

M. Wink (Hrsg.)

**LUPINEN 1991-
FORSCHUNG, ANBAU UND
VERWERTUNG**



1992

Universität Heidelberg

M. Wink (Hrsg.)

Anschritt des Herausgebers
Prof. Dr. Michael Wink
Institut für Pflanzenzüchtung
im Rheinheimer Feld 364
6900 Heidelberg
FRG

LUPINEN 1991- FORSCHUNG, ANBAU UND VERWERTUNG



1992

Universität Heidelberg

Anschrift des Herausgebers

Prof. Dr. Michael Wink
Institut für Pharmazeutische Biologie
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg
FRG

INHALT

	Seite
1. Vorwort	1
2. M. Wink: Lupinen 1991-Forschung, Anbau und Verwertung	2
3. H.E.Schmidt & H.B.Schmidt, E. Poll & E. Karl: Untersuchungen über zwei neue Viruserkrankungen der Andenlupine (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) in Mitteleuropa	5
4. U.Feiler: Erste Ergebnisse zum endogenen Pilzbefall von <i>Lupinus luteus</i> (Wurzel und Stengel) in Abhängigkeit von Standort und Fruchtfolge	14
5. E. Karl & H.E. Schmidt: Die Ausbreitung der Lupinenblattlaus (<i>Macrosiphum albifrons</i> Essig) in Mitteleuropa und ihre Bedeutung als Virusvektor	26
6. B.H.Emrich & M. Wink: Untersuchungen zum Alkaloidgehalt der Lupinenblattlaus <i>Macrosiphum albifrons</i> in Hinblick auf ihre durch die Wirtspflanze erworbene Toxizität	37
7. E.Käss & M. Wink: Molekulare Methoden zur Analyse der Evolution der Gattung <i>Lupinus</i>	53
8. I.Swatschek & M. Wink: Verwandtschaftsanalyse mittels DNA-Fingerprinting	66
9. M. Wink: Methoden zum Nachweis von Lupinenalkaloiden	78
10. C.Meißner & M.Wink: GC/MS-Analyse von Alkaloiden nordamerikanischer Lupinen	91
11. M.Wink: Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassungen der Pflanzenfresser	130
12. M.Hanke & M.Wink: Die Suche nach den Genen der Alkaloidbiosynthese bei Lupinen	157
13. D.Maercker, R.Perrey, M. Schneider & M. Wink: Genexpression in Lupinenzellkulturen	166
14. W.Kasten: Die Anwendung der Embryokultur nach abortiver interspezifischen Kreuzungen in der Gattung <i>Lupinus</i> zur Rettung abortiver Bastardembryonen	175
15. P.Römer: Strategien zur (Wieder-)Einführung der Lupine in die landwirtschaftliche Praxis	186
16. J. Bayer: <i>Lupinus albus</i> als Marktfrucht	193
17. Ch. Hartmann: Ein Prognosemodell für die N-Fixierung und Ertragsbildung der Weißen Lupine (<i>Lupinus albus</i>)	200
18. W. Gärditz: Zum Einsatz von Hummeln und Bienen (Apoideae) in Beständen der Weißen Lupine (<i>Lupinus albus</i>)	210
19. M. Brummond: Zur Realisierung der Alkaloidarmut und weiterer Zuchtziele bei	219

20.	T. Paradies: Die Reaktion eines ausgewählten Gelblupinensortiments (<i>Lupinus luteus</i> L.) auf unterschiedlich lange Kältebehandlung im Keimstadium	235
21.	E. Weißmann: Ergebnisse und Überlegungen zum Ertragspotential von <i>Lupinus mutabilis</i>	246
22.	F. Schnettler, U. Rubenschuh, & W. Jahn-Deesbach: Genotypenanalyse und Versuche zur Mutationsinduktion bei <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	254
23.	Gesellschaft zur Förderung der Lupine	266

VORWORT

Bislang haben sich die Wissenschaftler und Pflanzenzüchter des deutschsprachigen Raums, die sich mit Lupinen beschäftigen, nur auf den Internationalen Konferenzen der International Lupin Association getroffen, so. z.B. 1980 in Lima (Peru), 1982 in Torremolinos (Spanien), 1984 in La Rochelle (Frankreich), 1986 in Geraldton (Australien), 1988 in Poznan (Polen) und 1990 in Temuco (Chile). Als Vorbereitung für die Chilenische Tagung veranstaltete ich am 26.10.90 die 1. Heidelberger Lupinentagung, zu dem sich erstmals die Züchter aus den Neuen und Alten Bundesländern trafen. Da diese Tagung interessant und informativ war, wurde beschlossen, auch 1991 wieder eine Lupinentagung durchzuführen. So kamen vom 7.11.-10.11.91 über 40 Wissenschaftler und Züchter zur 2. Heidelberger Lupinentagung zusammen, die im Gebäude des Internationalen Wissenschaftsforum der Universität Heidelberg stattfand.

Insbesondere sollte jungen Mitarbeitern die Gelegenheit gegeben werden, über ihre laufenden Arbeiten zu berichten. Darüberhinaus sollte die Tagung ein Diskussionsforum für die versammelten "Lupinisten" aus Ost und West sein, um über die bislang erreichte aber auch über die zukünftig wünschenswerte Entwicklung der Lupinen in Forschung, Anbau und Verwertung zu beratschlagen.

Wir haben uns zur Publikation der Tagungs-Proceedings entschlossen, da die vorgelegten Arbeiten einen guten Überblick über den derzeitigen Stand der deutschen Lupinenforschung bzw. des Lupinenanbaus geben, ein Gebiet, das durch entsprechende Buchpublikation noch nicht abgedeckt wird.

Dank: Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte großzügig die Teilnahme der Lupinenforscher aus den "Neuen" Bundesländern. Die Firmen Mittex Anlagenbau (Ravensburg), Saatzucht Dr. Späth (Rastatt) und Saatzucht Dr. Hege (Hohebuch) halfen mit einer Spende, die Tagung durchzuführen. Danken möchten wir auch dem Internationalen Wissenschaftsforum der Universität Heidelberg für die Überlassung der Räumlichkeiten. Für die organisatorische Hilfe bin ich Frau I. Selg und D. Maercker (Institut für Pharmazeutische Biologie) zu Dank verpflichtet.

Die Publikation dieser Proceedings wurde durch eine finanzielle Unterstützung des BMZ/GTZ ermöglicht. Herrn Dr. R. Binsack und Herrn Dr. K. Wolpers danken wir für ihre Hilfe. Frau Dr. Ana Planchuelo-Ravelo übernahm dankenswerterweise die Übersetzung der Zusammenfassungen ins Spanische.

Heidelberg, im Mai 1992

Michael Wink

EINLEITUNG

Michael Wink

Wie alle Leguminosen sind die Lupinen, von denen es über 500 Arten weltweit gibt, in der Lage, nährstoffarme Böden zu besiedeln, da sie in ihren Wurzelknöllchen stickstoff-fixierende Rhizobien beherbergen. Einige Lupinenarten, wie z.B. *Lupinus albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* und *L. mutabilis* haben relativ große Samen, die reich an Protein (>40%) und Öl (5-20%) sind und damit ernährungsphysiologisch ähnlich wertvolle Nahrungsmittel darstellen, wie die Bohnen, Erbsen und Sojabohnen. Wildlupinen enthalten jedoch beachtliche Mengen an Chinolizidinalkaloiden (QA), wie Lupanin, die sehr bitter schmecken und für viele Tiere toxisch wirken, da sie u.a. Ionenkanäle der Nervenzellen und die Proteinbiosynthese aller Zellen stören (Wink 1992).

Beide Eigenschaften, ihr Wert als Nahrungsmittel aber auch ihr bitterer Geschmack, war dem Homo sapiens bereits seit Jahrtausenden bekannt. So darf man annehmen, daß bereits die alten Ägypter die Samen von *L. albus* nutzten. Selbst heute werden alkaloidreiche Lupinensamen in vielen Mittelmeerlandern auf besondere Art zubereitet: Um die Alkaloide weitgehend zu entfernen, werden die Samen gekocht, denn QA gehen dabei in das Kochwasser über. Die immer noch leicht bitterschmeckenden Samen werden gesalzen und als "Appetizer" gereicht, ähnlich wie Erdnüsse. Noch erfinderischer waren die Indios in Südamerika: Sie haben die Samen von *L. mutabilis* ("Tarwi") gekocht und anschließend in große Säcke gepackt und im fließenden Wasser mehrere Tage aufbewahrt. Auf diese Weise wurde der Großteil der Alkaloide entfernt (Gross 1986).

Vor ca. 90 Jahren fällten deutsche Pflanzenzüchter den Plan, die Lupine zu einer modernen Kulturpflanze zu entwickeln. Da die Alkaloide als störend und wertlos angesehen wurden, versuchte man, Pflanzen zu selektieren, die keine Alkaloide mehr produzierten. Da solche Varianten in der Natur sehr selten sind, mußten viele Tausend Lupinen auf ihren Alkaloidgehalt hin untersucht werden, wobei Schnelltests mit J_2/KJ , die mit QA einen gelbbraunen Niederschlag bilden, zum ersten Mal eingesetzt wurden. Die Bemühungen von Troll, Hackbarth, Baur und v. Sengbusch, um nur einige der renommierten Lupinenzüchter der ersten Hälfte unseres Jahrhunderts zu nennen, und vieler anderer Lupinenzüchter waren weitgehend erfolgreich, indem alkaloidarme Formen (absolut alkaloidfreie Varietäten sind bislang nicht gefunden worden) von *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* und unlängst von *L. mutabilis* und *L. polyphyllus* entwickelt wurden (Gross & Bunting 1982, Gross 1986, Gross et al. 1988). Diese "Süßlupinen" (ihnen fehlt der bittere Alkaloidgeschmack) wurden in vielfältiger Weise züchterisch in Hinblick auf Ertrag, Wuchsform und Resistenz weiter entwickelt.

Bereits 1918 gab es eine erste offizielle Lupinenverköstigung: Anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft wurden Lupinensuppe, Lupinenkaffee und andere Köstlichkeiten gereicht.

Heute werden Süßlupinen vielerorts weltweit unter dem Gesichtspunkt der Grünfütter- und Samenproduktion angebaut: Insbesondere in den Ländern Australien (ca 3000 km²), Südafrika (200 km²), Südamerika (120 km²), Europa (ca 1500 km²). Über die Fähigkeit zur Stickstofffixierung werden die Böden, auf denen Lupinen angebaut wurden, deutlich verbessert, was sich u.a. in einem erhöhten Ertrag der Folgefrucht, z.B. Weizen auswirkt.

Wie sind jedoch davon überzeugt, daß das Potential der Lupine noch lange nicht voll genutzt wird und daß es noch einen erheblichen Forschungs- und Entwicklungsbedarf gibt. Obwohl der Lupinenanbau auch heute noch erst in den

Kinderschuh steckt, stellt er bereits heute einen erheblichen Wirtschaftsfaktor dar.

Wo aber liegen Probleme ?

Vergleichen wir die heute vorliegenden Formen der Süßlupinen mit den bitteren Stammformen, so zeigt sich:

1. Die Samenrerträge der Süßlupinen liegen z.T. erheblich niedriger als die der Bitterlupinen, die aber bislang noch nicht auf erhöhte Produktivität hin selektiert wurden. Gerade in einer ertrags- und wettbewerbsorientierten Landwirtschaft sollte die Chance, höhere Erträge mit Bitterlupinen zu erwirtschaften, nicht vertan werden.

2. Süßlupinen sind deutlich anfälliger gegenüber Schadinsekten, anderen Pflanzenfressern und z.T. wohl auch gegenüber pflanzenpathogenen Mikroorganismen als die alkaloidreichen Wildformen (Wink 1984, 1988). Wie wir heute wissen, dienen die Alkaloide als chemische Abwehrsubstanzen gegenüber Pflanzenfressern und z.T. gegen Mikroorganismen. Wird dieser "Resistenzfaktor" jedoch weggezüchtet, so bleibt eine anfällige Pflanze zurück, die durch Zäune und Pestizide geschützt werden muß. Es sollte zu bedenken geben, daß bei der züchterischen Bearbeitung der meisten unserer Kulturpflanzen ebenfalls Sekundärstoffe weggezüchtet wurden, was jetzt ihre Vitalität beeinträchtigt und in Konsequenz den Pestizideinsatz notwendig macht, der unsere Umwelt nicht unerheblich schädigt (Wink 1988).

3. Süßlupinen neigen dazu, sich in wenigen Generationen wieder in ihre alkaloidreichen Ausgangsformen zurück zu entwickeln. D.h. es muß ständig eine Selektion des Saatguts auf Alkaloidarmut erfolgen, was einen nicht unerheblichen Aufwand in der analytischen Qualitätskontrolle erfordert. Bislang wird eine wirklich adäquate Analytik nur von wenigen Anbauern, so z.B. in Australien durchgeführt, da sie mit hohem personellen und apparativem Aufwand einhergeht. Insbesondere, wenn an die Verwendung der Samen für die menschliche Ernährung gedacht wird, ist eine rigorose Qualitätskontrolle unumgänglich.

Unter Berücksichtigung dieser Probleme ergeben sich die folgenden Überlegungen bzw. zukünftigen Forschungs- und Entwicklungsprojekte:

1) Auf Süßlupinen werden wir auch in Zukunft nicht verzichten wollen; sie müßten jedoch verstärkt in Hinblick auf Resistenzsteigerung (z.B. durch andere Sekundärstoffe als Alkaloide) insbesondere gegenüber pathogenen Pilzen und Viren, Frostunempfindlichkeit und Ertragssteigerung bearbeitet werden.

2) Wir sollten ernsthaft überlegen, ob nicht die ursprünglichen Bitterlupinen doch Vorteile bieten. Wir könnten von höheren Erträgen, besserem Wachstum und einer erhöhten Vitalität ausgehen, hätten jedoch das Problem der Entfernung der Alkaloide vor der Nutzung der Samen. Außerdem würde die ständige und aufwendige Selektion des Saatguts in Hinblick auf Alkaloidarmut entfallen, da sich automatisch bittere Formen einstellen werden und sich stabilisieren. Weitere Zuchtziele mit den ursprünglichen Bitterlupinen wäre Ertragssteigerung, Wuchsform und Frostunempfindlichkeit.

Unverarbeitete Lupinensamen können als Viehfutter und in geringem Maße auch für die menschliche Ernährung eingesetzt werden. Da die Preise für Sojabohnen relativ niedrig (durch Subvention in USA) sind, steht die Lupine damit in einem ständigen Wettbewerb und am Rande der Rentabilität.

Es bietet sich eine Lösung sowohl des Alkaloidproblems als auch der Rentabilität an: Ähnlich wie bei der Sojaverarbeitung müßten die Lupinensamen raffiniert werden, d.h. man trennt die Samen in die verschiedenen Einzelkomponenten auf, wie z.B. Protein, Öl, Fiber, Alkaloide usw., da diese Einzelkomponenten eine wesentlich höhere Wertschöpfung erreichen als die unverarbeiteten Rohsamens (z.B. der Süßlupinen). Während für Protein, Öl und Fiber be-

reits etablierte Absatzmärkte bestehen, stellt sich die Frage, was mit den Alkaloiden geschehen soll: Das Lupinenalkaloid Spartein hat pharmazeutische Bedeutung und wird als Antiarrhythmikum eingesetzt. Vermutlich sind die anderen QA ähnlich nutzbar. Wir wissen ferner, daß die Lupinenalkaloide deutliche Wirkung auf Insekten haben, z.B. Deterrenz und Toxizität. Hier bietet sich die Möglichkeit an, die Lupinenalkaloide als natürliche Pflanzenschutzmittel, die leicht abbaubar sind, in der Landwirtschaft zu nutzen. Natürlich erfordert diese Prozessierung relativ hohe apparative Investitionskosten. Herr Dipl. Ing. W. Jaeggler der Firma Mittex Anlagenbau hat in seinem Referat seine Vorstellungen zu dieser Vorgehensweise klargestellt und überzeugend gezeigt, daß eine "Lupinenraffinerie" bereits nach kurzer Zeit ertragreich arbeiten kann. Da das Mittex-Verfahren keine umweltschädigenden Lösungsmittel benötigt und andererseits der Anbau der Bitterlupine mit einem Minimum an Pflanzenschutzmitteln auskommen wird, ist dieses Vorgehen aus dem Gesichtswinkel der umweltverträglichen Ressourcennutzung sicherlich ein Meilenstein in die Zukunft.

3.) Es bietet sich jedoch auch noch eine biologische Variante an, die die Vorteile sowohl der Süß- als auch der Bitterlupine vereinigen würde:

Aus unseren biochemischen Untersuchungen wissen wir, daß die Alkaloide in den Blattchloroplasten synthetisiert und anschließend über das Phloem in alle Pflanzenteile, insbesondere die Samen transportiert werden. Die Lupinenalkaloide liegen unter physiologischen Bedingungen als geladene Ionen vor, die Biomembranen nicht über einfache Diffusion überwinden können. Statt dessen werden sie mittels Transportsysteme durch Membranen geschleust. Diese Carrier sind gencodiert. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß es auch Mutationen geben wird, die die Expression solcher Transportproteine in den Früchten blockiert. Wir erwarten, daß eine solche Lupine im Kraut alkaloidreich ist, gleichzeitig aber alkaloidarme Samen aufweist. Diese Pflanze würde ihre natürliche Resistenz gegenüber Insekten erhalten, gleichzeitig aber süße Samen liefern, die sofort als Viehfutter verwendet werden könnten. Eine solche, natürlich geschützte Bitterlupine (NPT-Lupine) mit süßen Samen könnte ein Zuchtziel der nächsten Generation der Lupinenzüchter sein (Wink 1991).

Die vorliegenden Proceedings reflektieren den derzeitigen Stand der Forschungsarbeiten auf dem Lupinensektor, die Situation im Lupinenanbau und in der Verwertung der aus den Lupinen gewinnbaren Produkte.

Literatur:

- GROSS, R. (1986): Lupins in the Old and New World- A biological-cultural evolution. Proc. 4th. Intl. Lupin Conf. 244-277.
- GROSS, R., & E.S. BUNTING (1982): Agricultural and nutritional aspects of lupins. Proc. First Intl Lupin Conf. 878 Seiten.
- GROSS, R., E. VON BAER, F. KOCH, R. MARQUARDS, L. TRUGO, M. WINK: Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. INTI) with low-alkaloid content. J. Food Comp. Anal. 1, 353-361.
- WINK, M.: Chemische Verteidigung der Lupinen: zur biologischen Bedeutung der Chinolizidinalkaloide. Plant Syst. Evol. 150, 65-81.
- WINK, M.: Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theor. Appl. Genet. 75, 225-233.
- WINK, M. (1991): Plant breeding: High or low alkaloid content?. Proc. 6th Intl. Lupin Conf. 326-334
- WINK, M. (1992): Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In "The alkaloids". Acad. Press. im Druck

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ZWEI NEUE VIRUSERKRANKUNGEN DER ANDENLUPINE (*LUPINUS MUTABILIS* SWEET) IN MITTELEUROPA

Heribert E. Schmidt, Heinz B. Schmidt, Eckhard Proll und Ewald Karl

Institut für Phytopathologie Aschersleben
der Biologischen Zentralanstalt Berlin
Theodor-Roemer-Weg
O-4320 Aschersleben

ABSTRACT

Investigations on two new virus diseases of Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) in Central Europe

Investigations on the diagnostic analysis of viruses naturally infecting *Lupinus mutabilis* grown in a world collection of legumes revealed pea enation mosaic virus and a potyvirus additionally to bean yellow mosaic and cucumber mosaic viruses. The potyvirus resembling lupin mottle virus occurring in Great Britain proved to be not serologically identical with bean yellow mosaic virus and other 23 potyviruses so far tested by DAS-ELISA, ISEM and western blot. It has been transmitted in a non-persistent manner by the aphids *Macrosiphum albifrons* Essig and *Myzus persicae* Sulz. It infects spontaneously *L. albus*, *L. luteus* as well as *L. polyphyllus*. The virus isolate LpAs 9/89 was purified by differential ultracentrifugation followed by CsCl density centrifugation. Three rabbits were immunized in order to prepare an homologous antiserum.

RESUMEN

Investigaciones sobre dos nuevas virosis del lupino andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Europa Central

Las investigaciones sobre el diagnóstico de virosis revelan que el *Lupinus mutabilis*, que crece en la colección de leguminosas del Banco de Germoplasma Nacional de Alemania, se ve atacado en forma natural por los siguientes virus: Potyvirus de la arveja, enation-mosaico virus de la arveja, mosaico amarillo del poroto y mosaico del pepino. El estudio demuestra que el potyvirus, semejante al virus moteado que ocurre en Gran Bretaña, no es serológicamente idéntico al virus del mosaico amarillo del poroto, ni a los otros 23 potyvirus investigados con DAS-ELISA, ISEM. Este potyvirus ha sido transmitido en forma casi persistente por los pulgones *Macrosiphum albifrons* Essig y *Myzus persicae* Sulz. Infecta espontáneamente a *L. albus*, *L. luteus* y *L. polyphyllus*. El virus aislado es el LpAs 9/89 que fue purificado por ultracentrifugación diferencial seguido de CsCl centrifugación densa. Se logró obtener el antígeno correspondiente mediante la inmunización de tres conejos.

1. EINLEITUNG

Bemühungen, *Lupinus mutabilis* mit züchterischen Mitteln als Alternativkultur an die Anbaubedingungen Mitteleuropas anzupassen, umfassen die Erforschung von Krankheiten und Schädlingen als Grundlage für die Resistenzzüchtung (Schmidt und Karl, im Druck). Von den Viren wurden in Deutschland bisher das Bohnengelbmosaik-Virus (bean yellow mosaic virus, BYMV) und das Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, CMV) als Ursache von Spontaninfektionen an Andenlupinen ermittelt (Eppler et al., 1986; Römer, 1988). Bei der Vorevaluierung von Feldresistenzen im Lupinensortiment des Instituts für Genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben in den Jahren 1990 und 1991 wurden kranke Lupinepflanzen aufgefunden, aus denen die Isolierung von 2 Viren gelang, die nicht mit den vorgenannten identisch waren. Über Untersuchungen zur Identifizierung soll nachstehend berichtet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Von erkrankten Andenlupinen mit virusverdächtigen Symptomen wurden Triebproben entnommen, um Virusisolate zu gewinnen und serologische Virusidentifizierungen vorzunehmen. Blattpressäfte wurden nach Zugabe von $1/15$ M neutraler Phosphatpufferlösung nach Sørensen zum Material im Verhältnis 1 (g) : 3 (ml) durch Zermörsern hergestellt. Hiermit erfolgte die Inokulation der Testpflanzenarten *Vicia faba* L. ("Tinova"), *Phaseolus vulgaris* L. ("Pinto", Selektante A), *Chenopodium guinoa* Willd. und *Nicotiana megalosiphon* Heurck et Muell. Arg., um Virusisolate zu erzielen. Für vergleichende Untersuchungen dienten ein Lupinenstamm LiWi 30/77 und der niederländische Typstamm B 25 des Bohnengelbmosaik-Virus (bean yellow mosaic virus, BYMV) sowie der Ackerbohnenstamm VfAn₂ des Erbsenenationmosaik-Virus (pea enation mosaic virus, PEMV), wie an anderer Stelle beschrieben (Schmidt, 1982). *Macrosiphum albifrons* Essig und *Myzus persicae* Sulz. benutzten wir für Versuche zur Aphidenübertragbarkeit eines von BYMV verschiedenen Potyvirus. Die Akquisitionszeit nach halbstündiger Hungerzeit betrug 10 Minuten und die Inokulationszeit 24 Stunden. Danach wurden die Tiere mit einem Insektizid abgetötet.

Zum serologischen Direktnachweis von Viren wurde der Saft kranker Pflanzen mittels einer Walzenpresse gewonnen und im DAS-ELISA nach Clark und Adams (1977) geprüft. Hierfür standen 25 Antiseren aus der Serumbank des Instituts für Phytopathologie Aschersleben zur Verfügung. Darunter befand sich ein gegen die Core-Region des Hüllproteins 3 verschiedener Potyviren gerichtetes Antiserum (203) und ein sogenanntes "Breitband"-Antiserum mit der Bezeichnung Tu 314.

Weitere 4 Antiseren fanden im Rahmen von Untersuchungen zur immunoelektronenmikroskopischen Virusidentifizierung nach Derrick (1972) bzw. nach Roberts und Harrison (1979) Verwendung.

Die Reinigung eines sehr virulenten Vergleichsisolates LpAs 9/89 aus der Staudenlupine (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) geschah nach folgendem Schema:

Vermehrungswirt: *V. faba* ("Tinova")

Vorreinigung

- Virusextraktion: 80 g Pflanzenmaterial
+ 0,1 M Ammoniumcitrat pH 6,5
+ 0,5 % Na₂SO₃
- Pressen durch Dederongaze
- niedertourige Zentrifugation: 15 Min., 12×10^3 rpm

Überstand + 2 % Triton X 100, 6 ml

Hauptreinigung

- Ultrazentrifugation
unterschichten mit 20 %iger Rohrzuckerlösung in 0,05 M Ammoniumcitrat pH 6,5; 2 h, 3×10^4 rpm
Sediment in Rohrzuckerlösung aufnehmen
- niedertourige Zentrifugation 20 Min., 10×10^3 rpm
- Ultrazentrifugation
unterschichten mit 20 %iger Rohrzuckerlösung 0,05 M Ammoniumcitrat pH 6,5; 90 Min., 3×10^4 rpm
Sediment in 0,05 M Boratpufferlösung, pH 8,0 + 0,001 M EDTA aufnehmen
- Ultrazentrifugation in Cäsiumchlorid $1,315 \text{ g/cm}^3$, 12 h, 35×10^3 rpm bei 10^0 C im Vertikalrotor VTi 65

3. ERGEBNISSE

Serologische Identifizierung von Viren in Blattpressäften aus *Lupinus mutabilis*

Von einigen Sippen der Andenlupine wurden in den Jahren 1990 und 1991 erkrankte Triebteile gesammelt, deren Krankheitsbild das Vorliegen einer Virusinfektion vermuten ließ. Pressäfte der erkrankten Lupinenherkünfte aus Gatersleben (Landkreis Aschersleben) und vom Institutsversuchsfeld Aschersleben reagierten im DAS-ELISA positiv mit Antiseren gegen bean yellow mosaic virus (BYMV), cucumber mosaic virus (CMV) und gegen pea enation mosaic virus (PEMV). Drei Saftproben, die aus Gaterslebener Material der Andenlupine gewonnen wurden, deren Blätter von deutlicher Scheckung bzw. Mosaikausprägung betroffen waren, ergaben indessen keine Reaktion mit Antiseren gegen die drei vorgenannten Viren. Die serologischen Befunde sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1: Natürlicher Virusbefall von *L. mutabilis* in den Jahren 1990 und 1991

Standorte	Anzahl der Proben	serologisch im DAS-ELISA identifizierte Viren			
		von 1, 2, 3			3 verschieden
		1 BYMV	2 PEMV	3 CMV	
Gatersleben	25	14	8*	0	3
Aschersleben	14	12	0	2*	0
insgesamt	39	26	8	2	3

* Mischinfektionen mit BYMV

Das CMV wurde lediglich in 2 Pflanzenproben vom Standort Aschersleben nachgewiesen und zwar in Mischinfektion mit BYMV. Letzteres wurde mit 26 positiven serologischen Reaktionen in den insgesamt 39 untersuchten kranken Pflanzenproben am häufigsten identifiziert. Dagegen war das Vorkommen des PEMV in 8 Blattpressäften als sporadisch zu bewerten. In einem Falle handelte es sich hierbei um die Mischinfektion mit BYMV.

Isolierung des PEMV aus *L. mutabilis*

Von 4 Andenlupinenpflanzen, deren Blätter im Adernbereich der Interkostalfelder chlorotisch, transparent gefleckt waren und Deformationen zeigten, konnte das PEMV nach dem serologischen Nachweis mechanisch auf *V. faba* übertragen werden. Die im Vergleich mit dem Stamm VfAn₂ des PEMV verminderte Symptomstärke des Isolates LmGa 5/90 deutete auf eine geringere Virulenz bei dieser Testpflanze hin. Dabei korrespondierten geringere mittlere Extinktionswerte des ELISA, welche in zwei Meßserien an je 20 bzw. 25 Pflanzen zwischen $\chi E_{(405nm)} = 0,44$ und $0,84$ lagen. Im Unterschied zu dem Andenlupinenisolat beliefen sich Vergleichswerte des Ackerbohnen-Virusstammes VfAn₂ auf Werte zwischen $\chi E_{(405nm)} = 1,65$ und $1,93$. Rückübertragungen auf zwei Sippen der Andenlupinen ermöglichten es, bei 5 von 22 mit Ackerbohnenpreßsäften des Virusisolates LmGa 5/90 die beschriebenen Symptome an *L. mutabilis* zu reproduzieren.

Isolierung eines vom BYMV verschiedenen Potyvirus aus *L. mutabilis* und Vergleich mit Virusisolaten aus weiteren Lupinenarten

Von dem für die Virusisolierung verwendeten Testpflanzensortiment konnten im Gegensatz zu *Phaseolus vulgaris* ("Pinto") und *Nicotiana megalosiphon* lediglich *V. faba* und *Chenopodium quinoa* mit Preßsäften der 3 Proben aus *L. mutabilis* der Gaterslebener Herkünfte infiziert werden, welche serologisch nicht mit dem BYMV, CMV und PEMV (Tab. 1) identisch waren.

Auf den inokulierten Blättern von *V. faba* entstanden gelbgrüne Flecken mit einem Durchmesser von 2-3 mm, welche ringartig von einem bräunlichen Saum umgeben waren. Die systemisch erkrankten Pflanzen blieben deutlich im Wachstum zurück. Die jüngeren gekräuselten Blätter zeigten chlorotische, relativ scharf begrenzte Adernbänderungen, hellgrüne Flecke und Scheckung. In den Spätherbst- und Wintermonaten traten im Adernbereich der ältesten Blätter Nekrosen auf, von denen die Stengelpartien erfaßt werden konnten, so daß die Pflanzen abstarben. Nicht nur serologisch im DAS-ELISA sondern auch hinsichtlich der Testpflanzenreaktion unterschieden sich die 3 Virusisolate von den Referenzstämmen B 25 und LIWi 30/77 des BYMV. In der Tabelle 2 ist der Vergleich mit dem Isolat LmGa 1/90 aus *L. mutabilis* dargestellt.

Tabelle 2: Die Reaktion von Differentialwirten des Potyvirusisolates LmGa 1/90 und der Stämme B 25 sowie LIWi 8/77 des BYMV

Differentialwirte	Virusisolate, Virusstämme		
	LmGa 1/90	B 25	LIWi 30/77
<i>Vicia faba</i> ("Tinova")	AB: cF, b FB: cA, cF, Kr, N	AB: oS FB: Mo	AB: oS FB: Mo
<i>Phaseolus vulgaris</i> ("Pinto")	AB: ni FB: ni	AB: cF FB: gMo	AB: cF FB: gMo
<i>Chenopodium quinoa</i>	AB: cF FB: ni	AB: cF FB: ni	AB: cF FB: cS, Kr

Anmerkungen: A = Adernbänderung, AB = abgeriebene Blätter, FB = Folgeblätter, b = braun umsäumt, c = chlorotisch, F = Flecke, g = gelblich, Kr = Kräuselung, Mo = Mosaik, N = Nekrosen, ni = nicht infiziert, oS = ohne Symptome, S = Scheckung

Indessen reagierte *C. quinoa* auf den beimpften Blättern verhältnismäßig einheitlich mit chlorotischen Flecken. Le-

diglich der Lupinen-Virusstamm LIWi 30/77 verursachte eine systematische Kräuselscheckung auf Blättern dieser Pflanzenart. *L. angustifolius* L. eignete sich nicht als Differentialwirt, da diese Art relativ einheitlich auf alle 3 Viren mit Mosaik- und Scheckungssymptomen reagierte.

Sowohl die 3 aus *L. mutabilis* (Herkünfte Gatersleben) als auch im Rahmen anderer Untersuchungen aus drei weiteren Lupinenarten wie *L. polyphyllus* (8 Isolate), *L. albus* (2 Isolate) und *L. luteus* (5 Isolate) gewonnenen, vergleichbaren Virusisolate wurden auf morphologisch-serologischer Grundlage untersucht. Alle Präparationen enthielten elektronenoptisch dargestellte, gestreckte, flexible Viruspartikeln, die für die Potyvirusgruppe typisch sind. Den Ausschlag für die Zuordnung von insgesamt 15 Virusisolaten (3 aus Andenlupinen, 8 aus *L. polyphyllus* und je 2 aus *L. luteus* und *L. albus*) zur Potyvirusgruppe gaben der ELISA mit dem "Breitband"-Antiserum Tu 314 und western blot mit dem Antiserum 203. In allen Fällen kamen eindeutig positive serologische Reaktionen zustande. Immunelektronenoptische Befunde bestätigten diese Ergebnisse (Abb. 1 A, B). In keinem Falle gelang die Identifizierung mit BYMV, da nur der Referenzstamm B 25 mit dem Antiserum gegen BYMV dekoriert werden konnte. Die erzielten Nachweise gleicher Gruppenzugehörigkeit der 15 Virusisolate aus Lupinen gaben Veranlassung zu eingehenderen diagnostischen Untersuchungen. Wie in der Tabelle 3 dargestellt, reagierten Chenopodiaceen und Leguminosen gegen die Virusisolate LmGa 1/90 aus *L. mutabilis* und LpAs 9/89 aus *L. polyphyllus* gleichartig.

Tabelle 3: Die Reaktion von Testpflanzen gegenüber den Isolaten LmGa 1/90 und LpAs 9/89

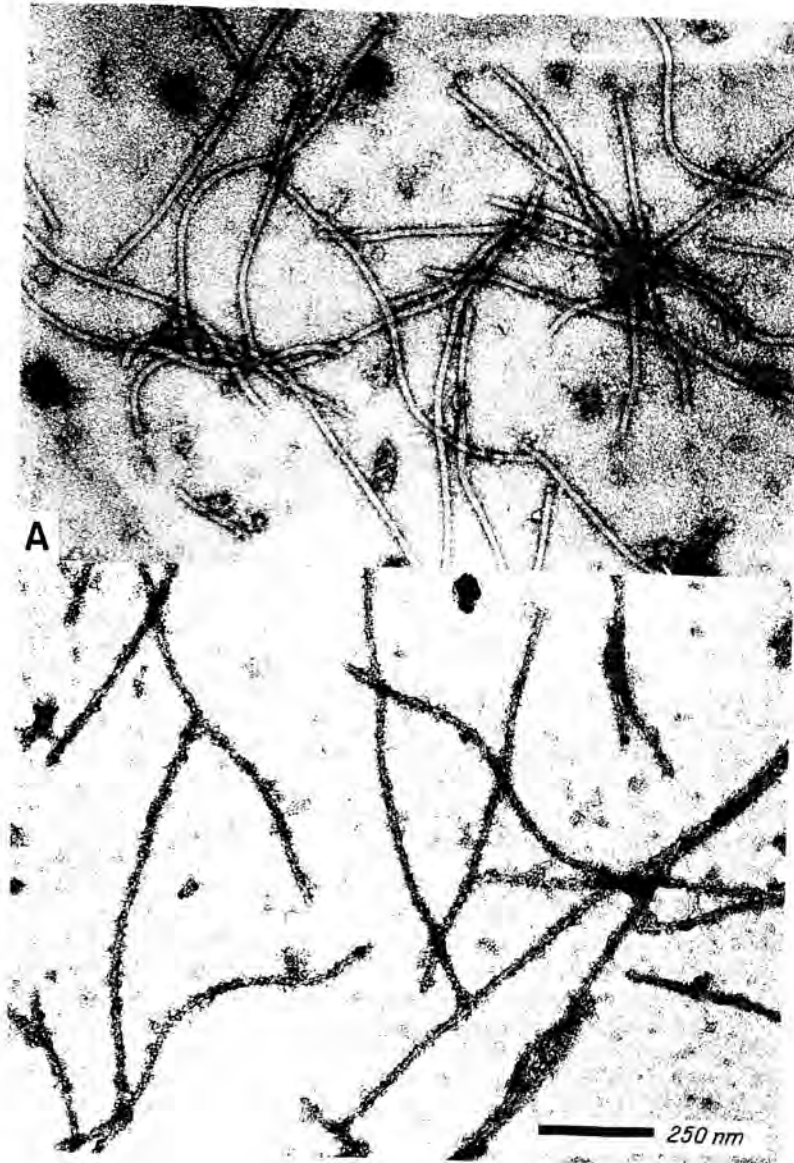
Testpflanzenarten	Virusisolate		Symptome
	LmGa 1/90	LpAs 9/89	
Chenopodiaceen			
<i>Chenopodium foetidum</i> Schrad.	6/10	7/10	AB: dcF
<i>C. foliosum</i> Aschers.	5/10	3/5	AB: dcF, FB: ni
<i>C. murale</i> L.	8/10	4/6	AB: pcF, FB: ni
<i>C. quinoa</i> Willd.	10/10	10/10	AB: cF, FB: ni
Leguminosen			
<i>P. vulgaris</i> L.	0/10	0/10	AB: ni, FB: ni
<i>V. faba</i>	7/10	6/9	AB: cFb, FB: cA, cF, Kr, N

Anmerkungen: Abkürzungen wie in Tabelle 2, außer: d = diffus, p = punktiert

Erwartungsgemäß gelang die Übertragung des Virusisolates LpAs 9/89 als Potyvirus durch *Myzus persicae* von *V. faba* auf *V. faba* und auf *L. polyphyllus* mit Übertragungsraten zwischen 66,7 und 78,6%. Auch *M. albifrons* war mit 35,7 bzw. 48,0% igem Übertragungserfolg zur Infektion beider Testpflanzenarten befähigt (Tabelle 4).

Verwachsene chlorotische Adernbänderungen und Scheckung waren bei *L. polyphyllus* charakteristisch. Infolge der eindeutigen Verschiedenheit des Virusisolates LpAs 9/89 vom BYMV wurde seine Identität mit Antiseren gegen weitere 23 Potyviren anhand der Immunelektronenmikroskopie geprüft. Mehrere Tests erfolgten außerdem im ELISA. Dabei zeigte sich, daß die Dekoration von Viruspartikeln oder positive Tests im ELISA oder western blot lediglich mit dem "Breitband"-Antiserum gelangen, so daß die Identität mit folgenden Viren ausgeschlossen war: clover yellow vein virus, bean common mosaic virus, peanut stripe virus, soybean mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus, pea seed-borne mosaic virus, lettuce mosaic virus, celery mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, leek yellow stripe virus, onion yellow dwarf virus, asparagus virus 1, plum pox virus, barley mild mosaic virus, potato virus Y, potato virus A, potato virus V, turnip mosaic virus, sorghum mosaic virus, maize dwarf mosaic vi-

Abbildung 1: Partikeln des Potyvirusisolats LpAs 9/89; A = nicht dekoriert, B = dekoriert mit dem "Breitband"-Antiserum Tu 314



rus, sweet potato mild mottle virus und sweet potato latent virus.

Lediglich mit dem in Großbritannien festgestellten Lupinenscheckungs-Virus (lupin mottle virus, LMV) waren in Ermangelung eines Antiserums keine Identitätsprüfungen möglich.

Tabelle 4: Übertragung des Virusisolats LpAs 9/89 durch Aphiden ausgehend von *V. faba* als Wirtspflanze

Testpflanzen	<u>Macrosiphum</u> <u>albifrons</u>	%	<u>Myzus</u> <u>persicae</u>	%
<i>L. polyphyllus</i>	12/25	48,0	20/30	66,7
<i>V. faba</i>	5/14	35,7	22/28	78,6

Anmerkungen: Zähler = Anzahl infizierter Pflanzen, Nenner = Anzahl besogener Pflanzen

Untersuchungen zur Virusreinigung

Das im Methodenteil beschriebene Reinigungsverfahren gewährleistete beim Virusisolat LpAs 9/89 nur eine geringe Virusausbeute. Für die Immunisierung von Kaninchen erscheinen höhere Antigenmengen erstrebenswert. Deshalb wurde das Reinigungsverfahren modifiziert. Ammoniumcitrat wurde durch 0,1 M Kaliumcitrat-Puffer pH 7,0 ersetzt. Zur Virusstabilisierung eignete sich 0,002 M EDTA + 0,0014 M PMSF (= Phenylmethylsulfonylfluorid). Vor der Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten wurde nur noch ein Ultrazentrifugationslauf in 20%iger Rohrzuckerlösung und 0,1 M Kaliumcitratpuffer vorgenommen. Mit gleicher Pufferlösung geschah die Aufnahme des Sediments für einen letzten Schritt niedertouriger Zentrifugation. Die Viruskonzentration im Endpräparat bei diesem verbesserten Verfahren betrug 0,68 mg/ml. Drei Kaninchen wurden für die Antiserumgewinnung immunisiert.

4. DISKUSSION

Neueste Technologien des Aufschlusses und der industriellen Verarbeitung von Lupinen (Birk u.a., 1989; Jaeggle, im Druck; Wink, im Druck) unterstützen bei relevanten Arten die Option als Alternativkulturen für den potentiellen Rohstoffmarkt. Um den Landwirt in die Lage zu versetzen, ausreichende Deckungsbeiträge bei einem der Wertschöpfung angemessenen Rohstoffpreis zu erwirtschaften, sind gesunde, leistungsfähige Lupinenbestände erforderlich. Deshalb gewinnen Bestandsaufnahmen von Schaderregern im Lupinenanbau Aktualität, denn vorbeugende Bekämpfungsmaßnahmen entscheiden mit über den Anbauerfolg. Die Erregerdiagnose, Resistenzforschung und -züchtung sind deshalb für anbauwürdige Lupinenarten unverzichtbar (Schmidt und Karl, im Druck).

Übereinstimmend mit den Untersuchungsbefunden anderer Versuchsansteller bildet das BYMV unter den Viren den größten Gefährdungsfaktor im Lupinenanbau Europas (Schmidt und Karl, 1990; Schmidt und Meyer, im Druck). Das in Andenlupinen festgestellte PEMV trat im Gegensatz zur Befallsituation des bedrohlichen Jahres 1990 bei *Pisum sativum* L. auch bei anderen Lupinenarten nur sporadisch auf und hat deshalb keine wirtschaftliche Bedeutung. Die Gründe hierfür sind in hoher Resistenz verschiedener Lupinenarten zu suchen. Auch das CMV kam unter den bestehenden virusökologischen Bedingungen der Versuchsstandorte nur selten vor.

Ungeklärt blieb allerdings die Identität des in *L. mutabilis*, *L. albus* und *L. polyphyllus* festgestellten, zumindest in Mitteleuropa bei Lupinen neuen Potyvirus. Es ließ sich auf morphologisch serologischer Grundlage unter Verwendung des "Breitband"-Antiserums Tu 314 eindeutig dieser Virusgruppe zuordnen. Identität mit dem BYMV und weiteren 23 Potyviren wurde anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen. Die Prüfung auf Kreuzreaktionen der betreffenden Viren mit dem homologen Antiserum gegen das Isolat LpAs 9/89 steht noch aus,

da letzteres sich in der Herstellungsphase befindet. Die bei den Untersuchungen berücksichtigten Testpflanzenarten, mit denen nach Hampton u.a. (1978) eine gewisse Vorinformation zur Identifizierung von Leguminosenviren erzieltbar ist, lieferte gleichermaßen keine Hinweise auf die Identität des Virusisolates LpAs 9/89 mit dem Lupinenstamm LIW/30/77 und dem niederländischen Typstamm B 25 des BYMV.

Auffällige Übereinstimmungen bestanden hinsichtlich der Reaktion der Testpflanzen *V. faba*, *P. vulgaris* und Chenopodiaceen im Vergleich mit in Großbritannien beschriebenen Symptomen, welche durch das dort aus *L. mutabilis* isolierte Lupinenscheckungs-Virus (lupin mottle virus, LMV) verursacht werden können. Dieses Virus ist serologisch entfernt mit dem BYMV und mit pea mosaic virus (PMV) verwandt (Hull, 1968). Näheres haben zukünftige serologische Untersuchungen zu klären. In derartige Experimente müssen nicht nur die Virusisolate eingeordnet werden, welche aus anderen Lupinenarten und nicht nur aus *L. mutabilis* stammen. Auch drei weitere, außerhalb Europas identifizierte Potyviren wie das Bidens-Scheckungs-Virus (bidens mottle virus) in *L. angustifolius* (Edwardson u.a., 1976), das Erdnußscheckungs-Virus (peanut mottle virus) in *L. albus* und *L. angustifolius* (Demski u.a., 1981) und ein vorläufig als Weißlupinenmosaik-Virus (white lupin mosaic virus) bezeichneter Krankheitserreger (Providenti und Gonsalves, 1991) kommen für vergleichende Untersuchungen zum Identitätsnachweis in Betracht. Sie werden in den USA infolge ihrer leichten Blattläusübertragbarkeit als gefährlich angesehen. In dieser Eigenschaft stand das erstmals durch *Macrosiphum albifrons* und *Myzus persicae* übertragene Virusisolat LpAs 9/89 jenen Viren und dem BYMV nicht nach. Die künstliche Infektion von *L. angustifolius* wies eine weitere Lupinenart als Wirtspflanze nach. Möglicherweise ist das Virus bei Lupinen weiter verbreitet als zu vermuten ist.

Die im Weltmaßstab bestehende Vielfalt virusbedingter Krankheiten der Gattung *Lupinus* (Jonas und McLean, 1989) berechtigt keineswegs dazu, Lupinen als virusbelastete Risikokulturen im Vergleich mit anderen Leguminosenarten einzustufen. Aus phytopathologischer Sicht bestehen durchaus Entwicklungschancen für einen erfolgreichen Lupinenanbau. Eingedenk dessen ergeben sich aus dem Nachweis des in Mitteleuropa nicht nur bei Andenlupinen neuen Potyvirus Aufgaben für die Resistenzforschung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur diagnostischen Analyse des natürlichen Virusbefalls bei Andenlupinen, die in einem Weltsortiment von Leguminosen angebaut wurden, wiesen zusätzlich zum Bohnengelbmosaik- und Gurkenmosaik-Virus das Erbsenenationenmosaik-Virus sowie ein Potyvirus nach. Das Potyvirus, welches dem in Großbritannien vorkommenden Lupinenscheckungs-Virus ähnelt, erwies sich serologisch nicht identisch mit dem Bohnengelbmosaik-Virus und 23 weiteren Potyviren soweit diese mittels DAS-ELISA, ISEM und western blot geprüft wurden. Es wurde nichtpersistent durch die Aphiden *Macrosiphum albifrons* Essig und *Myzus persicae* Sulz. übertragen und infiziert spontan *L. albus*, *L. luteus* und *L. polyphyllus*. Das Virusisolat LpAs 9/89 wurde gereinigt durch differentielle Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten. Drei Kaninchen wurden immunisiert, um ein homologes Antiserum herzustellen.

6. LITERATUR

- BIRK, Y.; DOVRAT, A.; WALDMAN, M.; UZUREAU, C.: Lupin production and bio-processing for feed, food and other by-products. Proceedings Joint CEC-NORD Workshop, Ginozar, Israel (1989), 218 S.
- CLARK, M.E.; ADAMS, A.N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen. Virol. 34 (1977), 475-483
- DEMSKI, J.W.; KHAN, M.A.; WELLS, H.D.; MILLER, J.D.: Peanut mottle virus in forage legumes. Plant Disease 65 (1981), 359-362
- DERRICK, K.S.: Immuno-specific grids for electron microscopy of plant viruses. Phytopathology 62 (1972), 753

- EDWARDSON, J.R.; PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, R.G.; CHRISTIE, S.R.: Blue lupin, a natural host for bidens mottle virus. Plant Disease Reporter 60 (1976), 776
- EPPLER, A.; HINZ, U.; RÖMER, P.: Virus diseases of *Lupinus mutabilis* Sweet in Germany. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 51 (1986), 817-826
- HAMPTON, R.O.; BECZNER, L.; HAGEDORN, D.J.; BOS, L.; INOUE, T.; BARNETT, O.; MUSIL, M.; MEINERS, J.: Host reaction of mechanically transmissible legume viruses of the northern temperate zone. Phytopathology 68 (1978), 989-997
- HULL, R.: Virus diseases of garden lupin in Great Britain. Ann. appl. Biol. 61 (1968), 373-380
- JAEGGLE, W.: Agricultural refining of bitter lupins derivats with high added value. *Lupinus mutabilis*: adaptation and production of *L. m.* under European pedochimatic conditions. CEC, EUROPROTEINA, Workshop, Cascais, Portugal (im Druck)
- JONES, R.A.C.; MCLEAN, G.D.: Virus diseases of lupins. Ann. appl. Biol. 114 (1989), 609-637
- PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.: Legumes. 19th Annu. Newsletter ISHS Internat. Vegetable Virus Working Group 1990 (1991), 24-25
- ROBERTS, I.M.; HARRISON, B.D.: Detection of potato leafroll and potato mop-top viruses by immunosorbent electron microscopy. Ann. appl. Biol. 93 (1979), 289-297
- RÖMER, P.: Diseases and pests of *Lupinus mutabilis* in Germany. ILA Lupin Newsletter 11 (1988), 28-32
- SCHMIDT, H.E.: Virosen an Gemüse- und Körnerhülsenfrüchten in der DDR und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. Diss. B, Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin (1982), 236 S.
- SCHMIDT, H.E.; KARL, E.: Viruses of lupins in Europe and conclusions for resistance breeding. ILA Abstracts 6th Internat. Lupin Conference Temuco-Pucon, Chile (1990), 117
- SCHMIDT, H.E.; KARL, E.: Diseases and pests of andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) and other lupin species in Europe. *Lupinus mutabilis*: adaptation and production of *L. m.* under European pedochimatic conditions. CEC, EUROPROTEINA, Workshop, Cascais, Portugal (im Druck)
- SCHMIDT, H.E.; MEYER, U.: Verbreitung, Schädigung und Bekämpfung von Virose der Gelblupine (*Lupinus luteus* L.) in drei neuen Ländern der Bundesrepublik Deutschland. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst, Braunschweig (im Druck)
- WINK, M.: Alkaloid composition of *Lupinus mutabilis* and potential applications. *Lupinus mutabilis*: adaptation and production of *L. m.* under European pedochimatic conditions. CEC, EUROPROTEINA, Workshop, Cascais, Portugal (im Druck)

ERSTE ERGEBNISSE ZUM ENDOGENEN PILZBEFALL VON *LUPINUS LUTEUS* (WURZEL UND STENDEL) IN ABHÄNGIGKEIT VON STANDORT UND FRUCHTFOLGE.

Uta Feiler

Fachgebiet Phytomedizin der Technischen Universität Berlin

ABSTRACT

Preliminary results of fungal invasion in *Lupinus luteus* (roots and stems) in relation to soil-conditions and sequence of cropping.

This article deals with the analysis of endogenous fungal invasion in roots and stems of *Lupinus luteus* cultivated on eight different fields. The intensity of the symptoms and the spectrum of the fungi are shown. Besides other genera especially invasion by *Fusarium* spp. and *Phoma* spp. occurred. When testing the seeds (9 cultivars) fungi of the genera *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Epicoccum*, *Fusarium* and *Phoma* were frequently isolated.

RESUMEN

Resultados preliminares de la relación entre la infestación fúngica en raíces y tallos de *Lupinus luteus* y las condiciones del suelo en cultivos secuenciales

Este artículo analiza la invasión endógena de hongos en raíces y tallos de *Lupinus luteus* cultivado en ocho campos diferentes. Se describe la intensidad de los síntomas y el espectro del hongo. Se determinó que la infestación principal fue causada por *Fusarium* spp y *Phoma* spp, aparte de otras infestaciones menores con otros géneros de hongos. Por otro lado en el análisis de las semillas de 9 cultivares de lupino se aislaron con frecuencia los siguientes géneros de hongos: *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Phoma*.

1. EINLEITUNG

Verglichen mit anderen Leguminosen zeichnen sich Lupinensamen vor allem durch einen sehr hohen Proteingehalt (40- > 50%) aus, der für die menschliche Ernährung verwertbar ist (Gross, 1988). In den letzten 15 Jahren ist eine Erweiterung des Wissens über die Lupine feststellbar. Für viele Länder Lateinamerikas, Afrikas und Asiens ist sie eine neue Proteinquelle, die nahrhaft und billiger ist als herkömmliche tierische Proteine (Aguilera, 1988). So wird von Gross (1988) beschrieben, welche vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten durch den Eiweißgehalt, Ölgehalt und Rohfasergehalt bestehen. In Chile werden Nährmittel aus Lupinensamen (Lupinenmilch, Tofu, Mehl) zur Überwindung des Eiweißmangels in der menschlichen Ernährung eingesetzt. Von der Möglichkeit des Nutzens von Lupinenprodukten in Ernährung, Medizin und Landwirtschaft wird auch aus Israel berichtet (Birk et al., 1988). Ähnlich den Sojaerzeugnissen lassen sich eine Vielfalt an Lebensmitteln wie Backwaren, Süßigkeiten, Getränke, Wurst- und Fleischwaren aus Lupinengrundstoffen her-

stellen (Reyes et al., 1980; de Sousa et al., 1988). Doch nicht nur für die menschliche Ernährung kommen Lupinenprodukte zur Anwendung. Positive Ergebnisse bei der Nutzung als Schaffütter in Neuseeland (Hill, 1988), Spanien (Perez-Cuesta et al., 1980), Südafrika (Pakendorf, 1986), Australien (Bailey et al., 1986), Schweinefutter in den USA (Erickson, 1988), Rinderfutter in Frankreich (Emile et al., 1988), Japan (Fukamachi, 1986) und Geflügelmastfutter in der UdSSR (Bogdanov et al., 1988) belegen weitere Verwendungsmöglichkeiten.

Neben dem Nährwert können beim Anbau von Lupinen günstige Effekte erzielt werden, so beispielsweise die Verminderung von Bodenerosion (Derpsch et al., 1980) oder die Ertragssteigerung und Schwarzbeinigkeitminderung bei Getreide (Armstrong, 1986; Mock, 1986). Sogar der Einsatz von Lupinenextrakt als Wachstumsregulator ist möglich (Kahnt et al., 1987). Um die erheblichen Vorzüge der Lupinen nutzen zu können, steht die Forderung ihre qualitative und quantitative Produktion zu verbessern. Die Ertragsfähigkeit ist relativ gering und wird vor allem durch das Auftreten von Schaderregern begrenzt. So hat der Anbau von Lupinen hauptsächlich durch Krankheiten in vielen Ländern an Popularität verloren (Williams, 1986). Die Beschäftigung mit dem Problemgebiet: "Lupinenkrankheiten und ihre Eindämmung" wird als wesentlicher Beitrag zur internationalen Agrarforschung angesehen, um einer Pflanze, die seit mehr als 3000 Jahren für ihre vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten als Nahrungs-, Heil-, Futter- und Düngungspflanze bekannt ist, auch in unserer Zeit den gebührenden Platz einzuräumen.

Wissensstand: Lupinenpilzkrankheiten und ihre Bekämpfungsmöglichkeiten

Schon kurz nach der Einführung der Süßlupine und der damit verbundenen Anbauausweitung, werden vor allem pilzliche Schaderreger als begrenzender Faktor für Anbau und Ertrag erwähnt (Hackbarth & Troll, 1960). Als Schwerpunkt wird auf die bodenbürtigen Pilze hingewiesen (Opitz, 1949; Hackbarth & Troll, 1960). Eine der wichtigsten Erregergruppen von Fuß- und Welkekrankheiten ist nach vielen Autoren die Gruppe der *Fusarium*-Arten (Richter, 1941; Kamüschkow, 1983; Motte et al., 1990-A). Die Angaben über die Artenzusammensetzung und den Schädigungsgrad durch diese Pilzgruppe variieren stark. Oft wird *Fusarium oxysporum* f.sp. lupini als hauptsächlichster Schadverursacher betrachtet (Dietrich, 1980; Dittrich, 1987; Gladstones et al., 1987). Weitverbreitet ist die Auffassung, daß dieser Pilz für die Lupinenwelke verantwortlich ist, die durch Gefäßverpilzung verursacht wird (Braun & Riehm, 1957; Kirchner, 1975; Rataj-Guranowska, 1988). Große Ausfälle durch diese *Fusarium*art wurden hauptsächlich in Deutschland (Troll, 1964; Dittrich, 1987) und Polen (Frenzel, 1987; Sadowski & Borys, 1988) beobachtet. In Spanien konnte keine Gefäßverbräunung durch *Fusarium oxysporum* festgestellt werden, sondern nur eine Wurzelfäule bei der dieser Pilz als Bestandteil einer *Fusarium*erregergruppe (*F.solani*, *F.roseum*, *F.oxysporum*) auftrat (Jambrina et al., 1988). Auch in Frankreich konnten verschiedene *Fusarium*-Arten häufig isoliert werden, jedoch war die größte Anzahl nicht pathogen (Gondran, 1988). Von gleichen Ergebnissen wird aus Australien berichtet (Sweetingham, 1989). In Untersuchungen von Frey (1980), war die *Fusarium*welke ebenfalls von geringer Bedeutung. Sicherlich hat die Existenz verschiedener *Fusarium*stämmen einer Art, sowie die Artenzusammensetzung des Erregerkomplexes einen erheblichen Einfluß auf den Schädigungsgrad. Von Richter(1941) konnten 3 *Fusarium oxysporum*-Stämme mit verschiedener Pathogenität gegenüber den Lupinenarten unterschieden werden. Gladstones et al.(1988) und Rataj-Guranowska (1988) stellten ebenfalls eine beträchtliche Variabilität von *Fusarien* hinsichtlich ihrer Pathogenität gegenüber Lupinenarten fest.

