

Induktion und Selektion von mangantolerantem Cowpea-Kallus (*Vigna unguiculata*)

GUNDA MIX

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die Kuhbohne (*Vigna unguiculata*) stellt für das Savannen-gebiet Westafrikas eine wichtige landwirtschaftlich genutzte Pflanzenart dar. Als ausgezeichnete Eiweißlieferant wäre es wünschenswert, die Kuhbohne (Cowpea) auch in den mehr feuchten Tropen anbauen zu können. Hier müßte die Pflanze auf meist sauren Mineralböden wachsen. Hohe Konzentrationen von Aluminium und Mangan in diesen Böden üben einen starken negativen Einfluß auf das Pflanzenwachstum aus (Horst 1980).

Im Gegensatz zu Aluminium wird Mangan leicht von den Wurzeln in den Sproß transportiert und führt bei Überschuß primär zu einer Beeinträchtigung des Sproßwachstums (Horst 1982).

Genotypisch erhöhte Mangantoleranz beruht in der Regel nicht auf dem Ausschluß von Mangan bei der Aufnahme und der Verlagerung, sondern auf einer erhöhten Toleranz des Blattgewebes gegenüber hohen Mangankonzentrationen (Brown und Jones 1977; Ouellette und Dessureaux 1958).

Die Regulierung der Mangantoleranz auf der Ebene des Blattgewebes erlaubt die Anwendung von *in vitro*-Techniken zur Selektion von Genotypen mit diesen gewünschten Eigenschaften.

Einige Arbeiten, die über *in vitro* Kulturen von Cowpea berichten, liegen bereits vor.

An Hypokotyl- (Ghosh et al. 1979) und Stengelsegmenten (Blaydes et al. 1986) gelang es diesen Autoren, Kallus zu induzieren und Suspensionskulturen anzulegen. Kallus konnte durch einen Kinetinzusatz zu einem schnelleren Wachstum angeregt werden. Die Suspensionskultur diente als Ausgangsmaterial für Fragen der Ploidieveränderung in Zellkulturen.

Die vorliegende Arbeit diskutiert die Entwicklung einer Kalluskultur aus Blattexplantaten und die anschließende Selektion von mangantoleranten Kalli.

Material und Methoden

Drei Cowpea-Genotypen und die Sorte „Solojo“ stellen das Versuchsmaterial dar. Hierbei handelt es sich um einen Genotypen, der sehr empfindlich (Tvu 91) und einen, der sehr tolerant (Tvu 1987) auf hohe Mangankonzentrationen reagiert. Die Empfindlichkeit des Genotypen Tvu 354 und der Sorte „Solojo“ gegenüber Mangan liegen zwischen den oben genannten (Tvu 91 und Tvu 1987) Genotypen. Die Tvu-Bezeichnung sind Genbankkatalognummern der Sammlung des „International Institute of Tropical Agriculture“ (IITA). Die Samen wurden *in vitro* ausgekeimt und die Nodien zu ganzen Pflanzen regeneriert. Die Kultur der ganzen Pflanzen *in vitro* erfolgte bei 28°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h (Mix 1987).

Es wurden vollentwickelte Blätter als Explantate entnommen. Die Blätter wurden in 2–3 cm breite Segmente geschnitten. Das Schneiden der Blätter erfolgte einmal auf einem trockenen Filterpapier und zum anderen in flüssiger Nährlösung (Medium 1, Tab. 1). Die Blattsegmente wurden sowohl mit Epidermis als auch ohne Epidermis kultiviert.

Für die Kallusinduktion auf den Blattsegmenten wurden 9 Nährmedien eingesetzt (Tab. 1). Drei Grundnährmedien (Murashige et al. 1962; Collins et al. 1983; Horst 1984) kamen hierbei zum Einsatz. Folgende Zusätze wiesen die 9 verschiedenen Nährmedien auf: Auxine: Indolyllessigsäure (IES); 1-Naphtyllessigsäure (NES); 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D); Cytokinine: 6-Benzylaminopurin (BAP); Vitamine: Thiamin HCl (Thi); Kokosnußmilch (CM) und Picloram. Alle Nährmedien enthielten 7 g/l Agar, wogegen die Saccharosekonzentration zwischen 10–60 g/l variierte (Tab. 1). Die Nährmedien wurden auf pH-Wert 5,5 eingestellt und für 10 min. bei 1,1 bar autoklaviert. Die Kultur der Segmente erfolgte bei 32°C in Dunkelheit bzw. bei 28°C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h.

