

STUDIUM GENETICKÉ VARIABILITY U ZÁSTUPCŮ RODU *AESCULUS* L. POMOCÍ SSR MARKERŮTHE STUDY OF GENETIC VARIABILITY IN THE GENUS *AESCULUS* L. BY SSR MARKERS

TOMÁŠ VYHNÁNEK¹⁾ - VÁCLAV BAČOVSKÝ¹⁾ - HELENA VLAŠÍNOVÁ¹⁾ - LADISLAV HAVEL¹⁾ - JANA ŠEDIVÁ²⁾ - JOSEF MERTELÍK²⁾

¹⁾ Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin, Brno

²⁾ Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice

ABSTRACT

Genetic variability was studied in two species of the genus *Aesculus* L.: *A. turbinata* and *A. hippocastanum*; ten clones of explant cultures of *A. hippocastanum* L. derived by organogenesis and somatic embryogenesis from donor resistant and susceptible to horse chestnut leaf-miner (*Cameraria ohridella*) were compared using microsatellite (SSR) markers. A total of 28 alleles were detected at the 8 SSR loci. The number of alleles generated by each marker ranged from 1 to 5 with an average of 3.5 alleles per locus. Statistical indicators were calculated for each SSR marker. We found low level of genetic variability. The value of polymorphic information content ranged from 0.00 to 0.74 (average 0.43). Conformity of donor plant resistant to *C. ohridella* and its *in vitro* horse chestnut clones (cultivar 'Mertelík') was demonstrated. No changes caused by *in vitro* cultivation were observed on molecular level. On the contrary, explant cultures of the susceptible genotype of *A. hippocastanum* did not report an assumed donor plant. This susceptible genotype was significantly different from the other *A. hippocastanum* genotypes. Despite a small sample analysis the possibility of using SSR markers for identification of donor plants and derived explant cultures was demonstrated.

Klíčová slova: jírovec, mikrosatelitní markery, polymorfismus DNA, explantátové techniky, klíněnka jírovcová, rezistence, pravost

Key words: horse chestnut, microsatellite markers, DNA polymorphism, explant techniques, horse chestnut leaf-miner, resistance, genetic fidelity

ÚVOD

Aesculus L. je malý rod, jehož zástupci jsou stromy nebo keře. Tento rod je zahradnický zajímavý zejména jako dekorativní strom v parcích a silničních alejích (UHLÍŘOVÁ, KAPITOLA 2004), má široké použití v lékařství (KIMURA et al. 2006) a dokonce i pro výživu v horských oblastech Japonska (MINAMI et al. 1998). V České republice je využíván také v lesním hospodářství jako významný tradiční zdroj potravy spárkaté zvěře (MERTELÍK et al. 2010). Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum*, L.), který není původní dřevinou České republiky (GREGOROVÁ et al. 2006). Původní areál těchto stromů je jen na malém území v jihovýchodní Evropě, v horských oblastech Balkánského poloostrova, a to v Řecku, ve východních částech Thesálie a v sousední části Makedonie (VĚTVIČKA et al. 2005).

Nejvýznamnějším škůdcem jírovce je larva klíněnky jírovcové (*Cameraria ohridella*), která se živí parenchymatickými buňkami listu, což v interakci s abiotickými vlivy (stres suchem a teplem) způsobuje intenzivní nekrózu, svinování listů a předčasnou defoliaci (MERTELÍK et al. 2004). Samotný škůdce nezpůsobuje úhyn stromu, ale zapříčiňuje jeho oslabení, které může dosahovat až 40% energetické ztráty stromu (PERCIVAL, NOVISS 2010). Dlouhodobé komplexní působení abionóz a dalších bionóz, jako jsou *Guignardia aesculli*, padlí a svilušky, mohou vést k celkovému chřadnutí a v krajních případech až k odumření stromu. K výraznému nárůstu odumírání jírovců dochází v posledních

