

MARIAN CZOPEK

## METODY HODOWLI *LEMNACEAE*

### Wstęp

Przedstawiciele rodziny *Lemnaceae* stanowią doskonały materiał doświadczalny do badań nad szeregiem procesów fitofizjologicznych ze względu na stosunkowo szybki wzrost i rozmnażanie wegetatywne oraz łatwość hodowli w kulturach sterylnych. *Lemnaceae* należą do wyższych roślin kwiatowych (kwiaty tworzą wyjątkowo rzadko), jednakże odznaczają się bardzo uproszczoną budową morfologiczną i anatomiczną. Rozmnażają się głównie na drodze wegetatywnej. W sprzyjających warunkach pędy wegetatywne tworzą niezwykle szybko nowe człony potomne, przy czym przyrost powierzchni jak i przyrost liczby członów odbywa się w sposób typowo wykładniczy. *Lemnaceae* stanowią materiał ogólnie dostępny, gdyż występują na całej kuli ziemskiej, tworząc szereg odmian fizjologicznych, uwarunkowanych różnymi czynnikami środowiska. Jako rośliny wodne posiadają tę zaletę, że można je hodować w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych na pożywkach syntetycznych, przy zastosowaniu odpowiedniej intensywności światła i temperatury. Inną zaletą hodowli *Lemnaceae* w kulturach sterylnych (w erlenmajerkach) jest stosunkowo mała powierzchnia, którą zajmują, co z kolei ułatwia badania wpływu wielu czynników zewnętrznych na różne procesy fizjologiczne. Stworzenie optymalnych warunków hodowli laboratoryjnej *Lemnaceae* uniezależnia badacza od sezonu wegetacyjnego w warunkach naturalnych i umożliwia przeprowadzanie doświadczeń w ciągu całego roku.

Z czterech rodzajów rodziny *Lemnaceae* (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*) najczęściej używane do badań fizjologicznych są *Lemna* i *Spirodela*. Znacznie rzadziej używa się rodzajów *Wolffia* i *Wolffiella* ze względu na ich drobne rozmiary (0,3–3 mm). Bogaty przegląd literatury nad fizjologicznymi badaniami poszczególnych gatunków rodziny *Lemnaceae* podaje Landolt (1957), Hillman (1959 a, b, 1961) oraz Czopek (1960, 1962).

### Otrzymywanie sterylnych kultur

Materiał po zebraniu w środowisku naturalnym poddaje się sterylizacji celem uzyskania kultur zupełnie pozbawionych mikroorganizmów. Sterylizację przeprowadza się przez zanurzenie roślin w 0,1% roztworze sublimatu i 50% alkoholu

przez 30–60 sek. zależnie od gatunku rośliny (Kandeler 1955, Czopek 1959 a, Wcisło 1963), względnie w 0,05% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl) przez 60 sek. (Bitcover i Sieling 1951, Landolt 1957). Następnie przemywa się rośliny sterylną wodą destylowaną i przenosi się do kolbek hodowlanych zawierających wyjałowioną pożywkę syntetyczną z dodatkiem 1% sacharozy i 0,01% asparaginy jako sprawdzianu sterylności. Powyższe operacje wykonuje się w wa-

Tabela I

Liczba sterylnych członów (po 15 dniach hodowli) w zależności od stosowanego czasu sterylizacji (Czopek 1959 a)

Czas sterylizacji w sekundach	Sublimat	Alkohol	Sublimat	Alkohol	Sublimat	Alkohol	Sublimat	Alkohol
	45	30	30	45	45	45	60	60
<i>L. gibba</i>		180		115		139		108
<i>L. minor</i>		138		98		116		82
<i>L. trisulca</i>		6		6		9		3
<i>Spirodela</i>		10		7		28		8
<i>Wolffia</i>		39		51		44		41

runkach aseptycznych, w specjalnych komorach do szczepień. Po kilku dniach hodowli w termostacie świetlnym (około 1200 luksów, temperatura 28°C) z ginących pędów macierzystych regenerują członki potomne dające początek sterylnej hodowli. Tak uzyskane kultury sterylne mogą być przeszczepiane (w warunkach aseptycznych) na świeżą pożywkę bez ponownej sterylizacji, stanowiąc materiał do fizjologicznych badań.

### Warunki hodowli kultur

Szybkość wzrostu i jego przebieg jest uzależniony od szeregu czynników zewnętrznych, jak chemiczny skład pożywki, intensywność oświetlenia, temperatura i inne.

