

## INDUKCE ORGANOGENEZE U JÍROVCE MAĎALU (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.)

### ORGANOGENESIS INDUCTION IN HORSE CHESTNUT (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.)

HANA VEJSADOVÁ<sup>1)</sup> - JANA ŠEDIVÁ<sup>1)</sup> - HELENA VLAŠÍNOVÁ<sup>2)</sup> - LADISLAV HAVEL<sup>2)</sup> - JOSEF MERTELÍK<sup>1)</sup> - KATEŘINA KLOUDOVÁ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice

<sup>2)</sup>Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno

### ABSTRACT

Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) belongs to horticulturally valuable woody species. Successfulness of its planting in Europe has decreased due to a pest invasion, the horse chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* DESCHKA & DIMIC, 1986. Research objective of this work was to induce organogenesis in explants taken from seedlings of horse chestnut individuals. Explants (shoot tips of vegetative buds, petiole and shoot segments) collected in the winter and the summer were cultured on WPM and MS medium. The endogenous bacterial and yeast contamination was showed to be limiting factor of regeneration induction in the winter buds. In spite of application of wide-spectrum antibiotics (Hygromycin, Timentin, Cefotaxim) into the medium and bud surface treatment using Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension and Amphotericin B, no viable in vitro culture was derived. However shoot tips of summer buds were found as the most suitable and responsive explants with none or low rate of microbial infection (13%) and high proliferation rate (up to 80%). Benzyladenine (BA) and naphthylacetic acid (NAA) were positive factors of organogenesis induction.

**Klíčová slova:** jírovec maďal, vegetativní pupeny, antibiotika, in vitro regenerace

**Key words:** horse chestnut, vegetative buds, antibiotics, in vitro regeneration

### ÚVOD

Jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum* L.), čeleď jírovcovité (*Hippocastanaceae*) pochází z jihovýchodní Evropy (Albánie, severní Řecko). Po mnoho let nebylo místo původu známé, protože byl do evropských zahrad přivážen z Turecka. V České republice je vysazován v lesích, parcích a alejích, ale poměrně často také zplaňuje. V současné době je rozšířen po celé Evropě, kromě severu, a v celém mírném pásu Severní Ameriky. Jedná se o evropský endemit a zároveň třetihorní relikv.

Z rostlinolékařského hlediska byl jírovec maďal po dlouhá léta bezproblémovou vitální a stresům odolnou dřevinou dobře využitelnou v zátěžovém prostředí. Změnu přinesl první výskyt klíněnky jírovcové (*Cameraria ohridella*) u Ohridského jezera v Makedonii (DESCHKA & DIMIC, 1986). Původ tohoto škůdce není doposud objasněn (KENIS et al. 2004). V poměrně krátké době se klíněnka rozšířila po celé Evropě (SKUHRÁVÝ 1999). V ČR byla poprvé zjištěna v roce 1993 na lokalitách Lednice, Valtice a Břeclav (LIŠKA 1997). Díky svému opakovanému přemnožování se stala nejvýznamnějším škůdcem jírovců. Larvy vyžírají parenchym listů a způsobují tzv. minování. Toto výrazné poškození listů v interakci s ostatními škodlivými činiteli způsobuje intenzivní nekrózu, svinování listů a předčasnou defoliaci, což představuje riziko pro zdravotní stav stromů. Klíněnka přezimuje ve stadiu cca 3 – 4 mm dlouhé, tmavohnědé kukly uvnitř listu ve formě útvarů podobných kokonu. I když během zimního období může být mortalita kukel v opadaném listu poměrně vysoká (GIRARDOZ et al. 2004), obecně k výraznému celkovému snížení