Neben bodenbürtigen Pilzen besitzen auch samenbürtige Schaderreger eine große Bedeutung für die Lupine. In der Mykoflora des Saatgutes konnten als hauptsächlichste Pathogene *Ascochyta* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium*

spp., *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Phoma* spp. nachgewiesen werden (Lacey et al., 1987; Filipowicz & Wagner, 1988; Gräber & Jahn, 1990). Auch *Pleiocheta setosa* ist als samenbürtiger Erreger bekannt (Motte et al., 1990-A) und auf Flächen in Australien (Cowling, 1988; Sweetingham, 1989) und Frankreich (Gondran, 1988) überwiegt die Schädigung durch diesen Pilz. Als Wurzelfäuleerreger mit erheblichem negativem Einfluß auf das Pflanzenwachstum sind weiterhin *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp. und *Thielaviopsis basicola* bekannt (Boas & Merckenschlager, 1923; Roemer, 1987; Jambrina et al., 1988; Sweetingham, 1988).

Für die Eindämmung von Auflauf-, Fuß- und Welkekrankheiten der Lupine, die durch bodenbürtige pilzliche Schaderreger verursacht werden, sind zur Zeit noch keine direkten Bekämpfungsmöglichkeiten verfügbar. Indirekte Maßnahmen, wie die Sicherung eines optimalen Pflanzenwachstums durch Boden- und Bestandesführung erlangen daher große Wichtigkeit. Eine Auflaufverbesserung durch eine Bekämpfung des samenbürtigen Befalls mit Saatgutbeizmitteln auf der Basis von Carbendazim und Thiram hat sich bewährt (Motte et al., 1990-B), allerdings schließt dies die Beimpfung mit Knöllchenbakterien aus.

Trotz intensiver Züchtungsarbeit auf Resistenz gegenüber den bodenbürtigen Pathogenen (vor allem gegenüber *F. oxysporum* f.s.lupini), stehen bisher noch keine Lupinensorten mit ausreichenden Resistenzmerkmalen gegenüber mehreren Erregern zur Verfügung.

In Ägypten konnten erste Erfolge bei der biologischen Bekämpfung von *F. oxysporum* f.sp.lupini in Vitro mit *Trichoderma harzianum* und *Bacillus subtilis* erzielt werden (Osman et al., 1986).

Insgesamt muß jedoch festgestellt werden, daß angesichts des oftmals enormen Schadausmaßes durch die pilzlichen Pflanzenpathogene die Anwendung der Saatgutbeizung und auch der vorbeugenden Maßnahmen nicht für eine effektive Bekämpfung ausreichen. Die Schaffung von nutzbaren Bekämpfungsstrategien ist daher notwendig, die gewährleisten, daß die Produktion eines so wertvollen pflanzlichen Rohstoffs nicht weiter eingeschränkt werden muß.

2. MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

Grundlage der Arbeit bildete die Untersuchung von *Lupinus luteus* auf endogenen Pilzbefall von Stengel und Wurzel. Als Versuchsmaterial dienten Pflanzen der Saatzuchtbetriebe Trebatsch (im brandenburgischen Raum) und Bornhof (im mecklenburgischen Raum). In jedem der Betriebe wurden vier Probenahmeflächen nach Vorfrüchten und Standorteigenschaften ausgesucht. Hauptkriterium für die Auswahl der Flächen war die Anbaufolge von Lupinen. Besondere Beachtung fanden die Provokationsfelder der Betriebe für *Fusarium*- und Virusresistenzzüchtung (Variante 1 und 5), auf denen durch langjährigen Lupinenanbau eine Anreicherung von Schadpilzen und Antagonisten zu erwarten war. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Varianten ist aus Tab.1 ersichtlich.

Tab. 1: Übersicht über die Versuchs-Varianten

a) Versuchsbetrieb Trebatsch

b) Versuchsbetrieb Bornhof

Variante	Bodenform	Vorfrucht	Lupinenanbau in Jahren
a)	1 Sand-Rosterde	Lupinen	ca 25
	2 Tieflehm-Fahlerde	Winterroggen	1
	3 Tieflehm-Fahlerde	Lupinen	2
	4 Sand-Rosterde	Kartoffeln	1
b)	5 Sand-Rosterde	Lupinen	3
	6 Sand-Rosterde	Lupinen	2
	7 Sand-Rosterde	Lupinen	2
	8 Sand-Braunerde	Kartoffeln	1

Nach verschiedenen Vorversuchen zur Anzucht von Lupinenpflanzen in sterilem Boden und dem dort starken Auftreten von Pilzbefall ergab sich die Notwendigkeit von Saatgutuntersuchungen. Die geprüften Sorten, sowie der Herkunftsbetrieb sind in Tab.2 aufgelistet.

Tab. 2: Sorten und Herkunftsbetrieb

Sorte	Betrieb
Refusa nova	
Stamm 2795/84	
Stamm 7379/83	Trebatsch
Stamm 5360/86	
Stamm 6544/86	
Schwako	
Bornowa 1	Bornhof
Toples St. 28626	
Bornowa 2	Müncheberg

METHODEN

Zur Feststellung des Befalls mit Fußkrankheiten wurden je Fläche und Boniturtermin (Trebatsch : 21.06, 11.07.1990; Bornhof 03.07, 17.07.1990) 6 x 25 Pflanzen entnommen. Nach gründlichem Auswaschen der Wurzeln und Säuberung der Stengelbasis fand die Symptomaufnahme statt. Dazu wurden Wurzeln und Stengelbasis mittels einer Standleuchtlupe bei zehnfacher Vergrößerung bonitiert. Als Grundlage diente der angezeigte Boniturschlüssel:

- Klasse 0 = Wurzel und Stengel ohne Symptome
 Klasse 1 = 25 % Symptome an Wurzel bzw Stengelbasis
 Klasse 2 = 50 % Symptome an Wurzel bzw Stengelbasis
 Klasse 3 = 75 % Symptome an Wurzel bzw Stengelbasis
 Klasse 4 = Wurzel und Stengelbasis völlig verfärbt

Zur besseren Auswertbarkeit sind die Einzelboniturwerte in Befallsindices umgerechnet worden. Für die Berechnung des Befallsindex (BI) kam folgende Gleichung zur Anwendung:

$$BI = \frac{\text{Summe der Anzahl befallener Pflanzen} \times \text{Boniturklasse} \times 100}{\text{Gesamtzahl der Pflanzen} \times \text{höchste Boniturklasse}}$$

Der Befallsindex wird in Prozent angegeben.

Nach der Symptombonitur wurde von jeder Pflanze ein Wurzel- und Stengelstücker nach 5 min. Oberflächensterilisation mit NaOCl (15 % ig) und anschließendem Spülen mit sterilem Aqua-dest auf BMA-Medium ausgelegt und bei 22°C im Brutschrank inkubiert. Die Feststellung des Pilzauswuchses erfolgte nach fünf Tagen. Nach dem Anlegen von Reinkulturen und dem Überimpfen jedes Pilzstammes auf SNA-Medium zur mikroskopischen Bestimmung und auf BMA-Medium zur makroskopischen Merkmalsprägung (Farbe, Wuchsform) ist das Artenspektrum (soweit möglich) aufgenommen worden. Beim Saatguttest fanden die gleichen Methoden der Oberflächensterilisation, der Auslegung des Prüfgutes auf Medium und der Bestimmung Anwendung. Je Sorte wurden 50 Körner auf endogenen Pilzbefall untersucht.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisdarstellung ist Teil eines mehrjährigen Untersuchungsprogrammes in welchem folgende Fragen bearbeitet werden sollen:

1. Welche Pilze treten an Wurzel und Stengel der Lupine auf?
2. Welche von diesen sind pathogen?
3. Welches ist die Hauptkrankheit bzw. deren Verursacher?
4. Welche Antagonisten sind nachweisbar?
5. Besteht die Möglichkeit eines Antagonisteneinsatzes als Pflanzenschutzmaßnahme?

Die vorliegenden Ausführungen basieren auf einjährigen Untersuchungen in der Vegetationsperiode 1990. Aussagen zur Pathogenität der einzelnen Pilze konnten noch nicht eingearbeitet werden, da die Versuche dazu noch im Anfang begriffen sind. Ziel der Darstellung der bisherigen Ergebnisse soll eine Einführung in das Problemgebiet Pilzkrankheiten an *Lupinus luteus* im deutschen Raum sein, sowie ein Überblick über das Pilzspektrum, das gefunden wurde.

-Pflanzenuntersuchungen

Bei den untersuchten Pflanzen konnte zu beiden Boniturterminen eine hohe Symptomausprägung an Wurzeln und Stengelbasen in allen Varianten festgestellt werden. Das Versuchsmaterial der Varianten 4 und 8 (Vorfrucht Kartoffeln) wies jedoch im Vergleich zu den anderen Varianten weniger Symptome auf. Besonders

die Pflanzen der Variante 8 unterschieden sich deutlich in Pflanzenlänge (Mittelwert: 71,38cm) und kräftigem Wuchstyp von denen der anderen Varianten. Das Material der Provokationsflächen war gekennzeichnet durch kleine Pflanzen (Variante 1: Mittelwert: 26,85; Variante 5: Mittelwert: 46,35 cm) mit oft gänzlich gelb verfärbten Sproß, dunkel verfärbten Wurzeln und häufiger Gefäßverbräunung. Auch die Lupinen der Variante 6 zeigten einen hohen makroskopischen Befall. Besonders am Standort Trebatsch waren die Unterschiede zwischen einmaligem Anbau von Lupinen und dem zweijährigem Nacheinanderbau gering. Beim Boniturstadium Pilzauswuchs gab es zwischen allen Varianten kaum Differenzen. Außer bei Variante 4 waren zwischen 70 und 85 % Pilzauswuchs aus der Gesamtzahl der ausgelegten Pflanzenstücke zu verzeichnen. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über Symptomausprägung und Pilzauswuchs der einzelnen Varianten.

In den untersuchten Pflanzenproben wurde zu beiden Boniturterminen und bei allen Varianten ein relativ breites Pilzspektrum ermittelt. Dieses umfaßt neben den wichtigen pilzlichen Schaderregern der Gattungen *Fusarium*, *Botrytis*, *Pythium*, *Cylindrocarpon* Pilze der Gattungen *Gliocladium*, *Chaetomium* und *Acremonium*. Auch weniger bekannte Fäuleerreger wie *Phoma* spp. konnten gefunden werden. Einen Überblick über das Gesamtpilzspektrum aus den untersuchten Wurzeln und Stengeln gibt Tab. 3.

Tab. 3 : Gesamtspektrum der nachgewiesenen Pilze

Fusarium oxysporum
Fusarium solani
Fusarium avenaceum
Fusarium culmorum
Fusarium equiseti
Fusarium torulosum
Gliocladium catenulatum
Gliocladium nigrovirens
Gliocladium roseum
Phoma medicagenis
Phoma eupyrena
Phoma pomorum
Phoma levilei
Cylindrocarpon destructans
Pythium spp.
Acremonium spp.
Chaetomium spp.
Alternaria spp.
Stemphylium spp.
Ulocladium spp.
Sclerotinia spp.
Penicillium spp.
Trichoderma spp.
Zygorrhynchus heterogamus
Aureobasidium pullulans
Coniothyrium spp.
Chalara elegans
Phialophora spp.

Abb. 1:

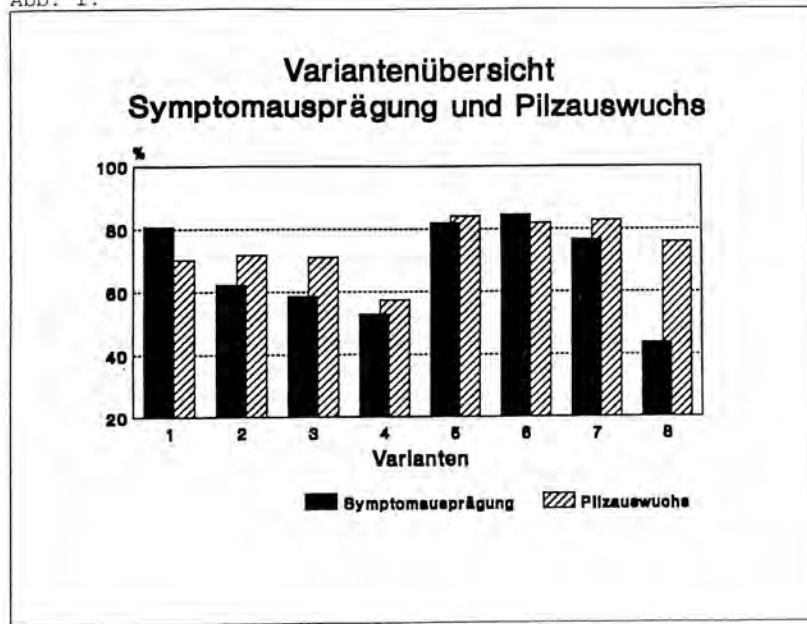
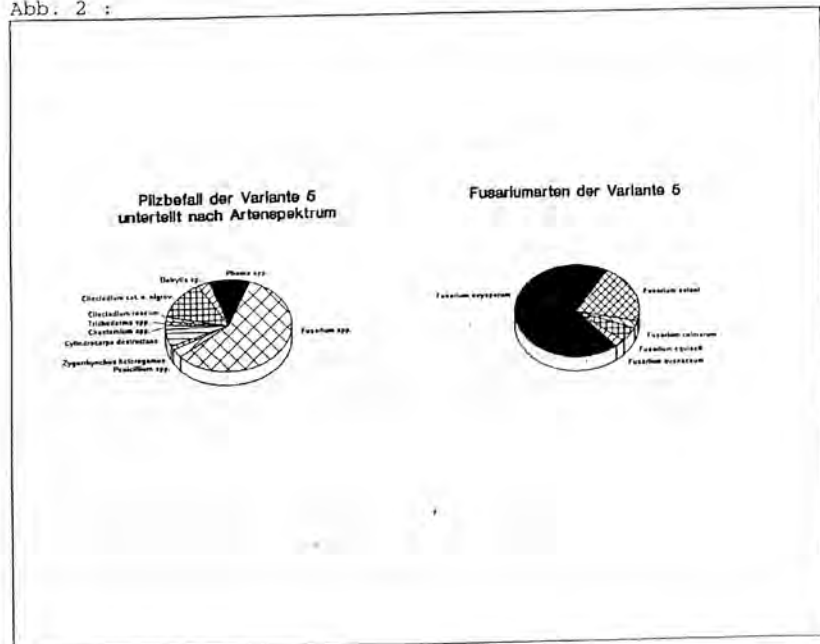


Abb. 2 :



Im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Autoren konnten *Phomopsis* spp. und *Rhizoctonia solani* nicht festgestellt werden. Das Pilzspektrum der einzelnen Varianten variiert kaum in der Zusammensetzung der einzelnen Pilzarten, jedoch im unterschiedlich starkem Auftreten der Arten je Variante. Dies wird besonders deutlich bei der Gegenüberstellung von Variante 5 (Provokationsfeld Bornhof) und 8. Abbildung 2 zeigt Artenspektrum und Anteil der einzelnen Arten von Variante 5 zum zweiten Boniturtermin.

Der Hauptanteil der Gesamtisolate der Variante 5 war durch den als Lupinenpathogen bekannten Pilz *Fusarium oxysporum* gekennzeichnet. Auch das als Bohnenpathogen beschriebene *Fusarium solani* war häufig. Außerdem konnten *Phoma* spp. und *Gliocladium* spp. in beträchtlicher Anzahl nachgewiesen werden. Bei Variante 8 überwogen Pilze der Gattung *Phoma*. *Gliocladium catenulatum* und *nigrovirens*, sowie *Botrytis* sp. nahmen ebenfalls einen großen Anteil an den Gesamtisolaten ein. Abbildung 3 macht dies deutlich (hier wurde gleichfalls der zweite Boniturtermin ausgewertet).

Die Unterschiede zwischen Variante 5 und 8 zeigen, daß nach mehrjährigen Nacheinanderbau von Lupinen sich deren spezifische Krankheitserreger wie *Fusarium oxysporum* im Boden anreichern. Es ist anzunehmen, daß andere wahrscheinlich nicht auf die Wirtspflanze Lupine spezialisierte Fäuleerreger wie *Phoma* spp. und *Botrytis* spp. unabhängig von der Fruchtfolgestellung der Lupine auftreten und einen Befall verursachen.

-Saatgutuntersuchungen

Da für Pathogenitätstests möglichst keimfreies Saatgut Verwendung finden soll, wurde es notwendig verschiedene Sorten der gelben Lupine auf endogenen Pilzbefall im Samen zu untersuchen. Von den neun geprüften Sorten erreichten die Stämme 2795/84 und 6544/86 die höchste Prozentzahl an befallenen Körnern. Der geringste Pilzbefall war bei der Sorte Toples Stamm 28626 feststellbar. Eine Gesamtübersicht gibt Abbildung 4.

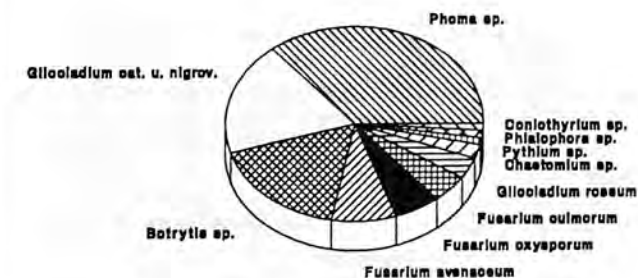
Als Hauptvertreter am untersuchten Saatgut sind *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp. und *Penicillium* spp. zu nennen. Auf Grund von sterilem Mycel konnte eine größere Anzahl von Isolaten nicht genauer klassifiziert werden. Abbildung 5 zeigt das Pilzspektrum des Saatgutes.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird von Untersuchungen des endogenen Pilzbefalls in Wurzeln und Stengeln von *Lupinus luteus* auf acht Flächen berichtet. Die Symptomausprägung und das Pilzspektrum werden aufgezeigt. Neben vielen anderen Gattungen traten vor allem *Fusarium* spp. und *Phoma* spp. auf. Bei einer Saatgutprüfung (neun Sorten) konnten Pilze der Gattungen *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Epicoccum*, *Fusarium* und *Phoma* häufig isoliert werden.

Abb. 3:

Pilzbefall der Variante 8 unterteilt nach Artenspektrum



(Befall in % von den Gesamtisolaten)

Abb. 5

Artenspektrum des Saatguttestes in % des Auftretens

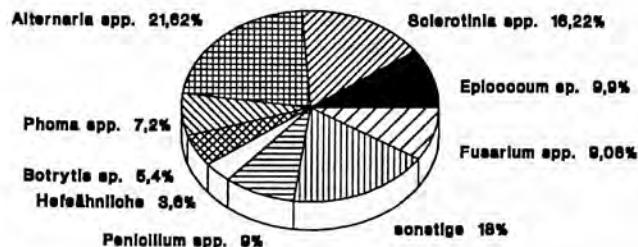
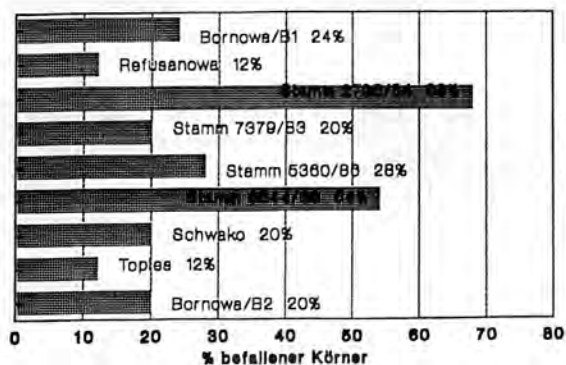


Abb. 4

Saatguttest Neun Sorten je 50 Korn

Sorte



5. LITERATURVERZEICHNIS

- AGUILERA, J.M.(1988) Developments in lupin protein extraction technology. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 262-277.
- ARMSTRONG, E.L.(1986) Grain legume effects on wheat yield in central western N.S.W. Proc. of 4th Int. Lupin Conf, Geraldton, Western Australia, August 1986, 305 pp.
- BAILEY, A.N.; MACKINTOSH, J.B.(1986) A lupinseed pellet for shipboard feeding of sheep. Proc.of 4th Int. Lupin Conf., Geraldton, Western Australia, August 1986, 300 pp.
- BIRK, V.; MADAR, Z.; SAMISH, S.; TENCER, Y.; HAYES, D.(1988) Isolation and evaluation of lupin-seed proteins, fibres and secondary metabolits. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 660-665.
- BOAS, F.; MERKENSCHLAGER, F.(1923) Die Lupine als Objekt der Pflanzenforschung. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 144 S.
- BOGDANOV, G.A.; PALIY, I.F.; POLOZYNK, O.F.(1988) Results of studies and problems of realization of lupin feed grains potential. Proc.of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 691-695.
- BRAUN, H.; RIEHM, E.(1957) Krankheiten und Schädlinge der Kulturpflanzen und ihre Bekämpfung. Paul Parey in Berlin und Hamburg, Verlag für LW, Vet.med., GB. u. Forstw. Berlin, 368 S.
- COWLING, W.A.(1988) Breeding for resistance to leaf and root diseases caused by Pleiocheta setosa in narrow-leaved lupin. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 217-230.
- DERPSCH, R.; ALBERTINI, J.L.(1980) Experiments with cover crops and lupines in the state of Parana, Brazil, and its importance for water and erosions control. Proc. of 1th Int. Lupin Workshop, Lima, Peru, April 1980, 187-211.
- DE SOUSA, B.R.; PEREIA, H.(1988) Characterization and potential utilization of lupin stem as an fiber source. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 695-699.
- DIETRICH, W.-H.(1980) Ergebnisse und Aufgaben der züchterischen Bearbeitung der Resistenzeigenschaften

- gegen die Fusariumwelke bei Lupinen. Abschlussarbeit im Postgradualstudium Pflanzenzüchtung, Halle, 51 S.
- DITTRICH, S.**(1987) Die Züchtung von alkaloidarmen Gelblupinen (*Lupinus luteus*) auf Kombinierte Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl forma sp.lupini Snyder et Hansen und das Bohnenengelbmosaikvirus. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle, 88 S.
- EMILE, J.C.; HUQUET, L.E.; HODEN, A.; MALTERRE, L.**(1988) Sweet lupin seeds for dairy cows and young bulls feeding. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 382-394.
- ERICKSON, P.J.**(1988) Nutrition of pigs fed lupin. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 373-383.
- FILIPOWICZ, A.; WAGNER, A.**(1988) Mycoflora of seed of *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus albus* cultivated in Poland with a regard to pathogenic species. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 521-525.
- FRENCEL, F.I.**(1987) Infections diseases of lupins in Poland, with special reference to the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). Boletín Informativo del Lupino-Lupin Newsletter No.11, 14-20.
- FREY, F.**(1980) Preliminary observation of diseases and pests of lupines (*Lupinus mutabilis* sweet) in Peru and Bolivia. Proc. of 1th Int. Lupin Workshop, Lima, Peru, April 1980, 176-187.
- FUKAMACHI, K.**(1986) Usage of lupin as feed ingredient for cattle in Japan. Proc. of 4th Int. Lupin Conf., Geraldton, Western Australia, August 1986, 77-84.
- GLADSTONES, J.S.; COWLING, W.A.; SWEETINGHAM, M.W.**(1987) Report of Australian lupin mission to the UdSSR, July 1-15, 1987. Boletín Informativo del Lupino, No.11, 1-14.
- GONDRAN, J.**(1988) Fungal diseases of white lupin sown in autumn in France. Special studies on *Fusarium* spp. and *Pleiocheta setosa* Kirchn. Hughes. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 201-216.
- GRÄBER, U.; JAHN, M.**(1990) Untersuchungen zum Auftreten samenbürtiger Schaderreger an Leguminosen. Nbl. für den PS der DDR, Heft 3, Jg.44, 50-52.
- GROSS, R.**(1988) Lupins in human nutrition. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 51-64.
- HACKBARTH, J.; TROLL, H.-J.**(1960) Anbau und Verwertung von Süßlupinen. DLG-Verlag-Frankfurt am Main, 115 S.
- HILL, G.D.**(1988) Lupins in sheep nutrition. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 359-373.
- JAMBRINA, J.L.; CRESPO, M.C.; BLANCO, R.**(1988) The white and narrow leafed lupin breeding for the central western region of Spain. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 146-156
- KAHNT, G.; HIJAZI, L.A.**(1987) Effect of bitter lupin extract on growth and yield of different crops. J. Agronomy and Crop Science 159, 320-328.
- KAMÜSCHKOW, A.W.**(1983) Die mehrjährige Lupine - eine Pflanzeneiweißreserve. Leningrader Verlag, 78 S.
- KIRCHNER, H.A.**(1975) Grundriß der Phytopathologie und des Pflanzenschutzes. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 328 S.
- LACEY; LABB; JONES**(1987) Fungal invasion of lupines following desiccation. Rothamsted Experimental Station-Report for 1986, June 1987, 116 pp.
- MOCK, I.T.**(1986) The influence of lupins on the disease and nutrient status of a subsequent wheat crop grown on calcareous sand. Proc. of 4th Int. Lupin Conf., Geraldton, Western Australia, August 1986, 306pp.
- MOTTE, G.; BEER, H.; FEYERABEND, G.; GROLL, U.; MÖGLING, R.; RÖDER, K.; ROGALL, G.; SÜB, A.**(1990-A) Überwachung und Bekämpfung pilzlicher und tierischer Schaderreger, sowie Unkrautbekämpfung in großkörnigen Futterleguminosen (Vorläufige Empfehlung). Institut für Pflanzenschutzforschung Kleinmachnow, 35 S.
- MOTTE, G.; BEER, H.; MAROLD, R.; KLEIN, W.; SCHINKEL, W.; PFITZNER, C.; NEUBERT, E.**(1990-B) Erste Ergebnisse zur Beizung großkörniger Futterleguminosen. Nbl. für den PS der DDR, Heft 3, Jg.44, 45-50.
- OPITZ, K.**(1949) Anbau von Hülsenfrüchten. Deutscher Bauernverlag Berlin, 63 S.
- OSMAN, A.R.; FAHIM, M.M.; SAHAB, A.F.; ABD-ELKADER, M.M.**(1986) Biological control of lupin wilt. Egypt. J. Phytopathol., Vol.18, 11-25.
- PAKENDORF, K.W.**(1986) New perspectives on lupin production in the Republic of South Afrika. Proc. of 4th Int. Lupin Conf., Geraldton, Western Australia, August 1986, 279-280.
- PEREZ-CUESTA, M.; TIRADO, J.; CONRADO, M.; MUNOZ, A.**(1980) The efficiency of *Lupinus albus* "Neuland" in the intensiv feeding of lambs. Proc. of 1th Int. Lupin Workshop, Lima, Peru, April 1980, 643-653.
- RATAJ-GURANOWSKA, M.**(1988) Immunochemical comparison of two physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. lupini. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 189-201.
- REYES, J.; GROSS, U.; PONCE, L.; SERPA, M.**(1980) Experiments on the use of *Lupinus mutabilis* for human consumption. Proc. of 1th Int. Lupin Workshop, Lima, Peru, April 1980, 707-721.
- RICHTER, H.**(1941) Lupinenfusariosen. Sonderdruck aus den Mitteilungen der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin Dahlem, Nr.64, 50-61.
- ROEMER, P.**(1987) Diseases and pests of *Lupinus mutabilis* in Germany. Boletín Informativo Del Lupino-Lupin Newsletter, No.11, 28-33.
- SADOWSKI, L.; BORYS, W.**(1988) The healthness of 3 lupin species grown on sandy loam soil. Proc. of 5th Int. Lupin Conf., Poznan, Poland, July 1988, 463-467.
- SWEETINGHAM, M.W.**(1989) Fungi associated with root and hypocotyl diseases of seedling lupins in Western Australia. Australian Journal of Agricultural Research, Vol.40, No.4, 28-35.
- TRÖLL, H.J.**(1964) Züchtung auf Fusarium-Resistenz bei *Lupinus luteus*. Agrotechnische und züchterische Probleme bei den Lupinenarten. Internationales Symposium des Institutes der Pflanzenzüchtung der Karl-Marx-Universität Leipzig, Juli 1964, 727-733.
- WILLIAMS, W.**(1986) The current status of the crop lupinus. Proc. of 4th Int. Lupin Conf., Geraldton, Western Australia, August 1986, 1-14.

DIE AUSBREITUNG DER LUPINENBLATTLAUS (*MACROSIPHUM ALBIFRONS* ESSIG) IN MITTELEUROPA UND IHRE BEDEUTUNG ALS VIRUSVEKTOR

Ewald Karl und Heribert E. Schmidt

Institut für Phytopathologie Aschersleben
der Biologischen Zentralanstalt Berlin
Theodor-Roemer-Weg
O - 4320 Aschersleben

ABSTRACT

Distribution of the Lupin aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig) in Central Europe and its importance as virus vector

A survey of the actual distribution of the lupin aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig) in Europe and Germany is given. The area of distribution extends now at least from Ireland to Poland and from Denmark to Austria. Problems of the further spreading to South and Southeast Europe are discussed. - While in the very mild winter 1989/90 *M. albifrons* hibernated anholocyclically on *Lupinus polyphyllus* Lindl. at Aschersleben (Sachsen-Anhalt), the lupin aphids died during the winter 1990/91 because of too low temperatures (up to -14°C). - Using 10 aphids per test plant *M. albifrons* transmitted the bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) to 16.4 % of the test plants, the turnip mosaic potyvirus (TuMV) to 25.9 %, the peanut stunt cucumovirus (PSV) to 11.6 % of the test plants, respectively.

RESUMEN

La difusión del pulgón del lupinus (*Macrosiphum albifrons* Essig) en Europa Central y su importancia como vector de virus

El trabajo presenta un estudio respecto a la distribución del pulgón del lupino (*Macrosiphum albifrons* Essig) en Europa y especialmente en Alemania. El área total de difusión se extiende actualmente desde Irlanda hasta Polonia y desde Dinamarca hasta Austria. En el trabajo se discuten los problemas que causaría una mayor expansión hacia el sur y el sudeste de Europa. Se informa que en el suave invierno de 1989/90 el *M. albifrons* inverna en *Lupinus polyphyllus* Lindl., en Aschersleben, Sachsen-Anhalt (Alemania), pero las bajas temperaturas (menores de -14°C) del invierno de 1990/91, causaron su muerte. Usando 10 pulgones por planta testigo, *M. albifrons* infestó al siguiente porcentaje de plantas con las respectivas virosis identificadas: 16,4% con el potyvirus mosaico amarillo del poroto (BYMV), 25,9% con el potyvirus mosaico del nabo (TuMV), 11,8% con el stunt cucumovirus del maní (PSV) y el 11,6% con el enation mosaico virus de la arveja (PEMV).

1. EINLEITUNG

Die aus Nordamerika zu Beginn der 80er Jahre nach Europa eingeschleppte Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) hat sich inzwischen von England her über mehrere europäische Länder ausgebreitet. Auf der Grundlage einer Literaturschau und persönlicher Mitteilungen von Fachkollegen sowie umfangreicher eigener Beobachtungen soll der derzeitige Stand der Ausbreitung dieses für unser Gebiet neuen Schaderregers dargestellt werden. - *M. albifrons* verdient nicht nur als Saugschädling, sondern auch als potentieller Vektor verschiedener Pflanzenviren Beachtung. Über Ergebnisse zur experimentellen Übertragung von vier Viren durch die Lupinenblattlaus wird hier berichtet, wobei auch ein Vergleich der Übertragungsrate mit derjenigen anderer Aphidenarten erfolgt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Das von den Lupinen gesammelte Blattlausmaterial wurde im Labor unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Citoplast, Carl Zeiss Jena) bestimmt und nach Morphen und Stadien getrennt ausgezählt.

Die Versuche zur Virusübertragung sind mit ungeflügelten adulten Weibchen durchgeführt worden. Der Virusaufnahme wurde eine etwa einstündige Fastenzeit der Blattläuse vorgeschaltet. Die Akquisitionszeit betrug im Falle der nichtpersistenten Viren 15 Minuten, beim persistenten Erbsenationenmosaik-Virus (PEMV) 24 Stunden. Nach dem Aufenthalt auf der Virusquelle wurden auf jede Testpflanze 10 Aphiden gesetzt. Die Inokulationszeit betrug bei den nichtpersistenten Viren 24, beim persistenten PEMV 48 Stunden. Die Testpflanzen wurden nach Abtötung der Blattläuse mit Pirimor 50 DP (Pirimicarb) im Gewächshaus aufgestellt. Außer der Symptombonitur erfolgte ein serologischer Virusnachweis mittels DAS-ELISA.

3. ERGEBNISSE

3.1. VERBREITUNG VON *M. ALBIFRONS*

Auf der Grundlage der uns zugänglich gewordenen Informationen gibt die Abbildung 1 den derzeitigen Stand der Verbreitung der Lupinenblattlaus in Europa wieder. Nach der ersten Beobachtung der Art in Europa im Jahr 1981 in Kew/England (Stroyan, 1981) erfolgte in den beiden nächsten Jahren eine rasche Ausbreitung über weite Teile von England und Wales (Carter et al., 1984).

Bereits 1983/84 konnte *M. albifrons* auf dem europäischen Festland beobachtet werden, und zwar in den Niederlanden und in Deutschland (Eppler und Hinz, 1987). Im Jahr 1985 fand man die Art in Irland (Carter et al., 1987) und der Schweiz (Meier und Schweizer, 1987). In Frankreich wurde *M. albifrons* mit Sicherheit im Jahre 1986 in vier Regionen (von der Bretagne bis nach Burgund) nachgewiesen; vermutlich kam die Art aber im Pariser Becken bereits 1984 vor (Bournoville et al., 1988). Spätestens 1987 trat *M. albifrons* auch in Schottland (Carter und Nichols, 1989) und 1988 in Belgien (B. Papierok, zit. bei Müller et al., 1990) auf.

Was die CSFR betrifft, so ist die Lupinenblattlaus 1989 in vielen Teilen West- und Südböhmens sowie in Südmähren nachgewiesen worden (Stary und Havelka, 1991). Befallsbeobachtungen aus Nordböhmen liegen ebenfalls aus dem Jahr 1989 vor (Karl und Schmidt, 1990a), solche aus Nordmähren aus dem Jahr 1990 (Karl, 1991). Das Jahr 1990 erbrachte Erstfunde von *M. albifrons* für Polen (Karl et al., 1991a), Österreich (Karl et al., 1991b) sowie Dänemark (Th. Thieme, pers. Mitt.).

In der Abbildung 2 ist die derzeitige Verbreitung der Lupinenblattlaus in Deutschland näher dargestellt. Erstmals wurde *M. albifrons* 1983 in Mittelhessen bei Gießen an *Lupinus mutabilis* Sweet gefunden (Eppler und Hinz, 1987). Es folgten Beobachtungen insbesondere an *L. albus* L. und *L. angustifolius* L. 1985 in Braunschweig (Wink und

Abbildung 1: Ausbreitung der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons*) in Europa.

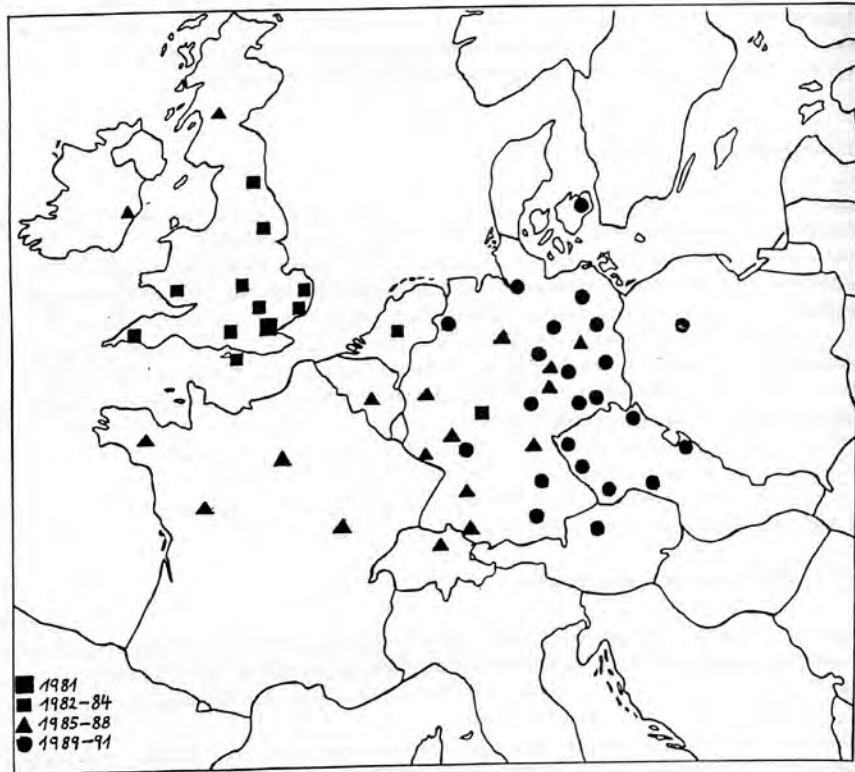
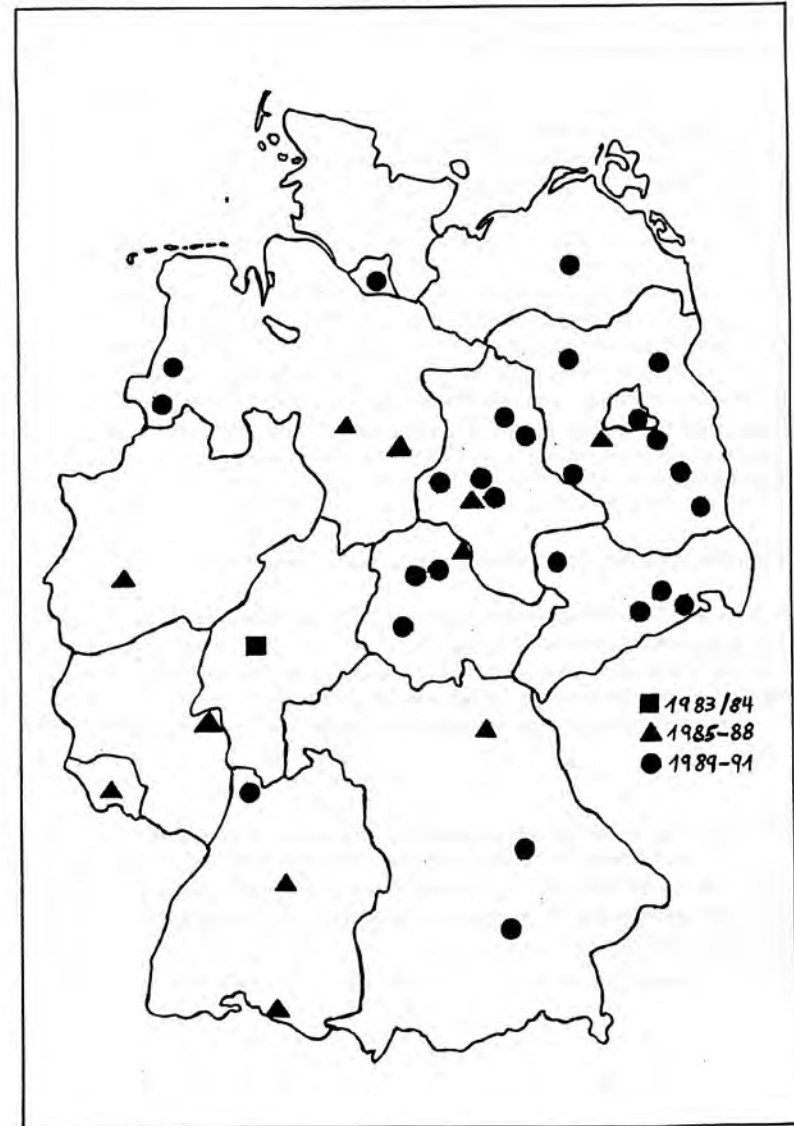


Abbildung 2: Fundstellen der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons*) in Deutschland.



Römer, 1986) und 1986 im Rheinland bei Leichlingen (Erdelen, 1988). Ebenfalls 1986 wurde die Lupinenblattlaus bei Bayreuth in Oberfranken an *L. polyphyllus* Lindl. gefunden (Piron, 1987) sowie 1987 bei Stuttgart (Gruppe et al., 1988). Das Jahr 1988 brachte weitere Nachweise für das Gebiet der westdeutschen Bundesländer: Mainz (Wink, pers. Mitt.), Saarland, Bodenseegebiet (Gruppe et al., 1988) und Hannover (W. Rieckmann, zit. bei Müller et al., 1990). Die ersten sicheren Nachweise der Lupinenblattlaus für das Gebiet der ostdeutschen Bundesländer stammen ebenfalls aus dem Jahre 1988: Roßleben Kr. Artern (Thüringen) und Aschersleben (Sachsen-Anhalt) (Karl und Schmidt, 1989) sowie Potsdam (Müller et al., 1990).

Im Jahr 1989 konnte - offenbar begünstigt durch die vorangegangenen sehr milden Winter - eine sehr rasche weitere Ausbreitung von *M. albifrons* im östlichen Deutschland registriert werden (Karl und Schmidt, 1990b). Überwiegend würden die Funde an *L. polyphyllus* gemacht. In Thüringen lagen die Fundorte in den Kreisen Gotha, Langensalza und Sömmerda, in Sachsen in den Kreisen Leipzig, Dresden und Pirna und in Sachsen-Anhalt in den Kreisen Bernburg, Hettstedt, Aschersleben, Staßfurt, Wanzleben, Quedlinburg, Halberstadt, Wernigerode, Stendal und Genthin. In Brandenburg wurde Lupinenblattlausbefall in den Kreisen Potsdam, Königs Wusterhausen, Belzig, Neuruppin, Eberswalde, Beeskow und Cottbus registriert.

Staudenlupinen waren auch an zwei Standorten in Berlin-Treptow von *M. albifrons* befallen (Karl und Schmidt, 1990b). Ein Fundort in Mecklenburg ist Malchin (P. Scholze, pers. Mitt.). Als weitere Nachweisorte der Lupinenblattlaus aus dem Jahre 1989 in Deutschland wären zu nennen: Hamburg (M. Lehmann, pers. Mitt.), Heidelberg in Nordbaden (M. Wink, pers. Mitt.) und Regensburg in der Oberpfalz (Eppler, 1990). Aus dem Jahr 1990 seien als zusätzliche Fundstellen Taufkirchen (Ldkr. Erding) in Oberbayern (Karl et al., 1990b) und Freiberg in Sachsen (M. Lehmann, pers. Mitt.) angeführt. Ebenfalls an *L. polyphyllus* konnte *M. albifrons* 1991 an zwei Orten im westlichen Niedersachsen beobachtet werden: Schüttorf in der Grafschaft Bad Bentheim und Geeste im Emsland bei Lingen (Karl und Schmidt, in Druck).

3.2. POPULATIONSDYNAMIK UND ÜBERWINTERUNG VON *M. ALBIFRONS*

In den Vegetationsperioden 1989 und 1990 war - offenbar als Folge einer vorwiegend anholozyklischen Überwinterung - der Befall der Staudenlupinen schon Anfang/Mitte Juni sehr heftig. Während meist in der ersten Juli-Hälfte der Höhepunkt der Populationsentwicklung zu verzeichnen war, erreichte der Befall im August an vielen Standorten einen Tiefpunkt. Im Herbst war dann wieder ein deutlicher Anstieg der Population zu beobachten. Ende Juni/Anfang Juli war in manchen Populationen der Anteil von Geflügelten und deren Vorstadien (Nymphen) bereits recht hoch, wie die Tabelle 1 zeigt.

Es können demnach schon im Juni zahlreiche geflügelte Tiere für die weitere Ausbreitung der Lupinenblattlaus bereitstehen. Je länger der Zeitpunkt des Besiedlungsbeginns einer Pflanze zurückliegt, desto höher ist im allgemeinen der Anteil von Nymphen und Geflügelten. So erklärt sich beispielsweise der große Unterschied im diesbezüglichen Prozentsatz zwischen den beobachteten Populationen in den benachbarten Orten Heudeber und Danstedt zu demselben Untersuchungstermin (Tab. 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung von *Macrosiphum albifrons*- Populationen an *Lupinus polyphyllus* im Sommer 1989

Datum/Fundort	Anzahl Blattläuse			Anteil (%)	
	Ungeflügelte	Larven	Nymphen	Geflügelte	Nymphen u. Geflügelte
21.06. Mehringen	129	429	307	11	36,3
04.07. Schackenthal	37	236	33	1	11,1
04.07. Plötzkau	63	688	233	32	26,1
05.07. Weißensee	26	586	12	1	2,1
12.07. Berlin-Nieder schöneweide	30	412	24	1	5,4
16.07. Heudeber	10	317	2	0	0,6
16.07. Danstedt	22	68	111	29	60,9
20.07. Arneburg	23	174	28	1	12,8

Während Lupinen mit hohem Alkaloidgehalt in Europa nahezu konkurrenzlos von *M. albifrons* befallen werden, kann an alkaloidarmen Zuchtformen gelegentlich ein stärkerer Befall auch mit anderen Blattlausarten registriert werden. Dies gilt insbesondere für die Erbsenblattlaus (*Acyrtosiphon pisum* (Harr.)) und die Schwarze Bohnenblattlaus (*Aphis fabae* Scop.).

In der Tabelle 2 ist ein Beispiel für den gleichzeitigen Befall einer alkaloidarmen Lupinenstaude mit 5 Blattlausarten aufgeführt. Es dominierte in diesem Falle eindeutig (*A. fabae*), was sich in der hohen Anzahl von Larven und Nymphen ausdrückt.

Tabelle 2: Artenspektrum der Blattläuse an einer alkaloidarmen Zuchtform von *Lupinus polyphyllus*

Besatz einer Staude am 23.06. 1989 in Lichterfelde-Buckow	
<i>Macrosiphum albifrons</i>	1 Ungeflügelte + 2 Larven
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	2 Ungeflügelte + 3 Larven
<i>Aphis fabae</i>	12 Ungeflügelte + 222 Larven
<i>Aphis nasturtii</i>	3 Larven + 2 Nymphen
<i>Aulacorthum solani</i>	1 Geflügelte + 2 Larven

Bei der Untersuchung von *M. albifrons*-Populationen im Herbst gewinnt man den Eindruck, daß wir es bei uns vorwiegend mit dem anholozyklischen Stamm der Lupinenblattlaus zu tun haben. Wir fanden bisher niemals Sexuales oder Wintererier. In dem sehr milden Winter 1989/90 hat *M. albifrons* im Raum Aschersleben (Sachsen-Anhalt) nachweislich an *Lupinus polyphyllus* anholozyklisch überwintert.

Tabelle 3: Populationsentwicklung von *Macrosiphum albifrons* an *Lupinus polyphyllus* - anholozyklische Überwinterung 1989/90 in Aschersleben

Staudenbeet auf dem Versuchsfeld des Institutes für Phytopathologie, Untersuchung von jeweils 30 bis 40 Lupinenblättern

Datum	Anzahl lebender Stadien				lebende Tiere insges.	tote Tiere insges.
	Ungeflügelte	Larven	Nymphen	Geflügelte		
07.12.89	55	1255	639	6	1955	514
04.01.90	0	48	27	1	76	171
15.03.90	19	30	0	0	49	-
14.05.90	54	583	102	43	782	-
28.06.90	361	3346	1602	1634	6943	-

Wie die Tabelle 3 zeigt, kam es im Zeitraum Januar bis März 1990 zu einem Tiefpunkt der Populationsentwicklung. Es überwinterten aber genügend Larven und ungeflügelte Adulte, damit sich im Frühjahr schnell wieder eine starke Population aufbauen konnte. Ende November 1989 kam es in Aschersleben in einigen Nächten zu Tiefsttemperaturen von -6°C und Anfang April 1990 von -3°C . Diese Temperaturen reichten nicht aus, um die Populationen auszulöschen. Dagegen gelang es der Lupinenblattlaus im Winter 1990/91 in Aschersleben nicht, im Freiland anholozyklisch zu überwintern. Offenbar war das Temperaturminimum von -14°C Anfang Februar 1991 die Hauptursache dafür, daß die Tiere abstarben, zumal zu diesem Zeitpunkt eine schützende Schneedecke fehlte. Als Folge der erschwerten Bedingungen für eine erfolgreiche Überwinterung war der Spontanbefall von Lupinen im Frühjahr 1991 bedeutend geringer als in den beiden Vorjahren.

3.3. VIRUSÜBERTRAGUNG DURCH MACROSIPHUM ALBIFRONS

In der Tabelle 4 sind die Übertragungsergebnisse, die mit *M. albifrons* und drei nichtpersistenten Viren und dem persistenten Erbsenenationenmosaik-Virus (pea enation mosaic virus, PEMV) erzielt worden sind, aufgeführt. Das Wasserrübenmosaik-Virus (turnip mosaic potyvirus, TuMV) wurde am besten übertragen ($\text{ÜR} = 25,9\%$). Die Vergleichsart *Myzus persicae* (Sulz.) übertrug das Virus freilich noch weitaus effektiver ($\text{ÜR} = 90\%$). Mit dem Erdnußstauche-Virus (peanut stunt cucumovirus, PSV) infizierte *M. albifrons* 11,8% der Testpflanzen. Mit dem für die Lupinen wirtschaftlich sehr wichtigen Bohnengelbmosaik-Virus (bean yellow mosaic virus, BYMV) erzielte die Lupinenblattlaus eine Übertragungsrate von 16,4% (Schmidt und Karl, 1989), mit dem persistenten PEMV eine solche von 11,6%.

In der Abbildung 3 sind für die beiden letztgenannten Leguminosen-Viren auch die Übertragungsraten der Vergleichs-Aphiden *M. persicae* und *A. pisum* dargestellt. Demnach übertrug *M. persicae* das BYMV 5,5mal besser als *M. albifrons* und *A. pisum* das betreffende Isolat des PEMV etwa 6,5mal besser.

Abbildung 3: Übertragung des Bohnengelbmosaik-Virus (BYMV) und des Erbsenenationenmosaik-Virus (PEMV) durch drei Blattlausarten.

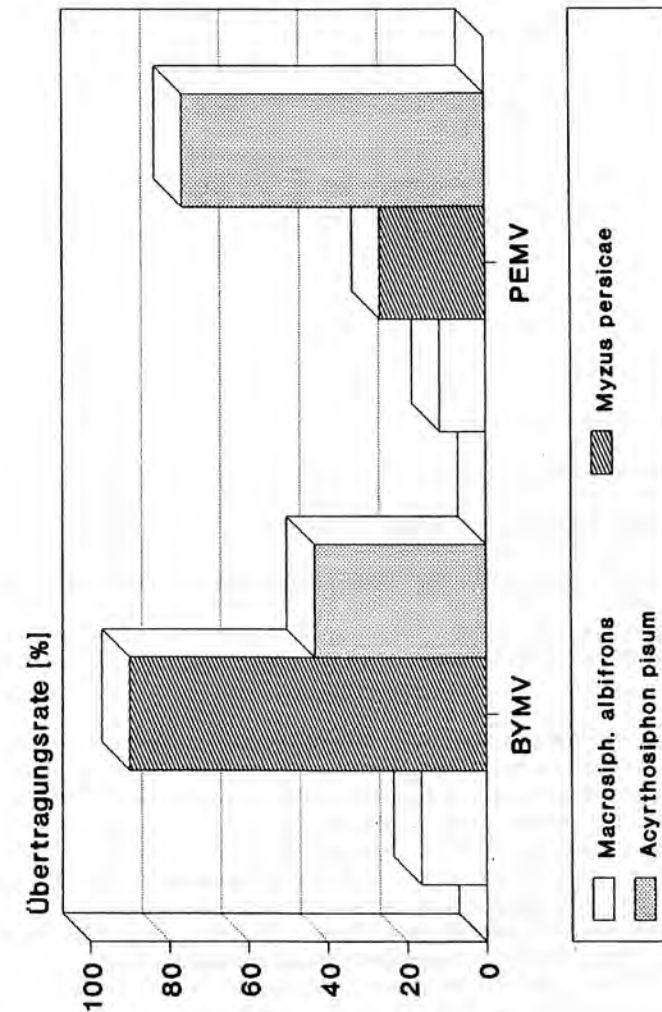


Tabelle 4: Übertragung von vier Viren durch die Lupinenblattlaus

Virus	Testpflanze	Akquisition	Inokulation	Übertragungsrates abs.	%
bean yellow mosaic potyvirus	Vicia faba	15 Min.	24 h	18/100	16,4
Turnip mosaic potyvirus	Brassica rapa var. oleifera	15 Min.	24 h	15/58	25,9
peanut stunt cucumovirus	Vicia faba	15 Min.	24 h	5/31	16,1
	Nicotiana tabacum	-	-	1/20	5,0
pea enation mosaic virus	Vicia faba	24 h	48 h	9/105	8,6
	Lupinus albus	24 h	48 h	9/50	18,0
				18/155	11,6

4. DISKUSSION

Seit ihrem Erstnachweis im Jahre 1981 in England hat sich die Lupinenblattlaus innerhalb eines Jahrzehntes über weite Teile West- und Mitteleuropas ausgebreitet. Zur Zeit reicht ihr Verbreitungsgebiet mindestens von Irland bis Polen und von Dänemark bis Österreich. Die Fundstellen in Polen und in Nordmähren (CSFR) liegen bereits östlich des 17. Längengrades, sie markieren offenbar die derzeitige östliche Verbreitungsgrenze der Art. Man gewinnt den Eindruck, daß die Alpen und Pyrenäen bisher eine wirksame Barriere gegen die Ausbreitung von *M. albifrons* nach Südeuropa dargestellt haben. Es ist aber nur eine Frage der Zeit, bis diese für Europa neue Aphidenart auch in Süd- und Südosteuropa heimisch wird. Das Eindringen in diese Gebiete könnte durch passive Verfrachtung von Tieren mit Luftströmungen über die Hochgebirge hinweg erfolgen oder durch Verschleppung von Blattläusen mit befallenen Pflanzenmaterial.

Nach Untersuchungen in Frankreich (Bournoville et al., 1988) kann die Lupinenblattlaus sowohl anholozyklisch als auch holozyklisch überwintern. Die Beobachtungen in Mitteleuropa sprechen bisher dafür, daß wir es bei uns überwiegend mit der anholozyklischen Form zu tun haben. In Gebieten mit ozeanischem Klima oder in ausgesprochen milden Wintern (wie z.B. 1988/89 und 1989/90 in weiten Teilen Deutschlands) haben anholozyklische Klone eine gute Chance erfolgreich zu überwintern. Wie Untersuchungen in Großbritannien gezeigt haben, erleichtert die Toleranz von *M. albifrons* gegenüber tiefen Temperaturen die Überwinterung im parthenogenetisch-viviparen Stadium (Carter und Nichols, 1989). Das Ausmaß der Etablierung der Lupinenblattlaus in winterrkalen Gebieten, vor allem Ost- und Südosteuropa, wird jedoch maßgeblich davon abhängen, inwieweit sich die holozyklische Form in Europa weiter ausbreitet. Als hauptsächliche Überwinterungspflanze würde *Lupinus polyphyllus* fungieren.

Zu den ökonomisch wichtigsten Viren, die Lupinen infizieren können, gehören das Bohnenengelbmosaik- (BYMV) und das Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, CMV). Im Experiment konnte gezeigt werden, daß *M. albifrons* einen Stamm des CMV, der an Lupinen starke Schädigungen hervorruft, zu übertragen vermag (Eppler und Hinz, 1987). Für ein weiteres Cucumovirus, daß Erdnußstauche-Virus (PSV), sowie für die Polyviren BYMV und TuMV konnten wir die Vektorbefähigung von *M. albifrons* nachweisen. Alle genannten Viren können aufgrund ihres nicht-persistenten Übertragungsmodus bereits beim Probesaugen der Blattlaus im Pflanzenbestand und darüber hinaus

verbreitet werden. Infolge des zeitweise sehr hohen Anteils von Geflügelten in ihren Populationen ist *M. albifrons* durchaus in der Lage, an der Ausbreitung dieser Viren wirksam beteiligt zu sein. Beachtenswert ist ferner, daß die Lupinenblattlaus in unseren Versuchen auch das persistente Erbsenenenmosaik-Virus (PEMV) übertragen konnte, wenngleich mit wesentlich geringerer Effektivität als die Erbsenblattlaus.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Überblick über die derzeitige Verbreitung der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in Europa und Deutschland gegeben. Das Verbreitungsgebiet reicht gegenwärtig mindestens von Irland bis Polen und von Dänemark bis Österreich. Probleme der weiteren Ausbreitung von *M. albifrons* nach Süd- und Südosteuropa werden diskutiert. - Während in dem sehr milden Winter 1989/90 *M. albifrons* in Aschersleben (Sachsen-Anhalt) anholozyklisch an *Lupinus polyphyllus* Lindl. überdauerte, starben im Winter 1990/91 die Lupinenblattläuse infolge zu niedriger Temperaturen (bis -14°C) ab. - *M. albifrons* übertrug bei Verwendung von 10 Aphiden je Testpflanze das Bohnenengelbmosaik-Virus (BYMV) auf 16,4% der Testpflanzen, das Wasserrübenmosaik-Virus (TuMV) auf 25,9%, das Erdnußstauche-Virus (PSV) auf 11,8% und das Erbsenenenmosaik-Virus (PEMV) auf 11,6% der Testpflanzen.

6. LITERATUR

- BOURNOVILLE, R.; LEVESQUE, J.; ANTOUN, MARIE; RETAILLEAU, F.: Effects of different lupin genotypes on the lupin aphid, *Macrosiphum albifrons*. Proc. 5th Internat. Lupin Conf., July 5-8, 1988, Poznan (Poland), A 16: 456-462
- CARTER, C.I.; FOURT, D.F.; BARLETT, P.W.: The lupin aphid's arrival and consequences. Antenna 8 (1984) 3, 129-132
- CARTER, C.I.; NICHOLS, J.F.A.: Winter survival of the lupin aphid *Macrosiphum albifrons* Essig. J. appl. Ent. 108 (1989), 213-216
- CARTER, C.I.; WOOD-BAKER, C.S.; POLASZEK, A.: Species, host plants and distribution of aphids occurring in Ireland. Irish Nat. J. 22 (1987), 266-284
- EPPLER, A.: Der gegenwärtige Stand der Ausbreitung von *Macrosiphum albifrons* in Europa. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, Heft 266 (1990), 114
- EPPLER, A.; HINZ, U.: Die Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* Essig, ein neuer Schaderreger und Virusvektor in Deutschland. J. appl. Ent. 104 (1987), 510-518
- ERDELEN, C.: Incidence of the lupin aphid in Western Germany (Homoptera: Aphididae). Entomol. Gener. 13 (1988), 261-262
- GRUPPE, A.; HINZ, U.; RÖMER, P.; EPPLER, A.: Zur Ausbreitung der Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, Heft 245 (1988), 173-174
- KARL, E.: Beobachtungen zum Auftreten der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in Nordmähren (CSFR). Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 27 (1991), 321-322
- KARL, E.; PASZKIEWICZ, Z.; SCHMIDT, H.E.: Ein Nachweis der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in der Republik Polen. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 27 (1991a), 243-244
- KARL, E.; PLANK, A.; SCHMIDT, H.E.: zum Vorkommen der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in Süddeutschland und Österreich. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 27 (1991b), 323-324
- KARL, E.; SCHMIDT, H.E.: Nachweis der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) in der Deutschen Demokratischen Republik. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 25 (1989), 297-298
- KARL, E.; SCHMIDT, H.E.: Beobachtungen zum Auftreten von *Macrosiphum albifrons* Essig an *Lupinus polyphyllus* Lindl. im Jahre 1989 im Norden der CSFR. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 26 (1990a), 499-501

KARL, E.; SCHMIDT, H.E.: Beobachtungen zum Auftreten von *Macrosiphum albifrons* Essig an *Lupinus polyphyllus* Lindl. im Jahre 1989 in der DDR. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 26(1990b), 503-505

KARL, E.; SCHMIDT, H.E.: Weitere Beobachtungen zum Befall von Lupinen mit *Macrosiphum albifrons* Essig. Jahresbericht des Institutes für Phytopathologie Aschersleben 1991 (im Druck)

MEIER, W.; SCHWEIZER, C.: *Macrosiphum albifrons*, eine für die Schweiz und Mitteleuropa neue Blattlausart auf Lupine. Mitt.Schweiz. Landwirtschaft. 35 (1987) 1/2, 41-42

MÜLLER, F.P.; STEINER, H.; DUBNIK, H.: Eindringen und Ausbreitung der Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* Essig in Mitteleuropa. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 26 (1990), 153-157

PIRON, P.G.M.: The advance of the American lupin aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig) (Homoptera: Aphididae) in Europe. J. appl. Ent. 103 (1987), 111-112

SCHMIDT, H.E.; KARL, E.: Übertragung des Bohnengelbmosaik-Virus durch die Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig). Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 25 (1989), 513-515

STARY, P.; HAVELKA, J.: *Macrosiphum albifrons* Essig, an invasive lupin aphid and its natural-enemy complex in Czechoslovakia (Homoptera, Aphididae). Acta Entomol. Bohemoslov. 88 (1991), 11-120

STROYAN, H.L.G.: A North American lupin aphid found in Britain. Plant Pathol. 30 (1981), 253

WINK, M.; RÖMER, P.: Acquired toxicity - the advantages of specializing on alkaloid-rich lupins to *Macrosiphum albifrons* (Aphidae). Naturwissenschaften 73 (1986), 210-212

UNTERSUCHUNGEN ZUM ALKALOIDGEHALT DER LUPINENBLATTLAUS *MACROSIPHUM ALBIFRONS* IM HINBLICK AUF IHRE DURCH DIE WIRTSPFLANZE ERWORBENE TOXIZITÄT

B.H.Emrich¹ und M. Wink²

¹Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Universität Gießen,
6300 Gießen, Deutschland

²Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg, Neuenheimer Feld 364,
6900 Heidelberg, Deutschland

ABSTRACT

Alkaloid content of the lupin aphid (*Macrosiphum albifrons*) in relation to alkaloid production by its hostplants

Seven sweet and bitter cultivars of four lupin species were tested regarding their alkaloid contents in seeds, leaves and stems as compared to the alkaloid content in the lupin aphid, *M. albifrons*. The results confirmed that the four cultivars *L. mutabilis* (LM 32), *L. albus* (Blanca), *L. angustifolius* (Kubesa) and *L. luteus* (Schwako) are alkaloid-rich, while the cultivars *L. albus* (Kalina), *L. angustifolius* (Handelssaat) and *L. luteus* (Topaz) proved to be sweet as indicated by the official plant breeding institutions.

No significant difference could be found between the alkaloid content of leaves and stems of the examined lupins. The alkaloid content of the aphids correlated with the content of their corresponding host plants as follows: sweet lupins as host plants resulted in "sweet" aphids (exception Kalina) while bitter lupins led to "bitter", alkaloid-rich aphids. A limited accumulation capacity of alkaloids in the aphids seems to exist. Varied accumulation degrees in the aphids can be explained by the fact that capacity limits are being reached after different periods of time. The latter depends on the specific alkaloid content of the hostplant. Selective transport proteins, which are located in the intestinal tract tissue might probably be responsible for the accumulation of certain alkaloids.

The alkaloid spectrum of the seven lupin cultivars mentioned above shows differences in quality and quantity such as the composition of major alkaloids, which can be held responsible for the toxicity to some predators.

M. albifrons is not only able to resist the deterrent effect of alkaloids of *Lupinus* spp., which are basically accumulated in the phloem sap and plant tissue, but also uses alkaloids in order to create an effective defence system against natural enemies, such as larvae of Coccinellidae or Syrphidae.

RESUMEN

Estudios sobre los contenidos de alcaloides del pulgón del lupino en relación con la toxicidad adquirida de la planta huésped

Variedades dulces y amargas de cuatro especies de lupinos fueron investigadas con respecto al contenido de alcaloides de sus semillas, hojas y tallos. Los resultados fueron comparados con el contenido de alcaloide del pulgón del lupino *Macrosiphum albifrons*. La investigación confirma que los cuatro cultivares, "LM 32" (*L. mutabilis*), "Blanca" (*L.*

albus), "Kubesa" (*L. angustifolius*) y "Schwako" (*L. luteus*) son ricos en alcaloides, mientras que los cultivares "Kalina" (*L. albus*), "Handelssaat" (*L. angustifolius*) y "Topay" (*L. luteus*) son dulces tal como estan identificados oficialmente por las instituciones que los crearon.

No se encontraron diferencias importantes entre el contenido de alcaloides de las hojas y de los tallos en los lupinos examinados. El contenido de alcaloide de los pulgones está correlacionado con el contenido de la planta hospedante, según los siguientes casos: planta huésped de lupino dulce dió como resultado pulgones "dulces" (con excepción de la variedad Kalina), mientras que lupinos amargos dieron pulgones "amargos", ricos en alcaloides. Parece ser que el pulgón tiene un límite de capacidad de acumulación de alcaloides que puede ser alcanzada en diferentes periodos de tiempo, según del contenido de alcaloide de la planta hospedante. El transporte selectivo de proteínas dentro del intestino del pulgón puede ser el responsable de la acumulación de ciertos alcaloides.

El espectro de alcaloides de los siete cultivares mencionados muestra diferente calidad y cantidad de alcaloides que pueden ser los responsables de la toxicidad de algunos predadores.

Macrosiphum albifrons no sólo es resistente al efecto de los alcaloides de *Lupinus spp.* que se acumulan en la savia floemática y en los tejidos de la planta, sino que usa esos alcaloides para crear un sistema de defensa contra enemigos naturales, tales como las larvas de las cochinillas o de las moscas de la familia *Syrphidae*.

1. EINLEITUNG

Zu den charakteristischen Inhaltsstoffen der Lupinen zählen die Chinolizidinalkaloide, deren biologische Bedeutung im Bereich der chemischen Verteidigung gegenüber Fraßfeinden und anderen Schädlingen zu sehen ist. Relativ gut untersucht ist die Wirksamkeit (z.B. Deterrenz und Toxizität) der Alkaloide gegen Insekten (Übersichten in Wink 1985, 1987, 1988, 1992).

Die Bedeutung der Alkaloide als Schutz gegenüber Blattläusen konnte gerade mit Lupinen eindeutig gezeigt werden: Die von den Pflanzenzüchtern auf Alkaloidarmut selektierten Lupinen, die sogenannten Süßlupinen, werden von einer Vielzahl polyphager Blattläuse heimgesucht, während die alkaloidhaltigen Bitterlupinen, die sich nur im Merkmal Alkaloidgehalt unterscheiden, quantitativ gemieden werden (Wink 1988, 1992). Dieser Zusammenhang kommt u.a. deshalb so klar zum Tragen, da die Lupinenalkaloide in den Blättern synthetisiert, aber dann via Phloemsaft, der von den Blattläusen ausgebeutet wird, in alle Pflanzenteile transportiert wird (Wink & Witte 1984).

Im Verlauf der Evolution haben sich jedoch einige Organismen an die Chemie ihrer Wirtspflanzen anpassen können. Insbesondere bei den Insekten finden wir das Phänomen, daß die in der Futterpflanze vorhandenen Schutzstoffe aufgenommen und für die eigene Verteidigung eingesetzt werden. Für diese Arten stellen die Alkaloide keine Abwehrsubstanzen dar, sondern sind häufig eher attraktiv (Übersichten: Harborne 1988, Schlee 1986, Wink 1992 a,b,c).

Auch von den Pflanzen, die Chinolizidinalkaloide bilden, sind einige Insekten bekannt, die sich an die Alkaloidchemie angepaßt haben und sie zur eigenen Verteidigung gegen Prädatoren einsetzen, insbesondere Blattläuse wie *Aphis cytisorum*, *A. genistae* und *Macrosiphum albifrons* (Wink & Witte 1991, Wink 1992a,b).

Die seit 1983 in Europa vorkommende nordamerikanische Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* fällt durch die Akzeptanz extremer Alkaloidgehalte ihrer Wirtspflanzen, Leguminosen der Gattung *Lupinus*, auf. Hinsichtlich ihrer Entwicklung reagiert sie unterschiedlich auf verschiedene Alkaloidtypen bzw. unterschiedliche Alkaloidmengen. Ebenso zeigen ihre natürlichen Feinde, Coccinelliden, Syrphiden und Chrysopiden unterschiedlich toxische Reaktio-

Tab.1 Überblick über die verwendeten Lupinenarten

Lupinenart	Sorte Alkaloid-(Herkunft)	Einstufung gehalt [%]*	
<i>Lupinus mutabilis</i>	LM 32 (INRA Lusignan)	2,03	b
<i>Lupinus luteus</i>	Schwako (Kruse & Co., Bielefeld)	0,31	b
	Topaz (Kruse & Co., Bielefeld)	0,04	s
<i>Lupinus albus</i>	Blanca (FAL)	1,22	b
	Kalina (Südwestsaat, Rastatt)	0,06	s
<i>Lupinus angustifolius</i>	Kubesa (Behm GmbH, Bielefeld)	0,48	b
	Handelssaat (Nungesser)	0,02	s

* Alkaloidgehalt bezogen auf die Samentrockenmasse von Freilandmaterial
s/b "süße"/"bittere" Varianten

Samen (1g TG)	Pflanzenmaterial (1g TG)	Blattläuse (100mg FG)
	Trocknen des Pflanzenmaterials: 35°C Zermörsem bzw. Mahlen (Rührwerk Fa. Ika-Werke) mit 0,5n HCl 2x Extrahieren: 20ml 0,5n HCl (bzw. 10ml HCl bei Läusen) 2x Zentrifugieren: 10min, 4000U/min 18 ml Überstand beider Zentrifugationen mit 6n NaOH (2ml) versetzen	
	Eluation: 20ml Extrelutsäulen (Fa. Merck), 80 ml CH ₂ Cl ₂ Rotationsverdampfer: Einengung des Eluats auf wenige ml Verdampfen des restlichen Lösungsmittels in Probengläschen Kapillar-GC-Analyse: Probe in 1ml CH ₂ Cl ₂ lösen	
	externer Standard: Spartein	

Abb.1 Schema zur Probenaufbereitung für die Kapillar-Gaschromatographie

Temperatur	Kapillarsäule
Injektor: 250 Grad	Länge: 30m
Detektor: 300 Grad	Durchmesser: 0,25mm
	Schichtdicke: 0,32µm
	Stationäre Phase: DB1
Ofen-Temperaturprogramm	Probenaufgabe
150-300 Grad	Split-Splitless-Inj.
Heizrata: 15 Grad/min	Inj.-volumen: 1µl
2 min isotherm	Splitless-Timer: 5sec
	Detektor: FID
Split: 1:30	Software
Topsplit: 4,0-4,5 ml/min	Chromstar LC 42
ca. 80 kPa _{sc}	Bruker-Franzen
(Trärgasflußrate)	Analytik GmbH

Abb.2. Bedingungen der Alkaloidanalyse mittels Kapillar-GLC

nen nach Fraß von Lupinenläusen, die auf unterschiedlichen Lupinenwirtspflanzen aufgewachsen sind.

In dieser Arbeit werden gaschromatographische Analysen des Alkaloidgehaltes der Sorten von vier Lupinenarten, *Lupinus mutabilis* cv. LM 32, *L. angustifolius* cv. Kubesa und cv. Handelsaatgut, *L. albus* cv. Blanca und cv. Kalina sowie *L. luteus* cv. Schwako und cv. Topaz vorgestellt im Vergleich zu Lupinenläusen, die diese sieben Sorten als Wirtspflanzen nutzen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Das verwendete Saatgut wurde freundlicherweise von der Fa. Südwestsaat GmbH (Rastatt) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der Lupinen erfolgte im Gewächshaus. Im Rosettenstadium (1. und 2. Laubblatt entfaltet, Aussaat in Pickierschalen) wurden die Pflanzen einzeln getopft und unter Langtagbedingungen (16h hell, 8h dunkel) bei 22+/-2 °C gehalten. Im Alter von 4 Wochen (Sproßentwicklungsstadium) hatten die Pflanzen je nach Art bzw. Sorte eine Höhe von 25-30cm erreicht. In diesem Stadium wurden sie getrennt nach Sproß und Stengel für die Analyse verwendet. Abgetrennt wurden dabei nur Blätter und Stengel der oberen Sproßhälfte. Einen Überblick über die verwendeten Lupinenarten und -sorten hinsichtlich ihres Alkaloidgehaltes zeigt Tab. 1.

2.2. Blattlausmaterial

Die Lupinenlaus-Stammzuchten bestehen im Gewächshaus des Institutes für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (Gießen) seit 3 Jahren. Sie werden unter gleichen Bedingungen wie die Pflanzen gehalten. Gezüchtet wurden die Läuse ebenfalls auf den in Tab. 1 aufgeführten 7 Lupinenarten bzw. -sorten. Die für die Analyse verwendeten Blattläuse waren ausschließlich Imagines, die zu gleichen Teilen von Blättern bzw. Stengeln abgenommen wurden.

2.3. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung des Materials erfolgte für Samen, Grünmasse und Blattläuse in gleicher Weise. Weitere Angaben hierzu sind schematisch in Abb. 1 aufgeführt. Die Daten zur Kapillar-Gaschromatographie sind Abb. 2 zu entnehmen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Alkaloidkonzentrationen im Samen

Wie Abb. 3 zeigt, handelt es sich bei den Sorten LM 32, Blanca, Kubesa und Schwako um bitterstoffreiche Lupinen-sorten mit einem Alkaloidgehalt von 20,3 bis 3,1 mg/gTG. Deutlich davon abgehoben sind die Sorten Kalina, Handelsaat und Topaz mit einer Alkaloidkonzentration von 0,2 bis 0,5 mg/gTG, die damit als alkaloidarme, süße Sorten einzustufen sind.

3.2. Alkaloidkonzentration in der Grünmasse

Abb. 4 zeigt die Unterschiede im Alkaloidgehalt von Blatt und Stengel. Geringfügige Differenzen von 0,8 bzw. 1,4mg/g TG zeigen sich lediglich bei den Sorten LM 32 und Schwako. Bei LM 32 ist die höhere Konzentration im Stengel, bei Schwako im Blatt zu finden.

Vergleicht man die Konzentrationen im Samen und in der Grünmasse miteinander, so zeigt sich, daß die Samenalkaloidgehalte nicht unbedingt mit den Konzentration in der Grünmasse korrelieren. Der Alkaloidgehalt im Blatt von *L. luteus* (Schwako) ist im Vergleich mit der Grünmasse von LM 32 trotz der bei Schwako niedrigeren Samenkonzentration um ca. 1 mg/gTG höher. Umgekehrt führt der bei Topaz und Kalina vergleichsweise ähnliche Alkaloidgehalt im Samen nicht zu entsprechenden Konzentrationen in der Grünmasse. Die Konzentration liegt in Topaz um das Doppelte bzw. Dreifache höher als in Kalina. Auffällig ist in diesem Zusammenhang noch die Sorte Handels-

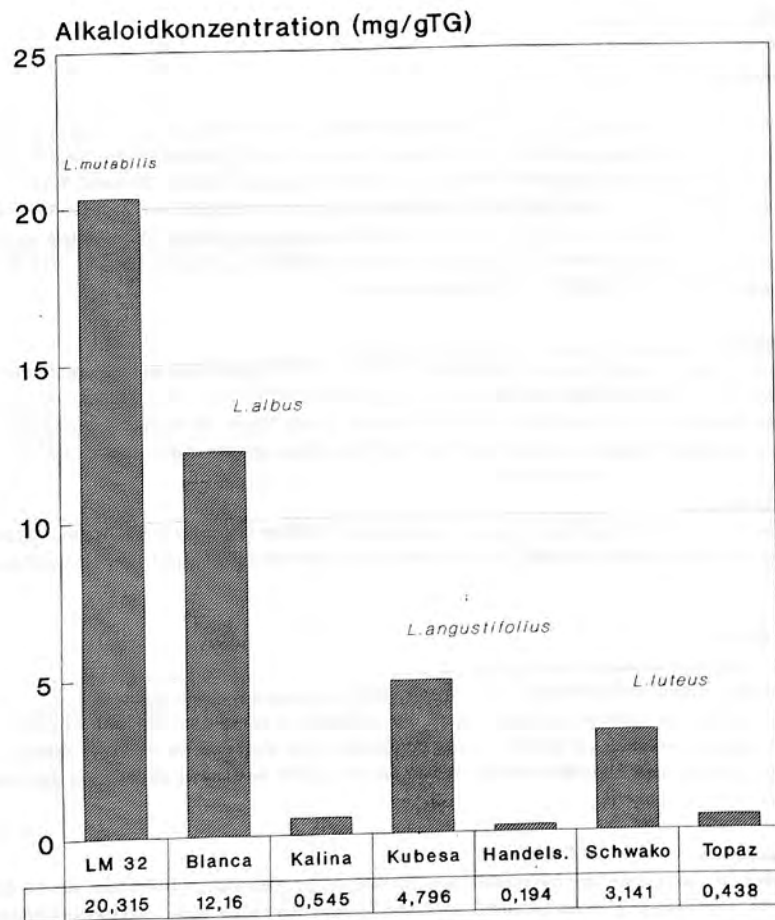


Abb.3. Alkaloidgehalt der Samen der untersuchten Lupinenarten

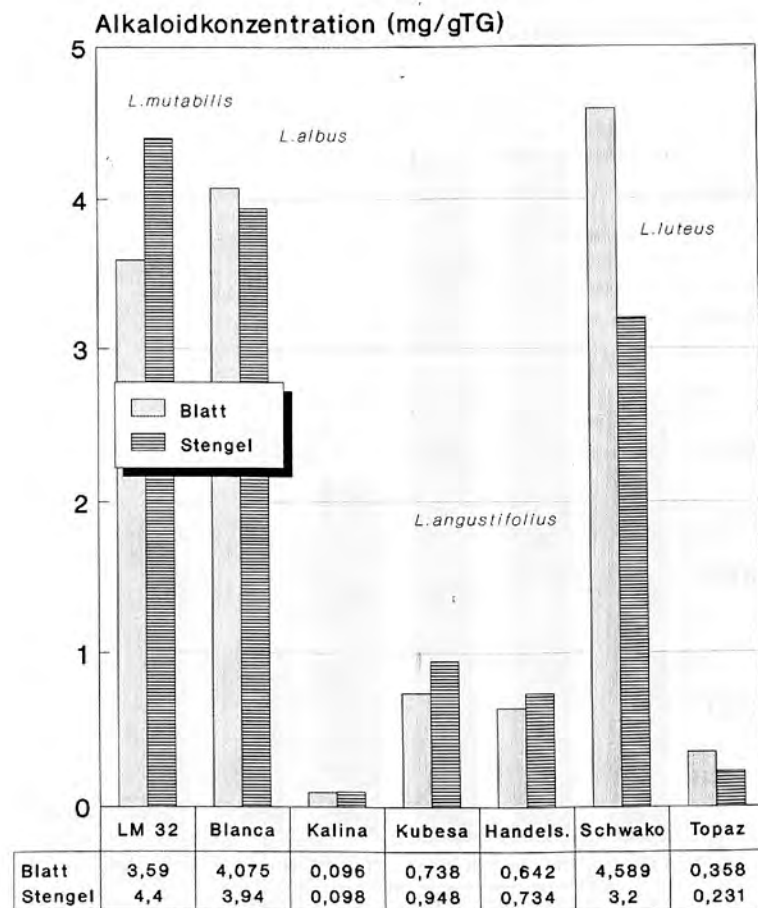


Abb.4. Alkaloidgehalt in der Grünmasse der untersuchten Lupinenarten

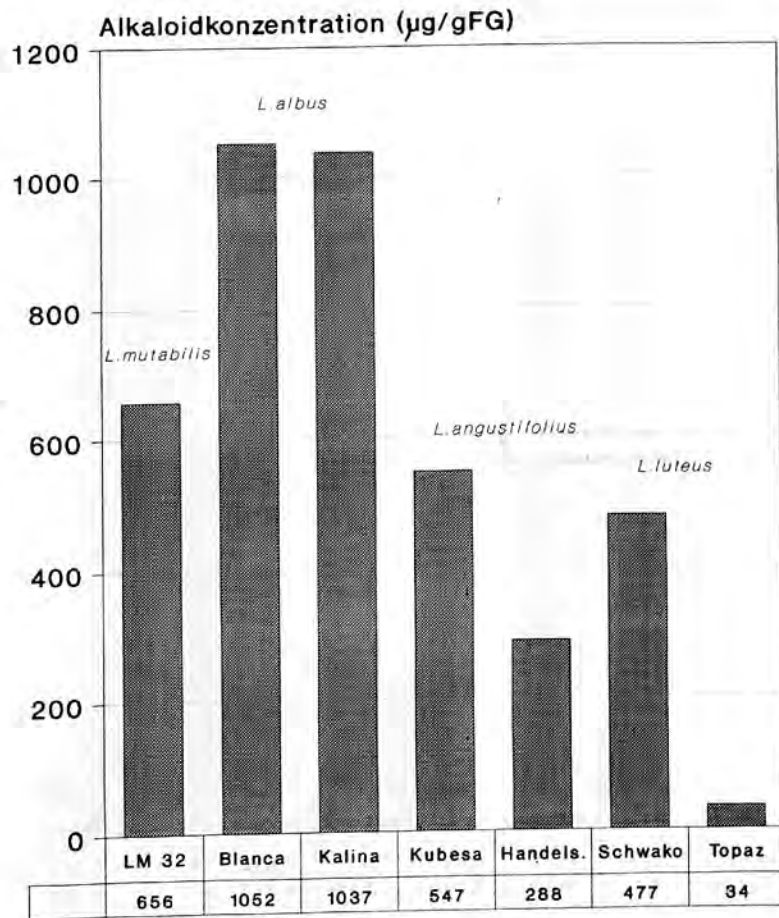


Abb.5. Alkaloidgehalt in *M. albifrons*, die auf den untersuchten Lupinensorten längere Zeit gezüchtet wurde.

saat mit einer Alkaloidkonzentration im Samen von 0,2mg/g TG und in der Grünmasse von ca. 0,7mg/g TG, also um gut das Dreifache mehr. Ähnlich, wenn auch weniger extrem verhält es sich mit der Sorte Schwako. Die Blattkonzentration liegt um ca. 1,4 mg/gTG höher als die Samenkonzentration.

3.3. Alkaloidkonzentration in der Lupinenblattlaus

Bei der Betrachtung der Alkaloidkonzentrationen in den Läusen (Abb. 5), ergibt sich eine Einteilung in die zwei Gruppen "bittere" und "süße" Läuse. In die "bittere" Gruppe fallen die Läuse der Wirtspflanzen LM 32, Blanca, Kalina, Kubesa und Schwako. In der "süßen" Gruppe findet man lediglich die Läuse der Wirtspflanzen Handelssaat und Topaz.

Daß die Kalina-Läuse in der bitteren Gruppe sogar mit dem zweithöchsten Alkaloidgehalt zu finden sind, erstaunt und ist zunächst nicht mit den Daten für die anderen "süßen" Läuse in Einklang zu bringen, die entsprechend der Bitterstoffarmut ihrer Wirtspflanzen einen geringen Alkaloidgehalt aufweisen. Dieses Ergebnis bedarf noch einer Bestätigung.

Zieht man einen Vergleich über die unterschiedliche Akkumulation der Alkaloide in den Läusen hinzu (Abb. 6), erkennt man, daß die mit über 1000% höchste Akkumulation in den Kalina-Läusen zu finden ist. Läßt man diese Läuse aus der Beurteilung heraus, zeigen auch die Kubesa- und Handelssaat-Läuse mit einem aus der Pflanze aufgenommenen Alkaloidanteil von 65 bzw. 42% eine höhere Akkumulation als die übrigen Läuse. Deren Akkumulationsraten unterscheiden sich mit 11-26% nicht wesentlich voneinander.

Die Angaben für die Grünmasse setzen sich aus dem Durchschnitt von Blatt- bzw. Stengelkonzentrationen zusammen. Da auch das aufbereitete Blattlausmaterial eine Mischung von an Blättern und Stengeln saugenden Tieren darstellt, kann anhand dieser Daten kein saugortspezifischer Akkumulationsunterschied festgestellt werden.

Sorte	Blatt-Stengel-Gehalt (mg/gTG)	Blattlaus* (mg/gFG)	Anteil (%)
LM 32	3,995	0,656	16,4
Blanca	4,008	1,052	26,2
Kalina	0,097	1,037	1069,0
Kubesa	0,843	0,547	64,9
Handelssaat	0,688	0,288	41,9
Schwako	3,894	0,477	12,2
Topaz	0,295	0,034	11,5

Abb.6. Vergleich der Alkaloidgehalte in den Blättern der Wirtspflanzen und in *Macrosiphum albifrons*

3.4. Alkaloidspektrum von *L. mutabilis* und *L. luteus*

Die Abbildungen zum Alkaloidmuster von *L. mutabilis* und *L. luteus*, aufgeteilt nach Blatt und Stengel (Abb. 7 und 9), geben exemplarisch einen Überblick über die in der Grünmasse akkumulierten Alkaloide. Die Abb. 8 und 10 zeigen das Spektrum der in der Laus wiedergefundenen Alkaloide.

Bei *L. mutabilis* erkennt man deutlich das Hauptalkaloid Lupanin mit einem Anteil von 40% im Blatt und 39% im Stengel (Abb. 7). Die weiteren Alkaloide sind mit sinkender Konzentration gegen den Uhrzeigersinn aufgeführt. Im Blatt folgen als nächstes die beiden Esteralkaloide 13-Tigloyl- und 13-Angeloyloxylupanin. Das 3-Hydroxylupanin folgt erst an fünfter Stelle. Anders hingegen im Stengel, wo es mit 19% an zweiter Stelle steht. Die Esteralkaloide folgen an vierter und fünfter Stelle.

Die Anteilsverhältnisse spiegeln sich in etwa im Spektrum der Blattlaus (Abb. 8) wieder. Auch hier ist Lupanin mit 44% das Hauptalkaloid, gefolgt von den beiden Esteralkaloiden mit 21 bzw. 13%. Außer den beiden Hydroxylupaninen, 3- und 13-OH-Lupanin, waren in der Blattlaus keine anderen Alkaloide mehr nachweisbar.

Für die Sorte Schwako von *L. luteus* zeigt sich ein völlig anderes Bild (Abb. 9). Hauptalkaloid ist hier Lupinin mit einem Anteil von 49% im Blatt und 78% im Stengel. Beide Male folgt Spartein mit 19% an zweiter Stelle. Im Spektrum der Blattlaus (Abb. 10) überwiegt dahingegen das Spartein mit 51% leicht gegenüber dem Lupanin mit 45%. Auch findet sich hier Lupanin mit einem Anteil von 5%, was in der Grünmasse offensichtlich unter der Nachweisgrenze lag und daher im Spektrum nicht auftaucht.

4. DISKUSSION

Untersucht wurden die artspezifisch wechselnden Alkaloidgehalte sieben verschiedener Lupinensorten. Da die Entwicklung der Lupinenläuse hinsichtlich larvaler Entwicklungsdauer, Imaginalgewicht und Larvenabsatzraten stark abhängig von der Gesamtalkaloidkonzentration und im besonderen vom Alkaloidspektrum ist (EMRICH und SCHMUTTERER, 1990), war davon auszugehen, Erklärungsmöglichkeiten durch die Analyse des Samens, der Blätter bzw. des Stengels und der Blattlaus selbst zu finden.

4.1. Alkaloidkonzentration in Samen und Grünmaterial

Die Analyse des Samens und der Grünmasse (Abb. 3 und 4) ergab eine lupinenartspezifische Alkaloidakkumulation. Die Analyse des Samens und der Grünmasse (Abb. 3 und 4) ergab eine lupinenartspezifische Alkaloidakkumulation. Dem züchterischen Grundsatz, daß in der Grünmasse (Freiland!) 1/6 - 1/10 des Alkaloidgehalts der Samen zu finden ist, konnte hier nicht immer bestätigt werden. So enthält die Grünmasse der Handelssaat-Lupine 3x mehr Bitterstoffe als der Samen selbst. Daß für LM 32, Blanca, Kalina und Kubesa die Grünmassekonzentration 1/4 - 1/5 des Samenalkaloidgehalts ausmacht, läßt sich durch die im Gewächshaus anderen klimatischen Bedingungen erklären. Auch verbleiben die Pflanzen im Gewächshaus für andere, i.d.R. kürzere Zeiträume in ihren einzelnen Entwicklungsstadien. Dies muß bei dem Vergleich von Samen aus Freilandmaterial mit Grünmasse von Gewächshausmaterial beachtet werden.

4.2. Vergleich der Alkaloidkonzentration in Blättern und Stengeln

Entsprechend den in den Zuchten zu beobachtenden lupinenartspezifischen Saugortpräferenzen der Blattläuse wären Unterschiede im Alkaloidgehalt von Blättern und Stengeln zu erwarten gewesen. Dies konnte im Versuch nur bedingt bestätigt werden (Abb. 4). So zeigt sich der höhere Alkaloidgehalt bei LM 32 im Stengel, dem Ort, der als erstes besiedelt wird. Umgekehrt verhält es sich mit der Blattkonzentration bei Schwako, die hier höher ist als im Stengel. So ist auch das Blatt der bevorzugte Saugort der Blattlaus. Daß Alkaloide als Stimulus zum Saugen und Larvenabsatz nötig sind, zeigte schon SMITH (1966) mit Untersuchungen an *Acyrtosiphon spartii*. Da sich aber die anderen Daten nicht mit den Beobachtungen zur Deckung bringen lassen, müssen darüberhinaus noch andere Faktoren für die Wahl des Saugortes von Bedeutung sein. Zusätzliche Information könnte die Analyse des Aminosäurespektrums von Blatt und Stengel liefern, da dort nach KUO-SELL (1989) wesentliche Phagostimulationen zu finden sind.

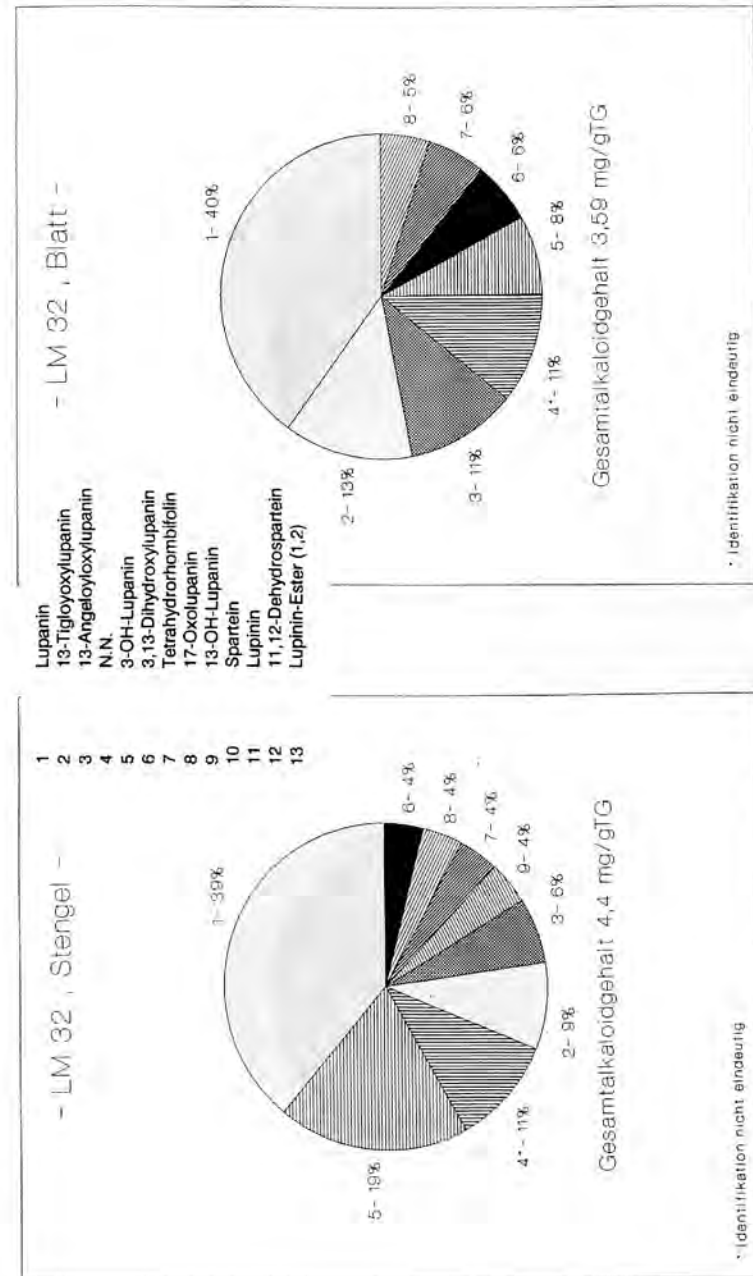


Abb. 7. Zusammensetzung der Chinolizidinalkaloide im Stengel und Blatt von *Lupinus mutabilis*

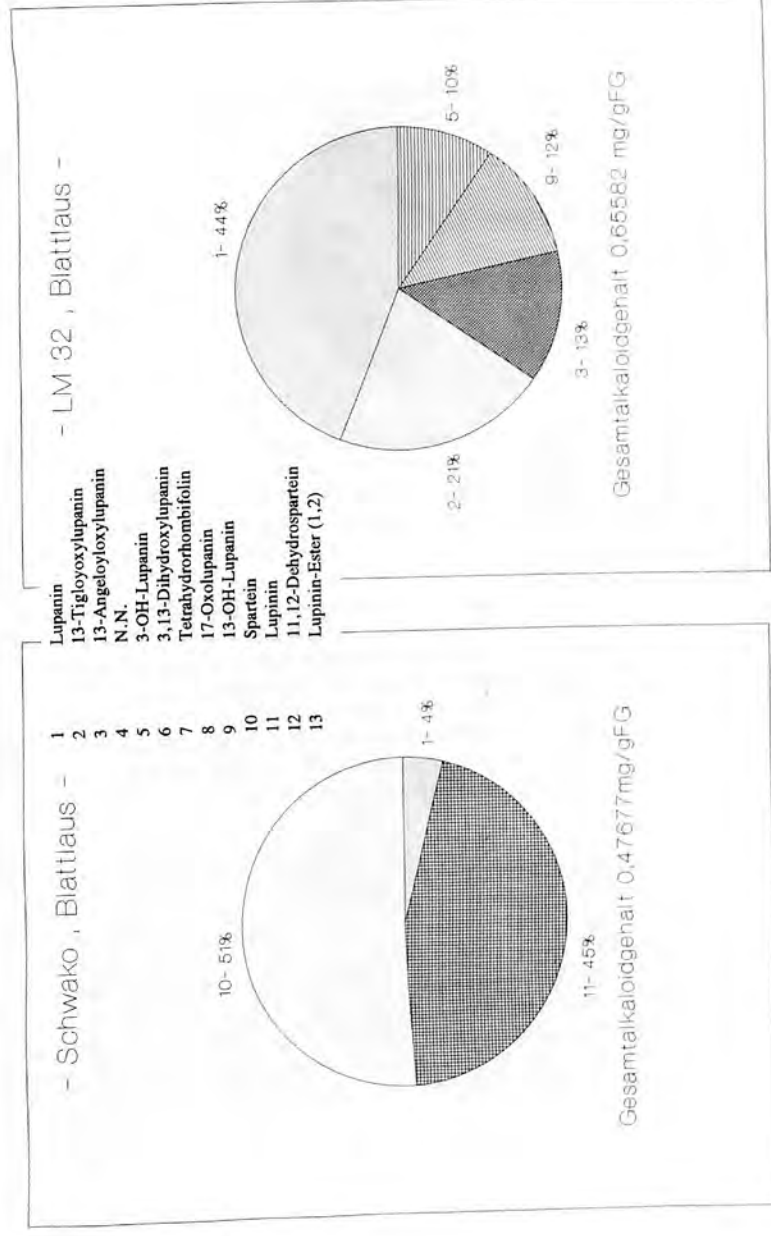


Abb. 10. Zusammensetzung der Chinolizidinalkaloide in *Macrosiphum albifrons* mit *Lupinus luteus* als Wirtspflanze

Abb. 8. Zusammensetzung der Chinolizidinalkaloide in *Macrosiphum albifrons* mit *Lupinus mutabilis* als Wirtspflanze

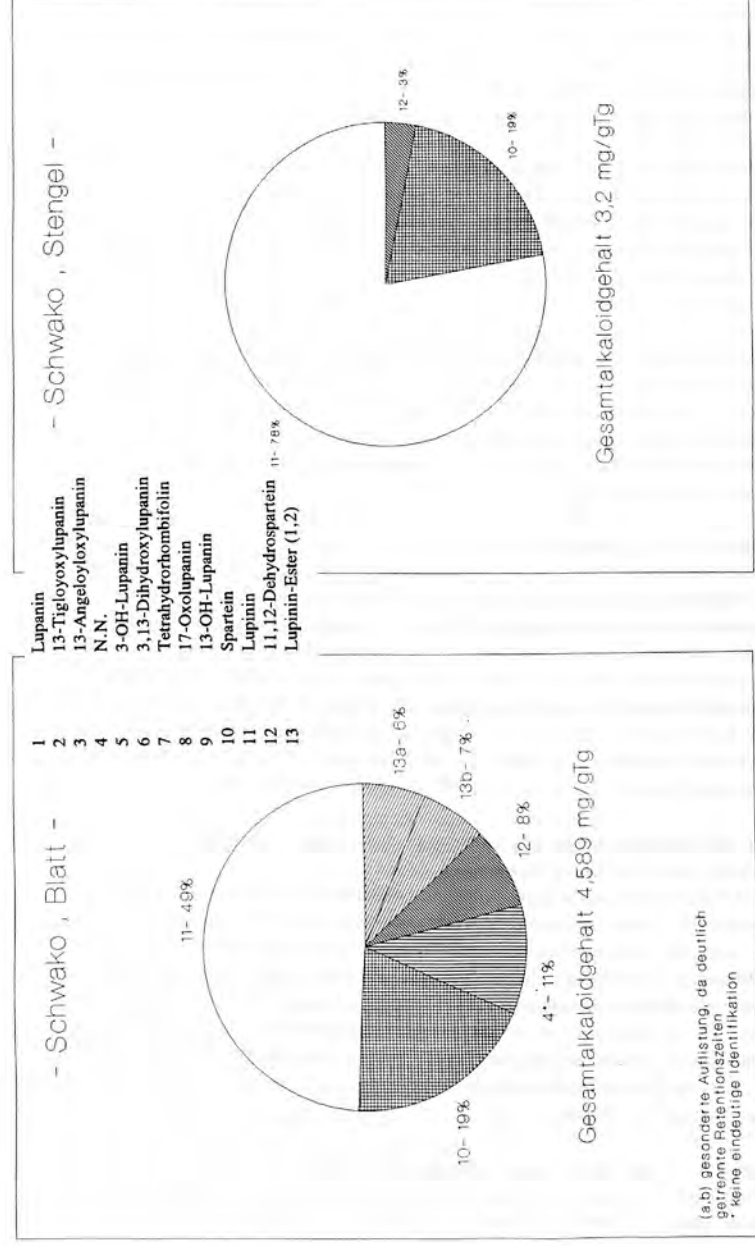


Abb. 9. Zusammensetzung der Chinolizidinalkaloide im Stengel und Blatt von *Lupinus luteus*

4.3. Alkaloidkonzentration in *Macrosiphum albifrons*

Betrachtet man die Alkaloidkonzentrationen in den Blattläusen, zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Konzentration in Grünmasse und Laus (Abb.6), der durch die Kalina-Variante relativ gestört wird. Mit steigendem Alkaloidgehalt im oberirdischen Pflanzenmaterial steigt auch die Konzentration in der Blattlaus. In der Kalina - Variante liegt die Konzentration in der Laus mit rund 1 mg/gFG ebenso hoch wie die Konzentration in den Blanca - Läusen und damit wesentlich höher als in der Kalina - Pflanze selbst, auch wenn es sich bei der Grünmasseangabe um eine Trockengewichtsangabe handelt. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze.

Zum einen kann man davon ausgehen, daß die Möglichkeit der Blattlaus Bitterstoffe aufzunehmen und zu speichern begrenzt ist, so daß Läuse, die auf Bitterlupinen saugen, relativ weniger akkumulieren als die auf Süßlupinen, da sie im gleichen Zeitintervall mehr Alkaloide mit dem Phloemsaft aufnehmen. Ist die Kapazität erschöpft, geben die Läuse die überschüssigen Alkaloide über den Honigtau (Wink & Römer 1986) wieder ab, so daß auch dieser zwangsläufig schneller bitter und damit toxisch wird (für z.B. Schweb- und Flörfliegenimagines) als der Honigtau auf Süßlupinen saugender Läuse.

Zum anderen könnte die hohe Akkumulation auf Kalina eine evolutiv entstandene Anpassung an Süßlupinen sein, um trotzdem einen Fraßschutz gegenüber natürlichen Feinden zu erhalten. Beide Gründe erklären allerdings nicht die wesentlich geringeren Akkumulationsgrade auf Topaz und Handelssaat, wiewohl auch Läuse der Handelssaat-Variante mit einer Akkumulation von 42% wesentlich höher liegen als die beiden *L. luteus* - Varianten. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß *M. albifrons* unter natürlichen Bedingungen *L. luteus* weniger gerne besiedelt als die Lupinin-reichen Arten (Wink & Römer 1986).

4.4. Alkaloidspektrum von *L. mutabilis* und *L. luteus*

Die unterschiedlichen toxischen Reaktionen natürlicher Gegenspieler der Lupinenlaus wie z.B. verschiedener Marienkäferarten, Schwebfliegen- und Flörfliegenlarven (EMRICH, 1991) oder auch Laufkäferarten (WINK & RÖMER, 1986) macht einen Unterschied in der Qualität der Alkaloide wahrscheinlich, da sich die Konzentration alleine nicht als ausschlaggebender Faktor erwiesen hat (s. Abb. 4). Die Larvalentwicklung von Coccinellidenlarven verläuft bei ausschließlicher Fütterung mit *Macrosiphum albifrons*, die auf der Bitterlupine Schwako (durchschnittliche Grünmassekonzentration an Alkaloiden 3,89 mg/gTG) gezogen wurden, problemlos und schnell und mit geringer Mortalität. Im Gegensatz dazu kommt es zu fast keiner Larvalentwicklung bei Fütterung von Läusen die auf einer Sorte vergleichbarer Alkaloidkonzentration, *L. mutabilis* (Alkaloidkonzentration 3,99 mg/g TG) gezüchtet wurden, d.h. die Mortalitätsrate beträgt je nach Coccinellidenart nach 3-6 Tagen 100% (EMRICH, 1991).

Aufschluß über die Zusammenhänge kann das Spektrum der in der Grünmasse gespeicherten und damit in der Laus zumindest teilweise akkumulierten Alkaloide geben.

Es zeigt sich, daß Lupinin als Hauptalkaloid in Grünmasse und Blattlaus der *L. mutabilis* - Varianten auf die meisten natürlichen Feinde einen entwicklungsverzögernden oder gar tödlichen Einfluß hat. Anders verhält es sich mit dem Einfluß dieses Alkaloids auf die Entwicklung der Blattlaus selbst; sie wird gefördert hinsichtlich der Larvalentwicklungszeit und Larvenabsatzrate (EMRICH und SCHMUTTERER, 1990). Die Hauptalkaloide von *L. luteus*, Lupinin und Spartein, zeigen dahingegen bei den Coccinelliden keine negativen Effekte, wohl aber bei den Blattläusen, die auf diese Wirtspflanzen mit reduzierten Larvenabsatzraten und verlängerten Entwicklungszeiten reagierten. Die Aufnahme einer bestimmten Alkaloidmenge scheint daher für die Laus weniger bedeutend als der Alkaloidtyp zu sein. Die mit 5% recht geringe Lupaninkonzentration in der Grünmasse von *L. luteus* - Schwako - scheint hierbei keinen Einfluß auf die Coccinelliden zu haben.

Die physiologischen Mechanismen, die es den Lupinenläusen ermöglichen, Alkaloidkonzentrationen zu tolerieren, die bei anderen Insektenarten wie den Coccinelliden, relativ schnell zum Tod führen, ist bislang noch unklar. *Macrosiphum albifrons* jedoch ermöglicht diese evolutiv entstandene Detoxifikation bzw. die Akzeptanz hoher

Alkaloidkonzentrationen eine monophage Lebensweise, die Nutzung dieser Nahrungsnische, die die Gattung *Lupinus* bietet. Gleichzeitig erlangt die Blattlaus bzw. die Population einen effektiven Fraßschutz gegenüber natürlichen Feinden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde der Alkaloidgehalt von sieben süßen und bitteren Sorten von vier Lupinenarten (*L. mutabilis*, *L. albus*, *L. angustifolius* und *L. luteus*). Gemessen wurde dabei die Konzentration in den Samen, Blättern und Stengeln sowie der auf diesen Lupinen saugenden Blattlaus *Macrosiphum albifrons*. Die Samenanalyse ergab eine der Angabe des Züchters folgende Einstufung in die bitteren Sorten LM 32, Kubesa, Blanca und Schwako sowie in die süßen Sorten Kalina, Handelssaat und Topaz. Wesentliche Konzentrationsunterschiede zwischen Blatt- und Stengelgehalt konnten nicht festgestellt werden.

Die Alkaloidkonzentration in den Läusen weist einen Zusammenhang zum Alkaloidgehalt in den entsprechenden Wirtspflanzen auf: sind die Wirtspflanzen Süßlupinen, ist die Alkaloidkonzentration gering, die Läuse sind "süß", d.h. alkaloidarm (Ausnahme Kalina); handelt es sich um Bitterlupinen, sind die auf ihnen saugenden Läuse "bitter", d.h. alkaloidreich.

Für die Anreicherung der Alkaloide in der Laus scheint es eine Kapazitätsgrenze zu geben, die je nach Alkaloidgehalt der Wirtspflanze von der Laus unterschiedlich schnell erreicht wird, so daß sich variierende Akkumulationsgrade ergeben.

Selektive Transportproteine im Darmtrakt der Läuse bewirken die Akkumulation von nur ganz bestimmten Alkaloiden und dürften für diese Phänomene verantwortlich sein.

Das Alkaloidmuster verschiedener Lupinensorten zeigt in Qualität und Quantität variierende Hauptalkaloide, die für die unterschiedlich toxischen Reaktionen auf natürliche Gegenspieler der Blattlaus, wie Marienkäfer-, Schwebfliegen- und Flörfliegenlarven verantwortlich gemacht werden können.

M. albifrons ist es gelungen, die Fraßbarriere in Form der Alkaloide zu überwinden und diese Inhaltsstoffe gleichzeitig als Schutz ihrer Population vor natürlichen Feinden einzusetzen.

6. DANKSAGUNG

Prof. Schmutterer und Herrn M. Feldhege danken wir für die Durchsicht des Manuskripts. Die Arbeit wurde gefördert aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- EMRICH, B.H., 1991. Erworbene Toxizität bei der Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* und ihr Einfluß auf die aphidophagen Prädatoren *Coccinella septempunctata*, *Ephisyrphus balteatus* und *Chrysoperla carnea*. Z. PflKrankh. PflSchutz **98**, 398-404
- EMRICH, B.H. & H. SCHMUTTERER, 1990. Host-modulated biological characters of the lupin aphid *Macrosiphum albifrons* Essig (Homoptera: Aphididae). Med. Fac. Landbouww. Rijks- univ. Gent **55**(2b), 463-470
- HARBORNE, J. 1988. Introduction to biochemical ecology. Academic Press, London.
- KUO-SELL, H.L., 1989. Aminosäuren und Zucker im Phloemsaft verschiedener Pflanzenteile von Hafer (*Avena sativa*) in Beziehung zur Saugortpräferenz von Getreideblattläusen (Hom., Aphididae). J. Appl. Ent. **108**, 54-63
- SCHLEE, D. 1986. Ökologische Biochemie. Springer-Verlag, Heidelberg.
- SMITH, B.D., 1966. Effect of the plant alkaloid sparteine on the distribution of the aphid *Acyrtosiphon spartii*

(Koch). Nature, Vol. 212 Oct.8, 213-214

- WINK, M. 1985. Chemische Verteidigung der Lupinen: Zur biologischen Bedeutung der Chinolizidinalkaloide. Plant Syst. Evol. 150, 65-81.
- WINK, M. 1987. Chemical ecology of quinolizidine alkaloids. In "Allelochemicals: Role in agriculture, forestry and ecology" (G.R. Waller, Hrg.), ACS-Symp. Ser. 330, 524-533.
- WINK, M. 1988. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theor. Appl. Genet. 75, 225-233.
- WINK, M., 1992. The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. In "Focus on Insect-plant interactions" (E.A. Bernays, Hrg.), Bd. IV, 133-169.
- WINK, M., 1992. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In "The Alkaloids" (G. Cordell, Hrg.-) Bd. 43 (in press).
- WINK, M. 1992. Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassungen der Pflanzenfresser (in press).
- WINK, M. & P. RÖMER, 1986. Acquired toxicity - the advantage of specializing on the alkaloid-rich lupins to *Macrosiphum albifrons* (Aphididae). Naturwiss. 73, 210-212
- WINK, M. & L. WITTE, 1984. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids: diurnal variation of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus*. Planta 161, 519-524.
- WINK, M. & L. WITTE, 1991. Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homoptera: Aphididae). Entomol. Gener. 15, 237-254.

MOLEKULARE METHODEN ZUR ANALYSE DER EVOLUTION DER GATTUNG LUPINUS

Ernst Käss und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg

ABSTRACT

Molecular evolution of the Genus *Lupinus*

It is assumed that lupins are monophyletic and that the origin of the genus *Lupinus* was Brasil/South America. From there, North America and Europe should have been colonized.

Using modern methods of molecular biology it should be possible to test this hypothesis and also to calibrate the time axis when all these events have occurred during evolution.

The basic method employs the Polymerase Chain Reaction (PCR), which allows the amplification of a single gene out of the total DNA extracted from lupins. This amplified gene is then sequenced and the resulting nucleotide sequences can be compared. This approach is described and exemplified for *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. polyphyllus*, *L. mutabilis* and *L. microcarpus*. Preliminary results, obtained from amplifying and sequencing a lupin-specific nuclear gene, indicate that the lupins from Europe, and North America differ from each other and from their South American counter parts, indicating that they are separated for a long time already.

RESUMEN

La evolución molecular del género *Lupinus*

Se presupone que los lupinos evolucionaron monofíleticamente y que su centro de origen fue en lo que hoy en día corresponde al centro-este de Brasil. Se considera que desde allí se deben haber colonizado Norteamérica y Europa. Usando los modernos métodos de la biología molecular es posible comprobar esta hipótesis y calcular en la escala del tiempo cuando ocurrieron estos acontecimientos evolutivos.

El método emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la clonación de un gen unitario fuera del total de DNA extraído del lupino. Luego de clonado el gen, se analiza la secuencia de nucleótidos para poder tener un patrón de comparación. En el trabajo se describe y ejemplifica la metodología de trabajo para *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. polyphyllus*, *L. mutabilis* y *L. microcarpus*. Los resultados preliminares obtenidos de la clonación y la secuenciación de un gen específico del lupino, muestran que las especies de Europa y Norteamérica difieren entre sí y de la contraparte sudamericana, indicando que la separación entre ellas ocurrió hace millones de años.

1. EINLEITUNG

Die DNA-Analyse als Grundlage für die systematische Einordnung von Lebewesen bzw. für die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen hat in den letzten Jahren eine immer breitere Anwendung gefunden. Durch neue molekularbiologische Methoden ist es möglich, gezielt DNA, d.h. Gene, zu vermehren und ihre Sequenz zu analysieren (HILLIS & MORITZ, 1990; INNIS ET AL. 1990; SAMBROOK ET AL. 1989).

Im Folgenden sollen drei der wichtigsten Methoden, die Polymerase Chain Reaction (akronym "PCR"), die Klonierung in Plasmidvektoren und die Didesoxysequenzierung nach SANGER (SANGER et al. 1977), vorgestellt werden.

Die DNA als molekularer Träger der Erbinformation ist für eine phylogenetische Analyse von besonderem Interesse, da alle Lebewesen sie besitzen und daher ein Vergleich zwischen Lebewesen verschiedener Entwicklungsstufen möglich ist, unabhängig von ihrer Morphologie, Chemotaxonomie und anderen, oft willkürlichen Merkmalen. Das Problem der konvergenten Entwicklung, das die Interpretation der bisherigen Daten sehr erschwert, ist auf der Ebene der DNA-Sequenzen zumindest von untergeordneter Bedeutung.

Die pflanzliche DNA besteht aus drei Komponenten, der nucleären DNA (ncDNA), etwa 5×10^7 - 5×10^{10} bp (Basenpaare), der mitochondrialen DNA (mtDNA), etwa 200.000-500.000 bp und der Chloroplasten DNA (cpDNA), etwa 120.000-160.000 bp groß. Diese drei DNA-Formen haben unterschiedliche, aber vermutlich relativ konstante Mutationsraten (Begriff der "Molekularen Uhr"). Zudem wechseln sich kodierende Bereiche (die meist weniger als 5% der Gesamt-DNA ausmachen), mit nicht kodierenden Bereichen (Introns, repetitive DNA, "Junk-DNA") ab. Gerade diese nicht-kodierenden Bereiche haben unterschiedliche, meist höhere Mutationsraten.

Durch Vergleich von DNA-Sequenzen kann eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad verschiedener Taxa oder von höheren systematischen Gruppen gemacht werden. Je nachdem, ob eine Groß- oder Feinsystematik geplant ist, wird man zu konservativen oder progressiven Genen gehen. Auch läßt sich mit diesen Methoden die Besiedlungsgeschichte von Artengruppen oder Gattungen nachvollziehen. Besonders reizvoll erscheint uns in diesem Zusammenhang die Disjunktion der Neuen und Alten Welt zu sein, deren Entwicklung aus dem frühen Gondwana-Kontinent vor ca. 120 Millionen Jahren einsetzte.

2. DIE METHODEN DER "MOLEKULAREN EVOLUTIONS-FORSCHUNG"

Die direkte Analyse eines Gens, das meist nur in wenigen Kopien im Genom vorliegt, ist nicht möglich. Der erste Schritt umfaßt daher immer die Vermehrung eines Gens oder Genbereichs. Alle Methoden bedienen sich des natürlichen Weges der DNA-Vermehrung, d.h. mit Hilfe von Polymerasen, deshalb soll dieser kurz erläutert werden. Die Bausteine der DNA sind die Nukleotide Adenosin (A), Thymidin (T), Cytosin (C) und Guanidin (G). Diese sind über einen Zucker (Desoxyribose, bestimmend für die Richtung der DNA) und einen Phosphatrest verknüpft, ihre Abfolge ergibt die Sequenz der DNA. Die DNA liegt als Doppelstrang vor, das heißt zwei gegenläufige, komplementäre DNA-Moleküle sind über Wasserstoffbrücken gebunden, die reversibel gespalten werden können (Denaturierung der DNA), es stehen sich immer A und T oder G und C gegenüber. Bei der Verdopplung der DNA wird der Doppelstrang enzymatisch getrennt, an den Einzelstrang legen sich kleine komplementäre DNA-Stücke an, sogenannte Primer. Von diesen Primern aus werden von einem Enzym (Polymerase) Nukleotide zu einem dem Einzelstrang komplementären Strang verknüpft, allerdings immer nur in eine Richtung.

Der neugebildete Doppelstrang besteht also aus einem der ursprünglichen Stränge und einem neusynthetisierten DNA-Strang (Begriff der "semikonservativen Replikation der DNA").

2.1. POLYMERASE CHAIN REACTION

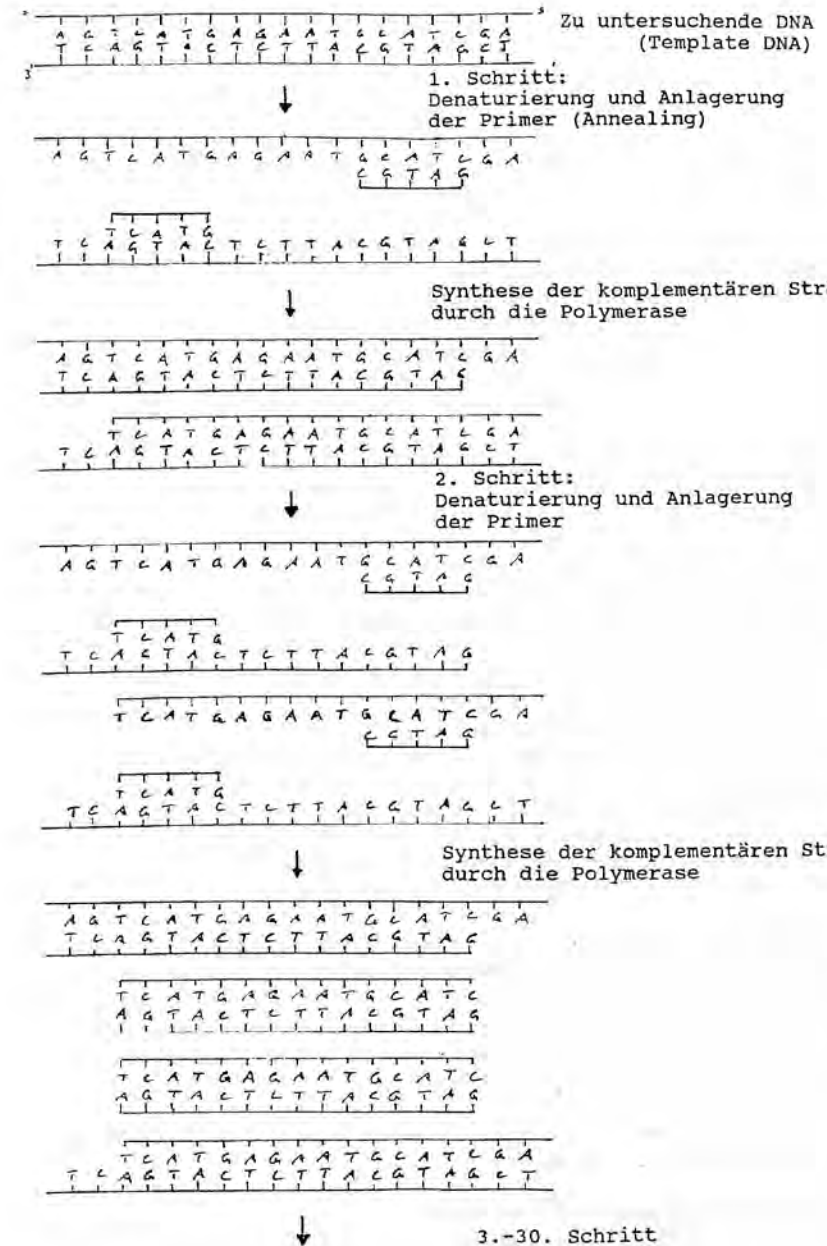


Abb.1: SCHEMA DER POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine relativ neue Methode der *in vitro* Vermehrung von DNA (MULLIS ET AL. 1986, SAKI ET AL. 1988, INNIS ET AL. 1990, MCPHERSON ET AL. 1991). Man kann hier ganz gezielt Gene oder Genbereiche vermehren, wenn Teile der gesuchten Sequenz bereits bekannt sind. Ausgehend von der bekannten Sequenz werden Primer synthetisch hergestellt, wobei der eine zum Anfang der gesuchten Sequenz homolog ist, der zweite zum Ende der Sequenz des komplementären Stranges.

Wird in einem unbekanntem DNA-Präparat diese Gen-Sequenz gesucht, so wird die DNA zusammen mit einem Überschuß an den spezifischen Primern, Nukleotiden und einer hitzestabilen Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) bei 95°C denaturiert (Abb.1). Beim Abkühlen auf etwa 40-50°C lagern sich die Primer an komplementäre Sequenzen der DNA an, beim Erwärmen auf etwa 70°C synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern den zugehörigen komplementären Strang. Danach werden die Stränge wieder denaturiert, die Primer erneut angelagert und die komplementären Stränge synthetisiert (Abb.1). Die gesuchte Sequenz wird also bei jedem Schritt verdoppelt und nach 30 Zyklen liegen etwa 10⁷ Kopien der gesuchten Sequenz vor. Die gesamte Reaktion dauert etwa 2-6 Stunden.

Eine breite Anwendung der Methode war anfangs nicht möglich, da eine normale DNA-Polymerase als Eiweiß beim Erhitzen irreversibel denaturiert wird und bei jedem Zyklus erneut zugegeben werden mußte. Seit man in heißen Quellen Bakterien gefunden hat, deren Enzyme auch bei hoher Temperatur über längere Zeit stabil bleiben (zum Beispiel Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), ist es möglich, alle Zyklen in einem temperaturgesteuerten Heizblock nacheinander ablaufen zu lassen. Durch diese Vereinfachung und die Möglichkeit, durch Veränderung von Zeit und Temperatur die Reaktion speziellen Problemstellungen anzupassen, hat die PCR sehr viele Anwendungsbereiche nicht nur in der Molekularbiologie, sondern auch in der diagnostischen und in der forensischen Medizin gefunden.

Die DNA aus der PCR Reaktion kann direkt zur Sequenzierung verwendet werden, will man aber DNA-Sequenzen zur Dokumentation oder späteren Bearbeitung aufbewahren, so ist der Weg über die Klonierung die bessere Lösung.

2.2. DIE KLONIERUNG IN PLASMIDVEKTOREN

Als Plasmid bezeichnet man eine spezielle, relativ kleine DNA-Spezies bei Bakterien. Es handelt sich dabei um ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in vielen Bakterien zusätzlich zum Chromosom enthalten sind. Plasmide, die oft Träger von Antibiotika-Resistenzen sind, können zwei sehr wichtige Eigenschaften besitzen: 1) Die Vermehrung unabhängig von der Zellteilung und 2.) die Austauschbarkeit zwischen verschiedenen Bakterienzellen. Diese Plasmide sind gentechnisch so verändert worden, daß sie zum Einschleusen von Fremd-DNA in ein Bakterium zwecks Klonierung benutzt werden können; d.h. sie stellen sog. Klonierungsvektoren dar.

Mehrere Schritte sind hier notwendig. Die gereinigte Plasmid-DNA wird von einer Restriktionsendonuklease aufgeschnitten, ein weiteres Enzym (Ligase) verbindet Plasmid- und Fremd-DNA (z.B. DNA-Fragment nach PCR-Amplifikation) zu einem ringförmigen Molekül, das dann in einem weiteren Schritt in das Bakterium, meist *Escherichia coli*, eingeführt wird (Transformation). Im Bakterium wird das Plasmid bis zu hundertfach kopiert und bei der Zellteilung weitergegeben. Nach ausreichender Vermehrung werden die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA isoliert und gereinigt. Aus einem Ansatz von 100 ml Nährlösung erhält man mehr als 100 µg Plasmid-DNA (Abb.2).

Die bisherigen Schritte dienen allein der genügenden Vermehrung der gesuchten DNA-Sequenz, der eigentliche analytische Schritt ist die Sequenzierung der DNA.

2.3. DIE DIDEOXYSEQUENZIERUNG NACH SANGER

Das Prinzip der Dideoxysequenzierung nach Sanger ist wieder die Synthese einer DNA-Sequenz ausgehend von einem Primer durch eine DNA-Polymerase. Bei der Sequenzierung wird nur einer der beiden Primer verwendet, das heißt, es wird immer nur einer der beiden Stränge abgelesen. Zur Sequenzierung wird die Plasmid-DNA denaturiert, der Primer wird angelagert und in der Grundreaktion synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend vom Primer den

durch eine Restriktionsendonuklease

PCR-Produkt

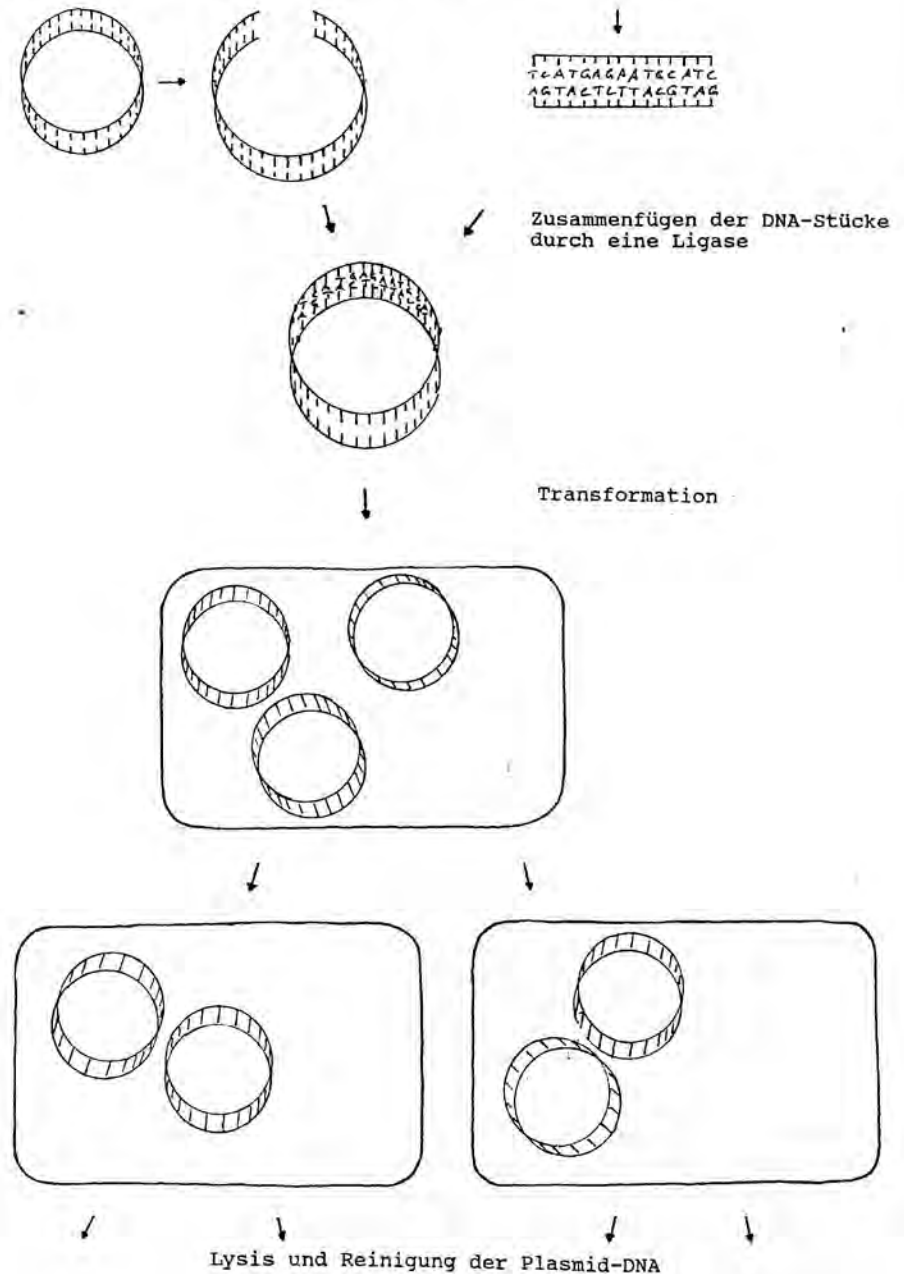


Abb.2: SCHEMA DER KLONIERUNG IN PLASMIDVEKTOREN

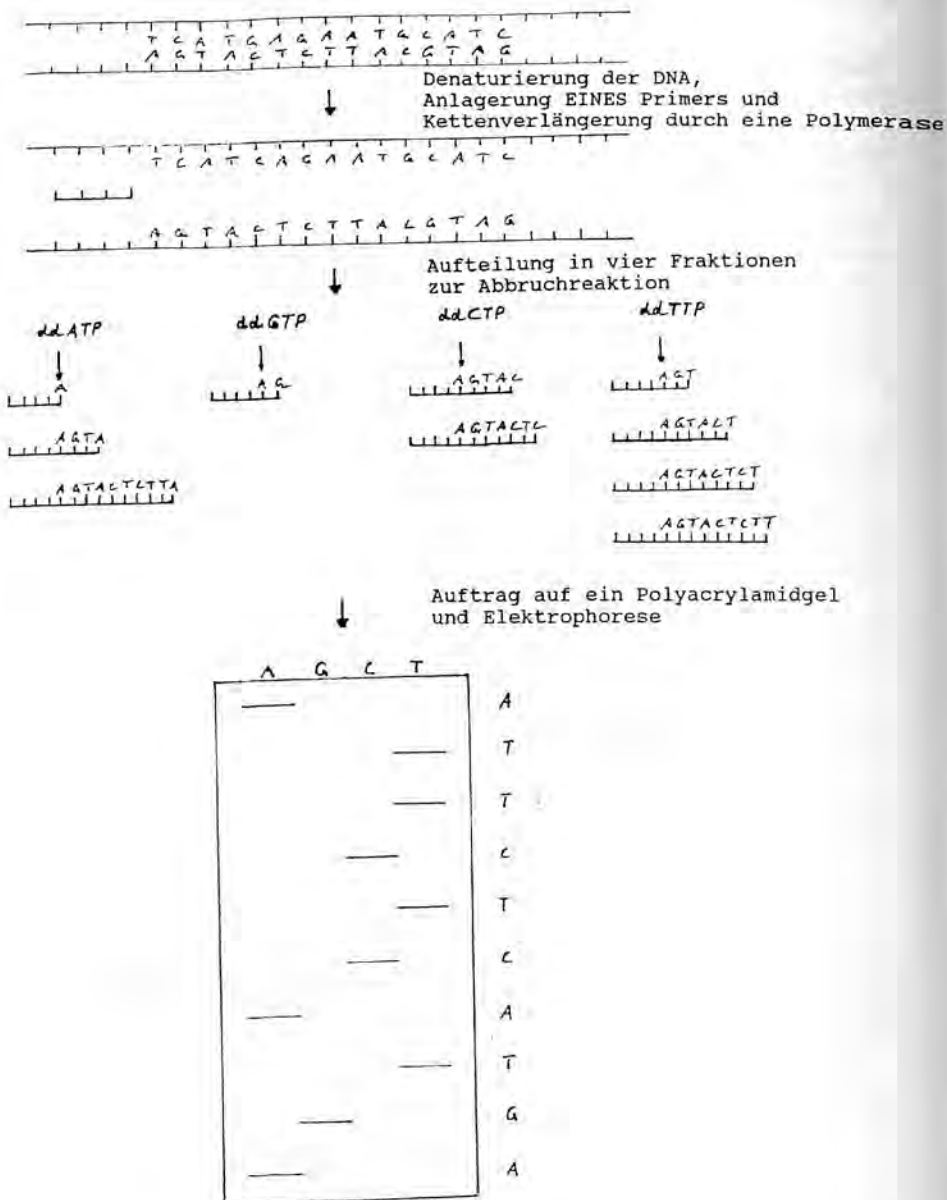


Abb. 3: SCHEMA DER DIDEOXYSEQUENZIERUNG NACH SANGER

komplementären Strang, wobei von den zugegebenen Nucleotiden dATP radioaktiv markiert ist. Bei der Abbruchreaktion wird der Ansatz in vier Fraktionen geteilt. In jeder Fraktion ist eines der Nucleotide chemisch so verändert, daß es zwar eingebaut, der Strang danach aber nicht mehr verlängert werden kann. Es handelt sich um die Dideoxynucleotide ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP, denen die Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt, so daß die Phosphodiesterbindung zum nächsten Nucleotid nicht erfolgen kann.

Man erhält also Einzelstränge unterschiedlicher Länge, da der Einbau der Dideoxynucleotide statistisch erfolgt. Sie reichen vom Primer bis zu jedem einzelnen Nucleotid des Stranges. Die vier Fraktionen werden nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge getrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wird ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt, der durch die radioaktiv markierten DNA-Banden geschwärzt wird (Abb.3). Diese Sequenzgele werden ausgewertet und man erhält die lineare Nucleotidsequenz eines DNA-Fragmentes.

Durch Verarbeitung im Computersystem Genius /"HUSAR", das speziell auf DNA-Auswertung zugeschnitten ist, kann man die erhaltenen Sequenzen ordnen und ihre Ähnlichkeit mit denen von anderen Genen oder mit demselben Gen aus einer anderen Population, Art oder Gattung vergleichen. Für die Erstellung von Stammbäumen sind spezielle Programme, wie PAUP oder PHYLLIP notwendig (HILLIS & MORITZ 1990).

3. DIE EVOLUTION DES GENUS LUPINUS

Die Familie der Fabaceae gehört zu den besonders artenreichen Sippen des Pflanzenreiches. Die primitiveren Triben, wie *Sophoreae*, *Dalbergieae*, *Euchresteeae*, *Thermopsidae*, *Bossieaeae*, *Brongniarteeae*, *Podalyrieae*, *Liparieae*, *Crotalarieae* und *Genisteeae* zeichnen sich phytochemisch u.a. durch die Produktion von Chinolizidinalkaloiden aus, ein Merkmal, das wir in den letzten 14 Jahren aus chemischer, physiologischer und biochemischer Sicht intensiv untersucht haben (s. Reviews: WINK & HARTMANN 1984; WINK 1987a,b; WINK 1992). An dieser Stelle soll besonders auf die artenreiche ($n \geq 600$), aber morphologisch homogene Gattung *Lupinus* eingegangen werden, die aufgrund ihrer morphologischen, karyologischen, makro- und mikromolekularen Ähnlichkeiten zum Tribus *Genisteeae* gerechnet wird (POLHILL 1976, CRISTOFOLINI 1989).

Drei Hauptverbreitungsareale werden unterschieden, die von Arten der Gattung *Lupinus* besiedelt werden: 1) Südamerika, 2) Nordamerika und 3) Südeuropa und Nord-/Ostafrika. Bei den südamerikanischen Arten werden die atlantische und die Andengruppe unterschieden. Einige Arten der atlantischen Gruppe sind vermutlich noch sehr ursprünglich, denn sie zeichnen sich durch ungeteilte Blätter aus, während Fiederblätter als typisches Merkmal für alle übrigen Lupinen gelten (PLANCHUELO-RAVENO, 1984). Auch die europäisch-afrikanischen Arten weisen einige Besonderheiten auf: a) alle Arten sind einjährig, während in Nord- und Südamerika ein- und mehrjährige Arten nebeneinander vorkommen. b) alle Arten sind großsamig, während in Amerika sowohl groß- als auch kleinsamige Arten bekannt sind. c) die 12 europäisch-afrikanischen Arten kann man aufgrund ihrer Samenoberfläche entweder in Section *Malacospermae* oder Sect. *Scabrispermae* einteilen, wobei die erste Gruppe sich durch eine veränderte Chromosomenzahl auszeichnet: Während alle anderen Lupinengruppen ($x=12$)_n Chromosomen enthalten, haben die Arten der *Malacospermae* ($x=10$)_n (PLITMANN 1981, DUNN 1984, PLANCHUELO-RAVELO 1984, GROSS 1986, CRISTOFOLINI 1989).

Die Entwicklungsgeschichte der Gattung wurde aus systematischer und serologischer Sicht untersucht. Alle Autoren kommen zum Ergebnis, daß die Gattung *Lupinus* monophyletisch ist (CRISTOFOLINI 1989, NOWACKI & JAWORSKI 1978). Die meisten Autoren nehmen an, daß Südamerika das Genzentrum der Gattung darstellt, und daß die nordamerikanischen Arten über eine Landbrücke vor 60-70 Mio Jahren aus Südamerika eingewandert sind. Die europäisch-afrikanischen Arten sollen sich vor 100-130 Mio Jahren abgetrennt haben, als die beiden Großkontinente auseinanderdrifteten (NOWACKI & JAWORSKI 1978; GROSS 1986). CRISTOFOLINI (1989) nimmt an, daß die Gattung *Lupinus* sehr eng zum Tribus *Genisteeae* gehört, dessen Ursprung aber nicht in der Neuen Welt liegt. CRISTOFOLINI postuliert

deshalb das tropische- bis gemäßigte Asien als Ursprung, von dem die Besiedlung der mediterranen-afrikanischen und der amerikanischen Region erfolgte. Mit den traditionellen Methoden wird sich kaum eine Entscheidung dieser Fragen herbeiführen lassen.

Die molekulare Analyse der Lupinengene sollte jedoch eine Klärung dieser Fragen erlauben. Wenn man die Nucleotidsequenzen mehrerer Gene bei allen Arten der Alten und Neuen Welt untereinander vergleichen könnte, müßte man über die zu erwartenden Nucleotidsubstitutionen ablesen können, welche Arten nah verwandt bzw. welche Arten seit langer Zeit getrennt sind. Bis vor wenigen Jahren wäre eine solche Untersuchung nur mit Einsatz hoher finanzieller, zeitlicher und personeller Mittel durchführbar gewesen, denn man hätte von jeder Art eine Genbank anlegen und die jeweiligen Gene einzeln "fischen" müssen. Durch Entwicklung der Polymerase Chain Reaction (PCR) hat sich die Situation weitgehend verändert, denn nun können einzelne Gene direkt aus der isolierten Gesamt-DNA eines Organismus amplifiziert und sequenziert werden (siehe 2.1) (INNIS ET AL. 1990, EHRlich 1989, HILLIS & MORITZ 1990).

Mit Hilfe der Molekularbiologie wollen wir die folgenden Fragen und Hypothesen testen:

1. Südamerika stellt das Genzentrum der Gattung *Lupinus* dar, wobei die Arten mit ungeteilten Blättern als primitiv und ursprünglich eingestuft werden.
2. Über eine Landbrücke erfolgte vor ca. 70-80 Millionen Jahren die Besiedlung von Nordamerika.
3. Die Besiedlung Europas und Afrikas erfolgte nicht in "rezenten" Zeit über die Landbrücke der Beringstraße.
4. Die europäisch-afrikanischen Arten trennten sich vor 130-100 Mio Jahren vom südamerikanischen Genzentrum infolge der Kontinentaldrift ab und entwickelten sich seitdem als konvergente Gruppe weiter.
5. Die Section Scabrispermae der europäisch-afrikanischen Region entspricht dem ursprünglichen Typus, während die Arten der Section Malacospermae abgeleitet sind.
6. Da die Zeitpunkte der Kontinentalverdriftung und der Landbrücke zwischen Nord- und Südamerika zeitlich determinierbar sind, besteht die Möglichkeit zu prüfen, ob die "molekulare Uhr" auch bei den Lupinen funktioniert, insbesondere bei welchen Genen, mt-DNA oder nc-DNA, am ehesten mit interpretierbaren Daten zu rechnen ist.

Als Beispiel soll ein Gen dienen, das 1990 bei der Erstellung einer cDNA-Bank von *Lupinus polyphyllus* gefunden wurde. Analog der Sequenz wurden Primer synthetisiert, die Anfang und Ende der Gensequenz flankieren (Abb. 4). Die PCR-Reaktion wurde mit genomischer DNA verschiedener Lupinusarten (*L. mutabilis* und *L. microcarpus* für Südamerika, *L. polyphyllus* für Nordamerika und *L. albus* und *L. angustifolius* für die Alte Welt) durchgeführt. Nach Klonierung und Sequenzierung ergaben sich Sequenzen, die Homologien zwischen 70 und über 90 % aufwiesen (Abb. 5, Abb. 6). Diese großen Differenzen belegen, daß die Zeiträume, durch die diese Arten bereits getrennt sind, relativ groß (d.h. viele Millionen Jahre) sein müssen. Damit kann eine rezente Neubesiedlung der Alten Welt ausgeschlossen werden. Obwohl wir im Moment noch keine sichere Aussagen über die genauen Verwandtschaften bzw. evolutionären Zeiträume machen können, scheinen die Homologien zwischen europäischen und südamerikanischen Arten größer zu sein als die zwischen europäischen und nordamerikanischen Arten. *L. termis* wurde eine Zeit lang als eigene Art geführt. Da sich aber keine Unterschiede zwischen der Nucleotidsequenz von *L. albus* ergeben, schließen wir uns der Meinung der Flora Europaea an, daß es sich um identische Arten handelt. Der Name *L. termis* ist deshalb nur als Synonym zu betrachten.

In Zukunft werden wir noch mehr Arten und noch weitere Gene in unsere Analyse einbringen, die interessante Er-

	ACTTTGATTTATACTATGGCATATGCATATACCCACAGATTCACAATGACAAAA	54
55	CCTAGTTAAATACAAATACACATATACCACAACCTCTATCACTCAAAACATATTCCACCAAGGC	117
118	TTTCTGAAGGAGGATTAGGTTCAAGTCTTTTTCCCTATC	174
	Met Ala Arg Pro Gln Gln	6
175	CGT TAT CGA GGC TTT CGA CAA AGG CAT TGG GGC TCT TGG GTA TCC GAA	222
7	Arg Tyr Arg Gly Phe Arg Gln Arg His Trp Trp Ser	22
223	ATT CGA CAT TCA ATA TTG AAA ACT AGG ATT TGG CAA GGT ACT TTT GAA	270
23	Ile Arg His Ser Ile Leu Lys Thr Arg Ile Trp Gln Gly Thr Phe Glu	38
271	AGT GCC GAG GAT GCT GCT AGA GCA TAT GAT GAA GCA GCA AGG CTA ATG	318
39	Ser Ala Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Arg Leu Met	54
319	TGT GGT ACA AGG GCA AGA ACA AAT TTC CGT TAC AAT CCA AAT CCG TCG	366
55	Cys Gly Thr Arg Ala Arg Thr Asn Phe Pro Tyr Asn Pro Asn Ala Ser	70
367	CAA TCG TCA TCT TCT AAG CTT CTC TCA GCT ACT TTG ATT GCT AAA CTT	414
71	Gln Ser Ser Ser Ser Lys Leu Leu Ser Ala Thr Leu Ile Ala Lys Leu	86
415	CAC CGG TGC TAT ATG GCT TCG CTA CAA ATG ACT AGG CCG TCG TCG TTG	462
87	His Arg Cys Tyr Met Ala Ser Leu Gln Met Thr Arg Pro Ser Ser Leu	102
463	CCA GAG GCT CCG AGA ATT ATA GCT TCA CCA AAT AAT GCA GTG AAG GGG	510
102	Pro Glu Ala Pro Arg Ile Ile Ala Ser Pro Asn Asn Ala Val Lys Gly	118
511	ATT GGA GCT GAT GCA ATG TTG TTG CCA AAG AAG AGA GAA CAG GAG GAA	558
118	Ile Gly Ala Asp Ala Met Leu Leu Pro Lys Lys Arg Glu Gln Glu Glu	134
559	CAA GAA ACA GGA GGG AAT TTG GAT TTC AAG AAG GTT AAA GTT GAA TGT	606
135	Gln Glu Thr Gly Gly Asn Leu Asp Phe Lys Lys Val Lys Val Glu Cys	150
607	TCT CAG CAG TTT AAG CCT	654
151	Ser Gln Gln Phe Lys Pro	164
655	AGCAGTTGGTTCATTATGGCTCTATTGAACTCTGTTTCGCTTTCCATCTCAGGCTCTTTAATG	718
719	CATCAGCATAAACCCCTTTGACTTTGAACATCAATTGAGCTTCTTTTTAGTGTTTAGCTTAT	781
762	TATAGGTCCTAGAGATATTTCTTCTAAGTGACCAATTAGAAATGTTATATGTATAGCCAATC	844
845	ATGTTATGATCTGTGAATTTATGTTTTATG	875

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence from the cDNA clone pPLZ2 (EMBL No X51767).

Primer X51767 normal

5' ATGCCAGACCACAACAGCGTTATCGAGGC 3'

Primer X51767 reverse

5' CTATCATTCGCAATATGATCTTCTTCAAG 3'

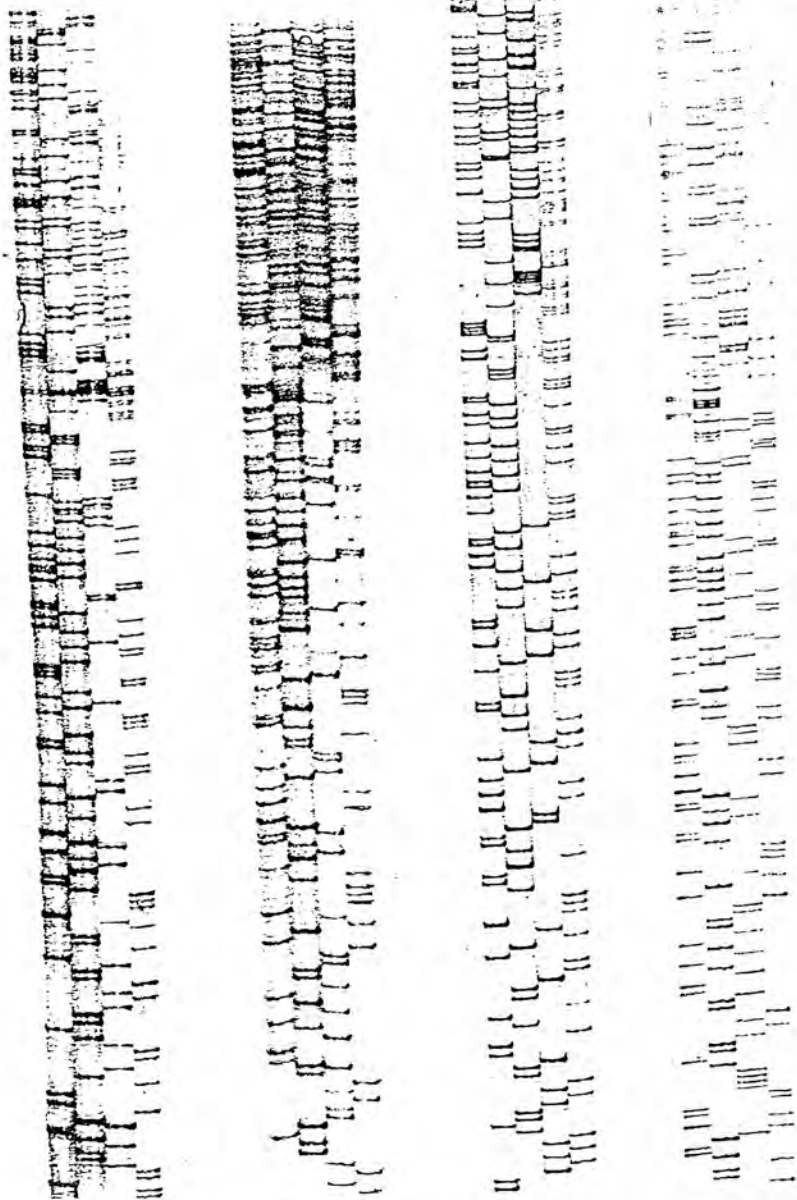
Abb. 4: CDNA SEQUENZ VON GEN X51767 UND PRIMERSEQUENZEN

A G C T

A G C T

A G C T

A G C T



L. mutabilis

L. polyphyllus

L. hartwegii

L. albus

62 Abb.5: SEQUENZEN DES GENS X51767

L. albus	TCCGAACTGACGACTCTTGAAAGTTGAAATTTGGAAGAAC
L. "termis"
L. angustifoliusA.....
L. polyphyllusT.....T.....
L. mutabilisA.....G
L. microcarpusG

TTTAGGGTCAAGGGAGGACAAAGAACGAGGAGGACAAGAGAGTAGAAACC

.....A.....TT.....T.A.....

.....T.T.....A.....A.....

...T...T...A.A.....A.....AG.GC...

.....A.....A.....T.....A.A.....

GTGTTGTAACGTAGTCAAGGTGAGGAAATGACGTAATAAACCACTTC

..A.....T.....G.....

.....G...T...G.G.....

.....A.....A.....C.....G.G.....

.....A..A.....T..T...G.....

GATATAAGGGGCTCCGAGACCGTTGCTGCTGCCGGATCAGTAAACTTCG

.....C.C.....

.....A.C...G...GC.....A...

.....C.AA.....AC.....

.....A.....G.....A.....

Abb.6: SEQUENZVERGLEICH EINES TEILS DES EXONBEREICHS DES GENS X51767

gebnisse verspricht.

4. DANK

Unsere Arbeiten werden dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Wi 719/8-1) unterstützt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die heute zugänglichen Methoden, die zum Studium der "Molekularen Evolution" eingesetzt werden können, wie PCR und DNA-Sequenzierung werden vorgestellt. Am Beispiel eines spezifischen Lupinengens zeigt ein erster Sequenz-Vergleich der Arten aus Südamerika, Nordamerika und Europa, daß die Bewohner der drei Erdteile bereits viele Millionen Jahre getrennt sein müssen.

6. LITERATUR:

- AVISE, J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB, N. C. SAUNDERS (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- CRISTOFOLINI, G. (1989): A serological contribution to the systematics of the genus *Lupinus*(Fabaceae). *Pl. Syst. Evol.* 166, 265-278
- DUNN, D.B. (1984): Cytotaxonomy and distribution of new world lupin species. *Proc. 4th Intl. Lupin Conf. La Rochelle.*, 68-85.
- EHRlich, H.A. (1989): PCR technology. Macmillan Press.
- GOLDBLATT, P. (1981): Cytology and phylogeny of Leguminosae.- In Polhill, R.M., Raven, P.H., eds., *Advances in legume systematics* 2, 427-464, Kew, Royal Bot. Gardens.
- GROSS, R. (1986). Lupins in the old and new world-A biological-cultural coevolution. *Proc. 4th Intl. Lupin Conf., Geraldton, 1986*, 244-277.
- HILLIS, D.M., C. MORITZ, *Molecular Systematics*, Sinauer Associates Inc., 1990
- INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SWINSKY, T.J. WHITE, *PCR Protocols*, Academic Press Inc., 1990
- KNIPPERS, R., *Molekulare Genetik*, Thieme, 1985
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. UND WILSON, A.C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196-6200.
- MARCUS, A., *The Biochemistry of Plants* Vol. 15, *Molecular Biology*, Academic Press Inc., 1989
- MCPHERSON, M.J., P. QUIRKE, G.R. TAYLOR, *PCR; A Practical Approach*, Oxford University Press, 1991
- MEYER, A., KOCHER, T.D., BASASIBWAKI, P., UND WILSON, A.C. (1990): Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347, 550-553.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, H. ERLICH, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction, *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 51, 263, 1986
- NÓWACKI, E., & JAWORSKI, A. (1978): A study on the evolution of the Genus *Lupinus* by serological methods. *Genet. Polon.* 16, 153-163.
- PERREY, R. & WINK, M. (1991): Constitutive expression and molecular characterization of a cDNA clone encoding a partial HSP70 gene in cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus*. *J. Plant Physiol.* 137, 744-748.
- PERREY, R., SCHNEIDER, M. & WINK, M. (1990): Tissue-specific expression of a cDNA clone from cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Mol. Biol.* 14, 1055-1056.
- PERREY, R., U. WARSKULAT, M. WINK, Molecular cloning of a lupin-specific gene from a cDNA library of suspension cultured cells of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Molecular Biology*, 15: 175-176
- PERREY, R., WARSKULAT, U., & WINK, M. (1990): Molecular cloning of a cDNA for the ubiquitin gene of *Lupinus polyphyllus*. *Nucl. Acids Res.* 18, 6428.

PERREY, R., WARSKULAT, U., & WINK, M. (1991): Molecular cloning of a *Lupinus polyphyllus* cDNA encoding a basic peroxidase isoenzyme of cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 137, 537-540.

PLANCHUELO-RAVELO, A.M. (1984). Taxonomic studies of lupins in South America. 4th Intl. Lupin Conf. La Rochelle, 40-54.

PLITMAN, U. (1981): Evolutionary history of Old World lupins. *Taxon* 30, 430-437.

POLHILL, R.M. (1976): Genisteeae BENTH. and related tribes (Leguminosae). *Bot. Syst.* 1, 143-380.

SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS, H.A. ERLICH, Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, *Science* 239: 487, 1988

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, T. MANIATIS, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SANGER, F., S. NICKLEN, A.R. COULSON, DNA sequencing with chainterminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, 1977

WARSKULAT, U., PERREY, R. & WINK, M. (1991): Molecular cloning of a cDNA from *Lupinus polyphyllus* cell cultures encoding a ribosomal protein (rps 16). *Plant Mol. Biol.* 16, 739-740.

WINK, M. & HARTMANN, T. (1984): Enzymology of quinolizidine alkaloid biosynthesis. in *Natural products Chemistry* 1984, 511-519.

WINK, M. & WITTE, L. (1985): Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. *Z. Naturforsch.* 40c, 767-775.

WINK, M. (1987a): Why do lupin cell cultures fail to produce alkaloids in large quantities. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8, 103-111.

WINK, M. (1987b): Quinolizidine alkaloids: Biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Med.* 53, 509-514.

WINK, M. (1992): The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. *Focus on plant-insect interactions* (E.A. BERNAYS, Hrg.), Vol. IV p. 133.

VERWANDTSCHAFTSANALYSE MITTELS DNA-FINGERPRINTING

Ingrid Swatschek und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Im Neuenheimer Feld 364
Universität Heidelberg
6900 Heidelberg

ABSTRACT

Analysis of relatedness by DNA-fingerprint

DNA-fingerprint is a recent method to analyze the genetics of close relationships, such as pedigree analysis. The method established in our laboratory for DNA-fingerprinting of bird populations is described in detail.

It can also be used to study plant populations, such as identification of varieties, paternity and control of breeding strains. It is assumed that this method will be of much interest for the plant breeder and should also be considered in lupin breeding.

RESUMEN

Análisis de la interrelación genética por medio de los patrones de identificación del DNA (DNA fingerprint)

El moderno método de los patrones de identificación del DNA (DNA fingerprint) permite estudiar las relaciones genéticas cercanas como es el caso del pedigree. En este trabajo se describe en detalle el método de laboratorio para el análisis de los patrones de identificación del DNA de una población de pájaros.

Este método puede ser usado también para estudios de poblaciones de plantas, como por ejemplo, la identificación de variedades, paternidad y control del poder de hibridación. Se considera que es una metodología de interés para el mejoramiento vegetal y debería ser considerada en los planes de mejoramiento de los lupinos.

1. EINFÜHRUNG

Die Methode des DNA-Fingerprintings wurde 1985 von Alec Jeffreys entwickelt (JEFFREYS et al. 1985b). Er hat dieser molekularbiologischen Analyse den Namen DNA-Fingerprinting gegeben, weil mit ihr, zumindest beim Menschen und vielen Tierarten, individuelle DNA-Bandenmuster erhalten werden können.

Dieses Analysenverfahren ist inzwischen vielerorts etabliert und wird für die unterschiedlichsten Fragestellungen, insbesondere aber für Verwandtschaftsuntersuchungen wie z.B. Vaterschaftsnachweise, angewendet:

--Vaterschaftsnachweise lassen sich auch dort erbringen, wo herkömmliche Verfahren keine eindeutigen Ergebnisse

zeigen (JEFFREYS et al. 1985a).

--Die **Rechtsmedizin** bedient sich des DNA-Fingerprintings, um durch den Vergleich von DNA-Spuren am Tatort mit DNA von Verdächtigen den Täter zu ermitteln (BÄR und HUMMEL 1991).

--Mit dieser Methode kann geprüft werden, ob Individuen **geschützter Tierarten** aus Gefangenschaftszuchten stammen oder der Natur entnommen wurden (z.B. WINK et al. 1990)

--Bei vom **Aussterben** bedrohten Tierarten lassen sich Zuchttempfehlungen aussprechen, um möglichst vielfältiges Erbgut zu erhalten, d.h. Inzuchteffekte zu vermeiden.

--Einwanderungsbehörden können den Verwandtschaftsgrad von einwanderungswilligen Personen feststellen, um über die Rechtmäßigkeit von **Einwanderungsgesuchen** zu entscheiden (JEFFREYS et al. 1985a).

--Der DNA-Fingerprint wird zur Typisierung von **Zell-Linien** angewendet (THACKER et al. 1988).

--In soziobiologischen Untersuchungen an **Tierpopulationen** lassen sich durch die Kenntnis der Verwandtschaftsbeziehungen neue Aussagen über das Verhalten der Tiere, insbesondere über **Paarungssysteme**, machen (WETTON et al. 1987; WINK et al. 1990), d.h. ob monogame oder polygame Verhältnisse vorliegen, oder wie oft sog. "Extra-Pair-Copulations" vorkommen.

--Seit 1988 findet das Verfahren auch in der Analyse und Charakterisierung des **Pflanzengenoms**, z.B für die Pflanzenzüchtung, Anwendung.

2. BIOLOGISCHE VORAUSSETZUNGEN

Die DNA, die den Chromosomen zugrunde liegt, enthält, mit Hilfe von vier verschiedenen Desoxyribonukleotiden verschlüsselt, die Bauanweisungen für alle lebensnotwendigen RNAs und Proteine. Nicht alle DNA-Sequenzen kodieren für Proteine, die meisten (> 95% bei vielen Eukaryonten) tragen keine in Proteine übersetzbare Informationen (Abb.1). Solche DNA-Sequenzen werden als "**nicht kodierend**" bezeichnet. Kodierende und nicht kodierende Sequenzen können im Genom ein einziges Mal auftreten (*single copy*), oder vielfach wiederholt, dann nennt man sie *repetitive DNA* (Abb.2). Im menschlichen Genom macht die repetitive DNA 20- 30% des gesamten Genoms aus (FOWLER et al. 1988).

Die mehrfach auftretenden Sequenzen können einzeln im Genom eingestreut vorkommen, oder mehrfach hintereinandergeschaltet als "**tandem repeats**" (Abb.2). Das besondere Kennzeichen der tandem repeats ist ein hoher individuenspezifischer Polymorphismus in der Anzahl der hintereinandergeschalteten Elemente. Zwei Klassen der *tandem repeats* seien hier vorgestellt:

- **Minisatelliten**, die keine exakten Kopien einer Sequenz sind, sondern nur über eine identische Kernsequenz verfügen (Abb.3)

- **Mikrosatelliten** oder "**simple repeats**", die dagegen aus exakten Kopien von extrem kurzen DNA-Sequenzen bestehen, wie zum Beispiel GTG oder GGAT, die aneinandergereiht sind (ALI et al. 1986). (Abb. 4).

Durch die unterschiedliche Anzahl der wiederholten Elemente für zwei Allele ergibt sich eine unterschiedliche Länge der Mini- oder Mikrosatelliten-Bereiche. Für den DNA-Fingerprint werden solche Mini- oder Mikrosatelliten-Typen

ausgewählt, die im Genom an mehreren Loci auftreten. Für jeden Locus entstehen durch den hohen Polymorphismus eigene Allele. Dies wird im DNA-Fingerprint zur Herstellung eines individuellen Bandenmusters ausgenutzt.

3. METHODE

Das Ausgangsmaterial für den DNA-Fingerprint bildet die DNA. Entsprechend dem untersuchten Organismus gibt es leicht unterschiedliche Verfahren zur DNA-Isolation, auf die aber nicht weiter eingegangen werden soll (s. Labor- und Lehrbücher zur Molekularbiologie, z.B. SAMBROOK et al. 1989).

Die DNA wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen zerschnitten. Restriktionsenzyme schneiden jedoch nicht wahllos, sondern erkennen bestimmte DNA-Sequenzen, die Palindrome bilden (s. Abb. 5). Je nachdem, wie weit die Schnittstellen auseinanderliegen, erhält man unterschiedlich große DNA-Abschnitte. Abbildung 6 zeigt, wie dadurch auch von Allelen der tandem repeats unterschiedlich große Fragmente entstehen.

Im nächsten Schritt werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Man macht sich dabei ihre größenabhängige Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zunutze. In einem Agarose-Gel läßt man die geschnittene DNA der zu untersuchenden Individuen parallel zueinander aufrennen. In Proben, die ein identisches Allel für einen tandem repeat-Bereich enthalten, wandern die entsprechenden DNA-Fragmente mit der gleichen Geschwindigkeit.

Zur weiteren Detektion werden die DNA-Fragmente auf eine andere Matrix übertragen. Im Kapillarblot (SAMBROOK et al. 1989) erzeugt ein Fließpapierstapel einen Sog, der die Fragmente auf eine Nylonmembran zieht. Die Nylonmembran hat gegenüber dem Agarosegel den Vorteil der mechanischen, chemischen und thermischen Stabilität, die für das weitere Verfahren notwendig ist. Die Nylonmembran wird erhitzt, um die DNA-Fragmente zu fixieren und gleichzeitig die DNA-Doppelstränge zu trennen (Abb. 6)

Im nächsten Schritt gilt es, die DNA-Banden mit der Mini- oder Mikrosatelliten-DNA zu erkennen. Dazu muß mit einer spezifischen Oligonucleotidsonde hybridisiert werden. Im Falle des *simple repeat* GTG wählt man als Sonde das komplementäre Oligonucleotid mit der Sequenz (CAC)₅. Die Sonde ist im Bereich der Einzelstränge zu den GTG-Bereichen komplementär und bildet entsprechende Doppelstränge. Dies geschieht durch Ausbildung von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen GC- und AT-Paaren. Es ist möglich, die Sonde vor der Hybridisierung radioaktiv zu markieren, in unseren Labors wird zur Erleichterung des Laboralltags jedoch eine nichtradioaktive Markierung verwendet.

Enzymatisch wird auf das 3'-Ende des Oligonucleotids ein Nucleotidanalogon, z.B. Dig-dUTP übertragen (Abb. 7 und 8). Dig-dUTP (Abb. 7) enthält, über eine Molekülbrücke gebunden, ein Digoxigeninmolekül (s. Abb.). Gegen Digoxigenin, das als Aglykon von Herzglykosiden aus dem Fingerhut (*Digitalis*) gewonnen wird, wurden Antikörper hergestellt, die mit einem Detektionsenzym, der Alkalischen Phosphatase, gekoppelt sind. Die Alkalische Phosphatase setzt chromogene Substrate in einen blaubraunen Indigofarbstoff um, der gut sichtbar ist.

In der Hybridisierungsreaktion bindet die markierte Sonde an DNA-Fragmente auf der Nylonmembran, die simple repeat-Bereiche enthalten. In der anschließenden Antigen-Antikörper-Reaktion gelangt der Antikörper und das damit gekoppelte Enzym an diesen Membranbereich (Abb. 9). Gibt man die Membran nun in eine Inkubationslösung, die die chromogenen Substrate enthält, so werden die Banden der Membran angefärbt, die simple repeat-Bereiche tragen (s. Abb. 9). Es entsteht ein blaubraunes Bandenmuster, das nun z.B. mit einem PC-gesteuerten Bildauswertesystem (z.B. Bioprofil, Firma Fröbel) ausgewertet werden kann (Abb. 10 und 11).

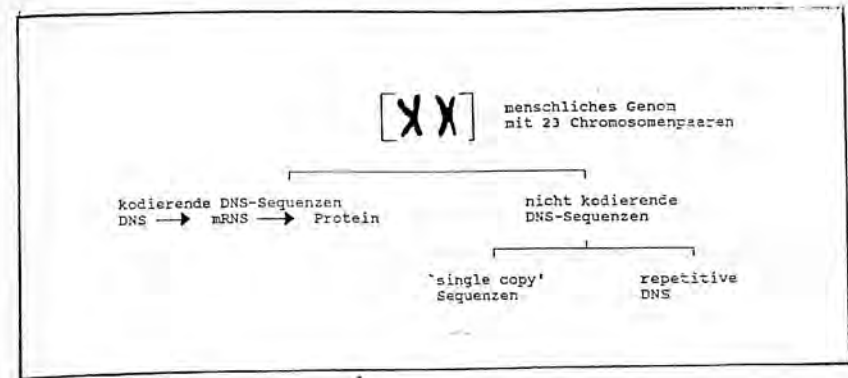


Abb.1. Aufbau des Genoms

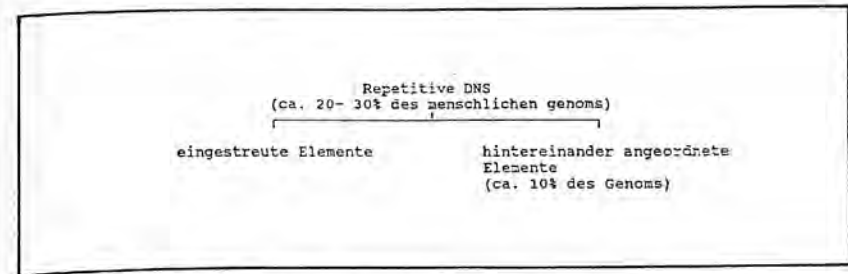


Abb.2. Aufbau der repetitiven DNA

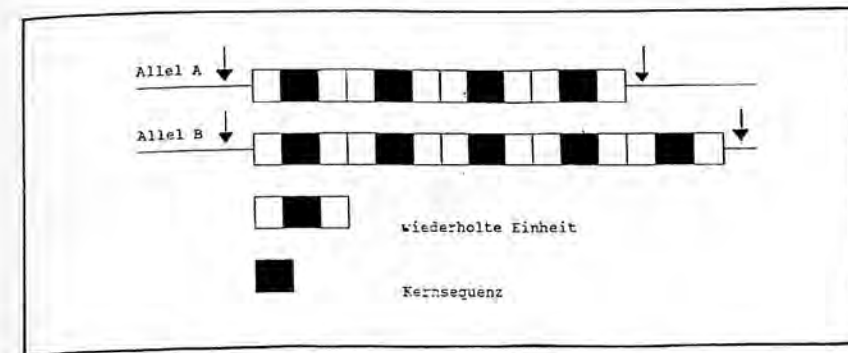


Abb.3. Aufbau von "Minisatelliten"

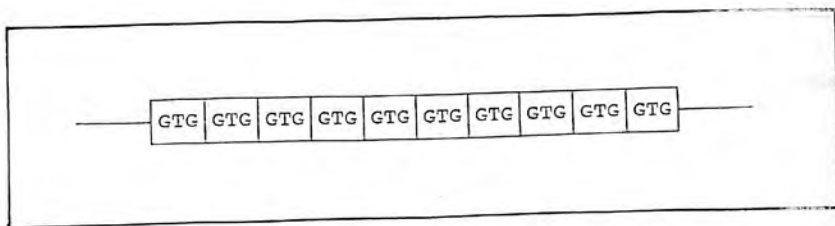


Abb.4. Beispiel der Nucleotidsequenz eines "Mikrosatelliten"

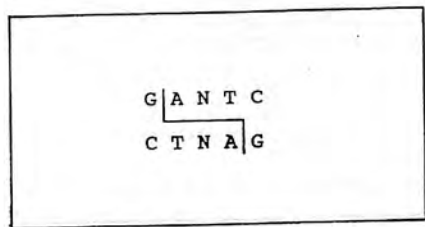


Abb.5. Beispiel einer Schnittstelle eines Restriktionsenzym (Palindrom)

DNS-FINGERPRINT: Die Methode

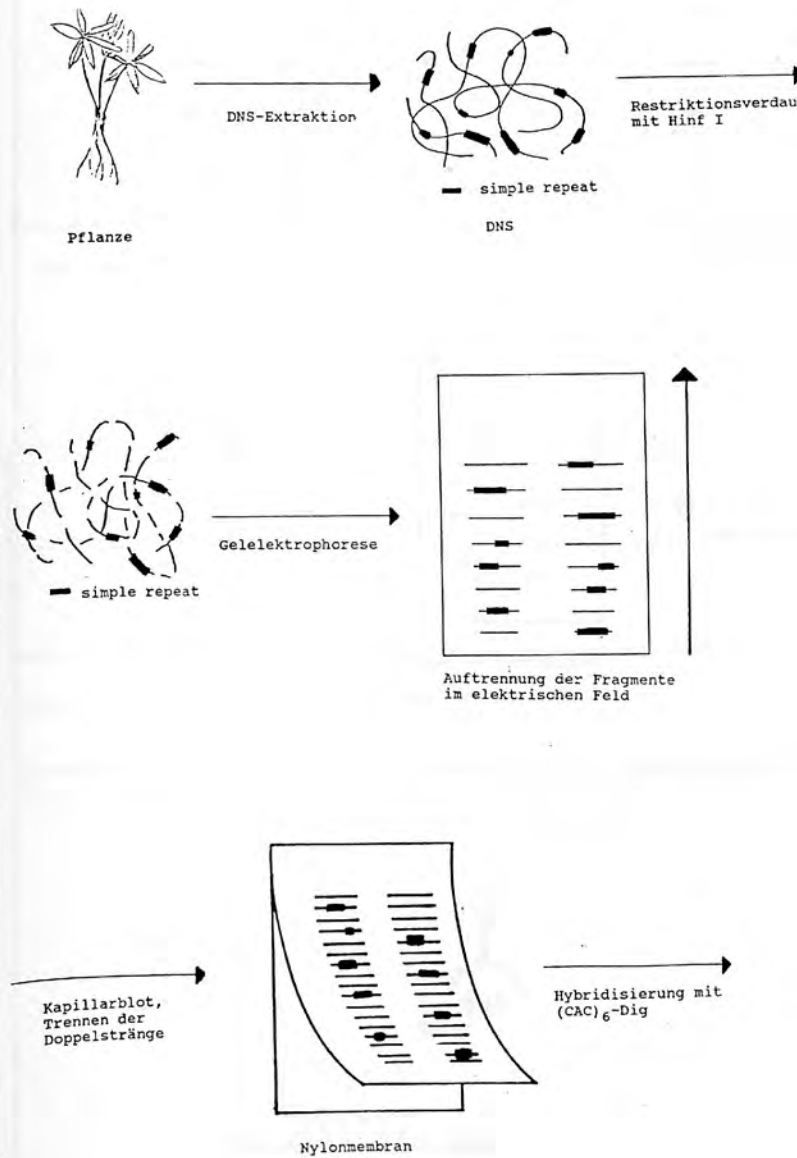
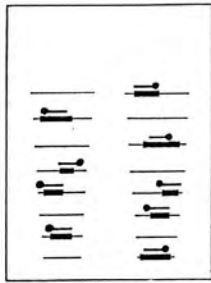
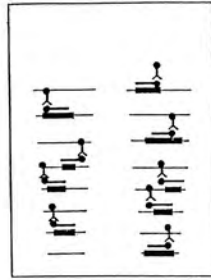


Abb.6. Schematische Darstellung des DNA-Fingerprint-Verfahrens

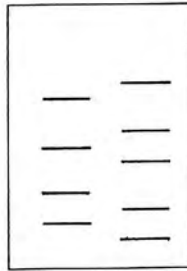


Bindung der Sonde an die simple repeat-Bereiche

Antigen-Antikörper-Reaktion



X-Phosphat, NBT
pH 9,5



Farbreaktion erzeugt Bandenmuster

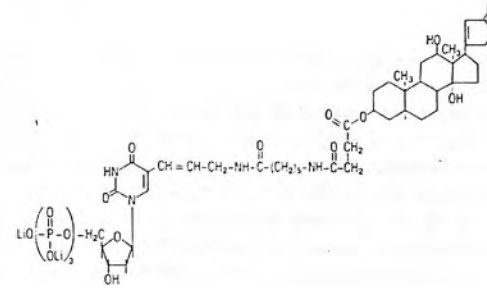


Abb.7. Struktur von Digoxigenin-11-dUTP

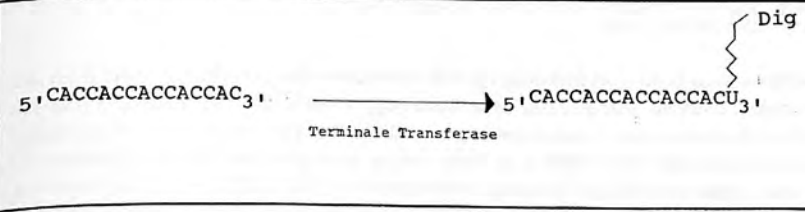


Abb.8. Prinzip der enzymatischen Markierung einer Oligonucleotidsonde

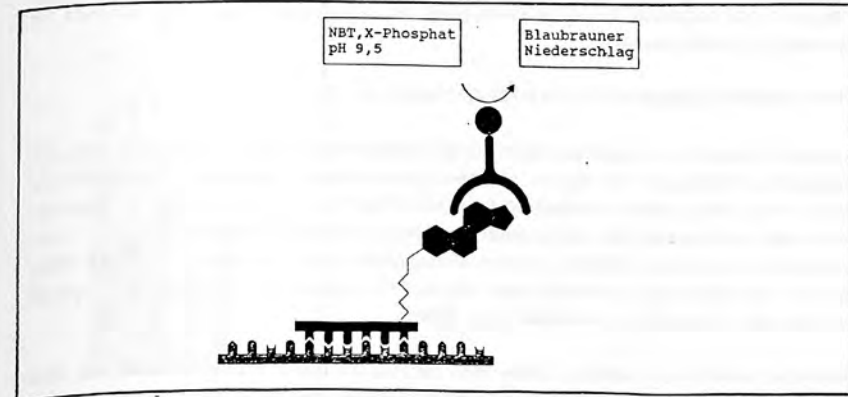


Abb.9. Prinzip der immunologischen Nachweismethode

Betrachtet man die DNA-Fingerprints einer Familie, bestehend aus Vater, Mutter und Kind, ergibt sich folgendes Bild: Die Muster von Vater und Mutter zeigen, wenn sie nicht eng verwandt sind, nur ganz wenige gleiche Banden, während sich die Banden des Kindes entweder auf die der Mutter oder die des Vaters zurückführen lassen (Abb. 10 während sich die Banden des Kindes entweder auf die der Mutter oder die des Vaters zurückführen lassen (Abb. 10 und 11). Die Vererbung der *tandem repeat*-Bereiche erfolgt nach den Mendelschen Regeln. Durch DNA-Fingerprint-Analyse läßt sich aus einer Gruppe von potentiellen Vätern der Richtige herausfinden. Dieses Problem ist nicht nur bei *Homo sapiens*, sondern auch im Tierreich akut. In Abb. 11 sind die Fingerprints einer Familie von Seggenrohrsängern (*Acrocephalus paludicola*), d.h. die von 1 Weibchen und 4 Kindern abgebildet. Während bei den Kindern 1, 2 und 4 offensichtlich derselbe Vater beteiligt war, stammt Kind 3 mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem zweiten Männchen. Bei dieser Rohrsängerart ist das polygame Verhalten auch aus Verhaltensexperimenten bekannt, wurde aber hier erstmals molekularbiologisch bewiesen (I. SWATSCHEK, M. WINK, A. DYRCZ & K. SCHULZE-HAGEN; in Vorbereitung).

Man kann sich leicht ausmalen, daß die Identität oder Nichtidentität der Banden ein klares und unbestechliches Kriterium ist, das für die forensische Medizin, Kriminalistik und Biologie von sehr großem Nutzen sein kann.

Die DNA-Fingerprint-Methode ist natürlich nicht auf den Einsatz von sog. "Multilocus-Sonden" beschränkt. Wenn ein Polymorphismus vorliegt, können für viele Anwendungen, sog. "Single-Locussonden" vorteilhafter sein, da die Empfindlichkeit erhöht und damit die benötigte DNA-Menge reduziert ist. Auch ist das zu interpretierende Bandenmuster einfacher. Dieses Verfahren wird auch als RFLP (restriction fragment length polymorphism, sprich "Riflip") abgekürzt (HILLIS & MORITZ 1990).

Eine weitere Entwicklung wurde durch Entdeckung des PCR-Verfahrens (Polymerase Chain Reaction) in den letzten Jahren möglich. Durch die Wahl geeigneter DNA-Sonden (sog. "Primer") können aus genomischer DNA entsprechende DNA-Fragmente selektiv vermehrt werden, die entweder durch Elektrophorese oder durch Sequenzierung analysiert werden (EHRlich 1989, INNIS et al. 1990). Letztere Methode hat vor allem die Erforschung der Stammbäume der Organismen (Phylogenieforschung) revolutioniert (HILLIS & MORITZ 1990). Werden kurze, d.h. 10-Basen lange Primer eingesetzt, so wird mit der PCR-Methode eine größere Anzahl von DNA-Fragmenten amplifiziert, die nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese ebenfalls ein komplexes Bandenmuster, d.h. einen DNA-Fingerprint ergeben. Dieses Verfahren, mit dem Acronym, RAPD (gesprochen "Rapid"), ist bereits jetzt für die Unterscheidung von Individuen aus unterschiedlichen Populationen einsetzbar und damit für die Sorten- und Genotypcharakterisierung bei Pflanzen sehr interessant. Vermutlich wird dieses Verfahren, das methodisch einfacher anzuwenden ist als das traditionelle Fingerprint-Verfahren mit den Oligonucleotid-Sonden, sicher auch bald für Vaterschaftsanalysen einsetzbar werden.

4. ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN IN DER PFLANZENZUCHT

Pflanzen zeigen im allgemeinen eine geringere Variabilität der Bandenmuster auf, wobei die Variabilität stark vom Fortpflanzungssystem abhängig ist: Sich vegetativ oder durch Selbstbestäubung fortpflanzende Spezies zeigen eine viel geringere Variabilität als solche, die fremdbestäubend sind (NYBOM und SCHAAL, 1990b). So findet man beim Eschen-Ahorn (*Acer negundo*), der sich geschlechtlich fortpflanzt, individuelle Muster erzeugen kann (DALLAS 1988). Bei Pflanzenarten, die solch geringe Variabilität zeigen, kann der DNA-Fingerprint zur Sortentypisierung eingesetzt werden (NYBOM und SCHAAL 1990a; GEBHARDT et al. 1989).

Die Variabilität ist weiterhin davon abhängig, welche Mini- und Mikrosatelliten-Bereiche untersucht werden. Zum Beispiel erhält man für die Kichererbse (*Cicer arietinum*) mit der Mikrosatelliten-Sonde (GATA)₄ sortenspezifische

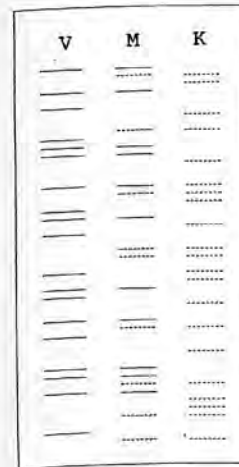


Abb.10. Schematische Auswertung einer Verwandtschaftsanalyse

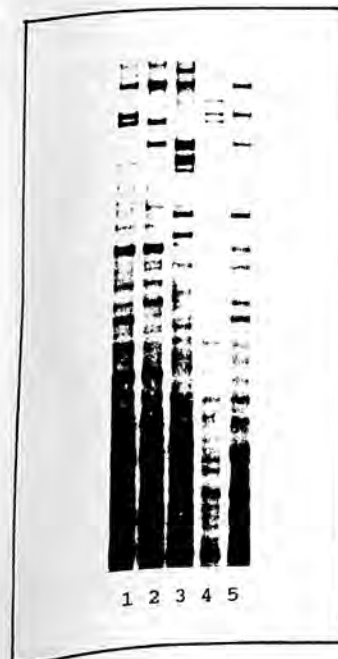


Abb.11. Original-DNA-Fingerprint einer Familie des Seggenrohrsängers, in der die Zahl der Väter unbekannt ist. Bande 1-4 = Kinder, Bande 5 = Mutter

Muster, während die Sonde (CAC)₅ für alle Sorten dasselbe Muster findet (WEISING & KAHL 1990). Auch bei Pflanzen sind Elternschaftsnachweise möglich: So konnten NYBOM und SCHAAL bei Apfelsämlingen von Bäumen verschiedener Apfelsorten feststellen, von welcher Apfelsorte der Pollen stammte (NYBOM und SCHAAL 1990a).

Durch den Vergleich von DNA-Fingerprints sollte es an Hand der abgestuften Ähnlichkeiten möglich sein, Stammrassen heutiger Zuchtformen zu ermitteln und Aussagen über die Verwandtschaft von Arten zu machen (WEISING et al. 1991).

Für den Züchter bietet sich der DNA-Fingerprint zur Kontrolle an, ob Inzuchtlinien auch wirklich rein sind oder heterogenes Erbgut enthalten. Dies würde sich durch uneinheitliche Bandenmuster nachweisen lassen.

Für Rückkreuzungsprogramme kann man die der Empfängerlinie ähnlichsten Pflanzen auswählen: Die Ähnlichkeit der Bandenmuster wird als Marker für die Ähnlichkeit des gesamten Erbgutes verwendet (HILLEL et al. 1990).

5. FAZIT

Für den DNA-Fingerprint bestehen vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Pflanzenzucht. Um nur einige Beispiele zu nennen:

- Sortentypisierung
- Nachweis der Elternschaft: Kreuzungen zweier Sorten lassen sich an Hand der Bandenmuster nachweisen
- Genetische Verwandtschaft von Arten und Sorten
- Kontrolle über die Reinheit von Inzuchtlinien
- Empfehlungen für Rückkreuzungsversuche

Der Einsatz setzt eine gewisse Entwicklungsarbeit voraus. Für jede Spezies muß eine Reihe von Fingerprint-Sonden getestet werden, um die für die jeweilige Fragestellung geeignete Sonde herauszufinden. Ist das Analysensystem aber einmal aufgestellt, kann durch Zuchttempfehlungen die Zeit bis zum gewünschten Zuchtergebnis verkürzt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der DNA-Fingerprint ist eine Analysenmethode, die Aussagen über Identität und Verwandtschaft von Organismen erlaubt. Es werden molekularbiologische Verfahren eingesetzt, die Bandenmuster erzeugen. Durch den hohen Polymorphismus der *tandem repeat*-Bereiche entstehen individuelle Muster, die miteinander verglichen werden.

Der Einsatz des DNA-Fingerprints ist nicht auf die Analyse des menschlichen und tierischen Genoms beschränkt. In der Pflanzenzucht besteht die Möglichkeit der Sortentypisierung, des Nachweises der Elternschaft und der Kontrolle von Inzuchtlinien mit Hilfe des DNA-Fingerprints. Zuchttempfehlungen können gegeben und die Abstammung von Pflanzenrassen und -arten untersucht werden.

7. DANK

Unsere Arbeiten wurden dankenswerterweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (Wi 719/7-1).

LITERATUR

- ALI, S., MÜLLER, C. R., EPPLER, J. T. (1986) DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.* 74: 239-243.
- BÄR, W., HUMMEL, K. DNA fingerprinting: its application in forensic case work. In: DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. BURKE, T., DOLF, G., JEFFREYS, A. J., WOLFF, R. (Hrsg.) Birkhäuser Verlag, Basel, 349-355 (1991).

- DALLAS, J. F. (1988) Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6831-6835.
- EHRLICH, H.A. (1989). PCR-Technology. Macmillan Press
- FOWLER, J. C. S., BURGOYNE, L. A., SCOTT, A. C., and HARDING, H. W. J. (1988) Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation - A concise review relevant to forensic biology. *J. F. Sc. A.*
- GEBHARDT, C., BLOMENDAHL, C., SCHACHTSCHNABEL, U., DEBENER, T., SALAMINI, F., RITTER, E. (1989) Identification of 2n inbreeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* 78: 16-22.
- HILLEL, J., SCHAAL, T., JEFFREYS, A. J., PLOTZKY, Y., CAHANER, A. LAVI, U. (1990) DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. *Genetics* 124: 783-789.
- HILLIS, D.M. & MORITZ, C. (1990). Molecular systematics. Sinauer Press.
- INNIS, M., GELFAND, D., SNINSKY, D. & WHITE, T. (1990). PCR-protocols. Academic press, London, New York
- JEFFREYS, A. J., BROOKFIELD, J. F. Y., SEMEONOFF, R. (1985a) Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818-819.
- JEFFREYS, A. J., WILSON, V. and THEIN, S. L. (1985b) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- NYBOM, H. (1991) Application of DNA fingerprinting in plant breeding. In: DNA fingerprinting: Approaches and applications. BURKE, T., DOLF, G., JEFFREYS, A. J., WOLFF, R. (Hrsg.) DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. Birkhäuser Verlag, Basel, 294-311 (1991).
- NYBOM, H., SCHAAL, B. A. (1990a) DNA "fingerprints" applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 79: 763-768.
- NYBOM, H., SCHAAL, B. A. (1990b) DNA "fingerprints" reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus, Rosaceae*). *Amer. J. Bot.* 77: 883-888.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- THACKER, J., WEBB, M. B. T., DEBENHAM, P. G. (1988) Fingerprinting cell lines: use of human hypervariable DNA probes to characterize mammalian cell cultures. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 14: 519-525.
- WEISING, K., KAHL, G. (1990) DNA fingerprinting in plants- the potential of a new method. *BFE* 7: 230-235.
- WEISING, K., RAMSER, J., KAEMMER, D., KAHL, G., EPPLER, J. T. (1991) Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. In: DNA fingerprinting: Approaches and applications. BURKE, T., DOLF, G., JEFFREYS, A. J., WOLFF, R. (Hrsg.) Birkhäuser Verlag, Basel, 312-329 (1991)
- WETTON, J. H., ROYSTON, E. C., PARKIN, D. T., WALTERS, D. (1987) Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147-149.
- WINK, M., SWATSCHEK, I., FELDMANN, F., SCHARLAU, W., RISTOW, D. (1990) Untersuchungen von Verwandtschaftsbeziehungen in Vogelpopulationen mittels DNA-Fingerprint. *Vogelwelt* 111: 86-95

Michael Wink
 Institut für Pharmazeutische Biologie
 Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 364
 W-6900 Heidelberg

ABSTRACT

Analytical methods for the identification and quantification of lupin alkaloids

The established methods of qualitative and quantitative analysis of lupin alkaloids are reviewed, such as thin-layer chromatography (TLC), high-resolution gas-liquid chromatography on capillary columns (GLC), high-pressure liquid chromatography (HPLC), gravimetry and colorimetry. The method of choice is GLC, which is best suited for the separation of the complex alkaloid pattern of lupins and at the same time sensitive enough to quantitate minute amounts of alkaloids, such as in sweet lupins.

New immunological methods, such as radioimmuno assay (RIA), scintillation proximity assay (SPA) and enzyme immuno assay (ELISA) are introduced, which allow the detection of trace amounts of lupin alkaloids, having the lupanine skeleton.

Seeds of *L. albus* and *L. mutabilis* can be screened under UV-light. Analysis by GLC show that fluorescing are alkaloid-rich and non-fluorescing seeds are sweet.

RESUMEN

Los métodos analíticos para la identificación y cuantificación de alcaloides de lupinos

Se revisaron los métodos cualitativos y cuantitativos de análisis de alcaloides de lupinos, tales como la cromatografía de capa delgada (TLC), la cromatografía de gas licuado de alta resolución en columna capilar (GLC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la gravimetría y la colorimetría. El método elegido fue el GLC, por ser el mejor para la separación de los complejos patrones de alcaloides de los lupinos, y a la vez, ser suficientemente sensitivo como para detectar las pequeñas cantidades que poseen los lupinos dulces.

Se presenta además, nuevos métodos inmunológicos como son: el ensayo radioinmunológico (RIA), el ensayo de sentelleo (SPA) y el ensayo inmunológico de enzimas (ELISA), que permiten detectar trazas de alcaloides de lupinos portadoras de la estructura de la lupanina.

Las semillas de *L. albus* y *L. mutabilis* pueden ser también analizadas bajo la luz ultravioleta, que indica por medio de la fluorescencia a las ricas en alcaloides, siendo las dulces no fluorescentes. Esta identificación fue luego comprobada con el análisis de GLC.

1. EINLEITUNG

Lupinenalkaloide gehören zu den typischen Sekundärstoffen der Lupinen. Diese Alkaloide kommen in allen Pflanzenteilen vor, insbesondere in den Samen, die bis zu 8% enthalten können. In allen Fällen liegt nicht ein einzelnes Alkaloid sondern ein Alkaloidgemisch vor, das aus über 30 Einzelkomponenten bestehen kann. Neben 2-6 Hauptalkaloiden liegen die übrigen Alkaloide als Nebenalkaloide vor, deren Anteil am Gesamtalkaloidgehalt unter 1% beträgt. Während für biochemische und chemotaxonomische Fragestellungen die Zusammensetzung dieser Nebenalkaloidfraktion von Interesse sein kann, kann sich der Lupinenzüchter oder -Verwerter auf die Erfassung der Hauptalkaloide, wenn nicht sogar die des Gesamtalkaloidextraktes beschränken und damit ein erhebliches analytisches Problem vermeiden (vergl. MEISSNER & WINK in diesem Band).

Bei den landwirtschaftlich genutzten Lupinenarten finden wir in den Samen die folgenden Hauptalkaloide (WINK ET AL. 1983, WINK & WITTE 1985, WINK 1991):

L. albus (synonym *L. termis*): Lupanin (50-80%), Multiflorin (3-10%), 13-Hydroxylupanin (5-15%) und Albin (5-15%)

L. angustifolius: Lupanin (50-80%), Angustifolin (5-20%) und 13-Hydroxylupanin (10-20%)

L. mutabilis: Lupanin (40-70%), 13-Hydroxylupanin (10-20%), 3-Hydroxylupanin (5-10%), Tetrahydrohombifolin (4%) und Spartein (5-20%)

L. luteus: Lupanin (40-70%) und Spartein (30-50%)

In den grünen Pflanzenteilen ist Lupanin weiterhin Hauptalkaloid, jedoch nimmt die Fraktion der Esteralkaloide, die sich vom 13-Hydroxylupanin, 3-Hydroxylupanin und Multiflorin ableiten signifikant zu. Auch Piperidinalkaloide, wie z.B. Ammodendrin werden regelmäßig nachgewiesen (WINK 1992a). Bei *L. luteus* und verwandten Arten, wie *L. hispanicus* oder *L. pilosus* kommt Lupanin nur in Spuren vor, hier ist das bicyclische Lupinin Hauptalkaloid, das ebenfalls verestert sein kann (WINK 1992).

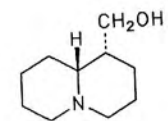
Bei den Alkaloidbestimmungsmethoden können wir zwischen den Schnellmethoden, die eine grobe Unterscheidung von hohen, mittleren und niedrigen Alkaloidgehalt erlauben und den aufwendigen analytischen Verfahren unterscheiden, die in der Lage sind, die Zusammensetzung komplexer Alkaloidgemische, sowohl qualitativ als auch quantitativ zu beschreiben. Der Praktiker wird die Schnellmethoden bevorzugen, jedoch muß man sich klar werden, daß für eine verlässliche Qualitätskontrolle bei der Zulassung von Varietäten oder bei Vermarktung von Samen oder deren Fraktionen strenge Maßstäbe gelten müssen, wie sie heute in der Lebensmitteltechnologie üblich sind. Hier wird man an aufwendigen chromatographische oder immunologische Verfahren nicht vorbeikommen.

In dieser Übersicht werden die z.Z. etablierten Verfahren zur Alkaloidanalytik referiert, wobei eigene noch nicht veröffentlichte Erfahrungen mit berücksichtigt wurden.

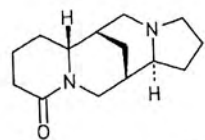
2. EXTRAKTION

Für die meisten Nachweismethoden ist die Extraktion der Alkaloide aus dem Pflanzenmaterial ein notwendiger erster Schritt, dem wir Aufmerksamkeit widmen müssen.

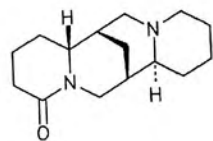
Lupinenalkaloide haben ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten, das davon abhängt, ob die Alkaloide protoniert oder als freie Basen vorliegen. Die freie Base ist in Wasser nicht, wohl aber in organischen Lösungsmitteln, wie CH_2Cl_2 oder Ether vollständig löslich. Umgekehrt ist das geladene Alkaloidmolekül in wässrigen und polaren Lösungsmitteln (z.B. Methanol) gut, nicht aber in apolaren organischen Lösungsmitteln löslich. Dieses unterschiedliche Verhalten macht man sich bei der Extraktion zu Nutze.



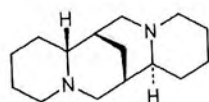
Lupinin (1)



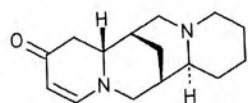
Cemoensidin (2)



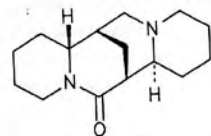
Lupanin (3a)



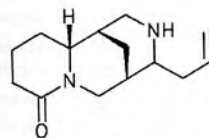
Sparteïn. (3b)



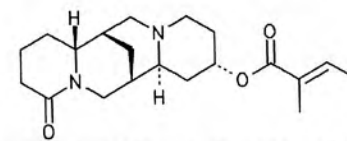
Multiflorin (3c)



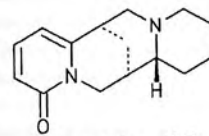
Aphyllin (3d)



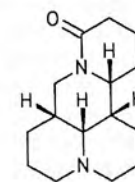
Angustifolin (3e)



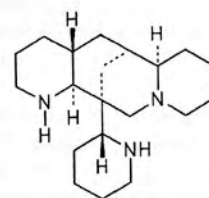
13α-Tigloyl-oxylupanin (3f)



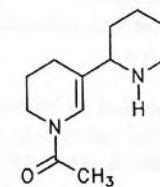
Anagyrin (4)



Matrin (5)



Piptanthin (6)



Ammodendrin (7)

In der Pflanze liegen die Alkaloide nicht als freie Base, sondern als Salze ionisiert vor, d.h. man kann sie relativ leicht mit Wasser oder Alkohol extrahieren.

Für einige Schnelltest-Verfahren, bei denen z.B. die Keimfähigkeit der Samen erhalten bleiben soll, nutzt man diese Eigenschaft aus: Die Samen kann man über Nacht in wenig Wasser quellen lassen (z.B. in einer Multititerplatte), ein Teil der enthaltenen Alkaloide geht in Lösung und kann dann direkt analysiert werden.

Für genauere Analysen kommt es jedoch darauf an, die Alkaloide möglichst quantitativ aus ihrer pflanzlichen Matrix heraus zu isolieren.

In der Praxis hat sich das folgende Extraktionsverfahren bewährt:

500 oder 1000 mg feingemahlene Samenmehl werden in 15 ml 0,5 N HCL oder 0,5 N H₂SO₄ gegeben und gut durchmischt und anschließend mehrere Stunden, z.B. über Nacht stehen gelassen, ohne daß Feuchtigkeit verdunstet kann. Frischmaterial wird mit Mörser und Pistill oder mit einem Ultraturax zerkleinert. Zur Weiterverarbeitung zentrifugiert man das Homogenat ab (z.B. 5 min bei 10.000 rpm), sammelt den Überstand und löst das Pellet erneut in 15 ml 0,5 N HCL. Nach 30 min wird erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Diese Überstände werden mit Ammoniak oder NaOH auf ca. pH 12 eingestellt (höhere pH-Werte führen zu Alkaloidverlusten). Danach erfolgt die Extraktion der Alkaloide mit einem apolaren Lösungsmittel, z.B. Dichlormethan (CH₂Cl₂). Die Methode der Wahl ist die Flüssig-Fest-Extraktion: Dazu gibt man 18 ml des Überstands (vorher Gesamtvolumen messen!) auf eine Extrelutsäule (Merck) oder Chemelut-Säule (Analytichem). Nachdem der wässrige Extrakt vom Säulenmaterial aufgenommen wurde, fügt man 3 x je 20 ml CH₂Cl₂ hinzu. Das Eluat wird in einem Rundkolben aufgefangen und angenommen wurde, fügt man 3 x je 20 ml CH₂Cl₂ hinzu. Das Eluat wird in einem Rundkolben aufgefangen und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne bei 45° C eingeengt. Aus dem Rundkolben überführt man die Rohschleife in entsprechende, gut verschließbare Probenfläschchen, indem man den Kolben gründlich mit 1-2 ml CH₂Cl₂ ausspült. Aus den Fläschchen entfernt man das Lösungsmittel durch Abdampfen unter Preßluft oder N₂ oder noch einfacher, indem man sie über Nacht im Abzug stehen läßt. Am nächsten Morgen ist CH₂Cl₂ verdampft. Die Probenfläschchen mit den Alkaloiden sollten bei < 4° C und im Dunkeln aufbewahrt werden. Wenn nur wenige Proben zu extrahieren sind oder keine Säulen zur Verfügung stehen, kann die Trennung auch konventionell mittels Schütteltrichter (3-5 mal ausschütteln) erfolgen.

Für gewisse Fragestellungen kann das Verfahren abgekürzt werden, indem die Zentrifugationsschritte unterbleiben, nur enthält der Alkaloidextrakt dann auch die gesamte Lipidfraktion, die bei einigen chromatographischen Verfahren stört. Anstelle von verdünnter Säure kann die Extraktion mit MeOH oder EtOH erfolgen, z.B. im Soxhlet, jedoch ist der Alkaloidextrakt dann mit vielen anderen Komponenten verunreinigt. Für einen Schnelltest kann man 10 - 100 mg feingemahlene Samenmehl in ein Eppendorfgesäß, das mit 1 ml MeOH gefüllt ist geben und über Nacht schüttelnd inkubieren. Nach dem Abzentrifugieren kann man dann am nächsten Tag den Überstand mit einem geeigneten Schnelltest analysieren.

3. NACHWEISVERFAHREN

3.1. Chromatographische Verfahren

3.1.1. Gaschromatographie

Als Methode der Wahl zur genauen qualitativen und quantitativen Erfassung der Lupinenalkaloide hat sich die Gaschromatographie mittels Kapillarsäulen erwiesen (WINK 1987, 1992), die seit ca 10 Jahren allgemein in guter Qualität zugänglich wurden. Insbesondere unter Verwendung eines stickstoff-selektiven Detektors lassen sich die unter 2 erhalten Alkaloidextrakte (nach Flüssig-Fest-Extraktion) direkt analysieren. Der Vorteil der Methode liegt in der hohen Trennkapazität der Kapillarsäulen (ca. 70000 Trennböden/ 30 m Säule), die es sogar erlaubt, Stereoisomere, wie z.B. Lupanin und α -Isolupanin oder 13-Tigloyloxylupanin und 13-Angeloyloxylupanin aufzutrennen. Außerdem ist die Empfindlichkeit mit 10 ng/ μ l allen anderen chromatographischen Verfahren überlegen, was dann wichtig

wird, wenn nur geringe Alkaloidmengen vorliegen (WINK 1992).

Da man die Kapillar-GLC direkt mit einem Massenspektrometer koppeln kann (GC-MS) und die meisten QA charakteristische Fragmentierungsmuster aufweisen, ist es mit GC-MS relativ einfach, die gängigen QA eindeutig zu identifizieren. Für die Praxis sind authentische Vergleichsalkaloide (die aber kommerziell nicht erhältlich sind) und Kovats-Retention-Indexwerte von großer Hilfe. RI-Werte und MS-Fragmentierungsmuster sind in folgenden Publikationen tabelliert: KINGHORN & BALANDRIN, 1984, WINK ET AL. 1983, WINK & WITTE 1985, 1991, WINK 1992).

3.1.2. HPLC

Eine Alternative bietet die Analyse mittels HPLC, wobei hier eine geringere Empfindlichkeit (QA haben meist keine empfindlichen Chromophoren und müssen bei 210-220 nm detektiert werden) und eine geringe Trennkapazität (Säule mit 5000 theor. Trennböden) in Kauf genommen werden müssen. Alkaloide vom α -Pyridontyp, wie z.B. Cytisin können bei 310 nm gemessen werden. Eine Zusammenstellung von adäquaten Säulen, Eluenten und Retentionszeiten findet sich in (SAITO ET AL. 1989; WINK 1992). Eine direkte Identifizierung der Komponenten mittels MS ist zwar theoretisch möglich, z.B. im Thermosprayverfahren, jedoch in der Praxis nach wie vor kaum verbreitet. Bewährt hat sich die Verwendung eines Photodioden-Array-Detektors, mit dem man online die UV-Spektren aller Substanzen messen und somit erkennen kann, ob Verunreinigungen vorliegen.

Ein Vorteil der HPLC besteht in der Möglichkeit, präparativ zu arbeiten, z.B. um Reinalkaloide zu isolieren, die dann für andere spektroskopische Verfahren (NMR) oder für Biotests zur Verfügung stehen.

3.1.2. Dünnschichtchromatographie

Für analytische Arbeiten ist die DC deutlich schlechter geeignet als GLC oder HPLC, da sie nur geringe Trennkapazität und Empfindlichkeit aufweist. Dafür ist sie aber apparativ einfach, billig und in jedem Labor durchzuführen.

Als Trägermaterial haben sich Kieselgel und als Laufmittel Diethylamin/Cyclohexan (7/3), MeOH/CHCl₃/NH₃ (15/85/1) und MeOH/NH₃ (65/1) bewährt. Die Detektion erfolgt mit Dragendorff's Reagenz oder mit J₂/KJ-Lösung (KINGHORN & BALANDRIN 1984, WINK 1992).

Zur Identifizierung ist es dringend erforderlich, authentische Vergleichssubstanzen einzusetzen, aber dennoch ist größte Vorsicht bei der Zuordnung am Platze, da viele Alkaloide ähnliche Rf-Werte aufweisen. In der Lupinen-Literatur befinden sich mehrfach falsche Angaben über Alkaloidmuster, die aufgrund von DC-Analysen erfolgten. Eine Quantifizierung kann bestensfalls semiquantitativ sein.

3.2. Immunologische Verfahren

In vielen Bereichen der analytischen und klinischen Chemie haben sich immunologische Nachweisverfahren, wie Radioimmunoassay (RIA), Enzym-Immunoassay (EIA oder ELISA) etabliert, wenn es darum geht, geringe Mengen einer Substanz oder eines Metaboliten in vielen ungereinigten Proben zu bestimmen.

Auch zur quantitativen Bestimmung der Lupinenalkaloide eignen sich diese Verfahren. In Australien wurde ein ELISA (ALLEN et al. 1991), in meinem Labor RIA, ELISA und SPA zur Bestimmung von QA vom Lupanintyp entwickelt (WINK 1991, 1992), mit denen noch pg/ng-Gramm Mengen eindeutig quantifiziert werden können. Erfahrt werden alle QA vom Lupanintyp, d.h. auch 13-Hydroxylupanin und Esteralkaloide, nicht jedoch Spartein oder Lupinin (WINK 1992).

Voraussetzung für diese Verfahren ist ein hochspezifischer Antikörper, der diese Alkaloide eindeutig "erkennt". Wir sind hier folgendermaßen vorgegangen: Reines 13-Hydroxylupanin wurde mit Bernsteinsäureanhydrid verestert. An-

schließlich wurde diese Substanz an Rinderserumalbumin chemisch gekoppelt. Dieses Konjugat (= Antigen) wurde 4 Kaninchen zusammen mit Freund'schen Adjuvanz subcutan injiziert. Nach 4 Wochen erfolgte eine 2. Immunisierung. Im Abstand von 4 Wochen wurden in den folgenden Monaten jeweils 20 ml aus den Ohrvenen entnommen. Das Blutserum wurde bei -20° C aufbewahrt. 2 Kaninchen produzierten hochspezifische Antikörper.

RIA

Für den RIA benötigt man zusätzlich ein radioaktives Traceralkaloid. Wir setzten hierfür tritiiertes 13-Hydroxylupanin ein. Die Alkaloidbestimmung wird wie folgt durchgeführt:

Eine Alkaloidprobe in PBS-Puffer wird mit stark verdünnten Antikörpern (> 1: 1000) versetzt, gleichzeitig wird ³H-13-Hydroxylupanin als Tracer zugegeben. Nach 2 h Inkubation werden die von den Antikörpern gebundenen von den nicht gebundenen Tracermolekülen durch Ammoniumsulfatfällung getrennt. Die Menge an gebundenen Tracermolekülen wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt.

Liegt kein Alkaloid in der Probenlösung vor, so wird das radioaktive Alkaloid quantitativ von den Antikörpern gebunden, d.h. man erhält einen maximalen Wert für die Radioaktivität. Liegen jedoch Alkaloidmoleküle vor, so kommt es zu einer Konkurrenz zwischen radioaktiven und nicht markierten Alkaloiden. Im Extremfall werden nahezu nur unmarkierte Alkaloide von den Antikörpern erkannt, d.h. die gemessene Radioaktivität wäre gleich 0%. Aus einer Standardkurve (Abb.1) kann man den Gehalt an Alkaloid in einer Probe sofort ablesen. Voraussetzung ist jedoch, daß man die Alkaloidkonzentration in der Probe so verdünnt, daß der Meßwert im Bereich der linearen Eickurve zu liegen kommt.

Der Vorteil des RIA liegt in seiner hohen Empfindlichkeit (Abb.1) und der Möglichkeit, viele Proben gleichzeitig zu vermessen, er erfordert jedoch die Erlaubnis zum Umgang mit radioaktiven Stoffen und ist apparativ relativ aufwendig.

Scintillation proximity assay (SPA)

Eine Variante des RIA ist der unlängst entwickelt SPA, den wir auch für Lupinenalkaloide einsetzen konnten. An die SPA-Beads wird der Antikörper gekoppelt. Wenn nun ein radioaktives Molekül am Antikörper bindet, kommt es zur Anregung der "Fluomicroperlen", die dann Photonen abgeben, die im Szintillationszähler gemessen werden können. Auch hier bestimmt die Relation markiertes Alkaloid/ kaltes Alkaloid die Meßkurve (Abb.2). Insgesamt ist der SPA-Assay mit dem RIA vergleichbar, jedoch weniger empfindlich und wesentlich teurer, dafür aber sind weniger Arbeitsschritte notwendig.

ELISA

Beim "Double-Sandwich-ELISA" koppelt man im ersten Schritt das Traceralkaloid, hier 13-Hydroxylupanin an ein Protein (= Antigen), mit dem die ELISA-Gefäße (Multititerplatten) beschichtet werden. Anschließend gibt man die Antikörperlösung und die zu messenden Alkaloide hinzu. Es kommt nun zu einer Konkurrenz der Antikörper mit dem Alkaloid, das an der Gefäßwand gebunden vorliegt und den Alkaloidmolekülen in Lösung. Anschließend wird das Gefäß gewaschen und alle freien Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt wird die Menge an Antikörpern bestimmt, die am fixierten Antigen gebunden haben. Dazu inkubiert man mit einem zweiten Antikörper, der spezifisch Kaninchenantikörper erkennen kann. Dieser "Anti-Rabbit Antikörper" ist mit einem Enzym, z.B. Peroxidase gekoppelt. Die Quantifizierung erfolgt über Zugabe eines chromogenen Substrats für die POD, indem die Farbentwicklung photometrisch bestimmt wird (im ELISA-Photometer) (Abb.3).

Auch der ELISA ist hochempfindlich und selektiv und hat den Vorteil, ohne radioaktive Substanzen auszukommen.

3.3. Schnelltests

RIA: Standardkurve

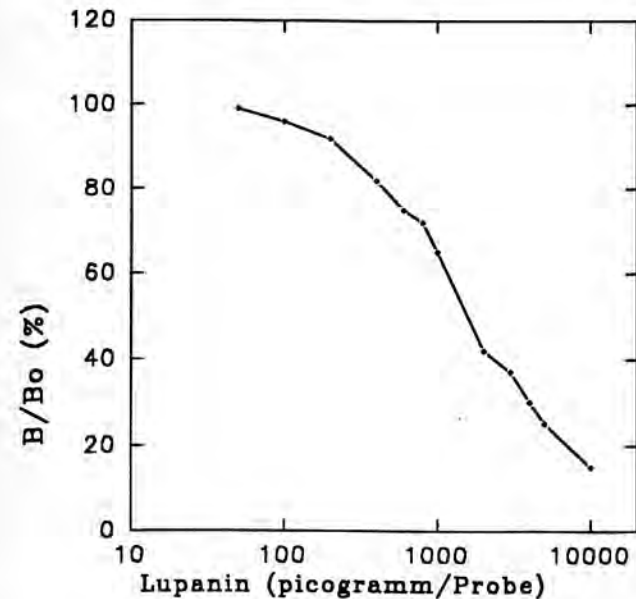
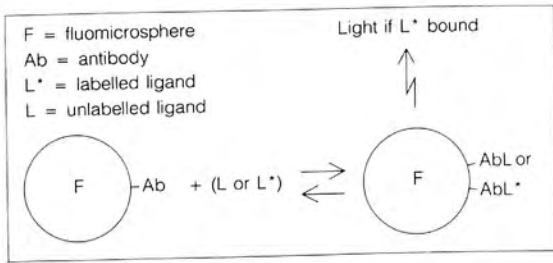


Abb. 1. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Radio-Immunoassay (RIA)



SPA: Scintillation proximity assay
Standardkurve

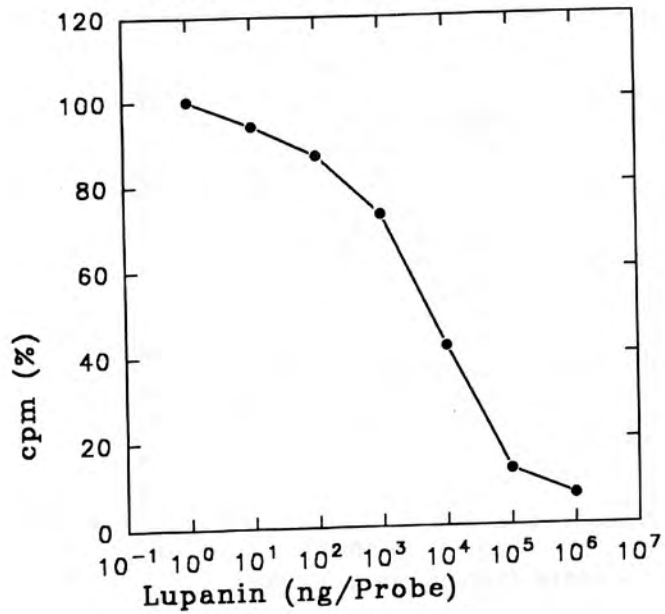


Abb.2. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Scintillation proximity assay (SPA)

ELISA
Standardkurve

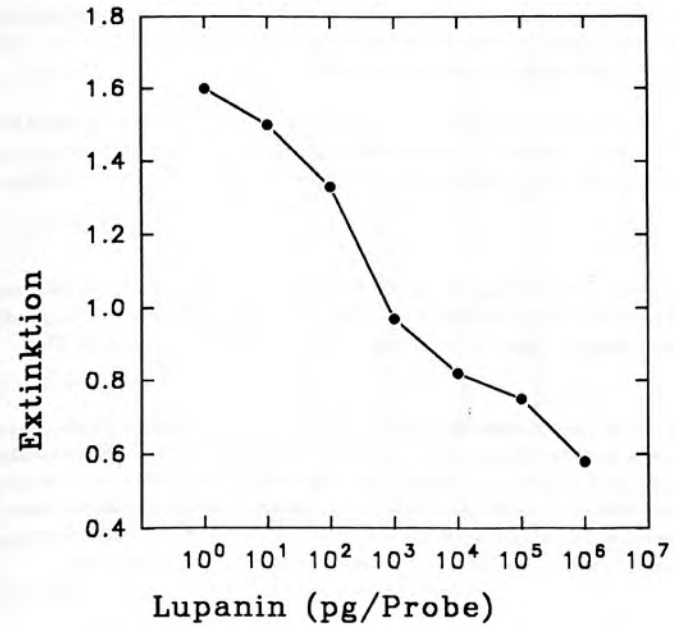


Abb.3. Bestimmung des Lupaningehaltes mit einem Enzym-Immunoassay (ELISA oder EIA)

3.3.1. Titri- und Kolorimetrie

Wenn man Alkaloide über die Fest-Flüssigextraktion nach Kapitel 2 isoliert hat, kann man den Alkaloidgehalt gravimetrisch (hier können jedoch andere mit-isolierte Substanzen stören) oder titrimetrisch mit z.B. p-Toluensulfonsäure bestimmen, denn die Alkaloide liegen als stark basische Verbindung vor.

Ferner kann man die Alkaloidmenge über einige Farbreagentien anhand von entsprechenden Eichkurven bestimmen, z.B. Bromchresolpurpur oder J₂/KJ (VON BAER ET AL. 1979; WINK & HARTMANN 1981). Da die im Gemisch vorliegenden Alkaloide u.U. unterschiedliche Reaktionen bewirken, kann man mit diesen Verfahren immer nur einen Näherungswert erhalten, der aber für viele praktische Anwendungen durchaus genügt.

Diese Verfahren sind relativ kostengünstig, jedoch im unteren Konzentrationsbereich störanfällig, so daß man sie zur Evaluierung von Süßlupinen mit Vorsicht anwenden sollte.

Mit größeren Fehlern kann die Bestimmung von QA in wässrigen oder alkoholischen Extrakten behaftet sein. In der Praxis kann der folgende Schnelltest mit J₂/KJ leicht bei der Prüfung helfen, ob Lupinenalkaloide in größerer Menge vorliegen oder nicht, was bei Reihenscreenings von Bedeutung sein kann:

Zu 1 ml wässriger Alkaloidlösung in 0.5 N HCl gibt man 100 µl des Jodreagens (9 g J₂, 14 g KJ in 100 ml 0,5 N HCl). Sind Alkaloide vorhanden, so entsteht eine gelb- bis dunkelbraune Trübung, genauer ein Niederschlag. Bei entsprechender Standardisierung läßt sich die Farbintensität bei 700 nm quantitativ bestimmen (WINK & HARTMANN 1981).

3.3.2 Indikatorpapier

Zur groben Abschätzung des Alkaloidgehaltes im grünen Pflanzenmaterial eignet sich ein Indikatorpapier (Filterpapier, das mit Dragendorff's Reagenz imprägniert wurde): Man schneidet einen Petiolus oder Stengel durch und tropft den austretenden Saft auf das Papier. Ist viel Alkaloid vorhanden, so ergibt sich ein orangroter Fleck.

3.3.3. NIRS-Methode

Zur schnellen und gleichzeitigen Quantifizierung von Protein und Öl in Samen kann man die NIRS-Methode anwenden. Mit ihr kann man relativ große Probemengen analysieren, ohne vorher die Inhaltsstoffe extrahieren zu müssen. Diese Methode wurde auch zur Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes herangezogen (WEIBMANN & WEIBMANN 1991). Vergleicht man die NIRS-Werte mit den Alkaloidgehalten, die gaschromatographisch bestimmt wurden, so ergibt sich eine gute Korrelation. Bei niedrigen Alkaloidgehalten, also bei alkaloidarmen Süßlupinen, ist die Quantifizierung mit großer Streuung versehen, so daß sich die NIRS-Methode hierfür nur bedingt einsetzen läßt.

3.3.4. UV-Test

In Deutschland, Frankreich und in Chile wurde und wird zur Selektion von alkaloidarmen Samen von *L. albus* eine Analyse unter der UV-Lampe vorgenommen (HACKBARTH & TROLL 1959, VON BAER & PEREZ, 1991). Es war aufgefallen, daß die Samen entweder blau fluoreszieren oder ohne Fluoreszenz sind. Fluoreszierende Samen erwiesen sich als alkaloidreich, die nicht fluoreszierenden als alkaloidarm (VON BAER & PEREZ 1991).

Wir haben diese Angaben für 4 Variäten von *L. albus* wiederholen und mittels Kapillar-GLC bestätigen können (Abb.4). Auch für *L. mutabilis* scheint dieser Test zu funktionieren (Abb.4). Wie die GLC-Messungen zeigen, gibt es einige wenige "Ausreißer", dennoch darf man annehmen, daß der UV-Test in der Praxis für eine schnelle Evaluierung sehr geeignet ist. Er ersetzt die spätere Qualitätskontrolle mit anderen Methoden jedoch nicht.

Dieses Fluoreszenz-Phänomen war für uns sehr überraschend, denn die Lupinenalkaloide selbst fluoreszieren nicht!

1= *L.albus* var. Blanka; 2= *L.a.* var. Lutop; 3=*L.a.*Kiew mutant
4= *L.a.* var. Neutra; 5= *L.a.* var. Ida; 6= *L. mutabilis*
F= Samen fluoreszieren; -F = Samen ohne Fluoreszenz

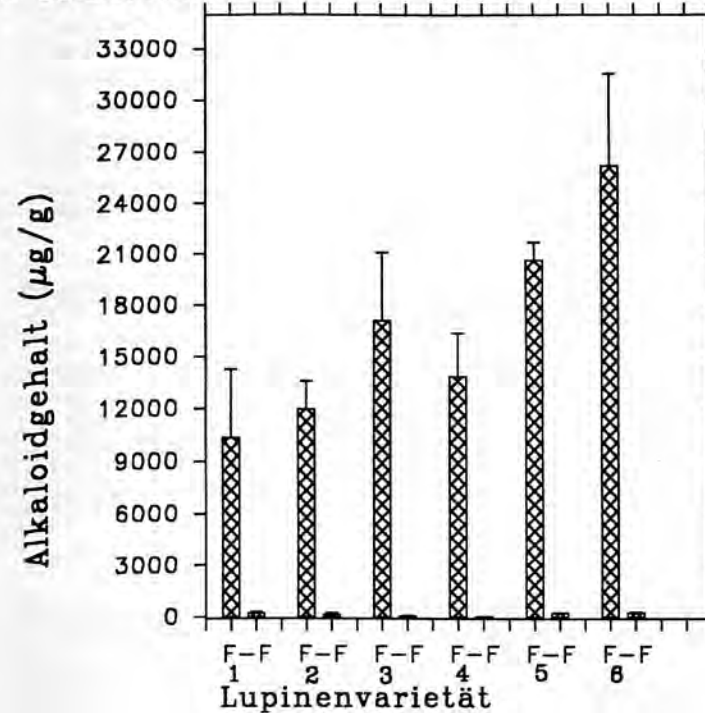


Abb.4. Korrelation zwischen Samenfluoreszenz und Alkaloidgehalt

Wir haben versucht, die fluoreszierende Substanz aus den Samenschalen zu extrahieren und zu identifizieren. Was wir im Moment sagen können, ist, daß sie sich gänzlich anders verhält als die Lupinenalkaloide. Es gilt nun herauszufinden, ob es sich hierbei vielleicht um Abbauprodukte der Lupinenalkaloide handelt oder aber um Sekundärstoffe (z.B. Flavonoide), deren Auftreten parallel zum Auftreten der Alkaloide verläuft.

4. Ausblick

Gegenüber der Situation zu Beginn der Lupinenzüchtung anfangs des Jahrhunderts ist die Analytik der QA ein gutes Stück weitergekommen. Die Alkaloidanalyse mittels Kapillar-GLC, HPLC und ELISA entspricht den modernen Möglichkeiten, ist aber für die Routine und den Praktiker zu aufwendig und zu teuer. Selbst die Schnellmethoden sind häufig immer noch kompliziert, wenn man einmal den UV-Test ausklammert, und versagen häufig bei niedrigen Alkaloidgehalten. Wenn Lupinensamen oder daraus isolierte Produkte auf den Markt gebracht werden sollen, z.B. für die tierische- oder menschliche Ernährung, muß eine strenge Qualitätskontrolle mittels GLC, HPLC oder ELISA erfolgen. Da der einzelne Lupinenanbauer dieser Forderung kaum nachkommen kann, benötigen wir in Deutschland oder in Europa dringend ein Servicelabor, in dem solche Tests routinemäßig durchgeführt werden können. Daß dieser Weg machbar ist, zeigen die Erfahrungen in Australien, in denen die Qualitätskontrolle nahezu vorbildlich in einem Zentrallabor betrieben wird (ALLEN et al. 1991).

Dank: Unsere Arbeiten zu den Lupinenalkaloiden wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Für technische Hilfe möchte ich Frau U. Schade, B. Weyerer, H. Wurm, H. Martin und U. Dostal danken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die analytischen Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Lupinenalkaloiden, wie z.B. GLC, GC-MS, HPLC, DC, Gravimetrie und Farbttests werden referiert. Die neu entwickelten immunologischen Verfahren RIA, SPA und ELISA eignen sich ebenfalls zur empfindlichen Detektion des Lupanins. Auch ein Schnelltest, bei dem auf Fluoreszenz der Samenschalen bei *L. albus* und *L. mutabilis* selektiert wird, eignet sich zur schnellen Unterscheidung von Bitter- und Süßlupinen.

5. LITERATUR

- ALLEN, D. G., GREIRSON, B.N. & HARRIS, D.J. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf. 24-27.
HACKBARTH, J. & TROLL, H.J. (1959), in Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl. Parey, Berlin & Hamburg, p. 39-44.
KINGHORN, D. & BALANDRIN, M.F. (1984), In, Alkaloids: Chemical and biological perspectives, W.S. PELLETIER, Hrsg., Vol. 2, 105-148.
SAITO, K., KOBAYASHI, K., OHMIYA, S., OTOMASU, H. & MURAKOSHI, I. (1989), J. Chromatography 462, 333-340.
VON BAER, D. & PEREZ, I. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf. 158-167.
VON BAER, D., REIMERDES, E.H. & FELDHEIM, W. (1979), Z. Lebensmittelunters. Forsch. 169, 27-31.
WINK, M. (1987), Planta Med. 53, 509-514.
WINK, M. (1991), Proc. 6th Intl. Lupin Conf., 326-334.
WINK, M. (1992), in "Methods of Plant Biochemistry" (im Druck).
WINK, M. & HARTMANN, T. (1981), Z. Pflanzenphysiol. 102, 337-344.
WINK, M. & WITTE, L. (1985), Z. Naturforsch. 40c, 767-775.
WINK, M. & WITTE, L. (1991), Entomol. Gener. 15, 237-254.
WINK, M., WITTE, L., HARTMANN, T., THEURING, C. & VOLZ, V. (1983), Planta Med. 48, 253-257.

GC/MS-ANALYSE VON ALKALOIDEN NORDAMERIKANISCHER LUPINEN

Carsten Meißner und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg

ABSTRACT

Analysis of quinolizidine alkaloids from North-American lupins by GC-MS

According to the growing significance of lupines in agriculture, there is an increasing demand for a simple method for the determination of their toxic alkaloids. The most powerful tool is the method of gaschromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), allowing the detection of even trace amounts of lupin alkaloids. In this study 31 different taxa of 75 North American lupins have been analysed by GC/MS, leading to a complex pattern of alkaloid profiles. The alkaloid distribution patterns were studied under chemotaxonomic aspects. This paper supplies the tabular listing of over 200 different alkaloids found in the studied samples. A substantial part has been partly or completely identified by their mass fragmentation pattern and their Kovats Retention Index. About 2/3 of the alkaloids are new and need further structure elucidation.

RESUMEN

Análisis por medio de GC-MS de los alcaloides de especies norteamericanas de lupinus

Dada la creciente importancia agrícola que tienen los lupinos, se creó actualmente una gran demanda de métodos simples para la determinación de los alcaloides tóxicos. El método más poderoso de determinación es el de la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC/MS), que permite detectar hasta trazas de los alcaloides de lupinos.

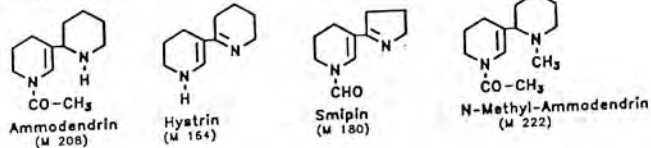
En este estudio se investigaron 31 táxones, sobre una muestra de 75 especies norteamericanas de lupinos, por medio de GC/MS. Los patrones de perfiles de alcaloides resultaron ser muy complejos. Todos ellos fueron evaluados desde el punto de vista quimiotaxonomico. Este trabajo provee una lista tabulada de más de 200 alcaloides diferentes encontrados en las muestras estudiadas. Una parte substancial del muestreo ha sido total o parcialmente identificada por los patrones de fragmentación y por el Kovats Retention Index. Aproximadamente 2/3 de los alcaloides son nuevos y necesitan una investigación posterior para dilucidar su estructura.

1. EINLEITUNG

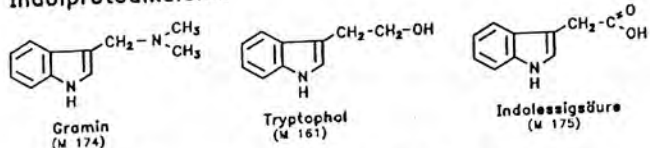
Die Gattung *Lupinus* ist mit über 400 verschiedenen Arten auf dem amerikanischen Kontinent (Süd- und Nordamerika) weit verbreitet und an eine Vielzahl unterschiedlicher Standorte angepaßt. Morphologisch sind die Lupinen leicht von anderen Gattungen zu unterscheiden, auf innerspezifischer Ebene ist ihre Charakterisierung jedoch selbst für Experten problematisch und nicht immer eindeutig, da Hybride zahlreich vorkommen. Trotz dieser, in der Litera-

STRUKTURFORMELN AUSGEWÄHLTER LUPINENALKALOIDE

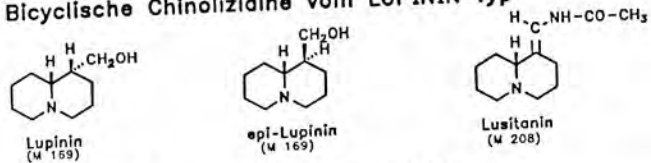
Piperidinalkaloide



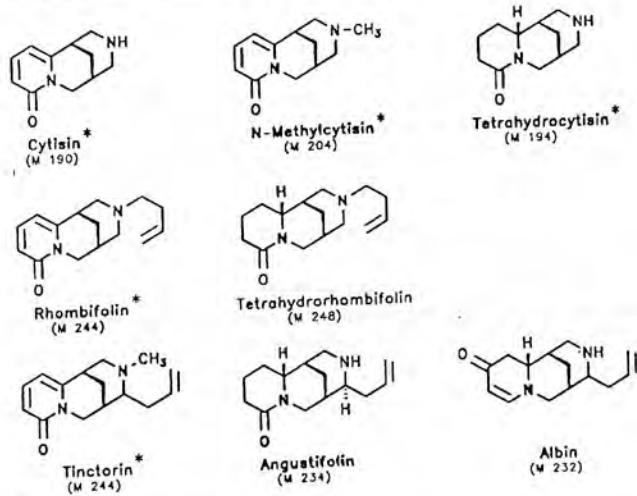
Indolprotoalkaloide



Bicyclische Chinolizidine vom LUPININ-Typ



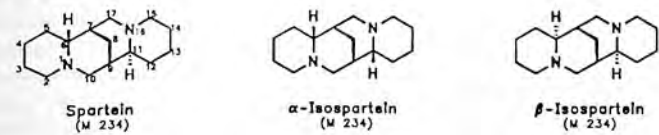
Tricyclische Chinolizidine vom CYTISIN-Typ



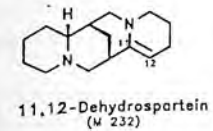
* α -Pyridonalkaloide

TETRACYCLISCHE CHINOLIZIDINE VOM SPARTEINTYP

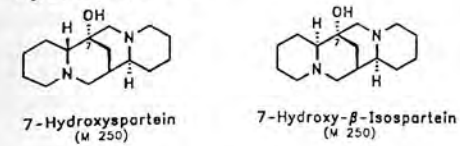
Sparteine



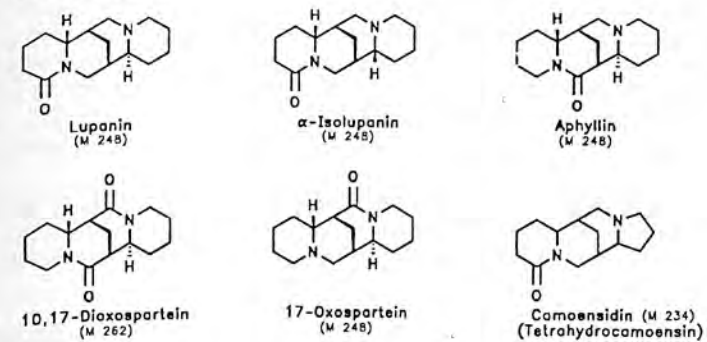
Dehydrosparteine



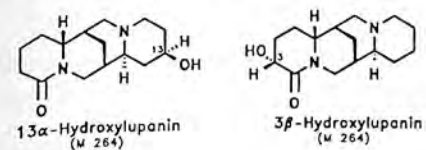
Hydroxysparteine



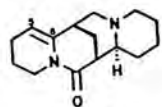
Oxosparteine



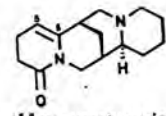
Hydroxy-Oxosparteine



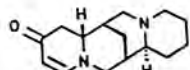
Dehydro-Oxosparteine



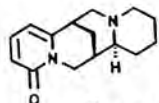
Aphyllidin
(M 246)



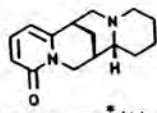
$\Delta^{3,4}$ Dehydrolupinin
(M 246)



Multiflorin
(M 246)

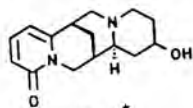


Anagyrin* (11 R)
(M 244)

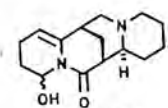


Tharmopsin* (11 S)
(M 244)

weitere polyfunktionelle Oxosparteine

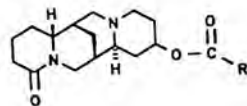


Bapflifolin*
(M 260)

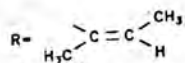


Argyrolobin
(M 262)

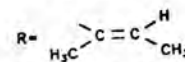
Ester



* α -Pyridonalkaloide



13-Angeloyl-Oxylupenin (M 348)



13-Tigloyl-Oxylupenin (M 348)

Strukturformeln ausgewählter Lupinenalkaloide

tur häufig als chaotisch bezeichneten Taxonomie, gibt es bislang wenig Versuche, phytochemische Merkmale, z.B. Alkaloidzusammensetzung, für die Klassifizierung zu verwenden. Untersuchungen über die Verteilung von Flavonoiden (NICHOLLS und BOHM 1983), Aminosäuren (BOULTER und DERBYSHIRE 1971) und Alkaloiden (NOWACKI & WALLER 1977, KINGHORN *et al.* 1980) in Lupinen zeigten, daß diese Pflanzeninhaltsstoffe vermutlich Bedeutung als generische Charaktere besitzen. Dabei spielt die Betrachtung der Alkaloide eine immer größere Rolle, sowohl bei taxonomischen Diskussionen als auch bei Fragen der Chemischen Ökologie und Biochemischen Evolution. Nicht zuletzt ist dies eine Folge der sich in den letzten Jahren stürmisch entwickelten Möglichkeiten, Alkaloide mittels empfindlicher analytischer Methoden bis in den Spurenbereich hinein zu identifizieren und zu quantifizieren (Übersicht: WINK 1992). Dabei erstreckt sich das Interesse zunehmend auch auf andere Gattungen der Familie der Leguminosae, bei denen Lupinenalkaloide als taxonomische Charaktere verwendet werden. Einen guten Überblick gibt die Arbeit von Van Wyk und Verdoorn (1990) in einer chemotaxonomischen Studie des Tribus Crotolarieae. Über die Verteilung von Chinolizidinalkaloiden in der Gattung *Virgilia* berichtete Greinwald *et al.* (1989).

Die Lupinenalkaloide zählen zum weitaus größten Teil zu der Gruppe der Chinolizidine, in Lupinen sind sie häufig zusammen mit Piperidinalkaloiden und Indolverbindungen zu finden. Aus Berichten über die toxische Wirkung von Lupinenalkaloiden wurde bekannt, daß der Verzehr bestimmter Lupinenarten im Westen der USA immer wieder zu dem Tod von Schafen und der Intoxifikation von Weidetieren führt (KEELER 1973, MEEKER & KILGORE 1987). Dafür werden sowohl einige Piperidinalkaloide (z.B. Ammodendrin) als auch das als teratogen beschriebene Chinolizidinalkaloid Anagyrin verantwortlich gemacht (KEELER & PANTER 1989, PANTER *et al.* 1990). Dagegen werden andere Alkaloide in der Medizin bereits seit längerem erfolgreich als Antiarrhythmika bei Herzleiden eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist das Spartein, dessen Wirkung bereits seit 1873 bekannt ist.

Die Methodik zur Untersuchung der Alkaloide, die häufig in komplexen Gemischen auftreten, erstreckt sich von einfachen gaschromatographischen Messungen mit einem Flammenionisationsdetektor, über die spezifischere Detektion mit einem stickstoffselektivem Detektor zu einer der im Bereich der Analytik aussagekräftigsten Methode im Spurenbereich, der Gas-Flüssig-Chromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS). Insbesondere seit Einführung der Kapillarsäulen in die Gaschromatographie hat die Analytik der Lupinenalkaloide große Fortschritte gemacht (Übersicht: WINK 1992). Ebenfalls gebräuchlich ist die Methode der Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) und der quantitativen Dünnschicht-Chromatographie. Eine Übersicht der einzelnen Verfahren enthalten die Arbeiten von WINK (1987, 1992 und der Beitrag in diesem Band).

An Hand umfangreichen Probenmaterials wurden in dieser Arbeit Alkaloidprofile für 31 verschiedene Arten nord-amerikanischer Lupinen mit Hilfe der Methode der gekoppelten GC/MS erstellt und chemotaxonomisch ausgewertet, um ein besseres Verständnis der Taxonomie innerhalb des Genus *Lupinus* zu erhalten.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Bei den analysierten Pflanzenteilen handelte es sich ausschließlich um Herbarmaterial, das uns K. W. NICHOLLS, Botanisches Institut der Universität von British Columbia, Vancouver, Canada überlassen hat und das bereits in Hinblick auf seine Flavonoide bearbeitet worden war (NICHOLLS & BOHM 1983). Weitere Informationen über die genaue Herkunft der Pflanzen enthält Tabelle 1.

2.2. Extraktion und Probenaufbereitung

Das Pflanzenmaterial wurde in 0.5 N HCl im Mörser homogenisiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten stehengelassen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit 6 N Natronlauge bis pH 11 alkalisiert. 20 ml des

Tabelle 1: Herkunft der untersuchten nordamerikanischen Lupinen

Taxon	Materialherkunft
1. <i>L. andersonii</i>	California: Mono Co., Nicholls 8326
2. <i>L. arboreus</i>	British Columbia: Vancouver Co., Nicholls 7702
3. "	California: Mendocino Co., Gornall 0090
4. <i>L. arboreus</i> var. <i>arboreus</i>	California: Obispo Co., Nicholls 8245
5. <i>L. arbustus</i> ssp. <i>silvicola</i>	California: Modoc Co., Nicholls 7809
6. <i>L. articus</i> ssp. <i>subalpinus</i>	British Columbia: Lake Penask, Nicholls 8927
7. <i>L. argenteus</i> ssp. <i>argenteus</i>	Oregon: Klamath Co., Nicholls 7806
8. "	California: Modoc Co., Nicholls 7807
9. "	Montana: Meagher Co., Nicholls 7857
10. <i>L. argenteus</i> var. <i>argenteus</i>	Alberta: Lethbridge, Nicholls 7912
11. <i>L. argenteus</i> ssp. <i>rubricaulis</i>	Utah: Utah Co., Nicholls 8005
12. <i>L. argenteus</i> ssp. <i>argenteus</i> var. <i>tenellus</i>	Utah: Uinta Co., Nicholls 7848
13. <i>L. bicolor</i>	Oregon: Benton Co., Nicholls 8301
14. <i>L. bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	British Columbia: Victoria Co., Nicholls 79115
15. <i>L. burkei</i>	British Columbia: Route 3, Nicholls 7904
16. <i>L. caudatus</i>	Nevada: Elko Co., Nicholls 7833
17. "	Idaho: Payette Co., Nicholls 7875
18. "	California: Mono Co., Nicholls 7816
19. "	Nevada: Washoe Co., Nicholls 7813
20. "	California: Lassen Co., Nicholls 7812
21. "	California: Modoc Co., Nicholls 7808
22. <i>L. caudatus</i> ssp. <i>caudatus</i>	Colorado: Grand Co., Nicholls 7844
23. <i>L. caudatus</i> x <i>L. hillii</i>	Arizona: Coconino Co. Nicholls 7822
24. <i>L. densiflorus</i> var. <i>aureus</i>	California: Mendocino Co., Bohm & Banek 1413
25. <i>L. densiflorus</i> var. <i>densiflorus</i>	California: Obispo Co. Nicholls & Bohm 1517
26. <i>L. elatus</i>	California: Los Angeles Co., Nicholls 7818
27. <i>L. excubitus</i> var. <i>anstromontanus</i>	California: Kern Co., Nicholls 7817
28. <i>L. hillii</i>	Arizona: Maricopa Co., Nicholls 7819
29. <i>L. holosericus</i>	Nevada: Elko Co., Elko, Nicholls 7832
30. "	Idaho: Custer Co., Nicholls 7838
31. "	Idaho: Oneida Co., Nicholls 7849
32. <i>L. kingii</i>	Arizona: Coconino Co., Nicholls 7823
33. <i>L. latifolius</i>	Oregon: Lane Co., Nicholls 7801
34. <i>L. leucophyllus</i> ssp. <i>leucophyllus</i>	Idaho: Crystal Creek, Nicholls 7850
35. <i>L. leucophyllus</i>	Idaho: Kootenei Co., Nicholls 7866
36. "	Washington: Spokane Co., Nicholls 7870
37. "	Washington: Asotin Co., Nicholls 7871
38. "	Oregon: Union Co., Nicholls 7876

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Taxon	Materialherkunft
39. "	Oregon: Umatilla Co., Nicholls 7878
40. "	British Columbia: Lumby, Nicholls 7708
41. <i>L. littoralis</i>	British Columbia: Vancouver, Nicholls 7701
42. <i>L. longifolius</i>	California: Los Angeles Co., Nicholls 8235
43. <i>L. parviflorus</i>	Nevada: Elko Co., Nicholls 7834
44. <i>L. polycarpus</i>	California: Sonoma Co., Nicholls 8264
45. <i>L. polyphyllus</i>	Oregon: Klamath Co., Nicholls 7803
46. <i>L. ruber</i>	California: Modoc Co., Nicholls 7810
47. <i>L. sericeus</i> var. <i>sericeus</i>	Oregon: Union Co., Nicholls 7877
48. "	Montana: Teton Co., Nicholls 7859
49. "	Montana: Teton Co., Nicholls 7860
50. "	Montana: Park Co., Nicholls 7854
51. "	Montana: Cascade Co., Nicholls 7858
52. "	Montana: Lincoln Co., Nicholls 7862
53. "	Washington: Garfield Co., Nicholls 7872
54. <i>L. sericeus</i> var. <i>egglestonianus</i>	British Columbia: Wardner Co., Nicholls 7907
55. "	Idaho: Fremont Co., Nicholls 7851
56. "	Washington: Okanogan Co., Nicholls 7881
57. "	Montana: Gallatin Co., Nicholls 7853
58. <i>L. sericeus</i> var. <i>flexuosus</i>	Idaho: Adams Co., Nicholls 7874
59. "	Idaho: Boise Co., Nicholls 7835
60. "	Idaho: Boise Co., Nicholls 7836
61. "	Idaho: Bannock Co., Nicholls 7841
62. "	Idaho: Boundary Co. Nicholls 7863
63. "	Idaho: Kootenai Co., Nicholls 7867
64. "	Idaho: Nez Perce Co., Nicholls 7873
65. "	Washington: Yakima Co. Nicholls 7879
66. "	Washington: Douglas Co. Nicholls 7882
67. "	British Columbia: Fruitvale, Nicholls 7905
68. "	Montana: Meagher Co. Nicholls 7855
69. "	Montana: Meagher Co. Nicholls 7855
70. "	Montana: Flathead Co., Nicholls 7861
71. <i>L. sericeus</i> ssp. <i>huffmanii</i>	Arizona: Coconino Co., Nicholls 7825
72. "	Utah: Garfield Co., Nicholls 7827
73. "	Utah: Piute Co., Nicholls 7829
74. "	Utah: Sevier Co., Nicholls 7828
75. "	Utah: Carbon Co., Nicholls 7831

Homogenats wurden anschließend auf eine "Extrelutsäule" der Firma E. Merck, Darmstadt, aufgetragen und mit 80 ml Dichlormethan eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und vor der Analyse mit 100-300 µl Methanol aufgenommen.

2.3. GC/MS-Kopplung

Die Analyse erfolgte mit einem GC/MS System, bestehend aus einem Carlo Erba 5160 Gaschromatographen, der mit dem Quadrupolmassenspektrometer MAT 4515 der Firma Finnigan direkt gekoppelt war. Die Trennung erfolgte auf einer 30 m x 0.32 mm Fused-Silica-Kapillarsäule, beschichtet mit der stationären Methylsilikonphase DB-1 (J&W Scientific, California). Helium wurde als Trägergas eingesetzt. Trennbedingungen: Injektor 250 °C, Split 1:20; Temperaturprogramm 150-300 °C, 6 °C/min, bei 300 °C isotherm.

El-Spektren wurden bei 40 eV in Kombination mit dem INCOS-Datensystem (Finnigan) aufgenommen. Die Retentionsindices der Alkaloide wurden nach der Methode von WEHRLI & KOVATS ermittelt.

2.4. Kapillar-Gas-Flüssig-Chromatographie

Quantitative Messungen wurden an einem Chrompack 438A Gaschromatographen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Phosphor-Stickstoff Detektor (PND). Bedingungen: Säule 10 m Quarzkapillarsäule belegt mit CP-SIL 5CB; Carriergas und Injektor wie unter GC/MS-Kopplung beschrieben; Detektortemperatur: 300 °C; Temperaturprogramm 150-280 °C, 20 °C/min, bei 280 °C isotherm. Die Peakflächen wurden elektronisch integriert und die prozentualen Anteile der Einzelkomponenten bezüglich der Gesamtflächen summe berechnet. Flächenkorrekturfaktoren wurden dabei wegen fehlender Eichsubstanzen nicht berücksichtigt. Spartein und Lupanin wurden als externe Standards eingesetzt.

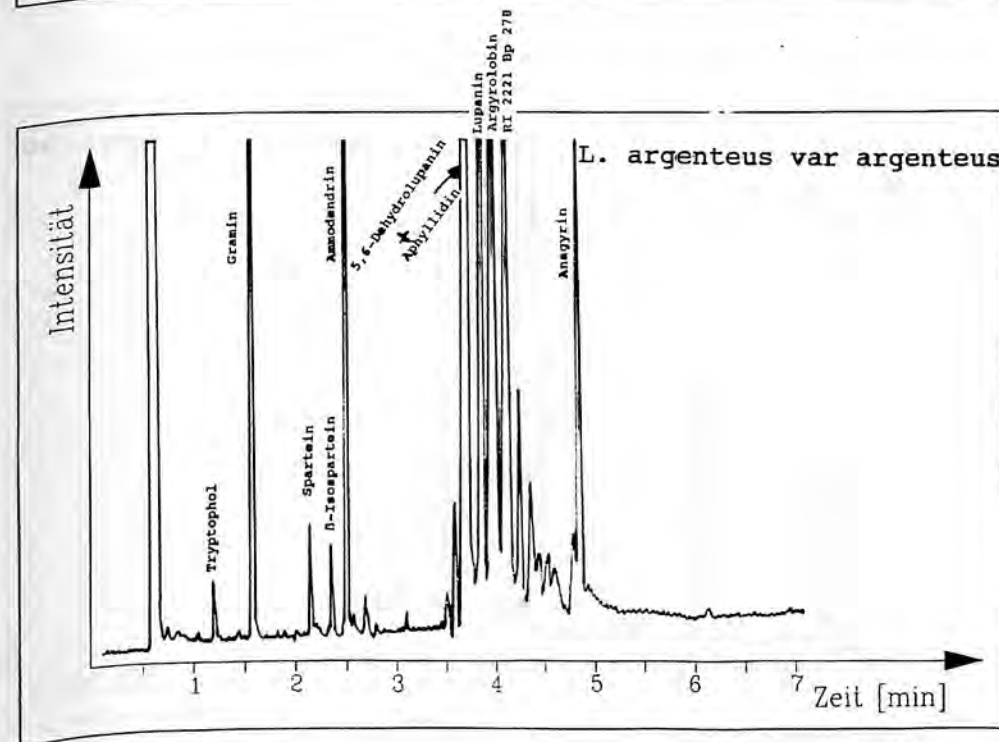
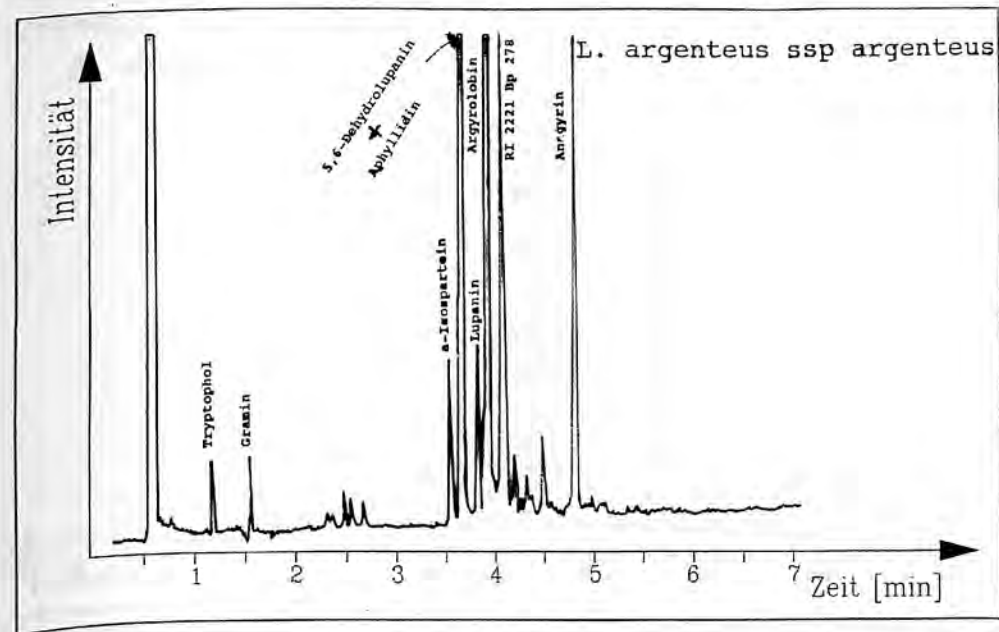
3. ERGEBNISSE

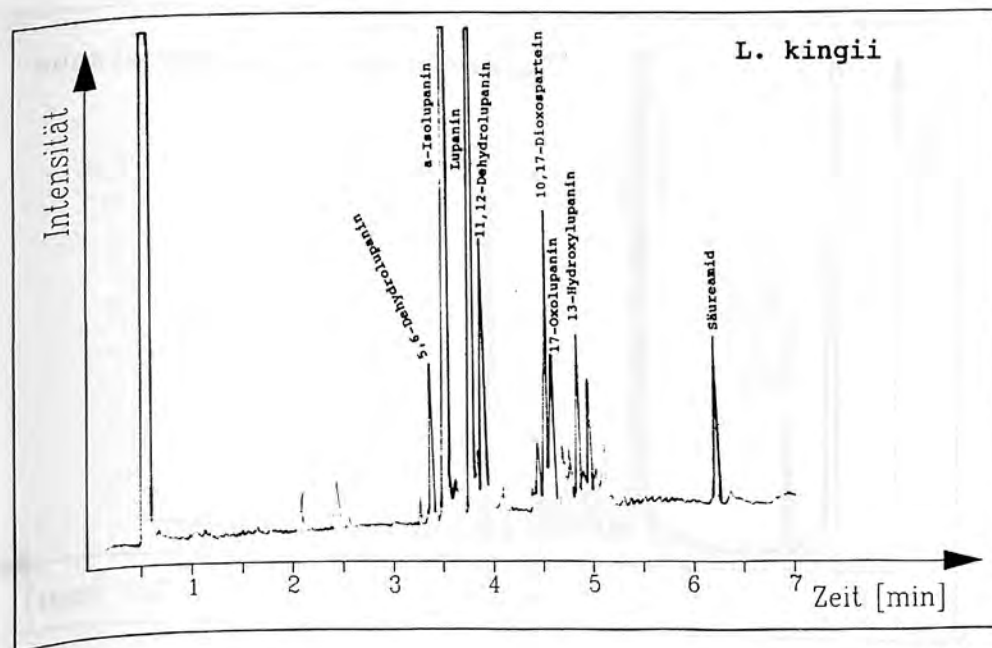
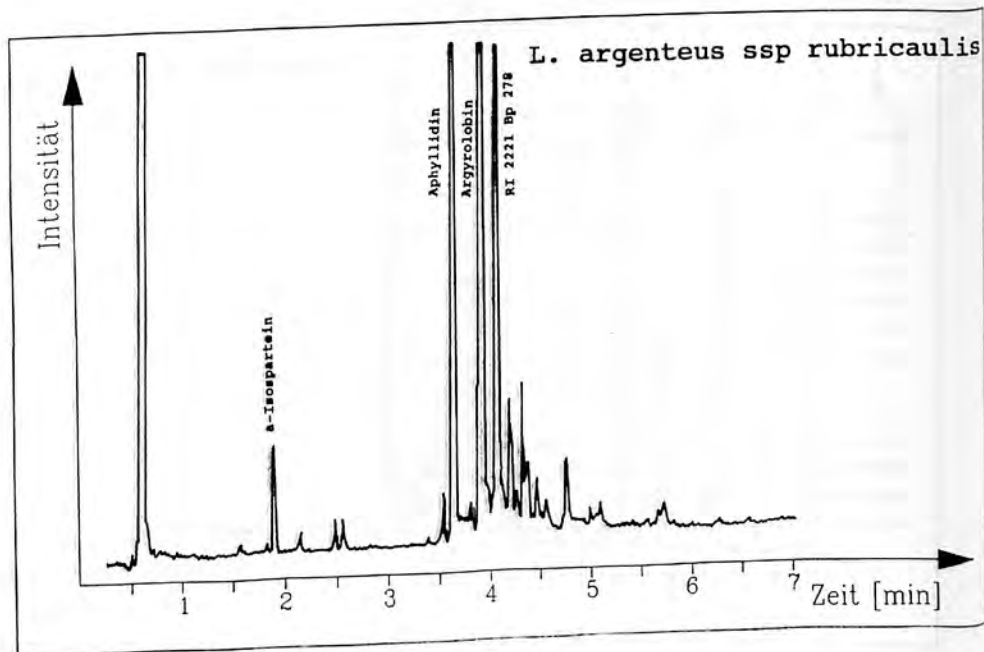
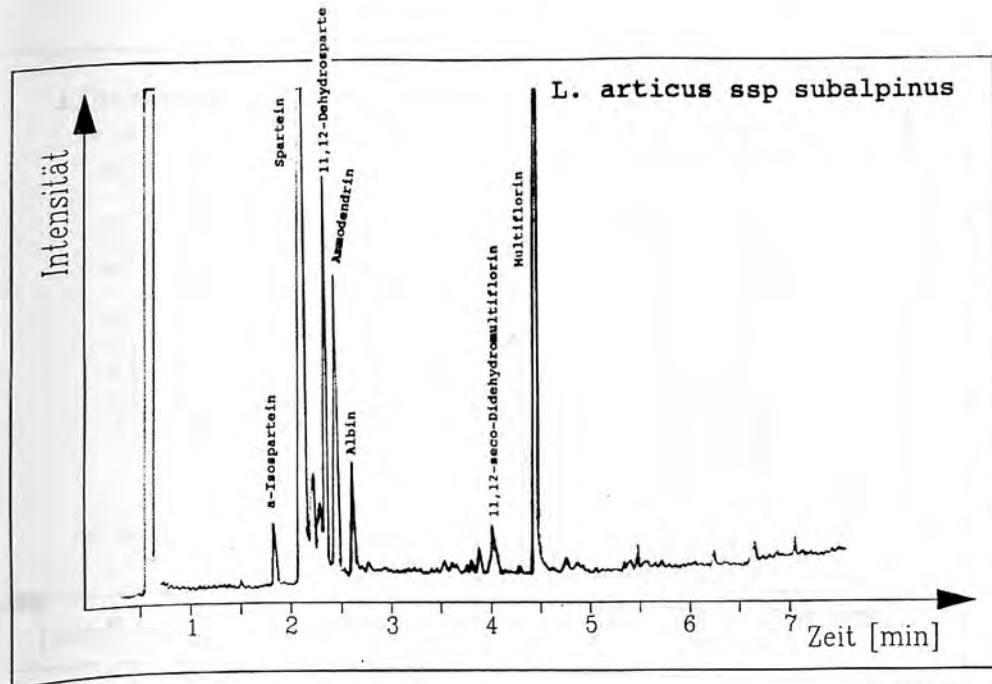
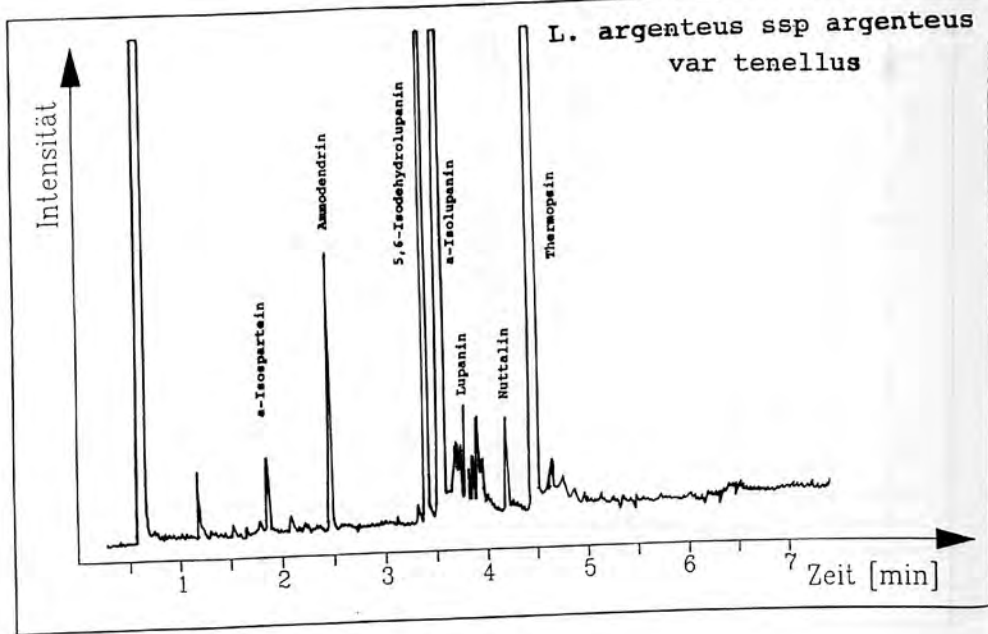
Die Alkaloidextrakte von 75 Lupinen aus 31 Arten wurden mit Kapillar-GLC und GLC-MS untersucht. In Abb.1 sind die Gaschromatogramme von *L. arcticus ssp. subalpinus*, *L. kingii*, *L. argenteus ssp. argenteus*, *L. argenteus var. argenteus*, *L. argenteus var. tenellus*, *L. argenteus var. rubricaulis*, *L. andersonii* und *L. excubitus var. astromontanus* exemplarisch dargestellt.

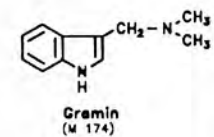
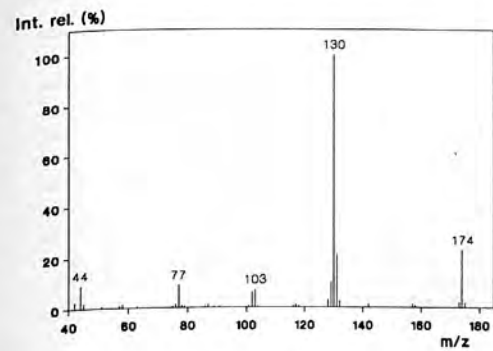
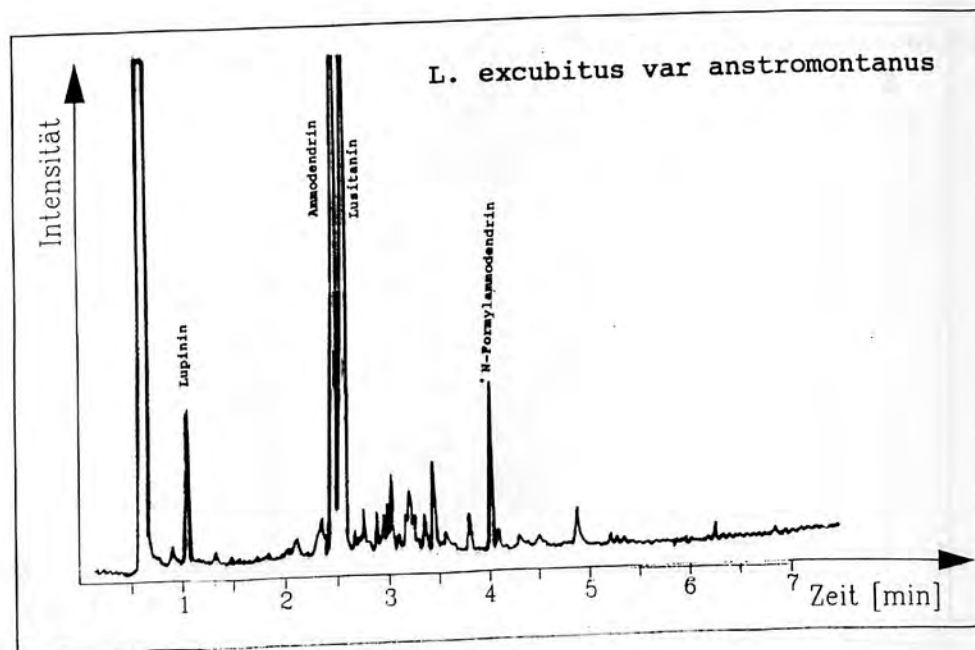
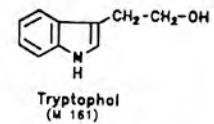
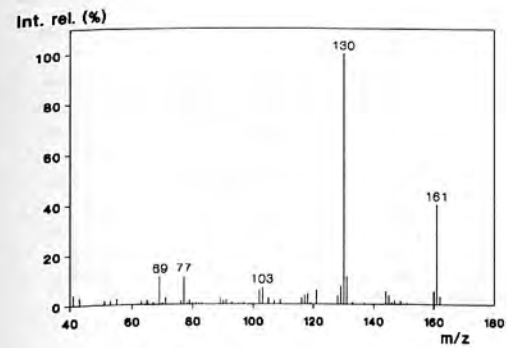
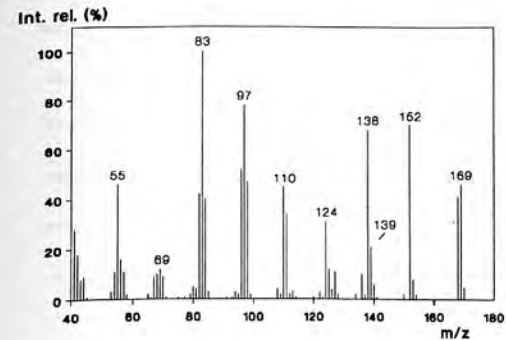
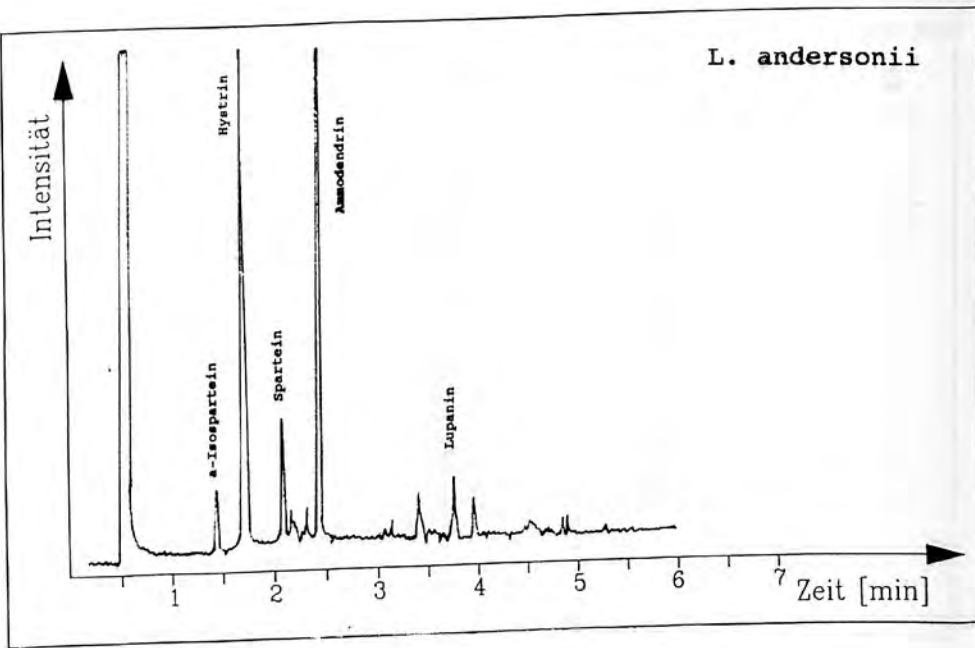
Die GC/MS-Analyse der nordamerikanischen Lupinen ergab weit über 200 unterschiedliche Alkaloide (Tab.4), von denen mehr als ein Drittel eindeutig über die Retentionsindizes und zugehörigen Massenspektren identifiziert werden konnte (Übersicht: WINK 1992).

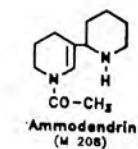
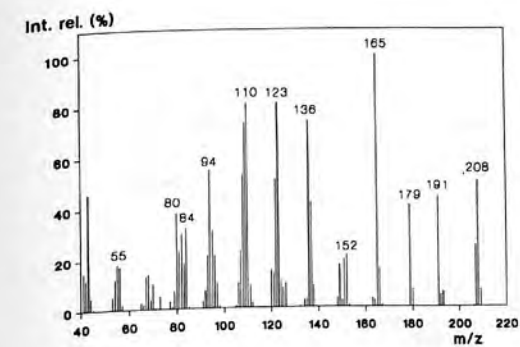
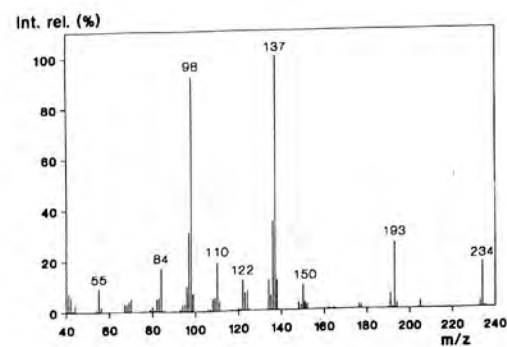
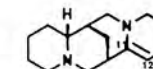
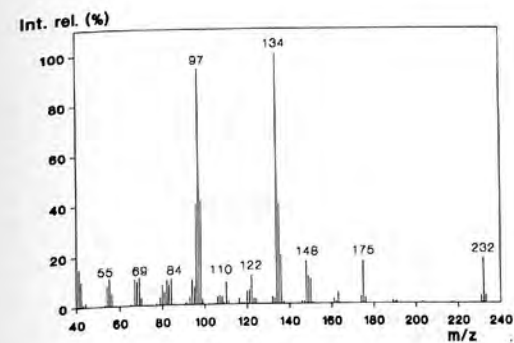
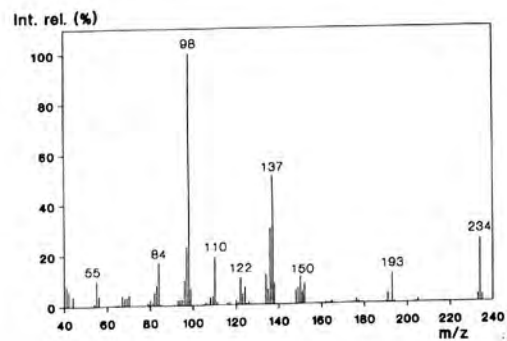
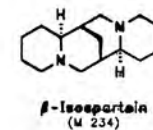
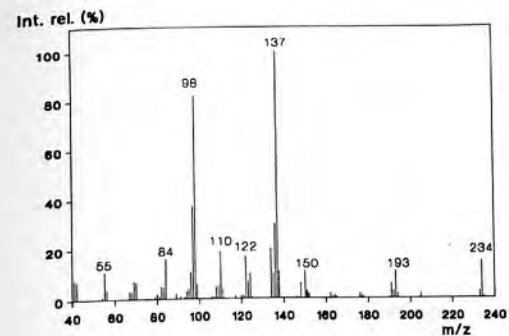
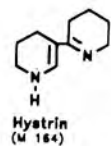
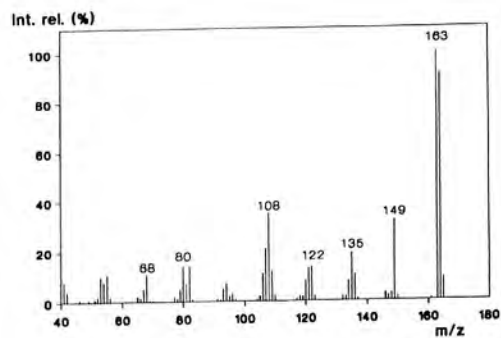
Bei den gefundenen und zur Klassifizierung verwendeten Alkaloiden handelte es sich größtenteils um Pflanzenstoffe, die chemisch in der Gruppe der Bis-Chinolizidine (s. Formelübersicht) zusammengefaßt werden. Abgesehen von den seltener vorkommenden bicyclischen Chinolizidinen Lupinin und Lusitanin sind die meisten Chinolizidinalkaloide tri- oder tetracyclischer Natur. In der Formelübersicht ist jeweils nur ein Enantiomer dargestellt. Welches Enantiomer in den Proben vorhanden war, läßt sich mit der angewandten Methode nicht aufklären, jedoch konnten Diastereomere wie z.B. das Spartein von den anderen Diastereomeren α -Isospartein und β -Isospartein auf der Säule getrennt und detektiert werden. Eine Unterscheidung ist über ihren Retentionsindex möglich.

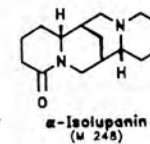
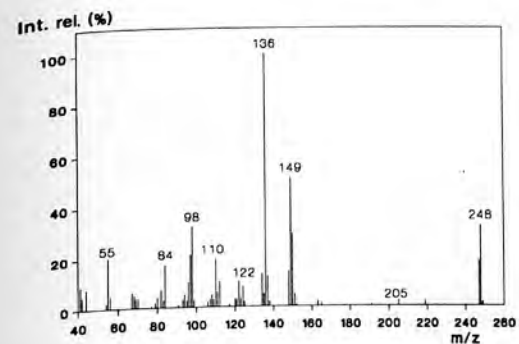
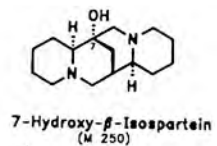
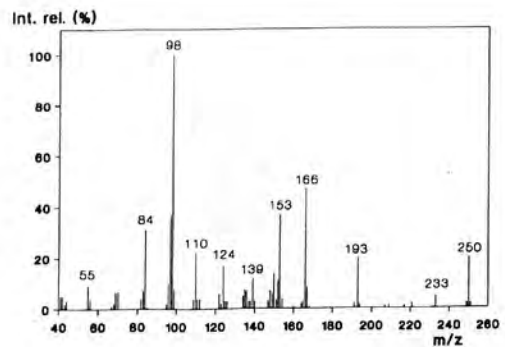
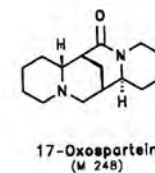
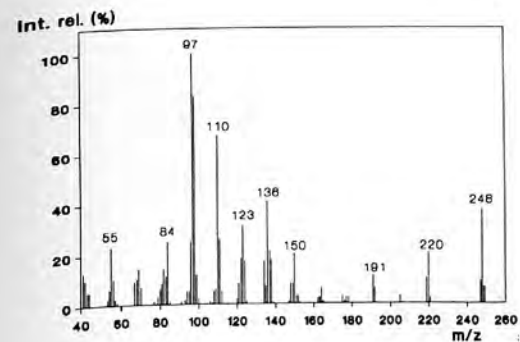
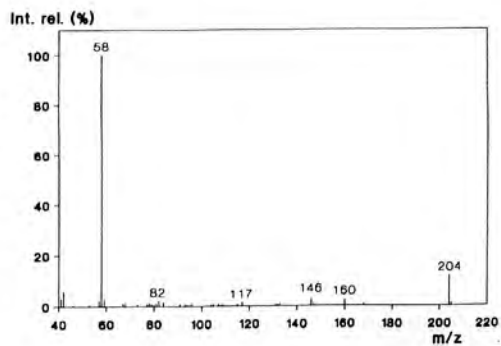
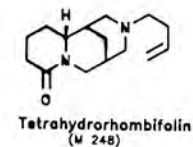
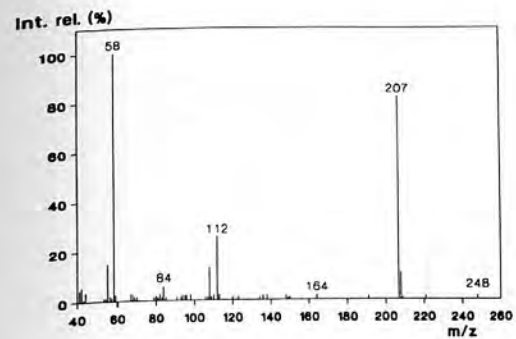
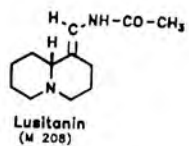
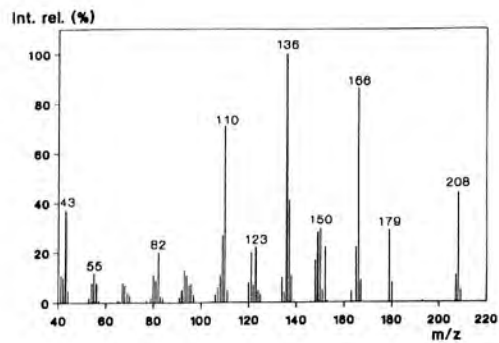
Bei den untersuchten nordamerikanischen Lupinen stellte sich Lupanin als das am weitesten verbreitete Alkaloid heraus (Tab.2 und 3). Aber auch Anagryrin und Ammodendrin waren vergleichsweise häufig in der Gattung vertreten. Seltener vorkommende Alkaloide waren beispielsweise das Lusitanin, das Multiflorin und das N-Methylcytisin. Letzteres wurde in *L. densiflorus* und *L. ruber* jeweils in Verbindung mit Anagryrin gefunden, mit dem es biogenetisch in Zusammenhang steht.

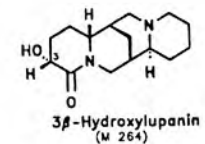
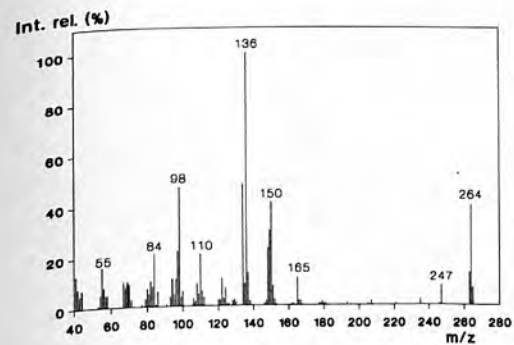
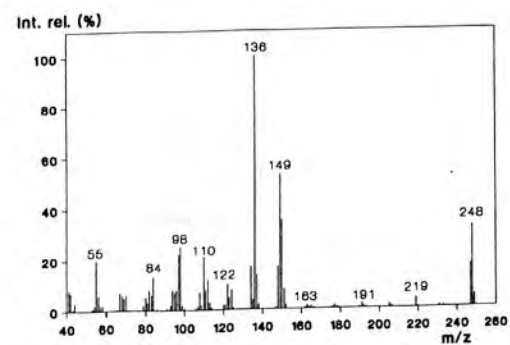
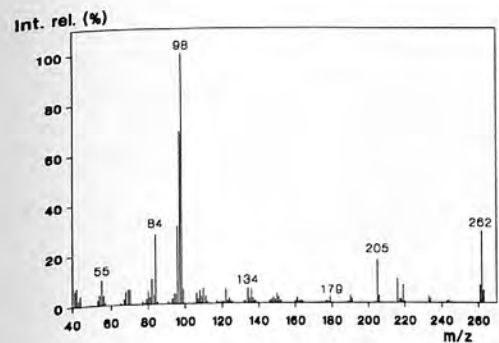
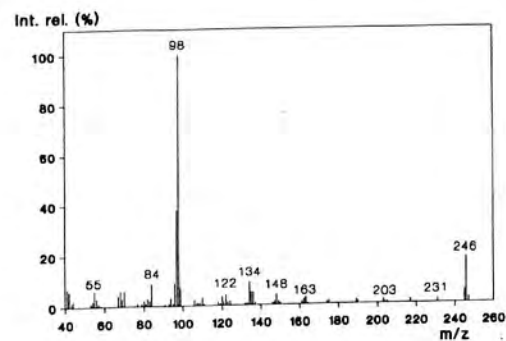
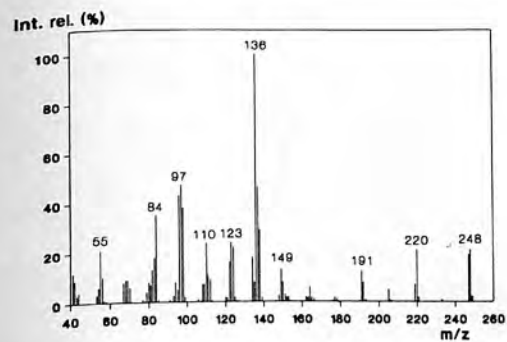
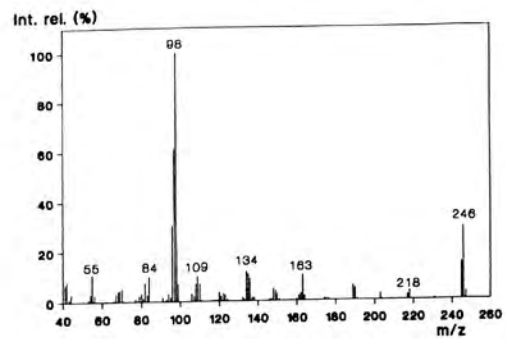


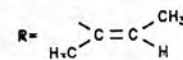
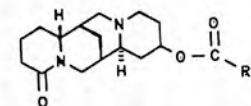
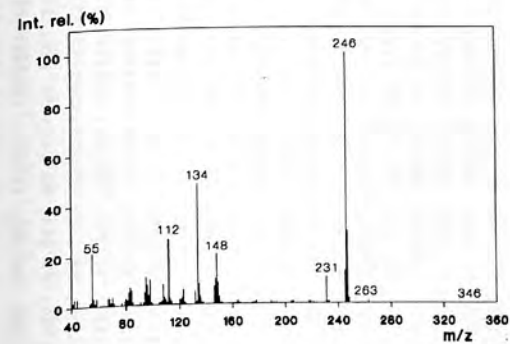
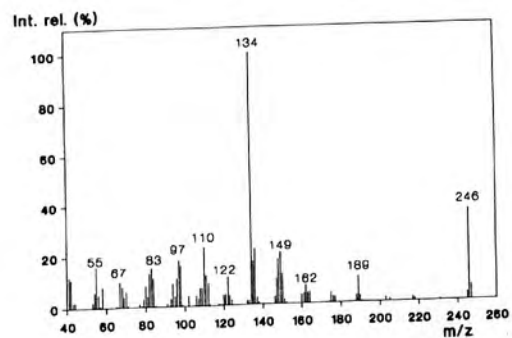
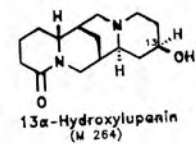
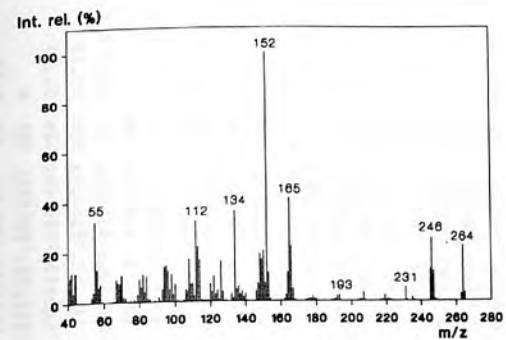
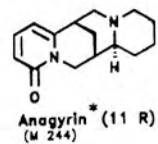
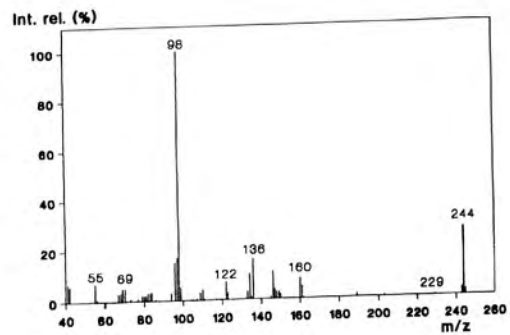




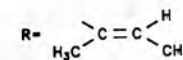








13-Angeloyl-Oxylupanine (M 348)



13-Tigloyl-Oxylupanine (M 348)

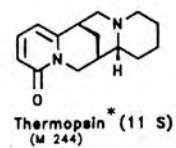
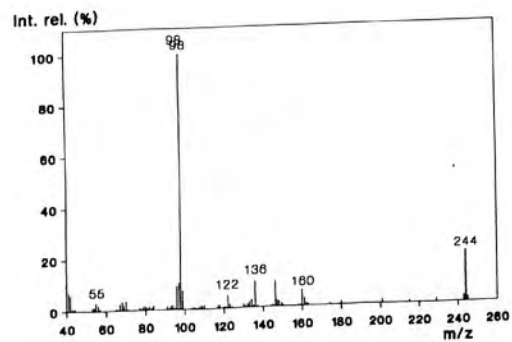


Tabelle 4:

Identifizierung von Lupinenalkaloiden über GC/MS-Kopplung (EI, 40 eV)*

Tabellarische Auflistung der gefundenen Alkaloidmassenspektren

RI	Substanz	M+	7 ausgewählte Peaks incl. Intensitäten	Bsp. Lit.
1335	skatol (3-Methylindol)	131	130(100) 131(64) 77 (18) 65 (13) 103(12) 102(8)	21 1
1360	n.i.	138(100) 83 (81) 95 (54) 109(39) 193(31) 124(29) 180(22)		62
1416	Epi-Lupinin	169 83 (100) 97 (78) 152(74) 138(69) 98 (45) 96 (35) 139(11) 29		14,15,11
1422	Lupinin	169 83 (100) 97 (78) 152(70) 96 (53) 98 (48) 138(68) 139(21) 29		11,17,3
1514	n.i.	58 (100) 44 (50) 154(47) 96 (26) 82 (20) 126(16) 205(5) 24		
1527	n.i.	160(100) 159(86) 104(52) 131(48) 145(25) 1		
1580	Tryptophol	161 130(100) 161(40) 69 (12) 77 (10) 131(11) 144(5) 118(4) 17		4
1600	Smipin	180 109(100) 96 (62) 107(28) 151(26) 112(24) 122(10) 180(2) 27		17
1605	n.i.	208 136(100) 83 (57) 110(35) 149(23) 150(21) 97 (19) 208(6) 27		
1620	Gramin	174 130(100) 174(23) 131(21) 77 (10) 44 (8) 103(7) 102(6) 17		9,17
1635	n.i.	226 98 (100) 84 (41) 97 (19) 58 (12) 226(4) 128(8) 99 (8) 27		
1637	Indolesäure	175 130(100) 175(31) 118(18) 131(12) 103(8) 91 (5) 77 (9) 21		4
1663	Hystrin	164 163(100) 164(91) 108(35) 149(32) 107(22) 135(20) 122(15) 1		6
1710	α -Isosparteïn	234 98 (100) 137(55) 136(29) 234(28) 110(19) 193(12) 84 (18) 53		14,11,17
1734	n.i.	206 122(100) 121(92) 136(75) 135(71) 181(59) 168(48) 206(17) 59		
1785	Sparteïn	234 137(100) 98 (94) 193(25) 110(19) 234(17) 84 (15) 122(12) 16		17,7,3,15,10
1795	n.i.	110(100) 111(62) 152(58) 170(35) 96 (31) 125(23) 193(2) 52		
1803	N-Methyl-Tetrahydrocycytisin	208 96 (100) 109(82) 58 (28) 94 (19) 135(16) 208(14) 84 (13) 45		14
1805	Dehydrosparteïn	232 97 (100) 134(53) 98 (52) 232(42) 96 (42) 122(38) 148(19) 53		
1810	Dehydrosparteïn	232 134(100) 98 (99) 97 (63) 232(51) 148(29) 175(26) 122(18) 66		
1820	Dehydrosparteïn	232 98 (100) 134(95) 232(62) 148(30) 189(25) 122(23) 110(19) 66		
1822	N-Methyl-Ammodendrin	222 98 (100) 96 (71) 150(57) 222(51) 137(47) 70 (46) 122(32) 27		11,6
1825	β -Isosparteïn	234 137(100) 98 (82) 97 (37) 193(12) 234(14) 150(13) 110(19) 53		11,17
1840	11,12-Dehydrosparteïn	232 134(100) 97 (93) 98 (42) 96 (40) 232(30) 148(17) 175(16) 30		11,17
1842	Dehydroammodendrin	206 163(100) 206(52) 107(63) 106(60) 80 (37) 121(36) 135(35) 27		6
1843	Tetrahydrocycytisin	194 95 (100) 82 (42) 194(17) 44 (17) 94 (17) 113(15) 150(6) 35		4,10
1853	n.i.	232 136(100) 96 (38) 134(32) 110(22) 232(19) 148(15) 135(15) 47		
1857	Dihydrocycytisin	192 95 (100) 82 (95) 94 (72) 80 (64) 192(43) 112(21) 137(10) 35		
1858	Dehydrosparteïn	232 98 (100) 232(41) 134(38) 97 (34) 84 (31) 137(27) 122(17) 66		
1865	Ammodendrin	208 165(100) 110(82) 123(82) 136(75) 94 (56) 208(51) 191(45) 69		17,11,6,10
1868	Dihydrocycytisin	192 192(100) 95 (94) 94 (65) 68 (32) 67 (32) 112(26) 150(23) 35		
1875	Lusitanin	208 136(100) 166(88) 110(72) 208(45) 137(42) 179(30) 150(29) 42		5,10
1877	n.i.	208 97 (100) 83 (62) 208(26) 96 (24) 98 (22) 136(8) 224(2) 9		
1883	Dehydrosparteïn	232 98 (100) 232(42) 134(41) 96 (38) 137(36) 97 (32) 84 (21) 73		
1885	n.i.	97 (100) 96 (71) 83 (53) 98 (48) 194(42) 112(20) 136(18) 14		
1900	Albin	232 191(100) 110(70) 122(49) 149(45) 120(22) 232(21) 80 (20) 6		17
	n.i.	84 (100) 99 (8) 141(7) 112(2) 56 (2) 154(1) 224(1) 27		
1911	n.i.	97 (100) 96 (69) 83 (52) 194(43) 98 (42) 136(23) 110(20) 67		
1913	n.i.	230 96 (100) 97 (30) 230(18) 146(11) 133 (8) 229(7) 173(5) 42		
1918	7-Hydroxy-Sparteïn	250 98 (100) 166(31) 84 (28) 153(27) 110(18) 193(10) 250(9) 42		14,7
1927	n.i.	84 (100) 59 (32) 72 (10) 99 (5) 141(5) 208(2) 27		
1932	Dehydroammodendrin	206 163(100) 206(48) 108(21) 135(12) 205(12) 122(11) 120(9) 27		6
1940	n.i.	230 134(100) 97 (90) 230(49) 96 (48) 82 (33) 229(29) 84 (26) 3		
1942	n.i.	84 (100) 97 (33) 96 (23) 126(19) 98 (16) 208(3) 180(3) 27		
1948	Hydroxysparteïn	250 98 (100) 84 (34) 110(32) 193(29) 250(13) 124(13) 166(11) 73		14
1950	n.i.	84 (100) 58 (17) 141(12) 99 (3) 224(2) 122(2) 112(2) 27		
1952	N-Methylcycytisin	204 58 (100) 204(13) 146(5) 160(3) 82 (3) 96 (2) 117(2) 24		17,3,11,10
	n.i.	110(100) 55 (38) 123(31) 98 (26) 193(24) 124(25) 80 (23) 35		
1965	n.i.	100(100) 83 (24) 109(18) 97 (13) 122(12) 224(4) 165(5) 27		
1966	7-Hydroxy- β -Isosparteïn	250 98 (100) 166(31) 84 (30) 153(26) 110(22) 124(15) 250(12) 57		14,7
1970	n.i.	84 (100) 99 (8) 141(8) 85 (7) 56 (4) 97 (4) 154(2) 27		
	Hydroxysparteïn	250 97 (100) 83 (47) 85 (41) 69 (29) 109(21) 136(12) 250(11) 9		14
1977	n.i.	246 58 (100) 205(77) 44 (46) 162(23) 98 (12) 120(7) 246(2) 35		
1980	Retamin (12-Hydroxysparteïn)	250 98 (100) 207(78) 153(68) 136(61) 97 (52) 114(51) 250(16) 66		14,11,17
1985	Oxosparteïn	248 98 (100) 111(36) 248(12) 150(11) 122(11) 84 (10) 164(6) 42		14
1987	Oxosparteïn	248 98 (100) 96 (41) 248(32) 110(29) 97 (23) 122(22) 150(10) 73		14
1989	Hydroxysparteïn	250 98 (100) 137(55) 153(52) 97 (42) 193(40) 110(38) 250(21) 53		14
1990	Cytisin	190 146(100) 147(60) 190(47) 160(22) 134(25) 148(27) 82 (16) --		14,17,10
1992	Hydroxy-N-Methylcycytisin	220 58 (100) 136(19) 220(8) 93 (4) 146(3) 138(3) 162(2) 24		14
1998	Oxosparteïn	248 97 (100) 98 (58) 191(57) 96 (37) 248(29) 148(18) 165(14) 42		14

2000 n.i.	83 (100) 125(97) 84 (88) 126(62) 112(26) 138(18) 238(2)	27
Hydroxypartein	250 153(100) 114(71) 98 (45) 136(36) 209(26) 110(20) 250(17)	26 14
2002 Hydroxypartein	250 137(100) 98 (88) 153(40) 114(33) 209(22) 250(19) 122(12)	48 14
2005 Oxopartein	248 98 (100) 134(91) 136(77) 112(69) 110(58) 248(55) 122(38)	3 14
2016 Oxopartein	248 98 (100) 150(88) 97 (58) 96 (48) 124(12) 205(11) 248(3)	53 14
2020 Hydroxy-N-Methylcytisin	220 58 (100) 219(58) 109(25) 108(18) 94 (9) 70 (8) 220(6)	24
2022 Dehydro-Oxopartein	246 98 (100) 97 (75) 96 (44) 246(32) 163(12) 135(11) 84 (11)	53
2030 Isoangustifolin	234 193(100) 112(49) 150(16) 55 (11) 94 (11) 234(5) 136(3)	38 17
2-Dehydrovirgiboidin	246 205(100) 96 (19) 58 (17) 82 (13) 134(3) 162(2) 246(2)	--
2032 Hydroxy-Oxopartein	264 98 (100) 97 (67) 150(35) 249(32) 84 (27) 263(18) 264(11)	5
2038 Oxopartein	248 111(100) 96 (75) 98 (54) 97 (29) 122(24) 248(15) 150(12)	42 14
2042 Epiaphyllidin	248 123(100) 134(46) 98 (31) 84 (21) 248(18) 96 (18) 150(5)	3 14
2048 Dehydrooxopartein	246 98 (100) 246(55) 134(18) 149(18) 218(10)	-- 14, 17
2050 Tetrahydrohombifolin	246 136(100) 98 (98) 97 (73) 137(62) 69 (31) 84 (22) 246(1)	54 14
2054 Hydroxy-Spartein	248 58 (100) 207(83) 112(26) 108(13) 84 (5) 148(2) 248(<1)	53 17, 11, 15
2055 Angustifolinisomer	250 137(100) 98 (69) 153(57) 114(32) 250(19) 122(12) 209(12)	48 14
2057 n.i.	234 94 (100) 193(30) 100(8) 150(3) 134(2) 122(2) 84 (6)	26
2060 Epiaphyllin	232 97 (100) 98 (67) 84 (23) 232(21) 136(11) 67 (13) 117(11)	23
2063 n.i.	248 136(100) 137(51) 96 (38) 97 (35) 220(34) 247(29) 248(28)	54 14, 17, 12, 11
2070 17-Oxopartein	58 (100) 205(93) 110(35) 206(11) 96 (8) 117(8) 108(8)	28
2073 5,6-Dehydro- α -isolupanin	248 97 (100) 98 (83) 110(68) 136(42) 248(37) 150(20) 220(19)	72 17, 12, 3, 11
2074 n.i.	246 98 (100) 97 (52) 246(21) 84 (11) 134(7) 148(4) 163(3)	32 14, 17, 11
2080 Camoensidin	254 84 (100) 141(64) 99 (62) 114(39) 154(1) 164(1) 224(1)	27
2082 n.i.	234 122(100) 135(65) 136(55) 234(52) 233(44) 84 (52) 96 (41)	33 16
2092 n.i.	234 136(100) 98 (50) 97 (42) 234(33) 233(23) 110(22) 84 (21)	2
2097 n.i.	234 193(100) 112(85) 150(18) 44 (20) 55 (20) 94 (11) 122(3)	35 17, 3, 15, 11
2105 α -Isolupanin	224 207(100) 109(48) 108(42) 165(46) 224(40) 179(37) 152(35)	27
2118 Dehydro-Oxopartein	98 (100) 246(72) 97 (63) 134(49) 148(40) 278(17) 263(9)	33
2125 Aphyllidin	248 136(100) 149(52) 248(33) 98 (32) 150(31) 110(19) 84 (16)	3 14, 17, 12, 3, 15, 11
2123 Oxopartein	246 134(100) 84 (52) 81 (43) 119(39) 95 (31) 191(18) 178(15)	42
2128 5,6-Dehydrocolupanin	112(100) 84 (25) 101(12) 56 (10) 86 (10) 128(3) 240(1)	27
	246 98 (100) 97 (62) 96 (31) 246(29) 134(12) 109(11) 163(11)	37 14, 17, 2, 13, 11
	248 149(100) 136(99) 150(64) 248(45) 98 (34) 110(33) 94 (31)	35 14
	246 98 (100) 97 (38) 246(20) 134(11) 84 (10) 110(5)	52 14, 17, 11, 13, 10

2130 Dehydrocolupanin	246 136(100) 150(77) 134(65) 246(58) 110(42) 98 (38) 84 (38)	65 14
2132 Dehydrocolupanin	246 134(100) 136(92) 148(61) 246(51) 149(33) 84 (30) 110(23)	51 14
2134 n.i.	246 97 (100) 98 (81) 246(42) 244(26) 135(14) 136(13) 148(10)	31
2138 Hydroxy-Tetrahydrohombifolin	264 223(100) 58 (86) 108(56) 96 (21) 128(18) 100(9) 264(<1)	2
2146 n.i.	278 97 (100) 98 (81) 136(31) 149(28) 122(28) 278(15) 191(22)	42
2150 Hydroxylupanin	264 98 (100) 97 (86) 96 (70) 246(37) 136(22) 84 (22) 264(2)	43
2153 n.i.	262 98 (100) 96 (70) 97 (18) 262(17) 84 (10) 150(6) 136(4)	36
2155 Rhombifolin	244 58 (100) 203(80) 160(15) 146(10) 98 (8) 244(2)	25 17, 3, 10
n.i.	262 221(100) 55 (70) 124(58) 136(36) 262(35) 110(24) 178(20)	35
2165 Lupanin	248 136(100) 149(52) 98 (28) 150(34) 248(32) 110(12) 84 (12)	38 17, 7, 12, 13, 3, 15
2166 n.i.	276 98 (100) 97 (60) 276(45) 96 (32) 216(24) 245(12) 161(12)	31
2168 Hydroxy-Tetrahydrohombifolin	264 223(100) 58 (48) 112(13) 124(9) 98 (2) 164(2) 264(<1)	35
Hydroxyangustifolin	250 209(100) 128(26) 44 (23) 100(16) 94 (11) 166(6) 250(<1)	33
2177 n.i.	138(100) 98 (48) 236(43) 84 (42) 166(35) 246(18) 264(2)	33
2180 Aphyllin (10-Oxopartein)	248 136(100) 137(48) 97 (48) 96 (44) 84 (35) 220(22) 248(21)	18 14, 17, 12, 13, 11
2182 Oxopartein	248 97 (100) 98 (82) 110(65) 136(50) 248(33) 123(31) 220(15)	73
2185 Argyrolobin	262 98 (100) 97 (68) 96 (32) 262(30) 84 (28) 205(18) 134(6)	36 2
2188 Dehydro-Oxopartein	246 136(100) 110(59) 84 (52) 134(49) 148(42) 246(36) 245(32)	15
2190 11,12-Dehydrocolupanin	246 134(100) 246(67) 148(39) 55 (27) 231(18) 112(18) 108(15)	32 3, 17
2192 n.i.	264 98 (100) 97 (80) 112(51) 84 (32) 264(22) 125(19) 166(12)	72
2195 n.i.	246 84 (100) 246(12) 110(11) 160(5) 132(2) 148(2) 217(1)	18
2200 Oxolupanin	264 98 (100) 97 (16) 264(5) 84 (7) 110(3) 138(2) 218(1)	42
2210 N-Formylammodendrin	236 218(100) 175(67) 176(49) 122(35) 150(33) 82 (30) 236(6)	27 10
Lampolobin	264 138(100) 83 (66) 97 (56) 110(53) 152(43) 264(21) 222(11)	-- 17, 3
2213 Hydroxy-Oxopartein	262 97 (100) 136(73) 262(51) 134(45) 150(41) 84 (40) 110(21)	62 14
2214 n.i.	100(100) 58 (69) 207(33) 110(24) 223(23) 152(20) 267(7)	35
2216 11,12-seco-12,13-didehydromultiflorin (früher N-Methylalbin)	246 58 (100) 205(50) 94 (27) 110(13) 246(7) 134(6) 98 (6)	53 17
Cytisin-12-carboxy-ethylester	262 146(100) 262(48) 190(12) 160(19) 217(10)	-- 8
2220 N-Acetylammodendrin	250 189(100) 232(73) 207(46) 165(38) 122(37) 84 (36) 250(2)	27 6
2221 n.i.	278 98 (100) 96 (58) 84 (31) 97 (19) 278(11) 136(2) 221(2)	37
2222 n.i.	278 136(100) 218(57) 98 (37) 97 (29) 134(22) 246(13) 278(9)	31
n.i.	276 98 (100) 96 (65) 84 (23) 97 (20) 276(15) 69 (7)	37
2223 n.i.	264 98 (100) 97 (23) 124(21) 96 (13) 152(11) 164(7) 264(6)	35

2226	Dehydro-Oxopartein	246 136(100)	246(93)	96 (60)	98 (40)	134(40)	122(18)	164(12)	31 14
2228	Tincturin	244 203(100)	146(16)	58 (13)	160(10)	94 (7)	172(2)	244(1)	-- 17
2230	n.i.	246 97 (100)	98 (95)	246(61)	136(42)	82 (28)	108(27)	217(26)	8 14
2235	n.i.	264 98 (100)	152(52)	110(43)	264(35)	124(33)	150(28)	166(25)	35
2238	Dehydro-Oxopartein	246 134(100)	246(34)	96 (19)	148(18)	97 (18)	132(10)	231(4)	62 14
2240	11-Allylcytisin n.i.	230 189(100)	146(30)	84 (13)	230(7)	160(10)	134(5)	122(5)	-- 17
2245	n.i.	262 84 (100)	150(29)	98 (21)	110(17)	245(14)	262(7)	134(13)	33
2246	Hydroxy-Tetrahydrohombifolin	262 166(100)	84 (99)	110(88)	152(84)	98 (72)	262(69)	124(32)	47
2247	Dehydro-Oxopartein	264 58 (100)	223(72)	108(13)	128(12)	110(11)	224(8)	94 (8)	28
2248	Hydroxy-Oxopartein	262 136(100)	97 (89)	99 (52)	96 (46)	134(32)	262(22)	219(21)	40
2250	3 β -Hydroxylupanin (früher angenommen als Nuttalin=4-Hydroxylupanin)	246 136(100)	97 (39)	218(38)	84 (21)	246(12)	122(11)	110(10)	18 14
2250	3 β -Hydroxylupanin	264 98 (100)	97 (82)	96 (70)	136(49)	246(50)	84 (24)	264(13)	8
2260	n.i.	264 136(100)	264(41)	134(48)	150(41)	98 (38)	110(22)	84 (21)	3 18,17,3
	Hydroxylupanin	250 97 (100)	96 (66)	83 (39)	84 (27)	250(17)	122(10)	277(2)	11
2264	n.i.	264 134(100)	136(87)	97 (39)	98 (30)	150(30)	264(24)	148(17)	3
2265	n.i.	98 (100)	263(52)	97 (35)	150(25)	246(18)	277(3)	278(4)	62
2266	n.i.	264 98 (100)	134(52)	136(39)	148(18)	150(16)	264(14)	110(11)	53
2265	n.i.	264 131(100)	162(95)	103(29)	161(26)	263(14)	205(9)	264(6)	35
2266	n.i.	262 110(100)	134(28)	177(28)	84 (23)	97 (19)	262(18)	148(12)	65
2265	Matrin	248 248(100)	205(80)	247(75)	96 (70)	98 (64)	150(60)	137(55)	--
2272	Hydroxy-Lupanin	264 98 (100)	152(80)	84 (51)	264(42)	110(41)	150(33)	124(29)	66
2275	n.i.	262 98 (100)	97 (53)	262(45)	96 (26)	84 (19)	136(18)	122(12)	31
2277	n.i.	264 97 (100)	84 (52)	96 (48)	136(39)	134(28)	110(27)	264(23)	40
2279	n.i.	276 98 (100)	97 (65)	245(22)	96 (23)	276(18)	137(16)		11
2280	n.i.	280 98 (100)	245(10)	280(10)	84 (6)	134(5)	148(2)		51
2282	Hydroxy-Oxopartein	264 98 (100)	97 (79)	112(55)	84 (47)	125(22)	264(20)	218(8)	42
2284	n.i.	244 98 (100)	244(37)	122(8)	146(9)	160(5)	229(3)	134(3)	9
2290	Camcoensin	230 84 (100)	230(28)	82(8)	146(9)	160(5)	229(3)	134(3)	-- 16
2293	n.i.	114(100)	262(25)	190(18)	205(17)	244(14)	147(12)	136(12)	48
2293	n.i.	262 110(100)	84 (40)	150(78)	152(65)	98 (61)	96 (56)	262(32)	15
2300	n.i.	276 98 (100)	97 (42)	96 (38)	276(12)	136(8)	164(3)	261(2)	11
2300	n.i.	264 154(100)	136(72)	84 (55)	110(19)	97 (13)	124(6)	264(5)	43
2302	n.i.	207(100)	58 (31)	152(11)	154(10)	112(8)	108(7)	266(6)	38

2304 Thermopsisin

	n.i.	244 98 (100)	244(22)	97 (15)	136(13)	146(12)	160(9)	122(7)	5 17,11,3
2310	Multiflorin	262 136(100)	97 (52)	262(42)	84 (38)	110(32)	134(32)	261(27)	15
2312	n.i.	246 134(100)	246(35)	136(26)	110(22)	149(21)	97 (18)	83 (15)	6 17,15,11,5
2318	Dihydroxy-Oxopartein	248 152(100)	207(41)	58 (29)	44 (18)	112(9)	138(7)	195(4)	45
2320	N-Acetylcytisin	280 136(100)	263(43)	134(38)	98 (37)	280(29)	150(27)	84 (15)	33
2323	N-Formylangustifolisinisomer	232 146(100)	147(75)	232(40)	148(22)	160(20)	190(15)	189(10)	-- 17,10
2325	10,17 Dioxopartein	262 193(100)	94 (59)	221(46)	122(45)	84 (19)	112(18)	150(6)	26
	n.i.	262 84 (100)	150(58)	152(47)	262(47)	84 (40)	110(30)	97 (25)	32 11
	n.i.	166(100)	97 (69)	84 (55)	112(54)	138(40)	262(17)	278(6)	53
2330	N-Formylcyttisin	114(100)	262(47)	205(43)	244(38)	112(32)	149(30)	190(11)	36
2332	Hydroxy-Oxopartein	218 146(100)	218(75)	147(45)	146(30)	134(15)	190(8)	44(32)	-- 17,10
2338	Oxolupanin	264 97 (100)	98 (70)	84 (61)	166(61)	136(42)	236(27)	264(18)	62
2340	10,17-Dioxo- β -isopartein	262 150(100)	110(39)	262(32)	97 (30)	84 (28)	112(8)	234(6)	66 14
2341	n.i.	262 150(100)	84 (66)	152(48)	262(26)	124(27)	151(22)	180(5)	18 14,17,11
2345	13-Epihydroxylupanin	259(100)	98 (34)	96 (17)	150(15)	148(13)	290(6)	136(6)	5
	17-Oxolupanin	264 152(100)	165(61)	264(55)	247(23)	150(21)			-- 11
2348	n.i.	262 150(100)	110(40)	112(30)	97 (30)	262(29)	84 (28)	234(6)	3 10,14,17,3,15
2350	n.i.	166(100)	148(29)	96 (17)	82 (13)	247(12)	278(12)	112(10)	26
	Hydroxyanagrin	262 150(100)	262(82)	163(70)	112(41)	94 (37)	108(35)	245(24)	38
	Dihydroxylupanin	260 98 (100)	97 (12)	207(9)	260(9)	138(7)	150(7)	244(3)	5
2352	n.i.	280 136(100)	98 (45)	84 (43)	263(43)	110(41)	280(21)	150(36)	44
2356	n.i.	154(100)	136(44)	84 (21)	246(18)	70 (17)	205(10)	94 (12)	53
	n.i.	242(100)	134(82)	120(53)	148(43)	96 (24)	108(22)	110(22)	62
2363	N-Formylangustifolisinisomer	96 (100)	98 (77)	97 (56)	84 (29)	293(13)	309(10)	264(2)	47
2366	n.i.	262 112(100)	193(98)	221(41)	55 (28)	44 (19)	262(2)	150(15)	28
2370	Hydroxylupanin	136(100)	97 (70)	98 (58)	150(48)	110(42)	280(32)	264(18)	53
2371	Dihydroxylupanin	264 98 (100)	136(49)	97 (35)	96 (33)	207(11)	264(9)		--
2375	n.i.	280 98 (100)	96 (35)	97 (27)	84 (15)	111(10)	280(6)	150(2)	11
	Hydroxy-Oxopartein	278 166(100)	136(86)	247(62)	149(58)	263(55)	112(50)	278(40)	28
	Dioxopartein	264 136(100)	149(38)	150(30)	97 (26)	98 (24)	264(24)	110(22)	24
	Anagrin	262 150(100)	152(84)	164(44)	262(31)	134(27)	132(22)	244(18)	45 14
	Hydroxy-Oxopartein	262 114(100)	262(26)	70 (18)	162(7)				35
2382	Anagrin	244 98 (100)	244(25)	146(11)	136(11)	160(7)	122(6)		29 5,17,7,13,3,11,10
2386	Hydroxy-Oxopartein	264 152(100)	113(32)	114(15)	155(12)	264(11)	138(11)	148(10)	26

2390 n.i.	148(100)	260(62)	108(40)	82	(35)	112(23)	231(12)	122(12)	53				
2394 n.i.	114(100)	134(93)	278(39)	221(19)	150(21)	250(18)	232(17)	40					
2402 13 α -Hydroxylupanin	264	152(100)	165(41)	134(36)	112(32)	246(25)	264(22)	148(19)	15				
2406 Hydroxylupanin	264	136(100)	98	(48)	150(43)	264(41)	97	(39)	247(23)	165(21)	66		
2422 n.i.	207(100)	163(16)	165(15)	208(13)	136(8)	191(4)	308(3)	23					
2426 n.i.	207(100)	163(12)	165(13)	208(13)	123(8)	191(4)	308(3)	23					
2430 Oxolupanin	262	245(100)	150(69)	112(61)	262(53)	164(36)	124(29)	94	(21)	45	14		
2432 n.i.	259(100)	98	(25)	260(16)	148(15)	150(15)	134(11)	94	(11)	62			
2440 N-Cinnamoylhistamin Hydroxy-Oxospartein	241	94	(100)	82	(70)	131(60)	103(45)	241(20)	--	17			
2442 n.i.	264	98	(100)	97	(60)	84	(13)	122(11)	191(10)	247(7)	44		
n.i.	207(100)	205(33)	191(30)	206(29)	185(22)	163(22)	291(10)	23					
2444 n.i.	150(100)	113(40)	84	(35)	112(35)	162(23)	260(12)	262(8)	53				
2446 n.i.	97	(100)	98	(55)	96	(53)	84	(48)	136(22)	245(19)	37		
2447 n.i.	259(100)	98	(28)	148(16)	260(15)	150(13)	134(10)	122(8)	54				
2450 13 α -Acetyloxylupanin	260(100)	148(68)	112(51)	149(38)	83	(28)	150(25)	133(23)	53				
2457 n.i.	306	246(100)	134(51)	148(30)	112(39)	96	(13)	234(12)	262(1)	35			
2480 n.i.	84	(100)	219(59)	98	(41)	151(23)	96	(13)	247(71)	306(8)	--		
n.i.	148(100)	247(78)	98	(13)	84	(12)	134(11)	110(11)	261(9)	53			
2483 n.i.	98	(100)	84	(40)	150(39)	122(22)	160(18)	246(7)	221(5)	62			
2508 Dihydroxylupanin	84	(100)	98	(49)	191(35)	219(31)	96	(29)	35				
2530 n.i.	280	152(100)	280(49)	165(41)	134(34)	150(32)	263(12)	148(17)	33	17			
2541 Hydroxanagyrin	306	207(100)	206(42)	163(31)	165(28)	134(13)	291(12)	306(7)	23				
2548 n.i.	260	98	(100)	96	(32)	260(23)	84	(18)	134(17)	149(10)	122(9)	62	
2550 n.i.	136(100)	97	(96)	96	(85)	84	(47)	194(26)	285(21)	266(20)	18		
2560 Cinchonin	168(100)	112(64)	84	(48)	113(39)	138(15)	98	(12)	280(3)	53			
2558 13 α -Hydroxymultiflorin	294	136(100)	81	(19)	159(14)	130(12)	294(12)	95	(9)	253(3)	68		
2565 13 α -Propyloxylupanin	262	150(100)	262(32)	110(21)	164(13)	149(22)	82	(16)	134(12)	--	17		
2568 cinchonidin	320	246(100)	247(67)	134(48)	148(30)	112(27)	245(21)	320(7)	68				
2576 Hydroxanagyrin	294	136(100)	294(21)	81	(20)	159(13)	143(12)	253(5)	68				
2577 n.i.	260	98	(100)	96	(32)	260(23)	97	(22)	84	(21)	134(18)	177(8)	16
2578 n.i.	262	245(100)	112(67)	262(35)	150(22)	94	(19)	207(19)	108(12)	35			
2590 4-Propionyloxylupanin	152(100)	180(100)	55(52)	208(25)	96	(26)	124(26)	150(28)	32				
2596 n.i.	320	134(100)	148(19)	246(12)	319(8)	98	(8)	320(4)	189(2)	--	17		
	112(100)	258(17)	84	(16)	146(8)	160(5)	241(4)	172(2)	25				

2598 13 α -Isobutyryloxylupanin	334	246(100)	247(70)	134(60)	148(30)	112(40)	231(11)	334(10)	--	17			
2610 n.i.	278	166(100)	112(97)	148(83)	260(80)	126(45)	150(43)	278(40)	35				
2635 Baptifolin	260	114(100)	260(27)	160(13)	146(21)	70	(18)	96	(17)	243(6)	21	10	
2650 13 α -Butyryloxylupanin	334	246(100)	247(61)	134(60)	148(30)	112(37)	231(11)	334(10)	--	11,17			
2656 Epi-Baptifolin	260	114(100)	260(32)	146(38)	96	(23)	70	(21)	152(13)	134(11)	25	17	
2672 n.i.	82	(100)	245(21)	138(12)	152(7)	97	(8)	247(5)	234(3)	28			
2675 13 α -Isovaleryloxylupanin	348	246(100)	247(60)	134(52)	112(36)	148(25)	245(21)	348(5)	--	17			
2678 Hydroxanagyrin	260	114(100)	260(31)	96	(29)	148(11)	82	(11)	108(9)	46			
2700 N-Cinnamoylhistamin	241	94	(100)	82	(70)	131(60)	103(45)	241(20)	--	10			
13-Acetoxyanagyrin	302	96	(100)	243(36)	302(29)	146(22)	160(12)	134(12)	121(12)	--	11,17		
2705 n.i.	82	(100)	57	(22)	138(10)	208(7)	221(2)	28					
2724 Lupaninester <i>ähnlich R12733</i>	346	136(100)	149(38)	97	(25)	150(25)	263(21)	110(20)	346(10)	33			
2733 13 α -Angelyloxylupanin	346	246(100)	134(50)	247(34)	112(28)	148(21)	231(11)	346(<1)	28	17			
2745 13 α -Valeryloxylupanin	348	246(100)	134(50)	148(21)	112(36)	245(14)	95	(12)	231(11)	45	17		
2753 13 α -Tiglyloxylupanin	346	246(100)	134(50)	247(31)	112(24)	148(21)	231(11)	346(<1)	28	17			
2756 n.i.	112(100)	113(32)	84	(18)	138(11)	265(2)	150(1)	341	7	53			
2775 Lupaninester	346	136(100)	149(44)	97	(28)	150(27)	110(22)	263(19)	346(10)	33			
2782 s. L. littoralis	173(100)	186(86)	160(61)	159(48)	202(39)	324(13)	41						
2790 Chinin s. L. littoralis	136(100)	137(11)	41										
2835 Angelyl-Hydroxy-Oxospartein	362	262(100)	134(81)	263(38)	148	(31)	108(18)	362(1)	234(3)	33,55			
2844 n.i.	260(100)	108(60)	261(42)	132(32)	146	(18)	175(17)	231(6)	28				
2850 13-Angelyloxymultiflorin	344	244(100)	344(50)	132(90)	362	262(100)	134(52)	148(35)	263(30)	108(25)	165(8)	362(1)	33,55
Tiglyl-Hydroxy-Oxospartein	260(100)	108(52)	261(30)	133(24)	175(21)	110(18)	355(1)	28					
2852 n.i.	315	152(100)	136(99)	315(20)	168(15)	--	17,10						
2860 4-Hydroxycinnamoyllupanin	346	134(100)	246(20)	148(18)	98	(8)	345(6)	110(2)	346(1)	--	17		
2867 4 β -Tiglyloxylupanin	378	278(100)	134(56)	279(46)	261(33)	148(28)	108(13)	378(4)	33,55				
2940 Angelyl-Dihydroxy-Oxospartein	378	278(100)	134(57)	279(37)	261(35)	148(27)	108(13)	378(3)	33,55				
2945 Tiglyl-Dihydroxy-Oxospartein	344	132(100)	134(50)	244(62)	243(32)	149(41)	110(41)	344(12)	--	10,17			
2955 13-Tiglyloxymultiflorin	345	152(100)	136(60)	345(25)	168(10)	--	10,17						
2960 4-Hydroxy-3'-methoxylupanin	368	246(100)	134(43)	279(40)	261(27)	148(21)	96	(11)	116(10)	55			
2965 n.i.	3110	13 α -Benzoyloxylupanin	134(34)	112(21)	148(16)	245(14)	231(10)	368(2)	--	17,5			
3128 n.i.	277(100)	295(80)	181(55)	294(40)	265(27)	116(21)	376(1)	33					
3186 n.i.	420	217(100)	204(65)	201(45)	121(41)	148(22)	420(20)	324(10)	33				

3260 13 <i>o</i> - <i>cis</i> -Cinnamoyloxylupanin	394	246(100)	134(42)	112(22)	148(20)	55	(17)	245(15)	231(11)	--	17
3390 13 <i>o</i> - <i>trans</i> -Cinnamoyloxylupanin	394	246(100)	134(42)	112(20)	149(20)	55	(17)	245(15)	231(11)	--	17
3550 Cineverin	428	246(100)	134(22)	112(11)	148(10)	231(10)	316(1)	428(1)	428(1)	--	5,17

* Zu jedem Alkaloid ist angegeben: Retentionsindex nach Kovats (RI); Name des Alkaloids (n.i.: nicht identifiziert, kursiv: vermutete Verbindung bzw. Verbindungsklasse); Molekülion M⁺; EI/MS: 7 charakteristische Fragmente mit ihrer relativen Intensität (%); jeweils ein Beispiel einer Lupine aus Tabelle 1, in der das entsprechende Alkaloid gefunden wurde; Literaturauswahl

Lit.:

- 1 Adams (1989)
- 2 Arslanian et al. 1990
- 3 Cho, Martin (1971)
- 4 Eight Peak Index of Mass Spectra
- 5 Faugeras et al. (1975, 1972); Faugeras (1971)
- 6 Fitch et al. (1974 a,b); Fitch (1974)
- 7 Flora (1985)
- 8 Greinwald et al. (1990)
- 9 Hesse (1974)
- 10 Murakoshi et al. (1982); Ohmiya et al. (1984); Mohamed et al. (1990); Saito et al. (1987); Takamatsu et al. (1991, 1990)
- 11 Kinghorn et al. (1984, 1982, 1980 a,b); Kim et al. (1982); Balandrin et al. (1981)
- 12 Majchrzak-Kuczynska et al. (1984)
- 13 Meeker, Kilgore (1987)
- 14 Neuner-Jehle (1964, 1967); Schumann et al. (1968)
- 15 Priddis (1983)
- 16 Waterman, Faulkner (1982)
- 17 Wink, Witte (1991, 1987); Wink (1992 in press, 1987, 1984); Wink et al. (1983, 1982, 1980); Mühlbauer et al. (1988); Hatzold et al. (1983)
- 18 Verdoorn, Van Wyk (1990)

KINGHORN et al. (1980) bestimmten N-Methylcytisin zusätzlich in *L. polycarpus* und *L. latifolius*. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden (Tab.2).

Neben den Chinolizidinen waren die Piperidinalkaloide häufig vorkommende Lupineninhaltsstoffe, denen zum Teil eine teratogene Wirkung auf Weidetiere zugeschrieben wird und zu einer als 'Crooked calf disease' bezeichneten angeborenen Kälberkrankheit führen (KEELER & PANTER 1989, KEELER 1973).

Zu den Indolprotoalkaloiden, die außer dem Indolchromophor kein Heterocyclensystem besitzen, gehören die Verbindungen Gramin, Tryptophol und Indolessigsäure. Letztere ist als Wachstumshormon im Pflanzenstoffwechsel wirksam. Diese Alkaloide konnten in *L. caudatus*, *L. argenteus*, *L. sericeus* und *L. holosericeus* identifiziert werden.

Die erhaltenen EI-Massenspektren aller gefundenen Alkaloide sind in Tabelle 4 tabellarisch aufgeführt. Es sind jeweils 7 Massenfragmente dargestellt, die entweder auf Grund ihrer Intensität oder ihrer Eigenschaft als Schlüsselbruchstück ausgewählt wurden. Exemplarisch sind in Abb.3 die Massenspektren häufig vorkommender Hauptalkaloide graphisch abgebildet.

Alle Alkaloide, deren Anteil am Gesamtalkaloidgehalt mehr als 5% betrug, wurden als Hauptalkaloide bezeichnet und für die taxonomische Klassifizierung herangezogen. Die Nebenalkaloide sind zwar ebenfalls interessant und u.U. sehr aufschlußreich; sie wurden hier nicht berücksichtigt, um die Darstellung nicht zu unübersichtlich werden zu lassen. Je nach An- oder Abwesenheit einzelner Alkaloide und auf Grund der, in der Biosynthese zusammenhängenden Alkaloidgruppen sowie einer visuellen Spektrenauswahl konnten die Tabellen 2 und 3 erstellt werden, deren Verteilungsmuster ein detailliertes Bild der generischen und subgenerischen Verhältnisse ergibt.

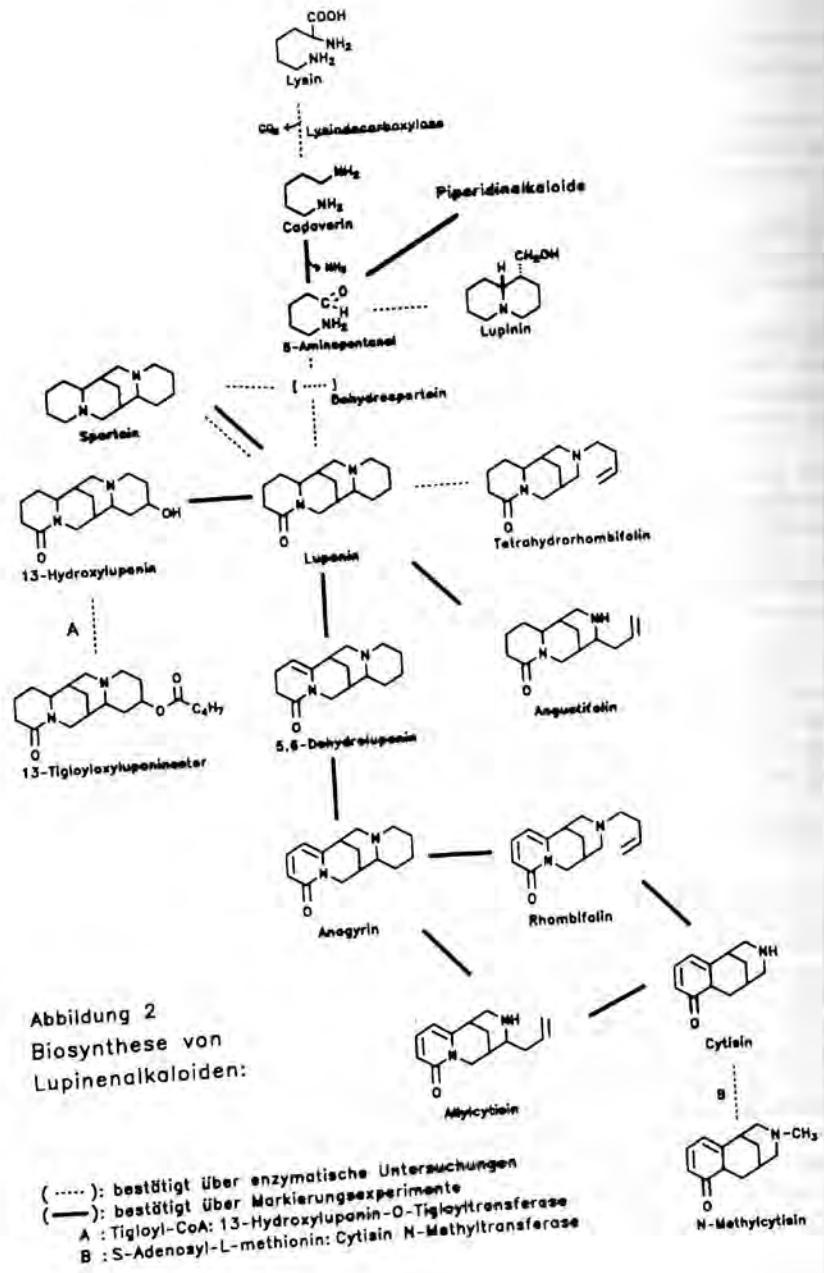
Für chemotaxonomische Untersuchungen ist es unerlässlich, die Biosynthesewege der einzelnen Alkaloide zu berücksichtigen, und somit Alkaloidgruppen als generische Charaktere bei der Auswertung anzunehmen. In diesem Sinne wäre eine andere Anordnung der Formelübersicht angebracht, bei der z.B. die α -Pyridonalkaloide eine eigene Gruppe darstellen. Eine Übersicht über die bislang durch enzymatische und radiochemische Methoden abgesicherte Biogenese ist in Abbildung 2 dargestellt (MOTHES et al. 1985, WINK 1984, 1987).

4. DISKUSSION

4.1. Subgenerische Chemotaxonomie

Das Bild, das sich aus dem Verteilungsmuster auf der Ebene der Subspecies ergibt, entspricht nicht immer den vorgegebenen morphologischen Klassifizierungen. Auf chemischer Basis sind jedoch klare Unterscheidungen in einer limitierten Anzahl von Gruppen möglich, die eventuell phylogenetische Zusammenhänge widerspiegeln. Die Zuverlässigkeit der Aussagen hängt dabei natürlich von der Anzahl der gemessenen Proben jeder Subspecies oder Varietät ab. Außerdem mußte geprüft werden, ob die Alkaloidmuster der Pflanzen unabhängig von der Herkunft ist. Letzteres konnte nicht bestätigt werden, die Verteilung der Alkaloide innerhalb einer Species variiert zum Teil erheblich (s. Tab.2). Diese Beobachtungen wurden auch in der Literatur mehrfach beschrieben: KELLER erkannte (1980) Populationsunterschiede in *L. holosericeus* und vermutete geographisch getrennte Genpools innerhalb desselben Taxon. Auch hielt er eine introgressive Hybridisierung mit benachbarten Lupinenpopulationen für möglich. Qualitative Unterschiede konnten auch von KEELER (1973) und DOLINGER et al. (1973) festgestellt werden. In einer Arbeit über *Baptisia* berichteten CRANMER & TURNER bereits 1967, daß ihnen eine chemotaxonomische Nutzung der Alkaloidprofile aus diesem Grund nicht möglich war.

Wir haben uns daher entschlossen, unabhängig von der Herkunft jede einzelne Pflanze getrennt zu behandeln, um unvoreingenommen Gruppierungen auf untergeordnetem Niveau bilden zu können. Es gelang, eine begrenzte Anzahl



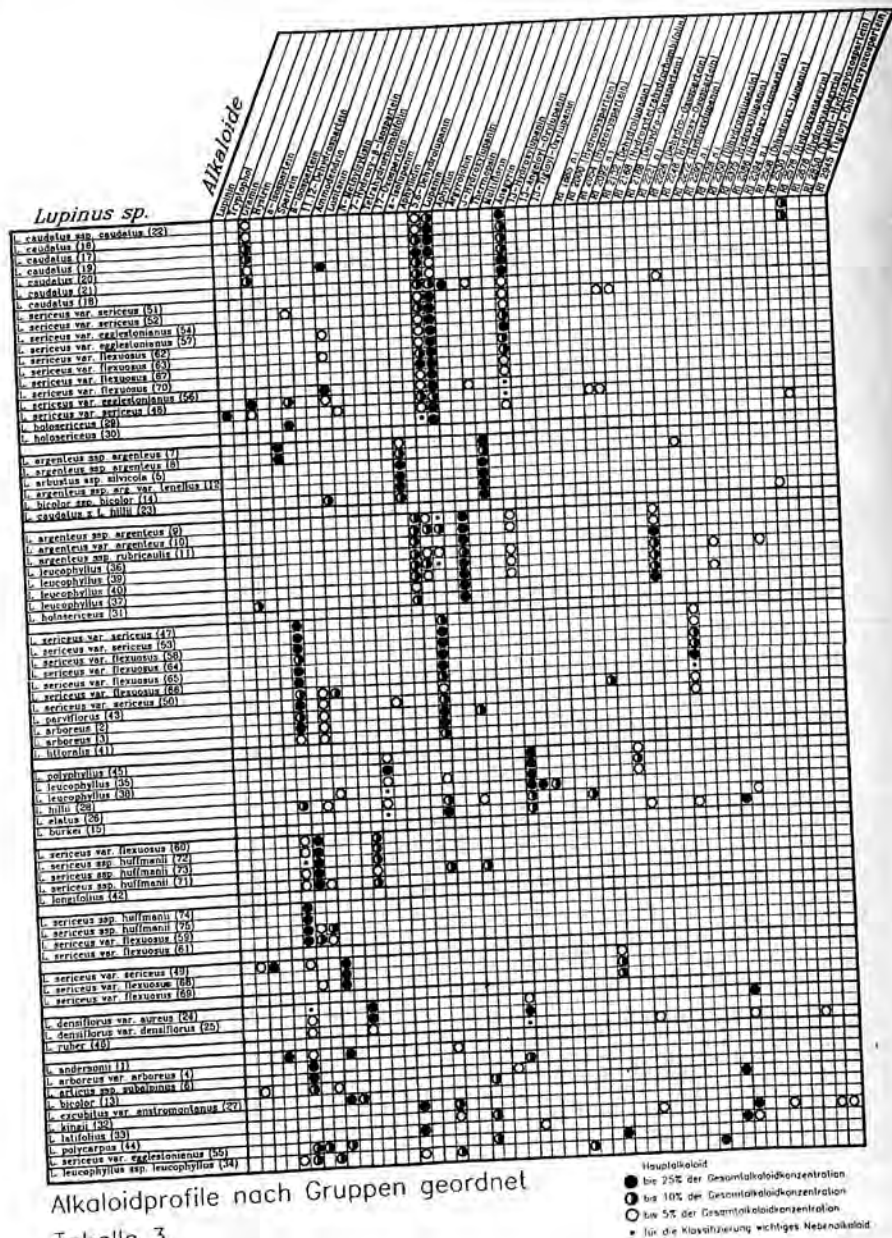
Lupinus sp.

Alkaloide

Lupinus sp.	Lyain	Sparteain	Lupinin	13-Hydroxylupenin	13-Tigloyloxylupeninester	5,8-Dehydrolupenin	Anagyrin	Rhombifolin	Allylcytisin	Cytisin	N-Methylcytisin
L. andersonii (1)	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. arboreus (2)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. arboreus (3)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. arboreus var. arboreus (4)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. arboreus ssp. subvulva (5)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. arvensis ssp. subulvula (6)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus ssp. argenteus (7)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus ssp. argenteus (8)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus ssp. argenteus (9)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus var. argenteus (10)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus ssp. rubicaulis (11)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. argenteus ssp. arg. var. tenellus (12)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. bicolor ssp. bicolor (14)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. bicolor (13)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. burkei (15)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus ssp. caudatus (22)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (16)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (17)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (19)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (20)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (21)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus (18)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. caudatus x L. hiltii (23)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. densiflorus var. aureus (24)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. densiflorus var. densiflorus (25)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. elatus (26)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. excelsus var. anisromontanus (27)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. hiltii (28)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. holosericeus (30)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. holosericeus (29)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. holosericeus (31)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. kuyii (32)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. latifolius (33)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (36)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (39)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (40)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (37)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (38)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus (35)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. leucophyllus ssp. leucophyllus (34)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. littoralis (41)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. lanceolatus (42)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. parviflorus (43)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. polycarpus (44)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. polyphyllus (45)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. ruber (46)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (51)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (52)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. eglestonianus (54)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. eglestonianus (57)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (62)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (63)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (67)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (70)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. eglestonianus (55)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (48)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (47)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (53)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (58)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (64)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (65)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (66)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (50)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (60)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus ssp. huffmanni (72)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus ssp. huffmanni (73)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus ssp. huffmanni (71)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (61)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (68)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus ssp. huffmanni (74)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus ssp. huffmanni (75)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. sericeus (49)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. flexuosus (69)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L. sericeus var. eglestonianus (56)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Alkaloidprofile nach Lupinenarten geordnet
 Tabelle 2

● Hauptalkaloid
 ○ bis 25% der Gesamtalkaloidkonzentration
 ○ bis 10% der Gesamtalkaloidkonzentration
 ○ bis 5% der Gesamtalkaloidkonzentration
 * für die Klassifizierung wichtiges Nebensalkaloid



von Gruppen mit den gleichen chemischen Merkmalen einiger mehrfach untersuchter Species zu bilden. Diese sollen im Folgenden kurz besprochen werden.

Proben von *L. caudatus* wurden an 7 unterschiedlichen Standorten gesammelt. Die Profile (Tab.2.) waren nahezu identisch mit 2 Ausnahmen: Die Pflanzen 22 und 16 wiesen ein zusätzliches Alkaloid bei RI 2576 (Hydroxynanagyrin) auf. In *L. caudatus* (18) konnte Aphyllin als profilbeeinflussendes Hauptalkaloid sowie zwei unbedeutendere Hauptalkaloide zusätzlich gefunden werden. Hier wäre möglicherweise eine weitere Unterteilung der Art möglich.

Ähnlich ist die Situation bei *L. argenteus*. Hier konnte die Species chemotaxonomisch in 2 Gruppen unterteilt werden, die ihrerseits eine gute Übereinstimmung des Alkaloidprofils untereinander zeigten. Die Einordnung von *L. argenteus ssp. rubricaulis* und *L. argenteus ssp. argenteus var. tenellus* ist wegen mangelnder Probenanzahl vorsichtiger zu beurteilen (vgl. Abb.1).

L. sericeus eignet sich am Besten zu Betrachtungen der Musterbildung bei den Alkaloidprofilen, auf Grund einer großen Anzahl Pflanzenproben, die an verschiedenen Standorten gesammelt werden konnten. Hier ergaben sich im Wesentlichen 5 Gruppen, deren Alkaloidprofile untereinander sehr ähnlich sind. Dabei konnte keine Unterscheidung von *L. sericeus ssp. sericeus var. sericeus*, *L. sericeus ssp. sericeus var. egglestonianus* und *L. sericeus ssp. sericeus var. flexuosus* erfolgen. *L. sericeus ssp. huffmanii* konnte in zwei Gruppen aufgeteilt werden, in der einen ist Spartein das dominierende Hauptalkaloid, in der anderen das isomere β -Ispartein.

L. densiflorus var. aureus unterschied sich von *L. densiflorus var. densiflorus* durch die Anwesenheit eines einzigen weiteren Alkaloids mit RI 2375 (Hydroxylupanin).

L. leucophyllus wies 2 größere Gruppen auf, die chemotaxonomisch unterschieden werden konnten. *L. leucophyllus ssp. leucophyllus* (34) paßte in keine der beiden Gruppen. Auch hier ist eine Interpretation schwierig, da es sich um eine Einzelprobe der Subspecies *L. leucophyllus ssp. leucophyllus* handelt.

Ähnliche Ergebnisse gab es auch bei *L. arboreus*, *L. holosericeus* und *L. bicolor*. Die Klassifizierung der restlichen Arten ist aufgrund des geringen Probenumfangs nur sehr eingeschränkt möglich. Das gilt auch für die im nächsten Abschnitt diskutierte generische Einordnung der Arten.

Weitere Analysen werden zeigen, in wie weit es möglich ist, einzelne Populationen auf Grund ihrer chemischen Daten in der infragenerischen Pflanzenhierarchie zu klassifizieren. Molekularbiologische Methoden (s. KÄSS & WINK und SWATSCHEK & WINK, in diesem Band) werden sicherlich als weiteres Merkmal in diesem Zusammenhang von zunehmender Bedeutung sein. Die Variation sekundärer Metabolite wirft eine ganze Reihe genetischer und biosynthetischer Fragen auf, deren Antwort z.T. noch aussteht. Da wir heute wissen, daß die Lupinenalkaloide als chemische Abwehrmittel genutzt werden (WINK 1988, 1992b,c), handelt es sich bei ihnen um adaptive Merkmale. Wir nehmen an, daß die hohe Variabilität von Nutzen ist, da sich so Feinde schlechter adaptieren können. Denn ein Herbivore kann sich nicht gegen alle Lupinenalkaloide auf einmal adaptieren, vielmehr muß die Anpassung an die physicochemisch unterschiedlichen Einzelalkaloide individuell erfolgen (s. Diskussion in WINK 1992b,c).

4.2. Generische Chemotaxonomie

Tabelle 3 gibt einen Überblick über den Versuch einer umfassenden generischen Einordnung der Arten. Hier unterscheiden sich unsere Ergebnisse von Untersuchungen, die NICHOLLS & BOHM (1982) über die Flavonoidchemie der Lupinen anstellten. Sie untersuchten damals die gleichen Pflanzenarten unter taxonomischen Gesichtspunkten, allerdings unter Anwendung von statistischen Methoden. In der von uns durchgeführten Studie untersuchten wir alle Spe-

cies wiederum unabhängig von ihrem geographischen Standort und waren in der Lage, 9 Gruppen mit sehr ähnlichen Alkaloidzusammensetzungen zu bilden. Diese sollen hier kurz besprochen werden. Die Zahlenangaben in Klammern entsprechen der Numerierung in Tabelle 1:

Gruppe 1 setzt sich aus Pflanzen der Arten *L. caudatus* (16-22), *L. holosericeus* (29,30) und *L. sericeus ssp. sericeus* (51,52,54, 56,57,62,63,67,70) zusammen, die gemeinsam die Alkaloide Lupanin, aber kein Spartein enthalten. Ferner finden wir die Lupanin in der Biogenese eng zusammenstehenden Alkaloide 5,6-Dehydrolupanin und das teratogene Anagyrin.

Gruppe 2 ist in direktem Zusammenhang mit Gruppe 1 zu sehen. Hier sind die charakteristischen Alkaloide das isomere α -Isolupanin und die damit biogenetisch zusammenhängenden Alkaloide 5,6-Iso-Dehydrolupanin und Thermopsin (siehe dazu: KINGHORN & SMOLENSKI 1980). In der Gruppe ist *L. argenteus* (7,8), *L. arbusus* (5), *L. bicolor* (14) und *L. caudatus* x *L. hillii* (23) vertreten.

Eine weitere, auch biogenetisch herausragende Alkaloidgruppierung umfaßt die Hauptalkaloide Aphyllidin und Argyrolobin der Arten *L. leucophyllus* (36,37,39,40), *L. argenteus* (9-11) und *L. holosericeus* (31) in **Gruppe 3**.

Spartein und Lupanin sind die charakteristischen Alkaloide der **Gruppe 4** in *L. sericeus ssp. sericeus* (47,50,53,58,64-66), *L. parviflorus* (43), *L. arboreus* (2,3), sowie *L. littoralis* (41).

Eine Anordnung von *L. polyphyllus* (45), *L. leucophyllus* (35, 38), *L. hillii* (28), *L. elatus* (26) und *L. burkei* (15) in einer Gruppe erfolgte auf Grund der charakteristischen Alkaloide Tetrahydrohombifolin und 13-Hydroxylupanin. (**Gruppe 5**)

Die **Gruppen 6-8** beinhalten fast ausschließlich Subspecies und Varietäten von *L. sericeus*, die schon bei der subgenerischen Betrachtung diskutiert wurden. Einzige Ausnahme ist *L. longifolius* (42), das der mit den Hauptalkaloiden β -Isospartein und 7-Hydroxy- β -isopartein der Gruppe 6 zugeordnet werden konnte.

Gesondert erfaßt wurde *L. densiflorus* (24, 25) und *L. ruber* (46), die das seltener vorkommende N-Methylcytisin als Hauptalkaloid enthielten.

Die restlichen Arten konnten keiner dieser Gruppierungen sicher zugeordnet werden und werden von uns daher vorläufig isoliert betrachtet. Das könnte sich ändern, wenn in Zukunft weitere Pflanzen dieser Arten für eine Analyse zur Verfügung stehen und ausgewertet werden. Besonders auffallend war das Muster von *L. excubitus* (27), das Ammodendrin und das selten vorkommende Lusitanin enthielt. Als Nebenalkaloide wurden weitere zahlreiche Piperidinalkaloide festgestellt, von denen ein großer Teil noch nicht identifiziert werden konnte (Abbildung 1). *L. andersonii* enthielt Ammodendrin und Hystrin als Hauptalkaloid (Abbildung 1). Das Vorkommen dieser Alkaloidkombination in *Genista hystris* L. wurde 1971 von Saxton bereits als taxonomisch interessant diskutiert. Eine außergewöhnliche Alkaloidzusammensetzung konnten wir bei *L. arcticus ssp. subalpinus* analysieren. Neben dem Hauptalkaloid Multiflorin konnten die verwandten Verbindungen Albin und 11,12-seco-Didehydromultiflorin gefunden werden (Abbildung 1), die üblicherweise in *L. albus* vorkommen.

Die 'launische' Natur der Lupinenalkaloide, wie sie häufig beschrieben wurde, konnte hier nur ansatzweise wiedergefunden werden. Vielmehr konnte, von nicht einzuordnenden Einzelproben einmal abgesehen, nur eine begrenzte Anzahl von taxonomisch signifikanten Gruppen gebildet werden.

4.3. Schlußbemerkung

Mit der Methode der GC/MS ist eine Analyse der Alkaloidzusammensetzung in Lupinen eine Routineangelegenheit geworden, nicht nur für taxonomische Probleme. Gerade aber bei der taxonomisch nicht immer eindeutigen Artenbestimmung der Lupinen werden chemische aber auch molekularbiologische Informationen mit zunehmender Zahl analysierter Proben immer wichtigere Entscheidungshilfen darstellen. Auch für zukünftige Fragen im Bereich der Qualitätskontrolle im Lupinenanbau und in der Futter- und Lebensmittelindustrie wird die Bestimmung der Alkaloidmuster und Konzentrationen entscheidend von Bedeutung sein. Noch sind längst nicht alle LupinenSpecies analytisch auf ihre Alkaloidzusammensetzung und Verwertung als Futter- oder Lebensmittelzusätze hin untersucht worden, so daß auch auf diesem Gebiet noch weitere Ergebnisse zu erwarten sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels Kapillar-GLC und GLC/MS wurden die Alkaloidmuster von 75 Lupinen aus 31 Arten detailliert analysiert. Über 200 Alkaloide (Chinolizidine, Piperidine und Indolderivate) konnten nachgewiesen werden, von denen 2/3 neue, bislang unbekannte Alkaloide darstellen. Es wurde der Versuch unternommen, die erhaltenen Alkaloidmuster unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten auszuwerten.

6. DANK.

Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Ganz besonders möchten wir Herrn Dr. L. Witte (TU Braunschweig) für die Unterstützung und stetige Hilfe bei der Durchführung und Einweisung in die GC/MS und Frau H. Wurm für die Extraktion und GLC-Messung der Alkaloidproben. Dr. Nicholls vermittelte uns dankenswerterweise die Proben der nordamerikanischen Lupinen.