#### 1. Pożywka

Badania wielu autorów wykazały, że poszczególne gatunki rodziny *Lemnaceae* mogą rosnąć na różnych pożywkach mineralnych o znacznej zawartości wapnia w porównaniu do pozostałych składników. Nie jest to fakt nieoczekiwany jeśli zważyć, że *Lemnaceae* należą do roślin wyższych — kwiatowych, które wymagają wapnia do swego rozwoju. *Lemnaceae* są gatunkami o dużych wymaganiach w stosunku do mikroelementów, zwłaszcza boru, manganu, molibdenu i cynku. W związku z tym do hodowli *Lemnaceae* najczęściej używa się pożywek o składzie podanym przez Hutnera (Landolt 1957), Pirsona i Seidela (Kandeler 1955) oraz Hoaglanda (Bonner i Galston 1952).

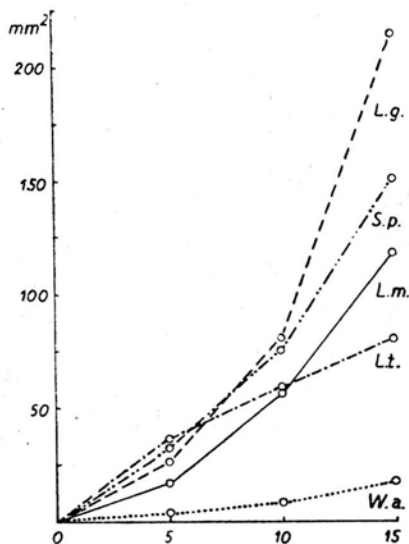
Cechą charakterystyczną pożywki Hutnera jest wysoka zawartość mikroelementów oraz dodatek  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczworoctowego). W pożywce mineralnej przy  $\text{pH} > 6$  znacznie lepiej przyswajalne jest żelazo w formie organicznej (cytrynian lub winian żelazowy). Natomiast przez

Tabela II

## Skład chemiczny pożywek

Hutner, mg	Pirson i Seidel, mg	Hoagland, mg
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ . . . . . 400	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . . 200	$\text{KNO}_3$ . . . . . 610
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . . . . . 200	$\text{KNO}_3$ . . . . . 400	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 950
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 500	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 610	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 490
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ . . . . . 200	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 300	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . . . . . 120
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 25	Cytrynian żelazowy . . . . . 5	Winian żelazowy . . . . . 5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 65	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 0,3	Mikroelementy . . . . . 1 ml
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . . . . . 15	$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . . 0,5	$\text{H}_2\text{O}$ dest. . . . . 1000 ml
$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . . 15	$\text{H}_2\text{O}$ dest. . . . . 1000 ml	Skład roztworu mikroelementów w mg/litr
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 25		$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . . 600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 4		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 400
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 1		$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 50
$\text{Na}_2\text{EDTA}$ . . . . . 500		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 50
$\text{H}_2\text{O}$ dest. . . . . 1000 ml		$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 20
		$\text{H}_2\text{O}$ dest. . . . . 1000 ml

Rys. 1. Przyrost powierzchni członów *Lemna gibba* (L. g.), *Lemna minor* (L. m.), *Lemna trisulca* (L. t.), *Spirodela polyrrhiza* (S. p.), *Wolffia arrhiza* (W. a.) jako funkcja czasu (pożywka Hoaglanda). Odcięte — dni, rzędne — ogólna powierzchnia członów w  $\text{mm}^2$  (Czopek 1959 a)



dodatek EDTA do pożywki można polepszyć pobieranie jonów metali trudno rozpuszczalnych soli, a szczególnie żelaza podanego w formie soli nieorganicznej.

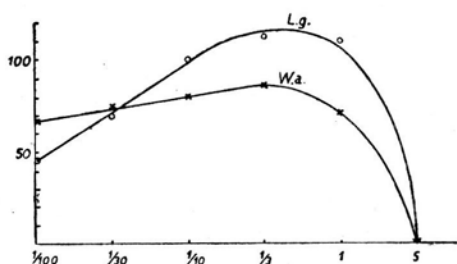
Jak wykazały badania wielu autorów najlepszy wzrost *Lemnaceae* jest w zakresie  $\text{pH}$  od 4,8–6,1, przy czym małe zmiany w kwasowości pożywki podczas wzrostu nie odgrywają większej roli (Henssen 1954, Landolt 1957).

