

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242938 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433288**

(22) Data zgłoszenia: **2020.03.18**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.09.20 BUP 25/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.05.22 WUP 21/2023**

(51) MKP:

A01H 4/00 (2006.01)

A01G 24/10 (2018.01)

A01G 24/30 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL
UNIWERSYTET ROLNICZY IM. HUGONA
KOŁŁĄTAJA W KRAKOWIE, Kraków, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

DARIUSZ LATOWSKI, Kraków, PL
KATARZYNA NAWROT-CHORABIK, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób pozyskiwania sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) oraz pożywki nadające się do stosowania w tym sposobie

PL 242938 B1

Opis wynalazku

Spośród trzech głównych europejskich gatunków rodzaju *Fraxinus* (*F. excelsior* – jesion wyniosły, *F. angustifolia* – jesion wąskolistny, *F. ornus* – jesion mannowy) najszerszym zakresem występowania cechuje się jesion wyniosły. Występuje on w całej Europie północnej do 64°N (w Norwegii), na południe do Morza Śródziemnego, a na wschód do Rosji (prawie do rzeki Wołgi). Dystrybucja pozostałych dwóch gatunków jest natomiast ograniczona do obszarów południowych (FRAXIGEN. 2005). Ze względu na tak olbrzymi zasięg *F. excelsior* i niejednokrotnie kluczowe znaczenie drewna jesionowego w gospodarce, zamieranie tego gatunku stanowi olbrzymi problem nie tylko ekologiczny, ale też gospodarczy. W niektórych krajach, takich jak np. Wielka Brytania i Irlandia wymieranie jesionu już spowodowało znaczne straty ekonomiczne (Atkinson 2019). Przyczyną wymierania jesionów jest choroba powodowana przez grzyb, należący do workowców, którego aktualna nazwa gatunkowa to *Hymenoscyphus fraxineus*. Według Holdenriedera, który wraz z Queloz i wsp. (2011) pomógł odkryć pełny cykl rozwojowy tego grzyba, stosowanie fungicydów w walce z tym patogenem nie ma uzasadnienia, m.in. dlatego, że stanowi zagrożenie istnienia bioróżnorodności, szczególnie ekosystemów leśnych (Coghlan 2012). Również wycinka zainfekowanych drzew nie ograniczy procesu wymierania, gdyż materiał zakaźny rozprzestrzenia się w grubej warstwie gleby, tzn. "na dnie lasu" (Coghlan 2012).

Znany jest sposób regeneracji jesionu wyniosłego (Capuana, 2012) obejmujący uzyskanie sadzonek jesionu wyniosłego *in vitro* z zastosowaniem metody somatycznej embriogenezy. W metodzie tej uzyskuje się kalus embriogeny, czyli taki na którym za pomocą manipulacji odpowiednimi hormonami powstają i rozwijają się zarodki somatyczne przechodzące przez kolejne etapy rozwojowe, tj. etap wczesny – globularny, sercowaty, torpedy i liścieniowy. Ostatecznie zarodek somatyczny może posłużyć do regeneracji całej rośliny. Metoda somatycznej embriogenezy charakteryzuje się wysoką kosztocłonnością i często obserwowaną niestabilnością genetyczną komórek kalusa. Wymaga ona też większej liczby etapów. Wieloetapowość wymagana w metodzie somatycznej embriogenezy skutkuje ponadto podwyższonym ryzykiem niepowodzenia w uzyskaniu sadzonki, m.in. dlatego, że każdy etap zwiększa prawdopodobieństwo zainfekowania hodowli. Wieloetapowość skutkuje też większą czasochłonnością, a większa czasochłonność z kolei zwiększa ryzyko mutacji i wymusza konieczność kosztownego utrzymywania ściśle określonych warunków i ich kontroli przez długi czas i to w okresowo zmienianych warunkach, zależnych od etapu hodowli. Wszystko to sprawia, że w komórkach kalusa w procesie uzyskiwania sadzonek metodą somatycznej embriogenezy zachodzą spontaniczne zmiany, które powodują, że regenerowane w ten sposób rośliny nie są tak jednorodne jak można by oczekiwać po metodzie wegetatywnego rozmnażania. W tkance kalusa z czasem pojawiają się zmiany liczby i struktury chromosomów. W czasie długotrwałej hodowli kalusa, zmiany zachodzące w materiale genetycznym kumulują się prowadząc do postępującej utraty totipotencji komórek kalusa, a tym samym wydajności i jakości pozyskiwanych sadzonek. Z powyższych powodów dla uzyskania sadzonek, szczególnie drzew leśnych, które będą charakteryzowały się wyrównanymi i stabilnymi cechami, wskazane jest stosowanie mikrorozmnażania metodą organogenezy, która nie tylko zapewnia stabilność własności drzew, ale też jest tańsza od pozyskiwania roślin metodą somatycznej embriogenezy. Kosztocłonność embriogenezy somatycznej wynika też z konieczności wielokrotnego pasażowania kultur *in vitro* z stosowaniem wielu różnorodnych regulatorów wzrostu i składników podłoży hodowlanych.

Wobec powyższego należy szukać innych rozwiązań zapewniających odnowienie i zachowanie populacji jesionu wyniosłego. Celem wynalazku jest dostarczenie metody produkcji sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), która pozwalałaby na uniknięcie wad znanych metod produkcji sadzonek.

Przedmiotem wynalazku jest sposób pozyskiwania sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) oraz skład pożywek nadających się do wykorzystania w tym sposobie, które zostały szczegółowo zdefiniowane w załączonych zastrzeżeniach patentowych.

