
**SUOMEN LUONNONVARAISTEN SANIAISTEN
MIKROLISÄYS**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Puutarhatalouden koulutusohjelma

Lepaa, 20.12.2012

Satu Dahl



LEPAA
Puutarhatalouden koulutusohjelma

Tekijä	Satu Dahl	Vuosi 2012
Työn nimi	Suomen luonnonvaraisten saniaisten mikrolisäys	

TIIVISTELMÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli löytää sopiva sterilointimenetelmä ja aloitusalus kivikkoalvejuurelle (*Dryopteris filix-mas*) ja metsäimarteelle (*Gymnocarpium dryopteris*). Nämä saniaiset kasvavat Suomessa luonnonvaraisena ja niitä on alettu käyttämään puutarhakasveina. Työntilajana oli Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikön mikrolisäyslaboratorio. Työ toteutettiin toimeksiantajan tiloissa Lepaalla syksyllä 2011.

Saniaisten mikrolisäämistä on tutkittu kauan, mutta suomalaisten luonnonvaraisten saniaisten mikrolisäyksestä ei löytynyt tietoa. Joten lähteinä käytettiin ulkomailla tehtyjä tutkimuksia saniaisten mikrolisäämisestä maavarresta ja itiöistä.

Lisäysmateriaalina käytettiin kivikkoalvejuuren ja metsäimarteen maavarsia. Itiöitä ei ollut enää mahdollista kerätä kun työ aloitettiin lokakuussa, joten työssä keskityttiin saniaisten mikrolisäämiseen maavarsista.

Kivikkoalvejuuren maavarret sterilisoitiin kahteen kertaan natriumhypokloriitilla, jonka vahvuus oli 1–1,5 %, lisäksi tehtiin Etax A 12 -käsittely. Metsäimarteen maavarret sterilisoitiin kertaalleen natriumhypokloriitissa, jonka vahvuus oli 1 %, Etax A 12 -käsittelyä ei tehty.

Aloitusaluslana käytettiin kolmea erilaista ½ MFMM-alustaa. Yhteen oli lisätty aktiivihiihtä 1 g/l. Toiseen lisättiin askorbiinihappoa 30 g/l ja aktiivihiihtä 1 g/l. Kolmannessa alustassa ei ollut aktiivihiihtä vaan sokerin määrää lisättiin 30g /l. Kaikissa alustoissa käytettiin kasvihormoneita, kinetiiniä (KIN) 8 mg/l ja naftaleenietikkahappoa (NAA) 0,5 mg/l.

Aloituksista onnistui vain yksi kaikista 99 aloituspalasta. Kasvuun lähtenyt maavarren pala oli metsäimarre. Tulosten perusteella voidaan todeta, etteivät saniaiset ole helppoja lisätä maavarresta, koska niitä on vaikea sterilisoida. Saniaisten lisäämistä itiöistä kannattaa kokeilla.

Avainsanat Mikrolisäys, saniainen, *Dryopteris filix-mas*, *Gymnocarpium dryopteris*, sterilointi.

Sivut 22 s. + liitteet 10 s.

The Lepaa
Degree programme in Horticulture

Author	Satu Dahl	Year 2012
Subject of Bachelor's thesis	Micropropagation of Finnish Natural Ferns	

ABSTRACT

The purposes of this thesis was to find a suitable sterilization method and to create a suitable nutrient medium for the male fern (*Dryopteris filix-mas*) and the oak fern (*Gymnocarpium dryopteris*). These ferns grow naturally in Finland and their use as garden plants has begun. The work was commissioned by the micropropagation laboratory of the Lepaa unit at HAMK University of Applied Sciences in the autumn of 2011.

The micropropagation of ferns has been studied for a long time. The information of the micropropagation of Finnish natural ferns has not been found. So the sources used mainly studies abroad the micropropagation of ferns rhizomes and spores.

Male fern and oak fern rhizomes were used for the propagation. Spores were no longer possible to collect when the work was started in October, so the work was focused on the fern rhizomes micropropagation.

The rhizomes of the male fern were sterilized twice sodium hypo-chloride having a thickness of 1 - 1.5%, there was also an Etax A12 treatment. The rhizomes of the oak fern were sterilized once with sodium hypochlorite having a strength of 1%, Etax A 12 treatment not being done.

Three different types of ½ MFMM platform were used as media. 1 g / l of active carbon was added to one of them, to another ascorbic acid was added 30 g / l and 1 g/l of activated carbon medium, and one had not activated carbon, but the amount of sugar was added to 30 g / l. In all trays growth hormones, KIN 8 mg / l, and NAA 0.5 mg / l was used.

Since inception managed only 1 of total 99. Growth had gone outwards from a piece of oak fern. It can therefore be conclude that the ferns are not easy to propagate from rhizomes, because they are difficult to sterilize. Propagating ferns from spores would be worth trying.

Keywords Micropropagation, fern, *Dryopteris filix-mas*, *Gymnocarpium dryopteris*, sterilization.

Pages 22 p. + appendices 10 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	SANIKKAISET.....	2
2.1	Saniaiset	3
2.2	Alvejuuret.....	3
2.3	Metsäimarteet	4
3	SANIAISSTEN MIKROLISÄYS	5
3.1	Saniaisten mikrolisäys maavarresta	5
3.2	Saniaisten mikrolisäys itiöistä.....	6
4	AINEISTO JA MENETELMÄT.....	8
4.1	Aloituspohjat.....	9
4.2	Sterilointimenetelmät	10
4.3	Aloitusalustat.....	12
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	14
5.1	Kivikkoalvejuuren tulokset	14
5.2	Metsäimarteen tulokset	16
5.3	Tulosten tarkastelu	17
6	POHDINTAA.....	19
	LÄHTEET	21

Liite 1 Aloituskuvat
Liite 2 Aloituskuvat

1 JOHDANTO

Mikrolisäyksellä voidaan siirtää emokasvin ominaisuudet muuttumattomana uusiin kasviyksilöihin, jolloin uudet kasviyksilöt ovat perimältään emokasvin kaltaisia (Haapala & Niskanen 1992, 22). Saniaisten mikrolisäykseen haluttiin tiettyä kantaa olevia saniaisia. Työn tilaajana ollut taimisto toimitti haluamansa aloitusmateriaalin. Työn tilannut taimisto pysyy nimettömänä ja näin ollen työntilajaksi on työssä merkitty Lepaan mikrolisäyslaboratorio.

Mikrolisäyksen etuja ovat nopeus, tilaa ei tarvita yhtä paljon kuin pistokaslisäyksessä sekä aloitusaloilla olevia kasveja ei tarvitse hoitaa ennen kuin ne siirretään seuraavalle kasvatusalustalle. Mikrolisäyksen avulla kasveja voidaan lisätä vuodenajasta riippumatta, sekä ne voidaan tuottaa taimiksi haluttuna ajankohtana, sillä viljelmiä voidaan varastoida ja säilyttää jääkaappilämpötilassa useita kuukausia. (Haapala & Niskanen 1992, 28.)

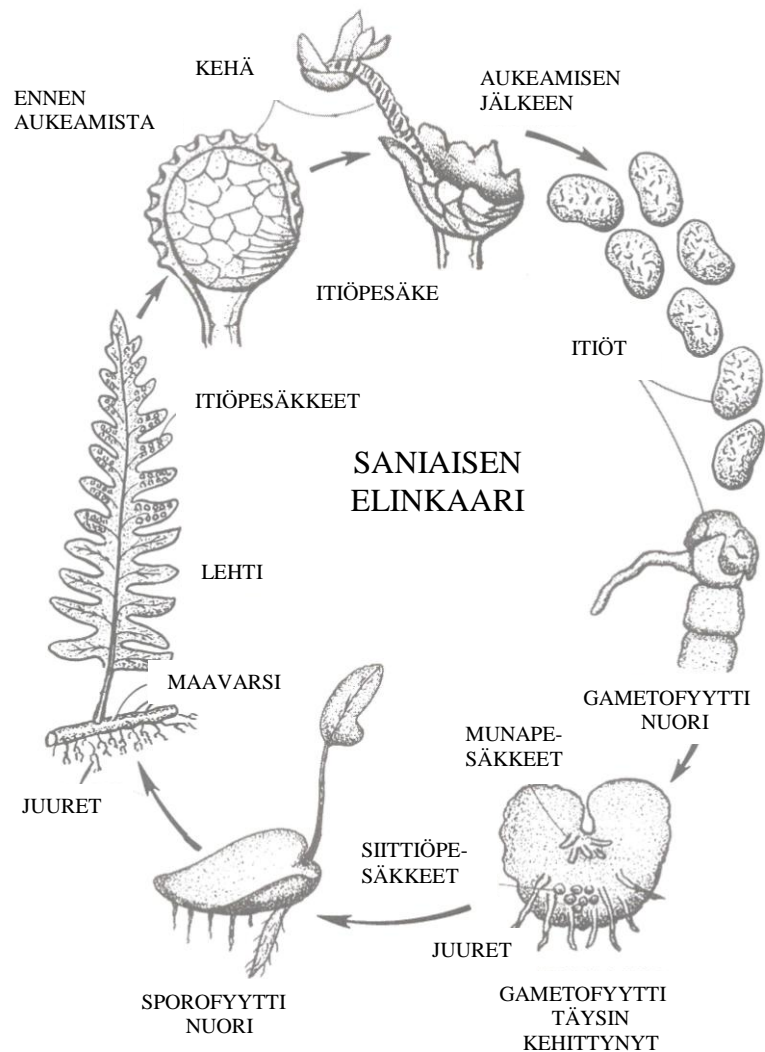
Saniaiset ovat ulkomailla suosittuja varjopaikkojen perennoja, joiden liuskoittuneet ja koristeelliset lehdet antavat niille käyttöarvon puutarhakasveina. Suurin osa saniaisista viihtyy varjossa, mutta on muutamia lajeja jotka viihtyvät kallioilla, kivillä ja jopa paahteessa. Saniaiset ovat luonnonperennoja eivätkä vaadi juuri mitään hoitoa puutarhassa, mutta niiden kasvupaikkavaatimukset tulee ottaa tarkkaan huomioon puutarhaan istutettaessa. (Alanko 2007, 432.) Kivikkoalvejuuren lisääminen taimistoilla on kannattavaa sen kasvupaikkavaatimusten ja myös sen koristearvon vuoksi.

