

## In vitro Kultur von Cowpeapflanzen zur Gewinnung keimfreier Blätter und Samen

GUNDA MIX

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

### Einleitung

Die Kuhbohne (*Vigna unguiculata* – cowpea), eine Körnerleguminose, hat ihren Hauptanbau in den Savannengebieten Westafrikas. Hier zählt sie zu den wesentlichen Proteinlieferanten in der menschlichen Ernährung. Aufgrund ihres ernährungsphysiologischen Wertes wäre es wünschenswert, sie in den mehr feuchten Tropen auch anbauen zu können. Dieses würde aber bedeuten, daß Genotypen zur Verfügung stehen müßten, die auf den meist dort vorhandenen sauren Mineralböden wachsen könnten.

Aluminium und Mangan beeinflussen auf diesen Böden entscheidend das Wachstum der Pflanzen (Horst 1980). Eine Züchtung auf Anpassung an hohe Aluminium- und Mangankonzentrationen im Boden wäre erforderlich. Dieses bedeutet, daß Genotypen diese Eigenschaften besitzen oder, daß solche Genotypen mit Hilfe biotechnologischer Verfahren erstellt werden müßten.

Es liegen schon einige Ergebnisse von in vitro Kulturen bei Cowpea vor (Ghosh et al. 1979a + b; Ahmed et al. 1986 und Blaydes et al. 1986). Diese konnten erste Auskünfte über die Kulturbedingungen dieser Leguminose vermitteln. Dickens und Mitarbeiter (1985) hatten schon erfolgreich versucht, ganze Sojabohnenpflanzen in vitro bis zum Blühen und Früchten heranzuziehen.

Die vorliegende Arbeit diskutiert die Entwicklung eines in vitro Systems für Cowpea, bei dem es möglich ist, Spenderpflanzen für eine laufende Blattentnahme zur Verfügung zu haben. Zum anderen eine in vitro Samenproduktion zu erreichen, um für Wurzelkulturen auf sterile Samen zurückgreifen zu können.

### Material und Methoden

Eine Cowpea Sorte „Solojo“ und drei weitere Herkünfte (Tvu 91, Tvu 354 und Tvu 1987) dienten als Versuchsmaterial. Die Tvu-Bezeichnungen sind Genbank-Katalognummern der Sammlung des International Institute of Tropical Agriculture (IITA).

Die Samen wurden oberflächlich mit 3 % Calciumhypochlorid, versetzt mit einigen Tropfen Tween 80, sterilisiert. Nach einer 10minütigen Sterilisationszeit wurden die Samen mehrfach mit Wasser gespült. Die Keimung der Samen erfolgte auf Filterpapierbrücken in Reagenzgläsern, die 6 ml MScp-Nährlösung enthielten (Tab. 1). Während der Keimzeit standen die Kulturen in Dunkelheit bei 30°C. Nach dem Öffnen der Kotyledonen wurden die Kulturen in Licht (12 h) und 28°C überführt. Hatten die Sämlinge ein Blatt gebildet, wurden sie in je ein großes Kulturgefäß (Ø 10 cm, Höhe 20 cm), das Steinwolle als Substrat enthielt und mit einer MScp1-Nährlösung (Tab. 1) angefeuchtet war, übertragen. Die Kultur der in vitro Pflänzchen erfolgte bei 28°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h. Hatten die Pflanzen das 7–8 Blatt-Stadium erreicht wurde der Sproß vor dem letzten Nodium abgeschnitten. Aus diesem Nodium mit seiner Achselknospe entwickelte sich erneut eine Pflanze, die bei Wiederholung dieses Vorganges mehrfach

(6–7 x) als Spenderpflanze von Nodien dienen konnte. Dem abgeschnittenen Sproß wurden die Nodien entnommen und auf das feste MScp2-Nährmedium (Tab. 1 und 7 g/l Agar) gelegt. Die Kulturbedingungen (Temperatur, Tageslänge) wurden beibehalten.