letech v západní Evropě a také v ČR v souvislosti s bakteriální chorobou „bleeding canker“ (slizotoková nekróza), způsobenou *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2011). Silné narušení užité hodnoty jírovců v užitém prostředí člověka je také velmi významné z pohledu lesnictví a myslivosti, kde byla výrazně narušena funkce jírovce jako plodonosného stromu. Ekosystém rozsáhlých lesních obor s intenzivními chovy spárkaté zvěře je tradiční, ekonomicky významný úsek lesního hospodářství, který umožňuje kvalitní chovy zvěře a v oblasti trofejí reprezentuje špičkové výsledky české myslivosti po celém světě. V těchto člověkem vytvořených vysoce účelových lesních celcích je jírovec dlouhodobě využíván pro produkci semen (kaštany), která je významným zdrojem krmiva jelenů, daňků a muflonů. Úlohu spolehlivých „plodonosných stromů“ plnil jírovec maďal v ekosystémech obor bez problémů po desetiletí, až do doby zavlčení klíněnky. Negativní dopad snížené plodnosti jírovců byl prakticky zaznamenán ve čtyřech oborách Lesního závodu Židlochovice (MERTELÍK et al. 2010). Redukce výnosů semen byla experimentálně prokázána v Německu (THALMANN et al. 2003), kdy u stromů silně poškozených klíněnkou dosahovala redukce výnosu sušiny až 50%. Podobné výsledky prokázali také SALLEO et al. (2003) v Itálii. Ekosystém obor s členěným terénem a výrazným podrostem vytváří velmi příznivé podmínky pro přezimování a množení klíněnky a poškození listové plochy zpravidla dosahuje nejvyšší úrovně. Koncepčním ekologickým řešením problematiky obnovy funkce plodonosných jírovců v oborách v dlouhodobém horizontu je využití genotypu jírovce maďalu odolného k poškození klíněnkou.

V roce 1998 byl ve VÚKOZ Průhonice vytvořen klonový materiál HZR1357 s rezistentním chováním ke klíněnce jírovce (MERTELÍK 2002), který byl postupně vyselektován a patentován jako klon M06 (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2006) a později vedl až k vytvoření kultivaru 'Mertelík' (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2010). Tento unikátní materiál jírovce maďalu vykazuje rezistentní chování v podobě úhynu larev v různých fázích vývoje a zastavení minování, jehož výsledkem je snížení poškození listů o 50 % a více. Rezistentní chování bylo potvrzeno v různých stanovištních podmínkách předpokládaného budoucího uplatnění výsadby kultivaru (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2012).

Pro strategii využití tohoto kultivaru se jeví výhodné využití množení v podmínkách *in vitro* (tzn. pomocí explantátových technik), a následná výsadba rezistentních stromů do krajiny nebo do městských alejí. Pro ověření možné genetické variability, resp. identity odvozených rostlin je vhodné využít metody molekulární biologie zaměřené na studium polymorfismu DNA. Dobré výsledky byly dosaženy pomocí analýzy mikrosatelitních (SSR) oblastí v genomu, která byla použita např. u révy (MARTINELLI et al. 2004) a cukrové třtiny (SHAHID et al. 2011).

Cílem naší práce bylo studium genetické variability jírovce pomocí mikrosatelitních markerů u genotypů s rozdílnou citlivostí ke klíněnce jírovce a porovnání donorových rostlin s odvozenými explantátovými kulturami, jako prostředek k určování pravosti *in vitro* klonového potomstva rezistentního kultivaru 'Mertelík' v komerčním množení.

MATERIÁL A METODIKA

Pro analýzy DNA bylo použito 13 vzorků jírovce (*Aesculus* L.) (tab. 1). Jednalo se o jeden genotyp *Aesculus turbinata* Blume, dva donorové genotypy a deset klonů *Aesculus hippocastanum* L., odvozených v *in vitro* podmínkách s využitím metody organogeneze a somatické emb-

ryogeneze v laboratoři Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhoních (VÚKOZ, v. v. i.) (ŠEDIVÁ et al. 2011) a v laboratoři explantátových kultur Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty MENDELU v Brně. Kromě kontrolního *A. turbinata* byly odběry prováděny z jedinců a klonů *A. hippocastanum*, lišících se náchylností ke klíněnce jírovce.

