

In Vitro Erzeugung von haploiden Cowpea-Pflanzen (*Vigna unguiculata* L.)

GUNDA MIX und WANG HUAI - MING*

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die Kuhbohne (*Vigna unguiculata* L.) ist in den Savannen- gebieten Westafrikas zuhause. Sie hat sich aber in ganz Afrika (de Mooy, 1984) und Europa (Padulosi et al., 1987) ausgebreitet. Der Cowpea wurde aus züchterischer Seite nie eine so große Bedeutung beigemessen wie es vielleicht im Hinblick ihrer Verbreitung und Bedeutung notwendig wäre (Rachie et al., 1973).

Die Züchtungsschwerpunkte liegen in der Selektion auf hohen Ertrag, Dürretoleranz und Krankheitsresistenzen. Das "Cowpea Mosaikvirus" nimmt hierbei eine besondere Stellung ein (Hibi et al., 1975).

Haploide stellen für die Züchtung ein beachtliches Potential dar. Sie können unter anderem dazu genutzt werden, Mutanten und/oder rezessive Eigenschaften zu entdecken. Die Verdopplung ihres haploiden Chromosomensatzes führt zu homozygoten Pflanzen. Aus diesen Gründen wurde schon bei vielen Pflanzenarten mehr oder weniger erfolgreich versucht, Haploide zu erzeugen.

Einige Arbeiten, die über in vitro Kulturen von Cowpea berichten, liegen bereits vor. Es konnten eine Anzahl von Meristem-, Protoplasten- und Achselknospenkulturen erfolgreich durchgeführt werden (Kantha et al., 1981; Sebastian, 1983; Gill et al., 1987; Mix, 1987).

Ladeinde und Mitarbeiter (1977) berichteten bisher als einzige in einer einleitenden Studie über die Erzeugung von Haploiden mit Hilfe der Antherenkultur. Sie konnten eine Kallusbildung und wurzelähnliche Strukturen durch geeignete Nährbodenwahl induzieren.

In der vorliegenden Arbeit werden in vitro Kulturbedingungen diskutiert, die zur Regeneration von haploiden Cowpea-Pflanzen geführt haben.

Material und Methoden

Drei verschiedene Cowpea-Herkünfte (2n=22) dienen als Antherenspenderpflanzen. Zwei Herkünfte (Tvu 91, Tvu 1987) stammten aus der Genbank des International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria. Die Sorte "Pipo" wurde aus Argentinien bezogen.

Die Spenderpflanzen wurden in Phytokammern unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Die Temperatur betrug 30°C während des Tages und 22°C in der Nacht. Die Luftfeuchtigkeit konnte während der Vegetationszeit auf 30-40% gehalten werden.

*Diese Arbeit wurde während eines Studienaufenthaltes von Herrn Wang Hui-Ming im Rahmen der deutsch-chinesischen Zusammenarbeit im Bereich der Agrarforschung angefertigt.

ten werden. Eine Lichtintensität von 8-9 Klx stand während der Tageszeit zur Verfügung.

In Kultur genommen wurden Antheren, die aus 2-4 mm langen Knospen stammen. In diesem Entwicklungsstadium waren die Antheren ca. 0,5 mm lang und weißgrün gefärbt. Die Mikrosporen befanden sich dann im Einkernstadium wie die mikroskopischen Untersuchungen gezeigt hatten.

Die 10 Antheren, die in jeder Knospe enthalten sind, wurden auf verschiedene Nährböden aufgelegt. Die Desinfektion der Knospen erfolgte in einer 2%igen Calciumhypochloridlösung für 20 min. mit einer nachfolgenden mehrmaligen Spülung in sterilem Wasser.

