

ALEKSANDRA LUWAŃSKA
KAROLINA JARZYŃIAK
JOANNA MAKOWIECKA
KAROLINA WIELGUS

Zakład Biotechnologii
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Namnażanie cennego genotypu *Aesculus hippocastanum* L. metodą mikropropagacji

Propagation of valuable genotype of *Aesculus hippocastanum* L. by micropropagation

Kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum* L.) jest drzewem liściastym, wywodzącym się z Półwyspu Bałkańskiego. Odkąd został sprowadzony do Polski stanowi popularne drzewo wykorzystywane do nasadzeń w parkach oraz alejach. Z uwagi na zawartość escyny o działaniu przeciwochrząsteczkowym, przeciwzapalnym oraz uszczelniającym naczynia krwionośne znalazł również zastosowanie w medycynie i kosmetyce. W ostatnich latach największym zagrożeniem dla drzewa jest motyl — szrotówek kasztanowcowiaczek (*Cameraria ohridella*). Owad żerując na liściach prowadzi do defoliacji drzewa, a w konsekwencji do powtórnego listnienia i kwitnienia na jesień, przez co drzewo staje się mniej odporne na mrozy. Najczęściej stosowane metody zwalczania szkodnika, pomimo iż prowadzą do zmniejszenia jego liczebności, nie chronią drzewa w sposób całkowity. Przyszłością w ochronie tego gatunku może być wykorzystanie nowoczesnych narzędzi biotechnologii przez zastosowanie mikropropagacji cennych genotypów. Celem badań było opracowanie skutecznej i wydajnej metody namnażania wyselekcjonowanego genotypu *A. hippocastanum*, odpornego na szrotówka kasztanowcowiaczka, metodą mikropropagacji. Kultury zainicjowano poprzez pobranie z rośliny matecznej eksplantatów, które poddano sterylizacji w 15% roztworze podchlorynu sodu i umieszczono na pożywce do namnażania — MS $\frac{1}{2}$ NO₃ zawierającą fitohormon BAP (1 mg/l). Pasaż na świeżą pożywkę odbywał się co 4 tygodnie. Zastosowana do namnażania pożywka przyniosła satysfakcjonujące wyniki propagacji roślin. Współczynnik namnażania w pięciu kolejnych cyklach namnożeńowych oscylował w granicach 3–5. W celu indukcji ukorzenienia rozmnożonych pędów zastosowano kilka rodzajów pożywek z różną kombinacją hormonów i ich stężeń. Jednak wszystkie użyte na etapie ukorzenienia podłoża nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, stąd prace nad ukorzeniem i aklimatyzacją sadzonek *A. hippocastanum* wymagają kontynuacji.

Słowa kluczowe: *Aesculus hippocastanum*, *Cameraria ohridella*, kultury *in vitro*, mikropropagacja

Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) is a deciduous tree, native to Balkan Peninsula. It is one of the most popular ornamental trees in Poland and all over the Europe. Thanks to the aescin, *A. hippocastanum* is widely used for medicinal and cosmetic preparations. The horse chestnut leaf miner moth (*Cameraria ohridella*) is the most dangerous parasite for European horse chestnut. The insect induces tree defoliation. Second leafing and flowering occur, which result in decrease of the frost

hardiness. The most frequently used control measures, although have impact on the leaf miner populations, do not protect the tree completely. The use of modern biotechnology to micropropagate unique genotypes could save this woody plant. The aim of this study was to establish method of efficient propagation protocol for the *A. hippocastanum* genotype resistant to the horse chestnut life miner using micropropagation. Explants from crown branches were used for culture initiation. Explants were sterilized by rinsing in 15% NaClO and then placed on propagation medium — MS $\frac{1}{2}$ NO₃ supplemented with (1 mg/l) BAP. Plant material was transferred to a fresh medium every 4 weeks. The propagation gave satisfying results. The mean number of newly formed shoots was 3–5 during five multiplication cycles. For root induction different treatments were compared. However, all media which were used, did not bring expected result. Therefore, research with rooting and acclimatization of *A. hippocastanum* needs to be continued.

