaisuna (niteet 1—120), on vuoden 1967 alusta lähtien neljännesvuosittain ilmestyyvä aikakauskirja. Suomen Metsätieteellinen Seura julkaisee myös *Acta Forestalia Fennica*-sarjaa vuodesta 1913 (nide 1) lähtien.

Tilauksia ja julkaisuja koskevat tiedustelut osoitetaan Seuran toimistolle. *Silva Fennican* tilaushinta on 20 mk.

KOKEITA RÖNTGENMIKROANALYYSIMENETELMÄN KÄYTTÖKELPOISUUDESTA ERÄIDEN ALKUAINOIDEN MÄÄRITYKSESSÄ MÄNNYN SILMUISSA

SIRKKA KUPILA-AHVENNIEMI—SIRKKA HANKONEN—SEPPO SIVONEN

SUMMARY:

EXPERIMENTS ON THE DETERMINATION OF CERTAIN ELEMENTS
IN THE BUDS OF THE SCOTS PINE BY MEANS OF THE ELECTRON
PROBE X-RAY MICROANALYSER.

Saapunut toimitukselle 12. 5. 1974

Kirjoituksessa on kuvattu röntgenmikroanalyysointilaitteen ja sen toimintaperiaate sekä esitetty kokeita, joita on tehty Oulun yliopiston elektronioptiikan laitoksella fosforin, rikin ja kalsiumin määrittämiseksi lepotilassa olevan männyn silmujen kärkisoluissa. Mäntymateriaali on kerätty marras—helmikuussa 1972—73, näytteet on valmistettu parafiinimenetelmällä ja alkuaineiden määrityksissä on käytetty viiva-analyysijä. Tähänastiset tulokset viittaavat siihen, että mainittujen aineiden esiintymisessä ei tapahdu kovin suuria muutoksia talven aikana.

Röntgenmikroanalyysi on kasvimateriaalin tutkimuksessa verrattain uusi menetelmä, jonka etuna on, että analyysi voidaan tehdä erittäin pienestä näytetilavuudesta. Työtavan uutuuden vuoksi menetelmien, kuten näytteenvalmistuksen ja tulosten tulkintatavan kehittäminen on edelleen hyvin keskeisellä sijalla. Tämän kirjoituksen puitteissa on pyritty kiinnittämään huomiota erityisesti näihin asioihin.

Metsäpuiden tutkimuksessa on jo tähän mennessä todettu röntgenmikroanalyysin merkitys saastetutkimuksissa. Ilmeistä on, että menetelmä tulee osoittautumaan käyttökelpoiseksi monella tavalla esim. lannoituskokeiden, vuosiryntien ja erilaisten patologisten tilojen tarkkailussa.

1. RÖNTGENMIKROANALYSAATTORI

1.1. TOIMINTAPERIAATE

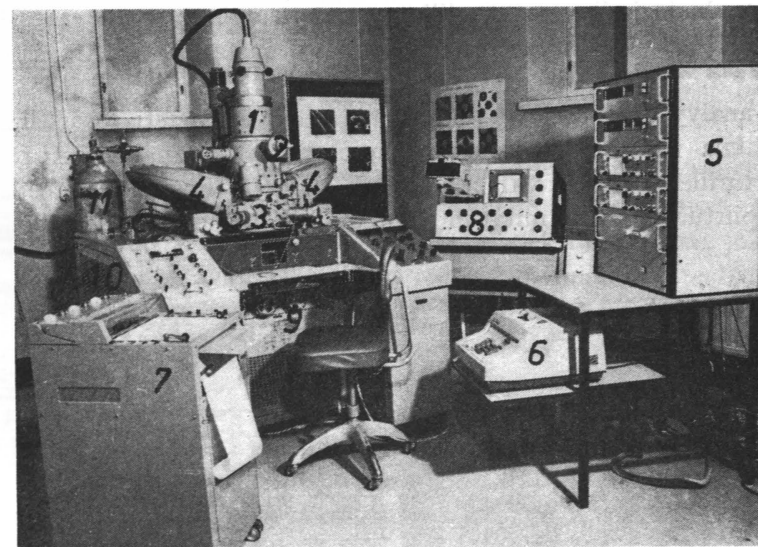
Röntgenmikroanalysaattori (RMA) on laite, jolla voidaan saada kiinteästä näytteestä ainetta hajottamatta kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi analysoitavan tilavuuden halkaisijan ollessa suuruusluokkaa $1 \mu\text{m}$. RMA:n toiminta on lyhyesti seuraava: 5–50 kV:n jännitteellä kiihdytetty ohut, halkaisijaltaan n. $1 \mu\text{m}$:n elektronisuihku kohdistetaan tutkittavaan näytteeseen, jolloin syntyy näytteessä oleville alkuaineille ominaista röntgensäteilyä. Tämä ns. karakteristinen röntgensäteily sisältää useita erilaisia röntgenwiivoja, joiden aallonpituus ja energia on kullekin alkuaineelle ominainen. Kun analysoidaan röntgenspektrometrillä syntynyt röntgensäteily, saadaan näytteen kvalitatiivinen analyysi. Kvantitatiivinen analyysi saadaan vertaamalla tutkittavasta näytteestä mitatun karakteristisen säteilyn intensiteettiä (säteily määrä/aikayksikkö) puhtaasta tai koostumukseltaan tunnetusta vertailunäytteestä mitattuun intensiteettiin. Alkuaineen karakteristisen röntgensäteilyn intensiteetti on suoraan, mutta ei lineaarisesti verrannollinen sen pitoisuuteen. Kaikki alkuaineet kolmea keveintä (H, He, Li) lukuunottamatta voidaan analysoida.

1.2. RAKENNE

Kuvassa 1 näemme Oulun yliopiston elektronioptiikan laitoksen japanilaisen röntgenmikroanalysaattorin JXA-3SM. Kuvaan on numeroitu RMA:n eri osia: 1. elektronioptinen osa, 2. valomikroskooppi, 3. näytekammio, 4. kaksi röntgenspektrometriä, 5. röntgensäteilyn intensiteetin mittausta- ja tulostusyksiköt, 6. printteri, 7. piirturi, 8. pyyhkäisy-yksikkö, jossa kaksi oskilloskooppia ja valokuvausta varten tavallinen kamera (kuvassa) tai polaroidkamera, 9. tyhjösysteemin käyttövivut (5 tyhjöpumppua laitteen takana), 10. korkeajänniteyksikkö, 11. kaasupullo, joka sisältää röntgenlaskureissa käytettävää argon-metaani kaasuseosta.