W celu polepszenia wzrostu wegetatywnego oraz sprawdzenia sterylności kultur do pożywki dodaje się również organiczne źródło węgla. Najczęściej używana jest sacharoza w stężeniu 1%, znacznie rzadziej natomiast fruktoza i glukoza (Gorham 1945, Henssen 1954, Kandeler 1955, Czopek 1959 b, 1963, Wcisło

Tabela III

Przyrost powierzchni, liczby członów i liczby roślin polskich gatunków z rodziny *Lemnaceae* w zależności od czasu hodowli na trzech pożywkach (Czopek 1959 a)

Pożywka	Gatunek	Przyrost powierzchni członów w mm <sup>2</sup> dni			Przyrost liczby członów dni			Przyrost liczby roślin dni		
		5	10	15	5	10	15	5	10	15
Pirson i Seidel	<i>L. gibba</i>	28,32	93,23	273,45	6	16	51	3	8	22
	<i>L. minor</i>	24,33	92,05	280,62	6	15	45	3	8	20
	<i>L. trisulca</i>	17,00	19,78	22,22	2	3	3	—	—	—
	<i>Spirodela</i>	11,73	37,29	49,30	2	3	4	—	1	2
	<i>Wolffia</i>	5,26	13,05	32,81	6	15	38	3	7	21
Hoagland	<i>L. gibba</i>	25,79	80,03	215,19	5	16	43	3	5	20
	<i>L. minor</i>	15,32	56,91	119,48	4	14	32	2	6	17
	<i>L. trisulca</i>	37,62	57,67	81,40	4	6	8	—	—	—
	<i>Spirodela</i>	33,91	76,34	152,14	5	7	13	2	3	6
	<i>Wolffia</i>	3,67	8,41	18,14	5	12	31	2	5	17
Knop	<i>L. gibba</i>	11,57	18,03	19,00	3	4	4	2	3	3
	<i>L. minor</i>	12,85	21,89	22,36	5	11	13	2	4	5
	<i>L. trisulca</i>	31,90	51,90	55,24	1	1	1	—	—	—
	<i>Spirodela</i>	3,83	16,33	27,47	2	3	4	1	1	2
	<i>Wolffia</i>	1,71	4,15	6,66	2	8	19	1	4	10



Rys. 2. Wzrost *Lemna gibba* (L. g.) i *Wolffia arrhiza* (W. a.) w zależności od stężenia pożywki Hutnera przy ciągłym oświetleniu 2000 luksów i temperaturze 24°C. Odcięte — stężenie pożywki, rzędne — szybkość wzrostu (Landolt 1957)

1963). Kultury sterylne rosną dobrze na pożywkach czysto mineralnych, jednak dodatek sacharozy znacznie przyspiesza wzrost.

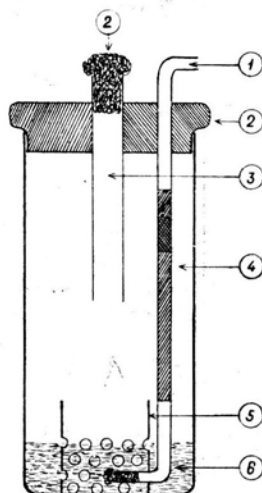
Wyniki badań Landolta (1957) wskazują, że rozcieńczona pożywka Hutnera nawet do 1/10 stężenia podstawowego tylko nieznacznie obniża wzrost. Natomiast pięciokrotne stężenie pożywki powoduje zupełne zahamowanie wzrostu *Lemna* i *Wolffia* (ryc. 2). Zupełnie inne wyniki uzyskano na pożywce Pirsona i Seidela, dla której obniżenie stężenia pożywki do 1/10 stężenia podstawowego wywołuje w efekcie silne zahamowanie wzrostu *Lemna gibba* (Czopek 1959 a).

Wcisło (1963) badając różnice morfologiczno-fizjologiczne pomiędzy klonami *Lemna trisulca* na drodze hodowli w warunkach aseptycznych stwierdziła, że najlepszy wzrost można uzyskać na pożywce Hoaglanda i Clarka oraz na zmodyfikowanej pożywce Rhodogo i Pfeffera. Natomiast na pożywce Hutnera, Knopa, Pirsona i Seidela *Lemna trisulca* rośnie znacznie słabiej.

*Lemnaceae* rosnące w wystarczająco silnym świetle nie potrzebują normalnie substancji wzrostowych. Jednakże rosnące w ciemności wymagają obok węglowodanów i aminokwasów — ekstraktu drożdżowego (Gorham 1950, cyt. wg Landolt 1957). Stymulujące działanie na wzrost niektórych gatunków rodziny *Lemnaceae* wywiera dodatek do pożywki substancji humusowych lub ekstraktu torfowego. Jednakże jest to zagadnienie złożone i wymagające dalszych badań, gdyż otrzymywano różne wyniki zależnie od stosowanych warunków hodowli. Badania Hutnera *et al.* (1950, cyt. wg Landolta 1957) wykazały, że ekstrakt torfowy podobnie jak ekstrakt nawozowy nie stymulują wzrostu *Spirodela oligorrhiza*. Wcisło (1963) hodując *Lemna trisulca* na zmodyfikowanej pożywce Pfeffera przygotowanej na 1% ekstrakcie torfowym, stwierdziła znaczne polepszenie wzrostu. Natomiast kultury *Lemna trisulca* hodowane na sterylnym 1% ekstrakcie torfowym, ale bez dodatku składników mineralnych i cukrów długo zachowywały żywotność, lecz bardzo słabo rosły. Dodatek 0,04% peptonu bakteriologicznego do pożywki Pfeffera powoduje deformację członów *Lemna trisulca*, objawiającą się zwijaniem liściokształtnych pędów (Wcisło 1963).

