

Zuchtmaterialerstellung durch Erschließung und Selektion bisher nicht erfasster Anbau - und Verwertungsmerkmale in bisher nicht genutzten genetischen Ressourcen der Schmalblättrigen Lupine (*Lupinus angustifolius* L.)

Germplasm development by disclosure and selection of agronomy - and utilization-characters in so far neglected genetic resources of narrow leafed lupins (*Lupinus angustifolius* L.)

FKZ: 14EPS036, 14EPS037 und 14EPS038

Koordination des Verbundvorhabens:

ESKUSA GmbH

Bogener Straße 24, 94365 Parkstetten

Tel.: +49 9421 1839199

E-Mail: eickmeyer@t-online.de

Internet: www.eskusa-pflanzen.de

Autoren:

Zeise, Karen; Eickmeyer, Fred; Schmidt, Florentin; Rose, Judith; Noll, Gundula; Prüfer, Dirk; Baum, Christel; Vitow, Nora; Schwinkendorf, Lisa-Marie; Ladach, Tim-Hendrik; Christiansen, Florence; Kollar, Fabian; Leinweber, Peter

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Eiweißpflanzenstrategie können sich noch Änderungen ergeben.

ESKUSA GmbH
FKZ: 2814EPS036

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institut für Biologie und Biotechnologie
der Pflanzen
FKZ: 2814EPS037

Universität Rostock
Institut für Landnutzung
Bodenkunde
FKZ: 2814 EPS038

Gemeinsamer Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: ESKUSA GmbH
Bogener Str. 24
94365 Parkstetten
Leitung: Dr. Fred Eickmeyer (Projektkoordinator)

Westfälische Wilhelms-Universität Münster für ihr Institut:
Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen (IBBP)
Schlossplatz 8
48143 Münster
Leitung: Prof. Dr. Dirk Prüfer

Universität Rostock (UniRo):
Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät (AUF)
Professur für Bodenkunde
Justus von Liebig Weg 6
18051 Rostock
Projektleitung: PD Dr. habil. Christel Baum

Förderkennzeichen: 2814EPS036; 2814EPS037; 2814EPS038

Vorhabensbezeichnung: „LUPI-ZAV – Zuchtmaterialerstellung durch Erschließung und Selektion bisher nicht erfasster Anbau- und Verwertungsmerkmale in bisher nicht genutzten genetischen Ressourcen der Schmalblättrigen Lupine (*Lupinus angustifolius* L.)“

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Laufzeit des Vorhabens: 26. Mai 2015 – 30. Juni 2018

Berichtszeitraum: 26. Mai 2015 – 30. Juni 2018

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Inhalt

1	Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse	6
1.1	Durchgeführte Arbeiten der WWU im Berichtszeitraum	6
1.1.1	Planung und Ablauf der Arbeiten der WWU	6
1.1.2	Ergebnisse der WWU	8
1.2	Durchgeführte Arbeiten der ESKUSA GmbH im Berichtszeitraum	30
1.2.1	Linienbeschaffung und Vermehrung bitterer Formen von <i>L. angustifolius</i>	30
1.2.2	Untersuchung zur pH-Toleranz bitterer Formen von <i>L. angustifolius</i>	31
1.2.3	Erfassung der phänotypischen und agronomischen Merkmale bitterer Formen von <i>L. angustifolius</i>	34
1.2.4	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen ESKUSA	44
1.3	Durchgeführte Arbeiten der UniRo im Berichtszeitraum	46
1.3.1	Qualitätsanalyse der Rhizodeposition	46
1.3.2	Molekular-chemisches Screening der Rhizodepositionen mit Py-FIMS (UniRo2)	48
1.3.3	Akzessionsspezifische Besiedlung der Wurzeln mit Mykorrhizapilzen und Bakterien (UniRo3 und 4)	52
1.3.4	Selektion komplementärer Analytik und Datenanalyse (UniRo5 und 6)	53
1.4	Veröffentlichung von Projektergebnissen	56
2	Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	58
2.1	Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	58
2.2	Für den Berichtszeitraum relevante Meilensteine	58
3	Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?	59
4	Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren?	59
5	Waren Änderungen in der Zielsetzung notwendig?	59
6	Fortschreibung des Verwertungsplans	60

6.1	Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten.....	60
6.2	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende	60
6.3	Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten.....	61
6.4	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit.....	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomische Struktur der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in <i>Lupinus angustifolius</i> Zuchtsorte Boruta	9
Abbildung 2: Referenzanalytik des Rohprotein- und Methioningehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen der Blauen Lupine (Feldernte 2016)	16
Abbildung 3: Real-Time PCR Expressionsanalyse von Methioninsynthese- und Speicherproteingenen in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine	20
Abbildung 4: Vergleich der Feldanzuchten 2016 und 2017 von ausgewählten Akzessionen der Blauen Lupine im Hinblick auf Rohprotein- und Methioningehalte reifer Körner	23
Abbildung 5: Real-Time PCR Expressionsanalyse von Methioninsynthese- und Speicherproteingenen in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine	27
Abbildung 6: Unterschiede in der pH-Toleranz: links: Linie mit Kalkchlorose; rechts kalktolerante Linie	31
Abbildung 7: BN-Integrale unterschiedlich kalkanfälliger Akzessionen im Vergleich zur Referenzsorte Boruta	32
Abbildung 8: Variation der pH-Reaktion innerhalb der empfindlicheren Akzession 81 (links) und der am wenigsten empfindlichen Akzession 59 (rechts)	32
Abbildung 9: Tausend-Korn-Massen der Akzessionen 46 und 59 auf dem alternativen (AS) und dem Gunststandort (GS)	33
Abbildung 10: Einzelreihen-Kornertrag aller Einzelpflanzennachkommenschaften (nach Reifegruppen, dann aufsteigend geordnet) im Jahr 2016	35
Abbildung 11: Unterschiede in Samenfarbe und –größe zwischen den Akzessionen	36
Abbildung 12: Unterschiede in Samenfarbe und –größe zwischen den EPN von Akzessionen	36
Abbildung 13: Unterschiede in der Korngrößenverteilung ausgewählter Genotypen aus dem Erntejahr 2016	37
Abbildung 14: Tausend-Korn-Massen aller geerteter Genotypen aus den Erntejahren 2015 und 2016	37
Abbildung 15: Körner von Boregine (Referenz) und den Akzessionen 40 und 41 etwa 4 Stunden nach dem Einweichen	38
Abbildung 16: Erhebung der Verticillium-Welke auf dem Standort Fischerdorf im Jahr 2016; links: silbrig verfärbte befallene Stängel, Mitte: abgelöste Epidermis mit Mikrosklerotien darunter, rechts: Auszug aus der Boniturtabelle	39
Abbildung 17: Unterschiede in der Anfälligkeit der Akzessionen gegen Anthraknose, aufgenommen in einem Grünmasse-Ertragsversuch mit Aussaat am 1. August 2017	40
Abbildung 18: Witterungsverlauf im Jahr 2017 am Standort Fischerdorf im Vergleich zum langjährigen Mittel (ökologisches Klimadiagramm nach Walter und Lieth)	41
Abbildung 19: Kornertragsleistung der frühen und mittelfrühen Akzessionen im Parzellenversuch 2017	42
Abbildung 20: Kornertragsleistung der mittelspäten und späten Akzessionen im Parzellenversuch 2017	43
Abbildung 21: Grünmasseleistung ausgewählter Akzessionen im Parzellenversuch 2017	43

Abbildung 22: Aktivität der Phosphodiesterase (PDA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von <i>L. angustifolius</i> (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test	47
Abbildung 23: Aktivität der sauren Phosphatase (ACPA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von <i>L. angustifolius</i> (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test	47
Abbildung 24: Aktivität der alkalischer Phosphatase (ALPA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von <i>L. angustifolius</i> (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test	47
Abbildung 25: Aktivität der β -Glucosidase (BGA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von <i>L. angustifolius</i> (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test	47
Abbildung 26: Kolonieformende Einheiten P-mobilisierender Bakterien (PBAC) [$\text{cfu g}^{-1} \text{TS}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) <i>L. angustifolius</i> (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test	48
Abbildung 27: Ausgewählte Indikatorkomponenten für die Bonitur der Rhizodeposition als Kontrolle der Standortanpassung und Nährstoffmobilisierung (Baum et al. 2017, Berlin BonaRes Workshop)	51
Abbildung 28: Rhizosphärenchemische Differenzierung der Akzessionen im Gefäßversuch und Differenzierung nach ihrer Ertragsleistung (Einzelpflanzenenertrag) im Feld: Gruppe A: Akzessionen mit geringem Einzelpflanzenenertrag im Feld; Gruppe B: mit hohem Einzelpflanzenenertrag im Feld (vgl. Ergebnisse Kooperationspartner ESKUSA GmbH,) (n = 3)	55

1 Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse

1.1 Durchgeführte Arbeiten der WWU im Berichtszeitraum

1.1.1 Planung und Ablauf der Arbeiten der WWU

Abweichend von den ursprünglichen Angaben im Projektantrag begannen die in der Gesamtlaufzeit des Forschungsvorhabens vorgesehenen Arbeiten an der WWU erst zum 01.09.2015. Dementsprechend wurden die Zeiträume der drei Forschungsjahre wie eingangs der folgenden Abschnitte aufgeführt angepasst. Die Gesamtlaufzeit des Forschungsvorhabens endete jedoch fristgerecht zum 25.05.2018.

1.1.1.1 Forschungsjahr WWU1 (01.09.2015-31.08.2016)

Im ersten Jahr des Forschungsvorhabens (WWU1) wurde die molekularbiologische Charakterisierung von Homologen der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels (*Cystathionin γ -Synthase (CgS)*, *Cystathionin β -Lyase (CbL)*, *Methionin Synthase (MS)* und *SAM Synthetase (SAMS)*) in der Blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) wie im Projektantrag vorgesehen durchgeführt. Zu Beginn des Vorhabens wurde das veröffentlichte Genom der Blauen Lupine auf vollständig konservierte Homologe der vier Gene durchsucht. Die bioinformatische Analyse erfolgte hierbei anhand der zuvor identifizierten Gensequenzen aus *Glycine max* (Sojabohne) und *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand). Im Anschluss an die erfolgreiche bioinformatische Identifizierung der Gene wurden die Sequenzen aus *L. angustifolius* mittels molekularbiologischer Methoden auf Genom- und Transkriptomebene aus Blattmaterial der süßen Zuchtsorte Boruta isoliert und anhand dieser die Exon-Intron-Struktur abgeleitet. Im Anschluss durchgeführte detaillierte Genomanalysen der Blauen Lupine ergaben, dass von LaMS und LaSAMS eine Vielzahl von Homologen existieren.

1.1.1.2 Forschungsjahr WWU2 (01.09.2016-31.08.2017)

Im zweiten Forschungsjahr (WWU2) wurden zunächst semiquantitative Expressionsanalysen der identifizierten LaMS- und LaSAMS-Homologe in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine (Sorte Boruta) durchgeführt. Diese ergaben, dass nahezu alle dieser Homologe in den verwendeten Körnern exprimiert werden, sodass Real-Time PCR Analysen dieser Gene nicht sinnvoll erschienen. Parallel hierzu wurde der Methioningehalt und zur vergleichenden Auswertung zusätzlich der

Rohproteingehalt in reifen Körnern von insgesamt dreizehn Akzessionen aus Feldanzucht (2016, ESKUSA GmbH) bestimmt, die hierfür anhand der züchterischen Kriterien Reifezeitpunkt, Wuchstyp und pH-Toleranz ausgewählt wurden. Im weiteren Verlauf des Forschungsjahres lag der Fokus auf der zeitintensiven Vorbereitung und Durchführung von Expressionsanalysen mittels quantitativer Real Time PCR. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen wurden, wie auf dem Projekttreffen im Oktober 2017 (JKI in Groß Lüsewitz) vereinbart, von den Genen der Methioninsynthese ausschließlich die Expression von *LaCgS* und *LaCbL* untersucht. Außerdem wurden die Analysen auf drei in der Blauen Lupine konservierte Gene von methioninreichen Speicherproteinen (*LaGamma1* (*LaGa1*) und *LaGamma2* (*LaGa2*), sowie *LaDelta4* (*LaDe4*)) ausgeweitet (Foley *et al*, 2011, Yang *et al.*, 2013). Eine hohe Expression dieser Speicherproteine könnte in Kombination mit einer erhöhten Expression der Methioninsynthesegene womöglich zu einem gesteigerten Methioningehalt in Körnern von *L. angustifolius* führen. Die durchgeführten Real-Time PCRs umfassten hierbei die Expressionsanalyse in sich bildenden Körnern von insgesamt fünf exemplarisch ausgewählten Akzessionen aus der zuvor erwähnten Feldanzucht (2016, ESKUSA GmbH), die zuvor im Rahmen der Methioninanalytik möglicherweise züchterisch wertvolle Merkmale gezeigt hat. Die erzielten Real-Time PCR Ergebnisse sollten im weiteren Verlauf des Vorhabens durch einen Vergleich zur Pflanzenanzucht unter standardisierten Bedingungen verifiziert werden. Hierfür wurde die verbleibende Zeit des zweiten Forschungsjahres für erste Anzuchtversuche der Blauen Lupine unter Standardbedingungen genutzt und die Sorte Boruta erfolgreich bis zur Abreife kultiviert.

1.1.1.3 Forschungsjahr WWU3 (01.09.2017-25.05.2018)

Im dritten Forschungsjahr (WWU3) lag der Fokus der durchgeführten Experimente darauf, die erzielten Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR sowie der Methioninanalytik für die zuvor untersuchten Akzessionen zu verifizieren und damit das züchterische Potential dieser Akzessionen eingehender zu untersuchen. In Absprache mit den Projektpartnern und dem Projektträger (Projekttreffen JKI Groß Lüsewitz, Oktober 2017) wurde somit nicht, wie ursprünglich geplant, Bezug zu Akzessionen genommen, die sich hinsichtlich ihrer Rhizosphären-Diversität als interessant erwiesen hatten (Ergebnisse UniRo). Im Falle der Methioninanalytik wurden die Analysen der zuvor ausgewählten Akzessionen auf reife Körner der Feldanzucht im Jahr 2017 (ESKUSA GmbH) erweitert und mit den Resultaten des Vorjahres verglichen. Damit sollten eventuelle Standort- und Umwelteffekte auf die Ergebnisse aus WWU2 aufgedeckt und somit eine fundiertere Bewertung der verschiedenen Akzessionen hinsichtlich ihres Methioninspeicherpotentials ermöglicht

werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCRs wurden die fünf zuvor ausgewählten Akzessionen unter Standardbedingungen im Gewächshaus angezogen und sich bildende Körner geerntet, um die Expression der Gene zu untersuchen. Mithilfe von Methioninanalytik und Real-Time PCR Analysen war abschließend eine grundsätzliche Bewertung möglich, ob in den untersuchten bitteren Akzessionen züchterisches Potential zur Verbesserung der etablierten Süßlupinensorten der Blauen Lupine im Hinblick auf ihren Methioningehalt vorhanden ist.

1.1.2 Ergebnisse der WWU

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Rahmen der Gesamtlaufzeit des Forschungsvorhabens „LUPI-ZAV“ an der WWU durchgeführten Arbeiten ausführlich beschrieben. Hierbei wird im Detail auf die in den drei Forschungsjahren erzielten Forschungsergebnisse eingegangen. Abweichend von der ursprünglich vorgesehenen Laufzeit des Forschungsvorhabens, konnte der Projektstart an der WWU aufgrund gesetzlicher Vorgaben bei der Einstellung von Personal (z.B. Stellenausschreibung) erst zum 01.09.2015 erfolgen, weshalb die Gesamtlaufzeit des Forschungsvorhabens an der WWU kürzer ausfiel. Aufgrund dessen wichen Beginn- und Endzeitpunkte der jeweiligen Forschungsjahre wie aufgeführt ab.

1.1.2.1 Forschungsjahr 1 Arbeitspaket WWU1 (01.09.2015-31.08.2016)

*Klonierung und molekulare Charakterisierung der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in *Lupinus angustifolius* aus Blattmaterial*

Ergebnisse der molekularbiologischen Charakterisierung der Schlüsselgene

Wie im Projektantrag vorgesehen, wurde im Rahmen des ersten Forschungsjahres (Arbeitspaket WWU1) die molekulare Charakterisierung der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in *Lupinus angustifolius* aus Blattmaterial der Zuchtsorte Boruta durchgeführt.

Zur Charakterisierung der Gene wurde(n):

- Homologe der vier Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels im veröffentlichten, bislang nicht annotierten Genom von *L. angustifolius* (Yang *et al.*, 2013) mittels Computer-basierter Verfahren identifiziert. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Homologe der Schlüsselgene

in den sequenzierten und annotierten Genomen der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max* auffindig gemacht. Dies erfolgte mit Hilfe der *Enzyme Commission* (EC)-Nummern, der durch die Schlüsselgene codierten Enzyme (Cystathionin γ -Synthase (CgS, EC 4.2.99.9), Cystathionin β -Lyase (CbL, EC 4.4.1.8), Methionin Synthase (MS, EC 2.1.1.14), SAM Synthetase (SAMS, EC 2.5.1.6)). Die Nukleotidsequenzen der Schlüsselgene aus den beiden Modellorganismen dienten anschließend als Basis für die Suche im Genom von *L. angustifolius*;

- *L. angustifolius* Sorte Boruta unter standardisierten Bedingungen (16 h Licht bei 20°C, 8 h Dunkelheit bei 18°C) in Erde angezogen und Blattmaterial geerntet;
- genomische DNA sowie Gesamt-RNA aus Blattmaterial isoliert und die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben;
- die Sequenzen der Schlüsselgene auf Genom- und Transkriptomebene mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt, kloniert und sequenziert.

Anhand der durchgeführten Experimente konnten die vier Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in *L. angustifolius* erstmals auf Ebene von Genom und Transkriptom identifiziert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine Exon-Intron-Struktur der Gene abgeleitet (**Abbildung 1**). Hinsichtlich dieser gilt es zu beachten, dass möglicherweise weitere als die dargestellten Spleißvarianten der Gene existieren.

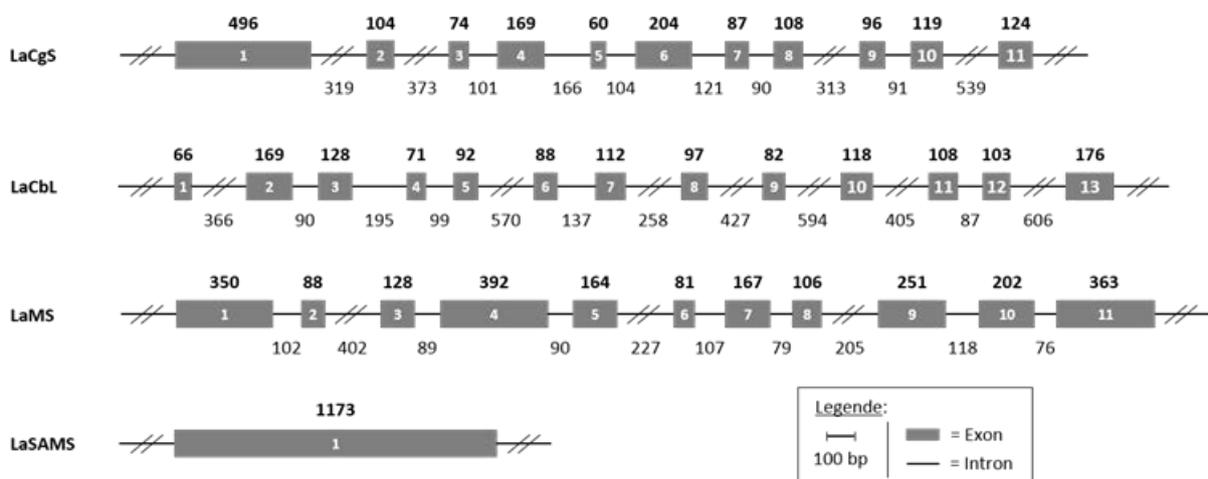


Abbildung 1: Genomische Struktur der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in *Lupinus angustifolius* Zuchtsorte Boruta

Die abgebildete Exon-Intron-Struktur der Gene wurde anhand des bioinformatischen Vergleiches von genomischer und transkribierter Sequenz erstellt. Zahlen über bzw. unter den Genabschnitten geben die Länge des jeweiligen DNA-Fragmentes in Basenpaaren [bp] an. *Lupinus angustifolius Cystathionin γ -Synthase* (LaCgS), *Lupinus angustifolius Cystathionin β -Lyase* (LaCbL), *Lupinus angustifolius Methionin Synthase* (LaMS), *Lupinus angustifolius SAM Synthetase* (LaSAMS).

Die Ergebnisse der computer-basierten Versuche ließen darauf schließen, dass zusätzlich zu den bereits charakterisierten, möglicherweise weitere Homologe der vier Schlüsselgene im Genom von *L. angustifolius* existieren. Aufgrund dessen folgte eine ausführlichere *in silico*-Analyse des Genoms der Blauen Lupine zur Identifizierung weiterer konservierter Homologe der Gene des Methioninstoffwechsels.

Ergebnisse der ausführlichen computer-basierten Genomanalyse von L. angustifolius zur Identifizierung weiterer Homologe der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels

Im Anschluss an die zuvor beschriebene molekularbiologische Charakterisierung der vier Schlüsselgene erfolgten im Rahmen des Arbeitspakets WWU1 weitere, detaillierte bioinformatische Analysen des Genoms der Blauen Lupine. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob zusätzlich zu den bereits charakterisierten möglicherweise weitere Homologe der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels existieren. Ausgangsbasis für diese Analysen waren

- die zuvor in der *L. angustifolius*-Varietät Boruta identifizierten und charakterisierten codierenden Sequenzen der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels (LaCgS, LaCbL, LaMS und LaSAMS, **Abbildung 1**);
- die von Yang *et al.*, 2013 veröffentlichte Genomsequenz von *L. angustifolius*.