Tabelle 1: Cowpea-Kulturmedien  
Cowpea-culture media

Medien Komponenten	MScp	MScp <sub>1</sub>	MScp <sub>2</sub>
MS <sup>1)</sup>	Salze	Salze	Salze
Thiamin HC1 mg/l	1,0		0,1
IES <sup>2)</sup> mg/l	1,0		1,0
BAP <sup>3)</sup> mg/l			0,5
GA <sub>3</sub> <sup>4)</sup> mg/l		0,1	
D-Mannit mg/l	500		
Saccharose g/l	10	10	80

1) Murashige und Skoog (1962)  
2) α-Indoleessigsäure  
3) 6-Benzylaminopurin  
4) Gibberellinsäure

Nach etwa 4 Wochen hatten sich aus den Achselknospen Pflanzen entwickelt. Befanden sich diese im 2–3 Blatt-Stadium, so wurden sie gleich den Sämlingen in große Kulturgefäße überführt. Die Steinwolle in diesen Gefäßen wurde mit MScp-Nährlösung angefeuchtet. Diese Pflanzen, aus Achselknospen entwickelt, dienten bis zu einem Jahr als Spenderpflanzen von Explantaten und zur Samengewinnung. Die Sortierung der Samen erfolgte nach ihrer Größe und dem Reifezustand (Tab. 2).

Die ausgereiften Samen konnten in flüssiger MScp-Nährlösung (Tab. 1) zum Keimen gebracht werden. Die unreifen kleinen und sehr kleinen Samen, die noch eine grüne Samenschale aufwiesen, wurden in flüssiger MScp2-Nährlösung (Tab. 1) ausgekeimt. Während der Keimzeit standen die Kulturen bei 28°C im Licht (12 h). Alle bei der Kultur von Cowpeapflanzen eingesetzten Nährmedien/-lösungen wurden auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.

### Ergebnisse und Diskussionen

Die Keimfähigkeit der drei Cowpeagenotypen und der Sorte „Solojo“ variierte unter den in vitro Bedingungen sehr stark. Die Samen des Genotypen Tvu 91 lagen mit ihrer Fähigkeit zu keimen zwischen 90–100 %, dagegen keimten von dem Genotypen Tvu 1987 nur 45–65 % der Samen. Die Sorte „Solojo“ und der Genotyp Tvu 354 nahmen hier eine Mittelstellung, bezogen auf die Keimfähigkeit, ein. Diese Unterschiede waren bei allen Wiederholungen, auch bei dem Saatgut, das in einer Phytokammer unter optimalen Bedingungen (Horst 1980) erzeugt wurde, zu beobachten.

Bei der Beurteilung der Vitalität der Sämlinge war der Genotyp Tvu 1987 allen anderen Typen weit überlegen. Die Sämlinge zeigten einen sehr kräftigen Wuchs und hat-

Tabelle 2: Samenproduktion von in vitro Pflanzen verschiedener Genotypen und einer Sorte „Solojo“  
Seed production of in vitro plants of different genotypes and one variety „Solojo“

Genotyp	Anzahl der Hülsen/Pflanze	Samenreife Samenschalenfarbe		
		reif braun-lila	unreif grün-bräunlich	unreif grün
Tvu 91	7	2	1	—
		1	2	—
		2	1	1
		2	1	—
		2	2	1
		2	2	1
		3	2	—
Tvu 354	5	1	1	1
		1	1	—
		2	2	—
		1	—	—
		1	—	6
Tvu 1987	3	3	—	1
		4	—	—
		3	—	1
		1	1	2
„Solojo“	5	—	—	1
		—	2	2
		—	1	1
		1	—	2

ten dunkelgrüne Blätter. Die restlichen Genotypen zeichneten sich dagegen durch sehr zarte Sämlinge, die hellgrüne Blätter entwickelten, aus.

Das unterschiedliche Aussehen der Pflanzen hatte aber keinen Einfluß auf die Möglichkeit des mehrfachen Dekapitieren der Pflanzen. Dieses konnte bei allen Genotypen und der Sorte „Solojo“ 6 bis 7mal vorgenommen werden, ohne daß sich bei den sich immer wieder entwickelnden Pflanzen eine Wachstumsdepression zeigte. Beim Fortführen dieses Vorganges stellte sich ab dem 9. Abschneiden eine Depression im Wachstum ein. Diese war sehr deutlich durch eine reduzierte Anzahl von sich bildenden Nodien und einer kleineren Blattfläche bei den Genotypen Tvu 91, Tvu 354 und der Sorte „Solojo“ zu beobachten. Die kräftigen Pflanzen des Genotypen Tvu 1987 entwickelten erst nach dem 12. Abschneiden kleinere Pflanzen.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Kartoffel- und Sojabohnensorten gemacht werden. Die Pflanzen mit einem zarten Aussehen zeigten schneller Wachstumsdepressionen nach mehrfachem Dekapitieren als sehr kräftige Pflanzen.