Saniaisia voidaan lisätä jakamalla, kun kyseessä on rönsyllä lisääntyvät lajit, kuten metsäimarre. Saniaisia voidaan lisätä myös itiöistä, mutta ne itävät hitaasti ja kylvökset eivät saa kuivahtaa välillä, joidenkin saniaisten itämistä voidaan joutua odottamaan useita vuosia. (Alanko 2007, 432–433.)

Työn tarkoituksena oli löytää kivikkoalvejuurelle ja metsäimarteelle sovelia sterilointimenetelmä sekä aloitusaloista. Sterilointimenetelmiä kokeiltiin kivikkoalvejuurelle kolme erilaista ja metsäimarteelle kokeiltiin neljää eri sterilointimenetelmää. Aloitusaloja tehtiin kolme erilaista, kahteen aloitusaloistaan lisättiin aktiivihieletä ja yhteen lisättiin sokerin määrää saniaisten ravinnoksi.

2 SANIKKAISET

Sanikkaiset (*Pteridohyta*) lisääntyvät itiöiden avulla, mutta niillä on putki-
lot veden kuljettamiseen. Sukupolvia on kaksi erilaista, jotka vuorottele-
vat. Haploidi suvullinen sukupolvi eli gametofyytti, sekä diploidi suvuton
sukupolvi eli sporofyytti (Kuva 1). Gametofyytti eli alkeisvarsikko kasvaa
itiöistä ja sen pinnalla ovat muna- ja siittiöpesäkkeet. Alkeisvarsikko on
lyhytikäinen ja pieni. Sporofyytti on erilaistunut juuriksi, varreksi sekä
lehdiksi ja se on ruohomainen ja monivuotinen kasvi. Haploideja itiöitä
muodostuu itiölehtien pinnalla olevissa itiöpesäkkeissä. Varsinainen sa-
nikkainen kasvaa hedelmöittyneestä munasolusta, joka on uusi itiöllä li-
sääntyvä sukupolvi. (Mossberg & Stenberg 2006, 34; Hämet-Ahti, Suomi-
nen, Ulvinen & Uotila, 1998, 35.)



Kuva 1. Sanikkaisten lisääntyminen itiöiden avulla, jossa vuorottelevat suvullinen su-
kupuolvi sekä suvuton sukupuolvi. Kuvassa kuvattu saniaisen elinkaari (Kuva-
lähde: Foster 1993, 7).

2.1 Saniaiset

Saniaiset (*Pteropsida*) ovat yhtäläisitiöllisiä sanikkaisia, maavarrellisia ja monivuotisia. Yhtäläisitiöisillä sanikkaisilla on samankokoiset itiöt, kun taas eriläisitiöisillä sanikkaisilla on iso- ja pikkuitiöitä. Saniaisilla on yksikotinen alkeisvarsikko, joka kasvaa yhtäläisitiöstä, ja siinä on sekä muna- että siittiöpesäkkeitä. Yhtäläisitiöstä kasvanut alkeisvarsikko on itsenäinen, lyhytikäinen, rihmamainen, levymäinen tai mukulamainen ja se on tavallisesti pieni, lehtivihreällinen tai lehtivihreätön, se voi olla maansisäinen tai maanpäällinen. Saniaisten alkeisvarsikko on yksikotinen, tavallisesti maanpäällinen, levymäinen ja vihreä. Se on harvoin maansisäinen ja mukulamainen. (Hämet-Ahti ym., 1998, 45.)

2.2 Alvejuuret

Alvejuuret (*Dryopteris*) ovat enimmäkseen kookkaita saniaisia, mätästäviä – ruusukkeellisia. Maavarsi on usein liuskaisten suomujen peitossa, se on lyhyt ja pysty tai vaakasuora. Itiöpesäkeryhmät ovat pyöreitä ja sen katesuomut ovat munuaismaiset ja pysyvät. (Mossberg & Stenberg 2006, 56; Hämet-Ahti, ym. 1998,49)

Alvejuuret viihtyvät metsissä, pelloilla ja kosteilla alueilla, Euroopassa, Japanissa ja Yhdysvaltojen itäosissa. Sukuun kuuluu noin 255 lajia, mutta useimmat lajit viihtyvät lauhkeilla vyöhykkeillä. (Hoshizaki & Moran 2001, 296–297.) Alvejuurien tieteellinen nimi tulee kreikankielestä, *drys* eli tammi ja *pteron* eli siipi. Nimi kuvaa lehdyköiden muotoa. Antiikin kreikkalaiset käyttivät sanaa *pteris* kaikista saniaisista.(Hardyfernlirary n.d.). Alvejuuria käytetään puutarhoissa rajaamaan alueita, sekä taustakasveina. Alvejuuren paikalleen kuihtuvat lehdet eivät välttämättä menetä lehtivihreäänsä. Kylmän ilmaston alvejuuret eivät sopeudu lämpimään ilmastoon. Alvejuuria voidaan lisätä itiöistä ja jakamalla, sivuhaaroista maavarren tyveltä. (Hoshizaki & Moran 2001, 296–297.)

Kivikkoalvejuuri (*Dryopteris filix-mas*) on kotoisin Pohjois-Amerikasta ja Euroopasta. Se on 25–120 senttimetriä korkea saniaisen, joka viihtyy puolivarjossa, kivikkoisissa lehdoissa, lehtokallioilla, kalliohyllyillä, kivikasoissa, jyrkänteillä ja muureilla. Kivikkoalvejuuri on luonnonristeymä, mutta silti hedelmällinen, *Dryopteris caucasica* x *Dryopteris oreades*. Kivikkoalvejuuresta on monia muunnelmia koristekäyttöön. (Hoshizaki & Moran 2001, 296–297.) Kivikkoalvejuurella on pitkät perinteet yrtilääketieteessä. Sitä on käytetty 300 eKr. lapamatojen häätöön, mutta väärä annostus oli todennäköisesti kuolemaksi. (Olsen 2007, 230.)

Kivikkoalvejuuren lehdet ovat kesävihantia, niiden ruoti on tanakka ja kellanruskea- tai vaaleanruskeasuomuinen. Lehtilapa on tummanvihreä, suikea ja keskeltä leveimmillään. Lehdykät ovat pyöreäkärkisiä, hammaslataisia ja niitä on 20–35 paria. Kivikkoalvejuuren itiöimisaika on heinä-syyskuussa. (Mossberg & Stenberg 2006, 56.)

2.3 Metsäimarteet

Metsäimarteet (*Gymnocarpium*) muodostavat kasvustoja jotka ovat melko pieniä ja hentoja. Niillä on suikertava, pitkä ja ohut maavarsi. Kolmiomaiset lehdet ovat huomiota herättävät. Itiöpesäkeryhmä on pyöreä ja katesuomuton. (Mossberg & Stenberg 2006, 54; Hämet-Ahti, ym. 1998,53.)

Metsäimarteet viihtyvät kosteissa, avoimissa metsiköissä ja ne muodostavat väljän aluskasvillisuuden lehdillään (Olsen 2007, 257). Tähän sukuun kuuluu viisi lajia ja ne ovat luonnonvaraisia Pohjois-Amerikassa, Euroopassa ja Aasiassa. Metsäimarteiden tieteellinen nimi tulee keikankielestä, *gymnos* eli alaston ja *karpos* eli hedelmä. Nimi viittaa itiöpesäkkeeseen jossa ei ole katesuomua. Metsäimarteita käytetään puutarhassa maanpeitekasveina. Sitä voidaan lisätä jakamalla ja itiöistä kasvattamalla. (Hoshizaki & Moran 2001, 334–335.)