poškození listů minováním nedochází. Pro přímou ochranu jírovce je používán systém postřiků insekticidy (ŠEPROVÁ 2001) a feromonové lapače (SVATOŠ et al. 1999), pro nepřímou ochranu metoda likvidace opadaného listu s kuklami škůdce. Negativa těchto opatření spočívají v riziku pro životní prostředí, v ekonomické a pracovní náročnosti a v některých případech velmi omezené účinnosti. Perspektivní řešení ochrany nových výsadeb jírovců spočívá v nalezení přirozené rezistence jírovce maďalu k *C. ohridella* v ČR (MERTELÍK et al. 2004) a využití vytvořeného patentovaného klonového materiálu Mertelík-06 s ověřeným rezistentním chováním (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2006). Tento rostlinný materiál je udržován formou roubovanců v matečnici a slouží jako základní materiál pro další experimentální práci. Jedním z cílů výzkumu je vypracovat metody množení klonu Mertelík-06 technikou explantátových kultur. Výhodou in vitro metod je namnožení vybraných genotypů dřevin v relativně krátké době. Regenerace rostlinného materiálu probíhá dvěma způsoby, buď pomocí organogeneze nebo embryogeneze. U *Aesculus hippocastanum* je většina prací zaměřena na indukci embryogeneze (GASTALDO et al. 1994, CAPUANA, DEBERGH 1997, TROCH et al. 2009). RADOJEVIČ (1978) obdržel haploidní embrya z prašnickových kultur, DAMERI et al. (1986) i GASTALDO et al. (1996) indukovali somatickou embryogenezi z listových explantátů. PROFUMO et al. (1991) indukovali regeneraci výhonů z kotyledonů zralých semen a KAMENICKÁ a RYPÁK (1988) odvodili kalusovou kulturu z embryí izolovaných ze semen. Nejúspěšnější metodou, která se osvědčila pro klonové množení zejména listnatých dřevin, je organogeneze (MALÁ et al. 1999). U jírovce maďalu však úda-

je o indukci organogeneze téměř chybí. Byl zjištěn stimulační vliv cytokininů na iniciaci organogeneze u vegetativních pupenů (TRIPPI 1963, PUDEPHAT et al. 1997, SAN JOSE et al. 2001, ŠEDIVÁ et al. 2004, MAGNUSSON et al. 2009).

Cílem této práce bylo zjistit podstatné faktory indukce organogeneze u vegetativních pupenů jírovce maďalu. Byl studován účinek povrchové sterilizace, typu explantátu, růstových regulátorů a aktivního uhlí na regeneraci výhonů. U explantátů byl také vyhodnocen vliv širokospektrálních antibiotik na míru mikrobiální kontaminace.

## MATERIÁL A METODY

### Rostlinný materiál, povrchová sterilizace a aplikace antibiotik

Odběr rostlinného materiálu byl proveden ze semenáčků *A. hippocastanum* (PS 5046/AH) v období leden, únor, duben, červenec, srpen 2008 a únor, duben 2009. Terminální a axilární pupeny byly povrchově sterilizovány (po krátkém opláchnutí 70% etanolem, případně acetonem) 2,5% chlornanem sodným (50% komerční přípravek Savo) s přídavkem jedné kapky Tweenu po dobu 20 – 30 min nebo 0,1 – 0,2% roztokem HgCl<sub>2</sub> (10 min), poté byly 3 – 5x opláchnuty ve sterilní destilované vodě. Ze sterilních pupenů byly vypreparované meristémy vzrostných vrcholů s 1 – 2 listovými primordií umístěny přímo na agarové médium nebo na můstky z filtračního papíru v tekutém médiu.

Vzhledem k počáteční vysoké endogenní kontaminaci explantátů ze zimních pupenů byly použity dva postupy aplikace směsi antibiotik:

1. Antibiotika (Hygromycin, Cefotaxim, Timentin) byla přidána do kultivačního média tak, aby zahrnovala široké spektrum proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Po týdnu na kultivačním médiu s antibiotiky byly explantáty přeneseny na médium bez antibiotik.
2. Po povrchové sterilizaci byly zimní pupeny ošetřeny antibiotiky (Sigma): Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension po dobu 24 hod. v doporučené (10 ml.l<sup>-1</sup>) a dvojnásobné dávce s adicí Amphothericinu B. Po odstranění šupin byly pupeny s několika základy listů kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách na pevném médiu bez antibiotik, překrytém vrstvou tekutého média s přídavkem směsi antibiotik.

Pro srovnávací pokusy byly testovány explantáty odebrané z vegetativních pupenů jedinců z pokusného pozemku VÚKOZ, v. v. i., a lokality ve východních Čechách i Brna.