Genomická DNA byla izolována z mladých listů pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen). Pro analýzu bylo vybráno osm SSR markerů (*AT3D6*, *AT5D2*, *AT5D10*, *AT6D2*, *AT6D8*, *AT6D12*, *AT7D1* a *AT7D8*). Primerové sekvence pro jednotlivé SSR markery, teplotní a časový profil reakce byly převzaty z publikace MINAMI et al. (1998) na základě nejvyššího stupně polymorfismu u *A. turbinata*. Složení reakční směsi bylo podle protokolu VYHNÁNEK et al. (2009). Výsledné produkty byly elektroforeticky separovány na 8% nedenaturačním polyakrylamidovém gelu a barveny stříbrem (0,2% AgNO₃).

Výsledky molekulárních analýz byly hodnoceny pomocí binární matice, následně byly analyzovány statistickým software FreeTree verze 9.1 (HAMPL et al. 2001) pomocí UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) s využitím Jaccardova koeficientu podobnosti (JACCARD 1908). Data byla následně zpracována do dendrogramu pomocí software TreeView verze 1.6 (PAGE 1996). Pro jednotlivé SSR markery byly vypočteny statistické hodnoty DI (diverzity index), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfni informační obsah) podle RUSSELL et al. (1997).

VÝSLEDKY A DISKUSE

V našem souboru 13 vzorků bylo detekováno celkem 28 alel, což je průměrně 3,5 alely na lokus (tab. 2). THOMAS et al. (2008) detekovali při použití stejných SSR markerů od 15 do 35 alel na lokus u 24 populací (391 jedinců) *A. flava*, *A. pavia*, *A. sylvatica* a jejich kříženců. MINAMI et al. (1998) zjistili průměrně 18 alel na lokus při studiu

Tab. 1.

Charakteristika rostlinného materiálu jírovce pro analýzy DNA
Characteristic chestnut plant material for DNA analysis

Druh/Species	Specifikace rostlinného materiálu/ Specification of plant material	Počet vzorků/ Number of samples	Označení vzorků/ Sample designation	Původ/Origin
<i>A. hippocastanum</i> 'Mertelík'	Donorový strom	1	AeH DM	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i> 'Mertelík'	<i>In vitro</i> kultura (organogeneze), AF	1	AeH EMB	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i> 'Mertelík'	<i>In vitro</i> kultura (somatická embryogeneze), VÚKOZ	4	AeH EMP1-P4	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i>	Donorový strom	1	AeH DN	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i>	<i>In vitro</i> kultura (organogeneze), AF	1	AeH ENB	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i>	<i>In vitro</i> kultura (organogeneze), VÚKOZ	3	AeH ENP1-P3	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i., Průhonice
<i>A. hippocastanum</i>	<i>In vitro</i> kultura (organogeneze), AF	1	AeH EA	Hardeg, Rakousko, lokalita u hranic NP Thayatal
<i>A. turbinata</i>	Donorový strom	1	AeT	Arboretum a botanická zahrada Mendelovy univerzity, Brno

Vysvětlivky: AF – Laboratoř explantátových kultur Ústavu biologie rostlin, Agronomická fakulta, MENDELU v Brně; VÚKOZ, v. v. i. – Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví; NP – Národní park
Captions: AF – Plant tissue laboratory of the Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno; VÚKOZ - the Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening; NP – National park