Die segmentierten Blätter wurden alle 2 Wochen auf ein frisch angesetztes aber gleiches Nährmedium übertragen. Nach 2–3maligem Umsetzen hatte sich bei allen Genotypen und der Sorte „Solojo“ Kallus gebildet. Die Kalli wurden mazeriert und in eine Suspensionskultur überführt. Die 5

Tabelle 1: Kallusinduzierende Nährmedien (callus inducing media)

Nähr-medium	Grundnähr-lösung	2,4D mg/l	IES mg/l	NES mg/l	BAP mg/l	Thi	Saccharose g/l
1	MS*	1		2	1		60
2	MS	0,1	1	1	2	0,4	60
3	MS	0,05	0,5	0,5	1	0,2	30
4	CP**				0,1	2,0	25
5	CP		0,2			1,0	15
6	MS	0,5		1,0			10
7	MS			0,5	3		20
8	MS				5	0,05	10
9	HW***	0,1	1	1	2	0,4	30

* Murashige und Skoog (1962)
 ** Collings et al. (1983)
 *** Horst (mündliche Mitteilung 1984)

Nährmedien, auf denen die beste Kallusbildung zu beobachten war (Tab. 2), wurden als Nährmedien für die Suspensionkultur ausgewählt. Das Mangan wurde jedoch diesen Nährmedien 1–4 und 9 entzogen. Die Suspensionskulturen wurden einige Tage auf dem Schüttler bei 120 Umdrehungen geschüttelt.

Die Zellsuspension wurde auf das feste Nährmedium 9 plattiert. Dieses Nährmedium enthielt zusätzlich verschiedene Mangankonzentrationen (10 µM, 1 mM, 10 mM und 50 mM).

Die Kultur der plattierten Zellen erfolgte bei 32°C in Dunkelheit und bei 28°C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h. Nach 6 Wochen wurden die Kulturen mit den verschiedenen Mangankonzentrationen auf ihre überlebenden Kalli hin ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussionen

Die Anzucht der ganzen Pflanzen aus in vitro ausgekeimten Samen und nachfolgender Nodienkultur zur Pflanzenregeneration erfolgte wie bei Mix (1987) beschrieben. Die Tabelle 2 zeigt sehr deutlich, daß auf den 9 Nährmedien alle Genotypen und die Sorte „Solojo“ mit unterschiedlicher Intensität Kallus gebildet hatten. Auf den Nährmedien 1–4 und 9 lag die Kallusbildungsrate zwischen 8,7 und 14,8 %. Auf den restlichen Nährmedien entwickelten maximal 5,7 % der Segmente Kallus. Die Segmente des Genotypen Tvu 354 hatten im Durchschnitt auf allen Nährmedien am wenigsten (6,8 %) und der Genotyp Tvu 1987 am meisten (10 %) Kallus gebildet. Der Genotyp Tvu 91 und die Sorte „Solojo“ lagen mit ihrer Kallusbildungsrate auf den Segmenten dazwischen (beide 8,1 %). Die Nährmedien, auf denen eine erhöhte Kallusbildung zu beobachten war, enthielten mehrere

Hormone und Saccharose in Konzentrationen zwischen 60–25 g/l. Blaydes und Mitarbieter (1986) konnten durch Zugabe von Kinetin zum Nährmedium das Kalluswachstum auf den Cowpeastengelsegmenten beschleunigen. Sie stellten fest, daß Kinetin durch 2,4D mit dem gleichen Effekt auf die Kallusbildung ersetzt werden konnte. Bei den 9 getesteten Nährmedien konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Nährmedien mit 2,4D in Kombination mit anderen Hormonen (z. B. Medium 1 + 2) zeigten eine positive Wirkung auf die Kallusbildung im Vergleich zu Nährmedien (z. B. Medium 5 + 8) mit nur einem oder zwei Hormonen.

Collins (1983) setzte bei einigen Leguminosen Picloram zur Förderung der Kallusbildung mit Erfolg ein. Picloram im Nährmedium 4 (Tab. 1) induzierte auch bei Cowpeablattsegmenten eine verstärkte Kallusbildung.

Die positive Wirkung des Piclorams hielt nur ca. 2 Wochen an, dann mußten die Segmente auf ein Picloram-freies Nährmedium umgesetzt werden, da sich sonst die Segmente mit dem gebildeten Kallus braun verfärbten. Picloram hat scheinbar nur eine kallusinduzierende Wirkung zum Anfang der Kultur bei Cowpeagewebe.

Aus Tabelle 3 ist sehr klar am Beispiel des Genotypen Tvu 91 zu entnehmen, daß durch eine veränderte Technik des Schneidens der Segmente und des Präparierens des Blattmaterials eine Steigerung der Kallusbildungsrate zu erzielen ist. Das Schneiden der Segmente im flüssigen Nährmedium 4 im Vergleich auf trockenem Filterpapier erhöhte die Kallusbildungsrate um 29,2 % auf Nährmedium 1 und um 27 % auf Nährmedium 9. Das Entfernen der Epidermis der Blätter erbrachte sogar eine Steigerung von 66,2 % bzw. 70 %. Diese Methode wurde von Schäfer-Menuhr (1986) als eine sehr erfolgreiche bei Lupinenblattkulturen beschrieben.

Tabelle 2: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Kallusbildung*
Influence of different media on the callus formation

Genotyp Medium	„Solojo“		Tvu 91			Tvu 354			Tvu 1987			
	kultivier- te Seg- mente	gebildete Kalli (%)	kultivier- te Seg- mente	gebildete Kalli (%)	kultivier- te Seg- menge	gebildete Kalli (%)	kultivier- te Seg- menge	gebildete Kalli (%)	kultivier- te Seg- mente	gebildete Kalli (%)		
1	250	24	9,6	210	27	12,8	275	24	8,7	180	22	12,2
2	200	20	10,0	200	25	12,5	250	22	8,8	170	24	14,0
3	210	27	13,0	210	24	11,4	270	29	10,7	175	25	14,3
4	200	25	12,5	230	23	10,0	260	27	10,3	182	27	14,8
5	250	12	4,8	235	10	4,3	265	12	4,5	180	10	5,6
6	240	10	4,8	220	9	4,1	275	8	2,9	165	8	4,8
7	210	7	3,4	210	7	3,3	240	6	2,5	175	10	5,7
8	210	8	3,8	215	9	4,2	245	7	2,8	170	9	5,2
9	200	24	12,0	210	25	12,0	250	27	10,8	172	24	13,9
		∅	8,1		∅	8,1		∅	6,8		∅	10

* Segmente wurden auf trockenem Filterpapier geschnitten und mit der Epidermis kultiviert

Tabelle 3: Der Einfluß des Schneidens der Segmente und der Oberfläche der Segmente auf die Kallusbildung des Genotypen Tvu 91
Influence of the cutting of the segments and the surface of the segments on the callus formation of the genotype Tvu 91

Medien	Schneiden der Segmente		Oberfläche der Segmente	
	trockenes Papier	flüssiges Medium 4	mit Epidermis	ohne Epidermis
1	12,8 %	42 %	12,8 %	79 %
9	12,0 %	39 %	12,0 %	82 %

Die Blattsegmente wurden in Blattrippen und Blattspreite vor der Inkulturnahme eingeteilt. Bei allen Genotypen und der Sorte „Solojo“ war zu beobachten, daß sich etwa 80 % der Kalli auf den Blattrippen und nur 20 % auf den Blattspreiten entwickelten, wobei diese 20 % erst durch die Kultur der Blattspreiten ohne Epidermis erreicht wurde. Dieselben Ergebnisse konnten auch bei Zichorienblattkulturen beschrieben werden (Mix 1985).

Keinen oder nur einen kaum abzusichernden Einfluß hatten die Kulturbedingungen: 32°C in Dunkelheit und 28°C im Tag/Nacht-Rhythmus, auf die Kallusbildungsrate der Blattsegmente als auch auf die Kalli der Mangansteigerungsvarianten.

Aus den besten kallusinduzierenden Nährmedien wurde das Nährmedium 9 für die Mangansteigerungsversuche ausgewählt. Auf diesem Nährmedium zeigten die Blattsegmente aller Genotypen und der Sorte „Solojo“ eine ähnliche Kallusbildungsrate. Sie variierte nur um 3,1 %. Die Zellsuspension, die aus den Kalli der Blattsegmente der Genotypen und der Sorte „Solojo“ erstellt wurde, wurde auf das Nährmedium 9 mit den verschiedenen Mangansteigerungsvarianten aufgetragen. Das Ergebnis der Manganbehandlung ist in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Anzahl der Kalli pro Variante geben Durchschnittswerte aus fünf Wiederholungen wieder.

Der Genotyp Tvu 91, sehr manganempfindlich, entwickelte kein Kallus, wogegen der Genotyp Tvu 1987, mangan-tolerant, 12 Kalli auf der Variante 50 mM Mangan bildete. Die Sorte „Solojo“ und der Genotyp Tvu 354, eine Mittelstellung in der Manganverträglichkeit einnehmend, entwickelten 5 bzw. 6 Kalli auf der höchsten Mangankonzentration. Die geringere Kallusentwicklung aller Genotypen und der Sorte „Solojo“ auf der Variante ohne Mangan zeigt deutlich, daß Mangan ein wichtiger Mikronährstoff ist. Die Variante 10 µM entspricht den Mangankonzentrationen vieler Grundnährmedien.

Die Kenntnis über die Manganverträglichkeit der getesteten Genotypen und der Sorte „Solojo“ machte es erst möglich, die in vitro Selektion als anwendbare Methode für Cowpea anzusehen, da die Ergebnisse der Selektion sowie die schon bekannte Verträglichkeit des Materials übereinstimmen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß selbst Zellen eines mangantoleranten Genotypen durch hohe Mangankonzentrationen in der Teilungsfähigkeit beeinträchtigt werden können. Ferner lassen sich aus Zellen manganempfindlicher Cowpeagenotypen Kalli entwickeln, die auf hohen Mangankonzentrationen zu Zellhaufen heranwachsen können.

Falls es gelingt – wie bei vielen anderen Pflanzenarten aus Einzelzellen, die vorher auf eine bestimmte Eigenschaft selektiert wurden – wie hier Mangan, Pflanzen zu regenerieren, könnte für eine gezielte Züchtung genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt werden.

Zusammenfassung

Drei Genotypen und die Sorte „Solojo“, von denen die Manganverträglichkeit bekannt war, dienten als Verbrauchsmaterial. Die Samen dieser Typen wurden in vitro ausgesät und aus den Nodien ganze Pflanzen herangezogen. Voll entwickelte Blätter wurden in 2–3 cm große Segmente zerschnitten. Die Kultur der Segmente erfolgte aufgeteilt in Blattrippen und Blattsparte auf 9 verschiedenen Nährmedien.

Die Kallusbildung auf den Segmenten der Genotypen und die Sorte „Solojo“ zeigte sich in sehr unterschiedlicher Intensität. Es hing sehr stark von den jeweiligen Nährmedien ab. Die Nährmedien mit nur einem oder zwei Hormonen unterlagen in der Kallusbildung denjenigen mit mehreren Hormonen.

