

Der Einfluß der Kotyledonen auf die Bildung von in vitro Pflanzen aus Cowpea-Embryonen (*Vigna unguiculata* L.)

GUNDA MIX und WANG HUAI-MING*

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die Anwendung der in vitro Embryokultur im Gartenbau und im Bereich der Züchtung ist von höchster Wichtigkeit. Diese Technik wurde ursprünglich entwickelt, um Untersuchungen über grundlegende Probleme der Embryoentwicklung durchführen zu können. Hierbei sind die Wachstumsansprüche der Embryonen, die Rolle der hormonalen Substanzen, die die Embryoentwicklung in vitro beeinflussen, die Ernährung und der Stoffwechsel während der verschiedenen Entwicklungsphasen nur einige wichtige Aspekte (Raghavan et al., 1982).

Es scheint so, als ob die Embryokultur für die Züchtung eine Standardtechnik wäre, um inkompatible Hybridkreuzungsprodukte zu erhalten. Es nimmt sich bisher die Anzahl der in vitro isoliert angezogenen Hybridsämlinge noch sehr bescheiden aus (Gosal et al., 1983; Chen et al., 1983; Schäfer-Menuhr, 1988).

Ebenfalls wird die Embryokultur dazu benutzt, die Keimruhe der Samen zu umgehen. Außerdem ist es möglich, den Lebenszyklus vom Samen bis zum Blühen abzukürzen (Hu et al., 1986). Der unreife sowie reife Embryo kann als Ausgangsexplantat für eine multiple Sproßbildung genutzt werden. Diese methodischen Ansätze könnten für einen Züchtungsablauf von Bedeutung sein.

In dieser Arbeit soll die Rolle der Kotyledonen bei der Entwicklung von isolierten Embryonen in vitro am Beispiel von *Vigna unguiculata* L. diskutiert werden.

Material und Methoden

Die Anzucht der Pflanzen der zwei Genotypen (Tvu 91 und Tvu 1987) konnte in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen bis zur Blütenbildung durchgeführt werden (Mix, 1988).

Für die Embryokultur wurden die Hülsen in unterschiedlichen Größen geerntet. Die oberflächliche Sterilisation der Hülsen erfolgte mit einer 2%igen Calciumhypochloridlösung für 20 Minuten und anschließender mehrfachen Spülung mit sterilem dest. Wasser. Die Samenanlagen wurden aus den Hülsen herausgetrennt und ihre Länge, bevor der Embryo herauspräpariert wurde, bestimmt. Die Abb. 1 gibt die Behandlungsvarianten der Embryonen wieder.

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

Die Embryonen befanden sich im Herz- bis Torpedostadium. Dieses entspricht den Embryogrößen zwischen 1 - >6 mm.

Die unterschiedlich behandelten Embryonen (6 Varianten) wurden auf drei Nährböden kultiviert. Die Zusammensetzung der Nährböden ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Zusätze zu diesen Nährböden waren folgende: Auxine: 1-Naphthylelessigsäure (NES) und Indol-3-essigsäure (IES); Cytokinine: 6-Benzylaminopurin (BAP) und Isopentenyladenin (2iP).

Die Kultur der behandelten Embryonen erfolgte bei 25°C in einem 16 h Tag bei einer Lichtintensität von 4-6 Klx.

Nachdem die Keimlinge eine Länge von 3-4 cm erreicht hatten, verlief die weitere Entwicklung zur Verbesserung der Wurzelbildung auf einem hormonfreien oder mit 0,5 mg/l 1-Naphthylelessigsäure versetzten Nährboden.

Alle Nährböden enthielten die halbe Konzentration des Murashige und Skoog (1962) Grundnährbodens. Allen Nährböden wurde 7,5 g/l Agar zugefügt und auf pH 5,8 eingestellt. Das Autoklavieren erfolgte für 10 Minuten bei 1,1 bar.

Ergebnisse und Diskussion

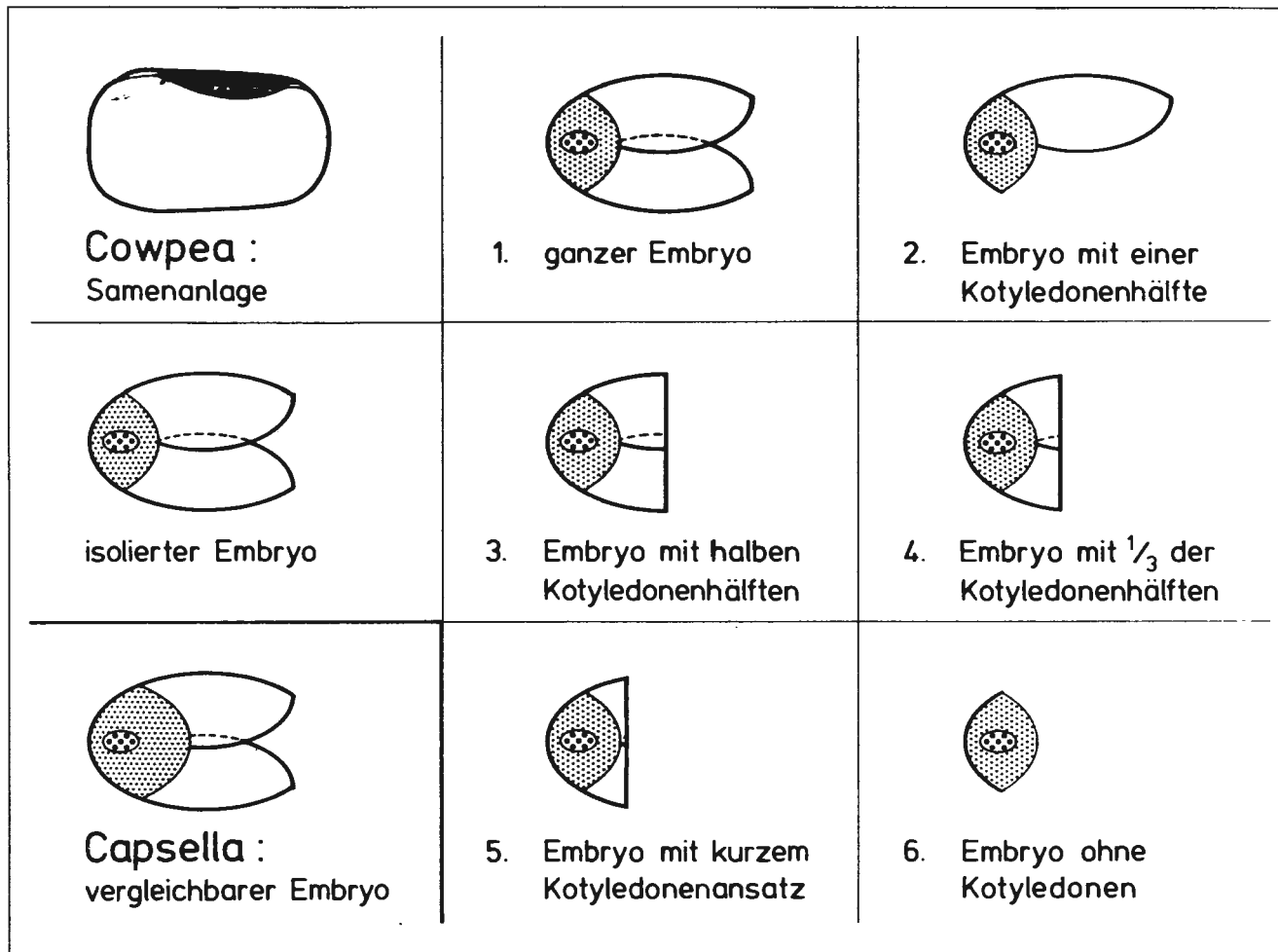
Die Hülsen der zwei Genotypen (Tvu 91 und Tvu 1987) wurden in unterschiedlichen Größen geerntet und die Samenanlagen entnommen. Bei dieser Präparationsarbeit konnte festgestellt werden, daß zwischen der Dicke sowie Länge der Hülsen und der Größe der Samenanlagen keine Beziehung besteht. Ebenfalls ließen sich nur sehr begrenzt Rückschlüsse aus der Größe der Samenanlage auf die Größe des Embryos ziehen. Die Samenanlage selbst hatte sehr schnell eine Größe von 6-8 mm erreicht, wobei aber die Größe des Embryos zwischen 1-8 mm liegen kann. So ließ sich die exakte Größe der Embryonen nicht mit Hilfe der Größe der Samenanlagen indirekt bestimmen.

Den Embryonen der zwei Genotypen wurden, wie in Abb. 1 dargestellt, unterschiedlich große Teile der Kotyledonen vor der Inkulturnahme entfernt.

In Abbildung 2 ist der Einfluß der Kotyledonen unterschiedlich großer Embryonen auf die Weiterentwicklung der Embryonen dargestellt. Bei allen Versuchsvarianten wurden 30 Embryonen in Kultur genommen.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, daß bei sehr kleinen Embryonen (<1-2 mm) die teilweise bis absolute Entfernung der

Abb. 1: Schematische Darstellung der Behandlungsvarianten/ Diagrammatic view of the variants of the treatment



Kotyledonen nur einen ganz begrenzten Einfluß auf die Keimfähigkeit der Embryonen ausübte. Die Anzahl der gekeimten Embryonen der 6 Versuchsvarianten schwankten nur zwischen 13 und 8 gekeimten Embryonen. Bei allen Versuchen mit den zwei Genotypen lag bei den ganz kleinen Embryonen (<1-2 mm) die Anzahl der gekeimten Embryonen niedrig. Eine Erklärung dieses Ergebnisses könnte sein, daß in diesem Stadium der Anteil der Kotyledonen am Gesamtembryo noch sehr gering ist und daher kaum ein negativer Einfluß bei dessen Entfernung zu erwarten ist. Eine zusätzliche Erklärung wäre, daß die sehr kleinen Embryonen noch Substanzen im

Nährboden zur Verfügung gestellt haben müßten die im isolierten Zustand eine normale Entwicklung ermöglichen. Der Anteil der sich nicht ganz normal entwickelnden Keimlinge war in dieser Embryogröße (<1-2 mm) mit am Größten. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses wäre, daß man beim Schneiden an den Kotyledonen die Coleoptile verletzt und dadurch einen negativen Einfluß auf das Wachstum des Embryos erhalten kann. Der Bereich für den Suspensor, die Coleoptile und die Coleorrhiza ist bei Cowpeaembryonen verglichen mit anderen Pflanzenarten sehr klein (s. Abb. 1 Capsellaembryo).

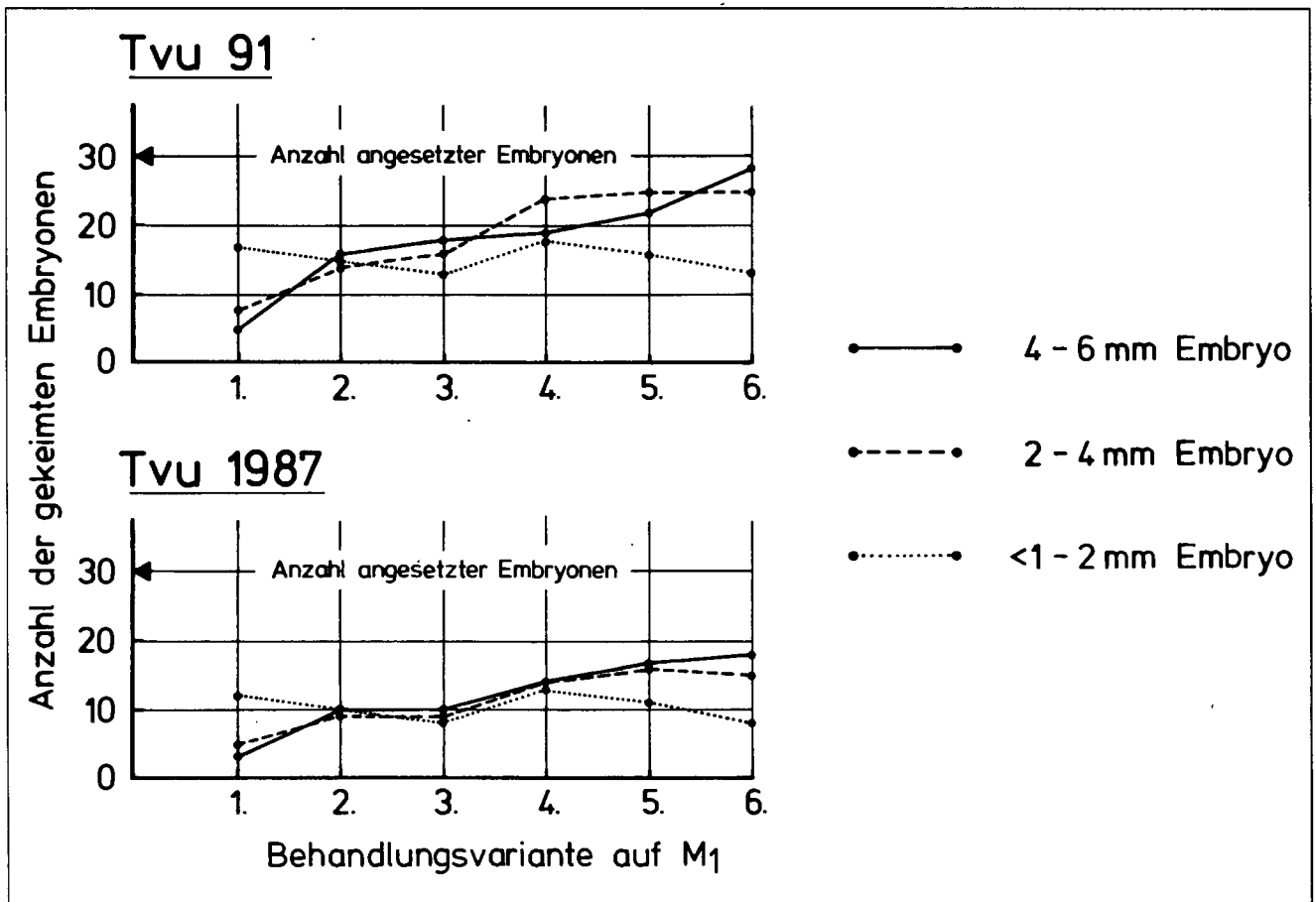
Tabelle 1: **Zusammensetzung der Nährböden für eine Embryokultur/ Composition of the embryo culture media**

	2iP mg/l	BAP mg/l	NES mg/l	IES mg/l	Sacch. g/l
M1	0,5		0,25	0,25	30
M2		0,5	0,25	0,25	30
M3					30

Bei den größeren Embryonen (2-4 und 4->6 mm) des Genotypen Tvu 91 führte die teilweise bis ganze Entfernung der Kotyledonen zu einer wesentlichen Steigerung keimender Embryonen. Erfolgte die Kultur ganzer intakter Embryonen, keimten nur 5 bzw. 8, wurden aber die Embryonen ohne Kotyledonen kultiviert, entwickelten sich 28 bzw. 25 Embryonen. Hierbei war der negative Einfluß der Kotyledonen ganz deutlich zu erkennen. Die Ergebnisse konnten durch Arbeiten von Alvarez und Mitarbeiter (1981) und Schäfer-Menuhr (1988), die ebenfalls mit Leguminosen (Euphaseolus und Lupinus) gearbeitet hatten, bestätigt werden.

Generell herrscht, belegt durch Experimente, in der Literatur die Meinung vor, daß durch die Entfernung der Kotyledonen eine Hemmung der Sproß- und Wurzelentwicklung indu-

Abb. 2: Der Einfluß der Kotyledonen auf die Keimfähigkeit der Embryonen/ The influence of the cotyledons on the germination of the embryos



ziert wird. Dieses Ergebnis erarbeitet an in vitro Kulturen erklärt Kruyt (1952) folgendermaßen.: " Die Hormone im Nährboden gehen mit den Reservestoffen in den Kotyledonen eine Reaktion ein, die sich dann fördernd auf das Sproß- und Wurzelwachstum der Embryonen auswirkt." Hotta (1957) machte die gleichen Beobachtungen an Bohnenembryonen, kultiviert in situ. Die Ergebnisse der 2.-4. Versuchsvarianten (siehe Abb. 1), bei denen den Embryonen unterschiedlich große Teile der Kotyledonen entfernt wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bei diesen Varianten konnte gezeigt werden daß je größer das Kotyledonenteil, das entfernt wurde, war, um so leichter keimten die Embryonen aus. Die Unterschiede in der Anzahl der ausgekeimten Embryonen war bei den 4->6 mm geringer (16-19) als bei den 2-4 mm großen Embryonen (14-24).

Rangaswamy und Mitarbeiter (1971) berichteten von Versuchen, bei denen unterschiedlich große Kotyledonenteile von *Cassya filiformis* entfernt wurden. Die Ergebnisse zeigten, daß die Größe des verbleibenden Kotyledonenteiles entscheidend das Embryowachstum fördert oder hemmt. Von diesen Versuchen wurde berichtet, daß aus Embryonen ohne Kotyledonen keine oder nur abnormale Keimlinge entwickelt werden konnten.

Abbildung 2 (unten) gibt die Ergebnisse des Genotypen Tvu 1987 wieder. Dieser Genotyp zeigte unter den in vitro Bedingungen ein schlechteres Wachstum als Genotyp Tvu 91. Es spiegeln sich jedoch die gleichen Ergebnisse in der Anzahl

gekeimter Embryonen wie bei Genotyp Tvu 91 wieder. Die Entfernung der Kotyledonen (6. Var.) förderte bei 2-4 mm bzw. 4->6 mm großen Embryonen das Auskeimen (15 bzw. 18 Embryonen), wogegen intakte Embryonen von 4->6 mm Größe in der Entwicklung gehemmt wurden. Nur drei entwickelten sich zu einem Sproß.

In Vorversuchen konnte beobachtet werden, daß verschiedene Hormonzusätze zum Nährboden einen zusätzlichen, neben der Embryogröße sowie der Anteile der Kotyledonen, Einfluß auf die Entwicklung des Embryos ausübt.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse dargestellt, die den Einfluß der Nährböden auf die Keimfähigkeit der unterschiedlich großen Embryonen wiedergeben. Zusätzlich ist der Einfluß der An- bzw. Abwesenheit der Kotyledonen dargestellt.

Aus der Anzahl der gekeimten Embryonen aller Größen ließ sich schließen, daß das Cytokinin Isopentenyladenin (2iP) eine stärkere wachstumsfördernde Wirkung (M1) zeigte als 6-Benzylaminopurin (BAP, - M2-). Diese Ergebnisse lassen sich durch noch laufende Versuche, bei denen verschiedene 2iP- und BAP-Konzentrationen dem Nährboden zugesetzt wurden, festigen.

Der Nährboden ohne Hormonzusatz (M3) eignete sich nur sehr begrenzt für die Kultur von sehr kleinen Embryonen (<1-2 mm). Bei dieser Größe der Embryonen kommt dem umliegenden Gewebe oder hier dem Nährboden wahrscheinlich noch eine größere Bedeutung zu.

Tabelle 2: Der Einfluß der Nährböden auf die Keimfähigkeit in Abhängigkeit von der Größe der Embryonen und An- bzw. Abwesenheit der Kotyledonen/ The influence of the media on the germination depending on the size of the embryo and the presence and the absence of the cotyledons

	Größe mm	Kotyl	M1	M2	M3
Tvu 91	< 1-2	mit	17	12	8
		ohne	13	10	9
	2-4	mit	8	7	8
		ohne	25	20	19
	4- >6	mit	5	4	5
		ohne	28	26	24
Tvu 1987	< 1-2	mit	8	6	1
		ohne	3	1	-
	2-4	mit	5	4	4
		ohne	15	11	12
	4- >6	mit	3	2	2
		ohne	18	15	16

Die An- oder Abwesenheit der Kotyledonen hatte bei den großen Embryonen (2->6 mm) beider Genotypen einen deutlicheren Einfluß auf die Embryoentwicklung als die zwei unterschiedlichen Nährböden (M1-2). Es war aber zu erkennen, daß bei der Entfernung der Kotyledonen eine stärkere Hemmung als mit den Kotyledonen in der Embryoentwicklung zu sehen war (ohne Kotyledonen 11,5 bzw. 2; mit Kotyledonen 14,5 bzw. 7). Mit der Entfernung der Kotyledonen ging oftmals eine Beschädigung der Embryonen einher, wodurch das Wachstum negativ beeinträchtigt wurde.

Je größer die Embryonen umso geringer war der Unterschied auf den drei Nährböden bezogen auf die Anzahl der gekeimten Embryonen. Die Anzahl der gekeimten Embryonen wurde weit stärker durch die Ab- bzw Anwesenheit der Kotyledonen bestimmt.

Bei den 2-4 mm großen Embryonen mit Kotyledonen konnten noch im Durchschnitt 7,6 (Tvu 91) Pflanzen regeneriert werden, wogegen bei den 4->6 mm großen nur noch 4,6 Embryonen keimten. Beim Genotyp Tvu 1987 waren die Werte noch geringer (4,3 bzw. 2,3). Auf allen drei Nährböden konnte bei Embryonen ohne Kotyledonen immer die beste Embryoentwicklung beobachtet werden.

Zusammenfassung

Zwei Genotypen (Tvu 91 und Tvu 1987) wurden für die Embryokultur herangezogen. Die Anzucht der Cowpea-Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen.

Während der Ernte der Hülsen wurden sie in verschiedene Größen eingeteilt. Die Samenanlagen, die den Hülsen entnommen wurden, konnten in drei Größen (<1-2 mm, 2-4 mm und 4->6 mm) geordnet werden. Hierbei zeigte sich, daß zwischen der Dicke sowie Länge der Hülsen und der Größe der Samenanlagen keine Beziehung bestand.

Die Kultur der Embryonen erfolgte auf einem Murashige und Skoog Grundnährboden, der mit Isopentenyladenin (2iP), 6-Benzylaminopurin (BAP), 1-Naphthylethylsäure (NES) und Indol-3-essigsäure (IES), versetzt wurde. Den Embryonen der zwei Genotypen wurde vor der Inkulturnahme unterschiedlich große Teile ihrer Kotyledonen entfernt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben ganz deutlich gezeigt, daß je mehr von den Kotyledonen entfernt wurde, umso höher lag die Anzahl der gekeimten Embryonen bei den 2->6 mm großen Embryonen. Bei den ganz kleinen Embryonen (<1-2 mm) zeigte sich durch die Entfernung der Kotyledonen eine Wachstumshemmung. Die Hemmung könnte mit einer Verletzung der Coleoptile beim Schneiden und / oder einem nicht optimalen Nährboden in Bezug auf das Hormonangebot erklärt werden.

Bei der Kultur intakter Embryonen keimten von den ganz kleinen (<1-2 mm) Tvu 91 Embryonen 41% und von Tvu 1987 16,6%. Bei den großen Embryonen entwickelten sich jedoch nur 20% (Tvu 91) bzw. 11,1% (Tvu 1987) zu Pflanzen.

Aus der Anzahl der gekeimten Embryonen auf den verschiedenen Nährböden ließe sich der Schluß ziehen, daß das Cytokinin Isopentenyladenin (2iP) eine stärkere wachstumsfördernde Wirkung auf die Embryoentwicklung ausübte als das 6-Benzylaminopurin (BAP).

The Effect of the Cotyledons on the Formation of Plants of Cowpea Embryos cultured in vitro

The application of embryo culture in plant breeding are of importance. The technique has been used to study fundamental problems. In addition, the embryo culture has been utilized to bypass seed dormancy, which may shorten the life cycle from seed to flowering. On the other hand it is possible to use the embryo as an explant for inducing multiple shoot formation.

Two different genotypes (Tvu 91 and Tvu 1987 obtained from IITA, Nigeria) were used for embryo culture.

The plants were grown in a growing chamber under controlled conditions. The temperature was 30°C during the day and 22°C during the night.

The pods were harvested in different developmental stages. The embryos were taken out and divided into three different groups of <1-2 mm; 2-4 mm and 4->6 mm.

It was obvious to see that there was no relation between the thickness and the length of the pods and the size of the ovule itself. Beside this it was impossible to draw a conclusion from the size of the ovules to the size of the embryos. While the ovules themselves have reached a size of 6-8 mm, the size of the embryos varied between 1-8 mm.

Before culturing the embryos of the two genotypes were treated differently by removing different amounts of the cotyledons (see Abb.1).