RMA on toiminnallisesti jaettavissa kolmeen osaan: elektronioptinen osa, kohdistussysteemi ja röntgenspektrometri. Elektronioptisessa osassa synnytetään, kiihdytetään ja fokusoidaan elektronisuihku näytteen pinnalle. Suihku voidaan säätää joko osumaan yhteen pisteeseen tai pyyhkimään neliön muotoista alaa näytteen pinnalla.

Kohdistussysteemillä etsitään näytteestä haluttu tutkimuskohta ja siirretään se elektronisuihkuun alle. Etsintä suoritetaan valomikroskoopilla, jolla voidaan tarkastella näytettä analysoinninkin aikana ja näin varmistua siitä, että suihku osuu täsmälleen haluttuun kohtaan. Näytettä on mahdollista vapaasti liikuttaa elektronisuihkuun vastaan kohtisuorassa tasossa.



Kuva 1. Oulun yliopiston elektronioptiikan laitoksen röntgenmikroanalysaattori JXA-3SM. Numeroiden selitykset tekstin yhteydessä.

Röntgenspektrometrillä analysoidaan näytteessä syntyvän karakteristisen röntgensäteilyn sisältämät röntgenwiivat ja mitataan niiden intensiteetit. Spektrometrejä on kahta eri päätyyppiä, joista ns. kidespektrometri kuuluu RMA:n vakiovarusteisiin. Kidespektrometrejä voi yhdessä laitteessa olla 1–4 kappaletta. Samanaikaisesti analysoitavien alkuaineiden lukumäärä on sama kuin spektrometrien määrä eli korkeintaan neljä. Kidespektrometrin rinnalla tai asemasta voidaan käyttää toista spektrometryyppiä ns. energiadiispersiivistä spektrometriä, jolla voidaan mitata kaikki alkuaineet samanaikaisesti mutta jolla ainakaan toistaiseksi ei voida analysoida natriumia ($Z = 11$) keveämpiä alkuaineita.

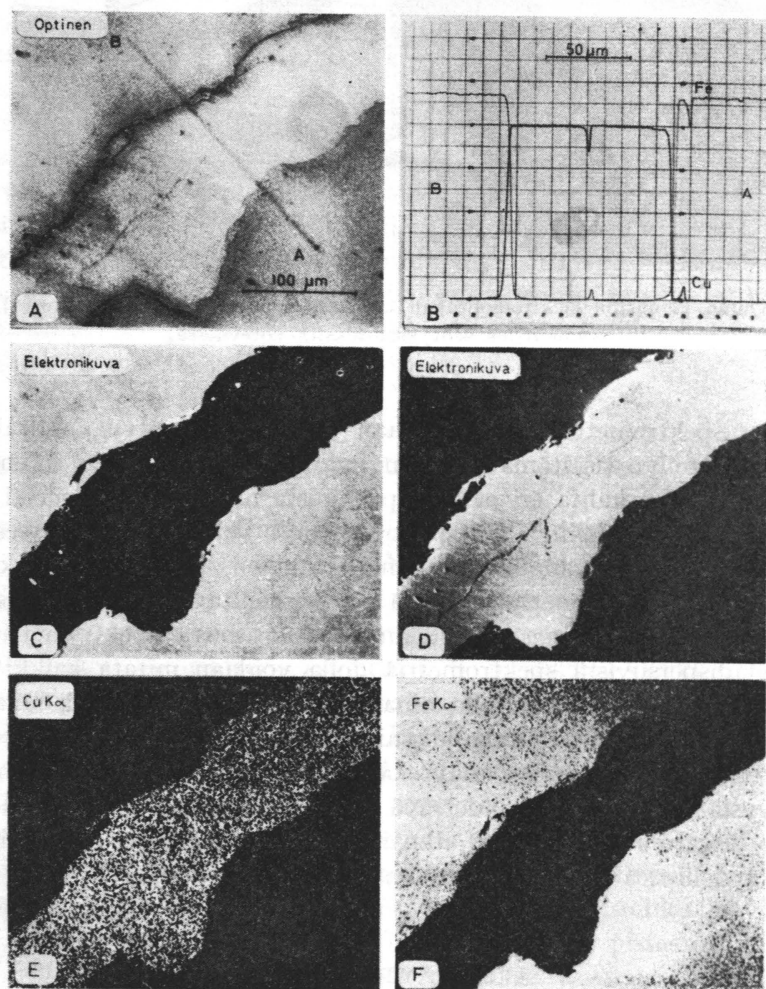
Elektronioptisessa osassa, näytekammiossa ja röntgenspektrometreissä on analyysiä suoritettaessa pidettävä hyvä tyhjö, sillä tavallisessa ilmapaineessa elektronit ja keveiden alkuaineiden röntgensäteily absorboituisivat ilmaan täydellisesti jo muutaman senttimetrin matkalla.

1.3. KÄYTTÖTAVAT

RMA:n analyysimenetelmät ovat piste-, viiva- ja pinta-analyysi. Piste-analyysissä sekä elektronisuihku että tutkittava näyte pysyvät paikallaan, joten analyysi syntyy todella hyvin pienestä tilavuudesta, pisteestä, näytettä. Metallinäytteillä analysoitavan tilavuuden halkaisija on pienimmillään 1

μm , mutta biologisella materiaalilla ei päästä näin hyvään erotuskykyyn. Kvantitatiivisessa määrittäksessä pisteanalyysi on tarkin RMA:n eri menetelmistä.