Key words: *Aesculus hippocastanum*, *Cameraria ohridella*, *in vitro* culture, micropropagation

WSTĘP

Kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum* L.) jest gatunkiem drzewiastym, należącym do rodziny *Sapindaceae*. Gatunek ten występuje rodzimie w centralnej i północnej Grecji, Albanii, byłej Jugosławii oraz w ograniczonym zakresie we wschodniej Bułgarii (Avtzis i in., 2007). Do Polski został sprowadzony w XVI w. (Piechal i in., 2005). Ze względu na walory dekoracyjne stanowi popularne drzewo wykorzystywane do nasadzeń w parkach oraz alejach (Russel i in., 2008). Oprócz funkcji rośliny ozdobnej *A. hippocastanum* znalazł zastosowanie w medycynie i kosmetyce. Ze względu na zawartość escyny kasztanowiec wykorzystywany jest w leczeniu takich schorzeń jak: chroniczna niewydolność żylna, zapalenie żył, hemoroidy oraz w preparatach kosmetycznych dla cery naczynkowej. Escyna jest mieszaniną triterpenowych saponin, wykazującą działanie przeciwobrzękowe, przeciwzapalne, poprawiające tonus żylny, zmniejszające pojemność żył, przeciwkrzepliwe oraz uszczelniające naczynia krwionośne (Piechal i in., 2005). W ostatnich latach największym zagrożeniem dla drzewa jest motyl — szrotówek kasztanowcowiaczek (*Cameraria ohridella*). Defoliacja, czyli pozbawienie rośliny liści, spowodowana obecnością owada doprowadziła do przypadków zamierania kasztanowców w Czechach i na Węgrzech. Częstym skutkiem defoliacji jest zjawisko powtórnego listnienia i kwitnienia drzewa na jesień, przez co następuje spadek odporności kasztanowca na mrozy (Kosibowicz, 2005). Zwalczanie szkodnika odbywa się najczęściej z zastosowaniem metod mechanicznych (niszczenie porażonych liści, lepowanie pni) oraz chemicznych (m.in. mikroiniekcje insektycydów do pni, opryskiwanie koron drzew środkami owadobójczymi oraz iniekcje do gleby) (Głowacka i in., 2009). Stosowane powszechnie metody, pomimo iż prowadzą do zmniejszenia liczebności owada, nie chronią drzewa w sposób całkowity.

Celem badań było opracowanie skutecznej i wydajnej metody namnażania wyselekcjonowanego genotypu *A. hippocastanum*, odpornego na szrotówka kasztanowcowiaczka, metodą mikropropagacji poprzez regenerację z pąków bocznych. Zastosowanie mikrorozmnazania oraz otrzymanie roślin identycznych z genotypem odpornym może przyczynić się do ochrony tego gatunku drzewa, poprzez wprowadzanie do nasadzeń osobników niewrażliwych na porażenie owadem.

MATERIAŁY I METODY

Jako źródło materiału roślinnego posłużył wyselekcjonowany genotyp *A. hippocastanum*, odporny na szrotówka kasztanowcowiaczka (rys. 1). Drzewo, z którego został pobrany materiał zlokalizowane jest na terenie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Materiał roślinny, w postaci pędów, pobranych wczesną wiosną, umieszczono w roztworze 8-hydroksychinoliny. Celem zabiegu było zwiększenie efektywności sterylizacji właściwej. Po upływie dwóch tygodni pobrano eksplantaty wyjściowe, którymi były fragmenty węzłowe pędu, zawierające komórki merystematyczne. Ze względu na rozmiar pobieranych eksplantatów, podzielono je na eksplantaty większe (2 cm) oraz mniejsze (1 cm). Do zainicjowania sterylnych kultur testowano dwa roztwory sterylizacyjne (15% NaClO oraz ACE 1:2) w dwóch kombinacjach czasowych (10' oraz 15'). Po upływie planowego czasu sterylizacji eksplantaty zostały trzykrotnie opłukane ze środka sterylizującego poprzez umieszczanie w sterylnej wodzie na okres 5 min (3×5 min). Efektywność sterylizacji sprawdzano w dwóch doświadczeniach, wysterylizowano łącznie 300 eksplantatów. W celu wybrania najbardziej efektywnej procedury sterylizacji po upływie 7 oraz 14 dni przeprowadzono obserwację, w której oznaczono procent roślin czystych oraz rosnących.