### Iniciační živná média a kultivační podmínky

Byla použita dvě základní média:

1. WPM (LLOYD, MCCOWN 1980), médium (Duchefa), které obsahovalo plnou koncentraci základních mikro/makroelementů a vitaminů s přídavkem 0,5 mg.l<sup>-1</sup> benzyladeninu (BA). Pro zpevnění média byl použit 7 g.l<sup>-1</sup> agar (Sigma).
2. MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) médium s poloviční koncentrací solí (kromě CaCl<sub>2</sub>), obsahující 2 g.l<sup>-1</sup> PVP (polyvinylpyrolidon), 2,5 g.l<sup>-1</sup> aktivního uhlí, 2% sacharózu, 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BA, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA (kyselina naftyloctová) a 7 g.l<sup>-1</sup> agar (Sigma).

Před autoklavováním bylo pH živných médií upraveno na 5,8 – 6,0. Explantáty byly kultivovány týden v termostatu (22 ± 2 °C) ve tmě, pak v kultivační místnosti s foteriodou 16/8 h (světlo/tma) při teplotě 23/19 °C (den/noc) a světelné intenzitě 55 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (zářivky). Subkultivace na čerstvá média probíhala v intervalu 3 – 6 týdnů.

## VÝSLEDKY

### Vliv povrchové sterilizace a doby odběru pupenů na regeneraci explantátů

Hodnocení účinnosti použitých sterilizačních postupů bylo provedeno bez rozlišení použitých klonů (tab. 1). Při založení primárních kultur ze zimních pupenů byla mikrobiální kontaminace vysoká (86 – 100 %) bez ohledu na typ a kombinaci sterilizačních činidel. V jarním období (duben) s použitím antibiotik poklesla kontaminace explantátů na 60 % a v letním období (červenec, srpen) byla kontaminace minimální (0 – 13 %). Bez ohledu na dobu odběru byl vždy větší podíl infekce způsoben endogenními mikroorganismy (bakterie, kvasinky). Regenerace explantátů v období leden – duben byla nízká (0 – 17 %) a po dalším přenesení na čerstvé živné médium došlo k jejich nekróze. Při odběru letních pupenů v období červenec – srpen regenerovalo 50 – 80 % explantátů, a to především z důvodu nižší bakteriální kontaminace. Po přenosu na čerstvé médium se stejným složením se vytvořily nové výhonky (obr. 1).

### Vliv testovaných antibiotik na míru mikrobiální kontaminace explantátů

Vliv antibiotik v médiu na míru kontaminace explantátů u zimních pupenů jedinců z pokusného pozemku ve VÚKOZ, v. v. i., a z lokality ve východních Čechách ukazuje tabulka 2. Po 10 dnech



Obr. 1. Primární kultura *A. hippocastanum*  
Primary culture of *A. hippocastanum*

**Tab. 1.**

Vliv doby odběru a sterilizačních agens na míru kontaminace a proliferaci explantátů u *A. hippocastanum* po 20 dnech  
Influence of collection time and sterilization agents on contamination rate and explant proliferation in *A. hippocastanum* after 20 days

Doba odběru pupenů <sup>1/</sup> Bud collection time	Sterilizace <sup>2/</sup> Sterilization	Použití antibiotik <sup>3/</sup> Antibiotic application	Počet explantátů/ Explant no.	Kontaminace/Contamination (%)		Regenerace/ Regeneration (%)
				F	B/K	
Leden/January	S	–	50	22	78	0
Únor/February	S+H	–	22	0	86	14
Duben/April	S+H	+	30	7	53	17
Červenec/July	S	+	30	0	0	80
Srpen/August	S	+	16	0	13	50

<sup>1</sup>Každá hodnota znamená průměry z experimentu v roce 2008 a 2009/Each value represents the means of experiment in 2008 and 2009;

<sup>2</sup>S – 50% Savo/Commercial bleach (30 min) H – 0,2% HgCl<sub>2</sub> (10 min)

<sup>3</sup>Ošetření explantátů/Explant treatment with Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension (10 ml.l<sup>-1</sup>); F – plíseň/mildew; B/K – bakterie nebo kvasinky/bacteria or yeast

**Tab. 2.**

Vliv antibiotik v médiu na míru kontaminace explantátů u zimních pupenů *A. hippocastanum* po 10 dnech  
Influence of antibiotics in the medium on contamination rate of explants in *A. hippocastanum* winter buds after 10 days

	Kontaminace/Contamination (%)							
	Doba odběru pupenů <sup>1/</sup> Bud collection time							
	Únor/February				Duben/April			
	1		2		1		2	
	F	B/K	F	B/K	F	B/K	F	B/K
A	0	100	0	0	0	100	0	100
B	100	100	0	100	100	100	0	100
C	0	100	0	100	0	100	0	100
D	100	100	100	100	0	100	0	100
E	100	100	100	100	100	100	0	100

<sup>1</sup>Explantáty z donorových stromů/Explants from donor trees in the year 2008;

1 – pozemek/trial: VÚKOZ, v. v. i., 2 – lokalita východní Čechy/locality in the eastern Bohemia; A – Hygromycin (40 mg.l<sup>-1</sup>) + Timentin (200 mg.l<sup>-1</sup>); B – Hygromycin (40 mg.l<sup>-1</sup>) + Timentin (200 mg.l<sup>-1</sup>) + Cefotaxim (100 mg.l<sup>-1</sup>); C – Hygromycin (40 mg.l<sup>-1</sup>) + Timentin (500 mg.l<sup>-1</sup>) + Cefotaxim (100 mg.l<sup>-1</sup>); D – Hygromycin (40 mg.l<sup>-1</sup>) + Timentin (200 mg.l<sup>-1</sup>) + Cefotaxim (200 mg.l<sup>-1</sup>); E – kontrola bez antibiotik/control without antibiotics; F – plíseň/mildew; B/K – bakterie nebo kvasinky/bacteria or yeast

se mikrobiální kontaminace neprojevila pouze u explantátů jedinců z lokality ve východních Čechách ošetřených směsí Hygromycinu (40 mg.l<sup>-1</sup>) a Timentinu (200 mg.l<sup>-1</sup>); ale po 20 dnech všechny explantáty znekratizovaly. U pupenů odebraných v dubnu byly všechny testované varianty kontaminovány bakteriemi nebo kvasinkami.

Žádná mikrobiální kontaminace a 100% regenerace (tab. 3) byla pozorována po 20 dnech u explantátů, které byly izolovány ze zimních pupenů jedinců ze stanoviště v Brně, které byly ošetřeny po dobu 24 hod. doporučenou (10 ml.l<sup>-1</sup>) dávkou Antibiotic-Antimycotic směsi (ošetření A) a kultivovány na pevném médiu bez antibiotik, přelitým tekutým médiem s dvojnásobnou dávkou A (20 ml.l<sup>-1</sup>). Adice Amphotericinu B v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (ošetření B), varianty 2A+B a pak 1A+B nebo 1A+B a následně 1A+B, snížila

mikrobiální kontaminaci na 50 % a explantáty z 50 % regenerovaly. Dlouhodobá kultivace za přítomnosti dvojnásobných dávek obou antibiotik ale vedla k nekrotóze.

#### Vliv typu explantátu a NAA na indukci organogeneze

Jako nejvíce responsabilní primární explantáty byly zjištěny vzrostlé vrcholy, u kterých regenerovaly výhony na médiích s 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA (tab. 4). Ve srovnání se samotným BA, kdy regenerovalo 20 % explantátů, přítomnost auxinu NAA regeneraci zvýšila na 35 %, ale počet výhonů neovlivnila. U řapíků a nodálních segmentů stonku se po 6 týdnech vytvořil kalus, u řapíků k regeneraci výhonů nedošlo a u nodálních segmentů se vytvořily adventivní výhony.

**Tab. 3.**

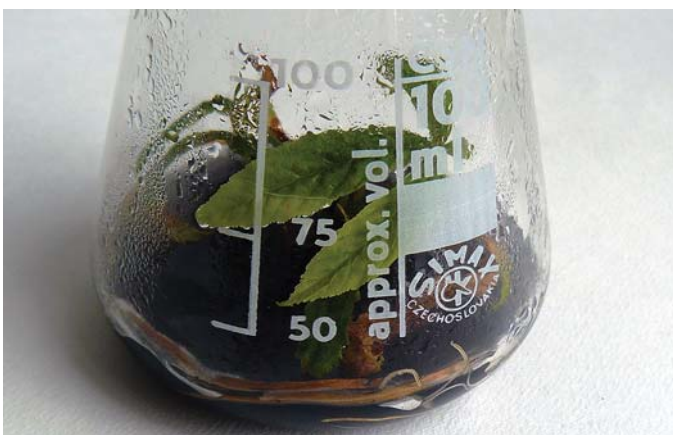
Efekt dvou následných ošetření pupenů antibiotiky na míru kontaminace explantátů u *A. hippocastanum* po 20 dnech  
Effect of two successive bud treatments using antibiotics on contamination rate of explants in *A. hippocastanum* after 20 days

Ošetření pupenů <sup>1</sup> /Bud treatments		Kontaminace/Contamination (%)		Regenerace/Regeneration (%)	Nekróza/Necrosis (%)
1.	2.	F	B/K		
1A	1A	0	0	0	100
1A	2A	0	0	100	0
1A	2A+B	0	0	0	100
1A	1A+B	0	0	0	100
2A	1A	0	0	0	100
2A	2A	0	100	0	100
2A	2A+B	0	100	0	100
2A	1A+B	0	0	0	100
2A+B	1A	0	100	0	100
2A+B	2A	0	100	0	100
2A+B	2A+B	0	100	0	100
2A+B	1A+B	0	50	50	50
1A+B	1A	100	0	0	100
1A+B	2A	0	100	0	100
1A+B	2A+B	0	50	0	100
1A+B	1A+B	0	50	50	50

<sup>1</sup>Explantáty z donorových stromů v Brně/Explants from donor trees in Brno; 1A – 10 ml.l<sup>-1</sup> Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension; 2A – 20 ml.l<sup>-1</sup>; 1A+B – 10 ml.l<sup>-1</sup> +25 mg.l<sup>-1</sup> Amphotericin B; 2A + B – 20 ml.l<sup>-1</sup> + 25 mg.l<sup>-1</sup> Amphotericin B; F – plíseň/mildew; B/K – bakterie nebo kvasinky/bacteria or yeast

### Vliv aktivního uhlí na regeneraci výhonů

Při polovičním zásobení živin v MS médiu s obsahem aktivního uhlí nebyla pozorována vyšší regenerace výhonů, ale jejich průměrný počet na explantát se zvýšil (tab. 5) a došlo také k tvorbě kořenů (obr. 2).

**Obr. 2.**

Tvorba kořenů u *A. hippocastanum*  
Root formation in *A. hippocastanum*

### DISKUSE A ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit podstatné faktory indukce organogeneze u vegetativních pupenů jírovce maďalu. Mikropropagační technologie lze s úspěchem využít u řady druhů listnatých dřevin a na úspěšné založení primárních kultur má podstatný vliv řada faktorů, jako je zajištění vhodných kultivačních podmínek (chemické složení živného média, teplota, vlhkost a světelný režim). Významně ovlivňuje úspěšnost organogeneze i stáří a fyziologický stav dárcovského jedince, doba sběru, způsob a délka skladování zdrojového materiálu, povrchová sterilizace a technika preparace explantátů (MALÁ et al. 1999). V našich experimentech jsme se zaměřili na výběr vhodné povrchové sterilizace explantátů, odstranění bakteriální a kvasinkové kontaminace a vlivu některých složek živného média na regeneraci výhonů.

U jírovce maďalu neexistuje mnoho údajů o indukcii organogeneze, většina prací se zabývá somatickou embryogenezí (GASTALDO et al. 1994, CAPUANA, DEBERGH 1997, TROCH et al. 2009) nebo studiem produkce sekundárních metabolitů (GASTALDO et al. 1996). Z tohoto důvodu jsme navázali na naše předchozí výsledky (ŠEDIVÁ et al. 2004) a použili jsme jako základní primární explantáty meristémy vzrostného vrcholu. Současně byly testovány nodální segmenty stonku a části řapíku. Protože v zimním a jarním období byly explantáty po 20 dnech silně kontaminovány bakteriemi i kvasinkami (bez ohledu na vysoké koncentrace použitých sterilizačních činidel a délku povrchové sterilizace pupenů), byly vyzkoušeny dva způsoby aplikace antibiotik: v prvním byla přidána do kultivačního média, v druhém byly pupeny povrchově ošetřeny různými koncentracemi

**Tab. 4.**

Vliv typu explantátu na regeneraci výhonů u *A. hippocastanum* po 6 týdnech  
Influence of explant type on shoot regeneration in *A. hippocastanum* after 6 weeks

Variety/Treatments	Typ explantátu/Explant type	Regenerace výhonů/ Shoot regeneration (%)	Průměrný počet výhonů na explantát/ Mean shoot no./explant
BA	VV	20	2
	SŘ	K	–
	NS	K	2
BA + NAA	VV	35	2
	SŘ	K	–
	NS	K	3

0,5 mg l<sup>-1</sup> BA; 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA; ½ MS medium

VV – vzrostný vrchol/shoot tip of summer buds, SŘ – segment řapíku/petiole segment, NS – nodální segment/nodal segment, K – kalus/callus

Počet explantátů tvořících výhonu je vyjádřený jako procento z celkového počtu explantátů (25)/The number of explants forming shoots is expressed as percentage of total number of explants used.

**Tab. 5.**

Efekt aktivního uhlí na regeneraci výhonů u vzrostných vrcholů letních pupenů *A. hippocastanum* po 6 týdnech  
Effect of activated charcoal on shoot regeneration of summer bud shoot tips in *A. hippocastanum* after 6 weeks

Variety/Treatments	Regenerace výhonů/ Shoot regeneration (%)	Průměrný počet výhonů na explantát/ Mean shoot no./explant
BA + PVP	50	2
BA + PVP + aktivní uhlí/activated charcoal	50	3
BA + NAA + PVP	80	5
BA + NAA + PVP + aktivní uhlí/activated charcoal	80	6

0,5 mg l<sup>-1</sup> BA; 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA; 2 g l<sup>-1</sup> PVP; 2,5 g l<sup>-1</sup> activated charcoal; ½ MS medium

Primární explantát/Primary explant – vzrostný vrchol letního pupenu/shoot tip of summer bud

přípravku Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension a Amphothericinu B. Tento způsob ošetření pupenů se ukázal jako vhodnější, byla zjištěna nízká míra kontaminace a zvýšené procento proliferace v závislosti na koncentraci antibiotik. Účinné byly doporučené základní koncentrace, dvojnásobné dávky vedly k nekrotizaci explantátů. Přestože došlo k potlačení mikrobiální kontaminace explantátů, regenerace výhonů byla nízká a později došlo k jejich nekrotizaci.

Protože se u zimních pupenů nepodařilo aplikací různých směsí antibiotik spolehlivě odstranit mikrobiální infekci, provedli jsme další pokusy v letním období (červenec – srpen). Zde byla zjištěna minimální bakteriální kontaminace a nejvyšší regenerace výhonů byla vyhodnocena u vzrostných vrcholů letních pupenů. Při použití axilárních pupenů se nepodařilo odvodit žádnou kulturu in vitro na rozdíl od terminálních pupenů, kdy regenerovalo až 80 % explantátů. Stonkové a řapíkové segmenty vytvořily kalus s nízkým či žádným regeneračním potenciálem. Autorům DAMERI et al. (1986) se podařilo indukovat kalus a embryogenní masu u listových explantátů *A. hippocastanum*.

KAMENICKÁ a RYPÁK (1988) získali kalusovou kulturu na MS médiu v přítomnosti BA a kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové (2,4-D). V našich experimentech se podařilo organogenezi stimulovat buď samotným BA v koncentraci 0,5 mg.l<sup>-1</sup> nebo v kombinaci s NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>). Adice aktivního uhlí do média výrazně regenera-

ci explantátů neovlivnila. Pozitivní vliv aktivního uhlí je potřeba vyhodnotit z dlouhodobějšího hlediska včetně jeho potenciálního stimulačního vlivu na multiplikaci kultur (pokusy probíhají) a zakořeňování výhonů.

#### Výsledky lze shrnout do následujících závěrů:

- Rozhodujícím faktorem indukce organogeneze byla doba odběru vegetativních pupenů.
- Nejvhodnějším obdobím pro regeneraci primárních explantátů bylo letní období z důvodů nízké kontaminace explantátů a snížené produkce fenolů.
- Jako účinné sterilizační agens se osvědčil 2,5% chlornan sodný (50% komerční přípravek Savo) s dobou působení 20 – 30 min.
- Kontaminace endogenními mikroorganismy (bakterie a kvasinky) byla po 20 dnech potlačena povrchovým ošetřením zimních pupenů směsí Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension a Amphothericinu B v doporučených základních koncentracích.
- Nejvyšší regenerace výhonů byla vyhodnocena u vzrostných vrcholů letních apikálních pupenů v přítomnosti BA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) a NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>).

**Poděkování:**

Výsledky byly získány za finanční podpory MZe ČR v rámci projektu NAZV č. QH81101.

**LITERATURA**

- CAPUANA M., DEBERGH P. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48: 23-29.
- DAMERI R. M., CAFFARO L., GASTALDO P., PROFUMO P. 1986. Callus formation and embryogenesis with leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Journal of Plant Physiology*, 126: 93-96.
- DESCHKA G., DIMIC N. 1986. *Cameraria ohridella* n. sp. aus Mazedonien, Jugoslawien (*Lepidoptera, Lithocellettidae*). *Acta Entomologica Jugoslaviae*, 22: 11-23.
- GASTALDO P., CARLI S., PROFUMO P. 1994. Somatic embryogenesis from stem explants of *Aesculus hippocastanum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 97-99.
- GASTALDO P., CAVIGLIA A. M., CARLI S., PROFUMO P. 1996. Somatic embryogenesis and esculin formation in calli and embryoids from bark explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Plant Science*, 119: 157-162.
- GIRARDOZ S., KENIS M., QUICKE D. 2004. Mortality factors affecting the different developmental stages of *Cameraria ohridella* DESCHKA & DIMIC in Switzerland. In: Abstract of papers of 1st International Cameraria Symposium – *Cameraria ohridella* and other invasive leaf-miners in Europe. Praha: IOCB ASCR: 11 s.
- KAMENICKÁ A., RYPÁK M. 1988. Optimalizácia rastu kalusového kultúry pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L) vo vzťahu k rastovým regulátorom. *Biologia (Bratislava)*, 43: 61-69.
- KENIS M., AVTZIS N., FREISE J., GIRARDOZ S., GRABENWEGER G., HEITLAND W., LAKATOS F., LOPEZ VAAMONDE C., SVATOŠ A., TOMMOW R. I. 2004. Finding the area of origin of the horse chestnut leaf miner. Where are we today? In: Abstract of papers of 1st International Cameraria Symposium – *Cameraria ohridella* and other invasive leaf-miners in Europe. Praha: IOCB ASCR: 19 s.
- LIŠKA J. 1997. Verbreitung der Rosskastanienminiermotte in der Tschechischen Republik. *Forstschutz Aktuell*, 21: 5.
- LLOYD G., MCCOWN B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagators' Society Proceedings*, 30: 421-427.
- MAGNUSSON V. A., CASTILLO C. M., DAI W. 2009. Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. *Acta Horticulturae*, 812: 185-188.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ŠÍMA P. 1999. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých lesních dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 44/4: 6-11.
- MERTELIK J., KLOUDOVÁ K., VANC P. 2004. Occurrence of *Aesculus hippocastanum* with high degree of resistance to *Cameraria ohridella* in the Czech Republic. *Acta fytotechnica et zootecnica*, 7: 204.
- MERTELIK J., KLOUDOVÁ K. 2006. Klon *Aesculus hippocastanum* MERTELIK 06 s rezistentním chováním ke *Cameraria ohridella* - patent č. 296896. *Věstník č. 7/2006*.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- SAN JOSE M. C., BALLESTER A., VIEITEZ A. M. 2001. Effect of thiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 588 - 595.
- PROFUMO P., GASTALDO P., BEVILACQUA L., CARLI S. 1991. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Plant Science*, 76: 139-142.
- PUDDEPHAT I. J., ALDERSON P. G., WRIGHT N. A. 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 48: 951-962.
- RADOJEVIĆ L. 1978. In vitro induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. *Protoplasma*, 6: 369-374.
- SKUHRAVÝ V. 1999. Zusammenfassende Betrachtung der Kenntnisse über die Rosskastanien-miniermotte, *Cameraria ohridella* DESCHKA & DIMIC (Lep., Gracillariidae). *Journal of Pest Science*, 72: 95-99.
- SVATOŠ A., KALINOVÁ B., VOSKOVEC M., KINDL J., HOVORKA O., HRDÝ I. 1999. Identification of a New Lepidoptera Sex Pheromone in Picogram Quantities using an Antennal Bidetector: (8E, 10Z)-Tetradeca - 8,10- dienal from *Cameraria ohridella*. *Tetrahedron Letters*, 40: 7011-7014.
- ŠEDIVÁ J., VEJSADOVÁ H., MERTELIK J. 2004. Využití metody meristémového množení in vitro v kombinaci s termoterapií pro ozdravení vybraných druhů rostlin od virových infekcí a metody mikropropagace in vitro pro klonové namnožení vybraných rezistentních taxonů. *Závěrečná zpráva projektu 0441 výzkumného záměru VÚKOZ, v. v. i., Průhonice*, 11 s.
- ŠEFROVÁ H. 2001. Control possibility and additional information on the horse-chestnut leafminer *Cameraria ohridella* DESCHKA & DIMIC (*Lepidoptera, Gracillariidae*). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 5:121-127.
- TRIPPI V. S. 1963. Studies on ontogeny and senility in plants. II. Seasonal variation in proliferative capacity in vitro of tissues from branches from juvenile and adult zones of *Aesculus hippocastanum* and *Castanea vulgaris*. *Phyton*, 20: 146 - 152.
- TROCH V., VERMEIR N., WERBROUCK S., VAN LABEKE M. C. 2009. Development, maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 812: 185-188.

## ORGANOGENESIS INDUCTION IN HORSE CHESTNUT (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.)

### SUMMARY

Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) belongs to horticulturally valuable woody species. Successfulness of its planting in Europe has decreased due to a pest invasion, the horse chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* DESCHKA & DIMIC, 1986. Research objective of this work was to induce organogenesis in explants taken from seedlings of horse chestnut individuals. Shoot tip meristems with 1 – 2 leaf primordia were isolated from surface sterilized vegetative buds and were placed onto WPM (LLOYD, MCCOWN 1980) and MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) medium containing a half salt concentration and benzyladenine (BA) and naphthylacetic acid (NAA). Subcultivation onto medium with an identical composition was performed every 3 – 6 weeks. In winter buds, where a high microbial contamination (bacteria and yeasts) was observed, two methods of antibiotic treatment were used: i), antibiotics (Hygromycin, Timentin, Cefotaxim) were added into cultivation medium; ii) the buds were surface-treated with various concentrations of Antibiotic-Antimycotic Stabilized suspension (treatment A) and Amphotericin B (treatment B) as provided by Sigma. This technique of bud treatment showed to be more effective, decreased contamination rate and increased proliferation were found depending on antibiotic concentration. Recommended basic amounts of A (10 ml.l<sup>-1</sup>) and 25 mg.l<sup>-1</sup> B were efficient, twofold doses induced explant necrosis. In spite of efficient explant decontamination demonstrated after 20 days, no viable in vitro culture was derived.

In summer buds, a low bacterial infection (13%) and the highest shoot regeneration (up to 80%) were ascertained in shoot tips. Nodal stem and petiole segments formed calli with low or none regeneration capacity. A critical factor in organogenesis induction was the collection time of vegetative buds. A suitable time for explant regeneration was July – August when the explants showed low microbial contamination and decreased phenol production. Sterilizing method, 2.5% calcium hypochlorite with 20 – 30 min bud treatment, showed to be suitable. The highest shoot regeneration was observed in the presence of BA in concentration of 0.5 mg.l<sup>-1</sup> and 0.1 mg.l<sup>-1</sup> naphthylacetic acid (NAA).

Recenzováno

---

#### ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Hana Vejsadová, Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.,  
Květnové nám. 391, 252 43 Průhonice, Česká republika  
tel.: 296 528 237; e-mail:vejsadova@vukoz.cz