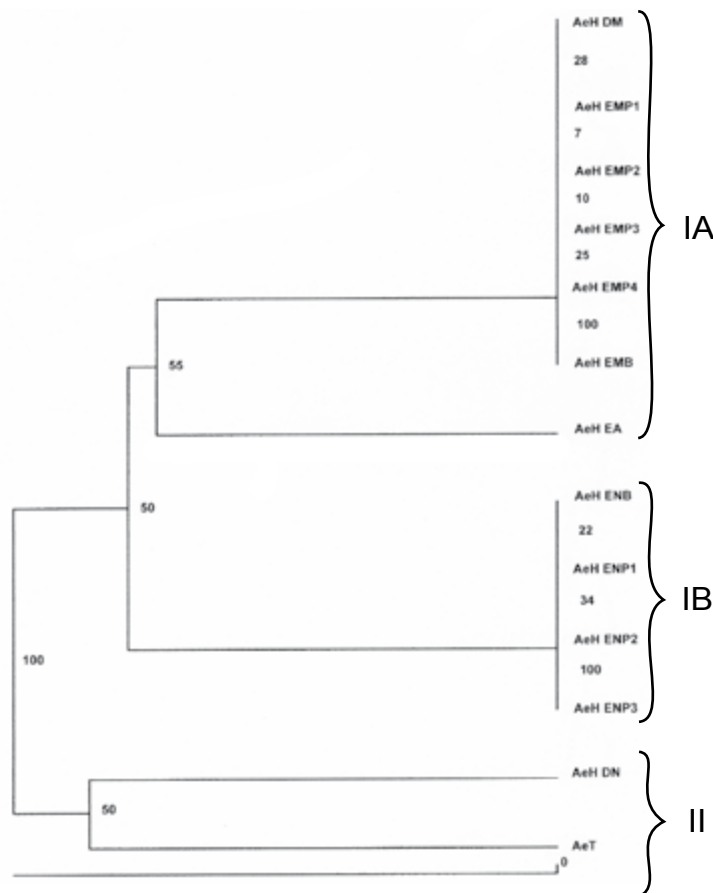
Tab. 2.
Statistické hodnocení jednotlivých SSR markerů
Statistical evaluation of the SSR markers

SSR marker	Velikost/ Size (bp)	Počet alel/ Number of alleles	DI	PI	PIC
AT3D6	290	1	0,00	1,00	0,00
AT5D2	240-280	4	0,60	0,21	0,55
AT5D10	220-260	3	0,36	0,43	0,33
AT6D2	260-300	5	0,76	0,06	0,74
AT6D8	120-140	3	0,26	0,57	0,24
AT6D12	120-160	4	0,37	0,39	0,36
AT7D1	160-200	4	0,70	0,11	0,66
AT7D8	80-100, 130	4	0,60	0,09	0,60
Průměr/Average		3,5	0,46	0,36	0,43

Vysvětlivky: DI (diverzity index), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfni informační obsah)
Captions: DI (diversity index), PI (probabilities of identity) and PIC (polymorphic information content)

genetické variability 43 jedinců *A. turbinata* při použití deseti SSR markerů, přičemž osm SSR markerů s nejvyšší variabilitou bylo využito v naší studii. Námí detekované hodnoty v porovnání s jinými autory jsou velmi nízké. Rozdíl je způsoben zejména velikostí souboru a jeho nízkou variabilitou. Tuto skutečnost potvrzují i průměrné hodnoty statistických ukazatelů pro jednotlivé SSR markery: DI 0,46; PI 0,36 a PIC 0,43.

V rámci analyzovaného souboru jsme detekovali jeden SSR marker (AT3D6), který poskytoval uniformní spektrum amplikonů. Byly detekovány i heterozygotní profily SSR markerů. Zde se nejvíce heterozygotní konstituce (62,5% SSR markerů) vyskytovala u jedince *A. turbinata*, když nebyla detekována pouze u tří SSR markerů (AT3D6, AT5D2 a AT6D2). Heterozygotní profily byly pozorovány u jedinců *A. hippocastanum* a jejich regenerantů u dvou SSR markerů (AT6D2 a AT7D1) a vždy korespondovaly s profilem rostliny označené jako donor explantátové kultury. Velikost jednotlivých detekovaných amplikonů odpovídala ± 20 bp velikosti produktů, jak je popsali u *A. turbinata* MINAMI et al. (1998). U SSR markeru AT7D8 byly detekovány dvě zóny produktů (velikost 130 bp a 80–100 bp) u všech analyzovaných jedinců. Zóna s produkty 130 bp byla shodná pro všechny analyzované genotypy a odpovídala průměrné velikosti 126 bp, kterou