Dalsze etapy pracy obejmowały namnażanie eksplantatów oraz ukorzenianie pędów. Wyjściowa liczba eksplantatów użytych w doświadczeniu, przed pierwszym pasażem oraz w kolejnych cyklach namnożeń wynosiła 250. W celu elongacji pędów i obserwacji wpływu tego procesu na ukorzenianie, 100 eksplantatów hodowano na modyfikowanych pożywkach (opisane poniżej). Ukorzenianiu poddano łącznie 500 eksplantatów.

Dla otrzymania jak największej liczby identycznych pod względem genetycznym roślin, eksplantaty umieszczano na pożywce MS $\frac{1}{2}$ NO₃ zawierającej 1 mg fitohormonu BAP oraz 30 g sacharozy w 1 litrze. Ustalono pH na poziomie 5,6 i zestalono agarą (7 g/l). Przeprowadzono 5 cykli namnożeń. Pasaż na świeżą pożywkę odbywał się co 4 tygodnie.

Przed przystąpieniem do ukorzeniania zregenerowanych roślin, badano efekt oddziaływania na eksplantaty pożywek przygotowanych do tego etapu. W tym celu zmodyfikowano pożywkę do namnażania. W modyfikacji I źródło węgla — sacharozę zastąpiono fruktozą (20 g/l). W modyfikacji II podłoże nie zostało wzbogacone dodatkiem fitohormonu. Dokonane zmiany miały na celu stymulację elongacji pędów, będącej warunkiem koniecznym do ukorzeniania.

W celu indukcji ukorzeniania testowano trzy pożywki: MS $\frac{1}{2}$ NO₃, $\frac{1}{2}$ MS oraz $\frac{1}{2}$ MS $\frac{1}{2}$ NO₃, w kilku kombinacjach, zmieniając stężenie oraz rodzaj zastosowanej auksyny (tab. 5). W przypadku pożywki MS $\frac{1}{2}$ NO₃ z 3 mg/l IAA oraz 3 mg/l IBA eksplantaty kasztanowca po 4 dniach przenoszono na pożywkę MS $\frac{1}{2}$ NO₃ z węglem aktywnym, nie zawierającą hormonu. Następnie, po upływie 4 tygodni materiał roślinny wyłożono na podłoże torf: perlit (1:2).

Podczas etapu namnażania oraz przygotowania do warunków *ex vitro* (tj. elongacji oraz ukorzeniania) prowadzono obserwacje co 2 tygodnie.

Hodowle prowadzono w fitotronie, w warunkach 33% wilgotności, przy szesnastogodzinnym fotoperiodzie (16 h dzień / 8 h noc), w temperaturze 23-25°C.

WYNIKI

Spośród dwóch roztworów sterylizacyjnych jako roztwór optymalny wybrano 15% roztwór podechlorynu sodu (tab. 1). Przeprowadzone obserwacje wykazały, iż najbardziej odpowiednim czasem sterylizacji jest: 15 min dla eksplantatów małych oraz 10 min dla eksplantatów dużych. W obu przypadkach zaobserwowano najbardziej powtarzalne wyniki zarówno w odniesieniu do czystości, jak i procentu eksplantatów rosnących.

Tabela 1

Inicjacja sterylnych kultur *in vitro* *Aesculus hippocastanum*
Initiation of sterile *in vitro* culture of *Aesculus hippocastanum*

| Roztwór sterylizacyjny Sterilization solution | Czas sterylizacji Sterilization time | Wielkość eksplantatu Explant size | Powtórzenie I Experiment no. I | | | | Powtórzenie II Experiment no. II | | | | | |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------|------|------|------|
| | | | eksplantaty — explants | | | | | | | | | |
| | | | czyste (%) pure | | rosnące (%) vigorous | | czyste (%) pure | | rosnące (%) vigorous | | | |
| | | | obserwacja — observation no. | | | | | | | | | |
| | | | | I | | II | | I | | II | | |
| ACE (1:2) | 10 min | małe (small) | 66,7 | 100 | 16,7 | 87,5 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | duże (big) | 36,4 | 100 | 0 | 100 | 0 | — | 0 | — | 0 | — |
| | 15 min | małe (small) | 75 | 100 | 33,3 | 55,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | duże (big) | 83,3 | 100 | 25 | 90 | 90,9 | 11,1 | 90,9 | 66,7 | 66,7 | 66,7 |
| 15% NaClO | 10 min | małe (small) | 83,3 | 100 | 50 | 80 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 80 |
| | | duże (big) | 83,3 | 100 | 75 | 80 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 15 min | małe (small) | 66,7 | 100 | 58,3 | 100 | 75 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | duże (big) | 58,3 | 85,7 | 50 | 85,7 | 42,9 | — | 57,1 | — | 57,1 | — |