Metsäimarre (*Gymnocarpium dryopteris*) on 10–40 senttimetriä korkea saniainen, joka on kotoisin Pohjois-Amerikasta, Euroopasta ja Aasiasta. Se viihtyy kosteissa kangasmetsissä, sekä lehdoissa, puronvarsilla, louhikoissa ja jyrkänteillä. (Mossberg & Stenberg 2006, 54; Hämet-Ahti, ym. 1998, 53; Hoshizaki & Moran 2001, 334–335 .)

Metsäimarteen lehdet ovat kolmiomaiset ja sen lehtiruoti on ohut, pitkä, hauras ja tummanruskea. Lehtilapa on kalju, nystytön, vaaleanvihreä, leveyttänsä pidempi ja vaakasuora, sekä kaksi kertaa parilehdykkinen. Metsäimarteen itiöimisaika on heinä-syyskuussa. Se on yleinen koko maassa. (Mossberg & Stenberg 2006, 54.)

3 SANIAISSTEN MIKROLISÄYS

Mikrolisäyksellä tuotetaan uusia kasveja aseptisissa olosuhteissa, esimerkiksi koeputkissa. Kaupallinen mikrolisääminen aloitettiin 1965 orkideoilla Yhdysvalloissa. Mikrolisäyksen osuus taimituotannossa on pieni verrattuna muihin lisäysmenetelmiin, kuten siemen- tai pistokaslisäykseen. Mikrolisättyjen taimien tuotanto on rajoitettua. Vaikka kysyntää on paljon, koska kustannukset ovat korkeat. (Hartman, Kester, Davies & Geneve 2011, 699.)

Monien kasvien kaupallisessa lisäämisessä mikrolisäyksestä on tullut tärkeää. Mikrolisäyksen etuja ovat taudinaiheuttajista vapaiden taimien tuottaminen, erityisten kloonien massatuotanto, perinnöllisesti samankaltaisten taimien tuottaminen, ympärivuotinen taimitarhatuotanto ja kloonien tuotanto sisäsiitoslinjaisten siemenien tuotannossa. (Hartman, ym. 2011, 699–701.)

Mikrolisäys mahdollistaa taudinaiheuttajien poistamisen taimesta. Lisäysaineistoa voidaan tuottaa ilman sieni-, bakteeri-, virus- ja virusten kaltaisia taudinaiheuttajia. Mikrolisäyksellä saatava massatuotanto on kannattavaa kun taimien tuottaminen on hidasta perinteisillä menetelmillä, uudella lajikkeella on suuri markkina-arvo, taimien tuottaminen on vaikeaa kasvullisesti tai kasvi on uhanalainen. Taimistot toimivat yleensä sesongin mukaan, mikrolisäyksellä taimistoista saadaan ympärivuoden toimivia, kun hiljaisina aikoina voidaan hyödyntää mikrolisäystä. (Hartman, ym. 2011, 700–701.)

Mikrolisäyksessä voidaan käyttää kinetiiniä, joka on synteettinen sytokiini. Kinetiini (KIN) yhdessä auksiinin ja gibberliinin kanssa edistää solujen jakautumista ja näin ollen kasvua. Kasvin luontaista sytokiiniä muodostuu jatkuvasti solukoissa, kuten lehdissä ja juurissa. Naftyylietikkahappo (NAA) on synteettisesti valmistettu auksiini, joka edesauttaa juurten muodostusta. Sitä käytetäänkin pistokkaiden juurrutukseen. (Pankakoski, 1994, 122–125; Zenkteler & Kwaśna, 2007, 81–86.)

3.1 Saniaisten mikrolisäys maavarresta

Saniaisten mikrolisääminen maavarresta on haasteellista niiden kasvutavan ja iän vuoksi. Lisäksi mikrolisäämisen onnistumista heikentävät sieni- ja bakteeritartunnat. Yleensä 85–90 prosenttia aloituspaloista saa sieni- tai bakteeri tartunnan ja 60–70 prosenttia muuttuu ruskeiksi, tämä tapahtuu pian sterilisoinnin ja aloitusalustalle pistämisen jälkeen. Siksi saniaisten juurakot tulisi esikäsitellä. (Zenkteler & Kwaśna, 2007, 81–86.)

Maavarret voidaan esikäsitellä pesemällä ne hanavedellä, ravistetaan 24 tuntia liuoksessa jossa on 150 mg/l nystatiinia (sieni-infektioiden hoitoon tarkoitettu lääke) johon on lisätty 0,25 ml Tween 20:a. Tämän jälkeen maavarret paloitellaan 5–10 senttimetrin paloiksi ja asetellaan kostutetulle

suodatinpaperille lasipurkkeihin. Lasipurkkeja pidettiin 18–20 asteen lämmössä 2–3 kuukautta pimeässä, jonka jälkeen maavarsia kasvatetaan jatkuvassa valossa, kunnes silmut työntyvät esiin. Tämän jälkeen maavarret steriloidaan uudestaan nystatiiniliuoksella, jonka jälkeen ne sterilisoidaan 5 minuuttia 0,2 prosenttisella elohopeakloridilla (HgCl_2), steriloinnin jälkeen maavarret huuhdotaan 3–5 kertaa steriilillä vedellä steriileissä oloissa ja pistetään aloitus-alustalle. (Zenkter & Kwa'sna, 2007, 81–86)

Esikäsittelemättömät saniaisten maavarren palat steriloidaan 0,5 prosenttiossa NaOCl -liuoksessa 20 minuutin ajan, huuhdellaan kolme kertaa steriilissä vedessä 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen maavarrenpalat laitetaan 95 prosenttiseen etanoliin 5 minuutin ajaksi ja huuhdellaan kolme kertaa steriilissä vedessä 5 minuutin ajan. Lisäksi maavarrenpalat käsitellään vielä 0,5 prosenttinen NaOCl -liuoksella, johon lisätty 0,03 prosenttia Tween 20:ta käsittelyaika 20 minuuttia, huuhdellaan 5 minuutin ajan steriilissä vedessä. (Chen & Read 1983, 266–269.)

Aloitusalustana voidaan käyttää $\frac{1}{2}$ MS-alustaa tai $\frac{1}{2}$ MFMM -alustaa, joka on kehitetty saniaisten lisäämiseen. MFMM -alustaan voidaan lisätä askorbiinihappoa maavarsista leikattujen palojen tummumista estämään. Lisäksi alustassa voidaan käyttää aktiivihiiltä saniaisten ravinnoksi. Alustassa voidaan myös käyttää kinetiiniä (KIN) ja naftyylietikkahappoa (NAA). (Zenkter & Kwa'sna, 2007, 81–86; Chen & Read 1983, 266–269.)

3.2 Saniaisten mikrolisäys itiöistä

Saniaistenitiöt ovat valmiita kerättäväksi, kun itiöpesäkkeet muuttuvat vaaleanruskeiksi. Vihreät itiöpesäkkeet eivät ole vielä valmiita kerättäväksi ja tummanruskeat tai mustat ovat itiöpesäkkeet, eivät enää sisällä itiöitä. Saniaisenlehti, jossa itiöpesäkkeet ovat, kerätään ja laitetaan pussiin tai paperin päälle itiöpesäkkeet alaspäin ja peitetään, odotetaan muutama päivä ja itiöt ovat varisseet pussiin tai paperin päälle. Samaan tilaan ei kannata laittaa useita eri lajikkeita saniaisia, mikäli halutaan tietyn lajikkeen jälkeläisiä. Itiöiden joukosta poistetaan roskat, sillä niiden mukana voi kulkeutua esimerkiksi sienitauteja. (Hoshizaki & Moran 2001, 71–74.)

Itiöt laitetaan suodatinpaperista tehtyihin paketteihin. Paketit upotetaan steriiliin veteen ja paketeista puristetaan niihin jäänyt ilma pois. Paketit upotetaan 5–10 prosenttiseen NaOCl -liuokseen, johon on lisätty 8 ml / l saippuaa (EriSept), käsittelyaika on 2–20 minuuttia. Tämän jälkeen paketit huuhdellaan kahteen kertaan steriilissä vedessä. Paketit avataan steriileissä oloissa (laminaarivirtauskaapissa) ja levitetään aloitus-alustalle. (Ford 1992, 296.)