Im Rahmen der bioinformatischen Analyse des Genoms der Blauen Lupine konzentrierte sich die Suche auf diejenigen Homologe, die eine potentiell vollständige codierende Gensequenz aufwiesen. Hierbei bestätigte sich, dass im Falle von zwei der vier Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels mehr als ein Homolog vorliegt (**Tabelle 1**). Während von LaCgS und LaCbL nach wie vor nur ein vollständiges Homolog identifiziert werden konnte, wurden von LaMS und LaSAMS mehrere im *L. angustifolius*-Genom detektiert. Dieses Ergebnis konnte außerdem durch die bioinformatische Analyse einer weiteren, vor kurzem publizierten und annotierten Genomsequenz von *L. angustifolius* (Hane *et al.*, 2016) bestätigt werden.

Tabelle 1: Anzahl der im Rahmen der computer-basierten Genomanalysen identifizierten Homologe der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in *L. angustifolius*

Gen	Anzahl genomisch identifizierter Homologe in <i>L. angustifolius</i>
<i>Cystathionin γ-Synthase (LaCgS)</i>	1
<i>Cystathionin β-Lyase (LaCbL)</i>	1
<i>Methionin Synthase (LaMS)</i>	6
<i>SAM Synthetase (LaSAMS)</i>	12

Angegeben sind nur diejenigen Homologe, für die eine potentiell vollständige codierende Gensequenz identifiziert werden konnte.

Fazit:

Aufgrund der Vielzahl konservierter Homologe im Falle von LaMS und LaSAMS wurde das Arbeitsprogramm einer detaillierten Expressionsanalyse der vier Schlüsselgene des Stoffwechsels deutlich umfangreicher. Zudem erschien es im Falle von LaMS und LaSAMS schwierig auf Basis von zukünftigen Expressionsanalysen züchterisch wertvolle Hinweise zur Steigerung des Methioningehaltes zu liefern. Aufgrund dessen sollte im Rahmen des folgenden Arbeitspakets WWU2 zusätzlich zu den bereits geplanten Arbeiten zunächst ermittelt werden, ob alle diese Homologe grundsätzlich in Körnern der Blauen Lupine exprimiert werden und somit für die geplanten detaillierten Expressionsvergleiche relevant sind.

1.1.2.2 *Forschungsjahr 2 Arbeitspaket WWU2 (01.09.2016-31.08.2017)*

***Real-Time PCR der RNA-Transkripte in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine.
Vergleich ausgewählter bitterer Akzessionen mit der Süßlupinensorte Boruta.
Referenzanalytik des Methioningehaltes für ausgewähltes Material.
Pflanzenanzucht bis zur Abreife unter standardisierten Bedingungen.***

Im Rahmen des zweiten Forschungsjahres wurden die in Arbeitspaket WWU2 vorgesehenen Arbeiten durchgeführt. In Absprache mit dem Projektträger (Projekttreffen JKI Groß Lüsewitz, Oktober 2017) wurden die Experimente im Laufe des Forschungsjahres hierbei, wie im Folgenden beschrieben, auf Basis der zuvor erzielten Ergebnisse sinnvoll angepasst. Im Detail umfassten die im zweiten Forschungsjahr durchgeführten Arbeiten

- Expressionsanalysen der genomisch identifizierten, vollständigen Homologe von LaMS und LaSAMS in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine mittels semiquantitativer Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR);
- Referenzanalytik des Methionin- und Rohproteingehaltes für ausgewähltes Material verschiedener Akzessionen der Blauen Lupine;
- Expressionsanalysen der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels LaCgS und LaCbL sowie der Gene methioninreicher Speicherproteine in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine mittels Real-Time PCR-Analysen (Vergleich ausgewählter bitterer Akzessionen mit der Süßlupinensorte Boruta);
- Pflanzenanzucht von *L. angustifolius* bis zur Abreife unter standardisierten Bedingungen.

Ergebnisse der Expressionsanalysen der vollständig konservierten Homologe von LaMS und LaSAMS in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine mittels semiquantitativer Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

In Ergänzung zu den ursprünglich geplanten Arbeiten wurden im Rahmen des Arbeitspakets WWU2 zunächst semiquantitative Expressionsanalysen der unterschiedlichen Homologe von LaMS und LaSAMS durchgeführt, die im Rahmen der bioinformatischen Analysen am Ende des ersten Forschungsjahres im Genom der Blauen Lupine auffindig gemacht wurden. Diese den geplanten Expressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time PCR vorgeschalteten Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob alle der bioinformatisch identifizierten, vollständig im Genom von *L. angustifolius* vorliegenden Homologe in sich bildenden Körnern exprimiert werden.

Für die semiquantitativen Expressionsanalysen wurde(n)

- Gesamt-RNA aus sich bildenden Körnern der Referenzvarietät Boruta isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben;
- spezifische Oligonukleotidkombinationen für die einzelnen Homologe von ihrer genomischen Sequenz abgeleitet;
- die Expression der einzelnen Homologe mittels cDNA-PCRs und Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die Spezifität der Oligonukleotide mittels Klonierung und Sequenzierung der PCR-Amplifikate verifiziert.

Die durchgeführten Experimente konnten belegen, dass mindestens fünf der sechs Homologe von LaMS und alle zwölf LaSAMS-Homologe in sich bildenden Körnern von *L. angustifolius* Boruta exprimiert werden und somit grundsätzlich eine katalytische Funktion in Körnern von *L. angustifolius* übernehmen könnten.

Fazit:

Die Vielzahl der in Körnern exprimierten Homologe von LaMS und LaSAMS erschwerten das Projektziel deutlich, durch Expressionsanalysen dieser Gene züchterisch wertvolle Hinweise zur Steigerung des Methioningehaltes zu liefern. Aufgrund dessen erschien eine detaillierte Expressionsanalyse dieser Gene mittels Real-Time PCR nicht sinnvoll. Von Seiten der WWU wurden deshalb im Rahmen des zweiten Zwischenberichts Änderungen hinsichtlich der geplanten quantitativen Real-Time PCR Analysen vorgeschlagen, welche nach Zustimmung des Projektträgers und der Projektpartner (Projekttreffen JKI Groß Lüsewitz, Oktober 2017) wie im Folgenden beschrieben im verbleibenden Zeitraum des Arbeitspaketes WWU2 umgesetzt wurden. Die von Seiten der WWU vorgeschlagenen Änderungen umfassten hierbei:

- ausschließlich den Einbezug der in *L. angustifolius* konservierten Homologe von LaCgS und LaCbL;
- Ausweitung der Expressionsanalysen auf Transkripte, die für Speicherproteine mit hohem Methioninanteil kodieren.

Wissenschaftlicher Hintergrund des Änderungsvorschlags

In früheren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass von den vier betrachteten Schlüsselgenen des Methioninstoffwechsels in Pflanzen der Cystathionin γ -Synthase eine besondere Rolle zukommt, da sie als erstes Enzym des Methioninsyntheseweges das nötige Substrat für die nachfolgenden drei Schlüsselenzyme bereitstellt. Diese scheinen daher eine eher untergeordnete Rolle in der Regulation der Verfügbarkeit freien Methionins einzunehmen (Kim *et al.*, 2002, Hesse *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsache und aufgrund der hohen Anzahl der in der Blauen Lupine identifizierten Homologe von LaMS und LaSAMS, die eine Züchtung hinsichtlich dieser beiden Merkmale deutlich erschweren, erschien deshalb aus unserer Sicht ausschließlich die vergleichende Expressionsanalyse von LaCgS und LaCbL sinnvoll.

Stattdessen empfahl sich jedoch die Erweiterung des geplanten Vorhabens auf Homologe von Speicherproteingenen, die für Proteine mit einem hohen Methioninanteil kodieren. In früheren Studien wurden in *L. angustifolius* mehrere Homologe von Speicherproteingenen identifiziert, die

den vier Speicherproteingruppen (α Konglutin, β Konglutin, γ Konglutin und δ Konglutin) zugeordnet werden konnten (Foley *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013). Laut dieser Studien sind in *L. angustifolius* drei α Konglutin-, sieben β Konglutin, zwei γ Konglutin und vier δ Konglutin Homologe vorhanden (**Tabelle 2**). Von diesen Genen kodieren die beiden γ Konglutin-Homologe (*LaGamma1* und *LaGamma2*) sowie ein δ Konglutin Homolog (*LaDelta4*) für Proteine mit einem verhältnismäßig hohen Methioninanteil bezogen auf die kodierte Aminosäure-Gesamtzahl (**Tabelle 2**, Foley *et al.*, 2011). Eine hohe Expression der Speicherproteingene *LaGamma1* (*LaGa1*), *LaGamma2* (*LaGa2*) und *LaDelta4* (*LaDe4*) könnte in Kombination mit einer gesteigerten Expression der Methioninsynthesegene zu einem gesteigerten Methioningehalt in Körnern von *L. angustifolius* führen.

Tabelle 2: Übersicht der in *L. angustifolius* identifizierten Homologe von Speicherproteingenen

Speicherproteingruppe	Homolog	Genbank-Akzession (kodierende Gensequenz)	Methioninanzahl	As-Gesamtzahl	Methionin [% As-Gesamtzahl]
α Konglutin	<i>LaAlpha1</i>	HQ670406.1	3	506	0,59
	<i>LaAlpha2</i>	HQ670407.1	1	643	0,16
	<i>LaAlpha3</i>	HQ670408.1	2	585	0,34
β Konglutin	<i>LaBeta1</i>	HQ670409.1	3	611	0,49
	<i>LaBeta2</i>	HQ670410.1	4	603	0,66
	<i>LaBeta3</i>	HQ670411.1	3	580	0,52
	<i>LaBeta4</i>	HQ670412.1	3	590	0,51
	<i>LaBeta5</i>	HQ670413.1	3	637	0,47
	<i>LaBeta6</i>	HQ670414.1	3	593	0,51
	<i>LaBeta7</i>	HQ670415.1	3	605	0,50
γ Konglutin	<i>LaGamma1</i>	HQ670416.1	6	449	1,34
	<i>LaGamma2</i>	HQ670417.1^(*)	13	446	2,91
δ Konglutin	<i>LaDelta1</i>	HQ670418.1	1	152	0,66
	<i>LaDelta2</i>	HQ670419.1	1	153	0,65
	<i>LaDelta3</i>	HQ670420.1	1	149	0,67
	<i>LaDelta4</i>	HQ670421.1	2	96	2,08

Die in der Blauen Lupine identifizierten Homologe wurden den vier Speicherproteingruppen (α , β , γ und δ Konglutin) zugeordnet (Foley *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013). Angegeben sind die Genbank-Akzessionsnummer der codierenden Sequenzen der einzelnen Speicherproteingene (Foley *et al.*, 2011), die kodierte Methioninanzahl, die kodierte Aminosäure (As)-Gesamtzahl, sowie der Anteil an Methionin bezogen auf die As-Gesamtzahl des jeweiligen Proteins. Die Methioninanzahl sowie die Aminosäure-Gesamtzahl der Speicherproteine wurden anhand der kodierenden Gensequenzen bioinformatisch abgeleitet. Im Falle von *LaGamma2* lag die kodierende Gensequenz^(*) zunächst nur partiell vor und musste für die dargestellte Analyse unter zu Hilfenahme einer genomischen Sequenz des Gens (Genbank-Akzessionsnummer MLAU01014706.1) bioinformatisch vervollständig werden. In Fettdruck hervorgehoben sind die drei Gene mit einem deutlich erhöhten Methioninanteil.

Ergebnisse der Referenzanalytik des Methioningehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen

Im Rahmen des zweiten Forschungsjahres wurde die geplante Referenzanalytik des Methioningehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen der Blauen Lupine realisiert. Die durchgeführten Analysen sollten hierbei erste Hinweise liefern, ob Unterschiede zwischen dem Methioningehalt in bitteren Akzessionen im Vergleich zur Referenzvarietät Boruta existieren. In die Arbeiten wurden hierbei in Abstimmung mit der ESKUSA GmbH neben der Zuchtsorte Boruta exemplarisch insgesamt zwölf bittere Akzessionen einbezogen. Die Auswahl dieser Akzessionen erfolgte anhand der züchterischen Kriterien Reifezeitpunkt, Wuchstyp und pH-Toleranz. Für eine vergleichbare Auswertung des Methioningehaltes wurde zusätzlich der Rohproteingehalt pro Trockenmasse der Körner bestimmt. Für die Referenzanalytik wurde(n)

- die Süßlupinensorten Boruta sowie die vorgesehenen bitteren Akzessionen der Blauen Lupine an einem Gunststandort in Feldanzucht im Jahre 2016 bis zur Abreife kultiviert und das aufbereitete Saatgut ausgewählter Proben durch die ESKUSA GmbH für die Referenzanalytik zur Verfügung gestellt;
- die Referenzanalytik bei der LUFA Nord-West (Oldenburg, Deutschland) für ausgewähltes Material in Auftrag gegeben. Für einen Vergleich der Akzessionen wurde mit der LUFA Nord-West die Messung des Methionin- sowie des Rohproteingehaltes in den Körnern der Blauen Lupine in Einfachbestimmungen vereinbart. Diese wurde nach Verordnung (EG) Nr. 152/2009 vom Institut für Futtermittel durchgeführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte durch die WWU.

Die Auswertung der durchgeführten Messungen lieferte erste Hinweise, dass zwischen den einzelnen Akzessionen möglicherweise Unterschiede hinsichtlich ihres Methionin- und Rohproteingehaltes in reifen Körnern bestehen (**Tabelle 3** und **Abbildung 2**).

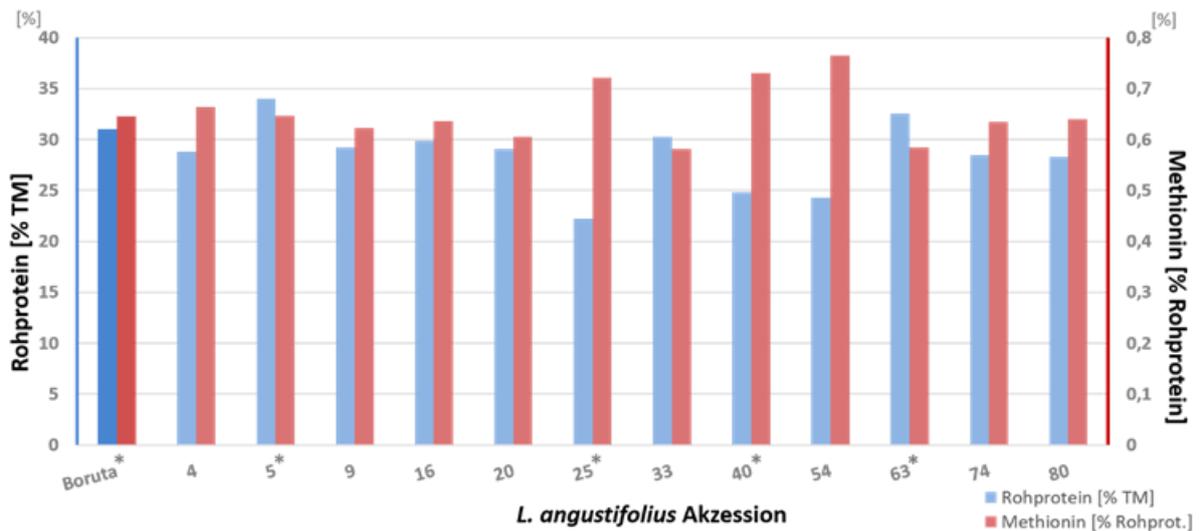


Abbildung 2: Referenzanalytik des Rohprotein- und Methioningehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen der Blauen Lupine (Feldernte 2016)

Dargestellt sind der Rohproteingehalt bezogen auf die Trockenmasse (TM) [%] und dessen Methioningehalt [%] in reifen Körnern zwölf ausgewählter bitterer Akzessionen verglichen mit der Referenzvarietät Boruta. Der Grafik liegen die in Tabelle 3 zusammengefassten Daten zugrunde. Die mit einem Sternchen (*) markierten Akzessionen wurden für anschließende Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR ausgewählt.

Im Vergleich zu der als Referenz ausgewählten Süßlupinensorte Boruta wiesen acht der zwölf bitteren Akzessionen bezogen auf den Rohproteingehalt einen vergleichbaren oder erhöhten Methioningehalt im Rohprotein auf (4, 5, 16, 25, 40, 54, 74, 80), der jedoch in einigen Fällen mit einem vergleichsweise niedrigeren Rohproteingehalt einherging. Besonders auffällig war dieser Trend in den drei Akzessionen 25, 40 und 54 zu erkennen, die einen höheren Methionin- in Kombination mit einem geringen Rohproteingehalt aufwiesen. Eine Besonderheit stellten außerdem Akzession 5 und 63 dar, die zu Boruta einen vergleichsweise erhöhten Rohproteingehalt zeigten.

Tabelle 3: Referenzanalytik des Methionin- und Rohproteingehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen der Blauen Lupine

Akzession	Rohprotein [% TM]	Methionin [% Rohprotein]
Boruta	31	0,65
4	28,8	0,66
5	34,0	0,65
9	29,2	0,62
16	29,9	0,64
20	29,1	0,60
25	22,2	0,72
33	30,3	0,58
40	24,8	0,73
54	24,3	0,77
63	32,5	0,58
74	28,5	0,64
80	28,3	0,64

Die Messungen erfolgten in Einfachbestimmungen nach Verordnung (EG) Nr. 152/2009 durch die LUFÄ Nord-West. Aufgeführt sind der Rohproteingehalt bezogen auf die Trockenmasse (TM) [%] der jeweiligen Probe, sowie der Methioningehalt im Bezug zum Rohproteingehalt [%]. In Fettdruck hervorgehoben sind die Werte der Referenzvarietät Boruta. Rot dargestellte Werte liegen unter, grün dargestellte Werte über dem für Boruta ermittelten Rohprotein- bzw. Methioningehalt.

Fazit:

Die Messungen von Methionin- und Rohproteingehalt in den reifen Körnern konnten erste Eindrücke liefern, dass durchaus Unterschiede zwischen den analysierten Akzessionen bestehen. Sollten sich im Verlauf des Vorhabens die gemessenen Trends bestätigen, schienen auf Basis der Methioninanalytik zumindest einige der Akzessionen züchterisches Potential zur Steigerung des Methioningehaltes zu besitzen. Da es sich bei den durchgeführten Messungen bislang jedoch um Einfachbestimmungen von auf einem Feld geerntetem Körnermaterial handelte, waren die Ergebnisse unter Vorbehalt zu interpretieren. Deshalb sollten im dritten Forschungsjahr weitere ergänzende Experimente folgen, um die durchgeführten Messungen zu verifizieren und einschätzen zu können, inwiefern der Methioningehalt von Umweltbedingungen, wie Bodenqualität und Witterung abhängt.

Ergebnisse der vergleichenden Analysen der RNA-Transkripte der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels und methioninreicher Speicherproteine mittels Real-Time PCR

Im Anschluss an die zuvor getätigten Versuche wurden im restlichen Zeitraum des zweiten Forschungsjahres in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine die vorgesehenen, vergleichenden Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR durchgeführt. Hierbei lag der Fokus, wie zuvor ausgeführt, auf den beiden Schlüsselgenen der Methioninsynthese *LaCgS* und *LaCbl*, sowie den ausgewählten Genen der Speicherproteine mit hohem Methioninanteil (*LaGa1*, *LaGa2* und *LaDe4*). Zum Erreichen der Forschungsziele mussten die geplanten Expressionsanalysen zunächst gründlich vorbereitet werden. Diese Vorbereitung umfasste folgende Arbeitsschritte:

- Ernte sich bildender Körner verschiedener, anhand züchterischer Merkmale ausgewählten bitteren Akzessionen und der Referenzsorte Boruta (hierfür freundlicherweise Zugang zur Feldanzucht an einem Gunststandort im Jahre 2016 der ESKUSA GmbH)
- mechanische Zerkleinerung des Körnermaterials durch Mörsern, Isolation der Gesamt-RNA aus den geernteten Körnern, DNase-Behandlung zum Abbau genomischer DNA in den Proben, Umschreiben der Gesamt-RNA mittels reverser Transkription in cDNA;
- Suche nach bereits für die Blaue Lupine veröffentlichten potentiell geeigneten Haushaltsgenen für die geplanten Real-Time PCR Analysen; erste Analysen der ausfindig gemachten, zuvor in Taylor *et al.* (2016), beschriebenen Gene auf ihre Eignung für Expressionsanalysen in sich bildenden Körnern und Auswahl zweier Gene (Ubiquitin C (*Ubc*) und Helicase (*Hel*)) für die geplanten Real-Time PCRs
- Ableiten und Etablierung von spezifischen Oligonukleotidkombinationen für die insgesamt fünf vereinbarten Zielgene (zwei Methioninsynthese- und drei Speicherproteingene), deren Transkriptlevel in den geplanten Real-Time PCRs im Vergleich zu den zwei ausgewählten Haushaltsgenen untersucht werden sollten.