Tabela 2

Namnażanie *Aesculus hippocastanum* na pożywce MS ½ NO₃ zawierającej 1 mg/l BAP
Propagation of *Aesculus hippocastanum* on MS ½ NO₃ medium containing 1 mg/l BAP

| Pasaż Passage no. | Eksplantaty — Explants | | | | | | | | | | WN Shoots per reactive explant | | | | |
|----------------------|------------------------------|-------|------------------------|-------|-------------------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------------|------|-----------------------------------|------|--|----|--|
| | czyste (%) pure | | rosnące (%) growing | | słabo rosnące (%) weakly growing | | obumarłe (%) necrotic | | zeszklone (%) hyperhydrated | | | | | | |
| | obserwacja — observation no. | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | I | | II | | I | | II | | I | | II | |
| n 1 | 98,45 | 97,05 | 71,71 | 73,84 | 25,19 | 13,92 | 3,10 | 12,24 | 1,94 | 2,95 | 2,11 | 3,27 | | | |
| n 2 | 99,32 | 98,95 | 97,95 | 93,68 | 1,37 | 4,74 | 0,68 | 1,58 | 0,00 | 1,05 | 2,25 | 5,15 | | | |
| n 3 | 98,86 | 95,13 | 92,78 | 89,82 | 6,08 | 7,52 | 1,14 | 2,65 | 0,76 | 1,33 | 2,75 | 5,20 | | | |
| n 4 | 99,38 | 96,13 | 80,00 | 82,90 | 15,31 | 8,06 | 4,69 | 9,03 | 0,31 | 1,61 | 1,97 | 3,11 | | | |
| n 5 | 100,00 | 93,23 | 86,36 | 87,97 | 9,47 | 4,89 | 4,17 | 7,14 | 4,53 | 3,01 | 1,68 | 3,05 | | | |

Zastosowana do namnażania pożywka przyniosła satysfakcjonujące wyniki propagacji roślin (tab. 2). Współczynnik namnażania, wyrażony jako ilość pędów przybyszowych przypadających na jeden eksplantat, w pięciu kolejnych cyklach namnożeń oscylował w granicach 3–5. Przy zastosowanej skali doświadczenia, umożliwiło to

otrzymać w przeciągu 4 tygodni, od 750 do 1250 roślin, z 250 eksplantatów. Procent eksplantatów rosnących utrzymywał się na wysokim poziomie i wynosił maksymalnie 97,95% po 2 tygodniach oraz 93,68% po 4 tygodniach prowadzenia kultury. Uśredniona wartość strat materiału roślinnego związanych z obumarciem eksplantatów nie przekraczała 2,76% (obserwacja I) oraz 6,53% (obserwacja II).

Zmodyfikowanie pożywki podstawowej poprzez zmianę źródła węgla w modyfikacji I oraz brak dodatku fitohormonu w modyfikacji II nie przyniosło pożądanego efektu w postaci zwiększonej elongacji pędów. W porównaniu do pożywki podstawowej wartości współczynników namnażania oraz żywotność eksplantatów były niższe. Zastosowanie fruktozy znacznie obniżyło zdolność do wytwarzania nowych pędów (współczynnik namnażania 1–3), straty związane z obumarciem materiału nie przekraczały jednak 12,77% (tab. 3). Najgorzej rośliny regenerowały na pożywce niezawierającej cytokininy, gdzie procent eksplantatów obumarłych, po 4 tygodniach wyniósł maksymalnie 77,42% (tab. 4).