The cultures were incubated at 25°C in a 16 h day cycle for germination. The differently treated embryos of the genotypes were cultured on three media. These media contained half of the concentration of the Murashige and Skoog basal medium, supplemented with (2-isopentenyl)adenine (2iP) or 6-benzylaminopurine (BAP) and indole-3-acetic acid and 1-naphtaleneacetic acid.

The results of the experiments showed very clearly, that the more of the cotyledons was removed the more embryos of the size from 2->6 mm were able to germinate. The total removal of the cotyledons of the very small embryos (>1-2 mm) caused a retarded growth. The reason for this could be that during the removal of the cotyledons by cutting some of the coleoptiles might have been hurt. At this stage of the embryo the cotyledons are very small and therefore the possible influence of the cotyledons on the embryo might be also small.

The amount of germinated embryos of the size of <1-2 mm after the total removal of the cotyledons (6.var.) was ranging from 13 (Tvu91) to 8 (Tvu 1987) out of 30 cultured embryos, the amount of germinated intact embryos (1.var.) were ranging from 17 (Tvu 91) to 12 (Tvu 1987).

For the very small (<1-2 mm) embryos the three tested media were not suitable enough, because small embryos might need more additional hormones in the medium than the more developed embryos.

It seems nevertheless as if for all cultured embryos (<1->6 mm) the cytokinine 2iP in the medium (M1) showed a more promotive effect on the germination of the embryos than (BAP) in medium M2.

From the Tvu 91 embryos of the size of 2-4 mm and 4->6 mm cultured as intact embryos (1.var.) only 5 and 8 embryos developed. After the removal of the cotyledons 28 and 25 embryos germinated. This result, contrary to that described in the literature, can show a negative effect of the cotyledons on the germination of embryos.

The genotyp Tvu 1987 showed the same results, though the germination rate was always lower in all treatments.

After the seedlings had reached a length of about 4 cm they were transferred on a hormone free medium or a medium supplemented with 1-naphtaleneacetic acid.

Literatur

A l v a r e z, M.N.; A s c h e r, P.D. and D a v i s, D.W.: Interspecific hybridization in *Euphorbia* through embryo rescue.- In: Hort. Science 16 (1981), S. 541-543.

C h e n, N.C.; B a k e r, L.R. and H o n m a, S.: Interspecific crossability among 4 spp. of *Vigna* food legumes.- In: Euphytica 32 (1983), S. 925-938.

G o s a l, S.S. and B a j a j, Y.P.S.: Interspecific hybridization between *Vigna mungo* and *Vigna radiata* through embryo culture.- In: Euphytica 32 (1983), S. 129-137.

H o t t a, Y.: Roles of the cotyledon in the morphological differentiation of bean seedlings (Morphogenetical studies in *Vigna sesquipedalis* II).-In: Bot.Mag. Tokyo 70 (1957), S. 383-390.

H u, C. and W a n g, P.: Embryo culture technique and application.- In: Handbook of Plant Cell Culture 4 (1986), S. 43-96.

K r u y t, W.: Effects of some plant growth substances on early growth of pea in sterile culture; a study in connection with the problem of hormonisation of seeds.- In: K. Ned. Akad.Wet. Proc. C. 55 (1952), S.503-513.

M i x, G. and W a n g, H.M.: In vitro Erzeugung von haploiden Cowpea Pflanzen (*Vigna unguiculata* L.).- In: Landbauforschung-Völkenrode (im Druck).

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.

R a n g a s w a m y, N.S. and R a n g a n, T.S.: Morphogenic investigations on parasitic angiosperm: IV. Morphogenesis in decotylated embryos of *Cassytha filiformis* L.- In: Bot. Gaz. 132 (1971), S.113-119.

R a g h a v a n, V. and S r i v a s t a v a, P.S.: Embryo culture.- In: Experimental Embryology of Vascular Plants. (1982), S. 195-230.

S c h ä f e r-M e n u h r, A.; C z e r w i n s k i, T. and B u s m a n n, A.: Der Einsatz von Embryokultur zur Gewinnung von Artbastarden aus der Kreuzung *Lupinus mutabilis* L. x *Lupinus hartwegii* L.- In: Landbauforschung-Völkenrode (im Druck).

S c h ä f e r-M e n u h r, A.: mündliche Mitteilung (1988).

Verfasser: M i x, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (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.