Im Anschluss an diese erfolgreiche Etablierungsphase konnten die geplanten Real-Time PCRs schließlich für ausgewählte Akzessionen durchgeführt werden. Exemplarisch wurden hierbei vier bittere Akzessionen (5, 25, 40 und 63) in die Analysen einbezogen, in denen die Expression der verschiedenen Gene der Methioninsynthese und der Speicherproteine im Vergleich zur Süßlupinensorte Boruta untersucht wurde (**Abbildung 3**). Die Auswahl der Akzessionen erfolgte anhand der zuvor durchgeführten Methioninanalytik (**Tabelle 2** und **Abbildung 3**) bei der diese entweder aufgrund eines deutlich erhöhten Methioningehaltes (25 und 40) oder eines erhöhten

Rohproteingehaltes in Kombination mit einem vergleichsweise niedrigen Methioninanteil (5 und 63) aufgefallen waren. So sollten die Expressionsanalysen dieser Akzessionen nun weitere Hinweise liefern, ob sich die Methioninanalytik im Transkriptlevel der fünf ausgewählten Zielgene widerspiegelt und die Akzessionen womöglich tatsächlich über züchterisches Potential zur Steigerung des Methioningehaltes verfügen. Im Rahmen der Auswertung lag der Fokus zunächst auf dem Vergleich des Transkriptlevels der beiden Methioninsynthesegene. Verglichen mit Boruta wiesen die untersuchten bitteren Akzessionen interessanterweise eine leicht erhöhte Expression von *LaCgS* beziehungsweise ähnliche *LaCbl*-Transkriptlevel auf (**Abbildung 3 A und B**). Die erhöhte Transkription von *LaCgS* könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass die analysierten Akzessionen im Vergleich zu Boruta tatsächlich eine gesteigerte Syntheserate an freiem Methionin aufweisen, da das von *LaCgS* kodierte Protein eine Sonderrolle als erstes Enzym der Methioninsynthese einnimmt (Kim *et al.*, 2002, Hesse *et al.*, 2004). Deutlichere Unterschiede zeigten sich weiterhin im Rahmen der Expressionsanalyse der Speicherproteingene (*LaGa1*, *LaGa2* und *LaDe4*). Im Akzessionsvergleich unterschieden sich die gemessenen Transkriptlevel drastisch voneinander. Während in den analysierten Proben der bitteren Akzessionen 5, 25 und 63 keine oder im Vergleich zu Boruta deutlich verminderte Expression der drei Speicherproteine nachgewiesen wurde, wies Akzession 40 drastisch erhöhte Transkriptlevel auf (**Abbildung 3 C-E**).

Fazit:

Insgesamt konnten die mittels Real-Time PCR erzielten Ergebnisse erste Hinweise liefern, dass sich die analysierten Akzessionen hinsichtlich der Expression der einzelnen untersuchten Gene von Methioninsynthese und methioninreichen Speicherproteinen teilweise deutlich unterscheiden. In Kombination mit der zuvor durchgeführten Methioninanalytik könnten die beobachteten Resultate somit tatsächlich auf ein züchterisch wertvolles Potential zur Steigerung des Methioningehaltes hinweisen, da insbesondere Akzession 40 bei einer erhöhten Transkription des Methioninsynthesegens *LaCgS* sowohl über einen gesteigerten Methioningehalt in reifen Körnern als auch über eine drastisch erhöhte Expression der drei methioninreichen Speicherproteine verfügte. Zu diesem Zeitpunkt des Forschungsvorhabens musste jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei den durchgeführten Analysen nur um erste Tests handelte, die hinsichtlich ihrer Aussagekraft unter Vorbehalt interpretiert werden mussten. Deshalb sollten die durchgeführten Real-Time Analysen ähnlich wie die Methioninanalytik im verbleibenden dritten Forschungsjahr durch weitere Experimente mit den bislang analysierten Akzessionen ergänzt und verifiziert werden.

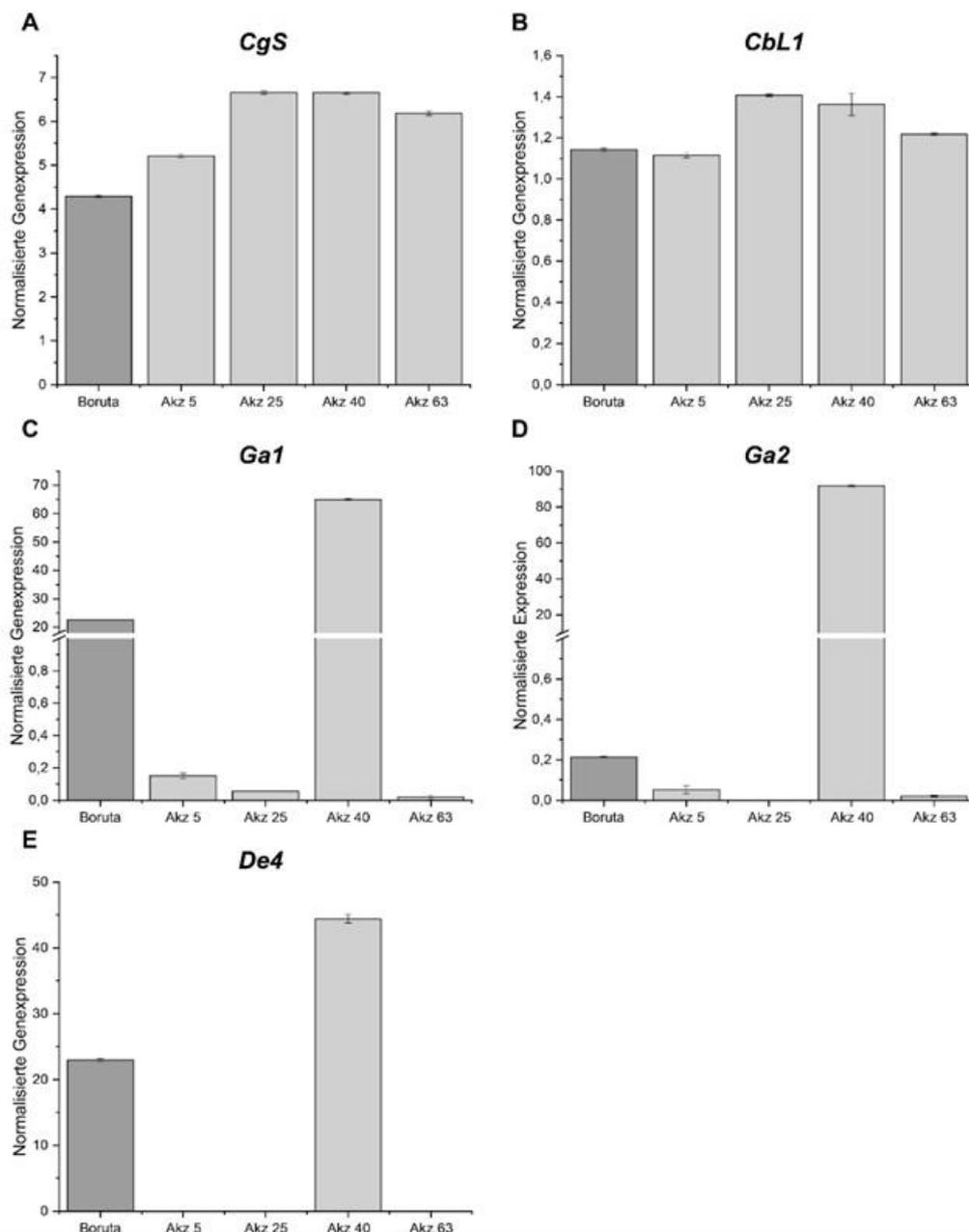


Abbildung 3: Real-Time PCR Expressionsanalyse von Methioninsynthese- und Speicherproteingenen in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine

Die untersuchten Körner der verschiedenen Akzessionen wurden zu einem definierten Zeitpunkt von Pflanzen der Feldanzucht 2016 (ESKUSA GmbH) geerntet und zu jeweils einer Gesamtprobe zusammengeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Körner eine möglichst ähnliche Größe und somit ähnliches Wachstumsstadium aufwiesen. Jede analysierte Probe enthielt hierbei Körner, von mindestens drei verschiedenen Pflanzen. Abgebildet ist die normalisierte Genexpression der Methioninsynthese- (*LaCgS* (A) und *LaCbL* (B)) und Speicherproteingene (*LaGa1* (C), *LaGa2* (D), *LaDe4* (E)) in den Körnern der vier untersuchten bitteren Akzessionen im Vergleich zur Zuchtsorte Boruta. Die Normalisierung der Werte erfolgte hierbei gegen die Werte der Haushaltsgene *Ubiquitin C*

(*LaUbc*) und *Helicase* (*LaHel*). Die angegebenen Standardbalken repräsentieren den kalkulierten Standardfehler von drei technischen Replikaten der jeweiligen Messungen.

Ergebnisse der Anzucht von L. angustifolius bis zur Abreife unter standardisierten Bedingungen

Die bislang durchgeführten Real-Time PCR Expressionsanalysen in sich bildenden Körnern der Feldanzucht sollten zur Verifizierung der Ergebnisse im weiteren Verlauf des Vorhabens mit unter Standardbedingungen gebildeten Körnern verglichen werden. Für diese an der WWU für das dritte Forschungsjahr vorgesehenen Experimente wurde im Rahmen des zweiten Forschungsjahres mit Anzuchtversuchen von *L. angustifolius* unter standardisierten Bedingungen bis zur Reife der Körner begonnen, welche im Arbeitspaket WWU2 vorgesehen waren. Die durchgeführten Arbeiten beschränkten sich hierbei zunächst auf die Kultivierung der Referenzsorte Boruta, die sich unter standardisierten Langtag-Bedingungen (bis zur Abreife auf ED73 Einheitserde oder Pikiererde Einheitserde Classic; beide Substrate bezogen über Einheitserde Werkverband e.V., Sinntal-Altengronau) kultivieren lässt. Bei Erreichen einer entsprechenden Größe wurden die Pflanzen von einem Saat- in einen größeren Anzuchtopf überführt, in welchem sie bis zur Abreife angezogen wurden. Ein Keimungstest des gereiften Saatguts der auf ED73 Einheitserde angezogenen Pflanzen zeigte, dass die Körner grundsätzlich keimfähig sind.

Fazit:

Die gewählten Anzuchtbedingungen schienen für eine standardisierte Anzucht der Süßlupinensorte Boruta geeignet zu sein, sodass Boruta und die zuvor in die quantitativen Real-Time PCRs einbezogenen bitteren Akzessionen unter diesen Bedingungen im Gewächshaus angezogen werden konnten, um die bislang durchgeführten Expressionsanalysen in sich bildenden Körnern zu verifizieren.

1.1.2.3 Forschungsjahr 3 Arbeitspaket WWU3 (01.09.2017-25.05.2018)

Real-Time PCR der RNA Transkripte in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine. Vergleich ausgewählter bitterer Akzessionen mit der Süßlupinensorte Boruta bei Anzucht unter standardisierten Bedingungen.

Erweiterte Referenzanalytik des Methioningehaltes für ausgewähltes Material. Vergleich verschiedener Akzessionen aus zwei verschiedenen Anbaujahren.

Im dritten Forschungsjahr (WWU3) lag der Fokus der durchgeführten Experimente darauf, die erzielten Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR sowie der Methioninanalytik für die zuvor untersuchten Akzessionen zu bestätigen. Die Analysen sollten eine gesichertere Beurteilung ermöglichen, ob die analysierten, bitteren Wildformen über züchterisches Potential zur Steigerung des Methioningehaltes in Körnern der Blauen Lupine verfügen und ob dieser maßgeblich durch Standortbedingungen beeinflusst wird. Somit wurde nicht, wie ursprünglich geplant, Bezug zu Akzessionen genommen, die sich hinsichtlich ihrer Rhizosphären-Diversität als interessant erwiesen hatten (Ergebnisse Universität Rostock).

Ergebnisse der erweiterten Referenzanalytik des Methioningehaltes in Körnern ausgewählter Akzessionen

In Ergänzung zu den im zweiten Forschungsjahr durchgeführten Messungen des Methionin- und Rohproteingehaltes wurde die Methioninanalytik im dritten Projektjahr auf weitere Körnerproben ausgeweitet, welche die Resultate des Vorjahres verifizieren und Aufschluss darüber geben sollten, ob Umweltbedingungen, wie Bodenbeschaffenheit und Witterung den Methioningehalt in Körnern beeinflussen. Deshalb konzentrierten sich die Analysen auf diejenigen bitteren Akzessionen, die bereits im Vorjahr im Fokus der Arbeiten standen. Bei den nun in Ergänzung analysierten Proben, handelte es sich um reife Körner aus der Feldanzucht des Jahres 2017, die auf einem anderen Gunststandort von ähnlich guter aber nicht identischer Bodenbeschaffenheit von der ESKUSA GmbH durchgeführt wurde. Leider wurden die Akzessionen 40 und 63 hierbei im Jahre 2017 nicht angebaut und konnten aufgrund dessen nicht in die vergleichenden Analysen einbezogen werden. Identisch zu den Ausführungen im zweiten Forschungsjahr wurden die Körner durch die ESKUSA GmbH aufbereitet, für die Methioninanalytik an die WWU weitergeleitet und diese identisch zu den Ausführungen im zweiten Forschungsjahr durchgeführt.

Im Rahmen der durchgeführten Analysen unterschieden sich die absolut ermittelten Werte des Rohprotein- und dessen Methioningehaltes im Jahresvergleich zur Feldanzucht 2016 zum Teil deutlich (**Abbildung 4, Tabelle 4**). So enthielten die Körner der Feldanzucht aus dem Jahr 2017

verglichen mit der Anzucht 2016 insgesamt weniger Rohprotein in Bezug auf die Trockenmasse. Interessanterweise fiel jedoch gleichzeitig der gemessene Methioningehalt des Rohproteins in den Körnern aller untersuchten Akzessionen in 2017 höher aus. Diese grundsätzliche Beobachtung ließ vermuten, dass Standort und Witterungsbedingungen grundsätzlich Einfluss auf die Rohproteinmengen in den Körnern hatten und die Bedingungen im Jahre 2016 zur Proteinbildung günstiger waren. Gleichzeitig schien jedoch die Synthese methioninreicher Speicherproteine möglicherweise weniger stark von diesen Faktoren abzuhängen, da der Methioningehalt im Rohprotein bei einer geringeren Rohproteinmenge anstieg. Trotz der insgesamt abweichenden Messergebnisse konnten zumindest für einige der Akzessionen die im Vorjahr ermittelten Verhältnisse von Rohprotein- und dessen Methioningehalt tendenziell bestätigt werden. So wiesen zum Beispiel die Körner der Akzessionen 25 und 54 auch im Jahre 2017 einen zu Boruta vergleichsweise hohen Methioningehalt im Rohprotein in Kombination mit einem geringeren Rohproteingehalt auf.

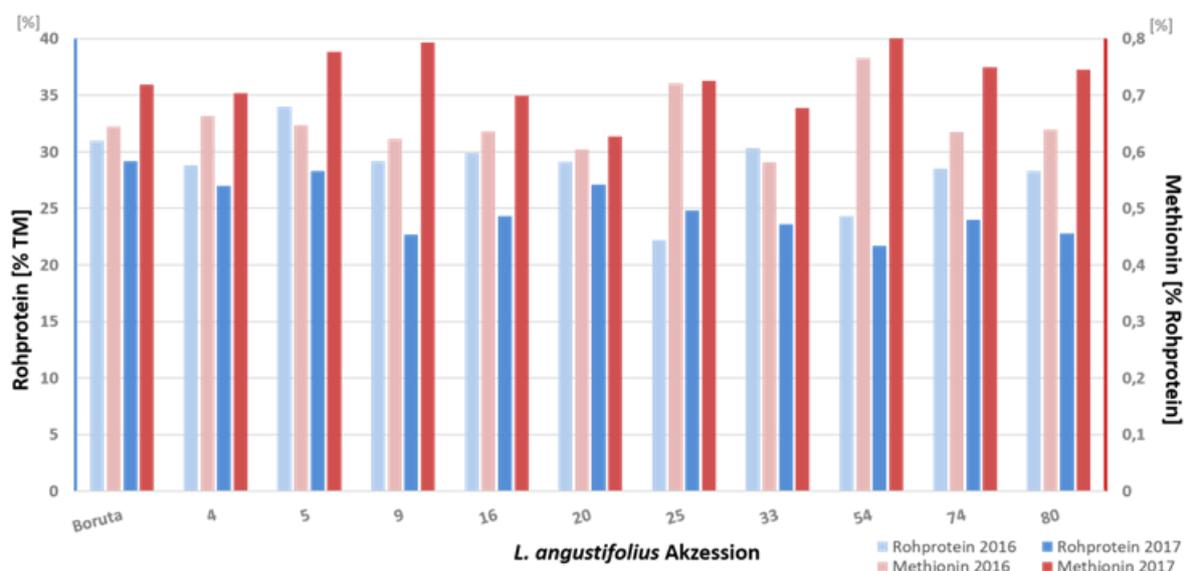


Abbildung 4: Vergleich der Feldanzuchten 2016 und 2017 von ausgewählten Akzessionen der Blauen Lupine im Hinblick auf Rohprotein- und Methioningehalte reifer Körner

Dargestellt sind der Rohproteingehalt bezogen auf die Trockenmasse (TM) [%] und dessen Methioningehalt [%] in den reifen Körnern ausgewählter bitterer Akzessionen verglichen mit der Referenzvarietät Boruta (Werte in **Tabelle 4**). Der Standort für die Anzucht wechselte zwischen beiden Jahren, hatte jedoch vergleichbare Bodenqualitäten. Zwischen den Jahren wurden zum Teil deutliche Unterschiede im Rohprotein- und Methioningehalt bei den Akzessionen festgestellt, sodass sowohl Standort als auch Umweltbedingungen einen Einfluss auf die Gehalte zu haben schienen.

Auffällig war, dass dieses Verhältnis von Rohprotein- zu dessen Methioningehalt unter anderem auch für die Akzessionen 9, 74 und 80 nachgewiesen wurde, die im Vorjahr bei einem höheren Rohproteingehalt noch ein geringeres oder vergleichbares Methioninlevel im Vergleich zu Boruta gezeigt hatten. Anders als im Jahr 2016 konnte in 2017 verglichen mit Boruta keine Akzession mit gesteigertem Rohproteingehalt identifiziert werden.

Tabelle 4: Vergleich der Feldanzuchten 2016 und 2017 von ausgewählten Akzessionen der Blauen Lupine im Hinblick auf Rohprotein- und Methioningehalte reifer Körner

Akzession	Rohprotein [% TM]		Methionin [% Rohprotein]	
	2016	2017	2016	2017
Boruta	31	29,2	0,65	0,72
4	28,8	27,0	0,66	0,70
5	34,0	28,3	0,65	0,78
9	29,2	22,7	0,62	0,79
16	29,9	24,3	0,64	0,70
20	29,1	27,1	0,60	0,63
25	22,2	24,8	0,72	0,73
33	30,3	23,6	0,58	0,68
40	24,8	<i>n.b.</i>	0,73	<i>n.b.</i>
54	24,3	21,7	0,77	0,83
63	32,5	<i>n.b.</i>	0,58	<i>n.b.</i>
74	28,5	24,0	0,64	0,75
80	28,3	22,8	0,64	0,75

Die Messungen erfolgten in Einfachbestimmungen nach Verordnung (EG) Nr. 152/2009 durch die LUFA Nord-West. Aufgeführt sind der Rohproteingehalt bezogen auf die Trockenmasse (TM) [%], sowie der Methioningehalt des Rohproteins [%]. In Fettdruck hervorgehoben sind die Werte der Referenzvarietät Boruta. **Rot** dargestellte Werte liegen unter, **grün** dargestellte Werte über dem für Boruta ermittelten Rohprotein- bzw. Methioningehalt des entsprechenden Jahres. Die Akzessionen 40 und 63 wurden 2017 nicht auf dem Feld angezogen, entsprechend fehlen die Werte für dieses Jahr (*n.b.* = nicht bestimmt).

Fazit:

Zusammengefasst weisen die Resultate der vergleichenden Methioninanalytik aus den beiden Anzuchtjahren darauf hin, dass der Proteingehalt in reifen Körnern und die Rohproteinqualität hinsichtlich dessen Methioninanteil deutlich von den Umweltbedingungen beeinflusst werden. Ein sinkender Rohproteingehalt scheint jedoch weniger mit einer verringerten Synthese methioninreicher Speicherproteine in Verbindung zu stehen und eher auf Kosten anderer Konglutine zu erfolgen, die einen verhältnismäßig niedrigeren Methioninanteil aufweisen und in höherer Anzahl in der Blauen Lupine konserviert sind (**Tabelle 2**). Diese Vermutung resultiert aus der Beobachtung, dass der Methioningehalt des Rohproteins aller getesteten Akzessionen bei einem geringeren Rohproteingehalt im Jahr 2017 vergleichsweise höher lag. Interessanterweise fiel dieses Phänomen bei den verschiedenen Akzessionen unterschiedlich und bei einigen bitteren Akzessionen (beispielsweise 9 und 16) vergleichsweise drastischer als bei Boruta aus. Dies könnte wiederum ein Indiz dafür sein, dass die einzelnen Akzessionen unterschiedliche Reaktionen auf die jeweiligen Umweltbedingungen zeigen. Auf Basis dieser gewonnenen Erkenntnisse der Methioninanalytik war deshalb zwar abschließend keine sichere Beurteilung des züchterischen Potentials einzelner bitterer Akzessionen möglich, dennoch belegen die durchgeführten Experimente eindrucksvoll, dass die untersuchten bitteren Wildformen aufgrund der beobachteten Variabilität von Rohprotein- und dessen Methioningehalt generell über züchterisch wertvolles Potential verfügen. Insgesamt gesehen deuten die Ergebnisse außerdem darauf hin, dass für eine fundierte züchterische Beurteilung der einzelnen Akzessionen auch im Falle der Methioninanalytik in möglichen zukünftigen Experimenten eine Anzucht unter Standardbedingungen sinnvoll erscheint.

Ergebnisse der vergleichenden Analysen der RNA-Transkripte der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels und methioninreicher Speicherproteine mittels Real-Time PCR

Im dritten Forschungsjahr wurden analog zur Methioninanalytik auch die Real-Time PCRs auf weitere Proben ausgeweitet. In diesem Zusammenhang sollten Expressionsanalysen in unter standardisierten Bedingungen gebildeten Körnern Aufschluss über die Verlässlichkeit und Aussagekraft der zuvor durchgeführten Analysen liefern. Zu diesem Zweck wurden im Vorfeld der Analysen die bitteren Akzessionen 5, 25, 40 und 63, sowie Boruta unter Langtag-Standardbedingungen (20°C (Licht), 16°C (Dunkelheit), Pikiererde Einheitserde Classic) im Gewächshaus angezogen und die sich bildenden Körner etwa 30 Tage nach Bildung der Blüte geerntet. Die Proben wurden im Anschluss identisch zum zweiten Forschungsjahr für die quantitativen Real-Time PCRs vorbereitet und die Expressionsanalysen der Methioninsynthese- und Speicherproteingene im Vergleich zu den Haushaltsgenen durchgeführt. Im Rahmen der Auswertung wurden anschließend die Resultate unter

standardisierten Bedingungen mit den Ergebnissen der Feldanzucht verglichen (**Abbildung 5**).

Auffällig war hierbei, dass sich die in den Körnern der Feldernte detektierten Expressionsverhältnisse zwischen den einzelnen Akzessionen zumindest teilweise auch unter Standardbedingungen zeigten. So wies beispielsweise Akzession 40 unter beiden getesteten Bedingungen jeweils im Vergleich zu den anderen bitteren Akzessionen drastisch höhere Level von *LaGa1* und *LaDe4* (**Abbildung 3/5C** und **E**) auf. Jedoch schienen die unterschiedlichen Transkriptlevel teilweise auch von den jeweiligen Umweltbedingungen beeinflusst zu werden. So wurden beispielsweise die erhöhten *Cg5*-Transkriptlevel in den Körnern der bitteren Akzessionen unter Standardbedingungen nicht bestätigt und lagen sogar zum Teil leicht unter den Werten von Boruta (**Abbildung 3** und **Abbildung 5 A**).

Außerdem wurde zum Beispiel in den bei Feldanzucht geernteten Körnern der Akzession 63 keine Expression von *LaGa2* detektiert, wohingegen diese unter Standardbedingungen im Vergleich zu Boruta sogar erhöht erschien (**Abbildung 3** und **Abbildung 5 D**).

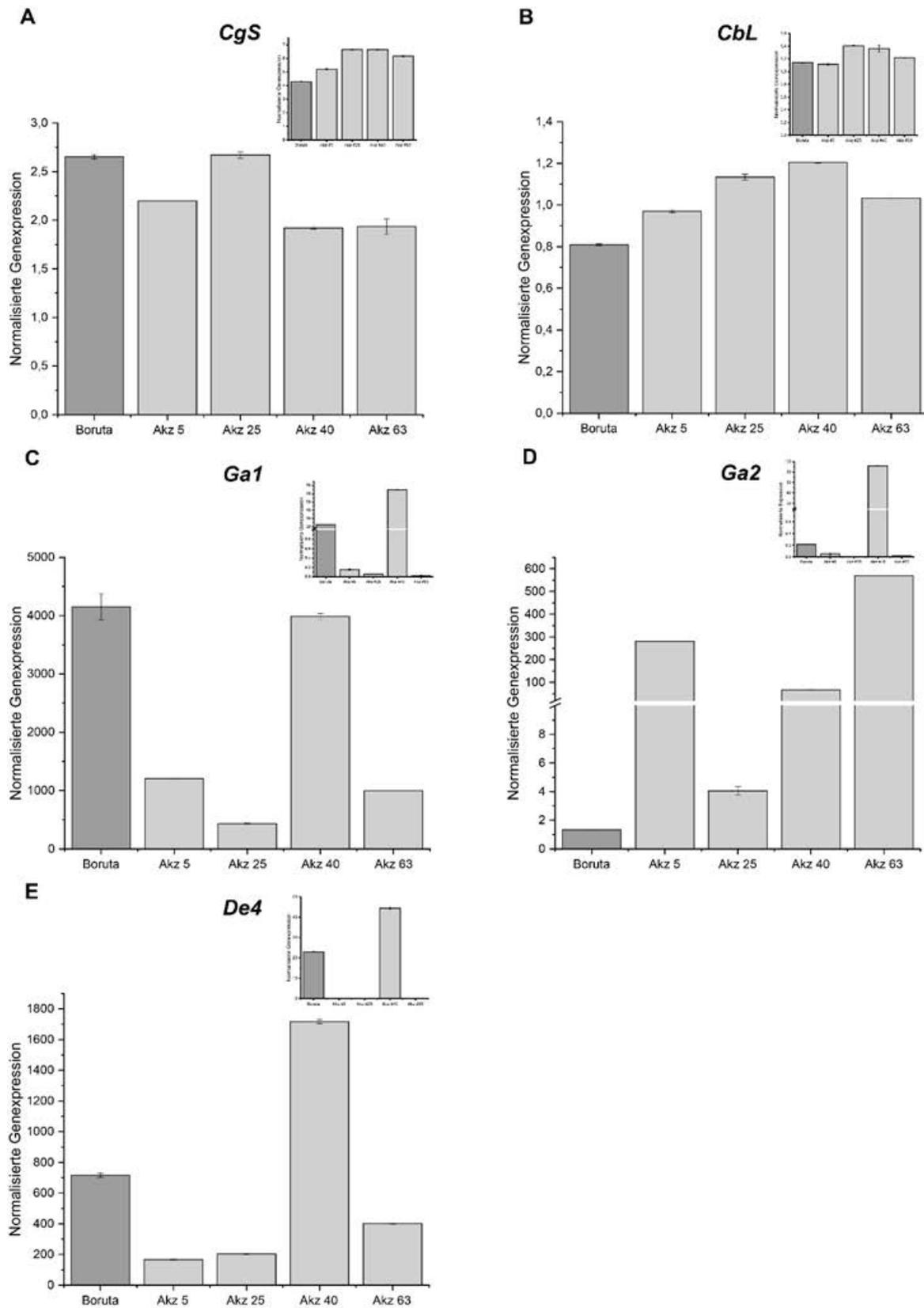


Abbildung 5: Real-Time PCR Expressionsanalyse von Methioninsynthese- und Speicherproteingenen in sich bildenden Körnern der Blauen Lupine

Die untersuchten Körner wurden circa 30 Tage nach Bildung erster Blüten von unter Standardbedingungen im Gewächshaus angezogenen Pflanzen geerntet und zu jeweils einer Gesamtprobe zusammengeführt. Jede analysierte Probe enthielt hierbei Körner, von drei verschiedenen Pflanzen. Abgebildet ist die normalisierte Genexpression der Methioninsynthese- (*LaCgS* (A) und *LaCbl* (B)) und Speicherproteingene (*LaGa1* (C), *LaGa2* (D), *LaDe4* (E)) in den Körnern der vier untersuchten bitteren Akzessionen im Vergleich zur Zuchtsorte Boruta. In den jeweils kleinen oben rechts abgebildeten Diagrammen sind in Ergänzung nochmals die Ergebnisse der Expressionsanalysen in sich bildenden Körnern der Feldanzucht dargestellt (siehe auch **Abbildung 3**). Die Normalisierung der für die fünf Zielgene gemessenen Werte erfolgte hierbei gegen die Werte der Haushaltsgene *Ubiquitin C* (*LaUbc*) und *Helicase* (*LaHel*). Die angegebenen Standardbalken repräsentieren den kalkulierten Standardfehler von drei technischen Replikaten der jeweiligen Messungen.

Fazit:

Ähnlich wie die Resultate der Methioninanalytik wiesen die durchgeführten Real-Time PCRs auf ein grundsätzliches züchterisches Potential der exemplarisch untersuchten Akzessionen hin. Diese Vermutung stützte sich auf die in Teilen drastische Expressionsvariabilität der einzelnen untersuchten Methioninsynthese- und Speicherproteingene im Akzessionsvergleich. Die beobachteten Abweichungen innerhalb einer Akzession unter verschiedenen Umweltbedingungen, sowie jene Variabilität zwischen den getesteten Akzessionen können jedoch weitaus vielschichtigere Gründe haben, die im Rahmen zukünftiger Experimente eingänglich untersucht werden müssten. Zu den möglichen Gründen für die Expressionsunterschiede zählen beispielsweise unterschiedliche Reifestadien der Körner zum Erntezeitpunkt oder allelische Unterschiede zwischen den Genen der einzelnen Akzessionen.

Da die bislang vorliegenden Ergebnisse der Transkriptanalytik nur partiell mit den Resultaten der Methioninanalytik in Einklang gebracht werden konnten, konnte im Rahmen des Forschungsvorhabens abschließend zwar keine eindeutigen Züchtungsempfehlungen für einzelne bittere Akzessionen zur Steigerung des Methioningehaltes abgeleitet werden, trotzdem bilden die im Rahmen der Versuche gewonnenen Erkenntnisse eine sehr gute Ausgangslage und Raum für mögliche zukünftige Experimente. Diese könnten beispielsweise den Fokus darauf richten, warum im Falle der bitteren Akzession 40 ein hoher Methioninanteil des Rohproteins sich auch in einer gesteigerten Expression der untersuchten methioninreichen Speicherproteine widerzuspiegeln scheint, dieser Zusammenhang jedoch in Akzession 25 mit einem ebenfalls erhöhten Methioningehalt im Rohprotein nicht nachgewiesen werden konnte. Für konkretere Züchtungsempfehlungen scheint außerdem eine Vertiefung der Transkriptanalytik mit Fokus auf Expressionsanalysen bei Standardanzucht auf verschiedenen Bodensubstraten, sowie Körnerernten zu

unterschiedlichen Reifezeitpunkten eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Analysen darzustellen.

Quellen:

Foley, R. C., Gao, L. L., Spriggs, A., Soo, L. Y., Goggin, D. E., Smith, P. M., Atkins, C.A., Singh, K. B. (2011) Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*. *BMC plant biology*, **11(1)**: 59.

Hane, J. K., Ming, Y., Kamphuis, L. G., Nelson, M. N., Garg, G., Atkins, C. A., Bayer, P. E., Bravo, A., Bringans, S., Cannon, S., Edwards, D., Foley, R., Gao, L.-l., Harrison, M. J., Huang, W., Hurgobin, B., Li, S., Liu, C.-W., McGrath, A., Morahan, G., Murray, J., Weller, J., Jian, J., Singh, K. B. (2017) A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant–microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnol J*, **15**: 318–330.

Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., Hoefgen, R. (2004) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *Journal of experimental botany*, **55(404)**: 1799-1808.

Kim, J., Lee, M., Chalam, R., Martin, M. N., Leustek, T., Boerjan, W. (2002) Constitutive Overexpression of Cystathionine γ -Synthase in *Arabidopsis* Leads to Accumulation of Soluble Methionine and S-Methylmethionine. *Plant Physiology*, **128 (1)**: 95-107.

Taylor, C. M., Jost, R., Erskine, W., Nelson, M. N. (2016) Identifying stable reference genes for qRT-PCR normalisation in gene expression studies of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *PLoS ONE*, **11(2)**: e0148300.

Yang, H., Tao, Y., Zheng, Z., Zhang, Q., Zhou, G., Sweetingham, M. W., Howieson, J. G., Li, C. (2013) Draft Genome Sequence, and a Sequence-Defined Genetic Linkage Map of the Legume Crop Species *Lupinus angustifolius* L.. *PLoS ONE*, **8(5)**: e64799.

1.2 Durchgeführte Arbeiten der ESKUSA GmbH im Berichtszeitraum

1.2.1 Linienbeschaffung und Vermehrung bitterer Formen von *L. angustifolius*

Die Arbeiten in LUPI-ZAV basierten auf einem 81 Akzessionen umfassenden Sortiment bitterer, alkaloidreicher Formen von *Lupinus angustifolius* des Vavilov-Institutes der Pflanzenindustrie, St. Petersburg, die mit je 30-50 Korn im Jahr 2014 übergeben worden waren. Alle Aussaaten zur Vermehrung und zum Erhalt der Akzessionen und deren Linien erfolgten in den Jahren 2015, 2016 und 2017 am Standort Fischerdorf bei Parkstetten auf einem leichten Sandboden (ca. 30 Bodenpunkte; pH 6,3) mit Rhizobien (HISTICK® L) behandelten Samenkörnern.

Im Jahr 2015 erfolgte die Ablage von 25 Körnern je Ausgangs-Akzession in einem Quadrat von 1,25 Meter Kantenlänge im Abstand von 25 cm zwischen und innerhalb der Reihen. Der Abstand von einer Akzession zur anderen betrug 50 cm, so dass sie zur Blüte mit Vlieszelten isoliert werden konnten. Die Ernteperiode setzte am 18. Juli ein und zog sich insgesamt über drei Wochen hin. In dieser Zeit wurden jeweils im Abstand von 2 bis 3 Tagen alle reifen Hülsen abgenommen und einzelpflanzenweise verpackt. Bei zwei Akzessionen (36 und 61) erfolgte kein Feldaufgang. In den verbleibenden 79 Akzessionen hatten insgesamt 630 Einzelpflanzen die Samenreife erreicht. In 74 Akzessionen standen ausreichend große Einzelpflanzennachkommenschaften (EPN) für eine Aussaat in mindestens einer Einzelreihe mit je 30 Körnern auf 2,5 laufende Meter für 2016 zur Verfügung. Im Vegetationsjahr 2016 wurden 564 EPN aus 74 Akzessionen als 111 Einzel- und 453 Doppelreihen ausgesät (EPN aus Akzessionen werden im Folgenden auch Linien genannt). Absolut homogene EPN einer Akzession wurden zur Ernte zusammengefasst und morphologisch abweichende EPN einzel- bzw. doppelreihenweise separat geerntet. Aus heterogenen EPN wurde wiederum einzelpflanzenweise Saatgut entnommen.

Im Vegetationsjahr 2017 kamen alle ausreichend großen Chargen (i.d.R. zusammengefasste EPN) in einem Korn- und einem Grünmasseertragsversuch zum Einsatz (**Abschnitt 1.2.3.5**). Material aus einzelpflanzenweiser Ernte wurde wiederum in Einzel- bzw. Doppelreihen ausgesät und, Homogenität vorausgesetzt, einzel- bzw. doppelreihenweise geerntet. Von interessanten inhomogenen Einzel- bzw. Doppelreihen wurden erneut drei bis fünf Einzelpflanzen geerntet. Zum Ende des Vegetationsjahres 2017 stehen damit insgesamt 450 Linien aus 74 Akzessionen in unterschiedlich großem Umfang zur Verfügung.

1.2.2 Untersuchung zur pH-Toleranz bitterer Formen von *L. angustifolius*

Im Vegetationsjahr 2016 wurde eine Einzelreihenanlage mit jeweils 15 Körnern pro laufende 1,5 Meter auf einem differenzierenden Standort in Reibersdorf (sandiger Lehm mit einem Boden pH-Wert von 7,4) realisiert. Dabei wurden insgesamt 434 EPN aus 74 Akzessionen berücksichtigt. Die Aussaat erfolgte am 14. April und die Bonituren der „Kalkchlorosen“ am 23. und 30. Mai sowie am 24. Juni (**Abbildung 6**). Die Boniturnoten (1 = keine Symptome, 9 = abgestorben) wurden zu Boniturnoten-Integralen (BN-Integral) verrechnet. Diese entsprechen den durch die Grafen der Boniturnoten über der Zeitachse gebildeten Flächen. Die Flächenberechnung erfolgte analog zur Berechnung eines Befallsintegrals nach der Formel:

$$BI = \sum_{t+1}^n (BN_t + BN_{t+1})/2 * [(t+1) - t]$$

BI = Befallsintegral

BN = Boniturnote

t = Boniturtermin



Abbildung 6: Unterschiede in der pH-Toleranz: links: Linie mit Kalkchlorose; rechts kalktolerante Linie

Die in **Abbildung 7** dargestellten mittleren BN-Integrale für ausgewählte Akzessionen und die Referenzsorte Boruta entsprechen den Flächen unter ihren Kurven. Das BN-Integral ist einheitslos und betrug beispielsweise für Boruta 255 und für die 59er Akzession 154. Je kleiner der Wert für das BN-Integral, desto weniger anfällig ist die Akzession gegenüber neutralen pH-Werten. Während etwa

alle Pflanzen aller Referenzreihen von Boruta zum 24. Juni abgestorben waren (mittlere BN = 9), lag die mittlere Boniturnote aller geprüften EPN der am wenigsten anfälligen Akzession 59 gerade bei knapp über 6 (mittelschwere Symptomausbildung).

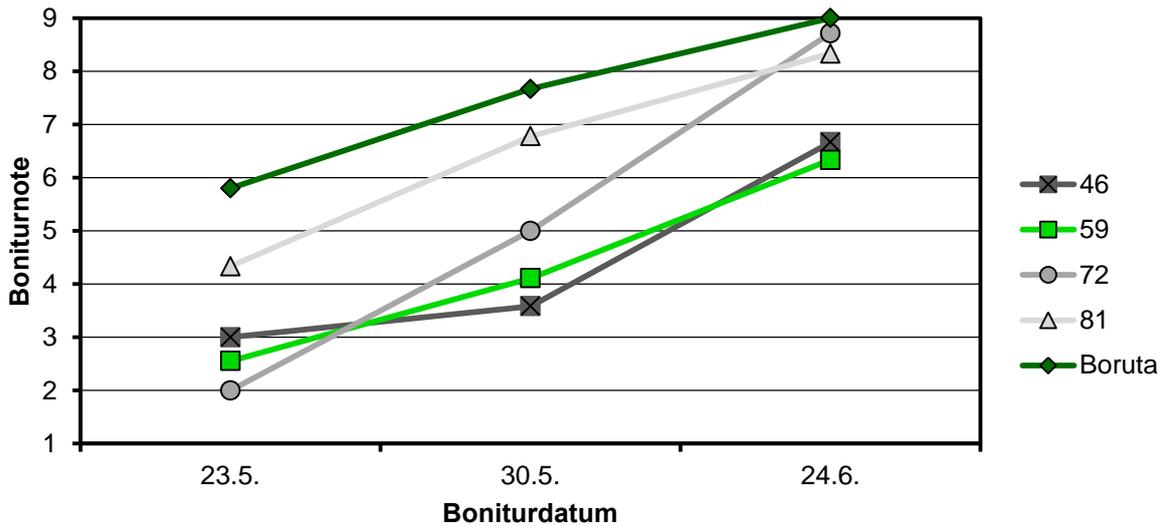


Abbildung 7: BN-Integrale unterschiedlich kalkanfälliger Akzessionen im Vergleich zur Referenzsorte Boruta

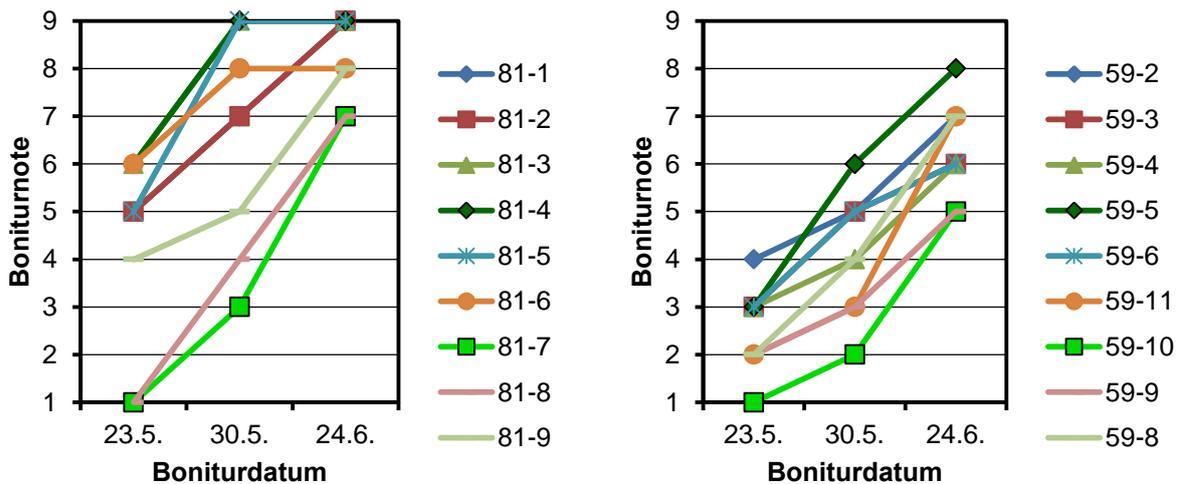


Abbildung 8: Variation der pH-Reaktion innerhalb der empfindlicheren Akzession 81 (links) und der am wenigsten empfindlichen Akzession 59 (rechts)

Abbildung 8 zeigt, dass es unter den EPN einer Akzession erhebliche Unterschiede in der pH-Toleranz gab. So schnitt EPN 81-7 der insgesamt anfälligeren Akzession 81 besser ab, als die meisten EPN der insgesamt am wenigsten anfälligen Akzession 59. Herausragend in ihrer Toleranz gegenüber neutralen Boden-pH-Werten war insbesondere die EPN 59-10 mit einem BN-Integral von 98. Aufgrund der am differenzierenden Standort erhobenen Daten fielen insbesondere die Akzessionen 46 und 59 durch eine deutlich höhere pH-Toleranz im Vergleich zu den Referenzsorten Boruta (BN-Integral 255) und Boregine (BN-Integral 263) auf. Hier ist eine dezidierte Suche nach noch toleranteren EPN lohnenswert. Von einigen EPN dieser Akzessionen ist auf dem alternativen (pH-neutralen) Standort (AS) Saatgut gewonnen worden. Geerntet wurden vollständig ausgebildete, keimfähige Körner, die, verglichen mit denen vom Gunststandort (GS) eine um knapp 25% geringere Tausend-Korn-Masse hatten (**Abbildung 9**).