Tabela 3

Hodowla *in vitro* kasztanowca na pożywce MS ½ NO₃ zawierającej 20 g/l fruktozy
Horse chestnut *in vitro* culture on MS ½ NO₃ medium containing 20 g/l fructose

| Pasaż Passage no. | eksplantaty — explants | | | | | | | | | | WN Shoots per reactive explant | |
|----------------------|------------------------------|--------|---------------------------|-------|----------------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------------|-------|--------------------------------------|------|
| | czyste (%) pure | | rosnące (%) growing | | słabo rosnące (%) weakly growing | | obumarłe (%) necrotic | | zeszklone (%) hyperhydrated | | | |
| | obserwacja — observation no. | | | | | | | | | | | |
| | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II |
| n 1 | 100,00 | 100,00 | 81,63 | 65,96 | 14,29 | 21,28 | 4,08 | 12,77 | 0,00 | 0,00 | 1,32 | 1,18 |
| n 2 | 100,00 | 100,00 | 97,50 | 85,00 | 2,50 | 12,50 | 0,00 | 2,50 | 2,50 | 5,00 | 3,55 | 3,51 |
| n 3 | 100,00 | 96,67 | 84,62 | 93,33 | 12,31 | 3,33 | 3,08 | 3,33 | 9,23 | 11,67 | 1,74 | 2,19 |

Tabela 4

Hodowla *in vitro* kasztanowca na pożywce MS ½ NO₃ nie zawierającej BAP
Horse chestnut *in vitro* culture on MS ½ NO₃ medium without BAP

| Pasaż Passage no. | Eksplantaty — Explants | | | | | | | | | | WN Shoots per reactive explant | |
|----------------------|------------------------------|--------|---------------------------|-------|----------------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------------|------|--------------------------------------|------|
| | czyste (%) pure | | rosnące (%) growing | | słabo rosnące (%) weakly growing | | obumarłe (%) necrotic | | zeszklone (%) hyperhydrated | | | |
| | obserwacja — observation no. | | | | | | | | | | | |
| | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II |
| n 1 | 100,00 | 100,00 | 41,27 | 25,81 | 55,56 | 74,19 | 3,17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,32 | 1,18 |
| n 2 | 100,00 | 96,77 | 22,58 | 3,23 | 77,42 | 19,35 | 0,00 | 77,42 | 0,00 | 0,00 | 0,97 | 1,38 |
| n 3 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 44,44 | 38,89 | 55,56 | 61,11 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 4,00 |

W celu indukcji ukorzenia rozmnożonych pędów zastosowano kilka rodzajów pożywek z różną kombinacją hormonów i ich stężeń. Jednak wszystkie użyte na etapie ukorzenia podłoża nie przyniosły oczekiwanych rezultatów (tab. 5). Wszystkie eksplantaty wyłożone na pożywki ukorzeniające charakteryzowały się wysoką żywotnością (70–100%) oraz całkowitym brakiem lub bardzo niskim procentem (3,33%) kalusa. Nie doszło jednak do ukorzenia pędów i tym samym niemożliwa była ich aklimatyzacja.

Ukorzenianie w kulturach *in vitro* *Aesculus hippocastanum*
Rooting of *Aesculus hippocastanum* in *in vitro* culture

| Pożywka Medium | Hormon Growth regulator | | Eksplantaty — Explants | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|--------|-------------------------------|------|------------------------|------|---------------------------------|------|
| | | | żywotne (%) vigorous | | ukorzenione (%) rooting | | kalus (%) callus | | zakażone (%) contaminated | |
| | typ type | stężenie hormonu concentration (mg/l) | obserwacja — observation no. | | | | | | | |
| | | | I | II | I | II | I | II | I | II |
| MS 1/2 NO ₃ | brak | AC (3 IAA) | 100,00 | 98,81 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | brak | AC (3 IBA) | 100,00 | 98,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,85 |
| | | 0,05 | 100,00 | 96,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,33 | 0,00 | 1,67 |
| | IBA | 0,1 | 100,00 | 98,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | 0,2 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,33 |
| | | 0,5 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,69 |
| 1/2 MS | IAA | 0,3 | 90,00 | 70,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | NAA + IBA | 0,4 + 0,2 | 98,18 | 94,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 1/2 MS 1/2 NO ₃ | IAA | 3 | 94,67 | 80,26 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

AC (3 IAA) — Eksplantaty na pożywkę z węglem aktywnym przełożone z pożywki z 3 mg/l IAA