#### Przewietrzanie hodowli

Polepszenie wzrostu *Lemnaceae* można również osiągnąć przez przewietrzanie pożywki. Jednak w kulturach sterylnych konieczne jest zastosowanie specjalnych



Rys. 3. Schemat naczynia hodowlanego z zastosowaniem pierścienia ograniczającego wzrost *Spirodela polyrrhiza* do pewnej powierzchni i filtru do przewietrzania pożywki. 1 — dopływ powietrza z przewietrznika, 2 — korek z waty, 3 — otwór do szczepienia roślin, 4 — filtr do otrzymywania sterylnego powietrza, 5 — pierścień, 6 — pożywka (Czopek 1963)

filtrów celem uzyskania sterylnego powietrza. Filtr taki może stanowić rurka szklana (długości około 25 cm, średnicy 0,5 cm) napełniona silnie ubitą watą (dłu-

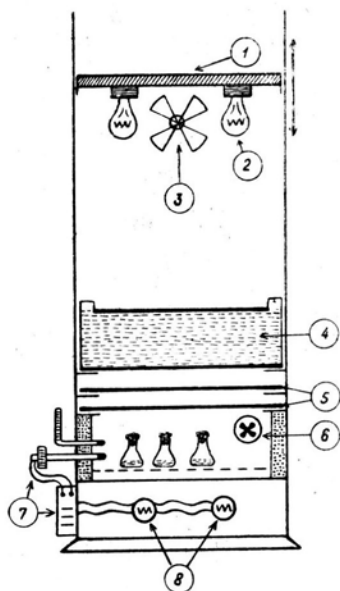
gości około 10 cm) i kawałkami rozartego sączka bibułowego (1 cm) używanego powszechnie do analiz. Tak zbudowany filtr podłączony do naczyń hodowlanych nie przepuszcza żadnych bakterii lub zarodników grzybów i może być używany (po uprzedniej sterylizacji) do właściwych doświadczeń (Czopek 1963). Do przewietrzania pożywki można stosować przewietrzniki akwaryjne, pompujące powietrze przez wyżej opisane filtry.

W pewnych wypadkach dla polepszenia warunków rozwoju przepuszcza się przez pożywkę mieszaninę powietrza z  $\text{CO}_2$  (5%).

## 2. Światło

Hodowlę *Lemnaceae* prowadzi się zazwyczaj w termostatach świetlnych, w których dowolnie można zmieniać intensywność oświetlenia. Najbardziej korzystnym dla wzrostu *Lemnaceae* (podobnie jak i dla wielu innych roślin wyższych) jest białe światło jarzeniowe o spektrum zbliżonym do światła dziennego. Pomiarów intensywności oświetlenia dokonuje się zwykle za pomocą luksomierza (w luksach) lub termostosu i galwanometru (w ergach/cm<sup>2</sup>/sek.). Przy dokładnych pomiarach intensywność oświetlenia mierzy się wewnątrz erlenmajerek używanych do doświadczeń, gdyż ściany tych naczyń oraz korek z waty pochłaniają pewien procent światła.

Do badań nad wpływem różnych zakresów spektralnych na procesy fotobiologiczne (kiełkowanie, kwitnienie) stosuje się fototermostaty ze światłem chroma-



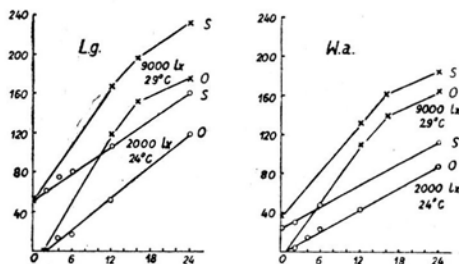
Rys. 4. Schemat budowy fototermostatu ze światłem chromatycznym. 1 — płyta ruchoma, 2 — źródło światła (4 żarówki 150 W), 3 — wentylator do chłodzenia żarówek, 4 — akwarium szklane z płynnym filtrem (roztwór  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  w 0,5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lub  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2$  w 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 5 — filtry szklane barwne, 6 — wentylator mieszający powietrze, 7 — termometr kontaktowy wraz z przekaźnikiem ręciowym, 8 — ogrzewanie termostatu (2 żarówki 25 W), (Czopek 1962)

tycznym o znacznej powierzchni oświetlenia (ryc. 4). Dokładny opis budowy tego rodzaju termostatu można znaleźć w pracy Czopka (1962).