Obr. 1.
Dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů jírovce

Vysvětlivky: AeH DM – *A. hippocastanum* /donor, 'Mertelík'; AeH EMB – *A. hippocastanum* /explantát, 'Mertelík', Brno; AeH EMP1-P4 – *A. hippocastanum* /explantát, 'Mertelík', Průhonice; AeH EA – *A. hippocastanum* /explantát, Rakousko; AeH DN – *A. hippocastanum* /donor, náchylný; AeH ENB – *A. hippocastanum* /explantát, náchylný, Brno; AeH ENP1-P3 – *A. hippocastanum* /explantát, náchylný, Průhonice; AeT – *A. turbinata* /kontrola

Fig. 1.
Similarity dendrogram of the analyzed chestnut genotypes

Captions: AeH DM – *A. hippocastanum* /donor, Mertelík; AeH EMB – *A. hippocastanum* /explants, 'Mertelík', Brno; AeH EMP1-P4 – *A. hippocastanum* /explants, Mertelík, Pruhonice; AeH EA – *A. hippocastanum* /explants, Austria; AeH DN – *A. hippocastanum* /donor, susceptible; AeH ENB – *A. hippocastanum* /explants, susceptible, Brno; AeH ENP1-P3 – *A. hippocastanum* /explants, susceptible, Pruhonice; AeT – *A. turbinata* /control genotype

zjistili u *A. turbinata* MINAMI et al. (1998). Je tedy zřejmé, že tato primerová kombinace nasedala v genomu námi analyzovaných genotypů jírovce na dvě místa. Pro další práci by bylo vhodné provést sekvenční analýzu těchto produktů a jejich srovnání.

Na základě dendrogramu (obr. 1) můžeme říci, že došlo ke statisticky významnému rozlišení analyzovaných genotypů do dvou shluků (I a II). Jako pozitivní výsledek lze označit statisticky průkaznou shodu rezistentních vzorků kultivaru 'Mertelík' (AeH DM) s jeho explantátovou kulturou vedenou v Praze a v Brně (AeH EMB a AeH EMP1-P4). Tento genotyp se nacházel ve společném podshluku (IA) s explantátovou kulturou, jež byla v Brně odvozena ze stromu pocházejícího z okolí Hardegu v Rakousku, který opakovaně ve dvou sezónách také nevykazoval symptomy napadení, i když vajíčka klíněnky na něm pozorována byla. Bohužel se pro experiment nepodařilo získat vzorek genomické DNA donorového stromu. Rovněž nelze zcela vyloučit, že tento strom nebyl na ochranu proti klíněnce ošetřen, i když je to nepravděpodobné s ohledem na to, že se vyskytuje volně v krajině v blízkosti hranic národního parku.

Zástupce *A. turbinata* (AeT) se nacházel ve shluku (II.) s náchylným donorem *A. hippocastanum* (donor). Velmi zajímavou skutečností je, že donor *A. hippocastanum* (AeH DN) vyznačující se náchylností ke klíněnce jírovce nevykazuje vysoký stupeň podobnosti se vzorky explantátové kultury vedené v Brně a v Praze (AeH ENB a AeH ENP1-P3), nacházejících se v podshluku IB. Na základě našich analýz bylo dodatečně zjištěno, že explantátové kultury byly odvozeny z více náchylných jedinců pracovníky VÚKOZ, v. v. i. Námi analyzovaný donor tak nemusí odpovídat explantátové kultuře. Naše výsledky však nyní umožňují dohledání a identifikaci jak donorového jedince, tak prokázání původu konkrétního klonového potomstva. Zjištěná shoda u rezistentních vzorků z donorové rostliny kultivaru 'Mertelík' a z ní vytvořené explantátové kultury je jednoznačným přínosem a bude uplatněna pro prokazování pravosti při praktickém sledování rezistentního chování a biologických vlastností *in vitro* klonového potomstva tohoto kultivaru. Hodnocení *in vitro* namnožených rostlin bude probíhat jak experimentálně v řízených podmínkách, tak dlouhodobě v podmínkách přirozené infestace klíněnkou na různých stanovištích budoucích cílených výsad. Možnost spolehlivého laboratorního prokázání pravosti rostlinného materiálu při vyhodnocování případných rozdílů je z metodického hlediska nezbytná.

ZÁVĚR

Výsledky i přes analýzu malého souboru ukazují možnost využití SSR markerů pro identifikaci explantátových kultur odvozených z donorových jedinců *A. hippocastanum* a studium stability explantátových kultur určených pro mikropropagaci ekologicky cenných genotypů. V případě podrobnějšího studia genomu rodu *Aesculus* L., např. fylogenetických studií nebo studia vnitrodruhové variability, spojených s rezistencí ke klíněnce jírovce, je výhodnější použít sekvenční analýzy (HARRIS et al. 2009) nebo analýzu délkového polymorfismu amplifikovaných fragmentů (PRADA et al. 2011). Pro produkční *in vitro* množení kultivaru 'Mertelík' rezistentního ke klíněnce jírovce byla vypracována certifikovaná metodika (ŠEDIVÁ et al. 2012), s cílem urychlení jeho praktického použití v cílených výsadbách jírovců v ČR včetně obor s intenzivním chovem spárkaté zvěře. Metoda s použitím SSR markerů je přínosem pro spolehlivé prokázání pravosti vyřazeného materiálu jak z hlediska biologického, tak z hlediska právní ochrany.

Poděkování:

Výzkum byl podpořen Ministerstvem zemědělství České republiky v rámci projektu NAZV QH81101.

LITERATURA

- GREGOROVÁ B., ČERNÝ K., HOLUB V., STRNADOVÁ V. 2006. Poškození dřevin a jeho příčiny. Praha, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví: 504 s.
- HAMPL V., PAVLÍČEK A., FLEGR J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to Trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 731–735.
- HARRIS A., XIANG Q.Y., THOMAS D. 2009. Phylogeny, origin, and biogeographic history of *Aesculus* L. (Sapindales) – an update from combined analysis of DNA sequences, morphology, and fossils. *Taxon*, 58: 108–126.
- JACCARD P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin del la Societé Vaudoise des Scientes Naturelles*, 44: 223–270.
- KIMURA H., OGAWA S., JISAKA M., KIMURA Y., KATSUBE T., YOKOTA K. 2006. Identification of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chesnut (*Aesculus turbinata* Blume) after treatment with wooden ashes and their nutraceutical activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedicine Analysis*, 41: 1657–1665.
- MARTINELLI L., ZAMBANINI J., GRANDO M.S. 2004. Genotype assessment of grape regenerants from floral explants. *Vitis*, 43: 119–122.
- MERTELÍK J. 2002. Nalezení jírovce mađalu s vysokým stupněm rezistence k napadení klíněnkou jírovcovou rozšiřuje možnosti řešení problematiky. *Rostlinolékař*, 13: 20–22.
- MERTELÍK 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 Zootechnica*, 7: 204.
- MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2006. Klon *Aesculus hippocastanum* Mertelík06 s rezistentním chováním ke *Cameraria ohridella* – patent č. 296896. *Věstník č. 7/2006*.
- MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2010. Šlechtitelské osvědčení o udělení ochranných práv k odrůdě podle zákona č. 408/2000 Sb. Vydané: Národní odrůdový úřad, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 65606 Brno. Dne: 23.11.2010. Ochranná práva k odrůdě jírovce mađalu (*Aesculus hippocastanum* L.), schválený název 'Mertelík', Číslo šlechtitelského osvědčení: 55/2010, č.j. NOÚ/PO1852/PHA/R55/2010.
- MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K., STEJSKAL J. 2010. Problematika uplatnění klonu jírovce mađalu M06 s rezistentním chováním ke klíněnce jírovce jako plodonosného stromu v oborách s intenzivním chovem spárkaté zvěře. *Acta Pruhoniana*, 94: 9–12.
- MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2011. Slizotoková nekróza jírovce mađalu způsobená *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* v ČR. *Zahradnictví*, 12: 58–60.
- MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2012. Hodnocení polní rezistence jírovce mađalu kultivaru Mertelík ke klíněnce jírovce. *Acta Pruhoniana*, 102: 5–8.
- MINAMI E., ISAGI Y., KANEKO Y., KAWAGUCHI H. 1998. Polymorphic microsatellite markers in Japanese horse chestnut *Aesculus turbinata* Blume. *Molecular Ecology*, 7: 1613–1621.
- PAGE R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.

- PERCIVAL C.G., NOVISS K. 2010. Managing *Pseudomonas* bleeding canker of horse chestnut. [online] Bartlett Tree Research Laboratories Technical Report. [cit 21. ledna 2013]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.bartlett.com/resources/managing-pseudomonas-bleeding-canker-of-horse-chestnut.pdf>.
- PRADA D., VELLOZA T.M., TOOROP P.E., PRITCHARD H.W. 2011. Genetic population structure in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.): effects of human-mediated expansion across Europe. *Plant Species Biology*, 26: 43–50.
- RUSSELL J., FULLER J., YOUNG G., THOMAS B., TARAMINO G., MACAULAY M., WAUGH R., POWEL W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, 40: 442–450.
- SALLEO S., NARDINI A., RAIMONDO F., LO GULLO M.A., PACE F., GIACOMICH P. 2003. Effects of defoliation caused by the leaf miner *Cameraria ohridella* on wood production and efficiency in *Aesculus hippocastanum* growing in north-eastern Italy. *Trees*, 17: 367–375.
- SHAHID M.T.H., KHAN F.A., SAEED A., FAREED L. 2011. Variability of red rot-resistant somaclones of sugarcane genotype S97US297 assessed by RAPD a SSR. *Genetics and Molecular Research*, 10: 1831–1849.
- ŠEDIVÁ J., VEJSADOVÁ H., VLAŠÍNOVÁ H., MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2011. Způsoby *in vitro* regenerace u *Aesculus hippocastanum* L. *Acta Pruhoniciana*, 99: 127–130.
- ŠEDIVÁ J., MERTELÍK J., KLOUDOVÁ K. 2012. Mikropropagace jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum* L.). Certifikovaná metodika č. 11/2012-057. Průhonice, VÚKOZ: 14 s.
- THALMANN C., FREISE J., HEITLAND W., BACHER S. 2003. Effects of defoliation by horse chestnut leafminer (*Cameraria ohridella*) on reproduction in *Aesculus hippocastanum*. *Trees*, 17: 383–388.
- THOMAS D. T., AHEDOR A.R., WILLIAMS CH.F., DEPAMPHILIS C., CRAWFORS D.J., XIANG Q.Y. 2008. Genetic analysis of a broad hybrid zone in *Aesculus* (Sapindaceae): Is there evidence of long-distance pollen dispersal? *International Journal of Plant Science*, 169: 647–657.
- UHLÍŘOVÁ H., KAPITOLA P. 2004. Poškození lesních dřevin. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 288 s.
- VĚTVIČKA V., MATOUŠOVÁ V., MAŠEK J. 2005. Stromy a keře. Praha, Aventinum: 288 s.
- VYHNÁNEK T., NEVRTALOVÁ E., SLEZÁKOVÁ K. 2009. Detection of the genetic variability of triticale using wheat and rye SSR markers. *Cereal Research Communications*, 37: 23–29.

THE STUDY OF GENETIC VARIABILITY IN THE GENUS OF *AESCULUS* L. BY SSR MARKERS

SUMMARY

Aesculus L. is a small genus, whose representatives are trees or shrubs. Our most famous species – horse chestnut (*A. hippocastanum*) is of particular interest as a decorative tree. In the Czech Republic it is used in forestry as an important traditional food source for cloven-hoofed game (MERTELÍK et al. 2010). A major pest of this plant species is a caterpillar of a horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*), which feeds on parenchymal leaf cells – it often results in repeated tree defoliation. The pest itself does not cause death of a tree but it brings its weakening and allows subsequent attacks of other pathogenic organisms. Significant factor in the fight against the horse chestnut leaf miner was finding the clonal material HZR1357 with resistant behavior, which later led to the creation of the cultivar 'Mertelík' (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2010). This unique material of a horse chestnut shows resistant behavior – it stops larvae mining and causes larvae mortality in various development stages. It results in a reduction of leaf damage by 50 % and more in different habitat conditions of anticipated future application of cultivar plantings (MERTELÍK, KLOUDOVÁ 2012). For the strategy of using and extension of this cultivar, it seems to be beneficial to multiply plants *in vitro* (i.e. by explant techniques) and the subsequent planting of resistant trees in the landscape or in urban alleys. The aim of our work was to study genetic variability of horse chestnut using microsatellite markers in genotypes with different sensitivity to horse chestnut leaf miner and comparison of donor plants with derived explant cultures.

The polymorphism of DNA was analysed in 13 samples of horse chestnut (Tab. 1) – one genotype of *Aesculus turbinata* Blume, two donor genotypes with different susceptibility to horse chestnut, and 10 clones of *Aesculus hippocastanum* L., derived by organogenesis and/or somatic embryogenesis *in vitro* in laboratory at the Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening (ŠEDIVÁ et al. 2011) and in the Plant tissue culture laboratory at the Department of Plant Biology of Mendel University in Brno. Genomic DNA was isolated from young leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). We analysed eight SSR markers. Primer sequences and reaction condition were used according to MINAMI et al. (1998). The reaction mixture, electrophoresis by polyacrylamide gel and visualisation with silver (0.2% AgNO₃) were used according to VYHNÁNEK et al. (2009). The resulting electrophoretic data were transformed to dendrogram and individual statistical indicators (DI - diversity index, PI - probabilities of identity and PIC - polymorphic information content) for each SSR marker were calculated according to RUSSELL et al. (1997).

A total of 28 alleles were detected at the 8 SSR loci (Tab. 2). The number of alleles generated by each marker ranged from 1 to 5 with an average of 3.5 alleles per locus. Statistical indicators were calculated for each SSR marker. We found low level of genetic variability. This fact is confirmed by the average values of the statistical indicators for all SSR markers: DI 0.46, PI 0.36 and PIC 0.43. Conformity of donor plant and *in vitro* horse chestnut clones (cultivar 'Mertelík') characterized by a resistance to horse chestnut leaf-miner was demonstrated (Fig. 1). On the contrary, it was found that explant cultures of susceptible genotype *A. hippocastanum* did not reported assumed donor plant. This susceptible genotype was significantly different from the other *A. hippocastanum* genotypes. Despite a small sample analysis, the possibility of using SSR markers for identification of donor plants and derived explant cultures was demonstrated. It is very important mainly for practical use of the resistant cultivar 'Mertelík' in forestry in the Czech Republic. This cultivar could have a great potential to overcome problems with horse chestnut leaf-miner mainly in deer-parks, but its introduction is not possible without the reliable verification. The method using SSR markers is also a good tool for legal protection of this cultivar.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká Republika
tel.: +420 545 133 185; e-mail: vyhnanek@mendelu.cz