Istotą prezentowanego wynalazku jest umożliwienie wykorzystania pośredniej organogenezy przybyszowej, w której pomija się etap kształtowania i rozwoju zarodka somatycznego, a tym samym znacznie ogranicza liczbę pasażów i kosztownych składników podłoży hodowlanych. W metodzie pośredniej organogenezy przybyszowej regeneracja rośliny następuje bezpośrednio z tkanki kalusowej, co skutkuje nie tylko niższymi kosztami produkcji sadzonek ale też, co bardzo istotne, większą ich stabilnością genetyczną niż w przypadku stosowania mikrorozmnażania metodą somatycznej embriogenezy.

Przykład 1. Pozyskiwanie sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.).

Poniżej zostanie przedstawiony szczegółowy opis kolejnych etapów przykładowej realizacji sposobu według wynalazku. Składy stosowanych pożywek zostały podsumowane w Tabeli 1.

A. dezynfekcja nasion jesionu wyniosłego

Dezynfekcja przebiega dwuetapowo a wskazane ilości zostały podane w przeliczeniu na ok. 250 nasion.

Etap pierwszy (dezynfekcja wstępna – nie wymaga warunków sterylnych)

1. Z dobrej jakości (bez wyraźnych uszkodzeń) nasion jesionu wyniosłego usunięto aparat lotny tj. skrzydlak.
2. Nasiona bez skrzydlaków umieszczano w metalowym, szczelnie zamykanym sitku o minimalnej zalecanej średnicy 65 mm. W przypadku mniejszej liczby nasion, np. 100, zalecana minimalna średnica sitka to 40 mm.
3. Nasiona zamknięte w sitku umieszczano w zlewce szklanej wypełnionej 70% roztworem nieskażonego etanolu w ilości pozwalającej na pełne zanurzenie nasion w tym roztworze i wytrząsano przez 30 sekund.
4. Po tym czasie nasiona w sitkach przenoszono do wysokiej, np. 2-litrowej zlewki i przemywano w strumieniu bieżącej wody wodociągowej o temperaturze około 18°C.
5. W końcowym etapie płukania tj. po 25 minutach zakręcano dopływ wody, a do zlewki z wodą wlewano 5 mL środka odtłuszczającego łupiny nasienne tj. polisorbatu 80 (Tween 80) (Sigma Aldrich) i wytrząsano nasiona w tym roztworze przez kolejne 5 minut (do powstania piany).
6. Celem opłukania nasion z powstałej piany nasiona w sitkach powtórnie umieszczano w zlewce o pojemności 2 litrów i przemywano bieżącą wodą wodociągową o temperaturze około 18°C przez co najmniej 5 minut.

Etap drugi (dezynfekcja właściwa – wymaga warunków sterylnych)

7. Nasiona w sitkach przenoszono do komory laminarnej, aby dalsza dezynfekcja przebiegała w sterylnych warunkach.
8. Nasiona wyciągano z sitka sterylną pęsetą i umieszczano w sterylnej zlewce szklanej o pojemności około 400 mL, a następnie zalewano 250 mL 5% wcześniej sporządzonego wodnego roztworu poliwinylpirolidonu (PVP).
9. Zlewkę z nasionami szczelnie zabezpieczano zachowując warunki sterylne, np. sterylną folią aluminiową i uszczelniano np. owijając parafilmem.
10. Tak zabezpieczone nasiona umieszczone w zlewce z roztworem PVP inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 7°C, w ciemności.
11. Po upływie 24 godzin nasiona umieszczano we wcześniej używanym sitku i przenoszono do sterylnej zlewki szklanej z 70% roztworem etanolu nieskażonego tak by wszystkie nasiona były zanurzone w tym roztworze i wytrząsano przez 30 sekund.
12. Następnie, w drugiej, sterylnej, szklanej zlewce nasiona umieszczone w sitkach przepłukiwano sterylną wodą dejonizowaną.
13. Nasiona dezynfekowano w 8% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl) firmy Fluka lub Sigma-Aldrich (numer katalogowy: 13440), który zawiera 6 14 aktywnego chloru. W przypadku NaOCl od innych dystrybutorów należy wcześniej przetestować, jakie stężenie należy zastosować, aby uniknąć uszkodzenia nasion. W przypadku zbyt wysokich stężeń zarodki „biały”, traciły turgor po sterylizacji i obumierały. Nasiona umieszczone w sitkach wytrząsano energicznie przez co najmniej 15 minut w roztworze NaOCl.
14. Po tym czasie nasiona umieszczone w sitkach płukano 5-krotnie w sterylnej wodzie dejonizowanej, każdorazowo przez co najmniej 1 minutę, zmieniając wodę po każdym płukaniu. Zdezynfekowane zgodnie powyższą procedurą nasiona były gotowe do izolacji zarodków zygocycznych. Dla zachowania efektu dezynfekcji izolację zarodków należy wykonać pod komorą laminarną bezpośrednio po dezynfekcji nasion.

Powyższa procedura pozwala uzyskać *in vitro* niezainfekowane eksplantaty pierwotne dające zdrową tkankę kalusa jesionu wyniosłego niezbędną do dalszych etapów badań i generującą poprawnie wykształcone sadzonki.