Rozwój *Lemnaceae* polepsza się ze wzrostem intensywności oświetlenia do pewnych granic. Jak donosi Landolt (1957) poszczególne gatunki i odmiany rodziny *Lemnaceae* osiągają maksymalny wzrost przy intensywności światła między 4000 a 15000 luksów. Jednakże intensywność oświetlenia około 15000 luksów powoduje u niektórych gatunków uszkodzenia górnej połowy roślin, co jest wywołane zdaniem Landolta (1957) raczej szkodliwym działaniem nadmiernej ilości promieni ciepłych przy tak silnym naświetlaniu. Czopek (1959 a, b, 1962, 1963) z powodzeniem stosuje do hodowli *Lemnaceae* znacznie niższe intensywności oświetlenia — około 1200 luksów. Natomiast Wciśło (1963) stwierdziła, że dla hodowli *Lemna trisulca* wystarcza zupełnie oświetlenie o intensywności około 500 luksów.

Dla wzrostu większości gatunków *Lemnaceae* ciągłe oświetlenie jest najkorzystniejsze. Krótsze okresy światła niż 24 godziny dziennie powodują obniżenie

Rys. 5. Wzrost *Lemna gibba* (L. g.) i *Wolffia arrhiza* (W. a.) w zależności od czasu naświetlania (9000 luksów i 29°C oraz 2000 luksów i 24°C) na pożywce z sacharozą (S) i bez sacharozy (O). Odcięte — okresy światła w godzinach, rzędne — szybkość wzrostu (Landolt 1957)

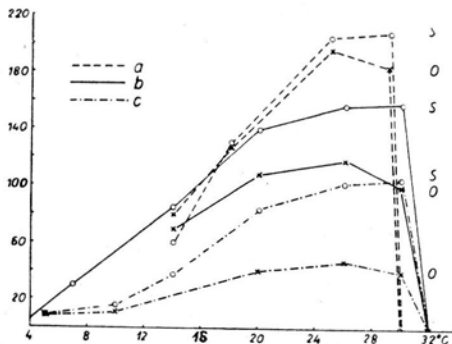


a nawet zahamowanie wzrostu, zwłaszcza przy niskich intensywnościach oświetlenia (Landolt 1957). Wyjątkowo u *Lemna trisulca*, która jest rośliną cieniophilną, zmniejszenie czasu naświetlania do 12 godzin dziennie, światłem o intensywności około 1000 luksów, powoduje obniżenie świeżej masy w granicach 10–30%. Jednakże i dla tego gatunku największa liczba członów oraz najwyższe wartości świeżej i suchej masy osiąga się przy ciągłym oświetleniu (Wciśło 1963).

### 3. Temperatura

Poszczególne gatunki rodziny *Lemnaceae* posiadają różne wymagania termiczne. Maksymalne temperatury wzrostu *Lemnaceae* (w znaczeniu temperatur, przy których rośliny mogą przetrwać dłuższy okres czasu) utrzymują się w granicach 26–37°C, a minimalne między 4–18°C — są więc one podobne do temperatur granicznych innych roślin kwiatowych. Bardziej odporne na działanie niskich i wysokich temperatur są turiony (organa przetrwalne) *Spirodela polyrrhiza*. Wytrzymują one działanie temperatury 50°C przez 24 godziny, 45°C przez tydzień, –4°C przez dwa tygodnie bez jakichkolwiek uszkodzeń (Jacobs 1947). Badania Landolta (1957) wykazały, że optymalne temperatury wzrostu *Lemnaceae* na pożywce bez sacharozy znajdują się w granicach 20–30°C, natomiast na pożywce z sacharozą zakres optimum jest nieco wyższy (między 23 a 32°C). Podniesienie

temperatury hodowli w granicach optymalnych powoduje zmniejszenie się powierzchni pędów na pożywce bez sacharozy, natomiast dodatek sacharozy do



Rys. 6. Wzrost *Lemna gibba* w zależności od temperatury przy różnych intensywnościach światła, a — 9000 luksów (ciągłe oświetlenie), b — 2500 luksów (16 godzin światła), c — 1000 luksów (18 godzin światła). Pożywka z sacharozą (S) i bez sacharozy (O). Odcięte — temperatury, rzędne — szybkość wzrostu (Landolt 1957)