Viiva-analyysissä näytettä liikutetaan suoraviivaisesti tasaisella nopeudella suihkua vastaan kohtisuoraan suuntaan ja samanaikaisesti rekisteröidään piirturille analysoidavan alkuaineen röntgenviivan intensiteetti. Näin saadaan piirturille kuva mitatun alkuaineen pitoisuuden vaihteluista vali-



Kuva 2. Kuparijuotos kahden teräslevyn välissä: A) Valomikroskooppikuva jossa elektronisuihkun polttama kontaminaatiojälki (A–B) osoittaa juotoksen yli ajetun viiva-analyysin linjan. B) raudan ja kuparin röntgenviivojen intensiteettikäyrät kuvan A) osoittamalla kohdalla A–B. C) Absorboituneiden ja D) takaisinsironneiden elektronien avulla muodostetut elektronikuvat. E) Kuparin ja F) raudan röntgenkuvat.

tulla matkalla näytettä (kuva 2). Vaikka viiva-analyysi on pisteanalyysiä epätarkempi, niin usein se kuitenkin on huomattavasti tätä käyttökelpoisempi nimenomaan biologisessa materiaalissa, missä menetelmiä ei ole vielä kovin pitkälle kehitetty.

Pinta-analyysiä tehtäessä asetetaan elektronisuihku pyyhkimään tutkittavaa alaa näytteen pinnalla. Näytteeseen osuvan suihkun kanssa on synkronoituna oskilloskoopin kuvapintaa pyyhkivä elektronisuihku, jonka kirkkautta säätelee mitattavan alkuaineen röntgenviivan intensiteetti. Oskilloskooppiputkelle syntyvässä suurennetussa kuvassa nähdään kirkkauseroina mitatun alkuaineen pitoisuuserot tutkitulla alalla näytettä (kuva 2). Suurennus näillä ns. röntgenkuvilla on 100–10 000.

Näytteessä syntyy elektronisuihkun sitä pyyhkiessä karakteristisen röntgensäteilyn lisäksi joukko muitakin signaaleja, joista RMA:ssa käytetään tavallisesti hyväksi näytteeseen absorboituneita elektroneja, näytteestä takaisinsironneita elektroneja ja näytteestä irronneita sekundäri elektroneja. Kun niiden intensiteetit mitataan sopivilla elektroni-ilmaisimilla ja asetetaan säätelemään oskilloskoopin elektronisuihkun kirkkautta, saadaan erilaisia suurennettuja kuvia, elektronikuvia, tutkitusta alasta näytettä. Niistä voidaan tarkastella yksityiskohtaisesti näytteen pinnan topografiaa (sekundäri elektroneit, kuva 3) tai niistä voidaan nähdä alkuaineiden jakautuminen näytteessä (absorboituneet ja takaisinsironneet elektroneit, kuva 2). Absorboituneitten elektronien avulla muodostetussa kuvassa ne kohdat näytteestä, joissa on keveitä alkuaineita, näkyvät kirkkaampina kuin raskaita alkuaineita sisältävät kohdat. Takaisinsironneista elektroneista muodostetussa kuvassa kontrasti on päinvastainen. Suurennusalue näillä elektronikuvilla on sama kuin röntgenkuvilla 100–10 000. Sekundäri elektronekuvien suora suurennus oskilloskooppiputkella voi olla jopa yli 100 000.

1.4. HAVAITSEMISRAJA JA TARKKUUS

Havaitsemisrajasta so. pienimmästä havaittavasta pitoisuudesta tai aine-määrästä puhuttaessa on tehtävä ero suhteellisen (%) ja absoluuttisen (g) havaitsemisrajan välillä. Suhteelliselle havaitsemisrajalle ei voida antaa mitään yleispäteviä arvoja, koska havaitsemisraja ei riipu ainoastaan analysoidavasta alkuaineesta vaan erittäin paljon myös muista näytteessä olevista alkuaineista. Niinpä esimerkiksi vaikka jokin aine voitaisiin havaita jopa pitoisuudella 0,005 %, niin jokin toinen samassa näytteessä oleva aine, jonka pitoisuus on 0,1 %, voi jäädä havaitsematta. Monella keskimääräisen pitoisuuden antavalla analyysimenetelmällä päästään pienempiin suhteellisen havaitsemisrajan arvoihin kuin RMA:lla, mutta analysoidavan tilavuuden pienyydestä seuraa RMA:n ylivoimainen absoluuttinen herkkyys (kuva 4).

Kvantitatiivisessa analyysissä saavutettava tarkkuus riippuu hyvin monista tekijöistä, josta syystä tarkkuudelle ei voi antaa mitään yleisiä arvoja. Metall- ja mineraalinäytteillä suhteellinen tarkkuus on suuruusluokkaa 1–10 %, mutta biologisilla näytteillä, joista toistaiseksi onkin tehty hyvin vähän kvantitatiivisia määrittämiä, suhteellinen tarkkuus on paljon huonompi. RMA:n arvo onkin enemmän aineiden paikallistamisessa kuin niiden tarkassa kvantitatiivisessa määrittämisessä.

1.5. NÄYTTEEN VALMISTUS

Röntgenmikroanalyysinäytteen tulisi täyttää seuraavat vaatimukset: 1. Näytteen on oltava kiinteä ja tarkkoja kvantitatiivisia määrittämiä varten siihen on voitava tehdä täysin tasainen pinta. 2. Näytteen on oltava stabiili tyhjässä ja pysyvä muuttumattomana elektronisuihkun osuessa siihen. 3. Näytteen pinnan pitää johtaa lämpöä ja sähköä. Biologisten näytteiden vaikeutena on, että ne eivät ilman usein hyvinkin monimutkaista näytteen valmistusta täytä mitään näistä kolmesta vaatimuksesta. Erilaisia valmistusmenetelmiä on lukuisa joukko, mutta mainitsemme tässä vain pari, joilla saadaan pehmeästä kudoksesta käyttökelpoinen näyte röntgenmikroanalyysiin (HALL ym. 1966, RASMUSSEN ym. 1968, HALL ja HÖHLING 1969). Parafiinimenetelmässä solukon kappale fikseerataan, vesi poistetaan ja näyte vataan parafiiniin. Näytteestä leikataan n. 4–10 μm :n leikkeitä, jotka asetetaan esim. elektronimikroskoopin näytehilalle tehdylle hyvin ohuelle tukikalvolle. Viimeisenä valmistusvaiheena molemmiin puoliin näytettä tyhjähöyrytetään yhteensä 70 nm:n alumiinikalvo, joka toimii lämmön ja sähkönsäjohteena. Kryostaattimenetelmässä solukonkappale jäädytetään hyvin nopeasti, leikataan jäätyneenä ja kuivataan härmistämällä, jonka jälkeen se siirretään samanlaiselle alustalle kuin edellä ja päällystetään alumiinilla. Esitetyt kaksi näytteen valmistusmenetelmää eivät ole millään tavoin yleispäteviä, vaan yleensä jokaiselle materiaalille pitäisi käyttää useampia erilaisia menetelmiä ja tuloksista päätellä, mikä soveltuu kuhunkin tutkimukseen parhaiten.

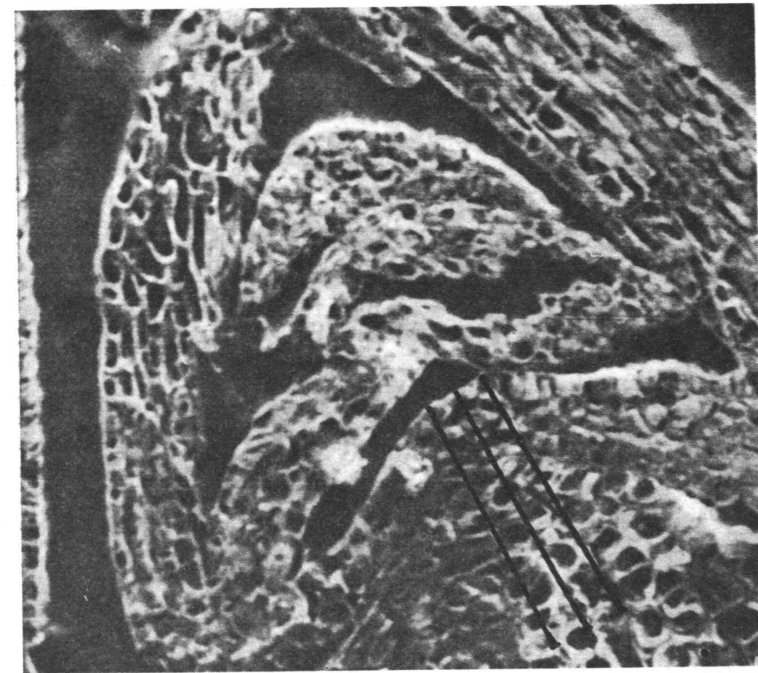
2. TUTKIMUKSIA LEPOTILASSA OLEVAN MÄNNYN SILMUN KÄRKISOLUKOLLA

2.1. TUTKIMUSMATERIAALI JA MENETELMÄT

Tutkimukseen käytetyt männyn (*Pinus silvestris* L.) silmut kerättiin vuosina 1972–73 Oulussa Oritkarissa olevalta kaupungin metsäalueelta. Tässä työssä mainitut tulokset ovat pääasiallisesti 7. 11.–72, 18. 12. —72 ja 21. 2. —73 kerätyistä näytteistä. Koeput olivat n. 20 v. vanhoja ja 6–8

m mittaisia. Silmuista poistettiin suomut ja silmujen kärkiosat fikseerattiin Carnoy'n nesteessä (jäätikka: kloroformi: etanoli, 1:3:6) 2 h ja siirrettiin 70 % etanoliin. Ennen parafiiniin (Parawax) valamista näytteistä poistettiin vesi tertiäributanolisarjan avulla. Valun jälkeen silmut leikattiin pitkittäin 10 μm :n vahvuiseksi. Keskimmainen silmunkärkileike kiinnitettiin liimalla (Bostik:asetoni, 1:10) alumiiniselle näytealustalle, parafiini poistettiin ksyleenillä ja näytteen pintaan tyhjähöyrytetettiin 20 nm:n alumiinikalvo. Näytteistä analysoitiin röntgenmikroanalyysaattorilla fosfori, rikki ja kalsium. Analyysit tehtiin käyttäen 15 kV:n kiihdytysjännitettä, halkaisijaltaan n. 1 μm :n elektronisuihkua ja n. 0.01 μA :n suihkuvirtaa. Fosforin ja rikin $K\alpha$ -viivoille käytettiin RAP-kidettä ja kalsiumin $K\alpha$:lle PET-kidettä. $K\alpha$ -viivojen intensiteetit rekisteröitiin piirturipaperille. Jokaisen analyysin yhteydessä määritettiin taustan intensiteetti.

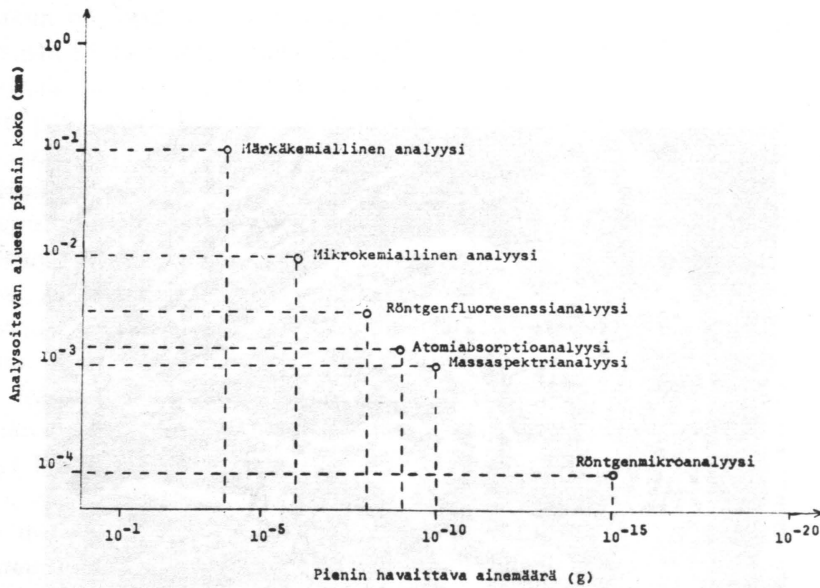
Tutkittavien aineiden kiinnittymistä solukoihin selvitettiin pesemällä joitakin näytteitä useita kertoja vedellä ja analysoimalla ne tämän jälkeen sekä analysoimalla muutamia kryostaattitekniikalla tehtyjä rinnakkaisnäytteitä.



Kuva 3. Sekundäärielektronien avulla muodostettu kuva männyn silmun kärjestä, näyte kerätty 21. 2. —73. Viivat osoittavat tehtyjen viiva-analyysien linjoja, ajot ylittävät korpuksen ja osan ydintä.

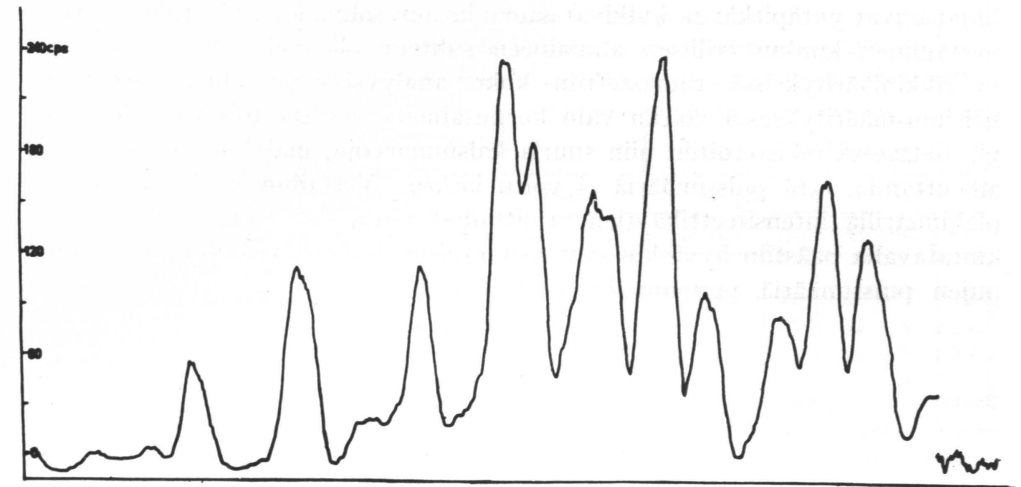
2.2. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Lepotilassa olevan männyn silmussa kärki on matalan holvimainen, joskin mittasuhteet vaihtelevat (TEPPER 1963). Silmun kärki muodostuu paljaasta korpuksesta, vaippamainen kerros puuttuu (CLOWES 1961, ROMBERGER 1963). Kärjen meristemaattisella alueella ei tämän mukaan siis olisi erilaistumista. Kuitenkin meristeemisoluissa on havaittu eroja koon, muodon ja sisällön suhteen ja tämän mukaan kärki on jaettu vyöhykkeisiin (SACHER 1954, HANAWA 1966). Vyöhykkeisyyttä on havaittu myös monissa histokemiallisissa tutkimuksissa (Esim. VANDEN BORN 1963, FOSKET ja MIKSCH 1966, RIDING ja GIFFORD 1973). Korpuksen alapuolella varressa on suu-rempisoluinen ydin. Röntgenmikroanalyysejä varten valmistetuissa näytteissä ei RMA:n valomikroskoopeilla kyetty selvästi erottamaan korpuksen eri vyöhykkeitä, sensijaan korpuksen ja ytimen raja näkyi paremmin. Sekundäärielektronikuvissa saattoi vyöhykerajojakin havaita (kuva 3).



Kuva 4. Erilaisilla analyysimenetelmillä saavutettavat herkkyudet ja erotuskyvyt.

Määritettäessä tässä työssä fosforin, rikin ja kalsiumin esiintymistä männyn silmujen kärkiosissa tehtiin kustakin silmusta kolme viiva-analyysiä kuvan 3 osoittamalla tavalla. Analyysit alkoivat korpuksen pinnalta ja jatkuivat jonkin matkan ytimen puolelle. Kuvassa 5 on esitetty esimerkki tuloksista, kuva esittää eräässä fosforianalyysissä saadun röntgenviivan in-



Kuva 5. Fosforin K α -viivan intensiteettikäyrä kuvassa 3 esitetyn männyn silmun yhden viiva-analyysin tuloksena. Oikealla alhaalla tausta.

tensiteetin vaihtelua. Viiva-analyysin tuloksena saatu intensiteettikäyrä ei suoraan osoita mitattavan aineen pitoisuuksien vaihtelua materiaalissa, sillä käyrän muotoon vaikuttavat osaltaan näytteen tiheys- ja topografia-vaihtelut. Kuitenkin samassa solukossa ja samalla menetelmällä valmistetuissa näytteissä kaksi viimeainittua tekijää antavat eri analyyseissä samansuuntaisen virheen, jonka vaikutus näinollen osin korjaantuu.

Analyysien tuloksia tarkastettaessa määritettiin ensin selvästi erotettavien huippujen osoittamat pulssimäärät. Laskemalla nämä yhteen yhden analyysiviivan osalta saatiin arvo, joka osoittaa alkuaineen suhteellista määrää ajon kohdalla (taulukko 1). Koska taulukkoon tulostetut analyysi-

Taulukko 1. Lepoaikaisen männyn silmun kärkiosan yli ajettujen fosforin, rikin ja kalsiumin viiva-analyysien tulokset tulkittuina siten, että kultakin käyrältä on laskettu yhteen huippujen pulssimäärät (pulssi/s.), taustan intensiteetti vähennettynä. Esitetyt arvot ovat kolmen rinnakkaisanalyysin keskiarvoja.

Silmu	Keräysaika	P	S	Ca (korpus)
I	7. 11. -72	804 \pm 75	303 \pm 60	95 \pm 22
II	18. 12. -72	705 \pm 36	526 \pm 55	203 \pm 19
III	18. 12. -72	869 \pm 95	707 \pm 51	139 \pm 18
IV	21. 2. -73	980 \pm 177	463 \pm 18	102 \pm 14
V	21. 2. -73	891 \pm 98	623 \pm 22	109 \pm 10

linjat olivat yhtäpitkät ja kulkivat samanlaisten solukoiden yli, tulosten rinnastaminen kunkin erillisen alkuaineen suhteen oli mahdollista. Fosfori- ja rikkimäärityksissä rinnastettiin koko analyysiviivan alue. Sensijaan kalsium-määrityksessä voitiin vain korpusalueita verrata toisiinsa. Ytimen yli ajettaessa rekisteröitiin niin suuria kalsiumarvoja, mahdollisesti kiteiden aiheuttamia, että pulssimääriä ei voitu laskea. Vertailun vuoksi mitattiin planimetrillä intensiteettikäyrien rajoittamat pinta-alat. Tällä tulostentulkintatavalla päästiin hyvinkin samansuuntaisiin loppupäätelmiin kuin huippujen pulssimääriä vertaamalla (taulukko 2).

Taulukko 2. Lepoaikaisen männyn silmun kärkiosan yli ajettujen fosforin, rikin ja kalsiumin viiva-analyysien tulokset tulkittuina siten, että käyrän rajaama pinta-ala on mitattu planimetrillä. Esitetyt arvot ovat kolmen rinnakkaisajon keskiarvoja.

Silmu	Keräysaika	P	S	Ca (korpus)
I	7. 11. -72	165 ± 8	170 ± 10	64 ± 16
II	18. 12. -72	137 ± 11	340 ± 19	102 ± 10
III	18. 12. -72	168 ± 7	399 ± 45	74 ± 2
IV	21. 2. -73	220 ± 30	384 ± 26	80 ± 10
V	21. 2. -73	212 ± 24	479 ± 27	83 ± 12

Taulukot 1 ja 2 viittaavat siihen, että fosforin, rikin ja kalsiumin esiintymisissä ei marras—helmikuun välisenä aikana tapahdu kovinkaan suuria muutoksia. Rinnakkaisanalyysien kohtalaisen suuri vaihtelu aiheuttaa sen, että tutkittu materiaali ei ole riittävä pitävien johtopäätösten tekemiseen. Taulukoiden avulla onkin lähinnä tarkoitus esittää, millä tarkkuudella menetelmä on käyttökelpoinen tämäläpöisessä tutkimuksessa.

Toinen tapa analyysitulosten tulkinnassa on verrata eri viiva-analyysien suurimpien intensiteettihiippujen keskiarvoja toisiinsa. Tulokset osoittavat tällöin korkeimpia tutkittavan aineen pitoisuuksia materiaalissa. Tällöinkin on otettava huomioon, että materiaalitiheyksien on oltava samankaltaiset, muuten ne vaikuttavat tulostasoihin. Taulukossa 3 on esitetty tuloksia, joissa on käytetty viimeksimainittua tulkintatapaa. Taulukossa on fosfori- ja rikkimääritysten Ka-viivojen intensiteettihiippujen keskiarvot esitetty erikseen korpuksen ja ytimen alueilla. Kummankin alkuaineen arvoja voidaan verrata joko korpuksen tai ytimen alueilla, mutta korpuksen ja ytimen arvot eivät ole suoraan verrattavissa keskenään solukoiden tiheys- ja topografiaerojen vuoksi. Kuitenkin taulukossa 3 esitetyt havainnot, joiden mukaan fosforiarvot ovat korpusalueella n. kaksi kertaa suuremmat kuin yti-

Taulukko 3. Männyn silmun kärkiosan yli ajettujen fosforin ja rikin viiva-analyysien tulokset tulkittuina siten, että kultakin analyysikäyrältä on määrätty huippujen pulssimäärä (pulssi/s.). Esitetyt arvot osoittavat kolmen rinnakkaisajon huippujen keskiarvoja ja huippujen lukumäärää.

Silmu	Keräyspäivä	Fosfori				Rikki			
		korpus		ydin		korpus		ydin	
		pulssi/s	(n)	pulssi/s	(n)	pulssi/s	(n)	pulssi/s	(n)
I	7. 11. -72	109 ± 8	18	56 ± 20	8	28 ± 2	16	20 ± 2	13
II	18. 12. -72	96 ± 11	19	33 ± 14	10	49 ± 3	21	42 ± 4	13
III	18. 12. -72	110 ± 16	16	55 ± 13	13	53 ± 2	23	61 ± 6	15
IV	21. 2. -73	128 ± 12	21	35 ± 13	7	51 ± 2	19	38 ± 4	11
V	21. 2. -73	131 ± 4	15	55 ± 10	13	58 ± 3	17	58 ± 5	15

men alueella kun taas rikkiarvot ovat lähes samat molemmissa soluissa, viittaavat siihen, että fosfori saattaa esiintyä korpuksessa suuremmissa pitoisuuksissa kuin ytimen alueella.

Näytteenvalmistuksessa kryostaattimenetelmää pidetään parafiinimenetelmää luotettavampana, koska alkuaineiden ei tällöin oleteta liikkuvan paikaltaan näytteenvalmistuksen aikana. Menetelmä on kuitenkin parafiinimenetelmää hankalampi, mm. sen vuoksi, että suurempaa näytettä on vaikea kunnollisesti oikaista alustalle. Julkaistut tiedot kryostaattimenetelmällä valmistetusta materiaalista ovatkin yleensä yhden tai muutaman solun levyisiltä alueilta. Männynsilmuissa ei kryostaattimenetelmän ja parafiinimenetelmän välillä ole kovin suurta eroa, kun kyseessä on fosforimääritys lepotilassa olevassa materiaalissa (taulukko 4). Kryostaattinäytteiden peseminen vedellä ennen määrittysten tekemistä ei myöskään alenna fosforin intensiteettihiippujen korkeutta, mikä viittaa melko kiinteään fosforin sitoutumiseen materiaalissa.

Taulukko 4. Männyn silmun kärkisolujen yli ajettujen fosforin viiva-analyysien tulokset. Näytteet on tehty joko kryostaattimenetelmällä (keräyspäivä 25. 2. -72) tai parafiinimenetelmällä (keräyspäivä 21. 2. -73). Luvut osoittavat kustakin silmusta tehtyjen kahden (kryostaattimenetelmä) tai kolmen (parafiinimenetelmä) rinnakkaisen viiva-analyysin huippujen keskiarvoja. Analyysit tehty korpuksen alueelta.

Kryostaattimenetelmä			Parafiinimenetelmä		
Silmu	pulssi/s	(n)	Silmu	pulssi/s	(n)
I	128 ± 15	10	I	128 ± 12	21
II	163 ± 10	10	II	131 ± 4	15

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, millä tasolla mitattavien alkuaineiden suhteelliset määrät tai pitoisuudet vaihtelevat talvisaikaisessa männynsilmutermateriaalissa. Morfologisestihan silmut ovat levossa sinä aikana, jolloin keräykset on tehty. Aikaisempien tutkimustemme mukaan mittoosit silmun kärjessä päättyvät lokakuussa ja vaikka fysiologinen herääminen kärkisilmuissa tapahtuu huhtikuun puolivälissä, silmujen kärjet aktivoituvat tätä myöhemmin (KUPILA-AHVENNIEMI 1966, 1970). Työhypoteesina on ollut ajatus, että ellei vaihtelu tutkittavien aineiden suhteellisissa pitoisuuksissa lepoajan kuluessa ole kovin suuri, menetelmän avulla saatetaan ryhtyä tutkimaan kasvun alkamista edeltäviä fysiologisia muutoksia. Tähän mennessä tehdyn työn arvo on siinä, että on voitettu monia menetelmällisiä vaikeuksia ja todettu röntgenmikroanalyysi mahdolliseksi kyseessä olevaan tutkimukseen. Samalla on havaittu, että vaikka lepotilan kuluessa ei mitattujen aineiden siirtymisessä ehkä tapahdu kovin suuria muutoksia, rinnakkaisnäytteitä on kerättävä ja tutkittava riittävästi tilastollista käsittelyä varten ennen kuin pitäviä johtopäätöksiä voidaan tehdä.

3. RÖNTGENMIKROANALYYSIMENETELMÄN KÄYTTÖKELPOISUUS KASVI-MATERIAALIN JA ERITYISESTI METSÄPUIDEN TUTKIMUKSESSA

Röntgenmikroanalyyssi on kehitetty ja sitä käytetään suuressa määrin metallien, mineraalien ym. koostumuksen tutkimiseen. Biologiset sovellutukset ovat kohtalaisen uusia, menetelmää alettiin ensin käyttää luututkimuksissa. Kasvimateriaalilla tutkimus liikkuu edelleen suuresti menetelmien kehittämisen tasolla, vaikeuksia on niin hyvin näytteen valmistuksessa kuin tulosten analysoinnissa. Mitattavan alkuaineen röntgeniivian intensiteetti vaikuttaa ko. aineen pitoisuuden ohella mm. näytteen epätasaisuudet, tiheyserot, muiden aineiden pitoisuusvaihtelut ja leikkeen paksuus. Menetelmän etuna on kuitenkin se, että analyysi voidaan tehdä erittäin pienestä näytetilavuudesta ja alkuaineet voidaan paikallistaa solukko-, harvemmassa solukossa solukohtaisesti. Elektronimikroskoopiin liitetyillä laitteilla voidaan tutkia myös solun eri osia. Röntgenmikroanalyysi täydentää täten esim. autoradiografian ja histokemian avulla saatuja tietoja alkuaineiden esiintymisestä eri kasvosissa.

Röntgenmikroanalyysiä on toistaiseksi kasvitutkimuksissa käytetty suhteellisen vähän. Kokeita on tehty pääasiassa erilaisilla ruohokasveilla, kuten maissilla (RASMUSSEN ym. 1968, LÄUCHLI ym. 1970), jolla on tutkittu eräiden alkuaineiden jakaantumista eri kasvosiin, sekä erällä viljakasveilla ja Equisetumilla (KAUFMAN ym. 1969, 1971, 1972, SONI ym. 1970, 1972), joilla on lähinnä tutkittu piin kertymistä erityyppisiin päällysketosolukon soluihin. SAWHNEY ja ZELITCH (1969) sekä HUMBLE ja RASCHKE (1971) ovat kiin-

nittäneet huomiota kaliumin merkitykseen ilmarakojen aukenemisessa ja KUPILA-AHVENNIEMI ym. (1973) kalsiumin suhteellisiin pitoisuuksiin haa-voitetuissa härkäpavun nivelväleissä. BAJAJ ym. (1971) puolestaan ovat kiinnittäneet erityistä huomiota pavun tumien alkuainekoostumukseen.

Mänty on tätä ennen ollut koeobjektina röntgenmikroanalyysitekniikkaa käytettäessä tiittävästi vain HUTTUSEN (1973) työssä, jossa hän on todennut menetelmän käyttökelpoiseksi puiden saastumisasteen osoittajana. Huttusen mukaan saastuneilta alueilta kerätyissä neulasnäytteissä voitiin osoittaa olevan huomattavasti enemmän rikkiä ja klooria kuin vastaavissa saastumattomilta alueilta kerätyissä näytteissä. Metsätieteellisiä tutkimuksia ajatellen voidaan röntgenmikroanalyysiä lisäksi pitää käyttökelpoisena esim. tutkittaessa lannoitteiden kertymistä eri kasvosiin samoin kuin ulkoisten tekijöiden vaikutusta tähän kertymiseen. Saastumistarkkailun lisäksi tekniikka voidaan ilmeisesti käyttää muidenkin patologisten tilojen tarkkailussa ja selvittämisessä. Myöskin vuosirytmisiä tutkittaessa saatetaan seurata eri kasvosien alkuainepitoisuuksia ja niissä mahdollisesti esiintyviä vaihte-
luita.