Die Nährböden M1-3 enthielten MS (Murashige und Skoog, 1962) und M4-7 B5 (Gamborg et al., 1968) als Grundnährboden. Die Zusätze zu diesen Nährböden waren folgende: Auxine: 1-Naphthyllessigsäure (NES); 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D); 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) und 4-Amino-3,5,6-Trichloropicolinsäure (Picloram) Cytokinine: 6-Furfurylaminopurin (Kin.); 6-Benzylaminopurin (BAP) und Saccharose (Tab.1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der kallusinduzierenden Nährböden/ Composition of the callus inducing media

	BAP mg/l	Kin mg/l	NES mg/l	2,4D mg/l	2,4,5T mg/l	Pic mg/l	Sacch. g/l
M1	1,0		1,0				60
M2	1,0		1,0				30
M3	2,0		1,0				30
M4	1,0		1,0	2,0			80
M5		1,0	1,0			0,1	80
M6		1,0	4,0		2,0		40
M7		0,5	4,0			0,1	40

Nachdem die Antheren bei 28°C in Dunkelheit kultiviert worden waren, erfolgte ein Umsetzen der gebildeten Kalli auf kallusbildungsfördernde oder sproßinduzierende Nährböden. Die kallusbildungsfördernden Nährböden hatten einmal B5 oder B (Blaydes et al., 1986) als Grundnährboden. Die Zusätze dieser Nährböden sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: **Zusammensetzung der Nährböden zur Förderung der Kallusbildung/ Composition of the media promotion callus formation**

	BAP mg/l	Kin mg/l	NES mg/l	2,4D mg/l	GA ₃ mg/l	Cahy.* mg/l	Casa.** mg/l	Sacch. g/l
M8	0,1		0,2		0,2	200		30
M9	0,1		0,2		0,2		200	30
M10		1,0	2,0					30
M11			2,0	2,0				30

* Caseinhydrolysat ** Pepton aus Casein C/HSB

Die sproßinduzierenden Nährböden basieren auf dem MS-Grundnährboden versetzt mit 1-Naphthylessigsäure, Indol-3-essigsäure, 6-Benzylaminopurin, Isopentenyladenin (2ip) und Saccharose (Tab.3).

Tabelle 3: **Zusammensetzung der sproßinduzierenden Nährböden/ Composition of the shoot inducing media**

	BAP mg/l	2ip mg/l	NES mg/l	IES mg/l	Sacch. g/l
M12		0,5	0,25	0,25	20
M13	0,05				60
M14	0,1				60
M15					20

Die weitere Kultivierung der Kalli erfolgte bei 26°C in einem 16 h Tag bei einer Lichtintensität von 4-6 Klx. Die Sprosse, die sich auf den sproßinduzierenden Nährböden entwickelt hatten, wurden auf einen wurzelbildenden Nährboden überführt. Der Grundnährboden RL (Collins et al., 1983) versetzt mit 0,1 mg/l 1-Naphthylessigsäure; 0,1 mg/l Indol-3-essigsäure; 0,1 mg/l 3-Aminopyridin und 10 g/l Saccharose stellte den wurzelbildenden Nährboden dar.

Alle Nährböden enthielten 7,5 g/l Agar und wurden auf pH 5,8 eingestellt und für 10 min. bei 1,1 bar autoklaviert.

Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden 7014 Antheren auf sieben (M1-7) kallusinduzierende Nährböden aufgelegt, wobei 1544 Antheren auf Tvu 91, 4547 auf Tvu 1987 und 923 auf die Sorte "Pipo" entfielen.

Die Cowpea-Knospen an den Pflanzen entwickeln sich sehr schnell. Für das Sichtbarwerden einer Knospenanlage bis hin zum Aufblühen bedarf es nur weniger Tage. Aus diesem Grunde ist die Größe der Knospen (2-4 mm) bei der Entnahme für die Antherenkultur von großer Bedeutung. Bei einer Größe von 6-8 mm blüht die Knospe bereits auf. Ladeinde und Mitarbeiter (1977) berichteten, daß Antheren aus 3 mm langen Knospen in Kultur genommen wurden.