II. Izolacja dojrzałych zarodków zygotycznych ze zdezynfekowanych nasion jesionu wyniosłego i otrzymywanie z nich sadzonek

Wszystkie czynności prowadzono w sterylnych warunkach np. w komorze laminarnej. Zdezynfekowane nasiona osuszano np. na sterylnej bibule filtracyjnej, ale tak by nie uległy całkowitemu przesuszeniu (dlatego zalecane jest osuszanie po kilka sztuk np. 5). Następnie nacinano sterylnie (np. przy pomocy sterylnego skalpela) wzdłuż łupinę nasienną każdego z nasion i sterylnie, np. przy użyciu sterylnej pęsety, odseparowano zarodek zygotyczny. Następnie, sterylnie, np. za pomocą sterylnego skalpela delikatnie raniono zarodek (korzystnie w dwóch miejscach) w celu przyspieszenia inicjacji tkanki kalusa. Po 10 wyizolowanych w ten sposób zarodków zygotycznych (eksplantatów pierwotnych) umieszczano na sterylnej pożywce 1 (Tab. 1A) w sterylnych wentylowanych szalkach Petriego, w pozycji horyzontalnej, tak aby w 1/2 powierzchni przylegały do pożywki.

1. Tworzenie i namnażanie tkanki kalusa z jednoczesnym formowaniem siewek pierwotnych

W szalkach przygotowanych jak wyżej zabezpieczonych przed wysuszeniem np. przez owinięcie ich parafilmem i inkubowanych w ciemności w temperaturze pokojowej (zalecane 24°C +/- 1°C) i wilgotności powietrza typowej dla hodowli roślinnych (zalecane 40–45%) po trzech do czterech tygodniach obserwowano wytwarzanie tkanki kalusa przez zarodki zygotyczne. Tkanka ta po około sześciu tygodniach od momentu umieszczenia zarodków zygotycznych na pożywce 1 (Tab. 1A) osiągała średnicę ok. 4-8 mm i wytwarzała siewki jesionu wyniosłego o niepełnej formie rozwoju, zwane tutaj siewkami pierwotnymi (Fig. 1).

2. Rozwój siewek wtórnych

Po osiągnięciu przez siewki pierwotne długości około 8 mm, w celu zwiększenia wydajności produkcji sadzonek, zalecane jest sterylnie pocięcie każdej z nich na 2 do 5 fragmentów (Fig. 2), ale tak by każdy powstały fragment zawierał część tkanki kalusa. Otrzymane fragmenty, korzystnie posegregowane w grupy pochodzące z jednego genotypu, przenoszono sterylnie do wentylowanych szalek Petriego, korzystnie o średnicy 90 mm, wypełnionych do 2/3 wysokości pożywką 2 (pełny skład patrz Tab. 1B). Pożywka 2 służy do inicjacji siewek wtórnych i w odróżnieniu do pożywki 1 stosowanej na wcześniejszych etapach nie zawiera auksyny 2,4-D tj. kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowy – regulatora wzrostu.

Na jedną szalkę zaleca się umieścić do 5, pociętych na fragmenty, siewek pierwotnych z fragmentami tkanki kalusa. Przestrzeganie czystości kultur pod względem genotypu materiału ma istotne znaczenie praktyczne przy późniejszym wykorzystaniu sadzonek w zalesianiu. Pozwala na wprowadzanie najbardziej wytrzymałych genotypów i zapewnia kontrolę bioróżnorodności sadzonek wprowadzonych do zalesianego terenu. Szalki z hodowlami inicjującymi siewki wtórne (tj. z umieszczonymi na pożywce fragmentami powstałymi z cięcia siewek pierwotnych wraz z pozostałością tkanki kalusa) przenoszono w warunki typowe dla hodowli roślinnych tj. zapewniające odpowiednią wilgotność, temperaturę i oświetlenie. W opisywanym przykładzie była to wilgotności 40–45%, temperatura 23°C +/- 1°C i światło białe LED o natężeniu promieniowania PAR 300 $\mu\text{mol/s}^{-1}/\text{m}^2$ ze źródłem umieszczonym w odległości 10 cm od hodowli i fotoperiodem 12 godzin (12 godzin światło i 12 godzin ciemność).

Przy zakładaniu hodowli inicjującej powstanie siewek wtórnych dopuszczalna jest rezygnacja z cięcia siewek pierwotnych, ale wówczas pominięto się zaplanowany na tym etapie proces zwielokrotniania siewek i uzyskiwanych ostatecznie sadzonek (z jednej siewki pierwotnej powstanie wówczas jedna siewka wtórna, która ostatecznie przekształci się tylko w jedną sadzonkę).

Po 2 tygodniach z fragmentów siewek pierwotnych powstawały wykształcone fizjologicznie siewki wtórne (Fig. 3) (o długości pędu około 5–7 mm), dobrze wybarwione chlorofilem, z liścieniami i korzonkiem zarodkowym (o długości około 5 mm) w liczbie średnio 8 siewek wtórnych wyhodowanych w pojedynczej szalce Petriego, w której uprzednio umieszczano wszystkie fragmenty uzyskiwane z pięciu pociętych siewek pierwotnych z pozostałością tkanki kalusa.