Hoshizaki & Moran (2001, 71–74) steriloiivat saniaisten itiöt 5–10 prosenttisella NaOCl -liuoksella, johon oli lisätty muutama tippa Tween 20:ta, käsittelyaika 1 minuutti. Itiöt kerätään liuoksesta suodatinpaperille ja huuhdellaan steriilissä vedessä 2–4 kertaa. Itiöt kuivataan ja kylvetään myöhemmin tai itiöt kylvetään heti muutamassa tipassa steriiliä vettä. (Hoshizaki & Moran 2001, 71–74.)

Jos itiöiden elinvoimaisena pysyminen on heikkoa, ne täytyy steriloida neljän päivän sisällä keräämisestä. Steriloinnissa käytetään 2 prosentista NaOCl -liuosta, käsittelyaika 2–4 minuuttia (Ford 1992, 296.) Toinen vaihtoehto heikko elinvoimaisten itiöiden sterilointiin on 2 prosenttinen NaOCl- liuos, käsittelyaika 5–1 sekuntia. (Hoshizaki & Moran 2001, 71–74.)

Aloitusalustaksi itiöille sopii ½ MS, johon on lisätty 30 g/l sakkaroosia, pH 5,8, agar 9 g/l. Aloituslusta autoklavoidaan steriiliksi. Hormoneja ei yleensä tarvitse lisätä, mutta voidaan kokeilla matalia pitoisuuksia synteettistä sytokiniiniä bentsyyliaiminopuriinia (BAP) ja naftyylietikkahappoa (NAA). (Ford 1992, 296.)

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

Kivikkoalvejuuren ja metsäimarteen maavarret toimitettiin Lepaalle työn tilanneelta taimistolta muutamaa päivää ennen työn aloittamista (Kuva 2). Maavarret tulivat multapaakun kanssa. Ennen varsinaisen työn aloittamista maavarsista poistettiin ylimääräinen multa. Maavarsia joita ei käytetty lisäysmateriaalina heti, säilytettiin Lepaan taimistolla kylmässä kasvihuoneessa multapaakkuineen, josta lisäysmateriaalia haettiin tarvittaessa.



Kuva 2. Kuvassa Lepaan taimistolle toimitetut maavarret.

Aloitusalustoja tehtiin kolme erilaista. Aloituspalat laitettiin aloitusalustalle koeputkiin. Aloitus palat laitettiin alustalle niin, että puolet palasta oli aloitusalustan sisällä ja puolet jäi alustan päälle. Jokaiseen koeputkeen laitettiin vain yksi aloituspala. Steriloitimenetelmiä kokeiltiin kivikkoalvejuurelle kolmea erilaista ja metsäimarteelle neljää erilaista. Jokaisesta erilaisesta steriloinnista laitettiin aloituspaloja kaikkiin kolmeen aloitusalustaan. Aloituksia seurattiin noin kahden viikon välein. Koeputket, joissa oli kuolleita tai infektoituneita aloituspaloja, poistettiin.

Kasvimateriaalin steriloinnilla pyritään tuhoamaan mikro-organismit aloitusmateriaalin pinnalta. Sterilointiin voidaan käyttää alkoholia, jonka etanolipitoisuus on 70 prosenttia. Tällöin aloituspalat upotetaan alkoholiin noin minuutiksi, jonka jälkeen aloituspalat huuhdellaan steriilillä vedellä. Natriumhypokloridilla steriloitaessa aloituspalat upotetaan liuokseen, jonka NaOCl -pitoisuus on 1–3 prosenttia, ja huuhdellaan steriilillä vedellä useita kertoja. Tween 20:n lisääminen NaOCl -liuokseen parantaa tulosta joka steriloinnilla saadaan. Lisäksi aloituspaloille suoritettava esipesu, hammasharjapesu ja saippuapesu, parantavat sterilisoinnilla saatavaa tulosta. (Haapala & Niskanen 1992, 35.)

4.1 Aloitusmateriaali

Kivikkoalvejuuresta käytettiin aloituspaloina kasvupistettä, maavarresta irrotettuja lehdenalkuja ja vanhoja lehden tyviä, maavarsissa olleita silmuja, sekä maavarresta poistetusta mullasta löytyneitä gametofyyttejä (Kuva 3). 13.10. aloitusmateriaalina käytettiin maavarresta olleita silmuja, sekä gametofyyttejä. Aloituspaloja tehtiin 23 kappaletta. 14.10 aloitusmateriaalina käytettiin kasvupisteitä, sekä lehden alkuja ja tyviä. Aloituspaloja tehtiin 28 kappaletta. Aloituspaloja steriloiitiin ja pistettiin aloituslustoille yhteensä 51 kappaletta.



Kuva 3. Kivikkoalvejuuren maavarsi.

Maavarsissa olleet silmut preparoiitiin niin, että aloituspalaan jäi silmu ja lastuvanhaa lehden tyveä. Gametofyyttejä ei preparoitu. Lehden alut ja vanhat lehden tyvet preparoiitiin niin, että niihin ei jäänyt maavartta (Kuva 4).



Kuva 4. Preparointivalmiit kivikkoalvejuuren lehden tyvet, jotka on irrotettu maavarresta.

Metsäimarteesta käytettiin aloituspaloina kasvupisteitä ja juurenkärkiä (Kuva 5). 24.10. tehtiin 30 kappaletta aloituspaloja, joihin käytettiin kasvupisteitä, sekä juurenkärkiä. 7.11. tehtiin 16 kappaletta aloituspaloja juurenkärjistä ja kasvupisteistä. 25.11. tehtiin 12 kappaletta aloituspaloja kasvupisteistä. Aloituspaloja tehtiin yhteensä 58 kappaletta.



Kuva 5. Metsäimarteen maavarsi.

4.2 Sterilointimenetelmät

Kivikkoalvejuuren aloituspaloilla kokeiltiin kolme eri sterilointimenetelmää (Liite 1). Aloitusmateriaalin vähyden ja aloituskertojen läheisyyden vuoksi kivikkoalvejuuresta tehdyt havainnot eivät vaikuttaneet sterilointien suunnittelussa. Kaikissa steriloinneissa hammasharjapesu, Erisept-pesu ja ionivaihdetulla vedellä (ivv.) huuhtelu pysyivät samanlaisina. NaOCl- käsittely oli jokaisessa steriloinnissa erilainen, lisäksi Etax A 12 -käsittelyn ajankohta ja aika vaihtelivat eri käsittelyiden välillä.

Sterilointi 1:

1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 20 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 15 minuuttia.
5. Huuhtelu 3x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
6. Alkoholikäsittely: 70 % Etax:ssa 30 sekuntia.
7. Huuhtelu 1x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Sterilointi 2:

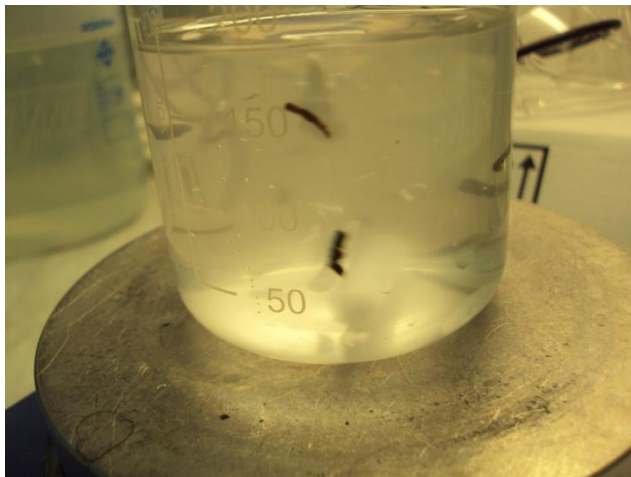
1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 20 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1,5 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 10 minuuttia.

5. Huuhtelu 1x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
6. Alkoholikäsittely: 70 % Etax:ssa 1 minuuttia.
7. Sterilointi 1,5 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 5 minuuttia.
8. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Sterilointi 3:

1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 20 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1,5 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 10 minuuttia.
5. Huuhtelu 1x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
6. Alkoholikäsittely: 70 % Etax:ssa 1 minuuttia.
7. Huuhtelu 1x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
8. Sterilointi 1,5 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 2,5 minuuttia.
9. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Metsäimarteen aloituspalloille tehtiin neljä erilaista sterilointimenetelmää (Liite 2). Sterilointimenetelmien kokeileminen aloitettiin voimakkaimmalla NaOCl-liuoksella. Kuolleiden osuus oli suuri, koska sterilointi oli ollut liian voimakas. Tämän jälkeen kokeiltiin kolmea laimeampaa sterilointia. Steriloinnin tehokkuus havainnoitiin, jonka jälkeen sitä muutettiin. Jokaisessa steriloinnissa tehtiin hammasharjapesu, Erisept-pesu ja ionivaihdetulla vedellä (ivv.) huuhtelu pysyivät samanlaisina (Kuva 6). Steriloinneissa muuttavana tekijänä oli NaOCl-käsittelyn pituus, joka vaihteli 30 – 15 minuutin välillä. Etax A 12-käsittelyä ei tehty metsäimarteille.