Die Knospenfarbe kann als Merkmal wie bei anderen Pflanzenarten nicht mit herangezogen werden, da sie sich während der gesamten Entwicklungszeit nicht verändert. Die Kallusbil-

dungsrates der zwei Genotypen und der Sorte "Pipo" schwankte in Abhängigkeit von den Nährböden sehr stark (Tab.4).

Tabelle 4: **Einfluß der Nährböden auf die Kallusbildung/ Influence of the media on the callus formation**

	Tvu 91		Tvu 1987		Sorte "Pipo"	
	Antheren %	Kalli	Antheren %	Kalli	Antheren %	Kalli
M1	389	41 (10)	160	42 (26)	60	21 (35)
M2	40	-	60	-	40	-
M3	40	24 (60)	60	29 (48)	60	8 (13,3)
M4	249	1 (0,4)	900	8 (0,8)	210	28 (13,3)
M5	249	4 (1,1)	1749	24 (1,3)	178	19 (10,6)
M6	248	1 (0,4)	808	22 (2,7)	156	19 (12,2)
M7	229	1 (0,4)	810	25 (3,0)	219	29 (13,2)

Tvu 91 zeigte auf dem Nährboden M3 die höchste Kallusbildungsrate. Auf den anderen Nährböden lagen die Kallusbildungsrates niedriger, M1 (10%), M2 (0%) und M4-7 zwischen 0,4-1,1 %. Das Gleiche trifft für Tvu 1987 und die Sorte "Pipo" zu. Der M2-Nährboden unterschied sich von dem mit der höchsten Kallusbildungsrate (M3) nur durch den Zusatz von 1 mg/l BAP. Der M1-Nährboden enthielt die gleichen Hormonkonzentrationen pro Liter, hatte jedoch nur 30 g/l Saccharose zusätzlich im Nährboden.

Beim Genotyp Tvu 1987 lagen die Kallusbildungsrates ähnlich wie bei Tvu 91. Hier konnte auf M1 eine 26%ige und auf M3 nur eine 48%ige (Tvu 91 60%) Kallusbildungsrate erreicht werden. Auf den Nährböden M4-7 lagen die Werte zwischen 0,8-3%.

Die Sorte "Pipo" zeigte auf dem Nährboden M1 die beste Kallusbildungsrate (35%). Auf dem Nährboden M4-7 konnten die Mikrosporen zu einer deutlich höheren Kallusbildungsrate (10,6-13,3%) verglichen mit den beiden anderen Genotypen angeregt werden. Die Sorte "Pipo" wies keine hohen Kallusbildungsrates wie z.B. Tvu 91 (60%) auf. Die Sorte "Pipo" lag jedoch bei der Berechnung der durchschnittlichen Kallusbildungsrates aller angesetzten Antheren auf allen sieben Nährböden bei 13,4%, wogegen Tvu 91 bei 4,6% und Tvu 1987 bei nur 3,3% lagen.

Den Nährböden M5-7 wurde Picloram zugesetzt, jedoch konnte kein Einfluß auf die Kallusbildung beobachtet werden. Collins und Mitarbeiter (1978) beschrieben Picloram als alternatives Auxin für 2,4D, dessen Wirkung es ersetzen kann. Picloram sollte beim Einsatz von niedrigen Konzentrationen (0,002-0,1 mg/l) bei Leguminosen die Kallusbildung wirksam fördern. Ebenfalls konnte kein positiver Einfluß des 2,4D im Nährboden M4 auf die Kallusbildung der Mikrosporen wie für andere Pflanzenarten berichtet gefunden werden. Bei Vorversuchen zur Antherenkultur von Cowpea führten 2,4D Konzentrationen kleiner und größer 2mg/l auch zu keiner Steigerung der Kallusbildung.

In Vorversuchen mußten die Kulturbedingungen für die wärmeliebende Cowpea ausgetestet werden. Die Ergebnisse zeigten, daß für die Antherenkultur eine Temperatur von 28°C geeignet schien, da bei 24°C eine Verringerung der Kallusbildung und bei 30°C ein Austrocknen der Antheren auf dem Nährboden zu beobachten war. Hiervon waren vor allem die sehr kleinen Antheren, die sich im Einkernstadium befanden, betroffen als die größeren Antheren, die oftmals schon einen Anteil von zweikernigen Pollen enthielten.