3. Rozwój sadzonek

Powstałe siewki wtórne przenoszono sterylnie do wysterylizowanych krystalizatorów, korzystnie o średnicy 80 mm (korzystnie po 4 siewki na jedno naczynie) zamkniętych szklaną pokrywą (pokrywą może stanowić np. górna część szalki Petriego) lub analogicznych sterylnych naczyń dedykowanych do hodowli roślin np. z firmy SPL Life Sciences Co 100 (śred.) x 40 (wys.) mm, nr. kat. 310100, wypełnionych sterylną, pożywką 3, uboższą niż poprzednie pożywki w wybrane składniki (głównie mikroelementy) i wzbogaconą w regulator wzrostu tj. auksynę IBA (kwas indolilomasłowy) o stężeniu 5,28 mg/l

(pełny skład patrz Tab. 1C). Hodowlę nadal prowadzono w opisanych powyżej warunkach światła, temperatury i wilgotności. Po 4 do 6 tygodniach hodowli w krystalizatorach uzyskano autonomiczne, wykształcone fizjologicznie sadzonki jesionu wyniosłego o wysokości pędu 15–20 mm z dobrze wykształconymi korzeniami (o długości średnio 10 mm) i liśćmi (Fig. 4). Po tym czasie hodowle mogły być aklimatyzowane w sterylnej glebie – każdą siewkę pikowano do osobnej doniczki np. o wymiarach 9 x 9 cm (np. typu p9) i wypełnionej stosowanym w uprawach roślin podłożem takim jak np. gleba uniwersalna, z zastrzeżeniem, że odczyn podłoża nie może być kwaśny (Fig. 5).

Podsumowując, ujawniony wynalazek dostarcza sposób pozyskiwania sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) z dojrzałych nasion na drodze pośredniej organogenezy przybyszowej w procesie mikrorozmnażania uwzględniający poniższy skład pożywek stosowanych na poszczególnych etapach.

Tab. 1. Skład pożywek do inicjacji i proliferacji tkanki kalusa oraz organogenezy przybyszowej w siewki i sadzonki *F. excelsior* w warunkach *in vitro*. W nawiasach podano dopuszczalny zakres stężeń, ze wskazaniem korzystnej wartości poza nawiasem oznaczonej *

	A	B	C
MAKROELEMENTY [mg/l]	INDUKCJA TKANKI KALUSA, JEJ NAMNAŻANIE (proliferacja), INDUKCJA SIEWEK PIERWOTNYCH	INDUKCJA SIEWEK WTÓRNYCH	INDUKCJA SADZONEK
NH ₄ NO ₃		825* (525–1150)	
KNO ₃		950* (650–1275)	
CaCl ₂ x 2H ₂ O		220* (100–335)	
MgSO ₄ x 7H ₂ O		185* (65–300)	
KH ₂ PO ₄		85* (15–200)	
MIKROELEMENTY [µg/l]	A	B	C
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8 (20–39)		27,8 (20–39)
Na ₃ EDTA x 2H ₂ O	22,0* (15–39)		22,0* (15–39)
KI	0,83 (0,20–1,30)		0,41* (0,15–0,55)
H ₃ BO ₃	6,2 (4,0–8,2)		3,15* (1,50–4,50)
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3 (14–34)		11,15* (7,50–13,50)
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6 (6–10,5)		4,3* (2,50–5,50)
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25 (0,10–0,45)		0,125* (0,05–0,325)
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025 (0,010–0,045)		0,0125* (0,060–0,185)
CoSO ₄ x 6H ₂ O	0,025 (0,010–0,045)		0,0125* (0,060–0,185)
Składniki organiczne [mg/l]	A	B	C
kwas nikotynowy	0,5 (0,2–0,75)		0,25* (0,1–0,4)
pirydoksyna-HCl	0,5 (0,2–0,75)		0,25* (0,1–0,4)
tiamina-HCl	0,2* (0,1–0,4)		0,1* (0,05–0,3)
glicyna	2 (1–3)		2 (1–3)
7i -inozytol	100 (50–130)		100 (50–130)
sacharoza	20000* (10000–30000)		10000* (5000–8000)
Regulatory wzrostu [µg/l]	A	B	C
6-benzyloadeninopuryna (BA)		2* (1–3)	
kwas dichlorofcnoksyoctowy (2,4-D)	0,2* (0,01–0,4)	0* (0–1)	0* (0–1)
kwas indolilo – 3 masłowy (IBA)	0* (0–1)	0* (0–3)	5,28* (3,5–7,5)
Pozostałe składniki (g/l)	A	B	C
agargel	4,0* (2–5)		4,4* (2–5)
pH pożywki	5,8* (5,0–6,5)		5,7* (5,0–6,5)