Kuva 6. Metsäimarteen aloituspalat Erisept pesussa.

Sterilointi 4:

1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 40 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 30 minuuttia.
5. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Sterilointi 5:

1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 40 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 15 minuuttia.
5. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Sterilointi 6:

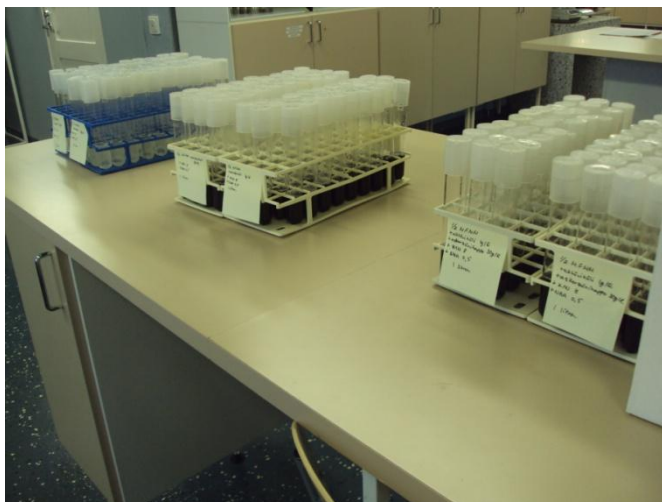
1. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
2. Erisept-pesu 40 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
3. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
4. Sterilointi 1 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 20 minuuttia.
5. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

Sterilointi 7:

6. Hammasharjapesu juoksevassa vedessä.
7. Erisept-pesu 40 minuuttia (3 tippaa /100 ml ionivaihdettua vettä).
8. Maavarsien huuhtelu lävikössä ionivaihdetulla vedellä.
9. Sterilointi 1 % NaOCl:ssa (+Tween 3 tippaa/ 100 ml steriili ivv.) 25 minuuttia.
10. Huuhtelu 4x steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

4.3 Aloitusalusat

Aloitusalusvoja valmistettiin kolme erilaista (kuva 7). Kahteen aloitusalusajaan lisättiin aktiivihieiltä ja yhteen lisättiin sokerinmäärää. KIN ja NAA -pitoisuudet olivat kaikissa alustoissa samat.



Kuva 7. Valmiit aloitusalusat. Aktiivihieiltä sisältävät aloitusalusat erottaa tummasta väristä, kun lisäsokeria sisältävä aloitusaluska on vaalea.

Aloitusalusat sisältävät makro- ja mikroravinteet, sekä vitamiinit ja raudan. Lisäksi alustaan lisättiin natriumfosfaattia (NaH_2PO_4), sokeria, Myo –

inositolia eli sokerialkoholi, agaria sekä Bacto-peptonia bakteerien ja sien-
ten esilletulon jouduttamiseen.

Aloitusalustana käytettiin ½ MFMM -alustaa Zenktelerin ja Kwa'snan
(2007, 81–86) tutkimuksen mukaisesti (Taulukko 1). Zenktelerin ja
Kwa'snan (2007, 81–86) tutkimuksen mukaan KIN-pitoisuudeksi valittiin
8 mg/l, sekä NAA pitoisuudeksi 0,5 mg/l, nämä pitoisuudet olivat antaneet
parhaan lopputuloksen heidän tutkimuksessa. Yhteen aloitusaluustaan lisät-
tiin askorbiinihappoa 0,03 g/l estämään aloituspalojen tummumisen koe-
putkessa.

Taulukko 1. Aloitusaluustat, sekä kasvihormonipitoisuudet kinetiini (KIN) ja naftyy-
lietikkahappoa (NAA).

Tunnus	Aloitusalusta
A	½ MFMM + aktiivihiili 1 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l
B	½ MFMM + aktiivihiili 1 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l+ askor- biinihappo 30 mg/l
C	½ MFMM + sokeri 30 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l

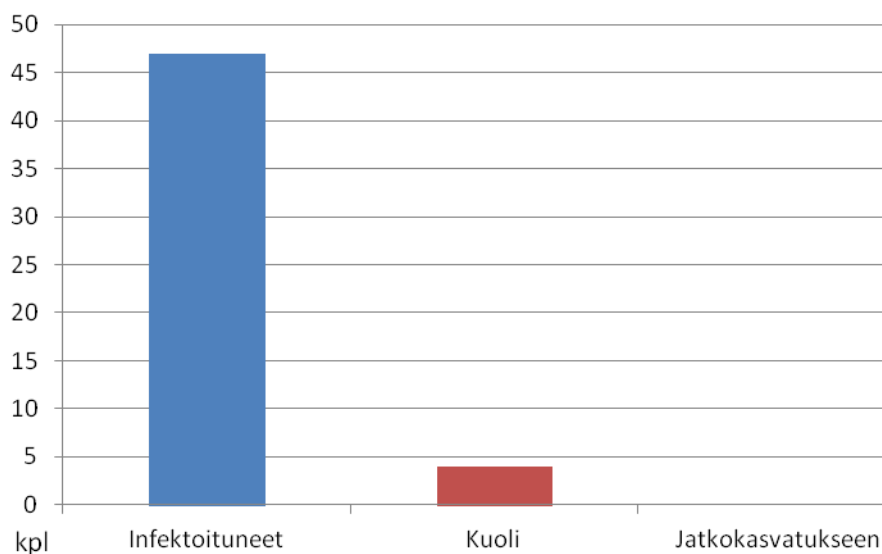
Kivikkoalvejuurelle sekä metsäimarteelle käytettiin kaikkia kolmea alus-
taa, jokaisesta sterilointierästä laitettiin kaikkiin kolmeen aloitusaluustaan
aloituspaloja. Aloitusaluustalle A laitettiin kivikkoalvejuuria 19 kappaletta
ja metsäimarteita 19 kappaletta. Aloitusaluustalle B laitettiin kivikkoalve-
juuria 17 kappaletta ja metsäimarteita 20 kappaletta. Aloitusaluustalle C lai-
tettiin kivikkoalvejuuria 15 kappaletta ja metsäimarteita 19 kappaletta.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Zenkterin ja Kwa'snan (2007, 81–86) tutkimuksen mukaisesti aloituspaikat, jotka otetaan saniaisen maavarresta ilman esikäsittelyä, ovat alttiita infektoitumiselle. Kivikkoalvejuuren mikrolisääminen osoittautui hyvin haasteelliseksi. Metsäimarteen kohdalla saatiin steriloinnista tuloksia, mutta kummankaan kohdalla aloitusalueita ei päästy vertailemaan.

5.1 Kivikkoalvejuuren tulokset

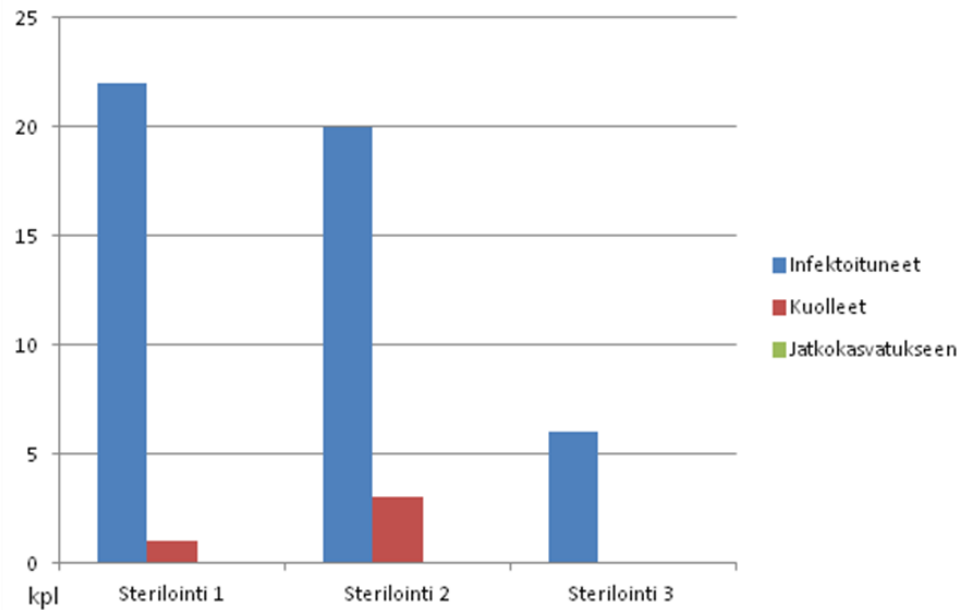
Aloitusalueille laitetuista 51 kappaleesta kivikkoalvejuuria infektoitui 47 kappaletta, kuoli 4 kappaletta ja jatkokasvatukseen siirrettiin 0 kappaletta (kuva 8). Sterilointimenetelmien välillä ei juuri ollut eroja, kasvupisteistä tehdyistä lisäyksistä kaikki aloituspaikat infektoituivat ja kuolleita ei ollut yhtään (Liite 1). Aloituspaikat tummuivat kaikissa aloitusalueissa samalla tavalla, merkittävää eroa askorbiinihappolisäyksellä ja askorbiinihapottomilla alueilla ei ollut.