Tabela IV

Średnia powierzchnia dojrzałych pędów w  $\text{mm}^2$  przy 18 godzinach naświetlania światłem o intensywności 1000 luksów w różnych temperaturach. Wyniki otrzymano z 4 powtórzeń po 50 członów (Landolt 1957)

Gatunek	Pożywka	Temperatura			
		10°	20°	26°	32°
<i>Lemna minor</i>	bez sacharozy	4,4	5,7	4,0	2,6
	z sacharozą	4,2	6,8	6,5	4,2
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	bez sacharozy	turiony	16,5	15,2	13,2
	z sacharozą	(2,7)	22,3	35,0	38,7

pożywki zwiększa powierzchnie roślin przy tych temperaturach (tabela IV). Czopek (1959 a, b, 1963) prowadzi hodowlę polskich gatunków z rodziny *Lemnaceae* w stałej temperaturze 28°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) osiągając doskonałe rezultaty.

### Hodowla *Lemnaceae* w ciemności

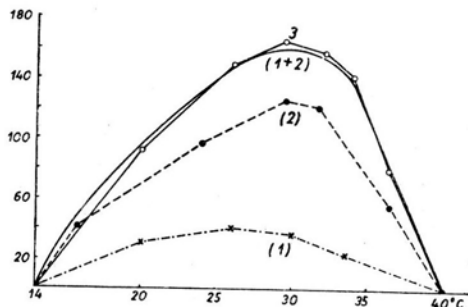
Do badań nad niektórymi procesami fotobiologicznymi, zachodzi konieczność otrzymywania etiolowanych pędów *Lemna* i *Spirodela* w ciemności. W tych warunkach *Lemnaceae* wymagają (oprócz pożywki mineralnej) nie tylko organicznego źródła węgla i azotu (sacharoza i aminokwasy), lecz również ekstraktu drożdżowego. Z 23 przebadanych aminokwasów (Gorham 1950, cyt. wg Landolt 1957), tylko d,1-izoleucyna, d,1-kwas aminomasłowy i  $\beta$ -alanina stymulują wzrost heterotroficzny, podczas gdy inne aminokwasy oddziałują raczej szkodliwie. W badaniach nad *Lemna minor* używa Gorham mieszaniny 1% sacharozy, 0,08% hydrolizatu kazeiny i 0,004% ekstraktu drożdżowego. Wcisło (1963) stosując pożywkę



przygotowaną na 1% ekstrakcie torfowym z dodatkiem 1% sacharozy zaobserwowała tylko minimalny przyrost świeżej masy *Lemna trisulca* w ciemności, natomiast stwierdziła zwiększenie się liczby członów potomnych przypadających na jeden człon macierzysty. Podobne zjawisko zaobserwowano u pędów wegetatywnych *Spirodela polyrrhiza* (Czopek 1959 b).

Oprócz wzrostu heterotroficznego zachodzącego w zupełnej ciemności na pożywce z dodatkiem składników organicznych (sacharoza, hydrolizat kazeiny i ekstrakt drożdżowy) istnieje wzrost «nie-fotosyntetyczny», który zachodzi na

Rys. 7. Stymulacja wzrostu *Spirodela polyrrhiza* przez sacharozę na świetle i w ciemności. Wykresy przedstawiają zależność wzrostu od temperatury przy 18 godzinach naświetlania światłem o intensywności 1000 luksów. 1 (1000 luksów, bez sacharozy) + 2 (ciemność, z sacharozą) = 3 (1000 luksów, z sacharozą). Odcięte — temperatury, rzędne — szybkość wzrostu (Landolt 1957)



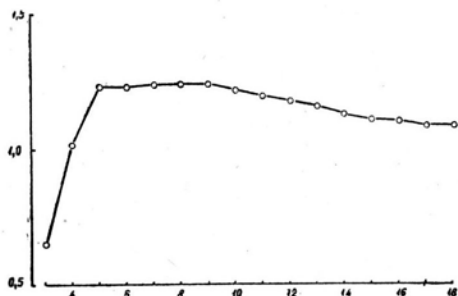
światle o niskim natężeniu nie wystarczającym do syntezy chlorofilu i fotosyntezy. Ten typ wzrostu wymaga pożywki z dodatkiem sacharozy. Wpływ tego światła zastępuje działanie substancji organicznych (hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy) niezbędnych dla zapewnienia wzrostu w zupełnej ciemności. Zdaniem Hillmana (1961) heterotroficzny wzrost może być uważany za podklasę «nie-fotosyntetycznego» wzrostu.