Die allgemein niedrige Kallusbildung der Mikrosporen aller drei Herkünfte läßt sich kaum mit einer angenommenen begrenzten Lebensfähigkeit der Mikrosporen erklären, da auf Nährboden M3 eine Kallusbildungsrate von 13,3-60% erzielt werden konnte. Mikroskopische Untersuchungen der ange-setzten Antheren haben gezeigt, daß ca. 70% der Mikrosporen nach 3-4 Wochen noch mit einer Rotfärbung auf Karminessig-säure reagierten. Dieses Ergebnis bestätigte die Lebensfähig-keit der Mikrosporen. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Sonnenblumen beschrieben werden, wobei diese Ergebnisse die Begründung für die sehr hohe (80%) Kallusbildungsrate darstellte (Mix 1985).

Die gebildeten Kalli, die im Durchschnitt eine Größe von 5-8 mm besaßen, wurden einmal auf kallusbildungsfördernde (Tab.2) oder auf sproßinduzierende Nährböden (Tab.3) um-gesetzt. Auf allen vier (M8-11) Kallusbildungsfördernden Nährböden konnte eine positive Wirkung auf die Kallusver-mehrung beobachtet werden. Auf den Nährböden M8+9 bil-deten sich auf dem und seitlich am Kallus grüne kugelförmige Strukturen. Es konnte angenommen werden, daß es sich hierbei um embryoähnliche Strukturen handelte, doch wird dieses noch mikroskopisch untersucht werden. Caseinhydro-lysat und Casamin scheinen die gleiche fördernde Wirkung auf die Kallusbildung und auf erste Differenzierungsstadien zu haben. Beim Einsatz von Gibberellinsäure wurde immer wieder eine intensive Grünfärbung der Kalli beobachtet.

Nach sechs- bis achtwöchiger Kulturdauer erfolgte das Um-setzen der Kalli, die vorher noch geteilt (5-10 mm) wurden, auf die vier (M12-15) sproßinduzierenden Nährböden.

Tabelle 5 gibt die Anzahl der regenerierten Sprosse der zwei Genotypen und der Sorte "Pipo" mit und ohne Subkultur wieder. Hier ist deutlich zu sehen, daß die Sorte "Pipo" zwar eine auf allen Nährböden gleichmäßige Kallusbildung auf-wies, jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Sprossen (12) re-generierte. Es läßt sich auf Grund der Ergebnisse nicht der Schluß ziehen, daß es sich bei der Sorte "Pipo", um einen mehr gewebekulturtauglichen Genotypen handelt. Diese An-nahme wäre vielleicht im Hinblick auf die Kallusbildung zu diskutieren.

Bei den Mikrosporen von Tvu 1987 konnte nur eine Kallus-bildungsrate von gesamt 3,3% induziert werden. Der Genotyp lag auch bei der Anzahl von 4 gebildeten Sprossen an letzter Stelle.

Bei Tvu 91 handelte es sich um einen Genotyp, der auf grund seiner Kallusbildungsrate von 4,6% zwischen der Sorte "Pipo" und Tvu 1987 zu plazieren war, jedoch die meisten Sprosse (22) regenerierte.

Tabelle 5 zeigte ebenfalls, daß die Anzahl der Regenerate auf den vier sproßinduzierenden Nährböden sehr variierte. So bildeten Kalli aus Tvu 91-Mikrosporen auf dem Nährboden M12 8 Sprosse. Die Mikrosporenkalli der Sorte "Pipo" und Tvu 1987 ließen sich auf M12 zu keiner Sproßbildung anregen.