KIRJALLISUUS

- BAJAJ, Y. P. S., RASMUSSEN, H. P. & ADAMS, M. W. 1971. Electron-microprobe analysis of isolated plant cells. *J. Exp. Bot.* 22, 749–752.
- CLOWES, F. A. L. 1961. Apical meristems. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- FOSKET, D. E. & MIKSCH, J. P. 1966. A histochemical study of the seedling shoot apical meristem of *Pinus lambertiana*. *Am. J. Bot.* 53, 694–702.
- HALL, T. A., HALE, A. J. & SWITSUR, V. R. 1966. Some applications of microprobe analysis in biology and medicine. In *The electron microprobe*, Mc Kinley, T. D., Heinrich, K. F. J., Wittry, D. B., eds., New York. John Wiley and Sons.
- HALL, T. A. & HÖHLING, H. J. 1969. The Application of Microprobe Analysis to Biology. *Vth int. congress on x-ray optics and microanalysis*. Möllenstedt, G. and Gaukler, K. H. eds., Springer Verlag. Berlin–Heidelberg, New York.
- HANAWA, J. 1966. Growth and development in the shoot apex of *Pinus densiflora* I. Growth periodicity and structure of the terminal vegetative shoot apex. *Bot. Mag. Tokyo* 79, 736–746.
- HUMBLE, G. D. & RASCHKE, K. 1971. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe analysis. *Plant Physiol.* 48, 447–453.
- HUTTUNEN, S. 1973. Studies on tree damage due to air pollution in Oulu: The toxins contained in pine needles as assayed by a microanalyzer. *Aquilo, Ser. Bot.* 12, 1–11.
- KAUFMAN, P. B., BIGELOW, W. C., PETERING, L. B. & DROGOS, F. B. 1969. Silica in developing epidermal cell of *Avena internodes*. *Electron microprobe analysis. Science* 166, 1015–1017.
- » — BIGELOW, W. C., SCHMID, R. & GHOSHEH, N. S. 1971. Electron microprobe analysis of silicon in epidermal cells of *Equisetum*. *Am. J. Bot.* 58, 309–316.
- » — SONI, S. L., LACROIX, J. D., ROSEN, J. I. & BIGELOW, W. C. 1972. Electron probe

- microanalysis of silicon in the epidermis of rice (*Oryza sativa* L.) internodes. *Planta* (Berlin) 104, 10–17.
- KUPILA-AHVENNIEMI, S. 1966. Physiological and morphological study on the vegetative and floral primordia of the Scotch Pine during the dormancy and the period of bud enlargement. *Aquilo*, Ser. Bot. 4, 59–79.
- » — 1970. Morphogenesis and nucleic acid content of developing vegetative and floral primordia of the Scots Pine. Proc. of IUFRO Section 22 Working Group on Sexual Reproduction of Forest Trees. II 9 s.
- » — KARJALAINEN, L. & KAUPPI, A. 1973. Electron probe x-ray microanalyser studies on cell wall calcium in wounded *Vicia faba* internodes. *Ann. Bot. Fennici* 10, 97–101.
- LÄUCHLI, A., SPURR, A. R. & WITTKOPP, R. W. 1970. Electron probe analysis of freeze-substituted, epoxy resin embedded tissue for ion transport studies in plants. *Planta* (Berlin) 95, 341–350.
- RASMUSSEN, H. P., SHULL, V. E. & DRYER, H. T. 1968. Determination of Element Localization in Plant Tissue with the Microprobe. *Devel. Appl. Spectroscopy* 6, 29–42.
- RIDING, R. T. & GIFFORD, E. M. Jr. 1973. Histochemical changes occurring at the seedling shoot apex of *Pinus radiata*. *Can. J. Bot.* 51, 501–512.
- ROMBERGER, J. A. 1963. Meristems, growth, and development in woody plants. *Techn. Bull.* 1293. U.S. Dept. Agric. Forest Service.
- SACHER, J. A. 1954. Structure and seasonal activity of the shoot apices of *Pinus lambertiana* and *Pinus ponderosa*. *Am. J. Bot.* 41, 749–759.
- SAWHNEY, B. L. & ZELITCH, I. 1969. Direct determination of potassium ion accumulation in guard cells in relation to stomatal opening in light. *Plant Physiol.* 44, 1350–1354.
- SONI, S. L., KAUFMAN, P. B. & BIGELOW, W. C. 1970. Electron microprobe analysis of the distribution of silicon in leaf epidermal cells of oat plant. *Phytomorphol.* 20, 350–363.
- » — 1972. Electron probe analysis of silicon and other elements in leaf epidermal cells of the rice plant (*Oryza sativa* L.) *Am. J. Bot.* 59, 38–42.
- TEPPER, H. B. 1963. Dimensional and zonal variation in dormant shoot apices of *Pinus ponderosa*. *Am. J. Bot.* 50, 589–596.
- VANDEN BORN, W. H. 1963. Histochemical studies of enzyme distribution in shoot tips of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss). *Can. J. Bot.* 41, 1509–1527.

SUMMARY:

EXPERIMENTS ON THE DETERMINATION OF CERTAIN ELEMENTS IN THE BUDS OF THE SCOTS PINE BY MEANS OF THE ELECTRON PROBE X-RAY MICROANALYSER

An electron probe X-ray microanalyser was used to study the occurrence of phosphorus, sulphur and calcium in the bud apices of dormant Scots pine. The material was collected during the winter months (November–February), fixed in Carnoy's fluid, dehydrated, and mounted in paraffin wax. Of the 10 µm longitudinal section, the ones containing the middle portion of the apices were glued to the specimen supports and vacuum coated with aluminium. Three parallel line analyses were run over the corpus and the uppermost portion of the pith. Results obtained so far suggest that no marked changes occur in the position and level of the three elements during the study period.

In comparison with other methods, the usefulness of X-ray microanalysis lies in the fact that only small volumes of material are required. Consequently, it is possible to localise in the tissue the sites in which certain elements occur in highest concentrations. It is also possible to compare the relative amounts of an element in separate samples.

X-ray microanalysis has relatively recently been introduced in the study of plant material and until the present investigation the paper of HUTTUNEN (1973) was the only one containing information on pine trees obtained by this method. Work on the procedure involved is therefore necessary and the present paper deals mainly with this aspect. Both the preparation of the samples and the interpretation of the results are experimented with and discussed. The operation of the X-ray microanalyser of the Department of Electron Optics of the University of Oulu is also described.

In her paper, HUTTUNEN (o.c.) showed the usefulness of the X-ray micro-analytical technic for the study of the effect of air pollution on pine trees. Other lines of investigation connected with silviculture in which this technic could give valuable information are, for example, the uptake and storage of fertilizers, the possible annual rhythm in the distribution of elements in different plant parts, and the excess or lack of specific elements in diseased tissues.