Jak wykazały badania Hillmana (1957), szybkość rozmnażania wegetatywnego *Lemna minor* w ciemności na pożywce z dodatkiem 1% sacharozy można znacznie zwiększyć, przerywając okres ciemności kilkuminutowym działaniem światła czerwonego przez 3 lub 4 dni. Efekt światła czerwonego można odwrócić bezpośrednim działaniem dalekiej czerwieni (około 730 m $\mu$ ). Prawdopodobnie odgrywa tu rolę ten sam układ absorpcyjny co w fotoperiodyzmie, deetiolacji, kiełkowaniu nasion i innych procesach fotobiologicznych. Wpływ niskich natężeń światła czerwonego na szybkość rozmnażania wegetatywnego *Lemna minor* można zastąpić stymulującym działaniem pewnych substancji chemicznych, zwłaszcza kinetyny (6-furfurylaminopuryny) o stężeniu  $3 \times 10^{-6}$  M (Hillman 1957). W związku z tym Hillman wysuwa przypuszczenie, że ekstrakt drożdżowy dodany do pożywki służy jako źródło kinetyny.

Czopek (1959 b) donosi, że na pożywce Pirsona i Seidela z dodatkiem 1% sacharozy powstają również w ciemności etiolowane turiony *Spirodela polyrrhiza*; są one jednak znacznie mniejsze w porównaniu z turionami wytworzonymi na świetle. Etiolowane turiony posiadają podobną zdolność do kiełkowania jak zielonooliwkowe turiony ze światła.

## Pomiary wzrostu

Ze względu na soczewkowato spłaszczony kształt *Lemnaceae*, najbardziej niezawodnym i najczęściej stosowanym wskaźnikiem wzrostu jest przyrost powierzchni, liczby członów i liczby roślin. Znacznie rzadziej oblicza się świeżą i suchą masę. Pomiaru powierzchni pędów *Lemna* i *Spirodela* dokonuje się różnymi metodami. Jedną z nich jest projekcja obrazu pływających członów na ekran względnie matówkę odpowiedniego urządzenia (Ashby, Bolas i Henderson 1928, Ashby



Rys. 8. Współczynnik kształtu (stosunek długości do szerokości) pojedynczego członu *Spirodela polyrrhiza* jako funkcja czasu. Odcięte — dni, rzędne — współczynnik (Czopek 1959 b)

Tabela V

Powstawanie członów potomnych, przebieg ich wzrostu i sumaryczny przyrost powierzchni członów, które się rozwinęły z jednego wykiełkowanego turiona *Spirodela polyrrhiza* w zależności od czasu hodowli (Czopek 1959 b)

Dzień hodowli po wykiełkowaniu turiona	Powierzchnia członów w mm <sup>2</sup>				Suma powierzchni członów I—IV, mm <sup>2</sup>	Suma przyrostu powierzchni wszystkich członów, które się rozwinęły z 1 turiona, mm <sup>2</sup>
	I	II	III	IV		
3	5	—	—	—	5	5
4	9	—	—	—	9	9
5	11,9	1,7	—	—	13,6	13,6
6	13,8	6,6	1,2	—	21,6	21,6
7	16,6	12,2	2,5	—	31,3	31,3
8	19,8	16,2	5,4	2,3	43,7	43,7
9	20,8	17,1	9,9	7,8	55,6	58,4
10	23,7	18,5	16,5	13,1	71,8	82,6
11	25,4	21,4	18,9	16,6	82,3	103,5
12	28,6	23,0	20,6	18,1	90,3	132,9
13	19,6	26,1	23,4	22,2	101,3	190,5
14	30,8	26,9	25,2	23,6	106,5	249,1
15	32,0	28,3	26,9	25,9	113,1	313,2
16	32,5	30,5	28,6	27,7	119,3	402,3
17	32,5	32,0	31,0	28,5	124,0	—
18	32,5	32,5	32,4	31,8	129,2	—

i Oxley 1935). Warunkiem tej metody jest, aby człony nie zachodziły wzajemnie na siebie. Dalszym udoskonaleniem jest metoda fotograficzno-planimetryczna (Gorham 1941, Czopek 1959 a, b). Na początku doświadczenia, a następnie co 24 godziny robi się powiększone odbitki fotograficzne roślin (aż do stadium zakończenia wzrostu przez pędy wegetatywne) i oznacza się powierzchnię przez planimetrywanie. Przy dużych powiększeniach błąd planimetrywania jest nieznaczny ( $\pm 0,2\%$ ). Ponadto ze zdjęć można oznaczyć współczynnik kształtu pojedynczego członu (stosunek długości do szerokości), liczbę członów i liczbę roślin.

Powierzchnia kultur jak i sumaryczna liczba wytworzonych członów rośnie w sposób typowo wykładniczy. Jak wykazują badania Czopka (1959 b) wzrost powierzchni pojedynczego członu *Spirodela polyrrhiza* zostaje zakończony w ciągu 10–15 dni.

Doświadczenia nad *Lemnaceae* rosnącymi w ciemności wymagają przeprowadzenia pomiarów w świetle nie wywierającym działania fizjologicznego. Gorham (1945) w doświadczeniach nad *Spirodela* używa światła ciemnozielonego, które tylko w minimalnym stopniu wpływa na wzrost. Jak wynika z badań Withrowa i Price'a (1957) światło zielone w zakresie od 500–550 m $\mu$  wywiera minimalny wpływ na fototropizm, syntezę chlorofilu i fotomorfogenezę. Ponieważ wzrok przystosowany do widzenia w ciemności posiada maksimum wrażliwości przy 510 m $\mu$ , możliwe jest używanie niskich natężeń światła zielonego do obserwacji materiału roślinnego rozwijającego się w ciemności.

Szybkie rozmnażanie wegetatywne w kulturach sterylnych tak na świetle, jak i w ciemności oraz łatwość hodowli *Lemnaceae* w ściśle ustalonych warunkach laboratoryjnych, pozwala na uzyskanie materiału do fitofizjologicznych badań niezależnie od pory roku.

*Zakład Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie*

#### LITERATURA

- Ashby E., Bolas B. D., Henderson F. Y. 1928. The interaction of factors in the growth of *Lemna*. Ann. Bot. 42, 771–782.
- Ashby E. and Oxley T. A., 1935. The interaction of factors in the growth of *Lemna*. VI. An analysis of the influence of light intensity and temperature on the assimilation rate and the rate of frond multiplication. Ann. Bot. 49, 309–336.
- Bitcover E. H. and Sieling D. H., 1951. Effect of various factors on the utilization of nitrogen and iron by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. Plant Physiol. 26, 290–303.
- Bonner J. and Galston A. W., 1952. Principles of Plant Physiology. San Francisco, W. H. Freeman and Co.
- Czopek M., 1959 a. Cultivation of Polish *Lemnaceae* species in laboratory conditions. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 2, 13–22.
- Czopek M., 1959 b. Researches on the physiology of formation and germination of turions in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 2, 76–90.
- Czopek M., 1960. Ekologiczno-fizjologiczne badania nad zakwitaniem gatunków z rodziny *Lemnaceae*. Wiad. Bot. 4, 263–280.

- Czopek M., 1962. The oligodynamic action of light on the germination of turions of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Acta Soc. Bot. Pol. 31, 703—722.
- Czopek M., 1963. Studies on the external factors inducing the formation of turions in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Acta Soc. Bot. Pol. 32, 199—211.
- Gorham P., 1941. Measurements of the response of *Lemna* to growth promoting substances. Am. Jour. Bot. 28, 98—101.
- Gorham P., 1945. Growth factor studies with *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. Am. Jour. Bot. 32, 496—505.
- Henssen A., 1954. Die Dauerorgane von *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. in physiologischer Betrachtung. Flora, 141, 523—566.
- Hillman W. S., 1957. Nonphotosynthetic light requirement in *Lemna minor* and its partial satisfaction by kinetin. Science, 126, 165—166.
- Hillman W. S., 1959 a. Experimental control of flowering in *Lemna*. I. General methods. Photoperiodism in *Lemna perpusilla* 6746. Amer. Jour. Bot. 46, 466—473.
- Hillman W. S., 1959 b. Experimental control of flowering in *Lemna*. II. Some effects of medium composition, chelating agents and temperatures on flowering in *Lemna perpusilla* 6746. Amer. Jour. Bot. 46, 489—495.
- Hillman W. S., 1961. The *Lemnaceae*, or duckweeds. A review of the descriptive and experimental literature. The Bot. Rev. 27, 222—287.
- Jacobs D. L., 1947. An ecological life history of *Spirodela polyrrhiza* (greater duckweed) with emphasis on the turion phase. Ecol. Monogr. 17, 437—469.
- Kandeler R., 1955. Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I. Kulturbedingungen und Tageslängenabhängigkeit. Zeit. f. Bot. 43, 61—71.
- Landolt E., 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 67, 269—410.
- Weisło H., 1963. Some observations concerning clones of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. (w druku).
- Withrow R. B. and Price L., 1957. A darkroom safelight for research in plant physiology. Plant Physiol. 32, 244—248.