Auf dem Nährboden M15 (ohne Hormone) bildeten sich 10 Sprosse aus Tvu 91-, 2 Sprosse aus Tvu 1987- und 4 Sprosse aus "Pipo"-Mikrosporenkalli.

Ladeinde und Mitarbeiter (1977) setzten zur Sproßinduk-tion ein MS-Nährboden versetzt mit 0,5 mg/l NES und 0,1 mg/l Kinetin ein. Es konnten keine Sprosse aus den Mikrosporen-kalli der Sorte "Texas Dream " regeneriert werden. Es ließen sich nur wurzelähnliche Strukturen induzieren.

Tabelle 5: **Einfluß der Kallussubkultur auf die Sproßbil-dung / Influence of the subculture of calli on shoot formation**

		reg. Sprosse mit Subkultur	reg. Sprosse ohne Subkultur
Tvu 91	M12	6 (1 hapl.)	2 (1 hapl.)
	M13	4	-
	M14	-	-
	M15	8	2
Tvu 1987	M12	-	-
	M13	1 (1 hapl.)	-
	M14	1	-
	M15	2	-
"Pipo"	M12	-	-
	M13	4	1 (1 hapl.)
	M14	3 (1 hapl.)	-
	M15	3	1

Die 37 regenerierten Sprosse wurden auf einen wurzelindu-zierenden Nährboden umgesetzt. Auf diesem Nährboden waren fast 90% der Sprosse befähigt, Wurzeln zu bilden. Diese hohe Wurzelbildungsrate konnte erreicht werden, nachdem 3-Aminopyridin dem Nährboden zugesetzt wurde. 3-Aminopyridin wurde von Collins und Mitarbeiter (1983) als eine wurzelbildungsfördernde Substanz zum Nährboden beschrieben.

Erfolgte das Umsetzen der Kalli aus Mikrosporen direkt auf die sproßinduzierenden Nährböden (M12-15), wurden in der gleichen Zeit weniger Sprosse gebildet als bei den Kalli mit Subkultur.

Tabelle 5 gibt ebenfalls die Anzahl der gebildeten Sprosse der verschiedenen Herkünfte ohne Subkultur wieder. Aus der Tabelle läßt sich entnehmen, daß sich auf den gleichen Nähr-böden ("Pipo" und Tvu 1987 auf M12, Tvu 91 auf M14) mit und ohne Subkultur keine Sprosse gebildet hatten. Eine Sub-kultur auf den Nährböden M8-11 hatte sich bei den beiden Genotypen und der Sorte "Pipo" als sproßfördernd erwiesen. Keiner der hier ausgetesteten Nährböden konnte auf grund seiner Zusammensetzung als optimal beschrieben werden. Bei den sproßinduzierenden Nährböden ergab sich ein ähnli-ches Ergebnis. Es zeigte sich bei Cowpea wie schon bei ande-ren Pflanzenarten sehr deutlich, daß die einzelnen Genotypen an die Zusammensetzung der Nährböden unter anderem spe-zielle Anforderungen stellen.

Nach der Bewurzelung der Sprosse bildeten sich schnell neue Blätter. Beobachtet wurde, daß die Pflanzen während der folgenden Wachstumszeit die sehr jungen Blätter abwer-fen. Dieser Blattabfall konnte weder durch eine Veränderung der Umweltbedingungen noch des Nährbodens verhindert werden. Da aber ein ständiges Neuaustreiben von Blättern er-folgte, erreichten die Pflanzen in vitro eine Größe von ca. 18 cm.

Die bisherigen Untersuchungen an den Wurzelspitzen haben gezeigt, daß haploide Pflanzen regeneriert wurden. Die Tabelle 5 gibt diese Ergebnisse wieder. Bemerkenswert ist

dabei, daß überwiegend dort Kalli Haploide regeneriert haben, wo sich nicht unbedingt die meisten Sprosse entwickelt hatten. Es läßt sich kaum ein Unterschied in Bezug auf die Anzahl der gebildeten Haploiden aus Kalli, die eine Subkultur auf den Nährböden M8-11 durchlaufen hatten und denen die gleich auf sproßinduzierende Nährböden M12-15 kultiviert wurden, erkennen.

Zusammenfassung

Antheren von zwei Cowpea-Genotypen (Tvu 91, Tvu 1987) und der Sorte "Pipo" wurden auf Nährböden mit unterschiedlichen Auxin- und Cytokininkonzentrationen kultiviert.

In Kultur genommen wurden Antheren, die aus 2-4 mm langen Knospen stammten. Die Mikrosporen befanden sich dann im Einkernstadium.

Nachdem die Antheren bei 28°C in Dunkelheit kultiviert wurden, erfolgte ein Umsetzen der gebildeten Kalli auf kallusbildende oder sproßinduzierende Nährböden.

Die Kallusbildungsrate der zwei Genotypen und der Sorte "Pipo" schwankten in Abhängigkeit von den Nährböden sehr stark. Tvu 91-Mikrosporen zeigten die höchste Kallusbildungsrate auf einem Nährboden. Sie lag bei 60%. Auf den restlichen Nährböden blieb die Kallusbildungsrate mit einer Ausnahme (10%) unter 1%. Die Mikrosporen der Sorte "Pipo" konnten auf allen Nährböden mit einer Ausnahme (35%) zu einer mehr oder weniger gleichmäßigen Kallusbildungsrate (ca. 12,5%) angeregt werden. Tvu 1987 nahm eine Mittelstellung ein.

Nach sechs- bis achtwöchiger Kulturdauer erfolgte das Umsetzen der Kalli, nach einer Subkultur auf kallusbildungsfördernden Nährböden, zur Sproßbildung.

38 Sprosse konnten auf den vier sproßinduzierenden Nährböden regeneriert werden. Die Anzahl der gebildeten Sprosse aus Kalli, die eine Subkultur durchlaufen hatten, lag bedeutend höher (32) als ohne Subkultur (6).

Fünf Sprosse erwiesen sich nach Chromosomenbestimmungen in den Wurzelspitzen als haploid. Aus den Kalli der Mikrosporen der Sorte "Pipo" und Tvu 91 konnten jeweils zwei und aus Tvu 1987 eine Haploide regeneriert werden.

Die Sprosse, die sich auf den sproßinduzierenden Nährböden entwickelt hatten, wurden auf einen Bewurzelungsnährboden überführt. Mit dem Zusatz von 3-Aminopyridin zum Nährboden konnte eine 90%ige Bewurzelung der Sprosse erreicht werden.

In vitro Production of haploid Cowpea Plants (*Vigna unguiculata* L.)

Two different genotypes (Tvu 91, Tvu 1987 , obtained from IITA, Nigeria) and the Argentinian variety "Pipo" were used as donor plants for anther culture. The donor plants were grown in a growing chamber under controlled condition. The temperature was 30°C during the day and 22°C during the night.

In total 7041 anthers were cultured on seven different callus inducing media. These seven media contained MS and B5 as basal media supplemented with combinations of auxins and cytokinins.

Flower buds of cowpea develop very fast. It takes only a few days from the appearance of buds up to flowering. For

anther culture the buds should have a length of 2-4 mm. The microspores are then in the uninucleate stage.

Young buds were sterilized by immersion for 20 minutes in 2 % calcium hypochlorite containing a trace of Tween 80 to facilitate wetting followed by washes with sterile water.

The cultures were incubated at 28°C in darkness for callus induction. The callus formation of the microspores of the three genotypes varied on the seven callus inducing media. Tvu 91 (60%) and Tvu 1987 (48%) showed the highest callus response on the medium M3. On the other six media the callus formation was low. The variety "Pipo" showed a more uniform callus formation rate (10,6-13,3%) with the exception of M1 with 35%. None of the three genotypes were able to promote their microspores to produce callus on medium M2.

Two of the callus inducing media contained Picloram, which is described to have a positive influence on the callus formation and could substitute 2,4D. No response could be found neither to Picloram nor to 2,4D.

The reason for the in general low callus formation on most media was not the rapid decrease of the viability of the microspores. Staining with carmine acid showed that after 3-4 weeks of culture on these media about 70% of the microspores were still alive.

The developed callus of the microspores were divided. One half was placed on media promoting callus formation and the other half on shoot inducing media.

38 shoot could be regenerated from calli on the four shoot inducing media. There was a great difference with regard to shoot formation whether the calli had been subcultured or not. 32 shoots developed out of calli treated by a subculture and 6 shoots out of those without a subculture. In total Tvu 91 microspores calli developed 22 shoots, Tvu 1987 4 shoots and the variety "Pipo" 12 shoots.

After chromosome counting in the root tip cells five shoots proved to be haploid. The variety "Pipo" and Tvu 91 produced two and Tvu 1987 one haploid shoot out of the microspore calli.

The 38 shoots were placed on a root inducing medium. On this medium 90% of the shoots were able to develop roots. This result could only be obtained after the addition of 3-Aminopyridin to the root inducing medium.

Literatur

Blaydes, D.F.; Frist, R.H.; Roger, G.; Seebert, Jr. and Bento, R.: Culture conditions for cowpea callus.-In: Plant Physiology Suppl. 80 (1986), S. 129.

Collins, G.B.; Vian, W.E. and Phillips, G.C.: Use of 4-Amino-3,4,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue culture.-In: Crop Science 18 (1978), S. 286-288.

Collins, G.B.; and Phillips, G.C.: In vitro tissue culture of *Trifolium pratense* L.- In: Crop Science 23 (1983), S. 22-23.

Gill, R.; Eapen, S. and Rao, P.S.: Callus induction from

- protoplasts of *V. unguiculata*, *V. sublobata*, *V. mungo*.-In: Theoretical and Applied Genetics 74 (1987), S. 100-103.
- H i b i, T.; R e z e l m a n, G. and v a n K a m m e n, A.: Infection of cowpea mesophyll protoplasts with cowpea mosaic virus.- In: Virologie 64 (1975), S. 308-318.
- K a r t h a, K.K.; P a h l, K.; L e u n g, L. and M r o g i n s k i, L.A.: Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean.- In: Can. J. Bot. 59 (1981), S. 1671-1679.
- L a d e i n d e, T.A. and B l i s s, F.A.: A preliminary study on the production of plantlets from anthers of cowpea.-In: Tropical Grain Legume Bull. 8 (1977), S. 13.
- M i x, G.: In vitro Kultur von Cowpeapflanzen zur Gewinnung Keimfreier Blätter und Samen.-In: Landbauforschung Völknerode 37 (1987), S. 121-123.
- D e M o o y, B.E.: Cowpea germplasm collection in Botswana.- In: Plant Genetic Resources-Newsletter 71 (1987), S. 37.
- M u r a s h i g e, T. and S k o o g, F.J.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.-In: Physiologica Plantarum 15 (1962), S. 473-497.
- P a d u l o s i, S.; C i f a r e l l i, S.; M o n t i, L. and P e r r i n o, P.: Cowpea germplasm in southern Italy.-In: Plant Genetic Resources-Newsletter 71 (1987), S. 37.
- R a c h i e and R a w a l: Integrated approaches to improve cowpea, *Vigna unguiculata* L.-In: IITA Bull. 5 (1973).
- S e b a s t i a n, K.T.: Shoot tip culture and subsequent regeneration in cowpea.-In: Scientia Horticulturae 20 (1983), S. 315-317.
- Verfasser: M i x, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völknerode (FAL), Institutsleiter: Prof. Dr. agr. M. D a m b r o t h.
- W a n g, Huai-Ming, Ass. Prof., Beijing Vegetable Research Centre, Beijing. Studienaufenthalt im Rahmen der "Deutscheschinesischen Zusammenarbeit" im Bereich der Agrarforschung.