Die Kultur der Nodien mit je einer Achselknospe spiegelte das gleiche Ergebnis wider. Der Genotyp Tvu 1987 mit seinen kräftigen Pflanzen wies folglich auch gut entwickelte Nodien auf, die etwa nach drei Wochen aus allen kultivierten Achselknospen Pflanzen regenerierten. Die restlichen Genotypen Tvu 91, Tvu 354 und die Sorte „Solojo“ benötigten jedoch 4 Wochen, um ein Pflänzchen bis zum 2–3 Blatt-Stadium zu bilden. Es waren aber nur 70–80% der Achselknospen befähigt, überhaupt eine Pflanze zu entwickeln. Die  $\alpha$ -Indolessigsäure im Nährmedium gewährleistete eine gute und gleichmäßige Bewurzelung der kleinen Pflänzchen, die ohne diesen Zusatz sehr unregelmäßig unabhängig vom Genotyp und der Sorte „Solojo“ Wurzeln bildeten.



Abbildung 1: In vitro regenerierte Cowpea-Pflanze

Von den in vitro Pflanzen (Abb. 1) konnten nach Bedarf Blätter entnommen werden, die als Explantate zur Kallusgewinnung dienten. Die Kallusbildung ließ sich durch die in vitro Kulturbedingung der Spenderpflanzen wesentlich verbessern, da Cowpeablätter sehr zart sind und schnell nach der Entfernung von der Pflanze ihre Turgeszenz verlieren. Sie reagieren ebenfalls sehr empfindlich auf Calciumhypochlorid.

Die Blüteninduktion und die anschließende Samenproduktion in vitro gestaltete sich bei den einzelnen Genotypen sehr unterschiedlich. Die Anzahl der Hülsen als auch die Samenzahl je Hülse variierten stark.

Bei allen Genotypen und der Sorte „Solojo“ wurde die Beobachtung gemacht, daß sich aus jeder Blüte eine Hülse entwickelte, was zum Beispiel bei der Sojabohne nicht der Fall war.

Die Tabelle 2 zeigt am Beispiel einer Pflanze je Genotyp und Sorte „Solojo“ die immer wieder beobachteten Unterschiede im Samenansatz. Der Genotyp Tvu 91 blühte am stärksten und zeigte dazu eine gute Samenproduktion, wogegen der Genotyp Tvu 1987 nur wenige Blüten entwickelte und dementsprechend wenig Hülsen. Die Hülsen enthielten aber die meisten ausgereiften Samen aller Genotypen und der Sorte „Solojo“. Immer wieder war zu beobachten, daß die Sorte „Solojo“ ganz selten ausgereifte Samen in ihren Hülsen entwickelte.

Das in vitro Auskeimen der ausgereiften Samen aller Genotypen und der Sorte „Solojo“ in der Nährlösung MScp (Tab. 1) erfolgte ohne weitere Schwierigkeiten. Nur, daß die Unterschiede in der Keimfähigkeit der Samen in vivo sich leicht abgeschwächt auch in der in vitro Keimung manifestierten. Diese Unterschiede in der Keimfähigkeit der Genotypen und der Sorte „Solojo“ waren weder bei den kleinen (grün-bräunlichen) noch bei den sehr kleinen

(grünen) Samen zu beobachten. Diese noch unreifen Samen wurden in einer MScp2-Nährlösung zum Keimen gebracht. Bei den kleinen Samen lag die Keimfähigkeit zwischen 90–100%. Bei den sehr kleinen Samen konnten nur 40–50% unabhängig vom Genotyp und der Sorte „Solojo“ zum Keimen gebracht werden.

Die in vitro Kultivierung ganzer Cowpeapflanzen bringt für viele Fragestellungen große Vorteile. Aus diesem Grunde haben ebenfalls Dickens und Mitarbeiter (1985) ein System entwickelt, um ganze Sojabohnenpflanzen in vitro bis zum Blühen und Fruchten zu bringen.