Literatura

- Atkinson N. 2019. Ash dieback: one of the worst tree disease epidemics could kill 95% of UK's ash trees. The Conversation, <https://theconversation.com/ash-dieback-one-of-the-worst-tree-disease-epidemics-could-kill-95-of-uks-ash-trees-116567>
- Capuana M. 2012. In Vitro Propagation of Ash (*Fraxinus excelsior* L.) by Somatic Embryogenesis. In: Lambardi M., Ozudogru E., Jain S. (eds) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 994. Humana Press, Totowa, NJ
- Coghlan A. 2012. Are Europe's ash trees finished? New Scientist, www.newscientist.com
- Mockeliunaite, R., Kuusiene, S., 2004. Organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. by isolated mature embryo culture. Acta Univ. Latviensis, Biol. 676,197–200.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473–497.
- FRAXIGEN. 2005. Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK. 128 pp. Ed. Boshier D.
- Nawrot-Chorabik K. 2016. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in Nordmann's fir (*Abies nordmanniana*). Journal of Forestry Research. 27:1219–1228.
- Queloz V., Gruenig C.R., Berndt R., Kowalski T., Sieber T.N., Holdenrieder O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology 41:133–142.
- Sydor M. (2014), Drewno w budowie maszyn: historia najważniejszego tworzywa, Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu ISBN 978-83-7160-629-8.
- Timmermann V., Břrja I., Hietala A.M., Kirisits T., Solheim H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. Bulletin OEPP/EPPO 41: 14–20.
- Woźny A. Przybył K. (red.) 2004. Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro. Wydawnictwo naukowe UAM. str. 82–83.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób pozyskiwania sadzonek jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), **znamienny tym**, że obejmuje otrzymywanie wyselekcjonowanych genotypów tkanki kalusa, a z nich sadzonek *F. excelsior* w hodowlach *in vitro*, na drodze pośredniej organogenezy przybyszowej, z zarodków zygotycznych izolowanych z dojrzałych nasion, przy czym:
 - a) nieuszkodzone nasiona jesionu wyniosłego pozbawia się skrzydlaków a następnie dezynfekuje wstępnie roztworem wodnym etanolu, korzystnie o stężeniu 70% wag., opłukuje wodą, odtłuszcza się roztworem wodnym polisorbatu 80 (Tween 80), i ponownie opłukuje wodą, a następnie
 - b) nasiona dezynfekuje się w warunkach sterylnych wodnym roztworem poliwinylpirolidonu, korzystnie o stężeniu 5% wag., ponownie kontaktuje się z roztworem wodnym etanolu, korzystnie o stężeniu 70% wag., opłukuje sterylną wodą dejonizowaną, a następnie dezynfekuje się wodnym roztworem podchlorynu sodu, korzystnie w stężeniu od 6 do 14%, po czym opłukuje się sterylną wodą dejonizowaną,
 - c) z nasion odseparowuje się zarodek zygotyczny i umieszcza go na pierwszej pożywce stałej i inkubuje, korzystnie w temperaturze pokojowej przez 3–4 tygodni, do wytworzenia tkanki kalusa przez zarodki zygotyczne uzyskując siewki pierwotne,
 - d) siewki pierwotne przenosi się na drugą pożywkę stałą, ewentualnie tnie na mniejsze fragmenty zawierające tkankę kalusa, i inkubuje, korzystnie w temperaturze pokojowej przez 2 tygodnie, do uzyskania wykształconych fizjologicznie siewek wtórnych, korzystnie o długości pędu około 5–7 mm, dobrze wybarwionych chlorofilem, z liścieniami i korzonkiem zarodkowym o długości około 5 mm,

e) siewki wtórne przenosi się na trzecią pożywkę stałą i inkubuje, do uzyskania wykształconych fizjologicznie sadzonek jesionu wyniosłego, korzystnie o wysokości pędu 15–20 mm z dobrze wykształconymi korzeniami, średnio o długości 10 mm, i liśćmi, gotowych do wysadzenia w glebie,

przy czym jako pierwszą pożywkę stałą stosuje się pożywkę do wytwarzania przez zarodki zygotyczne tkanki kalusa, jej proliferacji i uzyskiwania siewek pierwotnych jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) zawierającą:

NH ₄ NO ₃	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO ₃	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
CaCl ₂ x 2H ₂ O	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
MgSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH ₂ PO ₄	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 20–39 µg/l, korzystnie 27,8 µg/l,
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	w stężeniu 15–39 µg/l, korzystnie 22,0 µg/l,
KI	w stężeniu 0,20–1,30 µg/l, korzystnie 0,83 µg/l,
H ₃ BO ₃	w stężeniu 4,0–8,2 µg/l, korzystnie 6,2 µg/l,
MnSO ₄ x 4H ₂ O	w stężeniu 14–34 µg/l, korzystnie 22,3 µg/l,
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 6–10,5 µg/l, korzystnie 8,6 µg/l,
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	w stężeniu 0,10–0,45 µg/l, korzystnie 0,25 µg/l,
CuSO ₄ x 5H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 µg/l, korzystnie 0,025 µg/l,
CoSO ₄ x 6H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 µg/l, korzystnie 0,025 µg/l,

jako składniki organiczne:

kwask nikotynowy	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 10000–30000 mg/ml, korzystnie 20000 mg/ml,

jako regulatory wzrostu:

6-benzyladeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwask dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0,01–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
kwask indolilo-3 masłowy	w stężeniu 0–1 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,
a jako składnik żelujący agargel	w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5,	korzystnie o pH wynoszącym 5,8,
natomiast jako drugą pożywkę stałą	stosuje się pożywkę do uzyskiwania siewek wtórnych z siewek pierwotnych jesionu wyniosłego (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) zawierającą:

jako makroelementy:

NH ₄ O ₃	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO ₃	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
CaCl ₂ x 2H ₂ O	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
MgSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH ₂ PO ₄	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 20–39 µg/l, korzystnie 27,8 µg/l,
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	w stężeniu 15–39 µg/l, korzystnie 22,0 µg/l,
KI	w stężeniu 0,20–1,30 µg/l, korzystnie 0,83 µg/l,
H ₃ BO ₃	w stężeniu 4,0–8,2 µg/l, korzystnie 6,2 µg/l,
MnSO ₄ x 4H ₂ O	w stężeniu 14–34 µg/l, korzystnie 22,3 µg/l,
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 6–10,5 µg/l, korzystnie 8,6 µg/l,
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	w stężeniu 0,10–0,45 µg/l, korzystnie 0,25 µg/l,
CuSO ₄ x 5H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 µg/l, korzystnie 0,025 µg/l,
CoSO ₄ x 6H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 µg/l, korzystnie 0,025 µg/l,

jako składniki organiczne:

kwask nikotynowy	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 10000–30000 mg/ml, korzystnie 20000 mg/ml,

jako regulatory wzrostu:

6-benzyloadeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwask dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0–1 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,
kwask indolilo-3 masłowy	w stężeniu 0–3 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,

a jako składnik żelujący agargel w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5, korzystnie o pH wynoszącym 5,8,
a jako trzecią pożywkę stałą stosuje się pożywkę do uzyskiwania sadzonek z siewek wtórnych
jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) zawierającą:

jako makroelementy:

NH ₄ O ₃	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO ₃	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
CaCl ₂ x 2H ₂ O	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
MgSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH ₂ PO ₄	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 20–39 µg/l, korzystnie 27,8 µg/l,
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	w stężeniu 15–39 µg/l, korzystnie 22,0 µg/l,
KI	w stężeniu 0,15–0,55 µg/l, korzystnie 0,41 µg/l,
H ₃ BO ₃	w stężeniu 1,50–4,50 µg/l, korzystnie 3,15 µg/l,
MnSO ₄ x 4H ₂ O	w stężeniu 7,50–13,50 µg/l, korzystnie 11,15 µg/l,
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 2,50–5,50 µg/l, korzystnie 4,3 µg/l,
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	w stężeniu 0,05–0,325 µg/l, korzystnie 0,125 µg/l,
CuSO ₄ x 5H ₂ O	w stężeniu 0,060–0,185 µg/l, korzystnie 0,0125 µg/l,
CoSO ₄ x 6H ₂ O	w stężeniu 0,060–0,185 µg/l, korzystnie 0,0125 µg/l,

jako składniki organiczne:

kwask nikotynowy	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,25 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,25 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,05–0,3 mg/ml, korzystnie 0,1 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 5000–15000 mg/ml, korzystnie 10000 mg/ml,

jako regulatory wzrostu:

6-benzyloadeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwask dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0,01–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
kwask indolilo-3 masłowy	w stężeniu 3,5–7,5 mg/ml, korzystnie 5,28 mg/ml,

a jako składnik żelujący agargel w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4,4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5, korzystnie o pH wynoszącym 5,7.

- Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dezynfekcję etanolem w etapie a) i w etapie b) prowadzi się przez 30 sekund.
- Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie a) płukanie prowadzi się wodą o temperaturze 18°C.
- Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) dezynfekcję wodnym roztworem poliwinylpirolidonu prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze 7°C.
- Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) dezynfekcję wodnym roztworem podchlorynu sodu prowadzi się przez 15 minut.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie c) hodowlę prowadzi się w ciemności w temperaturze 24°C +/- 1°C i wilgotności powietrza 40–45%.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie d) hodowlę prowadzi się w wilgotności 40–45%, temperaturze 23°C +/- 1°C, naświetlając światłem białym LED o natężeniu promieniowania PAR 300 $\mu\text{mol/s}^{-1}/\text{m}^2$ i fotoperiodem 12 godzin.
8. Pożywka do wytwarzania przez zarodki zygocytyczne tkanki kalusa, jej proliferacji i uzyskiwania siewek pierwotnych jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), **znamienna tym**, że stanowi kompozycję zawierającą:

jako makroelementy:

NH ₄ O ₃	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO ₃	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
CaCl ₂ x 2H ₂ O	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
MgSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH ₂ PO ₄	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 20–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 27,8 $\mu\text{g/l}$,
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	w stężeniu 15–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 22,0 $\mu\text{g/l}$,
KI	w stężeniu 0,20–1,30 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,83 $\mu\text{g/l}$,
H ₃ BO ₃	w stężeniu 4,0–8,2 $\mu\text{g/l}$ korzystnie 6,2 $\mu\text{g/l}$,
MnSO ₄ x 4H ₂ O	w stężeniu 14–34 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 22,3 $\mu\text{g/l}$,
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 6–10,5 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 8,6 $\mu\text{g/l}$,
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	w stężeniu 0,10–0,45 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,25 $\mu\text{g/l}$,
CuSO ₄ x 5H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,025 $\mu\text{g/l}$,
CoSO ₄ x 6H ₂ O	w stężeniu 0,010–0,045 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,025 $\mu\text{g/l}$,

jako składniki organiczne:

kwask nikotynowy	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 10000–30000 mg/ml, korzystnie 20000 mg/ml,

jako regulatory wzrostu:

6-benzyloadeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwask dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0,01–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
kwask indolilo-3 masłowy	w stężeniu 0–1 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,
a jako składnik żelujący agargel	w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5,	korzystnie o pH wynoszącym 5,8.

9. Pożywka do uzyskiwania siewek wtórnych z siewek pierwotnych jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), **znamienna tym**, że stanowi kompozycję zawierającą:

jako makroelementy:

NH ₄ O ₃	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO ₃	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
CaCl ₂ x 2H ₂ O	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
MgSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH ₂ PO ₄	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 20–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 27,8 $\mu\text{g/l}$,
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	w stężeniu 15–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 22,0 $\mu\text{g/l}$,
KI	w stężeniu 0,20–1,30 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,83 $\mu\text{g/l}$,
H ₃ BO ₃	w stężeniu 4,0–8,2 $\mu\text{g/l}$ korzystnie 6,2 $\mu\text{g/l}$,
MnSO ₄ x 4H ₂ O	w stężeniu 14–34 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 22,3 $\mu\text{g/l}$,
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	w stężeniu 6–10,5 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 8,6 $\mu\text{g/l}$,

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,10–0,45 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,25 $\mu\text{g/l}$,
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,010–0,045 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,025 $\mu\text{g/l}$,
$\text{CoSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,010–0,045 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,025 $\mu\text{g/l}$,

jako składniki organiczne:

kwasy nikotynowy	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,2–0,75 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 10000–30000 mg/ml, korzystnie 20000 mg/ml,

jako regulatory wzrostu:

6-benzyladeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwasy dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0–1 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,
kwasy indolilo-3 masłowy	w stężeniu 0–3 mg/ml, korzystnie 0 mg/ml,
a jako składnik żelujący agargel	w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5,	korzystnie o pH wynoszącym 5,8.

10. Pożywka do uzyskiwania sadzonek z siewek wtórnych jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), **znamienna tym**, że stanowi kompozycję zawierającą:

jako makroelementy:

NH_4O_3	w stężeniu 525–1150 mg/ml, korzystnie 825 mg/ml,
KNO_3	w stężeniu 650–1275 mg/ml, korzystnie 950 mg/ml,
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 100–335 mg/ml, korzystnie 220 mg/ml,
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 65–300 mg/ml, korzystnie 185 mg/ml,
KH_2PO_4	w stężeniu 15–200 mg/ml, korzystnie 85 mg/ml,

jako mikroelementy:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 20–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 27,8 $\mu\text{g/l}$,
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 15–39 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 22,0 $\mu\text{g/l}$,
KI	w stężeniu 0,15–0,55 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,41 $\mu\text{g/l}$,
H_3BO_3	w stężeniu 1,50–4,50 $\mu\text{g/l}$ korzystnie 3,15 $\mu\text{g/l}$,
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 7,50–13,50 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 11,15 $\mu\text{g/l}$,
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 2,50–5,50 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 4,3 $\mu\text{g/l}$,
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,05–0,325 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,125 $\mu\text{g/l}$,
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,060–0,185 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,0125 $\mu\text{g/l}$,
$\text{CoSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	w stężeniu 0,060–0,185 $\mu\text{g/l}$, korzystnie 0,0125 $\mu\text{g/l}$,

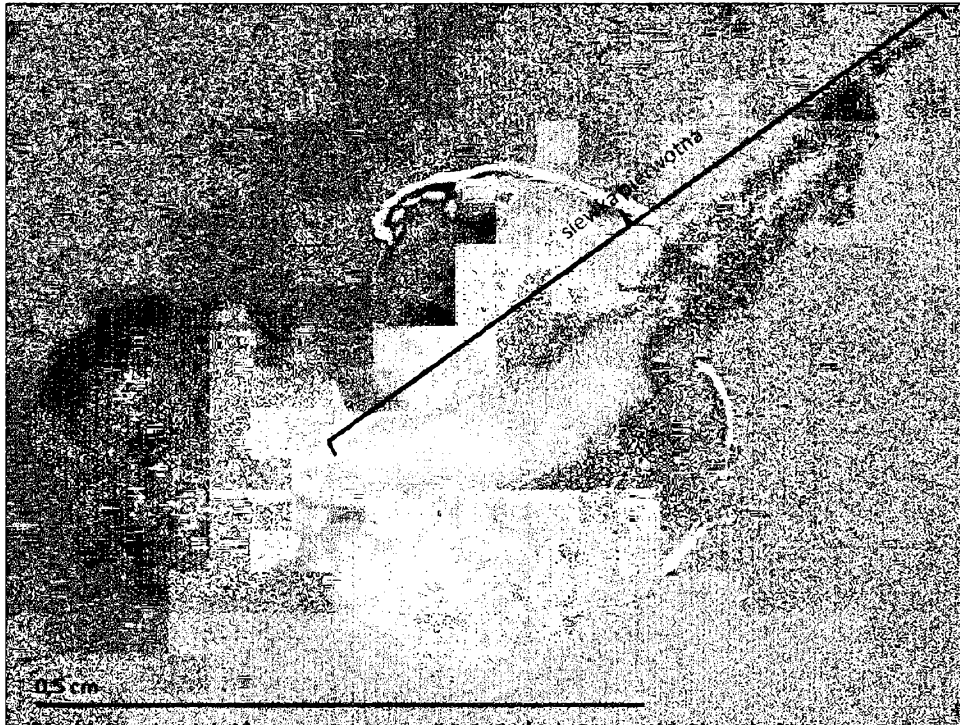
jako składniki organiczne:

kwasy nikotynowy	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,25 mg/ml,
pirydoksyna-HCl	w stężeniu 0,1–0,4 mg/ml, korzystnie 0,25 mg/ml,
tiamina-HCl	w stężeniu 0,05–0,3 mg/ml, korzystnie 0,1 mg/ml,
glicynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
inozytol	w stężeniu 50–130 mg/ml, korzystnie 100 mg/ml,
sacharozę	w stężeniu 5000–15000 mg/ml, korzystnie 10000 mg/ml,

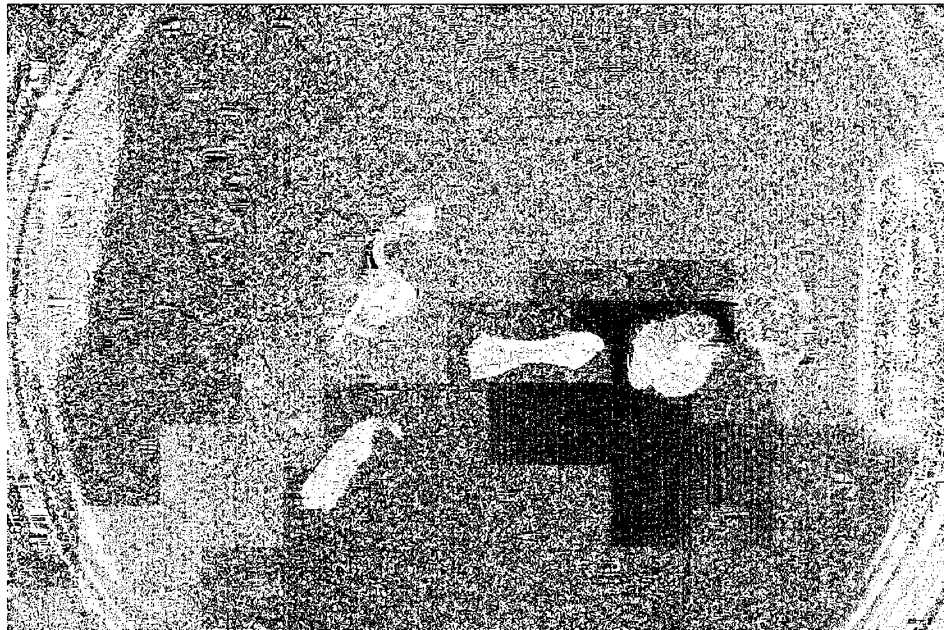
jako regulatory wzrostu:

6-benzyladeninopurynę	w stężeniu 1–3 mg/ml, korzystnie 2 mg/ml,
kwasy dichlorofenoksyoctowy	w stężeniu 0,01–0,4 mg/ml, korzystnie 0,2 mg/ml,
kwasy indolilo-3 masłowy	w stężeniu 3,5–7,5 mg/ml, korzystnie 5,28 mg/ml,
a jako składnik żelujący agargel	w stężeniu od 2 do 5 g/l, korzystnie 4,4 g/l,
oraz posiadającą pH w zakresie 5,0–6,5,	korzystnie o pH wynoszącym 5,7.

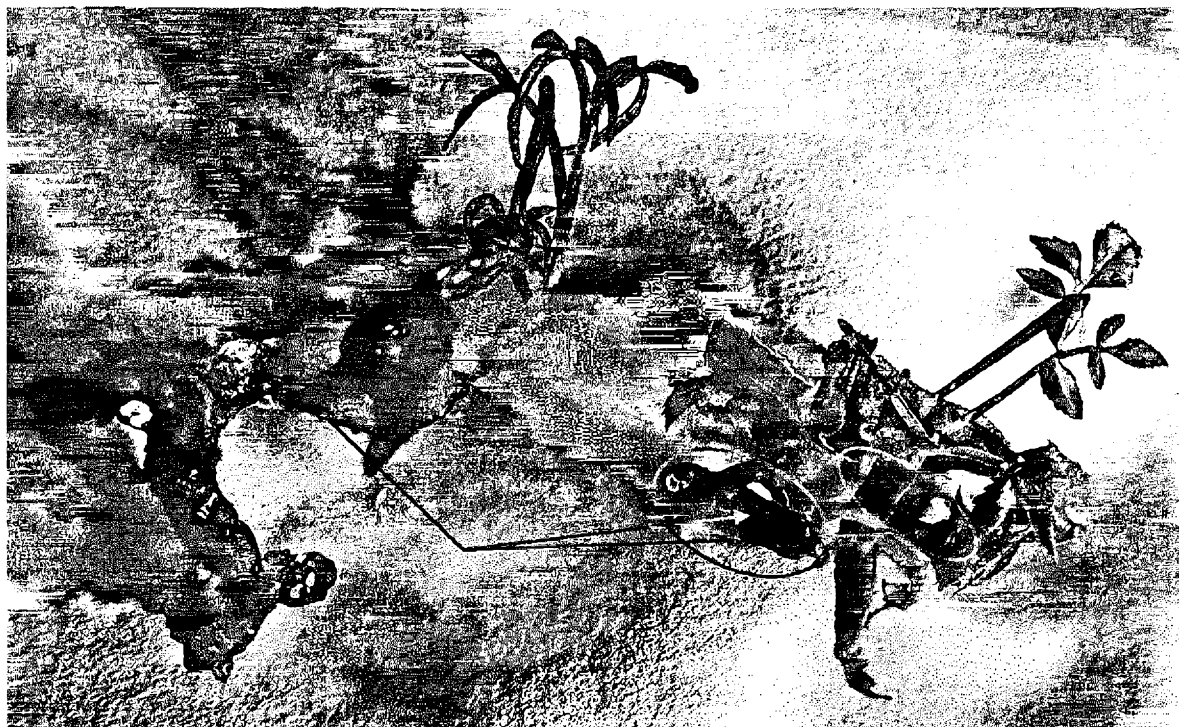
Rysunki



Kalus jesionu wyniosłego z uformowaną siewką pierwotną
Fig. 1



Pocięta siewka pierwotna z fragmentami kalusa po 5 dniach od pasażu na nowe podłoże hodowlane
Fig. 2



Siewki wtórne wytworzone na zaznaczonych fragmentach siewek pierwotnych jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.)

Fig. 3



W pełni wykształcone sadzonka jesionu wyniosłego

Fig. 4



Sadzonka jesionu w wazonowej kulturze ziemnej

Fig. 5