Kuva 8. Kivikkoalvejuurelle tehtyjen sterilointien yhteenveto.

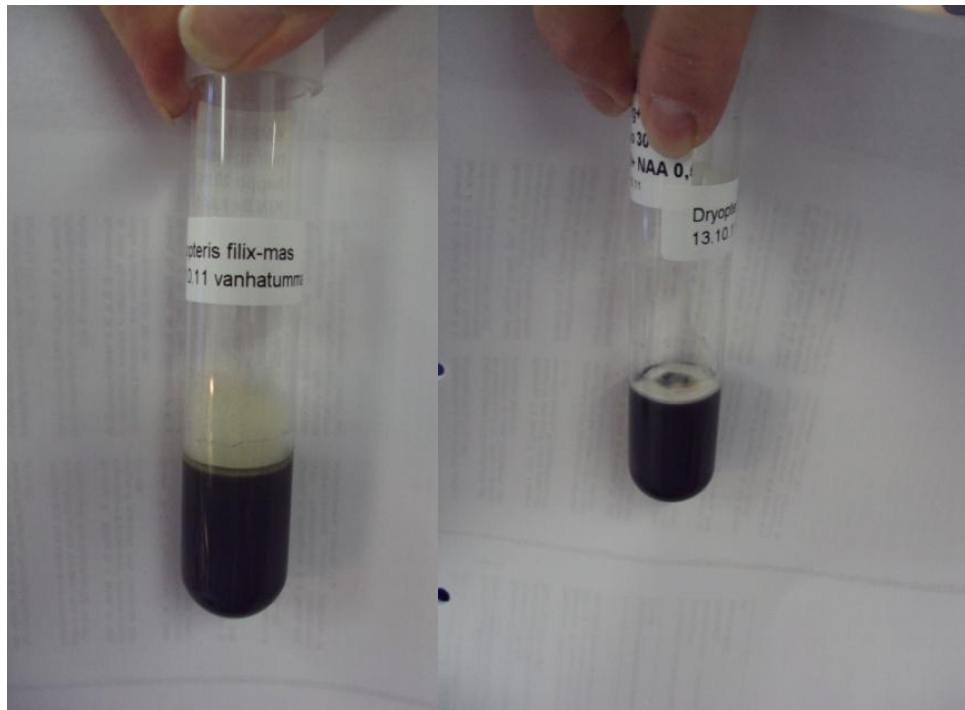
Eri sterilointimenetelmien välisiä eroja ei juuri ollut, joten voidaan todeta, ettei yksikään testatuista sterilointimenetelmistä ollut hyvä. Sterilointimenetelmä 3:sta voidaan todeta, että se oli kaikkein huonoin, koska kaikki aloituspaikat, jotka olivat kasvupisteitä, infektoituivat. Näin ollen käytetty sterilointimenetelmä on ollut liian kevyt, yhdestäkään aloituspaikasta ei ole saatu steriloitua kaikkia infektiotekijöitä pois (kuva 9). Kahdessa muussa steriloinnissa oli muutamia aloituspaikoja jotka eivät infektoituneet vaan kuolivat. Näiden yksilöiden kohdalla voidaan todeta steriloinnin olleen liian voimakas.

Koeputkia tarkasteltaessa näytti siltä, että kivikkoalvejuuren putkisoluista olisi valunut aloituslustralle alkoholikäsitteystä jäämiä, joten alkoholikäsitteily päätettiin jättää kokonaan pois metsäimarteita steriloinneista.



Kuva 9. Eri sterilointimenetelmien vertailu kivikkoalvejuurella.

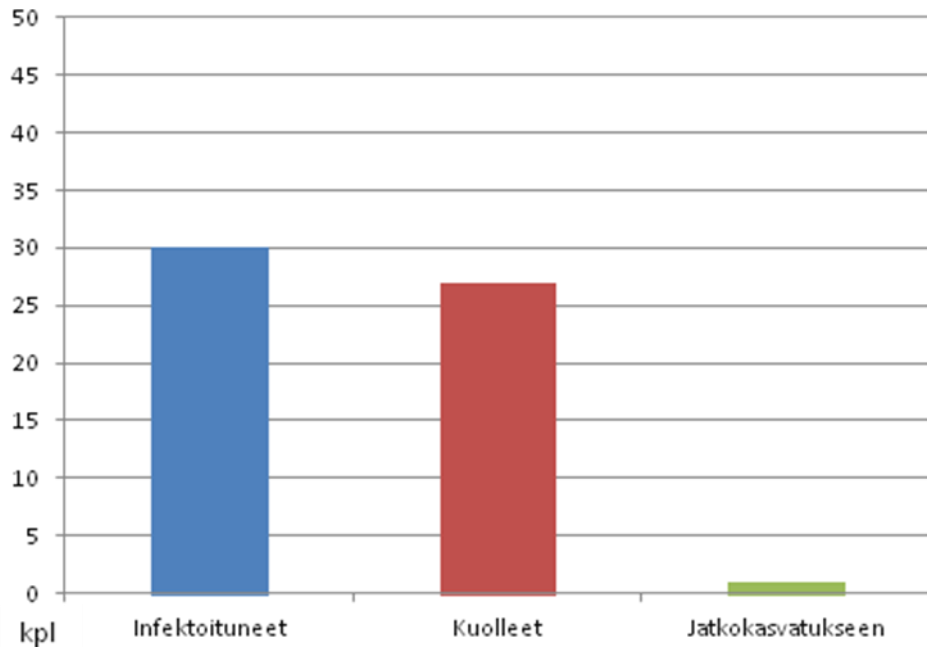
Aloitusalustojen sopivuutta kivikkoalvejuurelle ei pystytä vertailemaan, sillä yksikään aloituspala ei lähtenyt kasvuun (kuva 10).



Kuva 10. Infektoituneita kivikkovejuuren aloituspaloja.

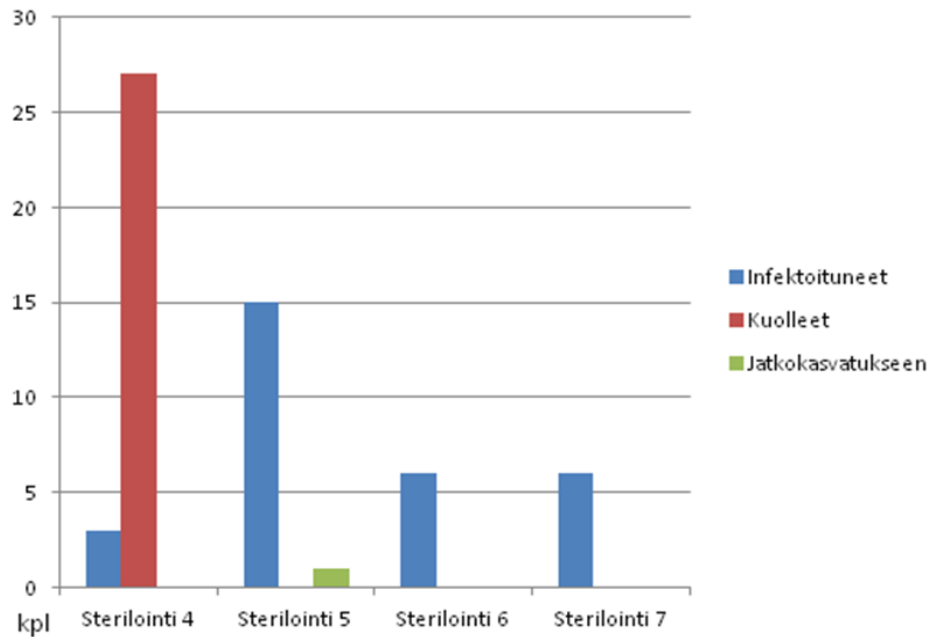
5.2 Metsäimarteen tulokset

Aloitusalustoille laitetuista 58 kappaleesta metsäimarteita infektoitui 30 kappaletta, kuoli 27 kappaletta ja jatkokasvatukseen siirrettiin 1 kappale (kuva 11). Sterilointimenetelmien eroja olivat infektoituneiden ja kuolleiden määrät (Liite 1).



Kuva 11. Metsäimarteelle tehtyjen sterilointien yhteenveto.

Sterilointimenetelmässä 4 aloituspaloja oli 30 kappaletta ja NaOCl - käsittelyaika oli 30 minuuttia, aloituspaloista kuoli 27 kappaletta, ja infektoitui 3 kappaletta, sterilointi oli ollut liian voimakas. Sterilointimenetelmässä 5, jossa oli 16 aloituspalaa, infektoituneita oli 15, mutta yksi aloituspala oli lähtenyt kasvuun, eikä infektoitunut. Sterilointimenetelmässä 6 aloituspaloja oli 6 kappaletta, joista kaikki infektoituivat. Sterilointimenetelmässä 7 oli aloituspaloja 6 kappaletta ja kaikki infektoituivat (kuva 12).



Kuva 12. Eri sterilointimenetelmien vertailua metsäimarteella.

5.3 Tulosten tarkastelu

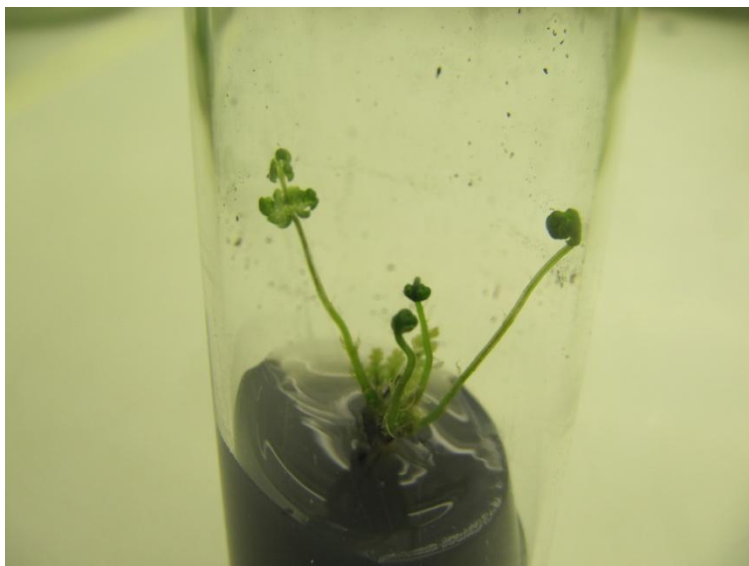
Aloituspalat tummuivat kaikissa aloitusalustoissa samalla lailla, merkittävää eroa askorbiinihappolisäyksellä ja askorbiinihapottomilla alustoilla ei ollut. Tummumiseen ei myöskään vaikuttanut pistettiinkö aloitusalustalle kivikkoalvejuuren tai metsäimarten aloituspala.

Aloitusalustojen vertailua niiden sopivuudesta kivikkoalvejuuren tai metsäimarten lisäykseen ei pystytä tekemään sillä vain yhdelle alustalle saatiin kasvuun lähtenyt aloitus. Käytetyt aloitusalustat mukailevat ulkomailla tehtyjä tutkimuksia ja niissä näiden alustojen on todettu olevan sopivia saniaisille. MFMM -alustan on suunniteltu saniaisten mikrolisäämiseen Murashige (Zenkteler, E., Kwa'sna, H. 81–86).

Kivikkoalvejuurille tehdyt kolme sterilointia olivat kaikki liian kevyitä, koska infektoituneiden määrä oli jokaisessa steriloinnissa suuri. Kasvualustoja kivikkoalvejuurilla ei pystytty vertailemaan sillä olisi tarvittu jatkokasvatukseen meneviä aloituspaloja.

Metsäimarteelle tehdyistä neljästä steriloinnista kolme oli liian kevyitä, sillä infektoituneita oli lähes sata prosenttia. Vain yksi aloituspala päätyi jatkokasvatukseen.

Kasvussa oleva saniainen on alustalla B, johon on lisätty askorbiinihappoa ja aktiivihiiltä (kuva 13). Alustalla B oleva metsäimarre näyttäisi kasvavan hyvin ja viihtyvän aloitusalustalla.



Kuva 13. Kasvuun lähtenyt metsäimarre aloituslustomalla B.

6 POHDINTAA

Saniaisten lisääminen maavarresta osoittautui haasteelliseksi. Maavarsille tulisi tehdä jokin esikäsittely ennen varsinaista sterilointia, jotta se saataisiin riittävän puhtaaksi taudinaiheuttajista aloituksen onnistumiseksi. Tällöin nyt kokeessa infektoituneet aloituspalat olisivat niitä jotka saadaan kasvamaan ja näin ollen saataisiin riittävä määrä puhtaita aloituksia kaupallisen hyödyn saamiseksi.

Kokeillut sterilointimenetelmät voisivat olla toimivia, jos maavarsille tehtäisiin esikäsittely, kuten kasvattaminen puolisteriileissä oloissa. Erilaisia esikäsittelyitä kannattaisi kokeilla saniaisten mikrolisäämisen. Tehtyjä kokeita voidaan käyttää vertailussa, kuinka paljon erilaiset esikäsittelyt auttavat steriloinnin onnistumisessa.

Zenkterin ja Kwaśnan tutkimuksessa oli esikäsittelemättömien maavarresta lisättyjen saniaisten infektoituminen saamaa luokkaa kuin kokeissa jotka tehtiin opinnäytetyössäni. Saniaiset vaativat puolisteriilit otot ennen varsinaista sterilointia, esimerkiksi kasvihuoneessa puhtaassa mullassa kasvattamisen muutamien kuukausien ajan, jotta saataisiin riittävä määrä onnistuneita aloituksia.

Kasvuun lähtenyt metsämarre kasvoi hyvin aloitusalueella, joten kokeiltu aloitusalue on sopiva. Avainasemaan saniaisten mikrolisäämisen nousi sien- ja bakteeritartuntojen pois saaminen. Perinteisillä sterilointimenetelmillä se ei onnistunut.

Kivikkoalvejuuren lisäämistä kannattaa kokeilla itiöistä tai maavarret tulee esikäsitellä. Itiöistä mikrolisääminen on kannattavampaa sillä silloin saadaan enemmän aloitusmateriaalia ja näin ollen myös enemmän jatkokasvatukseen sopivaa materiaalia.

Metsämarteen lisääminen maavartta jakamalla olisi taloudellisesti kannattavampaa taimistoille, kuin mikrolisääminen. Metsämarteen maavarsi on varsin helppo jakaa niin, että siitä saadaan monta jatkokasvatukseen sopivaa palaa, jossa on maavartta ja lehdenalkuja.

Lisäksi saniaisten mikrolisäämistä itiöistä kannattaa kokeilla, kunhan huomioon muistetaan ottaa saniaisten lisääntymistapa. Lisäksi pitää muistaa itiöiden kypsyminen, jotta itiöt saadaan kerättyä oikeaan aikaan. Itiöillä lisääntyvä saniaisen eivät lähde kasvuun yksittäisillä itiöillä, vaan itiöitä tarvitaan useampia samaan aloitusalueeseen, jotta saadaan aikaiseksi suvullinen sukupolvi, josta sitten muodostuu suvuton sukupolvi. Suvuttomalla sukupolvella on maavarsi ja lehdet.

Itiöiden itämisolosuhteet, voidaan mikrolisäyslaboratoriossa pitää ihanteellisina itämistä ajatellen. Itiöiden kosteusolot pystytään varmistamaan

täysin suljetussa kasvatusjärjestelmässä. Kasvuun lähteneet itiöt saadaan steriileinä jatkokasvatukseen.

LÄHTEET

- Alanko, P. 2007. Perennat. Hämeenlinna: Tammi.
- Chen, S.Y., Read, P. 1983. Micropropagation of leatherleaf fern. Proc. Fla. State Hort. Soc. 96.
- Ford, M.V., Ide, J.M., Jeremy, A.C. & Paul, A.M. (edited) 1992. Fern horticulture: past, present and future perspectives. Andover : Intercept.
- Foster, F.G. 1993. Ferns to know and grow. London: Timber Press.
- Haapala, T. ja Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: Valtion painatuskeskus.
- Hardyfernlibrary n.d. Viitattu 28.3.2012.
<http://www.hardyfernlibrary.com/ferns/listSpecies.cfm?Genus=Dryopteris>
- Hartmann, T.H., Kester, D.E., Davies, Jr. F.T. ja Geneve, R.L. 2011. Hartmann and Kester's Plant Propagation, Principles and Practices. 8th edition 2011. Yhdysvallat, New Jersey: Prentice Hall.
- Hoshizaki, B. & Moran, R. 2001. Fern grower's manual. Portland: Timber Press.
- Hämet-Ahti, L., Suominen, J., Ulvinen, T. & Uotila, P. (toim.) 1998. Retkeilykasvio. 3. painos. Helsinki: Luonnontieteellinen keskusmuseo, Kasvimuseo.
- Mossberg, B. & Stenberg, L. 2006. Suuri pohjolan kasvio. 2. painos. Norja: Repro.
- Olsen, S. 2007. Encyclopedia of garden ferns. Portland: Timber Press.
- Pankakoski, A. 1994. Puutarhurin kasvioppi. 5. painos. Helsinki: Opetushallitus, painatuskeskus.
- Zenkteler, E., Kwa'sna, H. 2007, Biodiv. Res. Conserv. 5-8: 81-86.