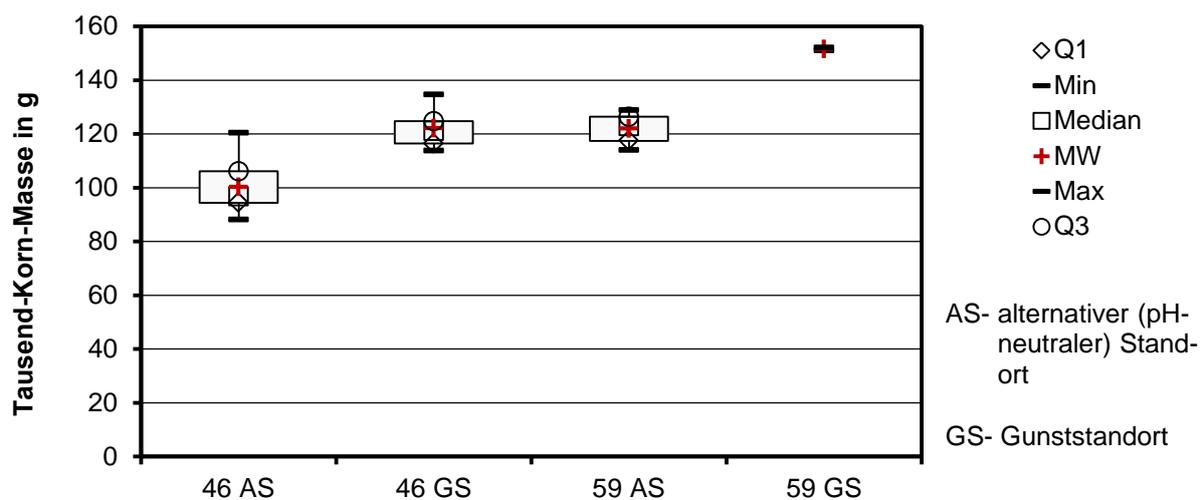


Abbildung 9: Tausend-Korn-Massen der Akzessionen 46 und 59 auf dem alternativen (AS) und dem Gunststandort (GS)

Kreuzungen der aufgefundenen pH-toleranteren Genotypen mit alkaloidarmen Sorten sind bislang nicht erfolgt, so dass noch keine Aussagen über die Vererbung getroffen werden können.

1.2.3 Erfassung der phänotypischen und agronomischen Merkmale bitterer Formen von *L. angustifolius*

Die in den Vegetationsperioden 2015, 2016 und 2017 auf dem Standort Fischerdorf angebauten Akzessionen und deren EPN in den Reihenanlagen wurden auf die wichtigsten Register- und Wertprüfungsmerkmale bonitiert (**Tabelle 5**). Im Ergebnis sind sämtliche Akzessionen und ihre EPN mit ihren Eigenschaften hinterlegt und in einer Excel-Datenbank zusammengefasst worden. Insbesondere finden sich Eintragungen zu Wuchstyp, Wuchshöhe, Blattfarbe, Blütenfarbe, Abreifeverhalten, Lagerneigung, Platzfestigkeit, Hartschaligkeit, Homogenität und Samenfarbe. Von allen in den Jahren geernteten Akzessionen und deren EPN sind Einzelpflanzen-, Einzel- bzw. Doppelreihen- oder aber Parzellenerträge und die dazugehörigen Tausend-Korn-Massen (TKM) erfasst worden.

Tabelle 5: Über die Projektlaufzeit erfasste Merkmale und deren Ausprägung

Merkmal	Ausprägung			
Blütenfarbe	blau	violett	rosa	weiß
Reifegruppe	früh	mittelfrüh	mittelspät	spät
Referenzsorten	Boregine Boruta		Azuro	
Blattfarbe Auflauf	grün		violett	
Blattfarbe	sehr helles Gelbgrün		sehr dunkles Tannengrün	
Anthocyan Laub	kein		dunkel violett	
Wuchshöhe	hoch		niedrig	
Wuchstyp	determiniert		verzweigt	
Verzweigung				
- Ansatz	an der Basis		ab der Mitte	
- Steilheit	waagrecht		senkrecht	
Lagerneigung	hoch		niedrig	
Platzfestigkeit der Hülsen	niedrig		mittel	
pH-Toleranz	mittel		niedrig	
Samenfarbe	Anthrazit, mehrfarbig gesprenkelt		reinweiß	
Ertragspotenzial	hoch		niedrig	
Besonderheiten				
Welkesymptome	auffällig		unauffällig	
Anthraknose	auffällig		unauffällig	
Hartschaligkeit	ja		nein	
sonstiges	z.B. Gleichmäßigkeit der Abreife aller Triebe, zur Samenreife einsetzender natürlicher Blattfall, herausragende Kornqualität (gleichmäßig ausgeprägte, fleckenlose Samen) etc.			

1.2.3.1 Ertragspotenzial

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Kornerträge sämtlicher Einzelreihen (EPN) der Akzessionen im Vergleich zu den Reihen der süßen Referenzsorten Boruta (frühe Reifegruppe, determiniert) und Boregine (frühe Reifegruppe, verzweigt) im Vegetationsjahr 2016. Sehr viele EPN überragten die Ertragsmittel der mehrfach wiederholt eingestellten Referenzsorten bei weitem und eine beachtliche Anzahl lag auch noch weit über den Standardabweichungen der Referenzen. Infolgedessen darf die Grundannahme, dass in den bitteren Formen der schmalblättrigen Lupine ein beachtlich höheres Ertragspotenzial gegeben sein muss, als bestätigt angesehen werden. Wurde in den süßen Lupinen in der jüngeren Vergangenheit auf Frühreife (Reifegruppe fr) fokussiert, so werden künftig im Zuge der Klimaveränderung (Vegetationszeit dehnt sich nach vorne ins zeitigere Frühjahr und nach hinten in den frühen Herbst aus) auch die mittelfrühen (mfr) und ggf. die mittelspäten (msp) Akzessionen und EPN interessant. Die **Abbildung 10** zeigt, dass in allen Reifegruppen Material mit entsprechendem Ertragspotenzial vorhanden ist.

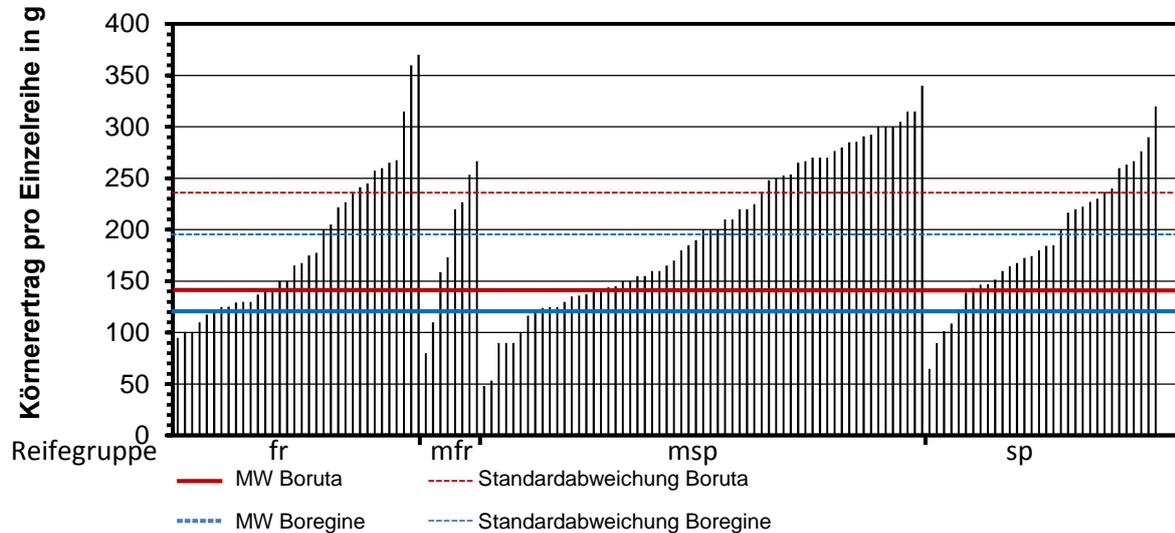


Abbildung 10: Einzelreihen-Kornertrag aller Einzelpflanzennachkommenschaften (nach Reifegruppen, dann aufsteigend geordnet) im Jahr 2016

1.2.3.2 Samenfarbe und -größe

Die Akzessionen und ihre EPN unterschieden sich sowohl in Farbe als auch Größe der Samen außerordentlich (**Abbildung 11**). Dabei gab es nicht nur Unterschiede zwischen den Akzessionen sondern auch innerhalb (**Abbildung 12**). Die Farbschläge rangierten von reinweiß bis „multicolor“, d.h. Samen mit einer starken dunkelgrau/anthrazit- farbigen Pigmentierung und mehrfarbigen (dunkelbeige und/oder verschiedenen braunen) Zwischenräumen. Daneben gab es zweifarbige Samen mit dunkelbeiger oder verschieden brauner Pigmentierung. Bei der Bonitur wurde sowohl die Dichte der Pigmentierung als auch ihre Färbung bewertet. Unter den Akzessionen fiel insbesondere die Nr. 54 mit ausgesprochen hellen, fleckenlosen (gesunden) und kugligen Samen in all ihren EPN auf.



Abbildung 11: Unterschiede in Samenfarbe und -größe zwischen den Akzessionen

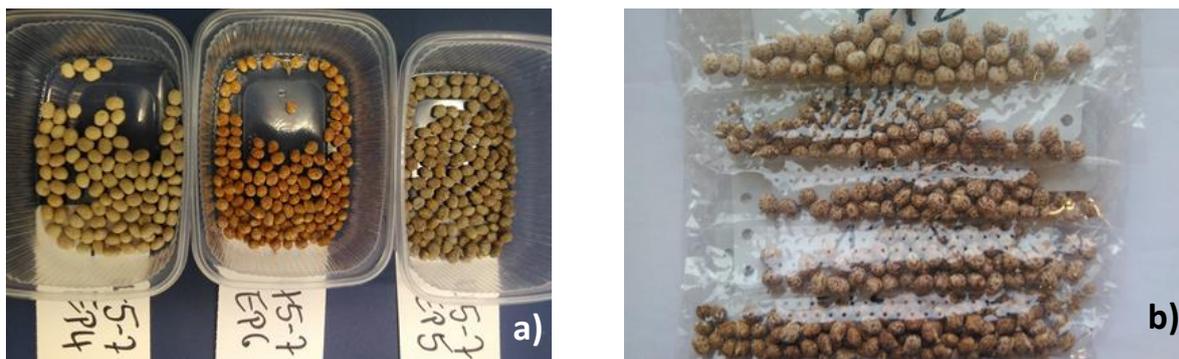


Abbildung 12: Unterschiede in Samenfarbe und -größe zwischen den EPN von Akzessionen

a) verschiedene EPN der Akzession 75 unterscheiden sich wesentlich, b) auch in überwiegend homogenen Akzessionen können EPN mit geringfügigen Abweichungen in der Dichte und/oder der Färbung der Pigmentierung auftreten (Akzession 70)

Auch die Tausendkornmassen (TKM) ließen in den Jahren eine große Variation erkennen. Verglichen mit der strikt einzelpflanzenweisen Ernte in 2015 kam es durch das akzessionsweise

Zusammenführen von sehr homogenen EPN zu größeren Erntechargen bereits zu einer merklichen Einschränkung der Schwankungsbreite (**Abbildung 14**). Dennoch gab es auch in der Ernte 2016 Genotypen (EPN von Akzessionen), die hinsichtlich Masse und Größe unterschiedlichen Ansprüchen gerecht werden können. So werden etwa für Gründungszecke, ob nur mit Lupine oder in Mischungen, Genotypen mit kleineren Samen bevorzugt, während für die Körnernutzung mit Blick auf Proteingehalt und -ertrag eher große Samenkörner gewünscht werden (**Abbildung 13**). Bezüglich der inhaltstofflichen Zusammensetzung wird auf Abschnitt 1.1.2.3 verwiesen.

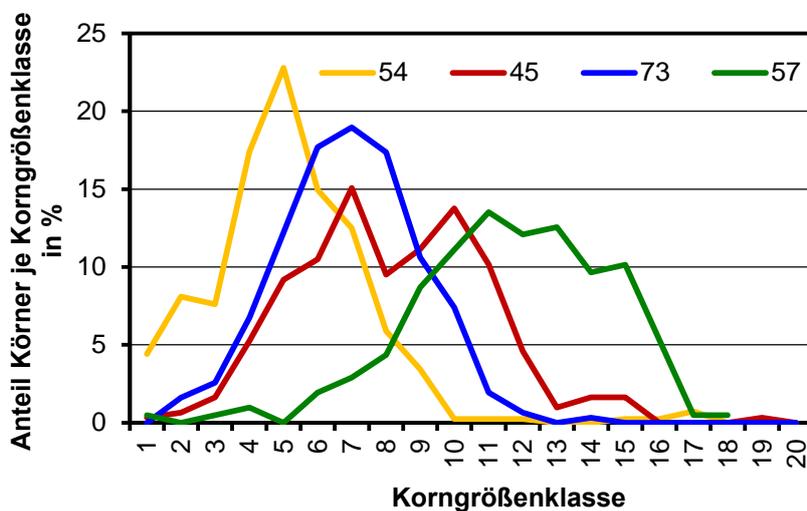
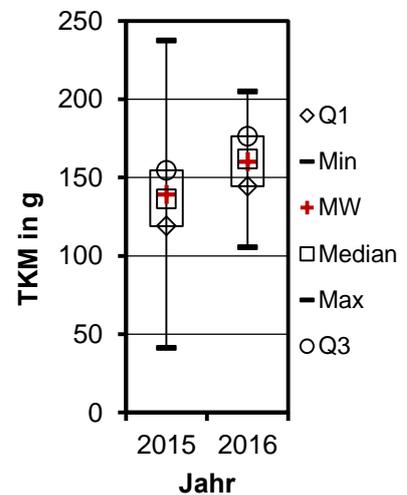


Abbildung 13. Unterschiede in der Korngrößenverteilung ausgewählter Genotypen aus dem Erntejahr 2016



Massen aller geerteter Genotypen aus den Erntejahren 2015 und 2016

1.2.3.3 Hartschaligkeit

In der Reihenanlage 2016 fielen zwei Akzessionen (40 und 41) durch einen überaus schlechten Feldaufgang auf. Von deren Saatgutbestand wurde ein simpler Test auf Hartschaligkeit durchgeführt, welche für beide Akzessionen bestätigt werden konnte (**Tabelle 6** und **Abbildung 15**).

Tabelle 6: Test auf Hartschaligkeit von Akzessionen mit schlechtem Feldaufgang im Jahr 2016

Stunden nach dem Einweichen	Gequollen sind von je 30 eingeweichten Körnern		
	Referenz Boregine	Akzession 40	Akzession 41
04:00	25	3	0
08:00	29	4	0
24:00	30	5	0
48:00	30	7	2



Abbildung 15: Körner von Boregine (Referenz) und den Akzessionen 40 und 41 etwa 4 Stunden nach dem Einweichen

1.2.3.4 Krankheitsanfälligkeit

In allen Versuchsjahren traten auf der Fläche in Fischerdorf mit Beginn der Samenreife Welkesymptome auf. Diese wurden aufgrund der unverwechselbaren Symptome zweifelsfrei auf einen Befall mit *Verticillium dahliae* zurückgeführt. Das Krankheitsbild sind völlig abgetrocknete, aus einigem Abstand silbrig schimmernde Stängel (**Abbildung 16**, links), deren Epidermis entweder faserig herabhängt oder leicht abgelöst werden kann. Unter der Epidermis sind zahlreiche Mikrosklerotien des Pilzes wie feinsten Eisenstaub zu erkennen (**Abbildung 16**, Mitte). Da *V. dahliae* als bodenbürtiger Schaderreger nicht gleichmäßig sondern gehäuft auf einer Fläche verteilt ist, konnten zwar keine belastbaren Daten wohl aber Indizien für unterschiedliche Anfälligkeiten gesammelt werden. In **Abbildung 16** rechts ist ein Auszug aus der Boniturtabelle wiedergegeben. Bemerkenswert ist der Umstand, dass es nicht nur Unterschiede zwischen den Akzessionen gab, sondern auch und vor allem innerhalb. Hier sind beispielhaft die mittelspäten EPN der Akzessionen 47 und 66 zu nennen. Besonders interessant sind die blau markierten EPN der Akzessionen 67 und 72. Da die Welke erst mit der physiologischen Reife einsetzt, wären die ersten und mithin schwersten Symptome an den früheren Linien zu erwarten. Bei den genannten Akzessionen beispielsweise verhielt

es sich umgekehrt. Insgesamt lässt sich konstatieren, dass das Gros der frühen Akzessionen/EPN tatsächlich deutlichere Welkeerscheinungen zeigten. Ganz offensichtlich hatte das spätere Material, das zum Abschluss der Ernte überwiegend frische grüne Stängel aufwies, noch nicht das erforderliche physiologische Alter für den Ausbruch der Symptome erreicht. Neben den schon genannten EPN 67.4 und 72.1 bis 72.7 gab es weitere interessante Ausnahmen (z.B. EPNs 74.6 und 77.2 in der roten Markierung). Zur sicheren Identifikation von Resistenzträgern bleiben Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen unerlässlich.



Akzession	Reife- gruppe	Auftreten von Verticillium
47.1-47.5	msp	+
47.6+7	msp	-
48.1-48.5	fr	+
48.6	fr	-
48.7	fr	-
51.1	fr	-
51.3	fr	-
64.2+64.3	mfr	-
64.1	fr	-
65.1	fr	+
65.2+65.3	fr	-
66.2+5+8	fr	+
66.3	msp	-
66.9	msp	+
66.6	msp	+
67.8+67.9	fr	-
67.4	fr	-
67.10	mfr	+
69.2+3+4	mfr	-
70.2+70.3	fr	-
71.2	fr	-
72.1-/2.7	fr	-
72.8	msp	+
72.9	fr	-
73.3+73.4	fr	-
74.6	fr	-
76.2-76.6	fr	+
77.2	fr	-

Abbildung 16: Erhebung der Verticillium-Welke auf dem Standort Fischerdorf im Jahr 2016; links: silbrig verfärbte befallene Stängel, Mitte: abgelöste Epidermis mit Mikrosklerotien darunter, rechts: Auszug aus der Boniturtabelle

Die Anthraknose der Lupine kam auf der regulären Reihenanlagenfläche in keinem der Vegetationsjahre vor. Es waren a) prophylaktische Spritzungen zur Zeit der Blüte durchgeführt worden und b) ließen die Witterungsverhältnisse in allen Jahren wegen der ausgesprochenen Sommertrockenheit keinen Krankheitsausbruch zu (**Abbildung 18**).

Indes konnte in einem zur Ermittlung der Gründungsleistung erst am 1. August 2017 auf einer Fläche im Vorderen Bayerischen Wald ausgesäten Versuch (vgl. Abschnitt 1.2.3.5) die Anthraknose beobachtet werden. Zwar gab es Unterschiede in der Befallsstärke zwischen Nord- und Südflanke des Versuches, doch die ermittelten Werte ließen einige Rückschlüsse auf das Niveau der Anfälligkeit zu. In **Abbildung 17** dargestellt sind die mittleren Befallsintegrale der am 2., 13. und 20. Oktober durchgeführten Bonituren und ihre Schwankung zwischen den 3 Wiederholungen des Versuches. Die großen Spannweiten sind größtenteils auf die erwähnte Nord-Süd-Lage der Parzellen im Feld zurückzuführen. Die hier für die Aussaat verwendeten großen Erntechargen von 2016 stehen in der Regel stellvertretend für die jeweiligen Akzessionen als Gesamtheit. Zu erwarten wären auch im Fall der Anthraknose Unterschiede in der Anfälligkeit innerhalb der Akzessionen, die hier nicht erfasst werden konnten. Auf jeden Fall sind vor einer weiteren Einengung der Anzahl an Linien durch Selektion auf Ertrag und agronomische Eignung Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen vorzusehen, um wertvolle Träger von Resistenzgenen aufzuspüren.

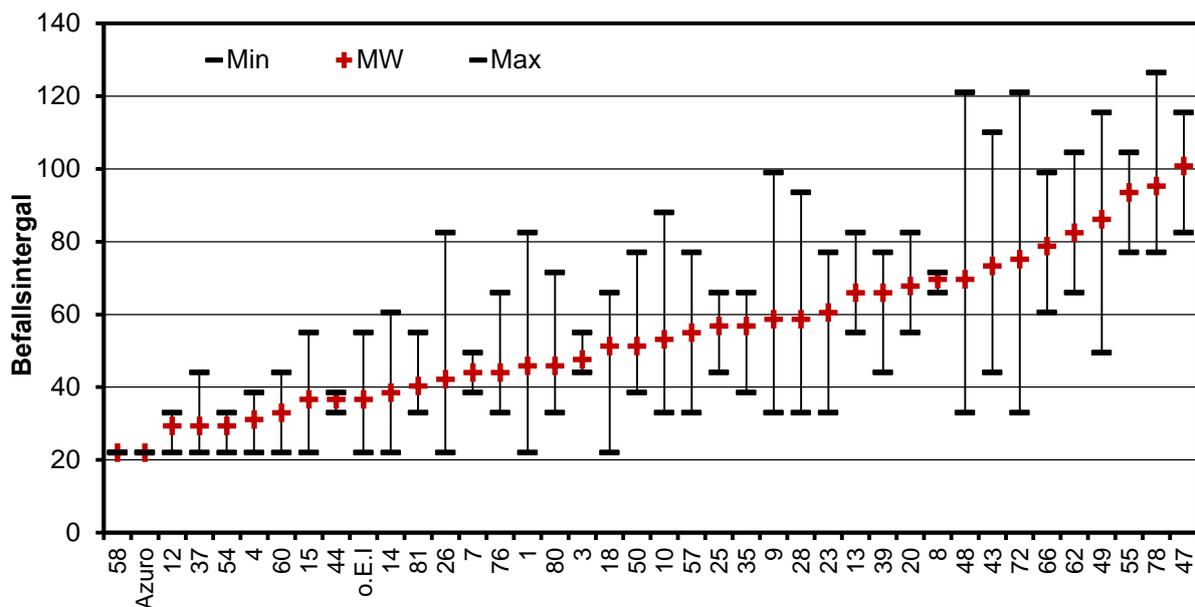


Abbildung 17: Unterschiede in der Anfälligkeit der Akzessionen gegen Anthraknose, aufgenommen in einem Grünmasse-Ertragsversuch mit Aussaat am 1. August 2017

1.2.3.5 Erfassung der Ertragsparameter bitterer Formen von *L. angustifolius* in Parzellenversuchen

Zur Ermittlung der Kornenertragsleistung der Akzessionen sind ausreichend große Erntechargen aus dem Jahr 2016 am 12. April 2017 am Standort Fischerdorf in alpha-Gitteranlagen mit dreifacher Wiederholung ausgesät worden. Dabei wurden frühe und mittelfrühe Akzessionen sowie mittelspäte und späte Akzessionen in zwei getrennten Anlagen untergebracht. Die Rhizobien wurden als Suspension zusammen mit einem Voraufbauherbizid gemäß den Angaben des Herstellers unmittelbar nach der Aussaat ausgebracht. Wahrscheinlich in Folge der ausgesprochen lang anhaltenden und extremen Trockenheit in den Monaten Mai, Juni und Juli (**Abbildung 18**) erfolgten keine Wurzelbesiedlung und entsprechend keine Knöllchenbildung. Das Resultat waren sehr niedrige, unterversorgte und in vorzeitige Reife eingetretene Bestände, die gleichwohl über ihren unmittelbaren Vergleich untereinander und im Verhältnis zu den Referenzsorten Aussagen zur Ertragsleistung zuließen.

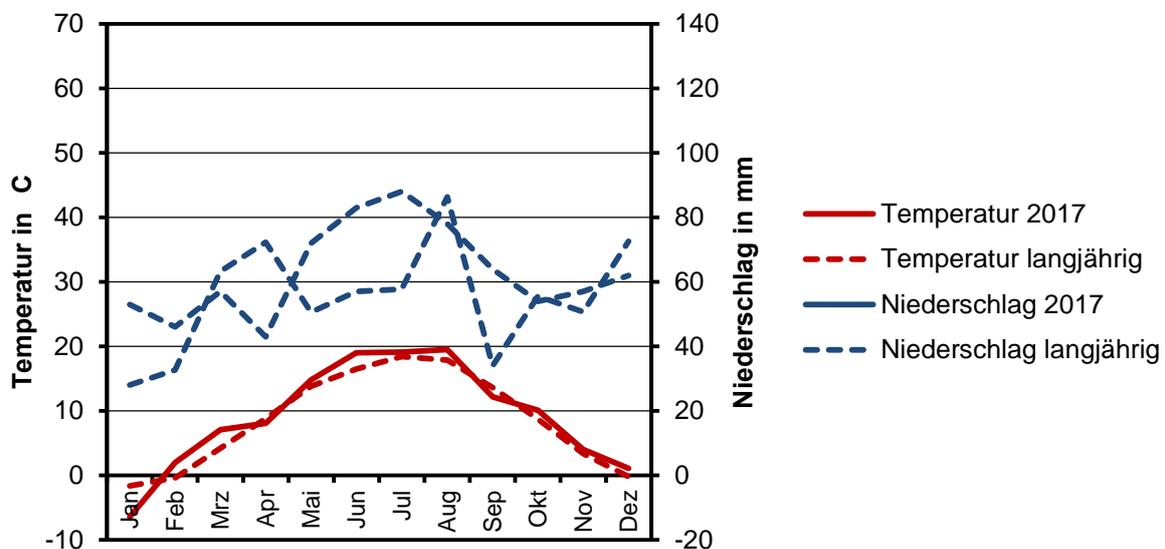


Abbildung 18: Witterungsverlauf im Jahr 2017 am Standort Fischerdorf im Vergleich zum langjährigen Mittel (ökologisches Klimadiagramm nach Walter und Lieth)

Über begleitende Bonituren ausgewählter phänotypischer und agronomischer Merkmale wurde die Identität der Akzessionen sichergestellt. Die absoluten Ertragszahlen machen deutlich, dass das Ertragspotenzial unter den gegebenen Bedingungen bei Weitem nicht ausgeschöpft werden konnte.

Die statistische Auswertung der Gitteranlage der frühen und mittelfrühen Akzessionen (**Abbildung 19**) offenbarte eine große Variabilität zwischen ihnen. Zwar war keine signifikant besser (bei $p \leq 0,05$) als die Referenzsorte Boregine, dafür gab es signifikante Unterschiede zur Boruta (Akzessionen 47-2, 64-1 und 66-2). Signifikant ertragsschwächer waren die Akzessionen 65-1 und 76-1. Hinsichtlich der Kleinkörnigkeit für potentielle Gründüngungssorten fielen mit signifikant niedrigerem TKM im Vergleich zur Boregine die Akzessionen 81-1 und 2, 76-1, 65-1 und 2, 51-1, 49-1 sowie 46-1 bis 3 auf. Signifikant kleiner als Boruta war keine, signifikant größer als diese die 25-1 und die 28-1.

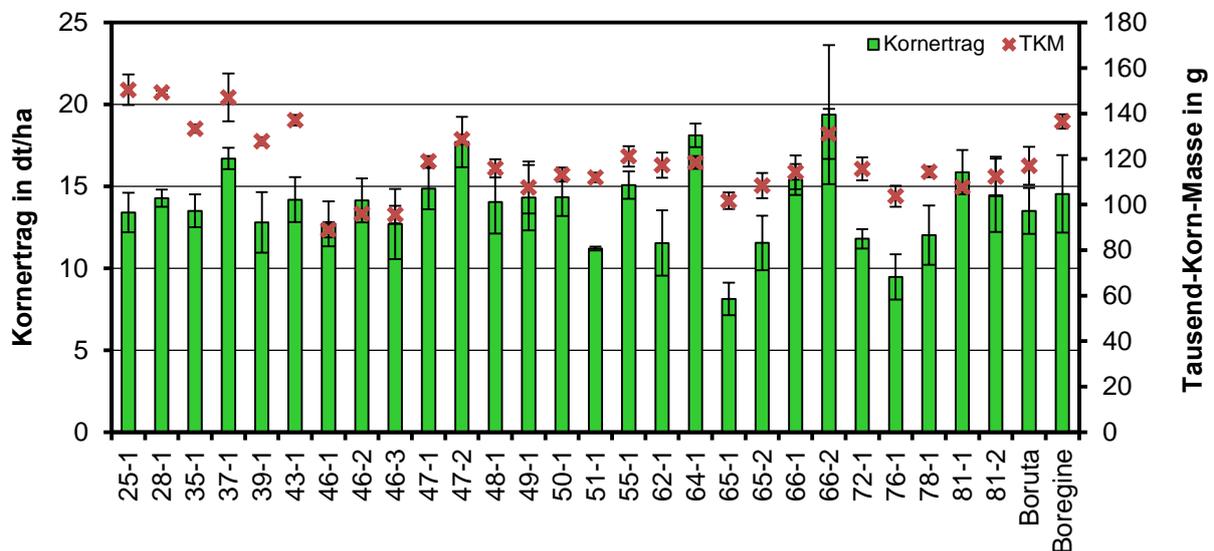


Abbildung 19: Kornertragsleistung der frühen und mittelfrühen Akzessionen im Parzellenversuch 2017

Viel deutlicher noch als auf das frühere Material wirkte sich die Trockenheit auf das spätere Material aus. Hier waren die Ertragsunterschiede zwischen den Varianten einer Akzession bereits so groß, dass kaum mehr signifikante Unterschiede zwischen den Akzessionen festgestellt werden konnten (**Abbildung 20**). Als besonders ertragsschwach erwiesen sich die Akzessionen 5-1, 45-1 und 59-1. Signifikant kleinere Körner als die Referenz Azuro hatten die 5-1, 9-1, 44-1, 54-1 und 2, 59-1 und 74-1. Die niedrige TKM ging dabei mit niedrigen Erträgen einher.

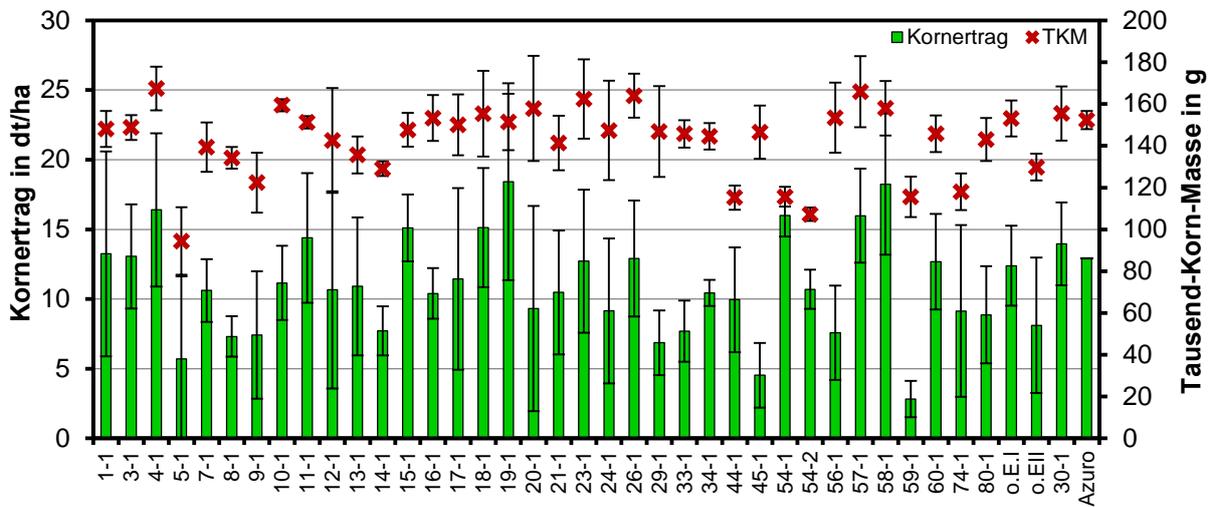


Abbildung 20: Kornertragsleistung der mittelspäten und späten Akzessionen im Parzellenversuch 2017

Als Indiz für die Gründungsleistung der Akzessionen wurde der in einem Parzellenversuch ermittelte Trockensubstanzertrag herangezogen (**Abbildung 21**). Verglichen mit der einzigen derzeit zum Zwecke der Gründung zugelassenen Sorte Azuro schnitten die Akzessionen 4-1, 13-1, 50-1 und 60-1 signifikant besser ab.

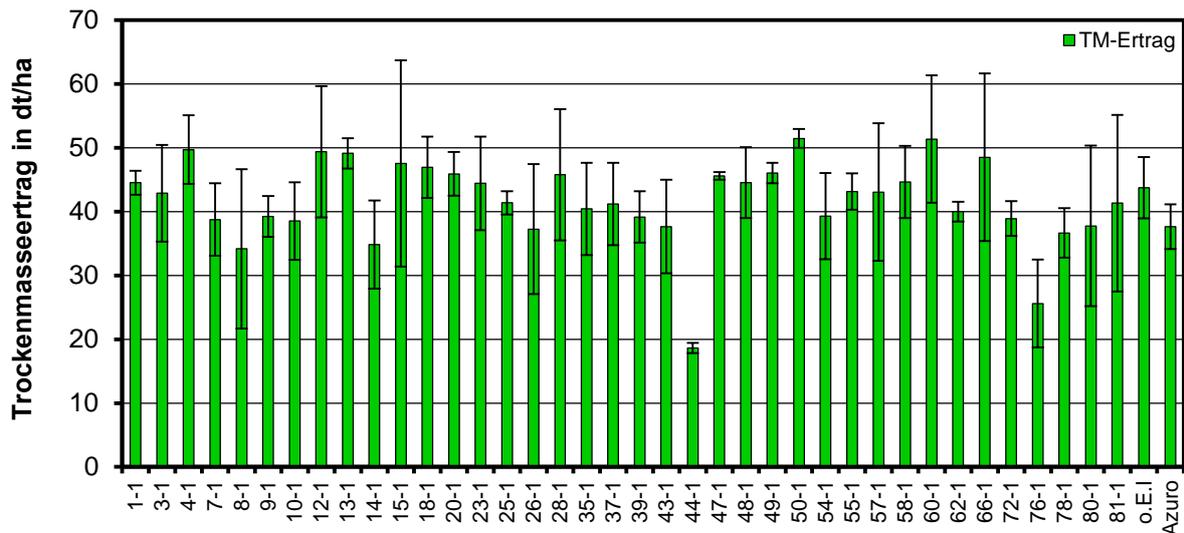


Abbildung 21: Grünmasseleistung ausgewählter Akzessionen im Parzellenversuch 2017

1.2.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen ESKUSA

Sowohl zwischen als auch innerhalb der Akzessionen der schmalblättrigen, bitteren Lupine des Vavilov-Institutes konnte eine große Variationsbreite in der Ausprägung agronomisch relevanter Merkmale nachgewiesen werden, die weit über die noch vorhandene Variabilität dieser Merkmale im Zuchtmaterial süßer Formen hinaus geht. Somit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass im bitteren Genpool der schmalblättrigen Lupine Merkmale vorhanden sind, die es lohnt züchterisch weiter zu verfolgen und auch in süße Formen einzukreuzen. In ihrer Leistung über die süßen Referenzsorten Boruta und Boregine herausragende bittere Akzessionen sind in **Tabelle 7** zusammengestellt.

Tabelle 7: Agronomisch interessante Akzessionen und aus deren Einzelpflanzen-nachkommenschaften hervorgegangene Linien

Merkmal	Akzession/ Linie	Referenz	
Kornertragsleistung	Linie 66-2 Linie 64-1	Abbildung 19	hohe Ertragsfähigkeit in allen drei Jahren bestätigt
Grünmasseleistung	LUPIZAV 4	Abbildung 21	ist als Gründüngungssorte angemeldet
Rohproteingehalt	Akzession 5	Abbildung 4	Ergebnis WWU
Methioningehalt	Akzession 40	Abbildung 3, Abbildung 5	Ergebnis WWU
pH-Neutralität	Linien von 46 Linien von 59	Abbildung 7, Abbildung 8, Tabelle 10	wird fortlaufend an pH-neutralen Standorten selektiert; auffällige Reaktionen in Pflanzen- und Bodenparametern bei Anbau auf Böden mit unterschiedlichem pH-Wert für Akzession 46 bestätigt durch UniRo
Standfestigkeit			ist fast immer gegeben; Negativauslese, wenn feststellbar
Platzfestigkeit der Hülsen	Linie 77.3 Linien von 68		Wird fortlaufend in Reihenanlagen selektiert
Saatgutqualität	Linien von 54 Linie 64-1		Sehr gut dreschbare Hülsen mit nahezu kugligen, weißen, optisch befallsfreien Körnern
Frühe Laub- und Strohreife	z.B. Linie 66-1		deutlich verlustärmere Ernte; wird fortlaufend in Reihenanlagen selektiert
Sehr gleichmäßige Abreife	Linie 44-1		wird fortlaufend in Reihenanlagen selektiert
Krankheitsanfälligkeit <i>V. dahliae</i> Anthraknose	z.B. Linien von 64 z.B. Linien von 58, 54 und LUPIZAV 4	Abbildung 16 Abbildung 17	wird fortlaufend in Reihenanlagen bonitiert, exakte Infektionsversuche erforderlich

Die im Projektantrag vorgesehenen Kreuzungsarbeiten wurden noch nicht durchgeführt, weil

- wegen der außerordentlich großen Variationsbreite von phänotypischen und Ertragsmerkmalen der in den Projektjahren selektierten Einzelpflanzennachkommenschaften (EPN) der Akzessionen zunächst die Verifizierung und Fixierung der interessanten Merkmale im Fokus stand. Ausreichend stabile EPN mit interessanten Merkmalen/ Merkmalskombinationen stehen nunmehr für die gezielte Kreuzung mit identifizierten hoch ertragreichen EPN zur Verfügung (**Tabelle 7**).
- ein dezidiertes, umfangreiches Kreuzungsprogramm in enger Absprache mit den Einrichtungen des LUPI-BREED Projektes aufgelegt wird, um die Ressourcen bündeln und effizienter und zielgerichteter nutzen zu können. Ein erster Materialaustausch ist hier bereits erfolgt.

Die Selektions- und Kreuzungsarbeiten im Sortiment der schmalblättrigen, bitteren Lupine werden von der ESKUSA GmbH über die Projektlaufzeit hinaus fortgeführt.

1.3 Durchgeführte Arbeiten der UniRo im Berichtszeitraum

1.3.1 Qualitätsanalyse der Rhizodeposition

Die Rhizodeposition dient als Indikator für das genotypspezifische Potenzial der Standortanpassung durch die Regulierung der Nährstoffmobilisierung und Toleranzspanne von unterschiedlichen pH-Werten des Bodens. Die Qualität der Rhizodeposition der Akzessionen wurde durch die chemische Analyse der Feinwurzelqualität ergänzt. Rhizodeposite und chemische Feinwurzelqualität wurden nach einer Wachstumsperiode von 4 Wochen untersucht, da die Nährstoffversorgung in dieser Entwicklungsphase einen besonders hohen Indikatorwert (stärkster Rhizosphäreneffekt, vgl. Boden vs. Rhizosphäre in BBCH 31, 53, 71 und höchste Besiedlungsdichte P-mobilisierender Bakterien) für die spätere Ertragsleistung besitzt.

Der Probenahmezeitpunkt wurde mit dem physiologischen Entwicklungsstadium der Akzessionen abgestimmt. Die Aktivitätsverläufe von hydrolytischen Enzymen und effizienten Vertretern der Rhizosphärenbakterien während des Wachstums sind beispielhaft in **Tabelle 8** und **Abbildung 22** bis **Abbildung 26** für die P-Mobilisierungsaktivität der Sorte Boruta dargestellt.

Tabelle 8: Aktivität der Phosphodiesterase (PDA), sauren Phosphatase (ACPA), alkalischen Phosphatase (ALPA), β -Glucosidase (BGA) und Besiedlungsdichte P-mobilisierender Bakterien (PBAC) in der Rhizosphäre von *L.angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71) gemessen an der Referenzsorte Boruta

BBCH	PDA	ACPA*	ALPA	BGA	PBAC*
31	8.43 b	841.80 a	8.5 b	10.75 b	16884557 a
53	19.50 a	783.39 a	20.5 a	20.50 a	10441179 ab
71	7.62 b	769.11 a	8.5 b	6.25 c	10441179 b

Mittelwerte (n=8) unterschiedliche Buchstaben in der gleichen Spalte stehen für signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) ermittelt mittels Kruskal-Wallis Test; * Tukey Test

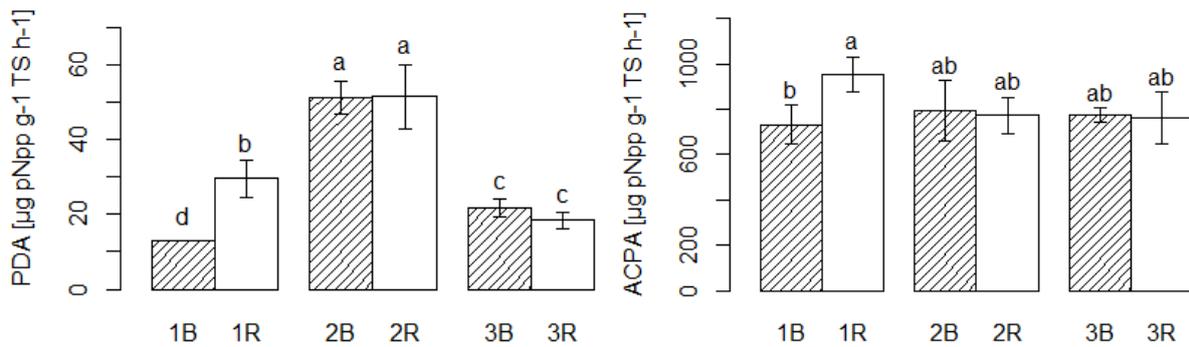


Abbildung 22: Aktivität der Phosphodiesterase (PDA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von *L. angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test

Abbildung 23: Aktivität der sauren Phosphatase (ACPA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von *L. angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test

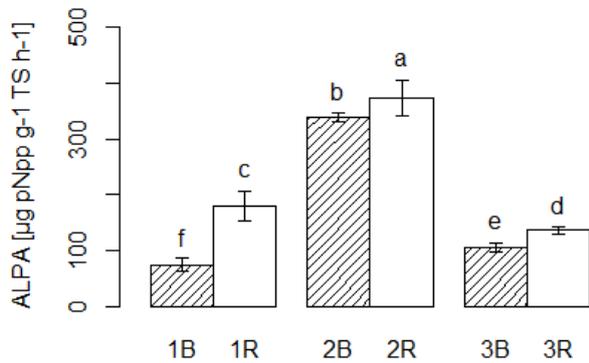


Abbildung 24: Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALPA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von *L. angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test

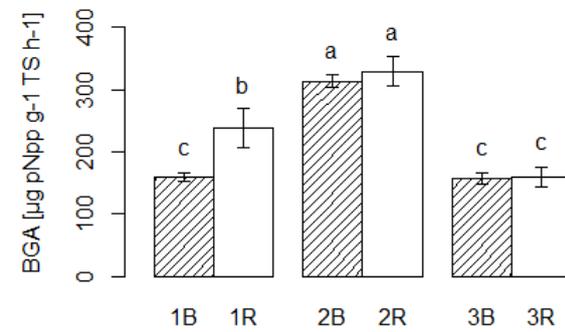


Abbildung 25: Aktivität der β -Glucosidase (BGA) [$\mu\text{g p-Nitrophenol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) von *L. angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test

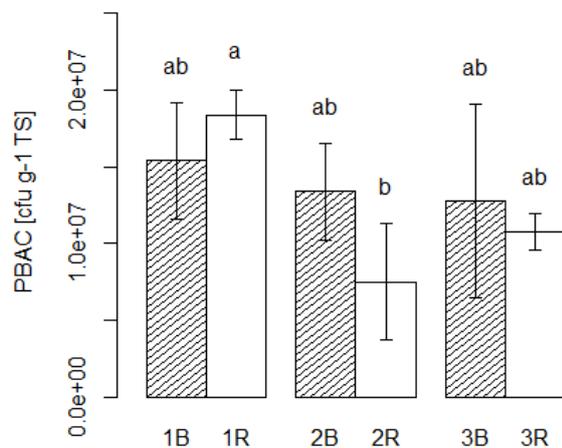


Abbildung 26: Kolonieformende Einheiten P-mobilisierender Bakterien (PBAC) [cfu g⁻¹ TS] im Boden (B) und in der Rhizosphäre (R) *L. angustifolius* (1= BBCH 31, 2=BBCH 53, 3= BBCH 71); unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0.05$) im Kruskal-Wallis Test

Fazit:

Die Bonitur von Wurzel- bzw. Rhizosphäreneigenschaften auf züchtungsrelevante Kriterien kann optimal bereits an Jungpflanzen (BBCH 31) durchgeführt werden, da dieser Zeitraum sowohl die höchste Relevanz für die künftige Ertragsbildung besitzt als auch die höchste Besiedlungsdichte rhizosphären-kompetenter Bakterien zur P-Mobilisierung als auch den ausgeprägtesten Rhizosphäreneffekt in der Nährstoffmobilisierung (Differenz von Rhizosphärenaktivität zum freien Boden, vgl. **Abbildung 22** bis **Abbildung 26**).

1.3.2 Molekular-chemisches Screening der Rhizodepositionen mit Py-FIMS (UniRo2)

Die molekular-chemische Analyse der Rhizodeposite mittels Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) ermöglicht die Selektion von Akzessionen mit einem hohen Nährstoffaneignungsvermögen (insbesondere der P-Mobilisierung), Trockenstresstoleranz und Toleranz von abiotischem Stress durch ungünstige pH-Werte des Bodens für das Wachstum von *L. angustifolius*. Die P-Mobilisierung im Boden wird durch die Abgabe von folgenden Komponenten der

Rhizodeposition direkt gefördert: Phosphatasen (zur Katalyse der P-Mobilisierung aus organischen Verbindungen) und Carboxylate (zur Mobilisierung von P aus mineralischen Bindungen mit Ca, Fe und Al). Die Rhizodepositionsqualität steht in enger Interaktion mit der Proteinbildung in Lupinen (Müller et al. 2015).

Für die qualitative Bewertung der Rhizodeposite werden sowohl die Anteile der Stoffklassen (**Tabelle 9**) als auch die Anteile von einzelnen Verbindungen mit Indikatorwert für die Regulierung der mikrobiellen Besiedlung und Nährstoffmobilisierung in der Rhizosphäre (**Abbildung 27**) genutzt. Hiermit erfolgte eine intra- (Akzessionen von *L. angustifolius* unterschiedlicher geographischer Herkünfte) und interspezifische (*L. angustifolius* vs. *L. atlanticus*) Differenzierung in der Gattung *Lupinus*. Die geographische Distanz der Herkunft der Akzessionen war hierbei kein Indikator des Ausmaßes an Unterschiedlichkeit der Qualität der Rhizodeposition (**Tabelle 9**). Daher konnte eine züchtungsrelevante nutzbare hohe Diversität der wurzelbezogenen Standortanpassung an ungünstige Bodenbedingungen bereits innerhalb einer Herkunft nachgewiesen werden.

Relevant für die Bonitur zur pH-Toleranz, Nährstoffmobilisierung und Beeinflussung der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft sind besonders die Stoffgruppen der Kohlenhydrate (EX1), Lignine (EX3), Lipide (EX4), Sterole (EX7) und Suberine (EX9). Hohe Kohlenhydratverfügbarkeit (EX1) in der Rhizosphäre fördert die mikrobielle Aktivität und die Attraktivität des Wurzelraumes für die Besiedlung assoziierter Mikroorganismen, ist zugleich ein Indikator eines hohen Energiebedarfes für die Nährstoffbereitstellung der Pflanze (Müller et al. 2015). Dies wurde insbesondere für die Akzession-Nummer 22 und 63 nachgewiesen (ca. doppelt so hoch wie in der Kontrollsorte Boruta). Die Kontrollsorte Boruta wies hierbei eine geringe Kohlenhydratverfügbarkeit in der Rhizodeposition auf, die im Niveau der artspezifischen Qualität von *L. atlanticus* entsprach, während die Mehrheit aller *L. angustifolius* Akzessionen eine deutlich höhere Kohlenhydratverfügbarkeit in der Rhizodeposition aufweisen und damit eine erhöhte potenzielle Attraktivität für die mikrobielle Rhizosphärenbesiedlung besitzen. Die Ligninkonzentrationen der Rhizodeposition der getesteten Akzessionen liegen im Mittel unter den Anteilen der Kontrollsorte Boruta (A22, A37 und A63 ca. die halbe Konzentration von Boruta). Ligninabstoßungen in den Wurzelraum sind Indikatoren von Wurzelalterung und geringer mikrobieller Abbaubarkeit. A37 wies zugleich mit einem signifikant geringeren Ligninanteil in der Rhizodeposition ein signifikant erhöhtes Ertragsniveau als die Vergleichssorte Boruta im Feldversuch des Projektpartners ESKUSA auf (vgl. **Abbildung 19**).

Tabelle 9: Molekularchemische Zusammensetzung der Rhizodeposition von Akzessionen (A.) von *L. angustifolius* und *L. atlanticus* gemessen mittels Py-FIMS (% von TII)

	EX1	EX2	EX3	EX4	EX5	EX6	EX7	EX8	EX9	EX10	EX11	EX12	VM
<i>L. angustifolius</i>													
Boruta	2.6	4.6	1.8	4.7	8.1	1.7	1.9	5.7	0.1	12.2	2.7	14.3	57.9
A. 1	5.1	6.4	1.3	3.9	8.9	2.2	1.1	7.4	0.1	13.0	3.0	15.9	84.2
A. 22	7.1	7.4	0.9	3.6	6.9	3.2	1.1	12.8	0.0	13.7	4.7	11.7	79.3
A. 25	2.7	6.1	1.6	4.9	9.0	2.1	1.3	4.7	0.4	4.7	1.8	20.5	88.8
A. 26	4.4	6.2	1.3	3.2	7.9	3.0	0.8	5.7	0.2	4.1	3.9	19.0	69.7
A. 27	4.1	4.4	1.7	4.5	10.8	3.8	1.4	5.2	0.3	10.1	0.4	20.1	77.5
A. 28	4.0	5.5	1.5	3.9	6.1	2.2	1.1	7.1	0.2	9.1	5.9	14.4	96.7
A. 37	4.4	6.9	0.7	3.7	8.2	3.5	0.8	6.4	0.1	5.2	2.4	21.2	79.5
A. 38	3.8	7.4	1.6	3.6	8.6	3.2	0.6	6.2	0.1	3.9	4.0	19.2	95.0
A. 46	2.9	6.0	2.1	5.0	10.5	2.8	1.2	9.1	0.1	3.3	2.2	14.8	85.2
A. 59	1.2	3.2	2.3	5.8	8.5	0.7	2.9	2.6	0.3	5.1	0.7	17.0	27.1
A. 63	6.1	7.2	0.8	3.4	7.1	3.2	1.0	8.9	0.1	12.8	3.5	14.4	69.2
A. 73	1.8	4.1	1.5	6.2	11.9	1.2	2.9	3.5	0.2	8.6	1.7	17.3	34.1
A. 76	2.6	7.2	1.4	6.6	11.7	2.1	3.3	4.6	0.1	7.2	1.6	15.0	24.7
A. 77	3.5	5.0	1.3	3.9	5.9	2.2	0.9	6.1	0.1	15.5	3.7	14.3	63.2
A. 81	1.3	2.9	2.3	4.5	6.9	0.7	3.3	2.3	0.4	5.1	1.0	17.6	76.5
<i>L. atlanticus</i>													
L5152	1.6	5.0	2.4	5.2	8.5	1.3	1.5	3.3	0.2	4.8	1.1	17.5	47.8
L5156	2.5	6.0	0.9	5.0	13.3	1.9	1.5	5.4	0.2	5.0	1.0	19.4	48.0
L5157	2.5	5.7	1.1	4.9	10.4	1.5	1.5	3.8	0.2	10.8	1.0	16.4	60.0
L5166	1.2	3.5	2.4	5.3	10.9	1.8	1.2	3.0	0.2	2.2	0.2	20.0	65.5
Artsp.													

Legende:

Höchste intraspezifische Diversität (*L. angustifolius*) zur Sorte Boruta

Artsp.: artspezifische Unterschiede

TII: Totale Ionenintensität

EX1: Kohlenhydrate

EX2: Phenole + Ligninmonomere

EX3: Lignindimere

EX4: Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren, n-Alkylester

EX5: Alkylaromaten

EX6: Heterozyklische Stickstoffverbindungen und Nitrile

EX7: Sterole
EX8: Amide (Aminosäuren, Peptide und Aminozucker)
EX9: Suberine
EX10: Freie Fettsäuren C16 bis C34
EX11: m/z 15..56
EX12: M+H and 13C peaks
VM: volatiler Anteil

Für die Bonitur der Rhizodeposite und als Indikatoren der Ertragsbildung im Feld dienen weiterhin Komponenten der Rhizodeposite mit hemmender Wirkung auf die enzymatische Nährstoffmobilisierung und die mikrobielle Aktivität in der Rhizosphäre (**Abbildung 27**).

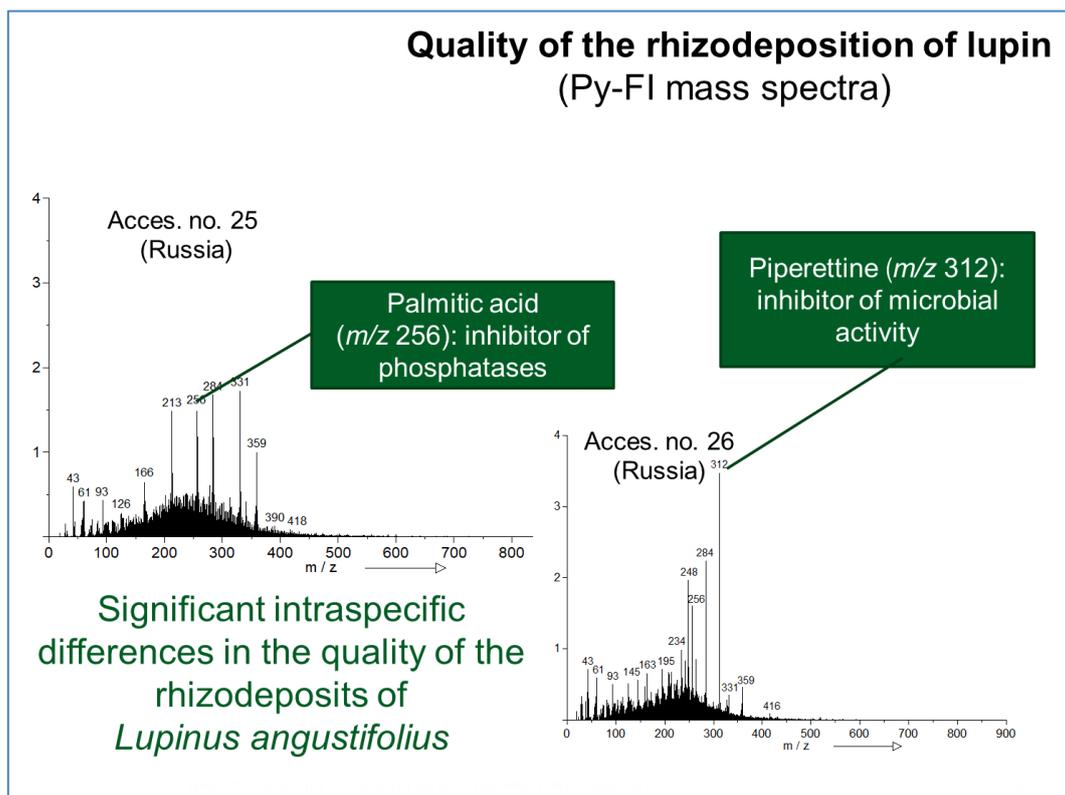


Abbildung 27: Ausgewählte Indikatorkomponenten für die Bonitur der Rhizodeposition als Kontrolle der Standortanpassung und Nährstoffmobilisierung (Baum et al. 2017, Berlin BonaRes Workshop)

Fazit:

Die Bewertung der Qualität der Rhizodeposition von *L. angustifolius* ermöglicht eine frühe Bonitur von Akzessionen von *L. angustifolius* nach einer 3 wöchiger Wachstumsperiode im Gefäßversuch mit hoher Aussagekraft für die potenzielle Ertragsfähigkeit und Standortanpassung im Feld (**Abbildung 28**).

Hierbei wurden ursächlich die Anteile folgender Stoffgruppen als summarische Parameter mit Indikatorfunktion ausgewiesen:

- 1) Kohlenhydrate (hohe Konzentrationen als Indikator erhöhter Rhizosphärenattraktivität für assoziierte Mikroorganismen, Rhizosphärenbakterien zur P-Mobilisierung und *Bradyrhizobium* spp. zur Knöllchenformung und N-Fixierung,
- 2) Lignine (geringe Konzentrationen als Indikatoren erhöhter Wurzelvitalität und verlangsamer Wurzelalterung und Zellabstoßung)
- 3) Suberine (erhöhte Anteile als Indikatoren von Hemmung mikrobieller Aktivität in der Rhizosphäre und verringerter Neigung zur Knöllchenbildung bzw. N-Fixierung)

Einzelne Verbindungen mit mikrobiell oder enzymatisch hemmender Wirkung (**Abbildung 27**), besitzen nur bei einzelnen Akzessionen eine herausragende Bedeutung und können zur Spezifizierung der Rhizosphärenqualität von ausgewählten Akzessionen herangezogen werden. Hierzu gehört auch die vereinzelt ausgeprägte (z.B. A46) und allgemein eher geringe Rhizodeposition von Alkaloiden auch aus alkaloidreichen (bitteren) Genotypen.

1.3.3 Akzessionsspezifische Besiedlung der Wurzeln mit Mykorrhizapilzen und Bakterien (UniRo3 und 4)

Zur Erfassung der wichtigsten mikrobiellen Einflüsse auf die P-Versorgung der Akzessionen wurde die Mykorrhizierungsneigung der Genotypen erfasst und die Besiedlungsdichte von P-mobilisierenden Bakterien in der Rhizosphäre bei Anzucht in einem P-defizienten Testboden. Mikrobielle Parameter und Rhizodepositionsqualität wurden auf Korrelationen überprüft und über multivariate Statistik bewertet. Die Auswertung erfolgte im Rahmen einer studentischen Abschlussarbeit (Bachelorarbeit) von Frau L.-M. Schwinkendorf (**Tabelle 11**). Alle geprüften Akzessionen wiesen keine ernährungsrelevante Mykorrhizierungsneigung (mykorrhizierte Wurzellänge $\leq 2\%$) auf, jedoch signifikante Unterschiede in der in der mikrobiellen Rhizosphärenqualität. Die mikrobielle Aktivität in

der Rhizosphäre (bakterielle und saprotrophisch-pilzliche P-Mobilisierung) wurde daher in die weitere Bonitur als Parameter aufgenommen, während die Mykorrhizierung als Merkmal nicht zur weiteren Bonitur herangezogen wurde. Zu den P-mobilisierenden Bakterien zählen auch die zur symbiontischen N-Fixierung assoziierten Bradyrhizobien (Grafe et al. 2018).

Fazit:

Erhöhte Mykorrhizierungsneigung konnte in keiner der getesteten Akzessionen nachgewiesen werden. Hingegen konnte eine signifikante Differenzierung der mikrobiellen Förderung von wachstumsfördernden Bodenmikroorganismen (inklusive von Bradyrhizobien als Symbionten zur N-Fixierung) als aussichtsreiches Selektionskriterium für eine erfolgreiche Anpassung an abiotischen Stress im Wurzelraum nachgewiesen werden.

1.3.4 Selektion komplementärer Analytik und Datenanalyse (UniRo5 und 6)

Die Qualitätsanalyse der Rhizodeposition wurde zur Validierung ergänzt um die Untersuchung weitere Pflanzenparameter, die frühe Indikatoren von Nährstoffmangel darstellen (Funayama-Noguchi et al. 2015). Hierfür erfolgte die Aufzucht der Testpflanzen im Gefäßversuch in P-defizienten Böden ungünstiger pH-Bereiche (5 und 8; unterhalb und weit über dem Bereich der Anbauempfehlung).

Die Akzessionen 22 und 46 erwiesen sich auf dem alkalischen Boden als leistungsstärkste Vertreter; auf dem sauren Boden Akzession 22 aus Sicht der Pflanzenparameter und Akzession 77 aus Sicht der Boden- bzw. Rhizosphärenparameter (Quelle: T.-H. Ladach, 2016; Masterarbeit, Universität Rostock, Math.-Nat. Fakultät, Studiengang Funktionelle Pflanzenwissenschaften, vgl. **Tabelle 11**).

Tabelle 10: Bonitur von 8 Akzessionen und der Sorte Boruta als Kontrolle auf zwei Böden mit ungünstigen pH-Werten (5 und 8) nach 3 Wochen Wachstum im Gefäßversuch (Pflanzen- und Rhizosphärenparameter)

Boden A (pH 8)

	Akzession										Unbe- pflanz	A vs B
	Boruta	1	6	22	27	28	46	63	77			
Pflanzenparameter												
BBCH-Code	0	-	0	++	0	0	+	0	+			0
Wurzellänge	--	-	0	+	0	+	++	-	0			-
Wurzelgewicht	0	--	-	++	-	+	0	++	0			-
Sprosslänge	-	--	0	++	-	0	+	0	+			-
Sprossgewicht	0	--	-	++	-	+	0	0	+			-
Anzahl Seiten- wurzeln	0	-	++	0	--	+	0	+	--			+
Blattpigmentkonz.:												
Chl. A	0	0	-	+	--	-	++	0	+			-
Chl. B	0	-	0	0	--	-	++	+	+			-
Carotine	-	++	+	0	--	-	+	0	0			-
Bodenparameter (Rhizosphäre)												
pH	+	--	0	-	0	++	0	+	-	+	+	+
Phosphatase	++	-	-	0	+	0	+	0	--	+	-	-
beta-Glucosidase	0	-	+	++	--	0	-	+	0	+	-	-
freies P	+	-	++	0	-	--	+	0	0	+	+	+

Boden B (pH 5)

	Akzession										Unbe- pflanz	A vs B
	Boruta	1	6	22	27	28	46	63	77			
Pflanzenparameter												
BBCH-Code	+	0	0	++	0	0	0	+	0			0
Wurzellänge	0	+	-	++	+	-	0	--	0			+
Wurzelgewicht	+	0	--	++	+	0	0	-	-			+
Sprosslänge	-	0	+	++	--	+	-	0	0			+
Sprossgewicht	++	0	0	+	0	+	-	-	--			+
Anzahl Seiten- wurzeln												
Blattpigmentkonz.:	++	-	0	+	0	0	-	+	--			-
Chl. A	+	0	0	0	--	-	-	++	+			+
Chl. B	+	0	0	0	--	-	-	++	+			+
Carotine	0	0	+	-	--	-	0	++	+			+
Bodenparameter (Rhizosphäre)												
pH	++	-	0	+	0	+	-	--	0	--	-	-
Phosphatase	+	--	0	0	-	+	-	0	++	+	+	+
beta-Glucosidase	0	+	0	-	+	-	--	0	++	0	+	+
freies P	0	++	+	0	0	-	-	--	+	+	-	-

Legende:

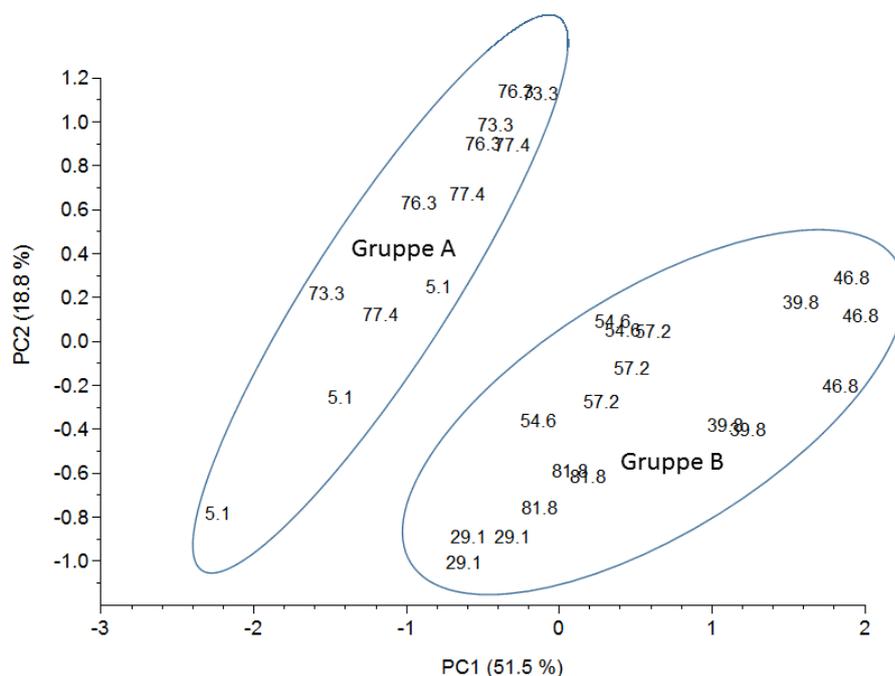
++ höchster Wert
+ die 3 höchsten Werte

0 Mittelfeld
- die 3 geringsten Werte
-- geringster Wert

Die rhizosphärenchemische Qualität der Akzessionen im Gefäßversuch erwies sich als geeigneter Indikator, um das Ertragspotenzial im Feld zu prognostizieren (**Abbildung 28**). Sie führte summarisch zu einer klaren Trennung von ertragreichen und ertragsschwachen Akzessionen im Feldanbau (Vergleich zu den Feldversuchsergebnissen von Projektpartner ESKUSA). Gleichzeitig kann eine differenzierte Anbauempfehlung von ausgewählten Akzessionen für pH-Bereiche außerhalb des empfohlenen Anbauspektrums der Schmalblättrigen Lupine erfolgen (**Tabelle 10**).

Die getesteten Akzessionen unterscheiden sich signifikant in ihrer Regulierung des Rhizosphären pH-Wertes als Kontrolle der Nährstoffverfügbarkeit in der Rhizosphäre. Dies erklärt sich anteilig durch die spezifische Deposition z.B. von Carbonsäuren und ebenfalls durch die Bildung von Kohlensäure infolge der spezifischen Atmungsaktivität in der Rhizosphäre.

Daher kommt der Regulierung der mikrobiellen Aktivität durch die Qualität der Rhizodeposition und auch der Wurzelstreu im Rahmen der Feinwurzelumsetzungen eine wesentliche Funktion bei der Standortanpassung zu.



Principal component analysis of Py-FIMS spectra (m/z 15...900).

Abbildung 28: Rhizosphärenchemische Differenzierung der Akzessionen im Gefäßversuch und Differenzierung nach ihrer Ertragsleistung (Einzelpflanzenenertrag) im Feld: Gruppe A: Akzessionen mit geringem Einzelpflanzenenertrag im Feld; Gruppe B: mit hohem Einzelpflanzenenertrag im Feld (vgl. Ergebnisse Kooperationspartner ESKUSA GmbH,) (n = 3)

Fazit:

Die Qualität der Rhizodeposition hat sich als ein geeigneter Indikator für eine frühe Abschätzung des Ertragspotenzials und der Fähigkeit zur Standortanpassung von *L. angustifolius* erwiesen. Die Wirkung der chemische Qualität der Rhizodeposition erklärt sich über ihre Eignung zur mikrobiellen Umsetzung und der sich daraus ergebenden mikrobiellen Nährstoffmobilisierung (P) bzw. Nährstofffixierung (N). Ausgewählte qualitative Parameter (Ligningehalt, Suberingehalt) sind gleichzeitig bekannte Kontrollgrößen physikalischer Eigenschaften.

Daher sollten Folgeuntersuchungen klären, ob z.B. einfache Schnelltests zur Rissfestigkeit (Lignin) oder zur Hydrophobizität (Suberin) umfangreichere und arbeitsintensive Analysen im Züchtungsverlauf ersetzen können, um einen erhöhten Probendurchsatz bei geringem Kosten- und Arbeitsaufwand zu ermöglichen.

Quellen:

Grafe, M.; Goers, M.; von Tucher, S.; Baum, C.; Zimmer, D.; Leinweber, P.; Vestergaard, G., Kublik, S.; Schloter, M.; Schulz, S. (2018): Bacterial potentials for uptake, solubilization and mineralization of extracellular phosphorus in agricultural soils are highly stable under different fertilization regimes. *Environmental Microbiology Reports*, DOI: 10.1111/1758-2229.12651

Funayama-Noguchi, S., Noguchi, K., Terashima, I. (2015): Comparison of the response to phosphorus deficiency in two lupin species, *Lupinus albus* and *L. angustifolius*, with contrasting root morphology. *Plant, Cell and Environment* 38, 399-410.

Müller, J., Gödde, V., Niehaus, K., Zörb, C. (2015): Metabolic adaptation of white lupin roots and shoots under phosphorus deficiency. *Frontiers in Plant Science* 6, Article 1014.

1.4 Veröffentlichung von Projektergebnissen

Die Einreichung einer Publikation zur Bedeutung der Qualität von Rhizodeposition und Feinwurzelszusammensetzung von *Lupinus angustifolius* als Indikatoren der Nährstoffmobilisierung und Standortanpassung erfolgt 2018 (Arbeitstitel: „Intraspecific diversity of the chemical quality of rhizodeposition and fine roots of *Lupinus angustifolius*“).

ESKUSA GmbH
FKZ: 2814EPS036

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institut für Biologie und Biotechnologie
der Pflanzen
FKZ: 2814EPS037

Universität Rostock
Institut für Landnutzung
Bodenkunde
FKZ: 2814 EPS038

Im Rahmen des Projektes LupiZAV sind an der Universität Rostock unter Betreuung von C. Baum drei Bachelor- und zwei Masterarbeiten verfasst worden (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Projektrelevante Bachelor- und Masterarbeiten an der Universität Rostock

Jahr	Abschluss	Thema	Bearbeiter
2017	Bachelor	Inter- und intraspezifische Diversität der Wurzelentwicklung und Rhizosphärenaktivität von <i>Lupinus pilosus</i> L. und <i>L. angustifolius</i> L. in P-defizientem Boden	Kollar, Fabian
2017	Master	Genotypspezifische Wurzelqualität von <i>Lupinus angustifolius</i> und ihre Bedeutung für die Ertragsbildung auf Böden mit einem neutralen pH-Wert	Christiansen, Florence
2016	Master	Intraspezifische Diversität der pH-Toleranz von <i>Lupinus angustifolius</i> L.	Ladach, Tim-Hendrik
2016	Bachelor	Intraspezifische Diversität der Rhizosphärenwirkung von <i>Lupinus angustifolius</i> L. auf die mikrobielle Aktivität im Boden	Schwinkendorf, Lisa-Marie
2015	Bachelor	Selektion von Akzessionen der Schmalblättrigen Lupine (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) auf eine hohe P-Mobilisierungsfähigkeit in der Rhizosphäre	Vitow, Nora

Die Präsentation der Ergebnisse zur Rhizosphärenqualität der getesteten Akzessionen wurde in drei gemeinsamen Tagungsbeiträgen präsentiert:

- (1) **Poster auf dem Internationalen Phosphor Workshop in Rostock (2016):** Intraspecific diversity of the rhizodeposition of *Lupinus angustifolius* L. regarding the phosphorus mobilization in the soil (Baum, Prüfer und Eickmeyer).
- (2) **Vortrag auf der Jahrestagung der DBG in Göttingen (2017):** Kommission III / Thema 5 (Biogeochemische Hotspots im Boden) Autoren: Baum, C.(Rostock), Eckhardt, K.-U., Eickmeyer, F., Prüfer, D., Leinweber, P., Präsentationsthema: Intraspezifische Diversität der Zusammensetzung von Wurzeln und Rhizodeposition von *Lupinus angustifolius* L. mit ihrer Bedeutung für die P-Mobilisierung im Boden
- (3) **Vortrag auf dem BonaRes Workshop in Berlin (2018):** Intraspecific variability of the quality of the rhizodeposition of *Lupinus angustifolius* L. for P-mobilization in the soil. Autoren: Baum, C.(Rostock), Eckhardt, K.-U., Eickmeyer, F., Prüfer, D., Leinweber, P.

2 Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung

2.1 Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung

Die Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanungen sind eingehalten worden. Die Gelder sind sparsam und effizient eingesetzt worden. Lediglich die während der Projektlaufzeit geplanten Kreuzungen zum Aufbau weiteren Materials sind bis zum Berichtstermin noch nicht durchgeführt worden, da erst in der Saison 2018 die interessanten agronomischen Eigenschaften verifiziert und fixiert werden konnten. Die geplanten Kreuzungen werden im Anschluss an das Projekt durchgeführt und das daraus resultierende Zuchtmaterial wird weiter verfolgt werden.

2.2 Für den Berichtszeitraum relevante Meilensteine

Meilenstein	Arbeitspakete		
M1	ESKUSA1	Alle Akzessionen sind isoliert vermehrt und phänotypisch charakterisiert. Ausreichend Saatgut für parallele Reihenanlagen ist vorhanden.	ja
M2	WWU1	Die Sequenzen der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels in <i>Lupinus angustifolius</i> sind ermittelt.	ja
M3	UniRo1	Unterschiede in der Rhizodeposition von Leitsubstanzen für alle Genotypen sind erfasst. Genotypen mit hoher P-Mobilisierungsleistung wurden selektiert.	ja
M4	ESKUSa2	Kornerträge der parallelen Reihenanlagen sind ermittelt. Isolierte Saatgutvermehrungspartellen sind beerntet worden. Ausreichend Saatgut für mehrortige Ertragsprüfungen ist vorhanden.	ja
M5	WWU2	Die Vergleiche der Expressionsraten von Lupinus Genotypen sind abgeschlossen.	ja
M6	UniRo2	Die Rhizodeposite der selektierten Genotypen sind molekularchemisch erfasst.	ja
M7	ESKUSA3	Ertragsprüfungen sind abgeschlossen. Kreuzungen sind durchgeführt.	ja nein
M8	WWU3	Einflüsse der Rhizosphären-Diversität auf die Genexpression der Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels sind erfasst und beschrieben (ergebnisoffen).	ja
M9	UniRo3	Die Interaktionen von Genotyp x Boden bezüglich der Qualität der Rhizodeposition, der P-Mobilisierungsleistung durch die Pflanzen und der spezifischen Rhizosphärenmikroflora und Knöllchenbildung durch Rhizobien sind erfasst.	ja
M10	ESKUSA4	Rückkreuzungen sind durchgeführt. BC1-Material liegt zur weiteren Bearbeitung vor.	nein

3 Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?

Nein

4 Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren?

Für den Projektpartner WWU:

- Veröffentlichung einer weiteren Genomsequenzierung von *L. angustifolius* (Hane *et al.*, 2016)
- Veröffentlichung der Analyse von potentiell geeigneten Haushaltsgenen für die geplanten Real-Time PCR Analysen (Taylor *et al.*, 2016)

5 Waren Änderungen in der Zielsetzung notwendig?

M2: Anstelle der Analyse der Homologe von LaMS und LaSAMS als Schlüsselgene des Methioninstoffwechsels wurde das Arbeitsprogramm in Absprache mit den Projektpartnern auf die weitaus vielversprechende Option der molekularen Charakterisierung von Homologen der Speicherproteingene, die für Proteine mit einem hohen Methioningehalt kodieren, abgeändert (**Abschnitt 1.1.1**).

M7: Aufgrund der noch sehr hohen Anzahl ertragsprüfwerter Akzessionen wurde der zweite Standort zugunsten einer mehrfachen Wiederholung an einem einzigen Standort in 2017 nicht angelegt. Bei zwei Standorten hätte zudem das Saatgut vieler Linien nicht für eine zweite Wiederholung ausgereicht. Dafür wurden in 2017 zwei getrennte Parzellenprüfungen mit unterschiedlichen Reifegruppen an einem Standort durchgeführt. Die Aussagen hinsichtlich des Ertragspotenzials der bitteren Akzessionen können so reifegruppenspezifischer getroffen werden. Zusätzlich wurde an einem Standort im Vorderen Bayrischen Wald ein Parzellenversuch zur Gründungsleistung angelegt und ausgewertet (**Abschnitt 1.2.3.5**).

M7/M10: Wegen der ausserordentlich großen Variationsbreite von phänotypischen und Ertragsmerkmalen der Einzelpflanzennachkommenschaften (EPN) der Akzessionen aus dem Jahr 2015 stand zunächst die Verifizierung und Fixierung der interessanten Merkmale im Fokus.

Ausreichend stabile EPN mit interessanten Merkmalen/Merkmal kombinationen stehen nunmehr für die gezielte Kreuzung mit identifizierten hoch ertragreichen EPN zur Verfügung.

M8: Es wurde der Fokus darauf gelegt, die erzielten Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR sowie der Methioninanalytik für die zuvor untersuchten Akzessionen zu verifizieren und das züchterische Potential dieser Akzessionen eingehender zu untersuchen. In Absprache mit den Projektpartnern und dem Projektträger (Projekttreffen JKI Groß Lüsewitz, Oktober 2017) wurde somit nicht, wie ursprünglich geplant, Bezug zu Akzessionen genommen, die sich hinsichtlich ihrer Rhizosphären-Diversität als interessant erwiesen hatten.

6 Fortschreibung des Verwertungsplans

6.1 Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten

Eine Sortenanmeldung einer bitteren Akzession (LupiZAV4) ist zur Prüfung auf Gründüngungseignung im Herbst 2017 beim Bundessortenamt erfolgt. Zum Berichtszeitpunkt gibt es bei dieser Akzession bisher keine negativen Auffälligkeiten in der Registerprüfung auf Homogenität und Unterscheidbarkeit. Eine mögliche Sorteneintragung könnte im Frühjahr 2020 erfolgen. Eine große Saatenhandelsfirma hat Interesse an der Produktion und Vermarktung dieser Sorte nach Eintragung signalisiert.

6.2 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Merkmale Methioningehalt und Rhizodeposition zielen auf eine höhere Proteinwertigkeit von Lupinensorten sowie auf eine bessere Anpassungsfähigkeit. Eine Nachfrage nach einheimisch erzeugten Eiweißpflanzen im Tierfutterbereich inkl. Aquakultur sowie im Food-Bereich (Prolupin) ist prinzipiell bereits vorhanden. Ein höherwertiges Lupinenprotein könnte insbesondere in der Futtermittelindustrie höhere Preise erzielen und eine bessere Konkurrenzfähigkeit des Lupinenproteins im Vergleich zu (importiertem) Soja- und Raps-Extraktionsschrot darstellen. Bessere Anpassungsfähigkeit würde Kornerträge sicherer machen und in Verbindung mit

höheren Preisen für Lupinenkörner eine höhere Akzeptanz bei den Landwirten hervorrufen. Außerdem werden Stickstoffbereitstellung und Phosphataufschluss zukünftig in der ökonomischen Bewertung von Fruchtfolgen einen höheren Stellenwert einnehmen als bisher und zu einer erhöhten Vorzüglichkeit von Leguminosen gegenüber nicht legumen Kulturarten führen. Für qualitativ hochwertige und besser angepasste Lupinensorten mit sicheren Erträgen wird aus den oben genannten Gründen zukünftig ein hohes Anbaupotenzial erwartet. Neben den bisherigen Einsatzgebieten in Futtermittel- und Lebensmittelindustrie verfolgt die ESKUSA GmbH Einsatzgebiete von Lupinenprotein im Non Food-Bereich und beabsichtigt dafür möglichst schnell eigene Sorten zu entwickeln und in die Produktion zu bringen (Zeithorizont bis zur Sortenanmeldung: 3-4 Jahre nach Abschluss des Projektes).

6.3 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Im Bereich der molekularbiologischen Forschung werden die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten vor allem in der erstmaligen funktionellen Charakterisierung der Schlüsselgene des Methionin-Stoffwechsels in Lupinen gesehen. In den vom Vavilov Institut der Pflanzenindustrie zur Verfügung gestellten Akzessionen konnten zusätzliche interessante Phänotypen/Genotypen gefunden werden, die neue und wertvolle Eigenschaften aus agronomischer Sicht aufweisen. Es ist geplant, die gewonnenen Ergebnisse in international renommierten Fachzeitschriften zu veröffentlichen und als Grundlage weiterer Zusammenarbeiten in der Entwicklung verbesserter Lupinensorten zwischen den Partnern und darüber hinaus zu nutzen.

Das im beantragten Projekt entstandene Pflanzenmaterial wird voraussichtlich für die direkte Sortenzulassung im Lebens- und Futtermittelbereich aufgrund zu hoher Alkaloidgehalte noch keinen Sortencharakter besitzen. Es ist vielmehr als Prebreeding-Material mit verbesserten Merkmalen anzusehen und wird als solches in aktuelle Zuchtprogramme einfließen können. Dafür wurde eine Zusammenarbeit mit dem JKI und einem etablierten Süßlupinenzüchter vereinbart, um die gefundenen Merkmale auch für Süßlupinensorten zugänglich zu machen. Besteht dort kein Interesse an dem Pflanzenmaterial ist ESKUSA bereit, das erstellte Material eigenständig bis zur Sorteneintragung und anschließenden Vermarktung weiter zu entwickeln.

Darüber hinaus hat sich aus einem Kontakt mit dem Lebensmitteltechnologe Gerhard Kloth (LupinoAG) ein interessanter Ansatz zur Entbitterung alkaloidreicher Lupinen ergeben. Dieser Ansatz ist in eine Projektskizze eingeflossen, die in der Ausschreibung „Deutschland - Land mit Genuss“ eingereicht wurde. Eine technische Entbitterung könnte die ausschließliche Verwendung

alkaloidarmer Sorten für den Futtermittel- und Lebensmittelbereich u.U. aufheben, so dass das im hier berichteten Projekt verwendete, bittere Pflanzenmaterial auch direkt in den Sektoren food und feed Verwendung finden könnte.

6.4 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit des Vorhabens liegt im Erkenntnisgewinn über die molekularen Grundlagen des Methionin-Stoffwechsels in Lupinen. Die detaillierte funktionelle Analyse der Expression der Schlüsselgene in Korrelation zum Gehalt wird Aufschluss darüber geben, welche Gene bzw. Gendosis für eine effiziente Biosynthese verantwortlich ist. In Folgestudien könnte diese Information genutzt werden, um die Expression der Schlüsselgene durch verschiedene Zuchtmethoden (z.B. TILLING) derart zu modulieren, dass der Methionin Gehalt in Lupinen entsprechend des Bedarfes moduliert werden kann. Ferner wird die Korrelationsanalyse zwischen der Rhizosphären- Diversität und Genexpression zukünftig neue Einblicke in das Forschungsgebiet der Pflanze-Umwelt-Interaktion, insbesondere für den Wurzelraum erlauben.

Die wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ergibt sich aus der starken Nachfrage nach dem Rohstoff Protein. In weiteren Zusammenarbeiten könnten die hier erarbeiteten Ergebnisse für die Züchtung von optimierten Pflanzen sowie für die Entwicklung von Aufarbeitungsprozessen und Prozessen zur Weiterverarbeitung biobasierter Produkte genutzt werden. Für die technische Industrie bietet das Protein aus Lupinen eine neue Rohstoffbasis z.B. als Füllstoff für Reifen. Hierdurch könnte die Rohstoffbasis für diverse technische Produkte zukünftig verbreitert und die Wettbewerbsfähigkeit in der Herstellung dieser Produkte gesichert werden. Weiterhin verspricht die nachhaltige Verwendung der Lupine ein hohes Wertschöpfungspotenzial für landwirtschaftliche Betriebe, insbesondere in Regionen, für die wegen marginaler Bodenbedingungen nur wenig Arten kulturwürdig sind.

Im technischen Bereich (Reifenindustrie, Änderungen in der Viskosität von Flüssiglatax und anderen Polymerlösungen, Klebstoffe) könnte Sortenmaterial unabhängig vom Alkaloidgehalt eingesetzt werden. Sowohl die ESKUSA GmbH als auch die WWU pflegen im Rahmen mehrerer gemeinsamer Projekte intensive Kontakte zur Kautschuk- und Reifenindustrie sowie zur Verarbeitungsindustrie von Flüssiglatax. Es soll mit diesen oder anderen Partnern versucht werden, neue Einsatzgebiete für Lupinenprotein oder –proteinisolate zu identifizieren und voran zu treiben. So konnte aus dem eingesetzten Lupinenmaterial im Labor des Lehrstuhls für Biogene Polymere des TU-München Campus Straubing eine erste Folie aus Lupinenprotein hergestellt werden. Dieses Thema soll kurzfristig in einem F&E-Projekt weiter verfolgt werden.

Für Einsatzbereiche in der stofflichen Nutzung von Protein könnte das Pflanzenmaterial relativ kurzfristig direkt und ohne weitere Kreuzungsprogramme zur Sortenanmeldung gebracht werden. Denkbar ist auch der Einsatz von Lupinen-Keimöl in der Kosmetikindustrie. Dieses kann als Alternative zu Sojaöl bspw. in Haut- und Gesichtscremes eingesetzt werden. Die ESKUSA GmbH ist diesbezüglich mit einem Extrakthersteller in Kontakt. Erste Muster von Lupinenkeimlingen, die aus Schalenabfällen herausgereinigt wurden, wurden an den Extrakthersteller zur Probeextraktion übergeben. Bei diesem Extraktionsverfahren können störende Alkaloide voraussichtlich selektiv entfernt werden, so dass auch hier alkaloidreiches Ausgangsmaterial direkt eingesetzt werden könnte. Schließlich kann das alkaloidreiche Material auch direkt als Gründüngungssorte in Fruchtfolgen eingesetzt werden. Hier ist insbesondere eine niedrige Tausendkornmasse wegen der Saatgutkosten wichtig. In den übergebenen Körnern der VIR-Akzessionen konnten bereits einige Linien mit entsprechend niedriger TKM identifiziert werden. Der aus der Selektion aus Akzession 4 hervorgegangene Stamm LUPIZAV 4 ist im Jahr 2017 beim Bundessortenamt für Gründüngungszwecke angemeldet worden.