AC (3 IAA) — Explants transferred from 3 mg/l IAA medium to the medium containing active carbon

DYSKUSJA

Uzyskiwanie roślin poprzez rozmnażanie wegetatywne w kulturach *in vitro* jest szybką i wydajną metodą, która może zastępować konwencjonalne metody namnażania, do których należą m.in. wysiew nasion oraz szczypanie (Kiss i in., 1992). Większość prac opisujących namnażanie kasztanowca zwyczajnego skupia się na zagadnieniu embriogenezy somatycznej (Bergmann i in., 1996). Wielu badaczy pracuje nad udoskonalaniem jej procedury (Ćalić-Dragosavac i Radojević, 2010; Capuana i Debergh, 1997; Troch i in., 2009). Naukowcy badają wpływ różnych czynników, np. wiek drzewa, jego genotyp na indukcję embriogenezy (Ćalić-Dragosavac i in., 2010; Radojević i in., 2000) oraz wykorzystują jako źródło eksplantatów fragmenty pochodzące z różnych tkanek (Gastaldo i in., 1994; Gastaldo i in., 1996; Profumo i in., 1991). W porównaniu do regeneracji poprzez zarodki somatyczne relatywnie mało jest informacji w literaturze tematu badań nad uzyskiwaniem *A. hippocastanum* na drodze morfogenezy bezpośredniej. Dlatego też, otrzymanie skutecznej metody powielania genotypu odpornego jest ważne oraz interesujące.

Prowadzone badania wykazały, iż najskuteczniejszą metodą sterylizacji właściwej jest zastosowanie 15% roztworu podchlorynu sodu. Zastosowane stężenie podchlorynu, skuteczne w przypadku eksplantatów pochodzących ze zdrewniałych gałęzi kasztanowca, było wyższe w porównaniu z innymi badaniami (Jain i Häggman, 2007; Sánchez i in., 1997). W badaniach własnych po 14 dniach od sterylizacji odsetek eksplantatów czystych, w dwóch powtórzeniach wyniósł 100%. Z kolei średnia wartość eksplantatów rosnących wynosiła odpowiednio, dla eksplantatów małych 100%, dla eksplantatów większych 90%. W badaniach przeprowadzonych przez Vejsadová i in. (2009), w celu sterylizacji sadzonek

A. hippocastanum, w początkowym etapie przemywano eksplantaty 70% etanolem, następnie przez 10 min wytrząsano je w 2,5% podchlorynie sodu z dodatkiem 0,1–0,2% HgCl₂. W wyniku zastosowanych procedur otrzymano 14% eksplantatów czystych oraz 14% eksplantatów regenerujących. Przedstawione wyniki dotyczyły eksplantatów pobranych w lutym, podobnie jak w IWNiRZ.

W badaniach własnych hodowlę prowadzono na pożywkę MS ½ NO₃ zawierającej 1 mg/l BAP, z wyłożonych eksplantatów, po 4 tygodniach powstawały liczne pędy boczne (3–5). Pożywka ta była wykorzystywana również przez innych badaczy (Soylu i Ertürk, 1999; Vieitez i in., 1983). Namnażane rośliny charakteryzowały się wysoką żywotnością (87,76%–98,42%) oraz niskim procentem eksplantatów zeszkłonych (1,05%–3,01%). Zastosowana pożywka została uznana za efektywną również w propagacji kasztana jadalnego (*Castanea sativa* Mill.) (Osterc i in., 2005). Wartości średnie współczynnika namnażania oraz żywotności eksplantatów *C. sativa* Mill. były niższe niż eksplantatów *A. hippocastanum* L. i wynosiły odpowiednio 2,1 oraz 84%. Problemem namnażania *A. hippocastanum* zajmowali się także naukowcy czescy (Vejsadová, i in., 2009). Zastosowane przez nich dwa warianty pożywki ½ MS: wariant I z 0,5 mg/l BAP oraz wariant II z 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l NAA, dały odpowiednio 20% oraz 35% regenerujących pędów. Współczynnik namnażania w obu przypadkach wynosił 2.

Mikropropagacja gatunków drzewiastych, do których zalicza się m.in. kasztanowiec zwyczajny wiąże się z pewnymi ograniczeniami. W przypadku drzew dojrzałych, odpowiedź tkanek na zmieniające się warunki w kulturach *in vitro* jest znacznie mniejsza niż form młodocianych (Ahuja, 1993). Dlatego też, ważnym aspektem mikropropagacji dojrzałych drzew jest wybór eksplantatu, ponieważ tylko niektóre tkanki wykazują tendencję do pożądanej odpowiedzi. Według Bonga i von Aderkas (1992) stopień młodocianości merystemu wierzchołkowego zależy od odległości merystemu od miejsca styku pnia z korzeniem (ang. root-shoot junction). Badania prowadzone przez Sánchez i Vieitez (1991) wykazały różnice w formowaniu pędu wierzchołkowego u *C. sativa*. Eksplantaty pochodzące z korony drzewa wykazywały znacznie mniejszą elongację pędu w porównaniu do eksplantatów pobranych z młodych pędów, wyrosłych po ścięciu drzewa. Zastosowanie fruktozy jako źródła węgla w mikropropagacji *C. sativa* (Chauvin i Salesses, 1988) stymuluje wydłużanie pędów tylko w przypadku form młodocianych (Bonga i von Aderkas, 1992). Ze względu na wiek drzewa *A. hippocastanum*, z którego pobrano eksplantaty, zmiana sacharozy na fruktozę (modyfikacja I), jak również usunięcie z pożywki do namnażania hormonu BAP (modyfikacja II) nie wywołało elongacji pędu. Skutkiem całkowitej eliminacji fitohormonu był jedynie spadek współczynnika namnażania oraz zwiększenie procentu eksplantatów obumarłych (Vieitez, 1986). W badaniach własnych podobne modyfikacje mające na celu elongację pędów nie przyniosły satysfakcjonujących rezultatów.

Brak elongacji pędów oraz mniejszy potencjał rozwojowy eksplantatów, wynikający z utracenia juwenalności tkanek stał się przyczyną nie wytworzenia korzeni na wszystkich testowanych pożywkach (Bonga i von Aderkas, 1992). Potwierdzeniem jest fakt uzyskania przez LüXiuLi i Shi JiSen (2004) wysokiego odsetka ukorzenionych eksplantatów *A.*

hippocastanum, dzięki zastosowaniu pożywki $\frac{1}{2}$ MS wzbogaconej o 0,4 mg NAA/litr oraz 0,2 mg IBA/litr, w przypadku gdy źródłem eksplantatów były młode rośliny macierzyste. Gonçaves i in., (1998) również uzyskali wysoki poziom ukorzenienia *C. sativa* \times *C. crenata*, dzięki zastosowaniu trój etapowej procedury (MS $\frac{1}{2}$ NO₃ z 3 mg/l IBA; MS $\frac{1}{2}$ NO₃ z węglem aktywnym; torf : perlit). Źródłem eksplantatów w prowadzonych badaniach były młode pędy, wyrosłe po ścięciu dojrzałego drzewa. W pracy własnej najprawdopodobniej ze względu na wiek drzewa, który posłużył jako źródło materiału roślinnego nie udało się uzyskać ukorzenionych sadzonek.



Rys. 1. *Aesculus hippocastanum* odporny na szrotówka kasztanowcowiaczka
Fig. 1. *Aesculus hippocastanum* resistant on horse chestnut leaf miner

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie skutecznej procedury sterylizacji materiału roślinnego oraz szybkiej i wydajnej metody namnażania genotypu *A. hippocastanum* odpornego na *C. ohridella*. Etap przygotowania do warunków *ex vitro*

nie przyniósł oczekiwanych rezultatów, gdyż nie udało się uzyskać ukorzenionych sadzonek. Z tego względu prace nad ukorzenianiem i aklimatyzacją sadzonek *A. hippocastanum* wymagają kontynuacji, przy czym znaczący jest fakt uwzględnienia wieku rośliny macierzystej.

LITERATURA

- Ahuja M. R. 1993. Micropropagation of woody plants. Springer. Dordrecht: 1 — 8.
- Avtzis N. D., Avtzis D. N., Vergos S. G., Diamandis S. 2007. A contribution to the natural distribution of *Aesculus hippocastanum* (*Hippocastanaceae*) in Greece. *Phytol. Balcan.* 13 (2): 183 — 187.
- Bergmann B. A., Hackett W. P., Pellett H. 1996. Somatic embryogenesis in *Aesculus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32 (3): 161 — 164.
- Bonga J. M., von Aderkas P. 1992. *In vitro* culture of trees. Springer. Dordrecht: 96 — 108.
- Capuana M., Debergh P. C. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic Embryos. *PCTOC*, 48: 23 — 29.
- Chauvin J. E., Salesses G. 1988. Effet du fructose sur la micropropagation du châtaignier *Castanea* spp.. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris (Séries D)*, 306: 207 — 212.
- Ćalić-Dragosavac D., Radojević Lj. 2010. Improvement of maturation and conversion of horse chestnut androgenic embryos. *Biologica Nyssana*, 1 (1–2): 49 — 55.
- Ćalić-Dragosavac D., Stevović S., Zdravković-Korać S. 2010. Impact of genotype, age of tree and environmental temperature on androgenesis induction of *Aesculus hippocastanum* L. *African Journal of Biotechnology* 9 (26): 4042 — 4049.
- Gastaldo P., Carli S., Profumo P. 1994. Somatic embryogenesis from stem explants of *Aesculus hippocastanum*. *PCTOC*, 39 (1): 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 (1–2): 157 — 162.
- Głowacka B., Lipiński S., Tarwacki G. 2009. Możliwości ochrony kasztanowca zwyczajnego *Aesculus hippocastanum* L. przed szrotówką kasztanowcowiaczką *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic. *Leśne Prace Badawcze* 70 (4): 317 — 328.
- Gonçalves J. C., Diogo G., Amâncio S. 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): Effects of footing treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 72: 265 — 275.
- Jain S. M., Häggman H. 2007. *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer. Dordrecht: 299 — 312.
- Kiss J., Heszky L. E., Kiss E., Gyulai G. 1992. High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. *PCTOC*, 30: 59 — 64.
- Kosibowicz M. 2005. Szrotówek kasztanowcowiaczek *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic (*Lepidoptera, Gracillariidae*), nowy inwazyjny szkodnik kasztanowca białego *Aesculus hippocastanum* L. w Polsce — biologia i metody zwalczania. *Leśne Prace Badawcze* 2: 121 — 132.
- LüXiuLi, Shi JiSen. 2004. Tissue culture and mass propagation of *Aesculus hippocastanum* L. *Journal of Nanjing Forestry University*.
- Osterc G., Zavrl Fras M., Vodenik T., Luthar Z. 2005. The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85 (2): 411 — 418.
- Piechal A., Blecharz-Klin K., Widy-Tyszkiewicz E. 2005. Kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum*) we współczesnej terapii. *Przewodnik lekarza*, 4: 74 — 81.
- Profumo P., Gastaldo P., Bevilacqua L., Carli S. 1991. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Plant Science* 76 (1): 139 — 142.
- Radojević Lj., Marinković N., Jevremović S. 2000. Influence of the sex of flowers on androgenesis in *Aesculus hippocastanum* L. anther culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 464 — 469.
- Russel T., Cutler C., Walters M. 2008. *Ilustrowana encyklopedia drzew świata*. Universitas. Kraków: 417 ss.

- Sánchez M. C., Vieitez A. M. 1991. In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiol.* 8 (1): 59 — 70.
- Sánchez M. C., Ballester A., Vieitez A. M. 1997. Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Ann Sci. For.* 54: 359 — 370.
- Soylu A., Ertürk Ü. 1999. Researches on micropropagation of chestnut. *Acta Horticulturae* 494: 247 — 250.
- Troch V., Werbrouck S., Geelen D., Van Labeke M. C. 2009. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *PCTOC*, 98 (1): 115 — 123.
- Vejsadová H., Šedivá J., Vlašínová H., Havel L., Mertlík J., Kloudová K. 2009. Organogenesis induction in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *Zprávy Lesnického Výzkumu*, 54 (4): 286 — 291.
- Vieitez A. M., Ballester A., Vieitez M. L., Vieitez E. 1983. In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science* 58: 457 — 463.
- Vieitez A. M. 1986. Changes in auxin protectors and IA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. *Physiol. Plant*, 66: 491 — 494.