Das Schneiden der Segmente in flüssigem Nährmedium sowie das Abziehen der Epidermis vor der Inkulturnahme brachte einen Kalluszuwachs von bis zu 70 %, unabhängig von den Genotypen und der Sorte „Solojo“. Die Blattkalli wurden als Suspension auf das Nährmedium plattiert, auf dem alle Genotypen und die Sorte „Solojo“ eine ähnliche Kallusbildungsrate zeigten. Diesem Nährmedium wurden zuvor verschiedene Mangankonzentrationen zugesetzt. Es konnten Kalli selektiert werden, die auf einer hohen Konzentration von 50 mM Mangan noch ein gutes Wachstum zeigten.

Die in vitro Ergebnisse bestätigten die schon bekannte Verträglichkeit der Genotypen und der Sorte „Solojo“. Daraus läßt sich ableiten, daß diese Methode zur Selektion von mangantoleranten Zelllinien bei Cowpea anwendbar wird.

Induction and selection of manganese tolerant cowpea callus (*Vigna unguiculata*)

Three cowpea genotypes and the variety "Solojo" were the plants used in the experiments. Their tolerance to manganese was in all cases a known factor. The seeds were germinated in vitro and entire plants were grown from the nodal segments.

Fully developed leaves were cut into 2–3 cm wide segments. The leaf veins were then separated from the rest of the leaf, and both were then cultured separately on nine different media.

There were great differences in the number of calli on the segments both of the genotypes and the variety "Solojo". The most important factor was the particular medium. The media with one or two hormones were greatly inferior to those with many hormones for callus development.

Tabelle 4: Der Einfluß verschiedener Mangankonzentrationen auf die durchschnittliche Anzahl der gebildeten Kalli
Influence of the manganese concentration of the average number of developed calli

Genotypen	ohne Mn	Mangankonzentration			
		10 µM	1 mM	10 mM	50 mM
Tvu 91	24	26	10	1	–
Tvu 354	28	27	15	8	6
„Solojo“	25	23	14	10	5
Tvu 1987	30	35	27	18	12

When the segments were cut in a liquid medium the result was an up to 70 % growth in the number of calli, independent of the genotype or variety. When the epidermis was removed before putting the segments in culture, the result was similarly an up to 70 % growth in the number of calli.

The calli from both parts of the leaf were put in suspension and then plated on the particular medium on which all the genotypes and the variety "Solojo" have shown a similar callus growth rate.

Different concentrations of manganese had previously been added to this medium. It was afterwards (6 weeks) possible to select these calli which showed a good rate of growth on a high manganese concentration of 50 mM. The results in vitro confirm the known tolerance to manganese of the genotypes and the variety "Solojo". Consequently, it appears that these methods are useful in selecting manganese tolerant cowpea cell lines.

Literatur

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.

Brown, J.C. und Jones, W.E.: Manganese and iron toxicities dependent on soybean variety. — In: *Commun. Soil Sci. and Plant Anal.* 8 (1977), S. 1–15.

Collins, G.B. und Phillips, G.C.: In vitro Tissue Culture and Plant Regeneration in *Trifolium pratense* L. — In: *Crop Sci.* 23 (1983), S. 22–33.

Glosh, 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. Bot.* 54 (1980), S. 377–392.

Horst, W.: Quick screening of cowpea genotypes for manganese tolerance during vegetative and reproductive growth. — In: *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 145 (1982), S. 423–435.

Horst, W.: mündliche Mitteilung (1984).

Mix, G.: Regeneration von in vitro Pflanzen aus Blatt-rippensegmenten der Zichorie (*Cichorium intybus* L.). — In: *Landbauforsch. Völkenrode* 35 (1985), S. 59–62.

Mix, G.: In vitro Kultur von Cowpeapflanzen zur Gewinnung keimfreier Blätter und Samen. (1987) im Druck.

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.

Ouellette, G.J. und Dessureaux, L.: Chemical composition of alfalfa as related to degree of tolerance to manganese and aluminium. — In: *Can. J. Plant Sci.* 38 (1958), S. 206–214.

Schäfer-Menuhr, A.: Somatic Hybridisation of Lupin Species. — In: *Fourth Intern. Lupin Conference* (1986), Geraldton, Australien.

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