ALOITUKSET

Aloituspvm: 13.10.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus	
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl
Kasvilaji: Dryopteris filix-mas	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5	24.10.2011	6				
Aloituspala: Silmu maavarressa							
Sterilointi: 1	6 kpl						
1. Hammasharjapesu, varoen Preparointi	1/2 MFMM + aktiivihiihi + KIN 8 + NAA 0,5	24.10.2011	8	23.11.2011	1		
2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettua vettä 20 minuuttia							
3. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä lävikössä Laminaariin		9 kpl					
4. NaOCl 1 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 15 min	1/2 MFMM + aktiivihiihi + askorbiinihappo + KIN 8 + NAA 0,5	24.10.2011	8				
5. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4		8 kpl					
6. Etax A 12 70 %, 30 sek. + huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä							
Muuta: C - gameofyyteille ei Etax - käsittelyä	Koodit: A = Dryopteris filix-mas 13.10.11 nuorivaalea	B = Dryopteris filix-mas 13.10.11 vanhatumma		C = Dryopteris filix-mas 13.10.11 gameofyytti			

Aloituspvm: 14.10.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus		
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl	
Kasvilaji: Dryopteris filix-mas	1/2 MFMM + lisäsokeri +	24.10.2011	4					
		7.11.2011	2					
Aloituspala: Silmu maavarressa	KIN 8 + NAA 0,5			23.11.2011	1			
Sterilointi: 2 1. Hammasharjapesu, varoen 2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettua vettä 20 minuuttia 3. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä lävikössä 4. NaOCl 1,5 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 10 min 5. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä Laminaariin 6. Etax A 12 70 %, 1 min + huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä 7. NaOCl 1,5 % + Tween 20, 5 min 8. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	7 kpl							
	1/2 MFMM + aktiivihiiili +	24.10.2011	7					
		7.11.2011	1					
	KIN 8 + NAA 0,5							
	8 kpl							
	1/2 MFMM + aktiivihiiili +	24.10.2011	4					
		7.11.2011	2					
	askorbiinihappo + KIN 8 + NAA 0,5				23.11.2011	2		
	8 kpl							
Muuta:	Koodit: A = Dryopteris filix-mas 14.10.11 nuori lehden tyvi	B = Dryopteris filix-mas 14.10.11 vanha lehden tyvi						

Aloituspvm: 14.10.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus		
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl	
Kasvilaji: Dryopteris filix-mas Aloituspala: Kasvupiste	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	24.10.2011	2					
Sterilointi: 3 1. Hammasharjapesu, varoen 2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettua vettä 20 minuuttia 3. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä lävikössä 4. NaOCl 1,5 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 10 min 5. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä Laminaariin 6. Etax A 12 70 %, 1 min + huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä 7. NaOCl 1,5 % + Tween 20, 2,5 min 8. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	1/2 MFMM + aktiivihiili + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	24.10.2011	2					
		1/2 MFMM + aktiivihiili + askorbiinihappo + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	24.10.2011	2				
Muuta:	Koodit: C = Dryopteris filix-mas 14.10.11 kasvupiste							

Aloituspvm: 24.10.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus	
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl
Kasvilaji: Gymnocarpium dryopteris	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5			7.11.2011	5		
				23.11.2011	5		
Aloituspala: juuren kärki ja lehdenkasvupiste							
Sterilointi: 4	10 kpl						
	1. Hammasharjapesu, varoen Preparointi	1/2 MFMM + aktiivihiili +	7.11.2011	1	7.11.2011	9	
2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettua vettä 40 minuuttia	KIN 8 + NAA 0,5						
3. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä lävikössä Laminaariin	10 kpl						
4. NaOCl 1 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 30 min	1/2 MFMM + aktiivihiili + askorbiinihappo + KIN 8 + NAA 0,5	7.11.2011	2	7.11.2011	6		
				23.11.2011	2		
5. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	10 kpl						
Muuta: Aloituspaloja 5 kappaletta / sterilisointierä	Koodit:						

Aloituspvm: 7.11.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus	
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl
Kasvilaji: Gymnocarpium dryopteris Aloituspala: juuren kärki ja lehdenkasvupiste Sterilointi: 5	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5 5 kpl	23.11.2011	5				
1. Hammasharjapesu, varoen Preparointi 2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettua vettä 40 minuuttia 3. Huuhtelu ionivaihdettulla vedellä lävikössä Laminaariin 4. NaOCl 1 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 15 min 5. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	1/2 MFMM + aktiivihiili + KIN 8 + NAA 0,5 5 kpl	23.11.2011	5				
Muuta: Kasvuun lähtenyt aloituspala lehden kasvupiste	Koodit:	23.11.2011	5			23.11.2011	1

Aloituspvm: 25.11.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus		
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl	
Kasvilaji: Gymnocarpium dryopteris Aloituspala: lehdenkasvupiste	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	2.12.2011	2					
Sterilointi: 6 1. Hammasharjapesu, varoen Preparointi 2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdetta vettä 40 minuuttia 3. Huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä Laminaariin 4. NaOCl 1 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 20 min 5. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	1/2 MFMM + aktiivihiili + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	2.12.2011	1					
		14.12.2011	1					
			2.12.2011	1				
			14.12.2011	1				
Muuta:	Koodit:							

Aloituspvm: 25.11.2011	Aloitusalusta	Infektoituneet		Kuolleet		Jatkokasvatus	
		pvm	kpl	pvm	kpl	pvm	kpl
Kasvilaji: Gymnocarpium dryopteris Aloituspala: lehdenkasvupiste	1/2 MFMM + lisäsokeri + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	14.12.2011	2				
Sterilointi: 7 1. Hammasharjapesu, varoen Preparointi 2. Erisept 3 tippaa 100 ml ionivaihdettaa vettä 40 minuuttia 3. Huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä Laminaariin 4. NaOCl 1 % + Tween 20 3 tippaa / 100 ml sekoitus 25 min 5. Steriilissä ionivaihdetussa vedessä huuhtelu X 4	1/2 MFMM + aktiivihiili + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	2.12.2011	1				
		14.12.2011	1				
	1/2 MFMM + aktiivihiili + askorbiinihappo + KIN 8 + NAA 0,5 2 kpl	14.12.2011	2				
Muuta:	Koodit:						

Aloitusalusta A: 1/2 MFMM + aktiivihiihi 1 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l		
KANTALIUKOKSET		RAVINTOLIUKOS
Nimike	Huomioitavaa	määrä ml / litra ravintoliuoksessa
MS - makro		50
MS - mikro		0,5
MS - Fe		5
LS - vitamiinit		2
NaH ₂ PO ₄	punnitaan erikseen	0,255 g/l
KIN 8 mg/l	punnitaan erikseen	8 mg/l
NAA	20 mg / 100 ml	2,5 ml/l
sokeri		15 g/l
Myo - inositoli		10 ml/l
pH		5,7
Aktiivihiihi		1 g/l
Agar		8,5 g/l
Bacto - peptone		0,27 g/l

Aloitusalusta B: 1/2 MFMM + aktiivihiihi 1 g/l + Askorbiinihappo 30 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l		
KANTALIUKOKSET		RAVINTOLIUOS
Nimike	Huomioitavaa	määrä ml / litra ravintoliuoksessa
MS - makro		50
MS - mikro		0,5
MS - Fe		5
LS - vitamiinit		2
NaH ₂ PO ₄	punnitaan erikseen	0,255 g/l
Askorbiinihappo	punnitaan erikseen	0,03 g/l
KIN 8 mg/l	punnitaan erikseen	8 mg/l
NAA	20 mg / 100 ml	2,5 ml/l
sokeri		15 g/l
Myo - inositoli		10 ml/l
pH		5,7
Aktiivihiihi		1 g/l
Agar		8,5 g/l
Bacto - peptone		0,27 g/l

Aloitusalusta C: 1/2 MFMM +sokeri 30 g/l + KIN 8 mg/l + NAA 0,5 mg/l		
KANTALIUKOKSET		RAVINTOLIUOS
Nimike	Huomioitavaa	määrä ml / litra ravintoliuoksessa
MS - makro		50
MS - mikro		0,5
MS - Fe		5
LS - vitamiinit		2
NaH ₂ PO ₄	punnitaan erikseen	0,255 g/l
KIN 8 mg/l	punnitaan erikseen	8 mg/l
NAA	20 mg / 100 ml	2,5 ml/l
sokeri		15 g/l
lisäsokeri		30 g/l
Myo - inositoli		10 ml/l
pH		5,7
Aktiivihili		1 g/l
Agar		8,5 g/l
Bacto - peptone		0,27 g/l