Die Blätter z. B. können für Kalluskulturen, die zur Selektion von bestimmten Eigenschaften, wie z. B. Mangan-toleranz, herangezogen werden, eingesetzt werden. Die Wurzeln der ausgekeimten in vitro Samen verschiedener Genotypen könnten einem Test auf Aluminiumverträglichkeit dienen.

Über den Einsatz dieser beiden Methoden wird später berichtet.

### Zusammenfassung

Drei Cowpea-Genotypen Tvu 91, Tvu 354, Tvu 1987 und die Sorte „Solojo“ dienten als Versuchsmaterial. Die Nodien der in vitro herangezogenen Sämlingspflanzen wurden auf einem modifizierten Murashige und Skoog Medium versetzt mit 1 mg/l  $\alpha$ -Indolessigsäure, 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurin und 80 g/l Saccharose kultiviert.

Aus den Nodien der Genotypen und der Sorte „Solojo“ bildeten sich unterschiedlich viele Pflanzen, die ebenfalls in unterschiedlicher Intensität blühten und Samen produzieren.

Der Genotyp Tvu 91 entwickelte die meisten und der Genotyp Tvu 1987 die wenigsten, jedoch nur reife Samen pro Pflanze. Die geernteten Samen wurden in drei Kategorien, reife, kleine und sehr kleine Samen, eingeteilt.

Beim in vitro Auskeimen der reifen Samen wurden die gleichen Unterschiede in der Keimfähigkeit, die, die in vivo erzeugten Samen aufwiesen, beobachtet. Die kleinen unreifen Samen keimten zu 90–100% aus, wogegen die sehr kleinen unreifen Samen nur 40–50% zu einem Sämling entwickeln konnten. Der Zusatz von 1 mg/l  $\alpha$ -Indolessigsäure zum Nähr-Medium gewährleistete ein gleichmäßiges Wurzelwachstum.

Die Möglichkeit der in vitro Kultivierung von ganzen Pflanzen bis hin zum Blühen und Fruchten bringt für viele Fragestellungen große Vorteile.

### **In vitro culture of cowpea plants to produce sterile leaves and seeds (*Vigna unguiculata*)**

Cowpea seeds of three different genotypes and one variety „Solojo“ were germinated in vitro with different rates of success. The seedlings were cultured until they had developed 7–8 leaves. The nodal segments were harvested several times from these plantlets and plated on a medium con-

taining Murashige and Skoog salts, 1 mg/l Indole-3-acetic acid, 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurine and 80 g/l sucrose. The pH of all the used media were adjusted to 4,5.

Cultivation took place at 28°C and with a light regime of 12 h. The nodal segments of the genotype Tvu 1987 developed 100% and the others only 70–80% plantlets. The addition of Indole-3-acetic acid to the medium guaranteed a uniform root development independently of the genotypes and the variety „Solojo“.

These plantlets were then cultured for nearly a year in a suitable culture container. During this time the plants flowered and produced seeds. The seed production varied a lot according to the different genotypes and the variety „Solojo“.

Growing in vitro plants up to seed production offers a suitable system with many advantages for solving important problems concerned with, for example, the production of callus and germination under sterile conditions.

### Literatur

Ahmed, R.; Gupta, S.D. und Ghosh, P.D.: Isolation of L-ethionine resistant cell lines in *Vigna sinensis* L. after mutagen treatment. – In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7 (1986), S. 135–144.

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

Dickens, C.W.S. und van Staden, J.: In vitro flowering and fruiting soybean explants. – In: *Journal of Plant Physiology* 120 (1985), S. 83–86.

Ghosh, P.D.; Mitra, G.C. und Sharma, A.K.: Effect of gamma irradiation on callus growth of *Vigna sinensis*. – In: *Current Science* 48 (1979), S. 731–732.

Ghosh, P.D. und Sharma, A.K.: Chromosome analysis in suspension culture of *Vigna sinensis* var. Black and *Pisum sativum* L. – In: *Caryologia* 32 (1979), S. 419–424.

Horst, W.: Genotypische Unterschiede in der Mangan-Toleranz von Cowpea (*Vigna unguiculata*). – In: *Angew. Botanik* 54 (1980), S. 377–392.

Murashige, T. und Skoog, F.J.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – In: *Physiologica Plantarum* 15 (1962), S. 473–497.

Verfasser: Mix, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsleiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth.