

LupiBreed - Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung der Süßlupine zur Sicherung der einheimischen Eiweißversorgung

LupiBreed - Increase of yield stability and yield performance of sweet lupins

FKZ: 14EPS009

Projektnehmer:

Julius Kühn-Institut (JKI)
Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen
Rudolf-Schick-Platz 3, 18190 Sanitz OT Groß Lüsewitz
Tel.: +49 38209 45-200
Fax: +49 38209 45-222
E-Mail: zl@julius-kuehn.de
Internet: www.julius-kuehn.de

Autoren:

Kristin Fischer, Steffen Roux, Hans-Ulrich Jürgens, Brigitte Ruge-Wehling

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.

Abschlussbericht

LupiBreed

Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung der Süßlupine zur Sicherung der einheimischen Eiweißversorgung

Zuwendungsempfänger: Julius Kühn-Institut

Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen

Institut für Stresstoleranz und Resistenzforschung

Erwin-Baur-Str. 27

06484 Quedlinburg

FKZ: 2814 EPS 009

Laufzeit: 15.02.2015 – 14.2.2018

Kooperationspartner: Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG, Bocksee

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben

Thünen-Institut, Trenthorst

Kurzfassung

Die Erhöhung der Ertragsstabilität als Voraussetzung für eine merkmalsverbessernde Sortenzüchtung konnte durch die markergestützte Nutzung definierter Anthraknoseresistenzgene und Mutantenlinien mit definierten Platzfestigkeitsgenen realisiert werden. Für das Resistenzgen *LanrBo* wurden molekulare Marker entwickelt, die mit diesem eng gekoppelt und sowohl für eine effiziente markergestützte Selektion von *LanrBo*-tragenden Zuchtlinien als auch für die Pyramidisierung der unabhängigen Resistenzgene *LanrBo* und *Lanr1* geeignet sind. Eine markergestützte Selektion mit publizierten Markern ist ebenfalls möglich für die bekannten Platzfestigkeitsgene *lentus* und *tardus* mit den als platzfest eingestuften Mutanten-Linien und mit platzfesten Zuchtstämmen.

Im Hinblick auf die Ertragsleistung sind in einem Set an Mutanten-Linien (N= 44) neue, positive Wuchstypen im Ertragsversuch identifiziert worden, die signifikant erhöhte Kornerträge, Proteingehalte und auch Proteinerträge im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangssorten (Boruta, Probor) aufwiesen.

Auch im Vergleich zu der aktuell ertragsreichsten, verzweigten Sorte Boregine konnten im Mutantenset Linien nachgewiesen werden, die an Standorten mit geringer Bodenqualität dieser ertragsmäßig überlegen waren. Darüber hinaus wiesen einige Mutantenlinien im Vergleich zu Boregine einen statistisch abgesicherten, erhöhten Proteingehalt bzw. Proteinertrag auf und waren auch in der Abreife deutlich früher als die Vergleichssorte.

Unter einer Auswahl von Genbankakzessionen wurden solche identifiziert, die aufgrund niedriger Alkaloidgehalte bei gleichzeitig hohen Proteingehalten züchterisch wertvoll sein könnten.

Das Projekt hat aufgezeigt, dass durch Nutzung von vorselektierten Mutantenlinien und genetischen Ressourcen die Selektion von neuem Prebreeding-Material ermöglicht wird, welches den gängigen Sorten im Hinblick auf Ertragsmerkmale überlegen ist. Im Ergebnis konnte das Projekt einen Fortschritt für die Züchtung von Lupinen erzielen.

Abstract

The aim of the project was to genetically improve sweet lupins with regard to disease resistance, grain-yield potential, and seed composition.

With regard to disease resistance, molecular markers were identified which are closely linked to the anthracnose resistance locus *LanrBo* and, thus, allow for marker-assisted selection of *LanrBo* carriers. In addition, these markers may be helpful for pyramiding the independent resistance loci *LanrBo* and *Lanr1*, in order to provide a genetically broad and hopefully durable basis for anthracnose resistance in narrow-leafed lupin. Also, a marker-assisted selection for the non-pod shatter genes *lentus* and *tardus* in crossing programmes with the shatter resistant mutant lines and breeding lines that carry the respective genes will improve yield stability.

With respect to yield performance mutant lines were identified, that showed significant increases in kernel yield, protein content, and protein yield compared to the respective original cultivars (Boruta, Probor). Some of these lines turned out to be significantly improved in protein content and protein yield, as well as in earliness, compared to the high-yielding cv. Boregine, which has been the dominating narrow-leafed lupin cultivar in Germany during the past ten years.

Among a sub-set of gene bank accessions that were analysed for the first time concerning protein and alkaloid contents, some lines were found to have high protein contents along with low alkaloid levels. These accessions may have potential for further breeding activities.

Kontaktinfos:

Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen

Dr. Brigitte Ruge-Wehling / Dr. Steffen Roux

OT Groß Lüsewitz, Rudolf-Schick-Platz 3a

18190 Sanitz

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	2
Inhaltsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einführung	11
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	11
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	11
1.3 Planung und Ablauf des Projekts	12
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde ..	13
3 Material und Methoden	16
3.1 Pflanzenmaterial	16
3.1.1 Entwicklung und Auswahl der Mutanten-Linien	16
3.1.2 Kartierungspopulationen	17
3.1.3 Zuchtstämme	17
3.1.4 Genbankakzessionen	17
3.2 Erfassung der Anthraknose-Anfälligkeit der Mutanten-Linien.....	18
3.2.1 Resistenztests	18
3.2.2 Molekulare Marker	18
3.3 Erfassung der Platzfestigkeit der Mutantenlinien	18
3.3.1 Feldtests	18
3.3.2 Molekulare Marker	19

3.4	Feldtests zur Ermittlung der Ertragsleistung.....	19
3.5	Inhaltsstoffbestimmungen	20
3.5.1	Probenvermahlung	20
3.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes	20
3.5.3	Bestimmung des Alkaloidgehaltes und der -zusammensetzung.....	20
3.6	Statistik.....	21
4	Ausführliche Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse ..	22
4.1	Ertragsstabilität	22
4.1.1	Anthraknose	22
4.1.2	Platzfestigkeit.....	25
4.2	Ertragsleistung	29
4.2.1	Kornertrag, Proteingehalt und Proteinertrag	29
4.2.2	Merkmalskorrelationen	32
4.2.3	Wertvolle Mutanten-Linien	34
4.3	Variationsbreite von Genbankmaterial	36
4.3.1	Alkaloidgehalt	37
4.3.2	Alkaloidzusammensetzung	38
4.3.3	Proteingehalt.....	40
4.3.4	Genetische Variabilität von Genbankakzessionen bezüglich Rohprotein und Alkaloidgehalt bzw. -zusammensetzung	43
4.3.5	NIR-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung des Rohprotein- bzw. Alkaloidgehaltes	48
5	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	53
6	Gegenüberstellung der geplanten zu den erreichten Zielen.....	54

7	Zusammenfassung	56
8	Literaturverzeichnis.....	58
9	Realisierte Veröffentlichungen	62
10	Anhang: Erfolgskontrollbericht.....	65
10.1	Beitrag zu den förderpolitischen Zielen	65
10.2	Das wissenschaftliche und technische Ergebnis, Nebenergebnisse, Erfahrungen	65
10.3	Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen.....	67
10.4	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten.....	67
10.5	Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten	67
10.6	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit.....	67
10.7	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	68
10.8	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Genetische Analyse spaltender Populationen der Gelben Lupine	24
Tab. 2 Charakterisierung der Prüfglieder hinsichtlich der Platzfestigkeitsgene <i>tardus</i> und <i>lentus</i> , Frühe Gruppe	28
Tab. 3 Charakterisierung der Prüfglieder hinsichtlich der Platzfestigkeitsgene <i>tardus</i> und <i>lentus</i> , Späte Gruppe	28
Tab. 4 Mittelwerte des Kornertrags, Proteingehalts und des Proteinertrags über 3 Jahre, Versuch Frühe Gruppe.....	30
Tab. 5 Mittelwerte des Kornertrags, Proteingehalts und des Proteinertrags über 3 Jahre, Versuch Späte Gruppe.....	31
Tab. 6 Varianzanalyse und Heritabilitäten, Frühe Gruppe.....	32
Tab. 7 Varianzanalyse und Heritabilitäten, Späte Gruppe.....	32
Tab. 8 Merkmalskorrelationen, Frühe Gruppe.....	33
Tab. 9 Merkmalskorrelationen, Späte Gruppe.....	34
Tab. 10 Mutantenlinien als potenziell wertvolles Prebreeding-Material . Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Tab. 11 Verteilung der Gesamt-Alkaloidgehalte innerhalb der Genbankakzessionen	43
Tab. 12 Genotypen mit hohen(+) und niedrigen(-) Anteilen der Hauptalkaloide	46
Tab. 13 Proteinreiche und alkaloidarme Akzessionen.....	47
Tab. 14 Kalibrations- und Validationsergebnisse für Rohprotein- und Alkaloidgehalt von Genbankakzessionen der Blauen Lupine im Schrot, in ganzen Körnern und im Einzelkorn	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Entwicklung der Mutanten-Linien.....	16
Abb. 2 Mittlerer Anthraknosebefall der Mutanten-Linien, A: frühe Gruppe, B: späte Gruppe	23
Abb. 3 Mittlere Platzfestigkeit der Mutanten-Linien (blau), Zuchtstämme (orange) und Standards (grün), Frühe Gruppe, Mittelwerte über 3 Jahre und 2 Standorte, hellgraue Markierung: signifikant platzfester als VB Antianiani.	27
Abb. 4 Mittlere Platzfestigkeit der Mutanten-Linien (blau und lila), Zuchtstämme (orange) und Standards (grün), Späte Gruppe, Mittelwerte über 3 Jahre und 2 Standorte hellgraue Markierung: signifikant platzfester als VB Antianiani.....	27
Abb. 5 Verteilung der Alkaloide 2015 und 2016	37
Abb. 6 Verteilung der Alkaloide 2015	38
Abb. 7 Verteilung der Alkaloide 2016	38
Abb. 8 Verteilung des relativen Anteils von Lupanin in den Alkaloiden.....	39
Abb. 9 Verteilung des relativen Anteils von 13-Hydroxylupanin in den Alkaloiden.....	39
Abb. 10 Verteilung des relativen Anteils von Angustifolin in den Alkaloiden	40
Abb. 11 Verteilung des Protein-Gehaltes der gesamten Genbank-Akzessionen	40
Abb. 12 Protein-Verteilung 2015	41
Abb. 13 Protein-Verteilung 2016	41
Abb. 14 Diagramm Gesamtalkaloide - Protein	42
Abb. 15 Hauptkomponentenanalyse der Alkaloide.....	44

Abb. 16 Chromatogramm einer Akzession mit sehr hohen Anteilen an Lupanin oben (Nr. 77) und andererseits sehr hohen Anteilen an Angustifolin und 13-Hydroxylupanin unten (Nr. 94).....	45
Abb. 17 Chromatogramm mit sehr hohen Anteilen an 13-Hydroxylupanin oben (Nr. 90) und andererseits mit nahezu keinem Anteil an Angustifolin unten (Nr. 66)	45
Abb. 18 Hauptkomponentenanalyse von Protein- und Alkaloidgehalt	47
Abb. 19 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Rohproteingehaltes im Schrot der untersuchten Genbankakzessionen	49
Abb. 20 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Rohproteingehaltes in ganzen Körnern der untersuchten Genbankakzessionen	49
Abb. 21 Kalibration (a) bzw. Kreuzvalidierung (b) des Rohproteingehaltes in Einzelkörnern der untersuchten Genbankakzessionen	49
Abb. 22 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes im Schrot der untersuchten Genbankakzessionen	50
Abb. 23 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes in ganzen Körnern der untersuchten Genbankakzessionen	50
Abb. 24 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes in Einzelkörnern der untersuchten Genbankakzessionen	50

Abkürzungsverzeichnis

BB	Brandenburg
BP	Bodenpunkt
EMS	Ethylmethansulfonat
FM	Feuchtmasse
MACE	Massive Analysis of cDNA ends
M-Generation	Mutations-Generationen
M/V	Mecklenburg-Vorpommern
PLS	Partial Least Squares
R ²	Bestimmtheitsmaß
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSEE	Root Mean Square Error of Estimation
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
RPD	Residual Prediction Deviation
SD	Standardabweichung des Validationssets
SEP	Standardfehler der Vorhersage
TKG	Tausendkorngewicht
TM	Trockenmasse

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Gegenstand des Vorhabens war die züchterische Verbesserung der Süßlupine im Hinblick auf Kornertrag bzw. Inhaltsstoffqualität. Grundlage dafür war ein Set an Prebreeding-Linien aus einem EMS-Mutageneseprogramm (Rudloff et al. 2008; Rudloff 2011; Fischer et al. 2018). Darüber hinaus sollte die enge genetische Basis der Lupinen durch Einbeziehung pflanzengenetischer Ressourcen verbreitert werden, um das Potenzial für eine züchterische Weiterentwicklung zu vergrößern.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Gesamtziel des Projektes war es, die Ertragsstabilität und die Ertragsleistung der Süßlupine zu verbessern und damit ihre Bedeutung als heimische Eiweißpflanze im Sinne der Eiweißpflanzen-Strategie (EPS) der Bundesregierung zu vergrößern.

Daraus ergaben sich im Einzelnen folgende Ziele:

Erhöhung der Ertragsstabilität durch ...

- Einschätzung des Anthraknose-Resistenzniveaus der Prebreeding-Linien
- Entwicklung effizienter Selektionsmarker für den Resistenzlocus *LanrBo*, die dann für eine markergestützte Einkreuzung in Zuchtmaterial zur Verfügung stehen
- Genetische Analyse einer Anthraknose-Resistenz in der Gelben Lupine
- Identifikation platzfester Prebreeding-Linien

Erhöhung der Ertragsleistung durch ...

- Identifikation ertragsstarker Prebreeding-Linien in mehrjährigen und mehrortigen Leistungsprüfungen (Kornertrag, Proteinertrag)

Darstellung der Variationsbreite in Genbankmaterial durch ...

- Bestimmung der Rohprotein- und Gesamtalkaloidgehalte

1.3 Planung und Ablauf des Projekts

Die Arbeitspakete wurden entsprechend der Vorhabensbeschreibung bearbeitet.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Anthraknoseresistenz

Bei der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius*) ist das Resistenzgen *Lanr1* aus der australischen Sorte 'Tanjil' bekannt (Yang et al. 2004). Im Rahmen eines bereits abgeschlossenen Drittmittelprojekts konnte ein weiteres Resistenzgen, *LanrBo*, aus der Zuchtlinie Bo7212 der Saatzucht Steinach GmbH und Co. KG identifiziert werden, welches für den Lupinenanbau in Deutschland eine große Relevanz aufweist (Ruge-Wehling et al. 2009). Für *LanrBo* wurden F2-Kartierungspopulationen entwickelt, die mit molekularen Markern genotypisiert wurden und eine Zuordnung von *LanrBo* zur Kopplungsgruppe NLL-11 von *L. angustifolius* (Nelson et al. 2006; Fischer et al. 2015) ermöglichten.

Neben genetischen Karten (Boersma et al. 2005; Nelson et al. 2010, Yang et al. 2013) für die Blaue Süßlupine steht mittlerweile das sequenzierte Genom der Blauen Süßlupine (Kamphuis et al. 2015; Hane et al. 2017) für eine effiziente Entwicklung von Selektionswerkzeugen zur Verfügung. Am JKI, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, steht eine Transkriptombibliothek zur Verfügung, aus der SNP-haltige Sequenzen gefiltert werden können, die bereits erfolgreich für die Entwicklung eng gekoppelter Marker verwendet worden sind.

Für die Gelbe Lupine (*L. luteus*) war bisher eine nicht monogen vererbte und nicht voll wirksame Anthraknose-Resistenz bekannt (Adhikari et al. 2011). In dem BÖLN-Projekt 'Züchtungsmethodische Ansätze zur Erhöhung der Anbaubedeutung der Gelben (*Lupinus luteus*) und Weißen Lupine (*Lupinus albus*) im Ökolandbau' (FKZ 2809OE071) wurde in dreijährigen Feldprüfungen eine Gelbe Lupinensorte polnischer Herkunft identifiziert, die unter den Versuchsbedingungen in Groß Lüsewitz als nahezu befallsfrei eingestuft werden konnte.

Aktuell ist für die Gelbe Lupine keine genetische Karte publiziert. Von Parra Gonzalez et al. (2010; 2012) wurden EST-Bibliotheken erstellt, deren

Sequenzinformationen für die Entwicklung von molekularen Markern für verschiedene Fragestellungen genutzt werden können.

Platzfestigkeit

Das Hülsenplatzen und damit einhergehende Ernteverluste sowie züchterische Ansätze zu dessen Minderung wurden bereits von v. Sengbusch und Zimmermann (1937) beschrieben. Hackbarth (1938) konnte bei der Gelben Lupine einen monogen-rezessiven Erbgang für dieses Merkmal aufzeigen. Gladstones (1967) identifizierte in der Blauen Süßlupine die zwei rezessiven Gene *tardus* und *lentus*, die nur in Kombination ein Platzen vollständig verhindern. Homozygotie des *lentus*-Allels ist dabei an rötlich gefärbten Stängeln und Hülseninnenseiten zu erkennen. Boersma et al. (2007) und Li et al. (2012) entwickelten PCR-Marker für die Selektion auf *lentus*. Li et al. (2010) veröffentlichten eng gekoppelte Marker und PCR-Assays für das *tardus*-Allel.

Erhöhung der genetischen Variabilität

Die heute verbreiteten süßen Sorten von Blauer und Gelber Lupine gehen auf die Selektion weniger Einzelpflanzen mit spontanen Mutationen zurück (v. Sengbusch 1930). Somit verfügt das aktuelle Süßlupinen-Sortiment über eine sehr enge genetische Basis, welche die Möglichkeiten, in aktuellem Zuchtmaterial nach neuen agronomisch wertvollen Merkmalen zu selektieren, begrenzt.

Am JKI in Groß Lüsewitz wurde bereits vor einigen Jahren ein Programm zur Erhöhung der genetischen Variabilität bei der Blauen Süßlupine begonnen (Rudloff 2011). Mittlerweile steht hieraus auf Basis verschiedener Sorten eine Kollektion von Prebreeding-Linien zur Verfügung, die u. a. neue Wuchstypen repräsentieren. Einige dieser Linien zeigten in Ertragskomponententests ein im Vergleich zur Referenzsorte erhöhtes Kornertragspotenzial.

Als weitere Ressourcen zur Erhöhung der genetischen Variabilität stehen am IPK Gatersleben Genbankakzessionen von *L. angustifolius* zur Verfügung. Aufgrund der limitierten Saatgutmenge konnten diese Akzessionen bisher nicht näher evaluiert werden.

Inhaltsstoffanalysen

Mit Blick auf die Eiweißversorgung werden Lupinensorten benötigt, die neben einem hohen Kornertrag über einen hohen und stabilen Eiweißgehalt verfügen und gleichzeitig arm an Alkaloiden sind. Das Ziel sicherer Inhaltsstoffqualitäten gehört zu den Herausforderungen in der Züchtung von Blauen Lupinen für Feed- und Food-Verwendungen. Rohproteingehalt und Alkaloid-Gehalt bestimmen maßgeblich die Kornqualität bei Süßlupinen (Eickmeyer 2009).

Zur Erfassung des Rohproteingehaltes in Einzelsamen von Blauen Lupinen wurde am JKI, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, eine zerstörungsfreie NIR-Methode an Einzelkörnern etabliert, die es ermöglicht, anhand sehr geringer Materialmengen Proteingehalte zu ermitteln, um anschließend die unversehrten Samenkörner für Züchtungsarbeiten weiter zu nutzen (Jansen et al. 2009). Umweltbedingungen, wie z. B. die Anbautemperatur (Jansen et al. 2009) sowie der Einsatz von verschiedenen Düngemitteln (Ciesiolka et al. 2005), haben einen Einfluss auf den Alkaloid-Restgehalt von bitterstoffarmen Süßlupinen. Um eine Überschreitung bestehender Richtwerte zu vermeiden, sind Sorten mit niedrigem Bitterstoffgehalt unter allen Anbaubedingungen notwendig. Mittels GC/MS (Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometer) kann eine exakte Bestimmung der Bitterstoffe (Alkaloide) durchgeführt werden (Jansen et al. 2009). Der Einsatz der NIR-Technik als schnelle Bestimmungsmethode ist in der internationalen Literatur für einige Inhaltsstoffe in Kulturpflanzen und Futtermitteln bereits beschrieben. Mittlerweile konnte für die Lupinenarten Blaue, Gelbe und Weiße Lupine eine NIR-Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes an ganzen Körnern entwickelt werden (Jansen et al. 2014).

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

3.1.1 Entwicklung und Auswahl der Mutanten-Linien

Grundlage für die Versuche zur Ertragsstabilität und Ertragsleistung waren ein Set an Mutanten-Linien, die auf eine EMS-Mutagenese von Saatgut der Sorten Boruta und Probor zurückgehen (Abb. 1).

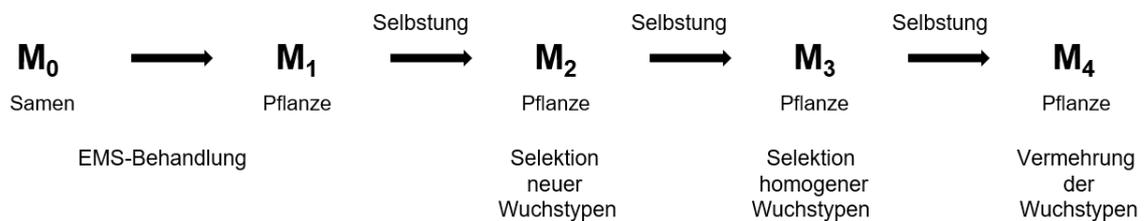


Abb. 1 Entwicklung der Mutanten-Linien

Saatgut (M₀) der Sorten wurde behandelt, im Feld ausgesät und die M₁-Pflanzen geselbstet und beerntet. In der darauffolgenden Generation (M₂) wurden Wuchstypen selektiert, die von dem determinierten, in manchen Anbaujahren in Bezug auf die Abreife vorteilhaften Wuchstyp der Sorte Boruta abwichen. Die Variabilität der beobachteten Wuchstypen reichte dabei von Zwergtypen bis hin zu neuen Verzweigungstypen. Nachfolgende Selbstungsgenerationen dienten zur Saatgutvermehrung von Mutanten-Linien mit vielversprechendem Wuchstyp und wurden im Feld auf phänotypische Homogenität und genetische Stabilität geprüft und bis zur M₄- bzw. M₅-Generation vermehrt. Für die Versuche wurden solche Wuchstypen ausgewählt, die aufgrund ihrer Verzweigung einen Mehrertrag im Vergleich zur determinierten Ausgangssorte Boruta erwarten ließen (Rudloff et al. 2008; Rudloff 2011).

Insgesamt wurden 44 phänotypisch divergente Mutanten-Linien ausgewählt und diese aus versuchstechnischen Erwägungen in eine frühe und eine späte Gruppe gruppiert.

Diese Linien gingen in die Versuche zur Einschätzung (1) des Anthraknose-Resistenzniveaus, (2) der Platzfestigkeit und (3) der Ertragsleistung ein.

3.1.2 Kartierungspopulationen

Die Entwicklung von Selektionsmarkern für das Resistenzgen *LanrBo* in der Blauen Lupine erfolgte anhand von F2-Populationen, die für das Merkmal Anthraknoseresistenz spalten und auf Kreuzungen des Resistenzträgers Bo7212 mit der stark anfälligen Sorte Arabella zurückgehen. F1-Pflanzen aus den Kreuzungen wurden geselbstet und die daraus entstandenen F2-Populationen im Gewächshausresistenztest hinsichtlich ihrer Resistenzausprägung definiert. Die Spaltungsanalysen der Populationen sind bereits publiziert (Fischer et al. 2015).

Die genetische Analyse einer Anthraknoseresistenz bei der Gelben Lupine basiert auf Kreuzungen der Sorte Taper, die in einem Vorgängerprojekt in Gewächshausresistenztests und unter Feldbedingungen nahezu symptomfrei eingestuft worden war, mit der als stark anfällig beurteilten Sorte Amulett. Das Kreuzungssaatgut wurde ausgesät und die F1-Pflanzen zur F2-Generation geselbstet. Insgesamt wurden N = 206 F2-Einzelpflanzen untersucht.

3.1.3 Zuchtstämme

Im Rahmen der Platzfestigkeitsprüfung wurden 20 Zuchtstämme der Saatzucht Steinach GmbH und Co KG geprüft.

3.1.4 Genbankakzessionen

Für die Abschätzung züchterischer Optionen zur Verbesserung des Rohprotein- bzw. des Alkaloidgehaltes und der Zusammensetzung der Alkaloide wurden durch die Projektpartner (Saatzucht Steinach GmbH und Co KG; Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung) genetische Ressourcen evaluiert und vermehrt. Insgesamt wurden 229 (aus den Ernten 2015 und 2016, 100 bzw. 129) Genbankakzessionen für die Inhaltsstoffanalyse verwendet.

3.2 Erfassung der Anthraknose-Anfälligkeit der Mutanten-Linien

3.2.1 Resistenztests

Der Anthraknose-Resistenztest im Gewächshaus erfolgte wie bereits publiziert (Yang et al. 2004, Ruge-Wehling et al. 2009).

Die Feldtests wurden einortig (Versuchsfeld Groß Lüsewitz, konventionelle Bewirtschaftung) über drei Jahre durchgeführt. Die Prüfglieder (Frühe Gruppe N = 22, Späte Gruppe N = 22) wurden in Doppelreihen ausgesät und waren jeweils flankiert von einem Inokulationsstreifen. Dieser bestand aus zuvor mit *Colletotrichum lupini* inokuliertem Saatgut der stark anfälligen Weißen Lupinen-Sorte Amiga. Als Standards dienten die zwei bis dato bekannten Resistenzträger, nämlich Bo7212 – ein Zuchtstamm der Saatzucht Steinach GmbH und Co. KG – und Tanjil, eine australische Sorte. Die Sorte Arabella wurde als anfälliger Standard genutzt. Die Anthraknose-Bonitur erfolgte im Entwicklungsstadium BBCH65 (Blühende) auf einer Skala von 1 (befallsfrei) bis 9 (70 – 100 % befallen).

3.2.2 Molekulare Marker

Für die Prüfung auf das Vorhandensein des Resistenzgens *Lanr1* wurden publizierte Selektionsmarker (Yang et al. 2004; Kamphuis et al. 2015; Hane et al. 2017) verwendet.

LanrBo wurde ebenfalls mit bereits publizierten Markern (Fischer et al. 2015) detektiert. Für die Entwicklung eng gekoppelter Marker wurde das im Projektzeitraum veröffentlichte Genom von *Lupinus angustifolius* (Hane et al. 2017, siehe 4.1.1.2) genutzt.

3.3 Erfassung der Platzfestigkeit der Mutantenlinien

3.3.1 Feldtests

Die Platzfestigkeit der Mutanten-Linien wurde zweiortig (Versuchsfeld Groß Lüsewitz, konventionelle Bewirtschaftung & Zuchtstation Bocksee) über 3 Jahre in

Microplots mit einer Aussaatdichte von 100 keimfähigen Körnern je m² getestet. Neben den 44 Mutanten-Linien wurden 20 Zuchtstämme der Saatzucht Steinach GmbH und Co KG evaluiert. Auch hier erfolgte die Einteilung in eine frühe und späte Gruppe. Als platzfeste Standards dienten die australischen Sorten Tanjil, Unicrop und Uniwhite, die Träger der bekannten Platzfestigkeitsgene *lentus* und *tardus* sind. Als stark platzanfälliger Standard wurde die litauische Sorte VB Antaniani genutzt. Die Bonitur erfolgte auf einer Skala von 1 bis 9, mit Note 1 bei weniger als 10 % Pflanzen mit mindestens einer geplatzten Hülse zu einem Boniturzeitpunkt mit maximalem Hülsenplatzen des anfälligen Standards und Note 9 bei etwa 80 – 100 % Pflanzen mit geplatzten Hülsen pro Parzelle.

3.3.2 Molekulare Marker

Zur Charakterisierung der Prüfglieder bezüglich der Gene *lentus* und *tardus* wurden publizierte Selektionsmarker (Boersma et al. 2009; Li et al. 2010; Li et al. 2012) eingesetzt.

3.4 Feldtests zur Ermittlung der Ertragsleistung

Zur exakten Ermittlung des Ertrages wurden die 44 Mutanten-Linien an drei Orten (Versuchsfeld Groß Lüsewitz – konventionelle bzw. ökologische Bewirtschaftung; Zuchtstation Bocksee) über drei Jahre mit jeweils 2 Wiederholungen in Leistungsprüfungen beurteilt. Parzellen mit 5 m² und einer Aussaatdichte von 100 Korn/m² dienten der Erfassung der Merkmale Wuchstyp, Homogenität des Wuchstyps, Bestandesdichte, Blühbeginn, Blühende, Gelbreife, Wuchshöhe, Lager und Kornertrag. Als Qualitätsmerkmale wurden das TKG und vom JKI, Institut für Stresstoleranz und Resistenzforschung, der Protein- und Alkaloidgehalt erfasst (siehe 3.5). Auf Basis des Kornertrages und des Proteingehaltes wurde der Proteinertrag ermittelt.

3.5 Inhaltsstoffbestimmungen

3.5.1 Probenvermahlung

Die standardmäßige Vermahlung der Körner erfolgte in zwei Schritten. Die Vorzerkleinerung der harten Lupinensamen mit der Schrotmühle SM3 der Fa. Brabender und eine anschließende Vermahlung mit der Fallzahlmühle der Fa. Perten (Sieb 0,8 mm) garantierte die reproduzierbare Herstellung repräsentativer Vollschrote.

3.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Analyse des Rohproteingehaltes (% in FM) erfolgte nasschemisch nach Kjeldahl (1883).

3.5.3 Bestimmung des Alkaloidgehaltes und der -zusammensetzung

Der Alkaloidgehalt ($\mu\text{g/g}$ FM) bzw. die -zusammensetzung wurden gaschromatographisch nach Bermúdez Torres et al. (2002) ermittelt, wobei zunächst eine salzsaure Extraktion durchgeführt wurde und anschließend nach pH-Umstellung mit NaOH die Alkaloide aus dem Extrakt durch Festphasenextraktion an Hydromatrix mit Dichlormethan isoliert wurden. Die Analysen der eingeeengten Proben erfolgten mit einem Gaschromatographen der Fa. Agilent über einen FID-Detektor. Um eine Umrechnung auf Trockenmasse zu ermöglichen, wurden zusätzlich die Feuchte jeder Probe im Schrot und einer Mischprobe für die Einzelkörner im Feuchteabsolutbestimmer bei 130 °C bestimmt.

Parallel wurden Rohprotein- und Alkaloidgehalte in ganzen Körnern, im Schrot und im Einzelkorn mittels Nahinfrarotspektroskopie (MPA Spektrometer Bruker) analysiert.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mittels Varianzanalyse und einem angemessenen PostHoc-Test (Kruskal-Wallis-Test bzw. Dunnett-Test) in dem Software-Paket R (R Core Team 2016).

Korrelationsanalysen sind nach der Methode nach Pearson durchgeführt worden.

4 Ausführliche Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Ertragsstabilität

4.1.1 Anthraknose

4.1.1.1 Einschätzung des Resistenzniveaus der Mutanten-Linien

Der Versuch wurde deshalb durchgeführt, weil vor der Empfehlung neugeschaffene Variabilität in Form von Mutantenlinien züchterisch zu nutzen nicht nur die Prüfung deren Ertragspotenzials, sondern, entsprechend der Bedeutung der Krankheit, auch deren Abschneiden im Hinblick auf Anthraknose geprüft werden muss. Eine große Variabilität im Hinblick auf die Befallstärke ist nicht zu erwarten, da die bereits bekannten Resistenzen durch einzelene, dominant vererbte Gene (*LanrBo* und *Lanr1*) bedingt werden. Somit war es unwahrscheinlich, mittels EMS-Behandlung, die rezessive Mutationen hervorruft, neue, Resistenz gegenüber Anthraknose vermittelnde Allele zu generieren und zu identifizieren.

Die dreijährigen Versuche sind wie folgt zusammenzufassen:

Die Ergebnisse zeigen eine fast vollständige Befallsfreiheit der resistenten Standards Bo7212 sowie Tanjil und dem fast vollständigen Befall des anfälligen Standards Arabella über die drei Jahre. Die Sorten Boruta, Probor und Boregine wiesen einen moderaten Anthraknose-Befall auf.

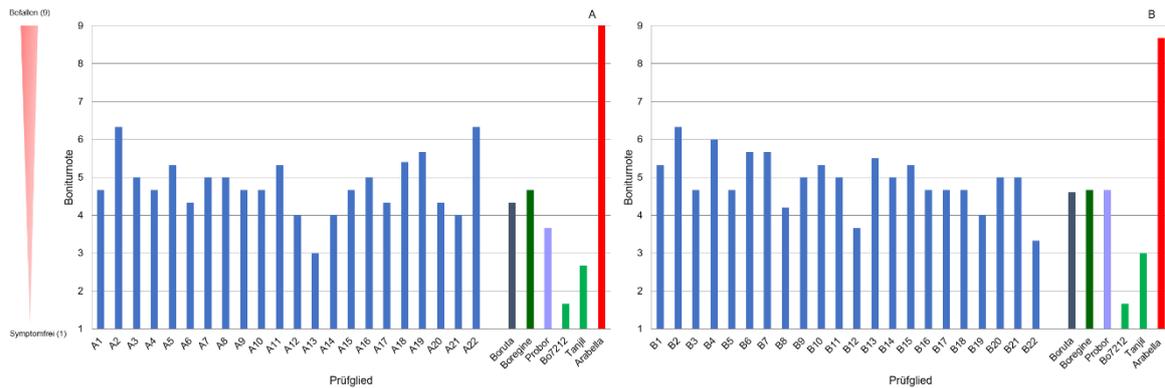


Abb. 2 Mittlerer Anthraknosebefall der Mutanten-Linien, A: frühe Gruppe, B: späte Gruppe
 Innerhalb der Mutanten-Linien gibt es, wie erwartet, wenig Variabilität im Hinblick auf die Anthraknose-Anfälligkeit, die Unterschiede können wohl eher auf Umwelteffekten zurückzuführen sein.

4.1.1.2 Selektionsmarker für *LanrBo*

Mit Hilfe neuer genomischer Ressourcen (Yang et al. 2013, Hane et al. 2017) wurden eng gekoppelte Marker für *LanrBo* identifiziert.

Mit Hilfe neuer genomischer Ressourcen (Yang et al. 2013, Hane et al. 2017) wurden eng gekoppelte Marker für *LanrBo* identifiziert.

Auf der Basis bereits kartierter Ankermarker (Fischer et al. 2015) wurde auf dem Chromosom NLL-11 eine Region von 6,6 Mbp bis 10,8 Mbp definiert, in der *LanrBo* lokalisiert ist. Für die Entwicklung spezifischer Marker wurden Sequenzen genutzt, die SNPs enthalten und aus einem MACE-Experiment hervorgegangen sind. Hier wurden differenziell exprimierte Sequenzen generiert, auf Sequenzunterschiede hin untersucht und mit dem Lupinengenom (www.lupinexpress.de, Hane et al. 2017) abgeglichen. Es wurden solche SNPs verwendet, die im definierten Bereich auf NLL-11 lokalisiert waren. Dabei konnte eine Markerklammer identifiziert werden, die beidseitig jeweils in einem Abstand zum Resistenzlocus *LanrBo* von etwa 1 cM kartiert. Diese im Rahmen der Projektarbeiten entwickelten Marker ermöglichen somit eine sichere markergestützte Selektion auf die Anwesenheit von *LanrBo* in der praktischen Lupinenzüchtung.

4.1.1.3 Allelietests von *LanrBo* und *Lanr1*

Zur Frage, ob die Gene *LanrBo* und *Lanr1* denselben Genort oder unabhängige Loci repräsentieren, wurden Alleliekreuzungen der betreffenden Resistenzträger (Bo7212 x Tanjil) durchgeführt. Insgesamt wurden N= 283 F2-Nachkommen im Gewächshausresistenztest untersucht. Die beobachtete Aufspaltung in 262 Resistente und 21 Anfällige ist mit einem Verhältnis von 15:1 vereinbar ($\chi^2_{15:1}=0,66$) und lässt auf eine unabhängige Vererbung von *LanrBo* und *Lanr1* schließen.

Die Selektionsmarker wurden für ein gezieltes Einkreuzen der Resistenzgene *LanrBo* und *Lanr1* in aktuelles Zuchtmaterial und in die ertragsstärksten Mutantenslinien sowie zur Pyramidisierung beider Gene eingesetzt (siehe Abschlussbericht des Projektpartners Saatzucht Steinach GmbH und Co KG).

4.1.1.4 Genetische Analyse und Nachkommenschaftstests von spaltenden Populationen der Gelben Lupine

Die genetische Analyse einer Anthraknoseresistenz in der Gelben Lupine, identifiziert in der Sorte 'Taper' in einem Vorgängerprojekt, erfolgte anhand spaltender F2-Populationen (Tab. 1).

Tab. 1 Genetische Analyse spaltender Populationen der Gelben Lupine

Population	Mutter	Vater	N Individuen	N resistent	N anfällig	$\chi^2_{(3:1)}$
G1118/2	Taper	Amulett	77	52	20	0,296
G4118/3	Taper	Amulett	129	97	32	0,003

Die Phänotypisierung der F2-Populationen erfolgte in einem Gewächshausresistenztest (Ruge-Wehling et al. 2009). Die nachgewiesene 3:1-Auspaltung in Resistente und Anfällige lässt auf einen monogen-dominanten Erbgang schließen.

Zur Verifizierung der F2-Phänotypisierung wurden sowohl für die Familie G1118/2 als auch für G4118/3 F3-Nachkommenschaftstests, diesmal unter

Feldbedingungen, durchgeführt. Aus der Familie G1118/2 wurden 39 F3-Nachkommenschaften getestet, wobei bei 35 der Nachkommenschaften das Ergebnis aus dem F2-Gewächshausresistenztest bestätigt wurde und vier der F3-Nachkommenschaften abweichend zum Gewächshausstest unter Feldbedingungen als anfällig eingestuft wurden. Die Abweichung von Gewächshaus vs Feldtest kann zum großen Teil mit den unterschiedlichen Umweltbedingungen erklärt werden.

Für die Familie G4118/3 wurden insgesamt 68 F3-Nachkommenschaften untersucht. Für 63 Nachkommenschaften konnte der Resistenzphänotyp unter Feldbedingungen bestätigt werden, fünf der Nachkommenschaften zeigten ein abweichendes Ergebnis. In dieser Familie wurden 36 von 53 resistenten F3enn als Nachkommenschaften von heterozygot resistenten F2-Pflanzen identifiziert. 15 F3-Nachkommenschaften bestätigten einen anfälligen F2-Phänotyp.

4.1.2 Platzfestigkeit

Die Verrechnung dreijähriger Daten von jeweils 2 Orten ermöglichte die Identifizierung von 10 Mutanten-Linien sowie 14 Zuchtstämmen, die eine signifikant geringere mittlere Platzanfälligkeit aufwiesen als der anfällige Standard 'VB Antaniani' (Abb. 3, Abb. 4, hellgrau hinterlegt). Die Sorte VB Antaniani wies erwartungsgemäß eine hohe Platzanfälligkeit auf, die platzfesten Standards Tanjil, Uniwhite sowie Unicrop, Träger der rezessiven Platzfestigkeitgene *lentus* und *tardus*, verhielten sich erwartungsgemäß nicht platzend.

Das hohe Niveau der Platzfestigkeit der Zuchtstämmen der SZS ist das Ergebnis bereits intensiv betriebener Einkreuzungen von platzfesten Sorten mit anschließender Selektion auf Platzfestigkeit. Dies konnte durch Markeranalysen der betreffenden Gene bestätigt werden (siehe unten).

Mit Hilfe der publizierten Selektionsmarker für *lentus* und *tardus* wurden die Prüfglieder und auch die Zuchtstämmen auf Vorhandensein dieser Gene getestet (Tab. 2 und Tab. 3). Erwartungsgemäß weisen Mutanten-Linien, die auf Boruta zurückzuführen sind, die betreffenden Allele, wie ihr Donor, nicht auf, wogegen M-Linien, die aus Probor (positiv für *lentus* und *tardus*) entwickelt wurden,

beide Allele zeigten. Die untersuchten Zuchtstämme sind durch vorangegangene Züchtungsaktivitäten häufiger mit diesen Genen ausgestattet.

Die Selektionsmarker sind während der Projektlaufzeit zum gezielten Einkreuzen der Gene *lentus* und *tardus* in aktuelles Zuchtmaterial und in die ertragsstärksten Mutanten-Linien effizient eingesetzt worden (siehe Abschlussbericht des Projektpartners Saatzucht Steinach GmbH und Co KG).

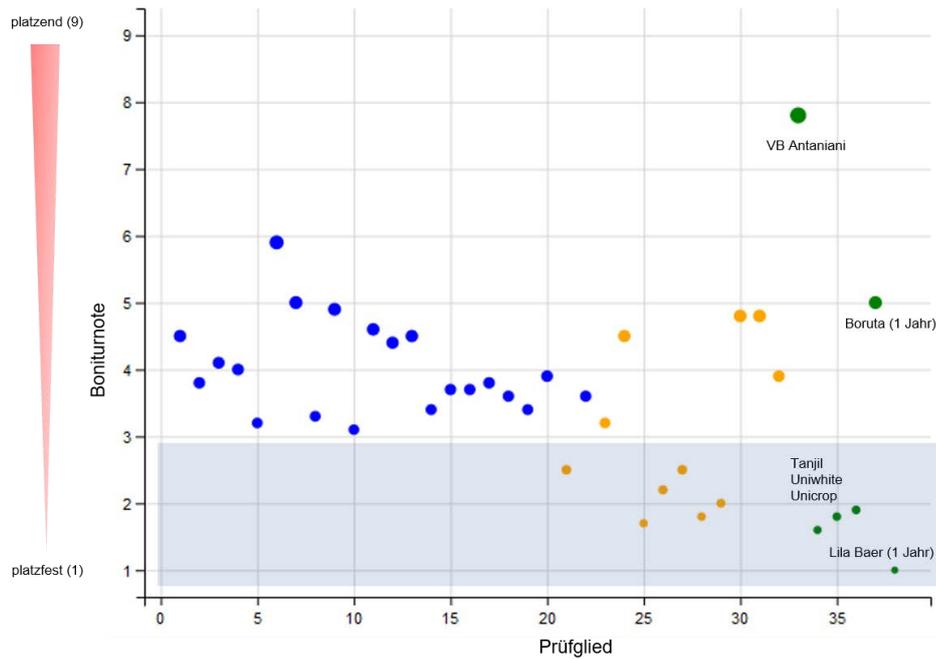


Abb. 3 Mittlere Platzfestigkeit der Mutanten-Linien (blau), Zuchtstämme (orange) und Standards (grün), Frühe Gruppe, Mittelwerte über 3 Jahre und 2 Standorte, hellgraue Markierung: signifikant platzfester als VB Antianiani.

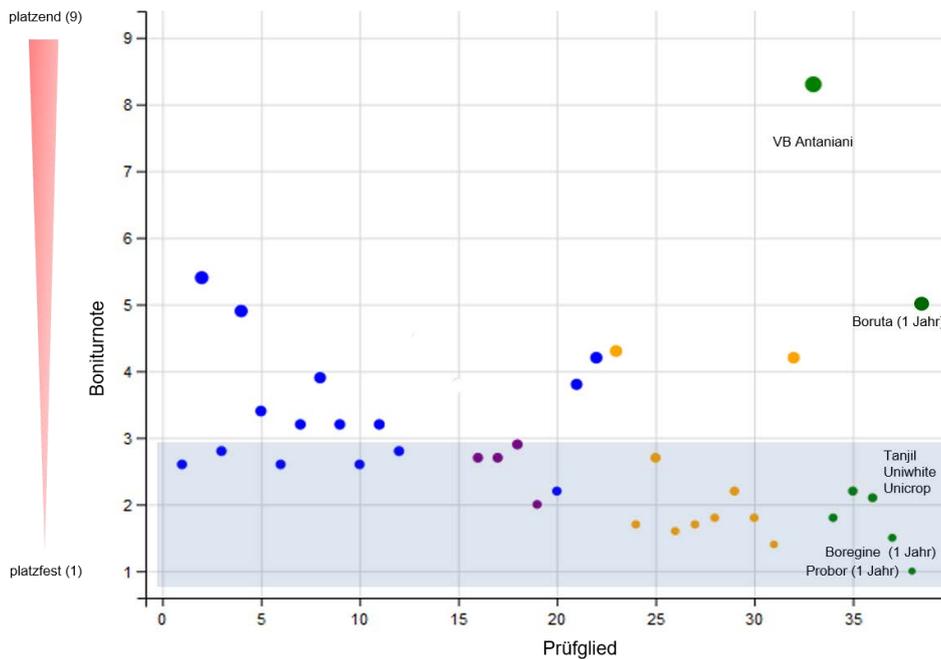


Abb. 4 Mittlere Platzfestigkeit der Mutanten-Linien (blau und lila), Zuchtstämme (orange) und Standards (grün), Späte Gruppe, Mittelwerte über 3 Jahre und 2 Standorte hellgraue Markierung: signifikant platzfester als VB Antianiani.

Tab. 2 Charakterisierung der Prüfglieder hinsichtlich der Platzfestigkeitsgene *tardus* und *lentus*, Frühe Gruppe

Prüfglied	<i>tardus</i>	<i>lentus</i>
A1		
A2		
A3		
A4		
A5		
A6		
A7		
A8		
A9		
A10		
A11		
A12		
A13		
A14		
A15		
A16		
A17		
A18		
A19		
A20		
A21 *	✓	✓
A22		
A23		✓
A24	✓	✓
A25 *	✓	✓
A26 *		✓
A27 *		✓
A28 *		✓
A29 *		✓
A30	✓	✓
A31	✓	✓
A32		✓
VB Antaniani		
Unicrop	✓	✓
Uniwhite	✓	
Tanjil	✓	✓
Boregine		✓
Boruta		
Probor	✓	✓
PI27255		

Tab. 3 Charakterisierung der Prüfglieder hinsichtlich der Platzfestigkeitsgene *tardus* und *lentus*, Späte Gruppe

Prüfglied	<i>tardus</i>	<i>lentus</i>
B1 *		
B2		
B3 *		
B4		
B5		
B6		
B7		
B8		
B9		
B10 *		
B11		
B12 *		
B16 *	✓	✓
B17 *	✓	✓
B18	✓	✓
B19 *	✓	✓
B20 *	✓	✓
B21		
B22		
B23	✓	✓
B24 *	✓	
B25 *	✓	
B26 *	✓	
B27 *	✓	
B28 *	✓	
B29 *	✓	
B30 *	✓	
B31 *	✓	
B32	✓	
VB Antaniani		
Unicrop	✓	✓
Uniwhite	✓	
Tanjil	✓	✓
Boregine		✓
Boruta		
Probor	✓	✓
PI27255		

4.2 Ertragsleistung

4.2.1 Kornertrag, Proteingehalt und Proteinertrag

Die Ertragsleistung der Mutanten-Linien wurde über drei Jahre an drei divergenten Standorten (= 9 Umwelten) in zwei Wiederholungen ermittelt.

Am Prüfort Groß Lüsewitz waren die Kornerträge der Mutanten-Linien bei konventionellem Anbau mit im Durchschnitt 42,5 dt/ha (frühe Gruppe) bzw. 39,6 dt/ha (späte Gruppe) im Vergleich zu den anderen Prüforten hoch (Tab. 4, Tab. 5). Dies ist auf die hohe Bodenqualität mit 40/47 Bodenpunkten (BP) sowie die durchgeführten Pflanzenschutzmaßnahmen (Voraufbauherbizid, Insektizid während der Vegetation) zurückzuführen. Das Ertragsniveau in Groß Lüsewitz lag bei ökologischem Anbau etwa 30 % unter jenem bei konventionellem Anbau. Auf dem Magerstandort Bocksee mit 18 – 20 Bodenpunkten lag der mittlere Kornertrag bei 15,1 dt/ha in der frühen und 16,3 dt/ha in der späten Gruppe.

Auf allen drei Standorten konnten Linien identifiziert werden, die im Jahresmittel einen signifikant höheren Kornertrag erbrachten als die Ausgangssorte Boruta, wenngleich die Erträge dieser Linien nicht an die Kornerträge der Standardsorte Boregine heranreichten. Gemittelt über 9 Umwelten (3 Versuchsjahre x 3 Standorte), lagen die besten Mutanten-Linien im Durchschnitt jedoch nur 10 % unter dem Kornertrag von Boregine. Hervorzuheben ist hier, dass einzelne Linien bei Betrachtung der drei Jahre nur für den Standort Bocksee (Magerstandort) höhere Kornerträge erzielten als die Sorte Boregine.

Betrachtet man den Proteingehalt, so wird auch hier deutlich, dass auf den drei Standorten Linien identifiziert werden konnten, die im Vergleich zu ihrer Ausgangssorte einen höheren Proteingehalt aufweisen. Im späten Versuch zeigten sogar einige Linien (mit Probor als Ausgangssorte) einen höheren Proteingehalt als die ohnehin schon proteinreiche Ausgangssorte Probor.

Im Proteinерtrag erbrachte ein Teil der Mutanten-Linien im Mittel signifikant höhere Ergebnisse im Vergleich zur Ausgangssorte Boruta und lag nur knapp unter den Proteinерträgen von Boregine.

Tab. 4 Mittelwerte des Kornertrags, Proteingehalts und des Proteinерtrags über 3 Jahre, Versuch Frühe Gruppe

Umwelt			Kornertrag (dt/ha)	Proteingehalt (%)	Proteinерtrag (dt/ha)
GL konv BP40-47	Mutanten- Linien	Min.	33.1	28.8	9.2
		Max.	51.1	33.0	15.2
		Mittel	42.5	30.2	12.5
	Boruta		43.7	30.6	13.1
	Probor		52.4	31.9	16.3
	Boregine		57.1	28.6	15.9
GL öko BP40-47	Mutanten- Linien	Min.	20.5	24.8	5.5
		Max.	36.4	30.5	9.8
		Mittel	29.6	26.8	7.8
	Boruta		29.6	25.7	7.4
	Probor		35.1	29.8	10.2
	Boregine		41.5	27.8	11.2
Bocksee BP18-20	Mutanten- Linien	Min.	10.3	24.6	2.4
		Max.	18.7	28.5	7.6
		Mittel	15.1	26.4	4.1
	Boruta		15.4	26.2	3.9
	Probor		17.6	28.5	5.2
	Boregine		18.2	26.5	6.0
gesamt	Mutanten- Linien	Min.	21.4	26.1	5.8
		Max.	35.4	29.3	10.0
		Mittel	29.1	27.6	8.0
	Boruta		29.6	27.5	8.2
	Probor		35.0	30.0	10.5
	Boregine		38.9	27.6	10.7

Tab. 5 Mittelwerte des Kornertrags, Proteingehalts und des Proteinertrags über 3 Jahre, Versuch Späte Gruppe

Umwelt			Kornertrag (dt/ha)	Proteingehalt (%)	Proteinertrag (dt/ha)
GL konv BP40-47	Mutanten- Linien	Min.	30.3	28.8	9.6
		Max.	46.6	34.7	14.7
		Mittel	39.6	31.6	12.1
	Boruta		36.3	29.5	10.4
	Probor		47.7	32.8	15.1
	Boregine		53.2	28.9	14.9
GL öko BP40-47	Mutanten- Linien	Min.	18.7	26.1	5.5
		Max.	35.4	32.3	10.6
		Mittel	29.5	28.8	8.2
	Boruta		30.6	26.2	7.7
	Probor		40	30.2	11.7
	Boregine		39	26.0	9.8
Bocksee BP18-20	Mutanten- Linien	Min.	11.1	25.2	2.7
		Max.	22.3	32.7	6.2
		Mittel	16.3	29.4	4.6
	Boruta		17.9	28.6	4.9
	Probor		17.7	29.8	6.6
	Boregine		17.8	27.9	5.5
gesamt	Mutanten- Linien	Min.	20.8	26.9	6.2
		Max.	32.9	32.7	10.0
		Mittel	28.4	29.9	8.4
	Boruta		28.3	28.1	7.7
	Probor		35.2	30.9	10.7
	Boregine		36.7	27.6	9.9

Die Varianzanalyse der Merkmale beider Gruppen ergab signifikante Ortseffekte. Mit Ausnahme des Merkmals Lager bei Reife wiesen die Merkmale auch signifikante Genotypeffekte auf (Tab. 6, Tab. 7). Zusätzlich wurden signifikante Genotyp x Ort-Interaktionen nachgewiesen. Die Heritabilitäten fielen mit Ausnahme für das Merkmal Lager bei Reife alle sehr hoch aus.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Selektionsentscheidung zur Verbesserung der im Rahmen dieser Leistungsprüfungen untersuchten Merkmale vorrangig auf der Basis von mehrortigen Prüfungen erfolgen sollte und bestätigen damit eine allgemeine züchterische Regel. Hohe Heritabilitäten und die durch die signifikanten Genotypeneffekte nachgewiesene hohe genotypische Varianz belegen, dass innerhalb des Mutanten-Sortiments die Voraussetzungen für die

Selektion leistungsstarker Linien und somit für das Erreichen von Zuchtfortschritt gegeben sind.

Tab. 6 Varianzanalyse und Heritabilitäten, Frühe Gruppe

	Genotyp- effekte	Orts- effekte	G x O- Interaktionen	h ²
Kornertrag	**	**	**	0.94
Gelbreife	**	**	**	0.92
TKG	**	**	**	0.95
Wuchshöhe	**	**	**	0.91
Blühbeginn	**	**	**	0.95
Blühende	**	**	**	0.96
Alkaloid µg/g	**	**	**	0.87
Prot_TM	**	**	**	0.90
Proteinertrag	**	**	**	0.94
Lager b. Reife		**	**	0.00

Tab. 7 Varianzanalyse und Heritabilitäten, Späte Gruppe

	Genotyp- effekte	Orts- effekte	G x O- Interaktionen	h ²
Kornertrag	**	**	**	0.94
Gelbreife	**	**	**	0.92
TKG	**	**	**	0.97
Wuchshöhe	**	**		0.88
Blühbeginn	**	**	**	0.98
Blühende	**	**	**	0.94
Alkaloid µg/g	**	**	**	0.92
Prot_TM	**	**	(+)	0.92
Proteinertrag	**	**	**	0.92
Lager b. Reife		**	**	0.14

4.2.2 Merkmalskorrelationen

Korrelationsanalysen (Tab. 8, Tab. 9) der erfassten Merkmale können zur Ableitung züchterischer und pflanzenbaulicher Empfehlungen genutzt werden.

In beiden Gruppen wurde eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen der Bestandesdichte und dem Kornertrag festgestellt. Dies zeigt, dass Lupinen bei einer reduzierten Bestandesdichte im Lauf der Vegetationsperiode nur eingeschränkt in der Lage sind, dies auszugleichen. Starke Konkurrenz durch Unkraut führt anschließend zu Einbußen im Kornertrag. Zur Ausschöpfung des vorhandenen

Kornertragspotenzials muss demnach dem Erreichen der optimalen Bestandesdichte pflanzenbaulich eine hohe Wertigkeit beigemessen werden.

Bei einer erwarteten engen, signifikant positiven Korrelation zwischen Kornertrag und Proteinertrag wurde eine unerwartete, schwach positive, indes unterhalb des Signifikanzlevels liegende Korrelation zwischen Kornertrag und Proteingehalt ermittelt.

Tab. 8 Merkmalskorrelationen, Frühe Gruppe

	Blühbeginn	Blühende	Bestandesdichte	Wuchshöhe	Lager bei Reife	Gelbreife	Kornertrag	TKG	Alkaloidgehalt	Proteingehalt	Proteinertrag
Blühbeginn	1										
Blühende	0.74 ***	1									
Bestandesdichte	-0.13	0.04	1								
Wuchshöhe	0.08	0.50 *	0.25	1							
Lager bei Reife	-0.11	-0.08	0.00	0.06	1						
Gelbreife	-0.01	-0.07	-0.09	0.25	0.20	1					
Kornertrag	-0.45	-0.37	0.73 ***	0.01	0.15	0.12	1				
TKG	-0.08	-0.05	0.34	0.35	0.18	0.52 **	0.50 *	1			
Alkaloidgehalt	-0.38 *	-0.50 *	0.16	-0.36	0.42 *	0.14	0.54 **	0.48 *	1		
Proteingehalt	-0.50 *	-0.54 **	0.02	-0.09	0.18	0.49	0.39	0.15	0.25	1	
Proteinertrag	-0.54 **	-0.47 *	0.64 **	-0.01	0.19	0.21	0.97 ***	0.45 *	0.54 **	0.59 **	1

Tab. 9 Merkmalskorrelationen, Späte Gruppe

	Blühbeginn	Blühende	Bestandesdichte	Wuchshöhe	Lager bei Reife	Gelbreife	Kornertag	TKG	Alkaloidgehalt	Proteingehalt	Proteinertrag
Blühbeginn	1										
Blühende	0.79 ***	1									
Bestandesdichte	-0.08	-0.15	1								
Wuchshöhe	0.58 ***	0.40 *	0.49 *	1							
Lager bei Reife	-0.04	-0.18	0.31	0.22	1						
Gelbreife	0.65 ***	0.23	-0.06	0.63 **	0.11	1					
Kornertag	-0.15	-0.09	0.82 ***	0.36	0.18	-0.15	1				
TKG	0.56 **	0.18	0.31	0.68 ***	0.11	0.69 ***	0.31	1			
Alkaloidgehalt	-0.06	-0.10	0.45 *	0.51 **	-0.00	0.24	0.39	0.37	1		
Proteingehalt	-0.08	-0.38	0.23	0.20	0.17	0.30	0.05	-0.12	0.10	1	
Proteinertrag	-0.16	-0.20	0.81 ***	0.38	0.21	-0.04	0.94 ***	0.23	0.37	0.37	1

4.2.3 Wertvolle Mutanten-Linien

Aus den Prüfungen zur Ertragsstabilität und Ertragsleistung sind einige Linien hervorgegangen, die aufgrund ihres homogenen Wuchstyps, eines hohen Kornertags, eines hohen Proteinertrags bei gleichzeitig niedrigem Alkaloidgehalt und hoher Platzfestigkeit als wertvolle Prebreeding-Linien fungieren können. Diese 21 Linien sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10 Mutantenlinien als potenziell wertvolles Prebreeding-Material

Linie	A4	A15	A3	A18	A5	A19	A17	A12	A7	B6	B11	B9	B5	B8	B3	B7	B10	B4	B22	B16	B19
Donor	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'	'Boruta'
Wuchstyp	hb	hb	hb	hb	hb	hb	zb	hb	zb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb	hb
Kornertrag	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Proteingehalt	++ ¹¹	+	+	+	+	+	+	+	+	++ ¹¹	++ ¹¹	+	++ ¹¹	+	++ ¹¹	+	++ ¹¹	++ ¹¹	+	++ ¹¹	++ ¹¹
Proteinertrag	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++ ¹	++	++	++	++	+	++	++	+	++	1
Alkaloidgehalt	-- ¹¹	--	11	--	11	--	11	--	11	1	11	11	1	11	1	11	11	11	--	11	--
Frühzeitigkeit (Blühbeginn)									--										--	11	--
Frühzeitigkeit (Gelbreife)	1	1	1	1	1	1	1	11	--	1	1	1	1	11	1	1	11	11			
Platzfestigkeit	x	x	x	x	x	x	x	x	x	xx	x	x	x	x	x	x	xx	x	x	xx	xx

Legende zu Tab.. 10

++	signifikant besser als Donor
+	besser als Donor
--	signifikant geringer /früher als Donor
-	geringer /früher als Donor
xx	signifikant besser als platzender Standard
x	besser als platzender Standard
hb	hoch angesetzt verzweigt
zb	nicht verzweigt
11	signifikant besser als Boregine
1	besser als Boregine

Hervorzuheben ist unter anderem die Linie A4 mit signifikant höherem Kornertrag, Proteingehalt und Proteinерtrag sowie signifikant niedrigerem Alkaloidgehalt im Vergleich zu ihrer Ausgangssorte ("Donor") Boruta. Zusätzlich zeichnete sich diese Linie durch eine gute Platzfestigkeit und einen signifikant höheren Proteingehalt sowie durch einen signifikant niedrigeren Alkaloidgehalt im Vergleich zu Boregine aus.

Weiterhin wiesen die Linien B6 und B11 signifikant höhere Kornerträge, Proteingehalte und -erträge im Vergleich zur Ausgangssorte auf, sowie eine gute Platzfestigkeit.

Des Weiteren hervorzuheben sind die Linien B16 und B19, die auf Probor als Donor zurückgehen und einen signifikant höheren Proteingehalt als die ohnehin schon proteinreiche Sorte Probor aufweisen.

Die Linien A12 und A17 zeichnen sich durch ihre Frühzeitigkeit aus, die dazu führte, dass sie signifikant früher gelbreif waren als Boregine.

Die multiple Merkmalsverbesserung dieser Linien bildet eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung neuer, ertragsstarker und ertragsstabiler Sorten.

4.3 Variationsbreite von Genbankmaterial

Zur Bestimmung der Variationsbreiten des Rohprotein- und Alkaloidgehaltes in genetischen Ressourcen wurden 229 Genbankakzessionen bezüglich dieser Qualitätsparameter charakterisiert. Zusätzlich wurde die Alkaloidzusammensetzung erfasst.

4.3.1 Alkaloidgehalt

Zwei der untersuchten Genbankakzessionen sind keine Blauen Lupinen, sondern wurden als *Lupinus luteus* bzw. *Lupinus cosentinii* beschrieben. Von den verbleibenden 227 Akzessionen sind 29 den Süßlupinen bis zu einem Gesamtalkaloidgehalt von 5000 µg/g TM zuzuordnen (Abb. 5).

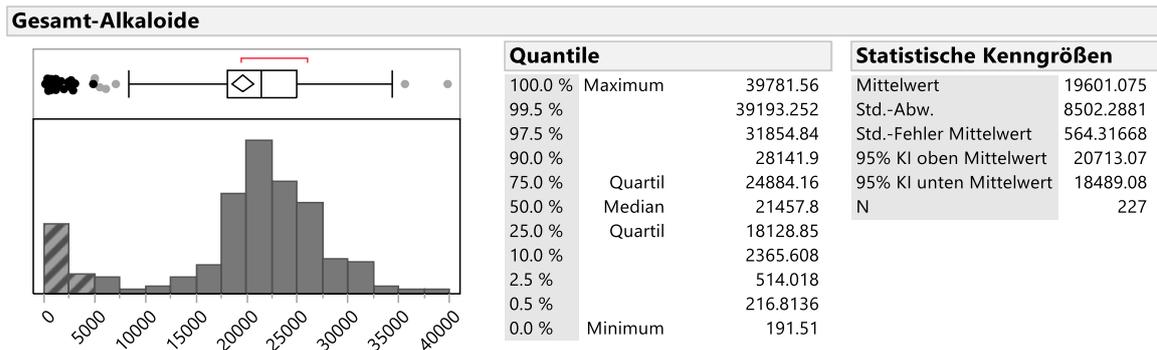


Abb. 5 Verteilung der Alkaloide 2015 und 2016

Davon befanden sich 7 im Anbau 2015 und 22 im Anbau 2016 (Abb. 6, Abb. 7). In den Abbildungen sind die Verteilungen der Alkaloidgehalte aus beiden Jahren gezeigt. Obwohl der Mittelwert des Alkaloidgehaltes aller untersuchten Akzessionen aus 2016 mit 1.75 % der TM niedriger lag als im Jahr 2015, war die Variationsbreite hier deutlich größer.

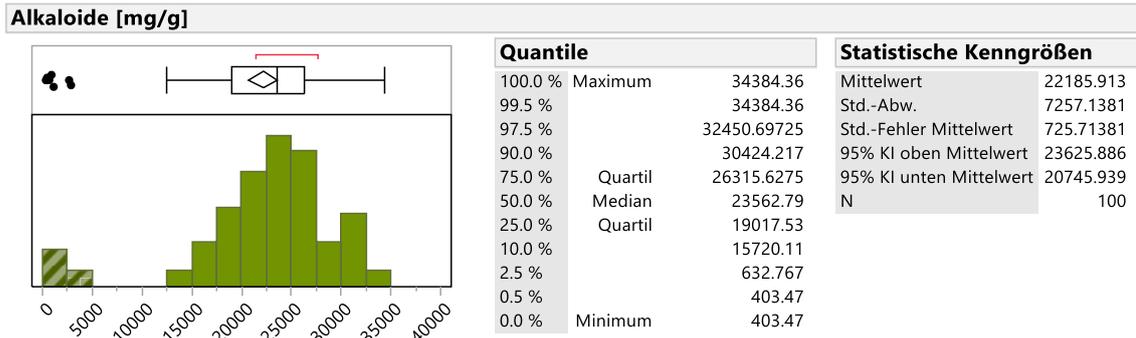


Abb. 6 Verteilung der Alkaloide 2015

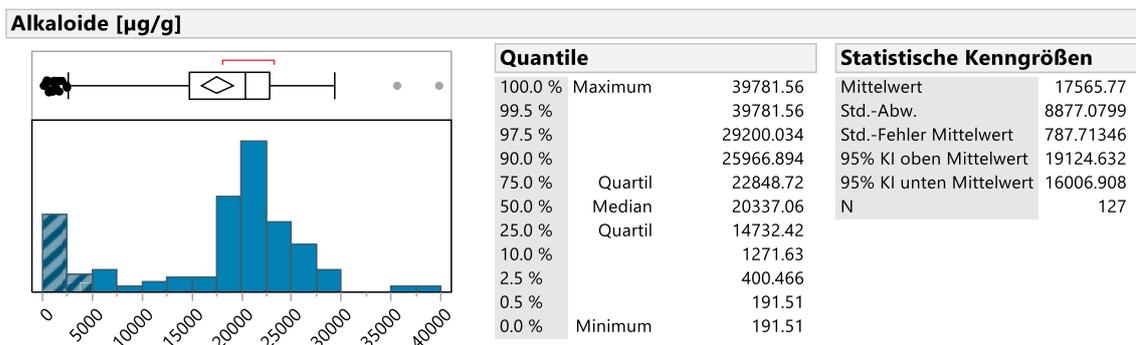


Abb. 7 Verteilung der Alkaloide 2016

Der analysierte Maximalgehalt betrug nahezu 4 % der TM und der gemessene Minimalwert von unter 0.02 % der TM lag im empfohlenen Bereich für eine Verwertung in Nahrungsmitteln. Für die Züchtung neuer Sorten kann ein unterschiedliches Spektrum an gefundenen Einzelalkaloiden ein Hinweis auf genetische Variabilität sein. Daher wurde der Anteil der Einzelalkaloide in der Gesamtsumme ausgewertet.

4.3.2 Alkaloidzusammensetzung

Die in Blauen Lupinen am häufigsten gefundenen Alkaloide sind Lupanin, 13-Hydroxylupanin, Angustifolin und Isolupanin. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Alkaloide, die häufig nur in Spuren vorkommen. Lupanin wurde im Mittel mit einem Anteil von 36 % an den Gesamtalkaloiden bestimmt. Der minimal gefundene Anteil lag bei 0.5 % und der maximale Anteil bei 69 % (Abb. 8).

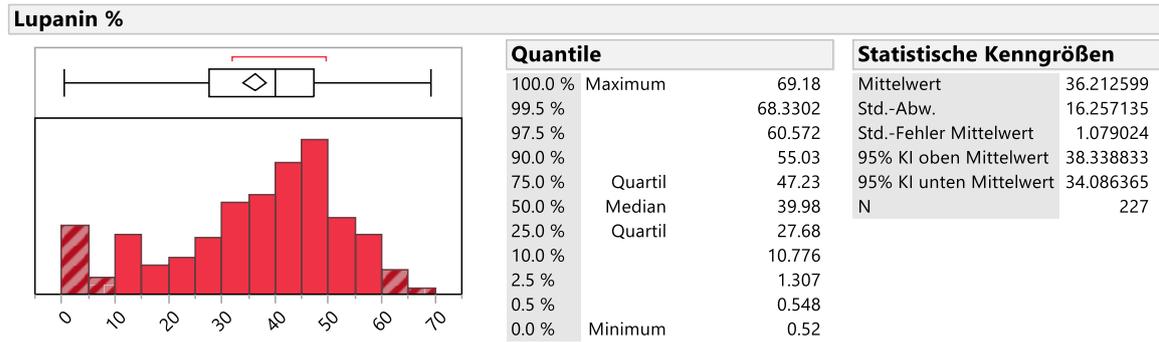


Abb. 8 Verteilung des relativen Anteils von Lupanin in den Alkaloiden

Für 13-Hydroxylupanin liegt der Mittelwert bei nahezu 44 % und die dazugehörigen Minimal- und Maximalwerte bei 22 % bzw. 73 % (Abb. 9).

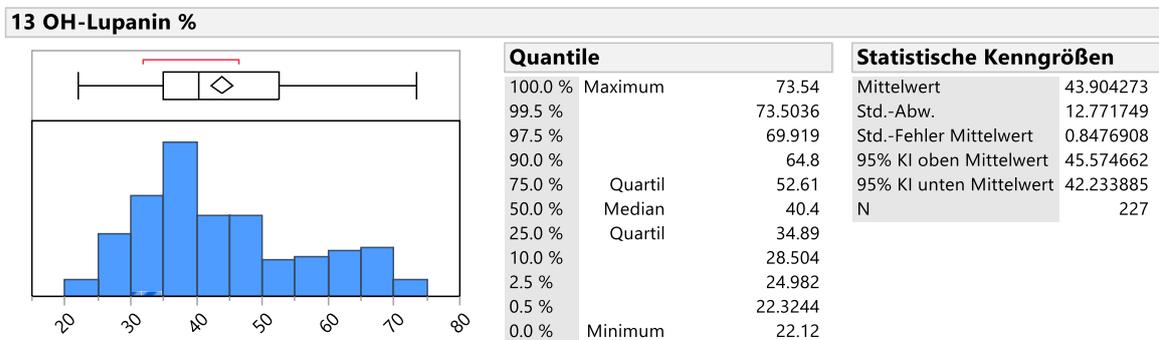


Abb. 9 Verteilung des relativen Anteils von 13-Hydroxylupanin in den Alkaloiden

Das vorwiegend in Blauen Lupinen vorhandene Angustifolin hat mit ca. 17 % einen deutlich geringeren mittleren Anteil. Aber auch hier wurde eine hohe Variationsbreite im Anteil von minimal 1 % und maximal 37 % beobachtet (Abb. 10).

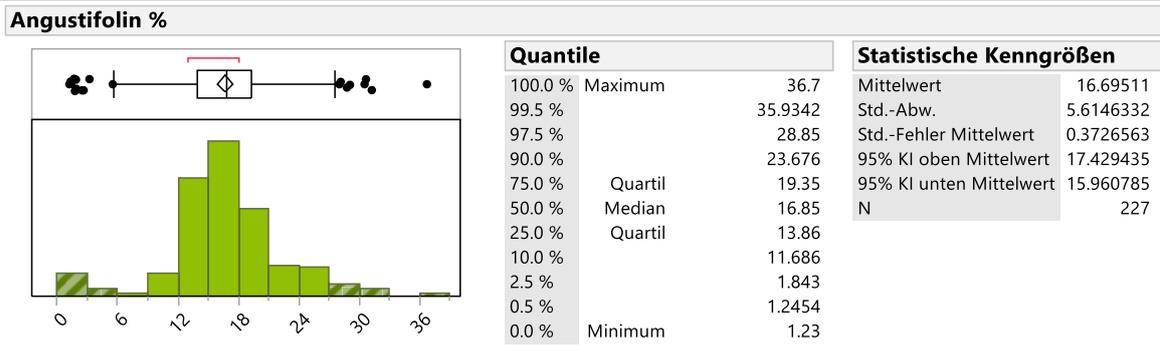


Abb. 10 Verteilung des relativen Anteils von Angustifolin in den Alkaloiden

Isolupanin, ein Alkaloid, das in nahezu allen Lupinenarten vorhanden ist, wurde mit einem niedrigen Anteil von durchschnittlich 1.2 % ermittelt. Maximal war es in einer Akzession mit 5 % des Gesamtalkaloidgehaltes zu beobachten (nicht dargestellt).

4.3.3 Proteingehalt

Der mittlere Protein-Gehalt der 227 Genbankakzessionen von Blauen Lupinen betrug in den beiden Anbaujahren 31.8 % TM. Die Variationsbreite lag zwischen minimal 23.6 und maximal 38.8 % der Trockenmasse (Abb. 11).

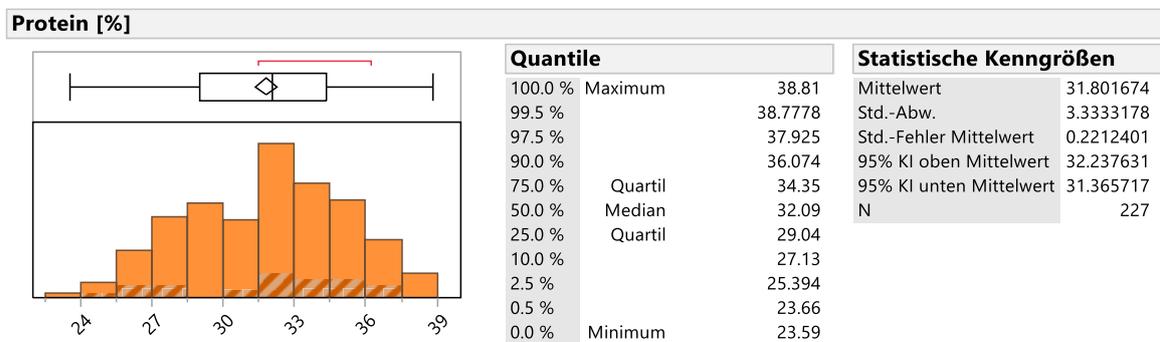


Abb. 11 Verteilung des Protein-Gehaltes der gesamten Genbank-Akzessionen

Im Anbaujahr 2015 war der durchschnittliche Proteingehalt um einen Prozentpunkt höher als 2016 (Abb. 12, Abb. 13). Andererseits war 2016 neben den niedrigeren Minimalwerten auch der Wertebereich vergrößert.

Werden die Akzessionen mit niedrigem Alkaloidgehalt hervorgehoben (Abb. 11, schraffiert dargestellt), so wird nahezu die ganze Variationsbreite im Proteingehalt abgedeckt.

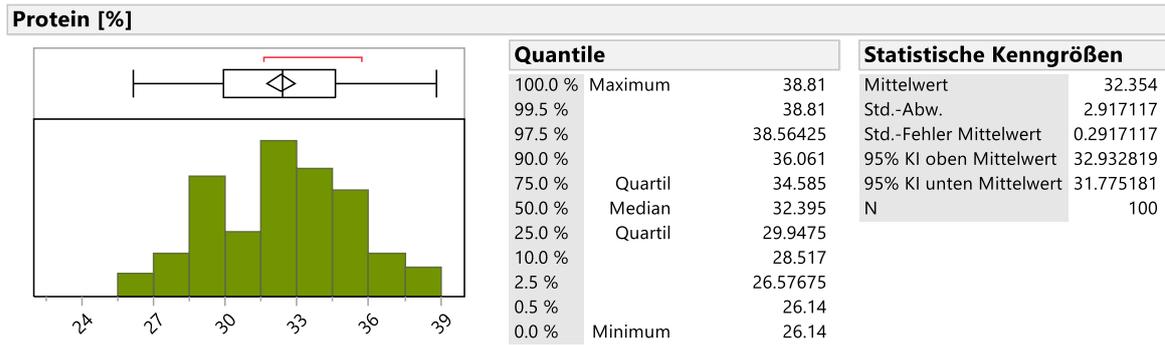


Abb. 12 Protein-Verteilung 2015

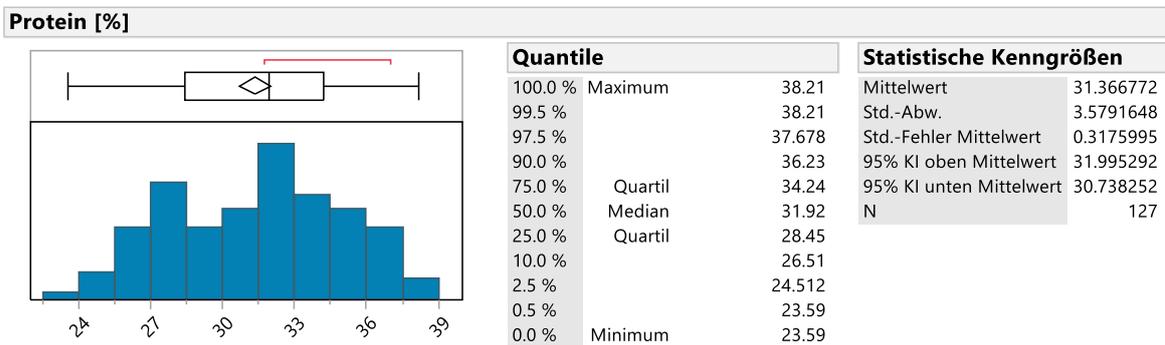


Abb. 13 Protein-Verteilung 2016

Aus züchterischer Sicht - hoher Protein-Gehalt (≥ 33 % TM) bei gleichzeitig niedrigem Alkaloidgehalt (≤ 0.2 % TM) - konnten 10 interessante Akzessionen (blau markiert) identifiziert werden (Abb. 14).

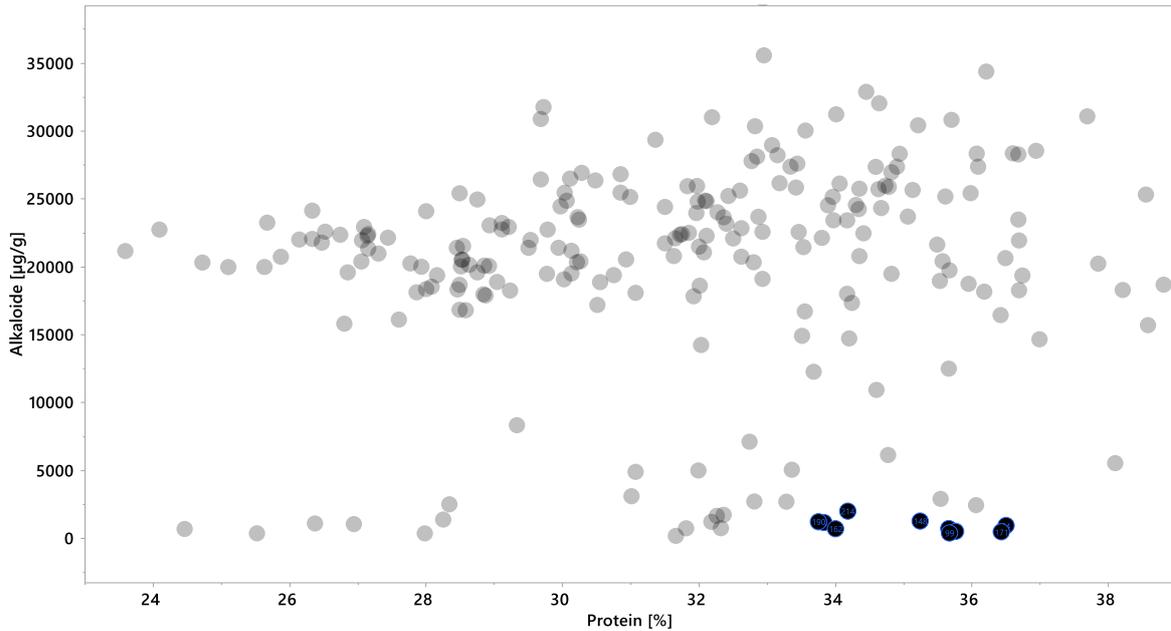


Abb. 14 Diagramm Gesamtalkaloide - Protein

Insgesamt wurden 227 Akzessionen an Blauen Lupinen auf Protein- und Alkaloidgehalt untersucht. Von diesem Genbankmaterial konnten 12 Akzessionen mit einem Alkaloidgehalt von <0.1 % TM bzw. 29 Akzessionen mit einem Alkaloidgehalt von <0.5 % TM gefunden werden. Im gleichen Material wurden 5 Akzessionen mit einem Proteingehalt von >38 % TM bzw. 24 mit einem Proteingehalt von >36 % TM bestimmt.

Neben der nasschemischen Analyse des Rohprotein- bzw. Alkaloidgehaltes wurden für alle unvermahlene Kornproben, standardmäßig vermahlene Schrotproben und ausgewählten Einzelkornproben NIR-Spektren (700-2500 nm) mittels Reflexions- bzw. Transflexionsmessungen aufgenommen. Damit sollte überprüft werden, inwieweit die NIR-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung des Protein- und Alkaloidgehaltes in Lupinen geeignet ist. Da für züchtungsrelevante Arbeiten besonders auch die Einzelkornanalyse von Interesse ist, wurden zusätzlich insgesamt 860 Einzelkörner aus 38 Genbankakzessionen nasschemisch exakt bezüglich Protein- bzw. Alkaloidgehalt charakterisiert.

4.3.4 Genetische Variabilität von Genbankakzessionen bezüglich Rohprotein und Alkaloidgehalt bzw. -zusammensetzung

Für eine Verwertung von Lupinen im Feed- und Food-Bereich werden Grenzwerte im Gesamtalkaloid-Gehalt von maximal 500 bzw. 200 µg/g (0.05 bzw. 0.02 %) angestrebt. Das hier untersuchte Genbankmaterial kann aber immer wieder ein oder sogar mehrere Fremdkörner enthalten, die von einem bitteren Genotyp stammen. Das haben ausgewählte Einzelkornanalysen von verschiedenen Akzessionen gezeigt. Die hier ermittelten Alkaloidgehalte sind aus einer gemahlten Mischprobe der einzelnen Akzessionen bestimmt worden. Die Einordnung als Süßlupine wurde daher bis zu einen Gesamtgehalt von 5000 µg/g (0.5 %) erweitert. In der Tab. 11 sind die Anzahl von Akzessionen bis zum genannten Alkaloidgehalt gezeigt.

Tab. 11 Verteilung der Gesamt-Alkaloidgehalte innerhalb der Genbankakzessionen

Alkaloidgehalt in µg/g TM ≤	Anzahl Akzessionen
1000	12
2000	21
3000	27
4000	28
5000	29

Unterschiede in der Zusammensetzung der Alkaloide sind im Allgemeinen genetisch bedingt. Daher sind Abweichungen in der Zusammensetzung von denen der aktuell zugelassenen Sorten zur Erweiterung der genetischen Diversität besonders interessant. Die drei Alkaloide Lupanin, 13-Hydroxylupanin und Angustifolin bestimmen in der Summe nahezu den Gesamtgehalt. Bei einer vorgenommenen Hauptkomponentenanalyse sollte bei einer voneinander unabhängigen Synthese der Alkaloide ein Winkel von 120° zwischen den einzelnen Komponenten erwartet werden. Es zeigt sich aber, dass ein höherer Lupaninanteil an den Gesamtalkaloiden gleichzeitig zu geringeren Anteilen an 13-Hydroxylupanin und Angustifolin führt und dass höhere Angustifolin-Anteile häufig auch mit hohen

13-Hydroxylupanin Anteilen korreliert sind (Abb. 15). So sind die in der Abbildung rot markierten Akzessionen durch hohe Anteile an Angustifolin charakterisiert, während die grün markierten Akzessionen hohe Anteile an 13-Hydroxylupanin aufweisen.

Gemeinsame Schnittmengen sind durch hohe Anteile beider Alkaloide gekennzeichnet.

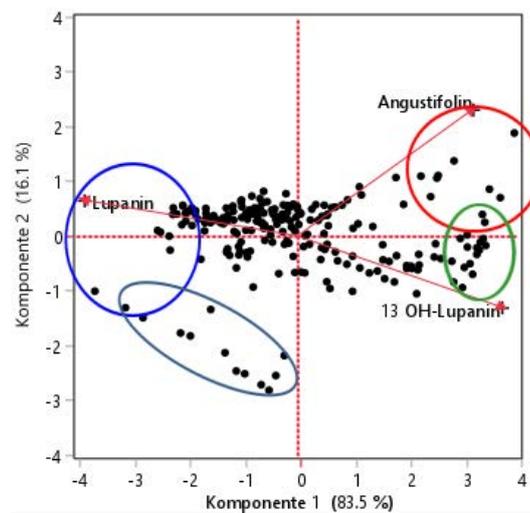


Abb. 15 Hauptkomponentenanalyse der Alkaloide

Blau markierte Akzessionen bedeuten hohe Anteile an Lupanin und blaugrau markierte geringe Angustifolin-Anteile. Auch hier sind Überschneidungen beider Kreise zu finden. Dies kann an Beispielen der Gaschromatogramme einzelner Akzessionen gezeigt werden (Abb. 16, Abb. 17).

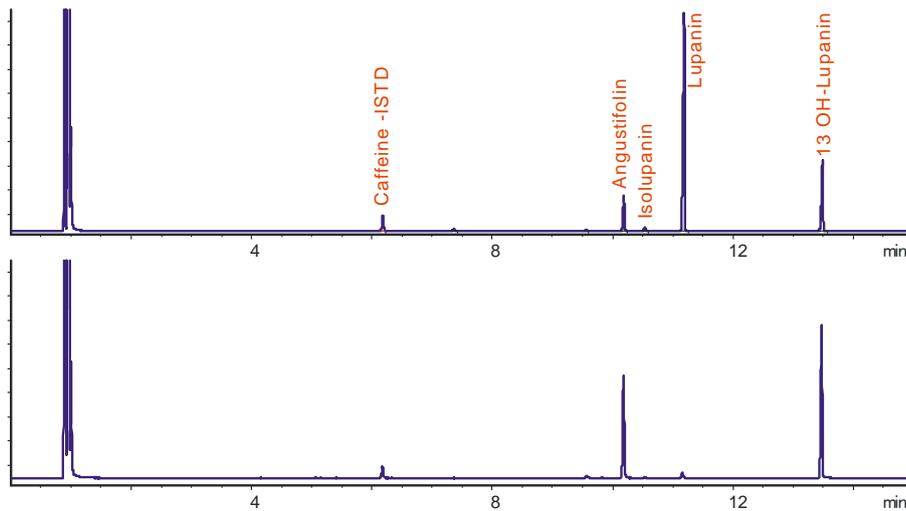


Abb. 16 Chromatogramm einer Akzession mit sehr hohen Anteilen an Lupanin oben (Nr. 77) und andererseits sehr hohen Anteilen an Angustifolin und 13-Hydroxylupanin unten (Nr. 94)

Der Übersichtlichkeit halber, sind die Bezeichnungen der Alkaloide im oberen und unteren Teil nur einmal aufgeführt. Die Nr. 77 hat mit den höchsten Anteilen an Lupanin gleichzeitig noch die beiden typischen anderen Hauptalkaloide der Blauen Lupine. Dagegen hat die Nr. 94 fast kein Lupanin, dafür die höchsten Anteile an Angustifolin und hohe Anteile an 13-Hydroxylupanin.

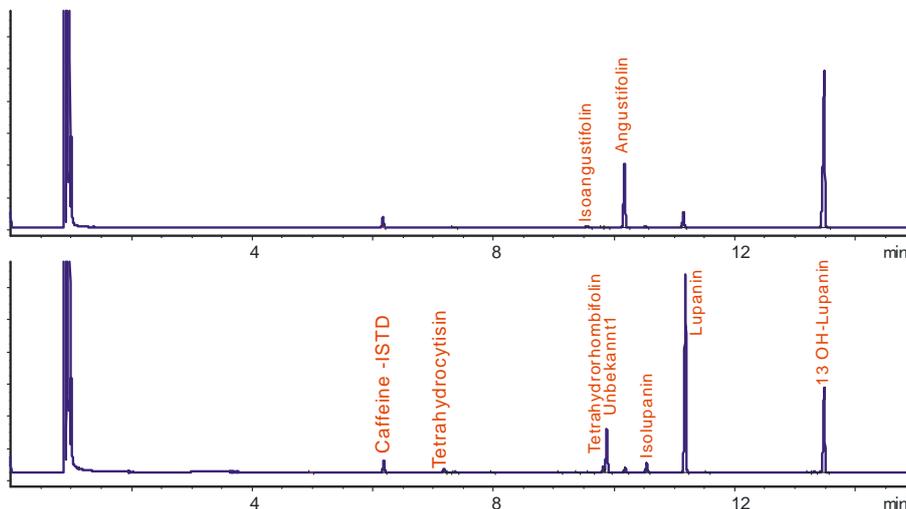


Abb. 17 Chromatogramm mit sehr hohen Anteilen an 13-Hydroxylupanin oben (Nr. 90) und andererseits mit nahezu keinem Anteil an Angustifolin unten (Nr. 66)

In Abb. 17 hat die Nr. 90 den höchsten Anteil an 13-Hydroxylupanin und in Nr. 66 wurden nur geringe Mengen an Angustifolin gefunden.

In Tab. 12 sind die 10 Akzessionen mit den jeweils höchsten bzw. niedrigsten Anteilen der einzelnen Hauptalkaloide vom Gesamtalkaloidgehalt absteigend bzw. aufsteigend zusammengestellt. Rot gekennzeichnete Akzessionen treten zweifach auf und blau markierte sind im Gehalt aller drei Hauptalkaloide auffällig.

Tab. 12 Genotypen mit hohen(+) und niedrigen(-) Anteilen der Hauptalkaloide

Lupanin		13-Hydroxylupanin		Angustifolin	
Nr. (-)	Nr. (+)	Nr. (-)	Nr. (+)	Nr. (-)	Nr. (+)
95	154	154	90	66	94
62	77	141	111	118	37
136	225	77	83	154	102
115	229	227	82	17	32
32	141	107	108	16	36
110	133	225	87	76	99
94	14	229	115	134	89
82	118	14	95	137	174
87	227	133	109	179	81
81	228	118	100	21	112

Neben den typischen Hauptalkaloiden wurden noch andere in Spuren vorkommende Alkaloide gefunden. Dazu zählen Isoangustifolin, Ammondendrin, Tetrahydrorhombifolin, Multiflorin und einige andere z.T. nicht identifizierte Verbindungen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Alkaloide und den Hauptalkaloiden war nicht erkennbar. Lediglich bei hohen Mengen an Lupanin konnte häufig auch etwas mehr Tetrahydrorhombifolin gefunden werden.

Die Toxizität der Alkaloide in Lupinen wird durch die höheren Mengen der Hauptalkaloide hervorgerufen. Bei mehr als 96 % der 227 untersuchten Akzessionen hatten diese drei Hauptalkaloide Lupanin, 13-Hydroxylupanin und

Angustifolin einen Gesamtanteil von mehr als 90 %, bei mehr als 88 % der Genotypen war der Gesamtanteil aus diesen drei Alkaloiden sogar größer als 95 %.

Ein Zusammenhang zwischen dem Alkaloid- und dem Proteingehalt war nicht erkennbar. Das zeigt auch die Hauptkomponentenanalyse der beiden Parameter (Abb. 18).

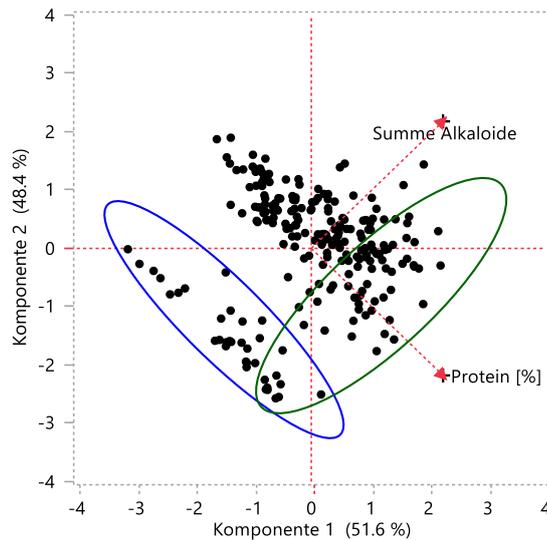


Abb. 18 Hauptkomponentenanalyse von Protein- und Alkaloidgehalt

Die gemeinsame Schnittmenge der blau markierten Akzessionen (geringer Alkaloid-Gehalt) mit den grün markierten (hoher Protein-Gehalt) stellt die für die Züchtung interessanten Prüfglieder dar. In Tab. 13 sind sie noch einmal zusammengestellt.

Tab. 13 Proteinreiche und alkaloidarme Akzessionen

Alkaloid	Protein	Akzessions-Nr.
<0.1 %	>34 % TM	162, 6 , 99, 9 , 171, 64
<0.5 %	>35 % FM	148, 12, 6 , 9 , 225, 64

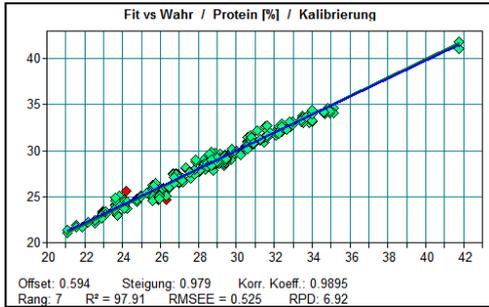
4.3.5 NIR-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung des Rohprotein- bzw. Alkaloidgehaltes

Die Kalibrationen wurden spezifisch im Schrot, in Körnern und in Einzelkörnern für die Merkmale Rohprotein- und Alkaloidgehalt durchgeführt. Für die Messungen wurden „klimatisierte“ lagerfähige Proben verwendet.

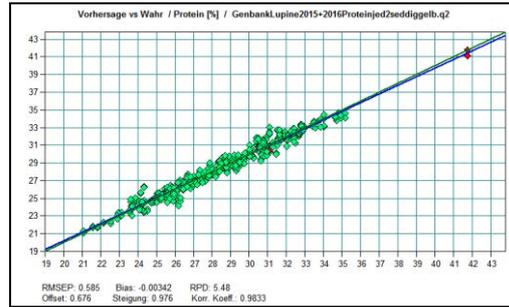
Die Auswertung erfolgte mit der Software OPUS QUANT2 der Fa. Bruker. Dabei handelt es sich um ein multivariates PLS (Partial Least Squares) Verfahren, das nicht nach Regressionskoeffizient und Steigung beurteilt werden kann. Die Bewertung der Kalibrierergebnisse erfolgte mit den üblichen Fehlermaßen der Kalibrationsstatistik. Dazu werden mittlere Abweichungen der NIR-Vorhersagen von den Referenzwerten der Komponenten berechnet: RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation), RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation) und RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction). Zusammen mit dem RPD-Wert (Residual Prediction Deviation; Verhältnis zwischen der Standardabweichung des Validationssets (SD) zum Standardfehler der Vorhersage (SEP) ist dann eine hinreichende Bewertung der Kalibrationen möglich. Zusätzlich kann mit orientierendem Charakter das Bestimmtheitsmaß (R^2) angegeben werden.

- (a) Für das Rohprotein ergaben sich die folgenden Kalibrationen bzw. Test-Set Validierungen (Vorhersagen) bzw. im Fall der Einzelkörner nur eine Kreuzvalidierung, da der Datensatz für eine unabhängige Test-Set-Validierung nicht groß genug war ((b)

Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21).

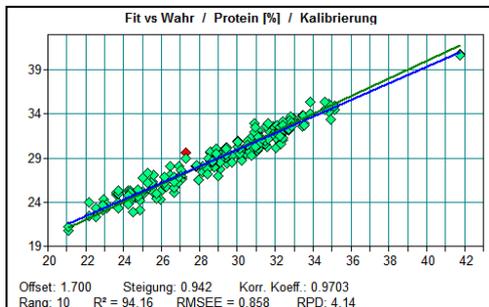


(b)

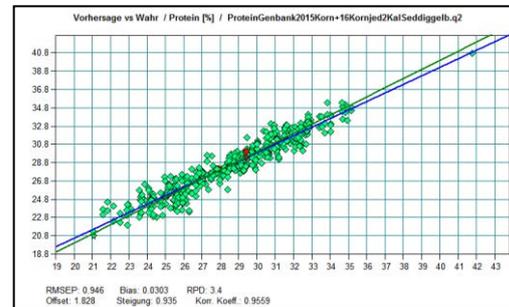


(b)

Abb. 19 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Rohproteingehaltes im Schrot der untersuchten Genbankakzessionen

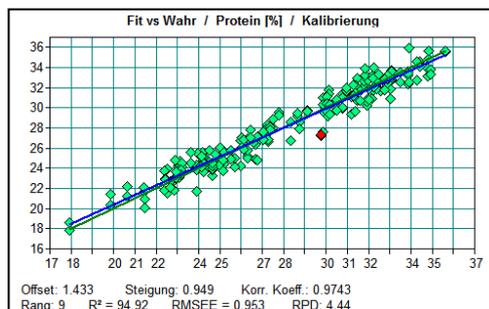


(a)

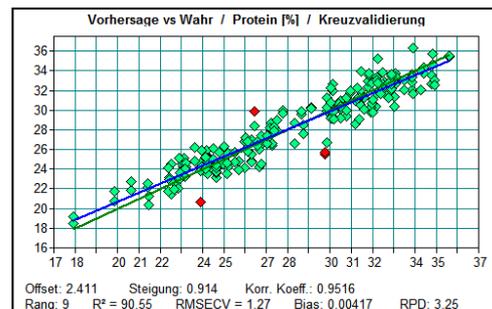


(b)

Abb. 20 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Rohproteingehaltes in ganzen Körnern der untersuchten Genbankakzessionen



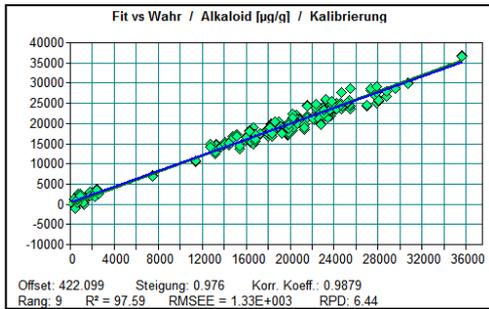
(a)



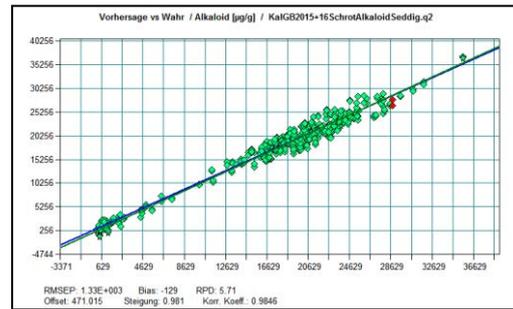
(b)

Abb. 21 Kalibration (a) bzw. Kreuzvalidierung (b) des Rohproteingehaltes in Einzelkörnern der untersuchten Genbankakzessionen

Parallel erfolgte die Erstellung von Kalibrierungen für den Alkaloidgehalt (Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24).

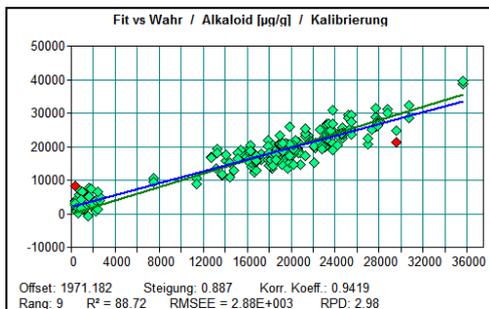


(a)

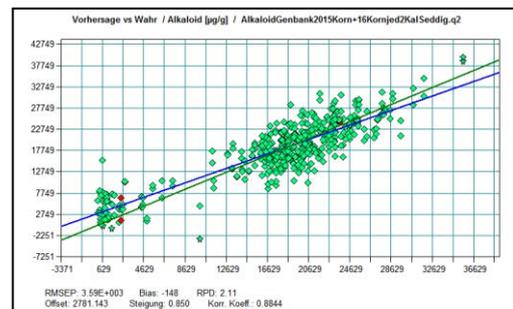


(b)

Abb. 22 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes im Schrot der untersuchten Genbankakzessionen

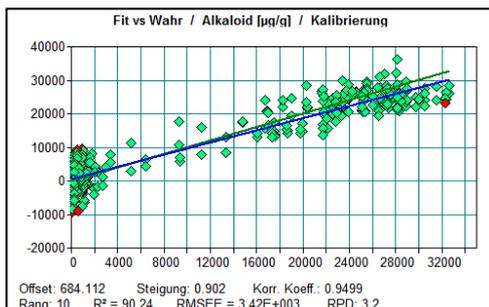


(a)

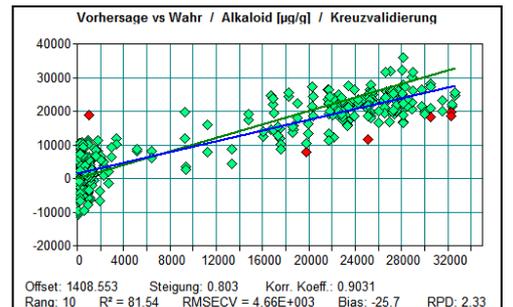


(b)

Abb. 23 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes in ganzen Körnern der untersuchten Genbankakzessionen



(a)



(b)

Abb. 24 Kalibration (a) bzw. Vorhersage (b) des Alkaloidgehaltes in Einzelkörnern der untersuchten Genbankakzessionen

Die Ergebnisse in Form der wichtigsten Kenngrößen der Kalibrationsstatistik sind in der folgenden Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14 Kalibrations- und Validationsergebnisse für Rohprotein- und Alkaloidgehalt von Genbankakzessionen der Blauen Lupine im Schrot, in ganzen Körnern und im Einzelkorn

	Kalibrierung			Vorhersage (Kreuzvalidierung)		
	RMSEE	R ² cal	RPD	RMSEP (RMSECV)	R ² val	RPD
	<u>Rohproteingehalt</u>					
Schrot	0.525	0.98	6.92	0.585	0.97	5.48
Körner	0.858	0.94	4.14	0.946	0.91	3.4
Einzelkorn	0.953	0.95	4.44	1.27	0.91	3.25
	<u>Alkaloidgehalt</u>					
Schrot	1330	0.98	6.44	1330	0.97	5.71
Körner	2880	0.89	2.98	3590	0.78	2.11
Einzelkorn	3420	0.90	3.2	4660	0.81	2.33

Für die Kalibrationen konnte auf Proben aus zwei Erntejahren von zwei Versuchsstandorten zurückgegriffen werden, die von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt wurden. Für die Einzelkornuntersuchungen wurden zunächst Genbankakzessionen ausgewählt, die in der nasschemischen Analyse eine breite Spanne in beiden Qualitätsparametern garantierten.

Für den **Rohproteingehalt** konnten Kalibrationen erstellt werden, die zufriedenstellende Ergebnisse liefern (Tab. 14). Die Bestimmtheitsmaße unterscheiden sich wenig. Die RPD-Werte der Kalibrierungen liegen zwischen 4,14 - 6,92 und lassen damit eine praktische Anwendung zu. Üblicherweise sind RPD-Werte unter 2 für ein Screening nicht geeignet. Während die RPD-Werte bei Körnern und im Einzelkorn über 4 liegen und damit ein angemessenes Screening zulassen, ist im Schrot (RPD-Wert von 6,92) sogar eine sehr gute Kalibrierung für

eine entsprechende Qualitätssicherung entstanden. Für die Kalibrierung des Rohproteingehaltes scheint es darüber hinaus unerheblich zu sein, ob es sich um Blaue, Gelbe oder Weiße Lupinen handelt. Die im untersuchten Sortiment nachweislich enthaltenen „nicht Blauen“ Lupinen (s.o.) fielen an keiner Stelle als Ausreißer auf. Bei einer Ausweitung des Untersuchungsmaterials ist die Kalibrierkurve in dieser Hinsicht zu erhärten.

Auch für den **Alkaloidgehalt** konnten entsprechende Kalibrationen erstellt werden. Im Schrot kann, wie beim Rohproteingehalt, von einer sehr guten Kalibrierung (RPD-Wert von 6,44) ausgegangen werden, wobei zu beachten ist, dass in diesem Fall mit einer mittleren Abweichung der NIR-Vorhersagen von den Referenzwerten mit bis zu 1330 µg/g TM zu rechnen ist. Damit kann diese, an sich sehr gute, Kalibrationskurve kaum für eine exakte Selektion „süßer“ (Grenze Alkaloidgehalt 500 µg/g TM) Genotypen verwendet werden. Das liegt an der sehr kleinen absoluten Alkaloidkonzentration und den damit verbundenen geringfügigen Änderungen in den Spektren. Für ein Screening (mit den angegebenen Abweichungen) ist die Kalibrierung sehr gut zu verwenden. In Körnern und Einzelkörnern ist mit den Kalibrierungen (RPD-Werte von 2,98 – 3,2) maximal eine grobe Vorselektion möglich. Eine angestrebte züchtungsrelevante zerstörungsfreie Selektion von Einzelkörnern (die dann im weiteren Züchtungsprozess verwendet werden können) mit einem definierten Alkaloidgehalt von max. 500 µg/g TM, ist unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Im Gegensatz zu den Rohprotein-Kalibrierungen fielen bei der Kalibrierung bezüglich Alkaloidgehalt die „nicht Blauen“ Lupinen besonders auf. Das sollten die Auswirkungen deutlich veränderter Alkaloidzusammensetzungen und damit veränderter Spektren sein. Bei weiterführenden künftigen Arbeiten sind diese Fakten zu klären.

5 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse bilden eine gute Grundlage für die Züchtung neuer ertragsstarker sowie ertragsstabiler Lupinensorten.

6 Gegenüberstellung der geplanten zu den erreichten Zielen

Ziel des Projektes war es, die Ertragsstabilität und die Ertragsleistung der Süßlupine zu erhöhen.

Folgende Ziele wurden dabei erreicht.

Erhöhung der Ertragsstabilität durch ...

- Einschätzung des Anthraknose-Resistenzniveaus der Prebreeding-Linien in Feldtests.
- Entwicklung nahezu diagnostischer Selektionsmarker für den Resistenzlocus *LanrBo*, die für eine markergestützte Einkreuzung in Zuchtmaterial zur Verfügung stehen sowie der Nachweis, dass die beiden bekannten Resistenzgene *LanrBo* und *Lanr1* unabhängig voneinander sind
- Genetische Analyse einer Anthraknose-Resistenz in der Gelben Lupine und damit die Benennung eines monogen dominant vererbten Faktors, der in der Gelben Lupine Resistenz gegenüber Anthraknose vermittelt. Die Entwicklung eines Selektionsmarkers für den Locus konnte nicht abgeschlossen werden.
- Identifikation von signifikant platzfesteren Prebreeding-Linien und Zuchtstämmen im Vergleich zu einem stark platzenden Standard.

Erhöhung der Ertragsleistung durch ...

- Identifikation ertragsstarker Prebreeding-Linien in mehrjährigen und mehrortigen Leistungsprüfungen. Diese weisen zum Teil signifikante Erhöhungen im Kornertrag, Proteingehalt und Proteinertrag sowie signifikante Erniedrigungen im Alkaloidgehalt auf. Einige Linien zeigten sich als frühzeitig, und erlauben somit eine gute Integration in die Fruchtfolge.

Darstellung der Variationsbreite in Genbankmaterial durch ...

- Innerhalb eines Sets an Genbankakzessionen sind Alkaloidgehalt, -zusammensetzung sowie Rohproteingehalt bestimmt worden und eine hohe Variationsbreite identifiziert worden.

7 Zusammenfassung

Ziel des Projektes war die züchterische Verbesserung der Produktivität der Süßlupine.

Dies wurde einerseits erzielt durch eine Erhöhung der Ertragsstabilität. In Bezug auf die Anthraknoseresistenz wurden eng gekoppelte Marker für den Locus *LanrBo* entwickelt. Zudem wurde gezeigt, dass die beiden Resistenzloci *LanrBo* und *Lanr1* voneinander unabhängig vererbt werden. Eine markergestützte Einkreuzung und Zusammenführung ("Pyramidisierung") beider Gene in aktuell bestehendes Zuchtmaterial ist somit möglich. Mit Blick auf die Anthraknoseresistenz bei der Gelben Lupine ist der aufgeklärte Vererbungsmodus eine gute Grundlage für die Verfolgung des Gens in weiteren Kreuzungsprogrammen sowie für die Selektionsmarkerentwicklung.

Hinsichtlich der Platzfestigkeit sind Mutanten-Linien sowie Zuchtstämme mit publizierten Selektionsmarkern für die beiden rezessiven Platzfestigkeitsgene *lentus* und *tardus* charakterisiert worden. Deren signifikant verminderte Platzanfälligkeit wurde in Feldtest nachgewiesen. Auch hier ist eine markergestützte Selektion möglich.

Darüber hinaus konnte bei der Blauen Lupine Prebreeding-Material mit verbesserter Ertragsleistung gefunden werden. In einem Set an Mutanten-Linien wurden solche identifiziert, die einen signifikant erhöhten Kornertrag, Proteingehalt als auch Proteinertrag im Vergleich zu ihren Ausgangssorten aufwiesen. Im Vergleich zu der ertragsstarken Sorte Boregine ragten einige Linien durch einen erhöhten Proteingehalt und Proteinertrag sowie durch ihre Frühzeitigkeit heraus.

In einem Set von Genbankakzessionen, die erstmalig hinsichtlich ihrer Protein- und Alkaloidgehalte sowie der Alkaloidzusammensetzung untersucht worden sind, wurde eine breite Variabilität festgestellt. Dabei wurden auch Akzessionen identifiziert, die aufgrund ihres niedrigen Alkaloidgehaltes und gleichzeitig hohen Proteingehaltes einen züchterischen Wert haben könnten.

Zusammengefasst wurden im Vorhaben Linien identifiziert, die in mehreren Merkmalen (Kornertrag, Proteingehalt, Alkaloidgehalt, Platzfestigkeit) züchterisches Potenzial aufweisen. Unter Anwendung markergestützter Selektion erscheint es möglich, die aktuell bekannten Anthraknoseresistenzgene *LanrBo* und *Lanr1* in diese neuen Prebreeding-Linien einzulagern.

8 Literaturverzeichnis

- Barthelmes G (2018) Landessortenversuche 2017. In: Jahrestagung der GFL, 2018.
- Bermúdez Torres K, Quintos NR, Necha LLB, Wink M (2002) Alkaloid profile of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* CP Smith. Zeitschrift für Naturforsch C 57:243–247.
- Boersma J, Nelson M, Sivasithamparam K, Yang H (2009) Development of sequence-specific PCR markers linked to the *Tardus* gene that reduces pod shattering in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Mol Breed 23:259–267. doi: 10.1007/s11032-008-9230-2
- Boersma JG, Buirchel BJ, Sivasithamparam K, Yang H (2007) Development of two sequence-specific PCR markers linked to the *le* gene that reduces pod shattering in narrow-leaved Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Genet Mol Biol 30:623–629.
- Boersma JG, Pallotta M, Li C, et al (2005) Construction of a genetic linkage map using MFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Cell Mol Biol Lett 10:331–344.
- Fischer K, Dieterich R, Nelson MN, et al (2015) Characterization and mapping of LanrBo: a locus conferring anthracnose resistance in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Theor Appl Genet 128:2121–2130. doi: 10.1007/s00122-015-2572-3
- Fischer K, Rudloff E, Roux SR, et al (2018) Generating genetic variation in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) for plant architecture by ethyl methanesulfonate mutagenesis. Plant Breed 137:73–80. doi: 10.1111/pbr.12558
- Gladstones JS (1967) Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus*. Aust J Exp Agric 7:360–366.

- Hackbarth J (1938) Cytologie und Vererbung bei den Lupinenarten. *Der Züchter* 10:33–41. doi: 10.1007/BF01812053
- Hane JK, Ming Y, Kamphuis LG, et al (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. doi: 10.1111/pbi.12615
- Kamphuis LG, Hane JK, Nelson MN, et al (2015) Transcriptome sequencing of different narrow-leaved lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnol J* 13:14–25. doi: 10.1111/pbi.12229
- Kjeldahl J (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen. *J Anal Chem* 366–382. doi: 10.1007/BF01338151
- Li X, Renshaw D, Yang HA, Yan GJ (2010) Development of a co-dominant DNA marker tightly linked to gene *tardus* conferring reduced pod shattering in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Euphytica* 176:49–58. doi: 10.1007/s10681-010-0212-1
- Li X, Yang H, Yan G (2012) Development of a co-dominant DNA marker linked to the gene *lentus* conferring reduced pod shattering for marker-assisted selection in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) breeding. *Plant Breed* 131:540–544. doi: 10.1111/j.1439-0523.2012.01978.x
- Nelson M, Phan HT, Ellwood S, et al (2006) The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* 113:225–238. doi: 10.1007/s00122-006-0288-0
- Nelson MN, Moolhuijzen PM, Boersma JG, et al (2010) Aligning a New Reference Genetic Map of *Lupinus angustifolius* with the Genome Sequence of the Model Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 17:73–83. doi: 10.1093/dnares/dsq001

- Parra-Gonzalez L, Aravena-Abarzua G, Navarro-Navarro C, et al (2012) Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics* 13:425.
- Parra Gonzalez L, Straub S, Doyle J, et al (2010) Development of microsatellites in *Lupinus luteus* (Fabaceae) and cross-species amplification in other lupine species. *Am J Bot* 97:e72–e74.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing.
- Rudloff E (2011) EMS-induced mutants-a valuable genetic pool for the breeding of narrow-leafed sweet lupin (*Lupinus angustifolius* L.). In: *Lupin crops: an opportunity for today, a promise for the future. Proceedings of the 13th International Lupin Conference, Poznan, Poland, 6-10 June 2011*. International Lupin Association, pp 92–98
- Rudloff E, Eickmeyer F, Wehling P (2008) Some aberrant variants in M2 lines and the resulting M3 lines of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) originating from EMS application. International Lupin Association, Canterbury, pp 328–331
- Ruge-Wehling B, Dieterich R, Thiele C, et al (2009a) Resistance to anthracnose in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. *J Kulturpfl* 61:62–65.
- Ruge-Wehling B, Dieterich R, Thiele C, et al (2009b) Resistance to anthracnose in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. *J Kulturpfl* 61:62–65.
- v. Sengbusch R (1930) Bitterstoffarme Lupinen. *Theor Appl Genet* 2:1–11.
- v. Sengbusch R, Zimmermann K (1937) Die Auffindung der ersten gelben und blauen Lupinen (*Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius*) mit nichtplatzenden Hülsen und die damit zusammenhängenden Probleme, insbesondere die der Süßlupinenzüchtung. *Der Züchter* 9:57–65. doi: 10.1007/BF01812469
- Yang H, Boersma J, You M, et al (2004) Development and implementation of a

sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol Breed* 14:145–151. doi: 10.1023/B:MOLB.0000038003.49638.97

Yang H, Tao Y, Zheng Z, et al (2013) Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species *Lupinus angustifolius* L. *PLoS One* 8:e64799. doi: 10.1371/journal.pone.0064799

9 Realisierte Veröffentlichungen

Vorträge und Poster

Ruge-Wehling B (2015): Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung bei Süßlupinen als wertvolle, heimische Eiweißpflanze. Vortrag. Biopark-Tagung. Bernburg-Strenzfeld. 19.2.2015.

Fischer K, Roux S, Jansen G, Wehling P, Ruge-Wehling B (2015): LupiBreed. Poster. XIV. International Lupin Conference. Mailand, Italien: 21.–26.06.2015.

Fischer K, Rudloff E, Dieterich R, Schmalenberg A-K, Wehling P, Ruge-Wehling B (2015): Novel growth types with improved yield potential in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Vortrag. XIV. International Lupin Conference. Mailand, Italien: 21.–26.06.2015.

Ruge-Wehling B Fischer K, Dieterich R, Rotter B, Winter P, Wehling P (2015) Improving yield stability in lupin – breeding for anthracnose resistance. Vortrag. XIV. International Lupin Conference. Mailand, Italien: 21.–26.06.2015.

Ruge-Wehling B (2015) Die Süßlupine: Erhöhung der Anbaubedeutung in Deutschland. Vortrag. Bio-vegane Landbautage. Burg Lohra. 13-15.11.2015.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Dieterich R (2015) Züchtungsforschung bei Lupine - Eine neue Eiweißressource für den Food Sektor, 66. Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2015, 23.–25.11.2015, Gumpenstein, Österreich, Vortrag.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Wehling P (2015): LupiBreed – Ein Verbundprojekt zur Erhöhung der Anbaubedeutung der Blauen Süßlupine. Vortrag. GFP-Sommertragung, Abteilung Öl- und Eiweißpflanzen. Gatersleben: 27.–28.05.2015.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S (2016) LupiBreed – Ein Verbund zur Erhöhung der Anbaubedeutung der Lupinen in Deutschland, Jahrestagung der Gesellschaft zur Förderung der Lupine, 13. Januar 2016, Teltow, Vortrag.

Züchtungsforschung bei Lupinen – Ein Beitrag zur Eiweißpflanzenstrategie des BMEL. Poster. Biofach. Nürnberg: 10.–13.02.2016.

Fischer K, Ruge-Wehling B, Roux S, Wehling P (2016): Züchtungsforschung bei Lupinen – Eine heimische Eiweißressource für Food und Feed. Vortrag. Zukunftsdialog Ökolandbau. 24.-25.5.2016. Eberswalde.

Fischer K, Ruge-Wehling B, Roux S, Wehling P (2016): LupiBreed – Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung zur Sicherung der einheimischen

Eiweißversorgung. Vortrag. GFPi Sommertagung der Abteilung Öl- und Eiweißpflanzen. Göttingen. 31.5.-1.6.2016.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Wehling P (2016) Süßlupinen als heimische Eiweißpflanzen für Tier und Mensch - Sweet lupins as home-grown protein sources for feed and food. Vortrag. 71. ALVA-Tagung. Klagenfurt. 30. – 31.5.2016.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Dieterich R, Rotter B, Winter P, Wehling P (2016) Improving yield stability in lupin – breeding for anthracnose resistance. Poster. 60. Deutsche Pflanzenschutztagung “Pflanzenschutz: Effizienz und Vielfalt”. Halle. 20.-23.09.2016.

Fischer K, Roux S, Jansen G, Dieterich R, Wehling P, Ruge-Wehling B (2016) LupiBreed – Valorisation of novel genetic variability of sweet blue lupin. Vortrag. II. International Legume Society Conference. Tróia, Portugal. 11.-14.10.2016.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Dieterich R, Rotter B, Winter P, Wehling P (2016). Marker-assisted breeding strategies for anthracnose resistance in lupin. Vortrag. II. International Legume Society Conference. Tróia, Portugal. 11.-14.10.2016.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Dieterich R (2016) Improving yield potential, yield stability and seed quality of lupins as protein plants (LupiBreed). In: Grausgruber H, Brandstetter A (Eds), Tagungsband 66. Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2015, p 35. Saatgut Austria, St. Pölten.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Wehling P (2016) Süßlupinenzüchtung – Was bringt die Zukunft. Vortrag. UFOP-Fachtagung Körnerleguminosen. Berlin. 20.9.2016.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Dieterich R, Rotter B, Winter P, Wehling P (2016) Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung der Süßlupine zur Sicherung der einheimischen Eiweißversorgung. Vortrag. Kongress „Hülsenfrüchte – Wegweiser für eine nachhaltigere Landwirtschaft“. Berlin. 3.-4.11.2016.

Fischer K, Roux S, Jansen G, Ruge-Wehling B (2017) LupiBreed – Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung der Süßlupine zur Sicherung der heimischen Eiweißversorgung. Vortrag. Tag der Lupine. Bernburg-Strenzfeld. 31.1.2017.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Dieterich R, Rotter B, Winter P, Wehling P (2016) Anthracnose resistance in lupin – genetic analysis and molecular markers. Vortrag. EUCARPIA Meeting „ Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics“. Vilnius, Litauen. 11.-14.9.2017.

Ruge-Wehling B, Fischer K, Roux S, Jansen G, Jurgens H-U, Wehling P (2018) LupiBreed – Erhöhung der Ertragsleistung und Ertragsstabilität bei Süßlupinen als agrarökologisch wertvolle Eiweißpflanzen. Vortrag. GFL-Tagung. Teltow. 17.1.2018.

Öffentlichkeitswirksame Veranstaltungen

Biofach, Nürnberg 02/2015, 02/2016

Lange Nacht der Wissenschaften, Rostock 05/2015, 05/2016, 05/2017

Feldtag Hülsenfrüchte im Internationalen Jahr der Leguminosen, Groß Lüsewitz,
12.6.2016

Tag der offenen Tür der Bundesregierung, Berlin, 27.-28.8.2016

Veröffentlichungen