7. LITERATUR

- R.P. ADAMS in: Identification of essential oils by Ion Trap Spectroscopy, Academic Press, San Diego 1989
- R.L. ARSLANIAN, G.H. HARRIS, F.R. STERMITZ: New quinolizidine alkaloids from *Lupinus argenteus* and its hosted root parasite *Castilleja sulphurea*. Stereochemistry and conformation of some naturally occurring cyclic carbonylamides, J. Org. Chem. 1990, 55(4), 1204-10
- M.F. BALANDRIN, A.D. KINGHORN: Tetrahydrohombifolin, a further constituent of *Lupinus oscar-haughtii* and *L. truncatus*, J. Nat. Prod. 1981, 44(4), 495-7
- D. BOULTER, E. DERBYSHIRE in: J.B. HARBORNE, D. BOULTER, B. L. Turner ed., Chemotaxonomie of the Leguminosae, p 285, Academic Press, London
- Y.D. CHO, R.O. MARTIN: Resolution and unambiguous identification of microgram amounts of 22 lupin alkaloids by sequential use of thin layer and gas-liquid chromatography and mass spectrometry, Anal. Biochem. 1971, 44, 49-54
- M.F. CRANMER, B.L. TURNER, Evolution 1967, 21, 508
- P.M. DOLINGER, P.R. EHRLICH, W.L. FITCH, D.E. BREEDLOVE: Alkaloid and predation pattern in Colorado lupin populations, Oecologia 1973, 13, 191
- EIGHT Peak Index of Mass Spectra, Mass Spectra Data Centre AWRE, Aldermaston 1983, 3. Ausg., Vol. 3, Part 2, 4122
- G. FAUGERAS, R. PARIS, M. DEBRAY, J. BOURGEOIS, C. DELABOS: Alkaloids and polyphenols of Leguminosae. Alkaloids of *Cadia ellisiana* bark. Isolation, identification, and toxicity, Plant. Med. Phytother. 1975, 9(1), 37-43
- G. FAUGERAS, R. PARIS, E. VALDES-BERMEJO: Alkaloids and polyphenols of Leguminosae. XXVI. Alkaloids of *Sarothamnus patens* (*Cytisus striatus*), Ann. Pharm. Franc., 1972, 30(7-8), 527-34
- G. FAUGERAS: Alkaloids and polyphenols of Leguminosae. XXII. Alkaloids of *Genista cinerea*, Ann. Pharm. Franc., 1971, 29(4), 241-58

- W.L. FITCH, C. DJERASSI: Mass Spectrometry in structural and stereochemical problems. CCXLIII. Functional group Interaction. Unusual fragmentations of amides as exemplified by bipiperidyl alkaloids, *JACS* **1974**, *96*:15, 1917-27
- W.L. FITCH in: The Alkaloids of *Lupinus formosus*. Structures and spectral properties". PhD Dissertation, Stanford University, **1974**
- W.L. FITCH, P.M. DOLLINGER, C. DJERASSI: Alkaloid studies. LXVIII. Novel piperidyl alkaloids from *Lupinus formosus*, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2974-79
- T. P. FLORA: Analysis of lupine alkaloids. III. Mass Spectrometry, *Herba Hung.* **1985**, *24*(1), 83-109
- R. GREINWALD, P. BACHMANN, L. WITTE, F.C. CZYGAN: Cytisine-12- carboxylic acid ethyl ester, a quinolizidine alkaloid from *Laburnum watereri* and its occurrence in the Leguminosae, *Phytochem.* **1990**, *29*, 3553-4
- R. GREINWALD, G. VEEN, B.E. VAN WYK, L. WITTE, F.C. CZYGAN: Distribution and taxonomic significance of major alkaloids in the genus *Virgilia*, *Biochem. Syst. Ecol.* **1989**, *17*(3), 231-8
- T. HATZOLD, I. ELMADFA, R. GROSS, M. WINK, T. HARTMANN, L. WITTE: Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*, *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 934
- M. HESSE, "Indolalkaloide", Vol. 2, Teil 2, Verlag Chemie, Weinheim **1974**
- S. OHMIYA, H. OTOMASU, J. HAGIWA, I. MURAKOSHI: Alkaloids of *Thermopsis lupinoides*, *Phytochem.* **1984**, *23*(11), 2665-7
- R.F. KEELER, K. E. PANTER: Piperidine alkaloid composition and relation to Crooked Calf Disease - Inducing potential of *L. formosus*, **1989**, *40*, 423-32
- R.F. KEELER: Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. I. Correlation of Crooked Calf disease incidence with alkaloid distribution determined by gas chromatography, *Teratology* **1973**, *7*(1), 23-30
- W.J. KELLER: Alkaloid variation in *Lupinus holosericeus*, *J. Nat. Prod.* **1980**, *44*(3), 357-9
- I.C. KIM, M.F. BALANDRIN, A.D. KINGHORN: Reinvestigation of the alkaloids of *Lupinus sericeus* Pursh. Identification of a new natural product, 10,17-dioxo- β -isosparteine, *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*(4), 796-8
- A.D. KINGHORN, M.F. BALANDRIN in: W.S. PELLETIER (ed), Alkaloids: Chemical and biological perspectives, Vol.2, pp 105-148, Wiley, N.Y. **1984**
- A.D. KINGHORN, M.F. BALANDRIN, L.J. LIN: Alkaloids of Papilionoideae. Part 1. Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes, Sophoreae, Dalbergieae, Loteae, Brongniartieae, and Bossiaceae, *Phytochem.* **1982**, *21*(9), 2269-75
- A.D. KINGHORN, M.A. SELIM, S.J. SMOLENSKI: Alkaloid distribution in some New World species, *Phytochem.* **1980**, *19*, 1705-10
- A.D. KINGHORN, S.J. SMOLENSKI: Alkaloids of *Lupinus bicolor ssp. microphyllus*. Detection of 5,6-dehydro- α -isolupanin by gas chromatography-mass spectrometry, *Planta Med.* **1980**, *38*(3), 280-2
- U. MAJCHRZAK-KUCZYNSKA, M. WIEWIOWSKI, E. WYRZYKIEWICZ: Mass spectrometry of bis-quinolizidine alkaloids: lactams of sparteine and α -isospartein, *Org. Mass Spec.* **1984**, *19*(12), 600-4
- J.E. MEEKER, W.W. KILGORE: Identification and quantification of the alkaloids of *Lupinus latifolius*, *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 431-33
- M.H. MOHAMED, K. SAITO, I. MURAKOSHI, A.H. KADRY, T.I. KHALIFA, A.H. AMMAR: A new lupine alkaloid, (-)- δ -5-dehydro-multiflorine, from the seeds of *Lupinus termis*, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*(6), 1578-80
- K. MOTHES, H.R. SCHÜTTE, M. LUCKNER in: Biochemistry of the alkaloids, pp 150-62, VCH, Weinheim **1985**
- P. MÜHLBAUER, L. WITTE, M. WINK, New ester alkaloids from lupins, *Planta Med.* **1988**, *88*, 237-39
- I. MURAKOSHI, E. KIDOGUCHI, M. KUBOTA, J. HAGIWA, S. OHMIYA, H. OTOMASU: Lupine alkaloids from *Echinosophora koreensis*, *Phytochem.* **1982**, *21*(9), 2385-8
- N. NEUNER-JEHLE, D. SCHUMANN, G. SPITELLER: Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden - 6. Mitt., *Mh. Chem.* **1967**, *98*, 836-851
- N. NEUNER-JEHLE, H. NESVADBA, G. SPITELLER: Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden - 3. Mitt., *Mh. Chem.* **1964**, *95*, 687-709
- K.W. NICHOLLS, B.A. BOHM: Flavanoids and affinities of some North American lupines, *Can. J. Bot.* **1983**, *61*, 708-30
- E.K. NOWACKI, G.R. WALLER: Quinolizidine Alkaloids from Leguminosae, *Rev. Latinoamer. Quim.* **1977**, *8*, 49-56
- K.E. PANTER, T.D. BUNCH, R.F. KEELER, D.V. SISSON, R.J. CALLAN: Multiple Congenital Contractures (MCC) and cleft palate induced in goats by their ingestion of piperidine alkaloid-containing plants: reduction in fetal movement as their possible cause, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1990**, *28*(1), 69-83
- C.R. PRIDDIS: Capillary gas chromatography of lupin alkaloids, *J. Chrom.* **1983**, *261*, 95-101
- K. SAITO, T. YOSHINO, S. TSAI, S. OHMIYA, H. KUBO, H. OTOMASU, I. MURAKOSHI: Absolute configuration of (-)- Lusitanine, a new lupine alkaloid in *Maackia* species, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*(3), 1308-10
- B.E. SAXTON: Quinolizidine Alkaloids, Alkaloids (London) **1971**, *1*, 86-95
- D. SCHUMANN, NEUNER JEHLLE, G. SPITELLER: Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden - 7. Mitt., *Mh. Chem.* **1968**, *99*, 390-408
- S. TAKAMATSU, K. SAITO, I. MURAKOSHI: New lupine alkaloids from the seedlings of *Lupinus hirsutus* and change of alkaloid pattern with germination, *Nat. Prod.* **1991**, *54*(2), 477-82
- S. TAKAMATSU, K. SAITO, T. SEKINE, S. OHMIYA, H. KUBO, H. OTOMASU, I. MURAKOSHI: Glycosidic alkaloids from *Lupinus hirsutus*, *Phytochem.* **1990**, *29*(12), 3923-26
- B.E. VAN WYK, G.H. VERDOORN: Alkaloids as taxonomic characters in the tribe Crotonarieae, *Biochem. Syst. Ecol.* **1990**, *18*, 503-15
- G.H. VERDOORN, B.-E. VAN WYK: Esters of chinolizidine alkaloids from the genus *Pearsonia*, *Phytochem.* **1990**, *29*, 1297-302
- P.G. WATERMAN, D.F. FAULKNER: Quinolizidine/Indolizidine alkaloids from the seed of *Camoensia brevicalyx*, *Phytochem.* **1982**, *21*(1), 215-18
- A. WEHRLI, E. KOVATS, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2709
- M. WINK, L. WITTE: Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae*, *Entomol. Gener.* **1991**, *15*(4), 237-54
- M. WINK: Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures, *Planta Med.* **1987**, *53*, 509-14
- M. WINK, L. WITTE: Cell-free synthesis of the alkaloids Ammodendrine and Smpine, *Z. Naturforsch.* **1987**, *42*, 197-204
- M. WINK: Stoffwechsel und Funktion der Chinolizidinalkaloide in Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen, Habilitationsschrift **1984**, Technische Universität Braunschweig
- M. WINK, L. WITTE, T. HARTMANN, C. THEURING, V. VOLZ: Accumulation of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures: Genera *Lupinus*, *Cytisus*, *Baptista*, *Genista*, *Laburnum*, and *Sophora*, *Planta Med.* **1983**, *48*, 253-57
- M. WINK, H.M. SCHIEBEL, L. WITTE, T. HARTMANN: Quinolizidine alkaloids from plants and their cell suspension cultures. Ester alkaloids of *Lupinus polyphyllus*, *Planta Med.* **1982**, *44*, 15-20
- M. WINK, L. WITTE, H.M. SCHIEBEL, T. HARTMANN: Alkaloid pattern of cell suspension cultures and differentiated plants of *Lupinus polyphyllus*, *Planta Med.* **1980**, *38*, 238-45
- M. WINK: Quinolizidine alkaloids, Methods of plant biochemistry (in press)
- M. WINK: Allelochemical properties or the raison d' être of alkaloids. In "The alkaloids" (G.Cordell, Hrg.), Vol. 43 (in press)
- M. WINK: The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. In " Focus on Insect Plant interactions" (E.A. Bernays, Hrg.), Vol. IV, 133-169 (1992).
- M. WINK: Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassungen der Pflanzenfresser. (in press)

DIE CHEMISCHE VERTEIDIGUNG DER PFLANZEN UND DIE ANPASSUNGEN DER PFLANZENFRESSER

Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg

ABSTRACT

Chemical defence of plants and the adaptations of herbivores.

Plants have to protect themselves against herbivores and microbial pathogens. The different life strategies which evolved during evolution are described and discussed. Chemical defence with low-molecular weight compounds, the so-called secondary products or allelochemicals and toxic proteins is of prime importance. Evidence for a protective role of alkaloids and their functions is provided in detail. Since protected plant constitute an ecological niche, it is plausible that some herbivores were successful to adapt to this situation and to feed on otherwise toxic plants. Some insects even utilize the defence chemicals of their host plants for their own chemical protection. The biochemical events which underlie these phenomena are discussed.

Lupins produce quinolizidine alkaloids whose main role seems to be protection against herbivores. Breeding for sweet lupins thus reduces their fitness. Alternatives are discussed, which will retain the protective function of alkaloids but will also allow the utilization of seeds for animal and human consumption.

RESUMEN

La defensa química de las plantas y la adaptación de los herbívoros

Las plantas generalmente tienen mecanismos naturales de protección contra los herbívoros y los microorganismos patógenos. En este trabajo se describe y discute la evolución de diferentes estrategias de vida. Se encontró que las defensas químicas de mayor importancia son, la de los compuestos de bajo peso molecular llamados productos secundarios o aloquímicos y las proteínas tóxicas. Se provee detalles de las evidencias encontradas sobre las funciones y el rol protector de los alcaloides. Dado que las plantas químicamente protegidas, ocupan un nicho ecológico importante, se dan las pautas del fenómeno de adaptación de algunos herbívoros para alimentarse de ellas. Se determinó que algunos insectos utilizan las sustancias químicas de la planta huésped para su propia protección.

Los lupinos producen alcaloides quinolizidínicos que tienen como finalidad dar protección a la planta contra los herbívoros. El mejoramiento vegetal de los lupinos dulces redujo esta capacidad protectora. Se discuten las alternativas de mantener la acción protectora de los alcaloides y a la vez permitir la utilización de las semillas para consumo humano y animal.

I. EINLEITUNG

Ein auffälliges Merkmal der höheren Pflanze ist ihre Fähigkeit, eine Vielzahl von Naturstoffen, die sogenannten Sekundärstoffe zu produzieren. Bei der Betrachtung der in Tab. 1 aufgeführten Zahlen der derzeit bekannten Strukturen

muß man beachten, daß schätzungsweise nur 15% aller Pflanzen und diese bislang meist nur unvollständig untersucht wurden. Man kann annehmen, daß die Zahl der wirklich vorkommenden Strukturen ein Vielfaches betragen wird, zu deren Aufklärung neuerdings sehr empfindliche und leistungsfähige Methoden, wie z.B. HPLC, GLC, MS und NMR zur Verfügung stehen.

Tab. 1. Zahl der bekannten Naturstoffe

Substanzgruppe	Anzahl der Strukturen
Monoterpene	1000
Sesquiterpene	1500
Diterpene	1000
Triterpene/Steroide	800
Tetraterpene	350
Polyketide	700
Polyacetylene	750
Flavonoide	1200
Phenylpropane	500
Amine	100
Alkaloide	10000
Nichtproteinogene Aminosäuren	400
Cyanogene Glykoside	50
Glucosinolate	100

Betrachtet man diese Datenfülle, so stellt sich die Frage nach dem Sinn dieser Substanzen, oder anders gefragt, Wozu PRODUZIEREN PFLANZEN SEKUNDÄRSTOFFE? Ich möchte diese Frage anhand der großen Gruppe der Alkaloide abhandeln, von der z.Z. mehr als 10.000 Strukturen bekannt sind und die in ca. 30% aller Pflanzen vorhanden sind. Eine solche Frage mag auf den ersten Blick merkwürdig erscheinen, da wir in den Naturwissenschaften meist das "Was?" und "Wie?" untersuchen und die "Wozu"-Frage in vielen Fällen, z.B. in der organischen Chemie und Physik unsinnig wäre. Bei biologischen Phänomenen muß jedoch die evolutionäre Komponente beachtet werden, d.h. es muß gefragt werden: Welcher Überlebensvorteil ist mit dem Vorhandensein eines Merkmals, das chemischer, physiologischer oder anatomischer Natur sein kann, verbunden. Der Biologe Henke bezeichnete deshalb die "Wozu"-Frage als die königliche Frage der Biologie.

Zieht man in dieser Frage die Lexika der Chemie oder Biologie zu Rate, so erhält man häufig die Antwort, daß I.) die Funktion der Alkaloide entweder unbekannt wäre, daß II.) Alkaloide Endprodukte und Abfallprodukte seien, III.) im Primärstoffwechsel eine Bedeutung hätten oder IV.) aber gänzlich funktionslos seien und als Spielwiese der Evolution zu betrachten wären. Auch wird die Vermutung ausgesprochen, daß V.) die Alkaloide als Schutzsubstanzen vor Tierfraß fungieren könnten.

II. HYPOTHESE: ALKALOIDE ALS END- ODER ABFALLPRODUKTE

Von einem End- und Abfallprodukt würde man erwarten, daß die Pflanzen in ihrer Individualentwicklung ein solches Produkt anreichern, d.h. daß die Pflanze am Ende ihres Lebens oder der Vegetationsperiode die höchsten Alkaloidgehalte aufweisen sollte. Aus vielen Untersuchungen weiß man jedoch, daß die höchsten Alkaloidgehalte meist in der

Zeit der Blüte und der Frucht/Samenbildung erreicht werden. In seneszierenden Organen nimmt dagegen der Alkaloidgehalt meist dramatisch ab. Ferner beobachtet man bei vielen Pflanzen, daß die Samen besonders hohe Alkaloidgehalte aufweisen, die dann während der Keimlingsentwicklung wieder abgebaut werden. Auch konnte man für eine Reihe von Pflanzen zeigen, daß die Alkaloidgehalte tagesrhythmisch schwanken können (Abb.1).

Nur wenige Alkaloidgruppen sind bislang biochemisch und pflanzenphysiologisch im Detail bearbeitet worden. Tab.2 zeigt am Beispiel der Lupinenalkaloide (Wink 1987, 1988, 1992a-c), daß in allen Fällen der Alkaloidstoffwechsel ausgesprochen komplex verläuft, mit gegesteuerten Prozessen auf der Ebene der Biosynthese, des Transports, der Akkumulation und des Abbaus. An all diesen Prozessen sind Proteine und Nucleinsäuren beteiligt, die einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen sind. Zusätzlich zu den eigentlichen Energiekosten (in Form von ATP) für die Biosynthese und die Speicherung der Alkaloide selbst, müssen die Kosten für die Synthese und Abbau der Proteine und Nucleinsäuren gezählt werden, d.h. der Stoffwechsel der Alkaloide kostet die Pflanze recht viel Energie. Zusätzlich muß man bedenken, daß der Stickstoff für die Pflanze meist limitiert und wachstumsbegrenzend ist. Schon aus diesen Gründen heraus wäre es äußerst unwahrscheinlich, daß gerade stickstoffhaltige Abfallprodukte synthetisiert würden.

Tab.2. Übersicht über die Produktion von Chinolizidinalkaloiden in der Pflanze (Lupine)

Biosynthese:	Lokalisierung im Chloroplasten Steuerung durch Licht (diurnale Rhythmik)
Transport:	Nahtransport in Vacuole Membrantransport durch Carriersystem Ferntransport über Phloem in übrige Organe
Speicherung:	Akkumulation in Epidermen von Blättern und Stengeln Anreicherung in Samen
Abbau:	Regelmäßiger Turnover Nutzung als N-Quelle bei der Keimlingsentwicklung.

Die Idee der Abfallprodukte stammt wahrscheinlich aus dem tierischen Stoffwechsel, der jedoch auf einer gänzlich anderen Basis beruht. Tiere sind heterotroph und gewinnen ihre Energie aus dem Abbau der mit der Nahrung aufgenommenen organischen Verbindungen. Dabei fallen vornehmlich stickstoffhaltige Abfallprodukte an, die meist als Harnsäure oder Harnstoff eliminiert werden. Pflanzen sind jedoch autotroph und gewinnen ihre Energie entweder photosynthetisch oder durch Abbau von zeitlich vorher aufgebauten und gespeicherten Kohlenhydraten oder Lipiden.

III. HYPOTHESE: FUNKTION IM PRIMÄRSTOFFWECHSEL

Immer wieder wird darauf hingewiesen, daß Alkaloide eine Funktion im Primärstoffwechsel der Pflanze haben könnten. Rein theoretisch wäre es bei dieser Hypothese schwer zu erklären, warum fast jede Pflanzenart ein eigenständiges Muster an Sekundärstoffen aufweist. Diese Mannigfaltigkeit steht geradezu im Gegensatz zum Primärstoffwechsel, der bei allen Organismen durch eine hohe Ähnlichkeit charakterisiert ist. Entsprechend gering sind denn auch die experimentellen Befunde, die diese Hypothese untermauern könnten.

Am nächsten kommt noch die Beobachtung, daß bei Lupinen ca. 10% des Stickstoffs, der im Phloem transportiert wird, auf Alkaloide zurückgeht (Wink & Witte 1984). Außerdem findet man bei Lupinen und vielen anderen Pflanzen, daß die Samen besonders alkaloidreich sind, und daß ihr Stickstoff während der Keimlingsentwicklung remobili-

Abb.1. Tagesrhythmische Schwankung des Alkaloidgehaltes in Blättern von *Lupinus polyphyllus* und von *Baptisia australis*.

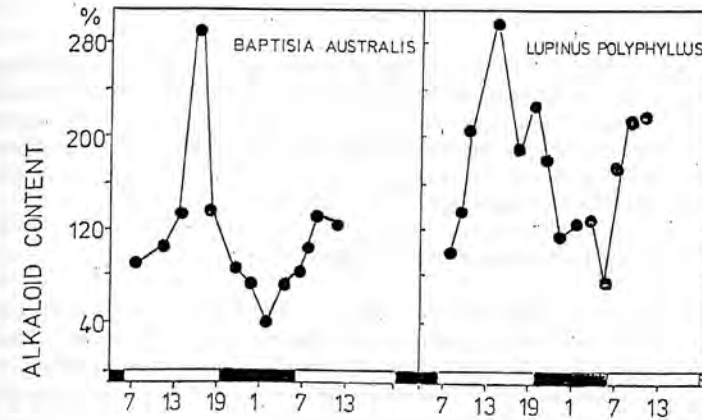
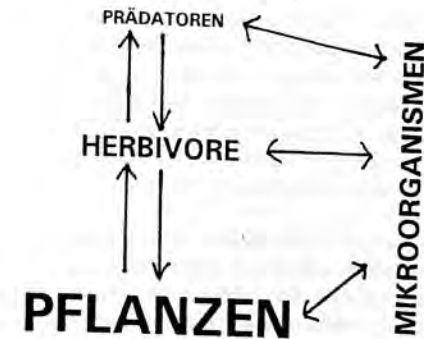


Abb.2. Aufbau der Nahrungspyramide



siert wird (Wink & Witte 1985). Demnach wären N-Transport und N-Speicherung mögliche Funktionen. Wie später gezeigt wird, handelt es sich hierbei jedoch höchsten um Nebenfunktionen, da die Hauptaufgabe gerade dieser Alkaloide in der chemischen Abwehr von Pflanzenfressern und Mikroorganismen zu suchen ist (Wink 1985, 1988, 1992b,c).

IV. HYPOTHESE: ALKALOIDE SIND FUNKTIONSLOS

Funktionslose Merkmale gehen in der Evolution im allgemeinen schnell verloren, zumal wenn ihre Aufrechterhaltung sehr viel Energie kostet (s. II). Da jedoch alle Pflanzenarten intensiv Sekundärstoffe produzieren, kann man auch diese Hypothese, die besonders von K. Mothes, der sich um die Alkaloidforschung besonders verdient gemacht hat, vertreten wurde, kaum aufrecht erhalten. Denn, wie im nächsten Kapitel ausgeführt, gibt es sehr viele Hinweise dafür, daß die Alkaloide ökologisch in der Auseinandersetzung der Pflanze zwischen Pflanzenfressern, Mikroorganismen und konkurrierenden Pflanzen bedeutsam sind.

V. HYPOTHESE: ALKALOIDE ALS SCHÜTZSUBSTANZEN

Die über 360.000 Pflanzenarten stehen als autotrophe Organismen in der Nahrungskette (Abb.2) ganz zu unterst, von denen direkt oder indirekt über 1 Million Tierarten abhängen. Pflanzen als auch Tiere werden von den Mikroorganismen als Substrat genutzt. Wir wissen in vielen Fällen, welche Strategien Tiere benutzen, um sich gegen Mikroorganismen oder gegen Fraßfeinde zu schützen. Da ist zum einen das hochentwickelte Immunsystem gegen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze, zum anderen sind es Waffen oder Verhaltensweisen (Flucht, Tarnung, etc.) gegenüber Fraßfeinden. Pflanzen sind unbeweglich und können deshalb nicht fliehen, noch können sie sich aktiv mit Waffen wehren. Und gegen Mikroorganismen fehlt ihnen ein Immunsystem. Wir können als gesichert annehmen, daß es nicht das Lebensziel einer Pflanze ist, gefressen zu werden, sondern daß jede Pflanzenart in der Evolution Strategien erworben hat, die ihr Überleben gewährleisten. Bis auf unsere Kulturpflanzen, die von uns Menschen besonders unter dem Aspekt der Ertragssteigerung selektiert wurden, wobei die natürliche Resistenz vernachlässigt oder in vielen Fällen sogar weggezüchtet wurden (s.u.).

Da Pflanzen sich im Allgemeinen sehr erfolgreich behaupten, muß man davon ausgehen, daß sie über wirksame Abwehrmaßnahmen verfügen. Wie in Tab.3. ausgeführt, muß man zuerst einmal die physikalisch-morphologischen Merkmale betrachten. Pflanzen sind nach außen meist durch eine wasserabstoßende Kutikula abgeschlossen, die sicher den Mikroorganismen ein Eindringen erschwert. Dornen, Stacheln, Drüsen- und Brennhaare sind sicher Strategien, mit denen Pflanzenfresser abgewehrt werden sollen. Die in vielen Pflanzen vorhandenen Milchsaftröhren und Harzkanäle enthalten unter Überdruck stehenden Milchsaft oder Harz, die herbivore Insekten bei einem Angriff geradezu überschwemmen und ihre Mundwerkzeuge verkleben.

Auf der biochemischen Ebene produzieren Pflanzen Enzyme, mit denen eingedrungene Bakterien (z.B. durch Lysozym), Pilze (durch Chitinase) oder Pflanzenfresser (z.B. Lektine, Protease-Inhibitoren) bekämpft werden können. Wohl die wichtigste Funktion spielen die Sekundärstoffe in diesem Zusammenhang, die konstitutiv, präformiert (z.B. Glucosinolate, cyanogene Glykoside, Coumaroylglykoside, Allicin und Ranunculin) werden erst im Verteidigungsfall durch Enzyme aktiviert) oder nur nach Induktion (z.B. nach Pathogenbefall) vorliegen. Im Folgenden möchte ich experimentelle Daten referieren, die klar belegen, daß die Hauptfunktion der Sekundärstoffe, insbesondere die der Alkaloide im Zusammenhang mit der chemischen Abwehr von Pflanzenfressern aber auch von Mikroorganismen und anderen Pflanzen zu sehen ist. In Tab.4 sind die Bedingungen zusammengefaßt, die erfüllt sein sollten, bevor wir diese Verteidigungshypothese akzeptieren können.

Tab.3. Verteidigungsstrategien der Pflanzen

1. Physischer und mechanischer Schutz

durch dicke Stamm- und Wurzelrinde mit abgestorbenen Fasern und Korkeinlagerung.
Epidermen mit hydrophoben Kutikularschichten, die zusätzlich antimikrobiell oder abschreckend wirkende Sekundärstoffe enthalten

Dornen, Stacheln, Drüsen- und Brennhaare

2. Schlechte Abbaubarkeit von Pflanzengewebe durch Zellulose, Kallose und Lignin;

schlechtes Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff

3. Offenes Wachstum, d.h. ein abgeissener Ast kann leicht ersetzt werden

4. Synthese von inhibitorischen Proteinen

Lektine, Protease-Inhibitoren, Chitinase, Lysozym, Hydrolasen, Nucleasen

Peroxidase und Phenolase zum Abbau von Phytotoxinen, die von Mikroorganismen produziert werden

Speicherproteine, denen essentielle Aminosäuren fehlen

5. Synthese von Sekundärstoffen

konstitutiv, präformiert oder induzierbar

zur Abwehr von Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilzen)

zur Abwehr von Herbivoren

zur Abwehr von konkurrierenden Pflanzen (Allelopathie)

Tab.4. Voraussetzungen für die chemische Verteidigung

1. Reinsubstanzen müssen dosisabhängige Hemmaktivitäten aufweisen

2. Die Menge an Sekundärstoffen in der Pflanze muß ausreichend hoch sein.

3. Die Abwehrstoffe müssen am rechten Ort und zur rechten Zeit verfügbar sein

4. Sekundärstoffe sollten nachweislich zur besseren Fitness beitragen (s. Vergleich Süß- zu Bitterlupine)

Für die Reinsubstanz oder für die Substanzgemische müssen sich *in vitro* klare Dosis-Wirkungsbeziehungen nachweisen lassen. Die meisten Untersuchungen, die in diesem Zusammenhang vorliegen, wurden nicht im Hinblick auf chemisch-ökologische Fragen, sondern eher unter dem Aspekt; neue Wirkstoffe für die Medizin oder Landwirtschaft zu finden, unternommen. Diese Daten können jedoch einen Anhaltspunkt auf mögliche Wirkungen und ihre ökologische Bedeutung im gewissen Rahmen geben. Für ca. 500 Alkaloide liegen Informationen vor (Zusammenfassung in Wink 1992c). Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß vielfach nicht ökologisch relevante Dosierungen getestet wurden, d.h. manch ein Alkaloid wurde als "wirkungslos" eingestuft, das aber in den Konzentrationen, die in der Pflanze vorliegen, durchaus wirksam sein kann. Denn für medizinische Anwendungen sind meist nur Wirkstoffe interessant, die bereits in geringer Dosierung wirksam sind.

V.1. Interaktion Pflanzen - Pflanzenfresser

Da *Homo sapiens* und seine Haustiere teilweise zu den Herbivoren zu rechnen sind, liegt ein über die Jahrtausende

gesammeltes empirisches Wissen über die Giftigkeit von Alkaloiden und alkaloidhaltigen Pflanzen vor (Abb.3-11). So hat man früher die toxischen Eigenschaften zur Definition der Alkaloide mit herangezogen. Im Folgenden wird die Wirkung für Insekten und Vertebraten getrennt abgehandelt, da diese Organismen sich in unterschiedlicher Weise an ihre alkaloidhaltigen Wirtspflanzen angepaßt haben.

V.1.1. Evertbraten

Vom evolutionären Standpunkt aus betrachtet, zählen Insekten zu den erfolgreichsten Organismen unserer Erde und repräsentieren die größte Organismenklasse. Entomologen schätzen die Zahl der bestehenden Insektenarten auf wenigstens 1 Million Arten, aber tropische Regenwälder weisen vielleicht bis zu 30 Millionen Arten auf, die bislang unbekannt sind und möglicherweise längst ausgestorben sind, bevor sie entdeckt und wissenschaftlich untersucht werden können, da ihr Lebensraum so erschreckend schnell vernichtet wird.

Die meisten Insekten sind Pflanzenfresser und ihre Anpassung an Pflanzen und ihre Wehrchemie ist oft eng und komplex. Während Insekten die Pflanzen als Nahrungsquelle nutzen, sind viele Pflanzen andererseits auf Insekten zur Bestäubung und Samenverbreitung angewiesen. In diesem Zusammenhang finden wir häufig, daß Pflanzen Insekten einerseits durch chemische Signale locken (durch Farbstoffe, Düfte, Zucker oder Aminosäuren im Nektar), sie jedoch andererseits durch andere Sekundärstoffe daran hindern, Blüten, Samen oder Blätter zu fressen.

Die enge Assoziation zwischen Angiospermen und Insekten entwickelte sich in den letzten 200 Millionen Jahren. Manchmal wird von einer Koevolution zwischen Pflanzen und Insekten gesprochen. Es sollte aber beachtet werden, daß die engen Assoziationen, die wir heute beobachten, nicht unbedingt dieselben sind, wie sie vor Millionen von Jahren durch Koevolution entstanden.

Herbivore Insekten können in zwei große Lager unterteilt werden, die sich in ihren Strategien gegenüber der Wehrchemie der Pflanzen substantiell unterscheiden. Während die polyphagen Arten ein weites Wirtsspektrum nutzen, sind die mono- und oligophagen Arten nur auf eine oder eine kleine Anzahl, gewöhnlich verwandter Arten spezialisiert.

Polyphage Insekten sind meist mit einer vorzüglichen Sensorik in bezug auf pflanzliche Sekundärstoffe ausgestattet, die es ihnen erlaubt, die Qualität ihrer potentiellen Nahrungspflanzen zu evaluieren. Diese "Generalisten", wie wir diese Untergruppe auch klassifizieren können, werden gewöhnlich durch hohe Sekundärstoffgehalte vom Fressen abgeschreckt. Sie wählen eher die Arten mit wenig oder harmlosen Sekundärstoffen, wie z.B. unsere Kulturpflanzen, denen viele der ursprünglich vorhandenen Gifte abhanden gekommen sind. Oder sie wechseln ihre Wirtspflanzen regelmäßig, so daß die Chance, sich zu vergiften, verringert wird. Zusätzlich verfügen die meisten polyphagen Arten über aktive Entgiftungsmechanismen, wie mikrosomale Oxidasen (z.B. Cytochromoxidase p450) und Glutathionperoxidase, die mit der Nahrung aufgenommene Sekundärstoffe schnell abbauen und eliminieren.

Monophage Arten dagegen wählen ihre Wirtspflanze häufig gerade danach aus, ob sie ein gewisses Gift in größerer Menge produziert. Für diese "Spezialisten" sind die üblicherweise giftigen Sekundärstoffe häufig Phagostimulantien. Diese Insekten können die Wirtchemie entweder tolerieren (so z.B. kann man den Tabakschwärmer, *Manduca sexta*, nicht mit Nicotin, das für andere Tiere hochtoxisch ist, umbringen, da er an dieses Alkaloid seiner Wirtspflanze angepaßt ist), oder häufiger, sie speichern die pflanzlichen Gifte und nutzen sie zur eigenen Verteidigung aus (s.unten). Diese Beobachtung scheint der Abwehrhypothese auf dem ersten Blick zu widersprechen. Aber diese Spezialisten sind nur die "Ausnahmen der Regel", wie wir sie in der Biologie häufig finden. Man denke nur an das ungeheuer gut funktionierende Immunsystem der höheren Tiere, das aber von einigen Spezialisten, z.B. Grippeviren, regelmäßig "ausgetrickst" wird. Niemand würde das Immunsystem deshalb als funktionslos bezeichnen - man sollte es ebenso mit

der chemischen Verteidigung halten. Diese Spezialisten sind aber nur resistent gegenüber der ihnen bekannten Wirtchemie, aber gewöhnlich empfindlich gegenüber anderen Sekundärstoffen. Vergleicht man die große Anzahl an potentiellen Herbivoren in einem Ökosystem, die eine Pflanze fressen könnten, so ist die Anzahl der wenigen Spezialisten sehr klein und kann offensichtlich von der Pflanze toleriert werden.

Über 150 Alkaloide erwiesen sich bislang als entweder insektizid oder Insekten-abschreckend (Übersicht in Wink 1992b,c). Eine Auswahl ist in Abb.3 aufgeführt. Besonders insektizid sind Nicotin, Piperin, Lupinenalkaloide, Coffein, Gramin, Strychnin, Brucin, Lobelin, Berberin, Ephedrin und Steroidalkaloide. Ihre potentiellen Wirkmechanismen werden in den nächsten Kapiteln besprochen.

V.1.2. Vertebraten

Viele Alkaloide haben für Säugetiere einen bitteren oder scharfen Geschmack, so daß Pflanzen mit Alkaloiden auch meist gemieden werden. Beispiele für besonders bitter-schmeckende Alkaloide sind: Chinin, Strychnin, Brucin und Spartein, für scharf schmeckende Substanzen Capsaicin und Piperin. Diese sensorischen Qualitäten bestehen jedoch nicht gleichermaßen für alle Vertebraten: Wir haben eine größere Testserie mit jungen und erwachsenen Grau-, Streifen- und Kanadagänsen durchgeführt, die obligate Herbivoren sind. Sie verweigerten kaum Nahrung mit Alkaloiden oder stinkenden Naturstoffen, wie Amininen, wohl aber Nahrung, die für unsere menschliche Nase gut riecht: Etherische Pflanzenöle waren für die Gänse äußerst fraßabschreckend (M. Wink, D. Schneider, A. Hofer in Vorbereitung).

Neben dem unangenehmen Geschmack sind die meisten Alkaloide für Warmblüter, inklusiv *Homo sapiens*, ausgesprochen toxisch. Für über 150 Alkaloide sind entsprechende LD₅₀-Werte ermittelt worden (Übersicht in Wink 1992c) und Alkaloidpflanzen werden meist als "Giftpflanzen" deklariert. Besonders giftige Alkaloide, von denen nur wenige mg/kg Körpergewicht bereits zum Tode führen können, sind Aconitin, Coniin, Hyoscyamin, Brucin, Curarin, Ergocomin, Physostigmin, Strychnin, Colchicin, Germerin, Veratridin, Cytisin, Delphinidin und Nicotin. Auch einige Alkaloide, die von Tieren gebildet werden (s.VIII), fallen in diese Kategorie wie Batrachotoxin, Batrachotoxinin A, Anabasein, Glomerin, Maitotoxin, Nereistoxin, Palytoxin, Saxitoxin oder Tetrodotoxin (Übersicht in Habermehl 1983, Mebs 1989). Ihre Giftigkeit ist gewöhnlich nach parenteraler Applikation (i.v., i.p. oder s.c.) höher als nach oraler Anwendung.

Neben der Ganztier-Toxizität ist für über 180 Alkaloide die Zytotoxizität ermittelt worden (Übersicht in Wink 1992c). Beispiele einiger Alkaloide sind in Abb.4 zu finden. Auch diese Daten belegen die weite Toxizität von Alkaloiden gegenüber Tieren, d.h. Herbivoren.

Für eine Reihe von Alkaloiden ist es gelungen, die Mechanismen, die den toxischen Effekten zugrunde liegen, biochemisch und molekular aufzuklären. Insbesondere sind Hemmungen oder Modifikationen wichtiger zellulärer Zielstrukturen, wie DNA, RNA, Transcription, Replikation, Protein-Biosynthese, Membranstabilität, Elektronentransportketten, Zytoskelett, Enzyme und Rezeptoren von Neurotransmittern und Hormonen zu beobachten.

Beispiele für DNA-interkalierende oder DNA-bindende Alkaloide sind 9-Methoxyellipticin, Dictamnin, Ellipticin, Harmanalkaloide, Chinin und andere Chinolinalkaloide, Skimmianin, Avicin, Berberin, Chelerythrin, Coptisin, Fagaronin, Nitidin, Sanguinarin, Cycasin, Olivacin und Pyrrolizidinalkaloide. Viele der interkalierenden Substanzen sind planar und hydrophob, so daß sie gut zwischen die planaren Basenpaare GC und AT passen.

Während die DNA-modifizierenden Alkaloide die Replikation und Transcription meist indirekt hemmen, greifen andere Alkaloide direkt an den DNA- und RNA-Polymerasen an, wie z.B. Vincristin, Vinblastin, Chelilutin, Coralytin, Amanitin, Hippeastrin oder Lycorin.

Abb.3. Beispiele für insektizide Alkaloide

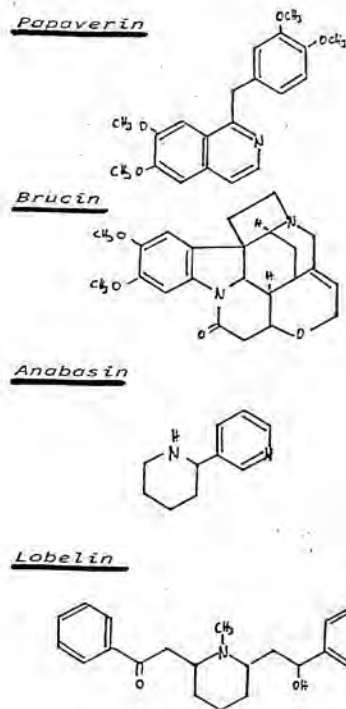
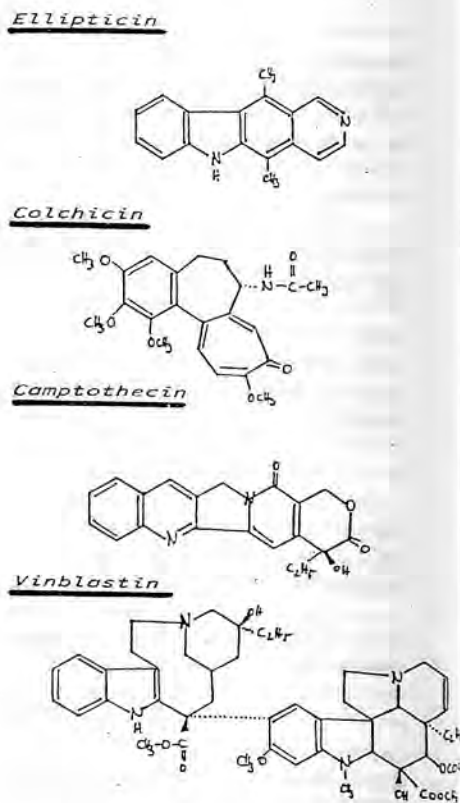


Abb.4. Beispiele für zytotoxische Alkaloide



Kurzzeiteffekte führen zum Absterben der Zellen, Langzeitwirkungen zu Mutation (Mißbildungen) oder Tumoren (Abb.5). Einige Alkaloide, wie Anagyrin, Anabasin und Coniin führen bei trächtigen Rindern und Schafen zu Kälbern mit verkrüppelten Beinen (sog. "crooked calf disease"). Einige der im Germer (*Veratrum album*) vorkommenden Steroidalkaloide, wie Cyclopamin, Jervin (Abb.5) und Veratrosin führen bei trächtigen Schafen, Ziegen und Rindern zur Ausbildung eines großen Zentralauges beim Nachwuchs. Die "Alten Griechen" haben diesen Effekt offensichtlich bereits gekannt, so daß die mythische Figur des Zyklops vermutlich eine reale Basis hatte. Man kann sich leicht vorstellen, daß Herbivore, die solche Wirtspflanzen nutzen, eine deutlich reduzierte Fitness aufweisen müssen. In der Tat werden Pflanzen, die reich an Anagyrin, Coniin, Anabasin oder Veratrum-Alkaloiden sind, von Tieren meist gemieden.

In Pflanzen der Gattung *Aristolochia* findet man einen ungewöhnlichen Alkaloidtyp, die Aristolochia-Säure, die eine Nitrofunktion aufweist (Abb.5). Dieses Alkaloid wird von Warmblütern wie Nitrosoamine verstoffwechselt und weist entsprechende carcinogene Aktivität auf. Ebenso carcinogen wirken die in ca. 3% aller Pflanzen vorkommenden Pyrrolizidinalkaloide, (Beispiel Senecionin in Abb.5) die erst durch eine Entgiftungsreaktion in der Leber zum alkylierenden Agens werden und Leberkrebs verursachen können (s.VII.2). Auch bei diesen Arten beobachtet man, daß sie von den meisten Vertebraten gemieden werden. Man kann dies auf Viehweiden leicht selbst beobachten: Die wenigen Pflanzen, die von Kühen nicht gefressen werden, sind z.B. das Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobaea*), das reich an PA ist.

Die **Protein-Biosynthese** ist ein weiterer wichtiger Angriffspunkt, der von den folgenden Alkaloiden gehemmt wird: Vincristin, Vinblastin, Emetin, Tubulosin, Tyramin, Spartein, Lupanin und andere Chinolizidinalkaloide, Cryptopleurin, Harringtonin, Haemanthamin, Lycorin, Narciclasin, Pretazettin, Tylocrebrin, Tylophorin und Tylocrepin.

Gegen **Elektronentransport-Ketten** (z.B. Atmungskette in Mitochondrien) gerichtet sind: Ellipticin, Pseudan, Alpinogenin, Sanguinarin, Tetrahydropalmatin, Capsaicin, DIMBOA und Solenopsin.

Die **Stabilität von Biomembranen** ist für die zelluläre Integrität und für einen geordneten Signalfluß von besonderer Bedeutung. Eine unspezifische Permeabilisierung von Biomembranen wird durch Ellipticin, Berbamin, Cepharanthin, Tetradrin, Irehdiamin und den Steroidalkaloiden verursacht. Die Steroidalkaloide (z.B. Tomatin, Solanin), die bei vielen Arten der Familie Solanaceae vorkommen, können Komplexe mit den Membransterolen, wie Cholesterol eingehen und so Zellen "löchrig" machen.

Eine überraschend große Anzahl Alkaloide moduliert hochspezifisch Ionenkanäle und Ionenpumpen (Beispiele in Abb. 6,7) und beeinflusst damit die zelluläre Ionenhomöostase und die Signalleitung der Nervenzellen. Im Falle der durch Neurotransmitter kontrollierten Ionenkanäle kann man die Alkaloide häufig als Strukturanaloge ansehen, die die natürlichen Liganden von ihrem Rezeptor verdrängen, die Rezeptoren oder die Enzyme, die Neurotransmitter desaktivieren, blockieren (Beispiele in Abb.7). Folgende Alkaloide fallen in diese Kategorie (Übersicht in Wink 1992c): Acronycin, Harmalin und andere β -Carbolinalkaloide, Chinin, Reserpin, Colchicin, Sanguinarin, Coffein, Spartein, Monocrotalin, Aconitin, Capsaicin, Cassain, Maitoxin, Ochrototoxin, Palytoxin, Pumiliotoxin, Saxitoxin, Solenopsin, Tetrodotoxin, Brucin, Ergot-Alkaloide, Eseridin, Serotonin, Physostigmin, Gelsemin, Strychnin, Yohimbin, Berberin, Bicuclulin, Bulbocapnin, Columbamin, Coptisin, Corlumin, Ephedrin, Galanthamin, Laudanosin, Plamatrin, Papaverin, Thebain, Cytisin und andere Chinolizidinalkaloide, Heliotrin und andere Pyrrolizidinalkaloide, Chaconin und andere Steroidalkaloide, Cocain, Atropin, Scopolamin, Arecolin, Dendrobin, Histronicotoxin, Muscarin, Nicotin, Pilocarpin, Psilocin, Psilocybin, Morphin, Mescaline, etc. Eine Anzahl dieser Alkaloide (Morphin, Mescaline, Psilocybin, Cocain, Scopolamin, etc) sind als halluzinogene Substanzen bekannt, die die Fitness eines Pflanzenfressers mit Sicherheit herabsetzen. Am Beispiel der strukturalogenen Neurotransmitter kann man deutlich

Abb. 5. Beispiele für Alkaloide mit mutagenen und carcinogenen Eigenschaften

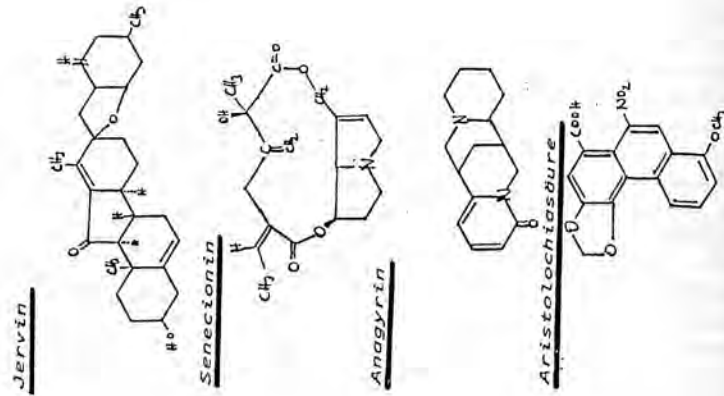
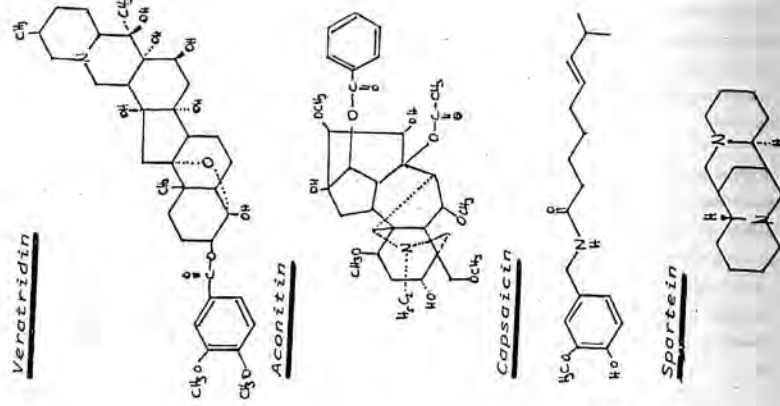


Abb. 6. Beispiele für Alkaloide, die Na⁺ und K⁺-Kanäle modulieren



erkennen, daß die Natur im Verlauf der Evolution so etwas wie "Molecular modelling" durchgeführt hat, indem die Struktur der Alkaloide solange abgewandelt wurde, bis sie an den Rezeptoren der Neurotransmitter binden konnten. Denn nur so sind sie biologisch hoch aktiv und als Verteidigungssubstanzen nutzbar.

Das Zytoskelett und der Spindelapparat mit den Mikrotubuli wird von Colchizin und verwandten Alkaloiden, von den dimeren Indolalkaloiden wie Vincristin, Vinblastin, und von Maytansin, Maytansin und Taxol angegriffen, die damit eine starke zytotoxische Wirkung aufweisen. Gerade das Taxol aus Eiben hat in letzter Zeit als potentielles Krebsmittel für einige Schlagzeilen gesorgt. Diese Alkaloide sind für Pflanzenfresser hochtoxisch, und Pflanzen, die diese Alkaloide produzieren, wie *Colchicum* oder *Taxus* werden fast immer gemieden.

Auch viele Enzyme werden durch Alkaloide gehemmt. An dieser Stelle soll nur auf die Klasse der Polyhydroxyalkaloide, wie Castanospermin und Swainsonin verwiesen werden, die selektiv Hydrolasen (wie β - und α -Glukosidase, Trehalase, Mannosidase oder Amylase) hemmen können. Auch "Second Messenger"-Systeme (Adenylatzyklase, Phosphodiesterase) sind Targets, die von Anonain, Isoboldin, Tetrahydroberberin, β -Carbolinalkaloide, Papaverin, Coffein, Theophyllin und Theobromin beeinflusst werden.

Die Modulierung zellulärer Zielstrukturen führt in vielen Fällen zu einer Beeinflussung von Gewebe- oder Organfunktionen. So ist für viele Alkaloide pharmakologisch belegt, daß sie das Zentralnervensystem und die Reizleitung zu den Muskeln, das Herz- und das Kreislaufsystem, Leber, Niere, das Verdauungssystem, die Reproduktion (Hemmung der Sexualfunktionen, der Gravidität u.a. abortive Wirkungen), Atmung und Immunsystem hemmen können. Hier sei auf die entsprechenden Lehrbücher der Pharmazeutischen Biologie und Pharmakologie verwiesen (z.B. Wagner 1989, Rimpler, 1990, Mutschler 1989). Man kann sich leicht vorstellen, daß die Fitness eines Herbivors durch solche Störungen gravierend beeinflusst werden kann; die starke Toxizität vieler Alkaloide ist schließlich die Konsequenz solcher zellulärer oder organspezifischer Störungen. Daß man viele Alkaloide in der Medizin nutzen kann, ist nur die andere Seite der Medaille: In niedriger Dosierung kommen häufig gewünschte Beeinflussungen von Organfunktionen zustande, bei höherer Dosierung überwiegen jedoch toxische Effekte.

Diese Zusammenstellung ist lückenhaft (Übersicht in Wink 1992c). Sie belegt jedoch, daß Alkaloide in der Evolution an zellulären Zielstrukturen, wie sie in Herbivoren vorkommen, optimiert wurden. Aber wie die folgenden Kapitel zeigen werden, wurden die Alkaloide offensichtlich multifunktionell entwickelt und zusätzlich gegen Mikroorganismen und gegen konkurrierende Pflanzen ebenso eingesetzt.

V.2 Interaktion Pflanzen - Viren

Pflanzen werden, wie alle anderen Organismen auch, von Viren und Viroiden befallen. Aufgrund der relativ aufwendigen Testmethoden sind bislang nur wenige Alkaloide auf ihre antiviralen Eigenschaften und auf ihre molekularen Angriffspunkte hin untersucht worden und dann meist nur in bezug auf ihre Wirkung auf human-pathogene Viren. Da Pflanzen- und Tierviren aber relativ ähnliche biochemische Mechanismen für ihre Vermehrung benutzen, darf man annehmen, daß die an Tierviren gefundenen Ergebnisse (wenn auch vermutlich mit Einschränkungen) auch auf die Pflanzenviren übertragen werden dürfen. Von den über 50 als antiviral beschriebenen Alkaloiden (Übersicht in Wink 1992c), sind in Abb. 8 vier Strukturen aufgeführt. Die Polyhydroxyalkaloide, von denen hier Castanospermin und Deoxynojirimycin genannt sind, wurden erst kürzlich als sehr potente Inhibitoren von Glucosidasen und Mannosidasen erkannt. Vermutlich wirken sie als kompetitive Inhibitoren aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu den natürlichen Substraten. Proteine, die von der Zelle sezerniert werden, - hierzu zählen auch die Membranproteine der äußeren Virusmembran- werden im Endoplasmatischen Retikulum modifiziert, indem zuerst ein Oligosaccharidrest an ein Asparagin des Proteins gekoppelt wird, von dem dann Glucose und Mannosereste im ER oder im Golgiapparat abgespalten werden. Vermutlich liegt hier der Ansatzpunkt der Polyhydroxy-Alkaloide. Auf der DNA-Ebene sind Replikation und Transkription Prozesse, die für die Virusvermehrung essentiell sind. Exemplarisch ist das

Abb. 7. Beispiele für Alkaloide, die an Rezeptoren von Neurotransmittern binden

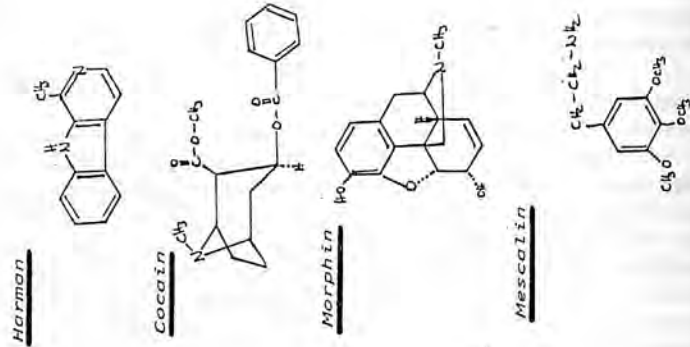
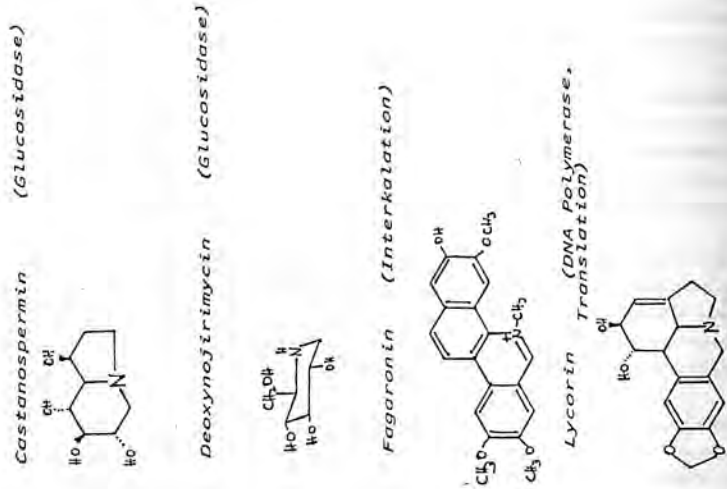


Abb. 8. Beispiele für antiviral wirksame Alkaloide



Benzophenanthridin-Alkaloid Fagaronin als DNA-interkalierende Substanz und Lycorin, einem Benzylisochinolin-Alkaloid der Amaryllidaceen als DNA-Polymerase-Inhibitor aufgeführt. Lycorin wirkt zusätzlich durch Hemmung der Proteinbiosynthese. Man kann also annehmen, daß gegen die möglichen Angriffspunkte, mit denen Viren bekämpft werden können, eine Reihe von Sekundärstoffen in den Pflanzen selektiert wurden, was natürlich für die Suche nach möglichen Therapeutica gegen virale Erkrankungen, z.B. AIDS relevant ist. Andere antiviral-wirksame Alkaloide sind Camptothecin, Chinin, β -Carbolinalkaloide, Acridonalkaloide, Cryptopleurin, Haemanthamin, Hippaestrin, Narciclasin, Pretazettin, Pseudolycorin, Spartein und Cinchonidin. Blattläuse und Wanzen sind wichtige Virusüberträger bei Pflanzen. Da Alkaloide bei diesen Insekten häufig fraßabschreckend wirken (s. V.1), kann auch ein indirekter Virusschutz über Alkaloide zustande kommen.

V.3. Interaktion Pflanzen - Mikroorganismen

Antibakteriell-wirksame Alkaloide: Da antibakterielle Wirkungen relativ einfach zu testen sind, wurden wesentlich mehr Alkaloide bereits in diesem Zusammenhang untersucht und über 190 Strukturen als wirksam erkannt. Da Bakterien vergleichsweise ähnlich in ihren biochemisch-molekularen Eigenschaften sind, dürfte es unwesentlich sein, daß die meisten Testorganismen keine pflanzentypische Bakterien darstellen. Weniger gut aufgeklärt sind die molekularen Angriffspunkte der Wirksubstanzen. In Abb. 9 sind einige Beispiele exemplarisch aufgeführt: Replikation und Transkription stellen wirksame Zielebenen dar; neben DNA-Interkalation, wie sie z.B. für das Benzophenanthridin-Alkaloid Sanguinarin beschrieben ist, hat man für die β -Carbolin-Alkaloide gefunden, daß sie nur dann antibiotisch wirken, wenn die Mikroorganismen nach Behandlung dem Licht ausgesetzt werden. Als Wirkungsmechanismus diskutiert man eine Photoadduktion des Alkaloids an die DNA. Die Proteinbiosynthese ist ein Angriffspunkt vieler weiterer Substanzen, z.B. des Isochinolin-Alkaloids Emetin oder der Chinolizidin-Alkaloide vom Lupanin-Typ. Die Integrität von Biomembranen ist essentiell und ihre Störung bei antimikrobiellen Wirkungen von Sekundärstoffen, z.B. Monoterpene (Thymol) oder von Saponinen im Vordergrund. In diesem Zusammenhang ist das Bisbenzylisochinolin-Alkaloid Tetrandrin zu nennen. An den Biomembranen laufen Elektronentransportprozesse ab, die z.B. vom Sanguinarin gestört werden können. Andere antibakteriell-wirksame Alkaloide sind Cinchophyllin, Dictamnin, Fagarin, Stemmadin, Liriodenin, Lysicamin, Oxonantenin, Solacasin, Rutacridon-Epoxid, Tryptanthrin und Tuberin (Übersicht in Wink 1992c).

Antifungal-wirksame Alkaloide: Pflanzen müssen gegen eine Vielzahl von Pilzen bestehen. Neben Saponinen, Mono-, Sesqui- und Diterpenen, phenolischen Substanzen (Isoflavone, Cumarine, Phenylpropane, Tannine, Flavane) muß man einige Alkaloide als antifungal-wirksame Komponenten ansehen. Über 120 Alkaloide wurden in diesem Zusammenhang beschrieben, darunter Dictamnin, Skimmianin, Berberin, Chelerythrin, Chelidonin, Dehydroglaucon, Liriodenin, Lysicamin, Samandarin, Sanguinarin, Thaligluconin, Demissidin, Solacasin, Soladulcidin, Solasodin, Tomatidin, Tomatin, Verazin, Cryptopleurin, Hydroxyrutacridon-Epoxid, Tryptanthrin und Tuberin (Übersicht in Wink 1992c) (Abb. 10). Die molekularen Ziele sind in vielen Fällen identisch mit denen, die bei den Toxizitätsmechanismen der Tiere besprochen wurden (s.o.). Hervorzuheben ist die starke antifungale Aktivität der Steroidalkaloide, die durch eine Komplexbildung der Membranstereotype erklärt wird.

In den letzten 10 Jahren hat sich immer mehr gezeigt, daß Pflanzen auf Pilzbefall reagieren können: Bereits 20 min nach Infektion kann die Aktivierung von Verteidigungsgenen festgestellt werden. Letztendlich kommt es zur Bildung von antifungal wirkenden Naturstoffen, die in der Phytopathologie "Phytoalexine" genannt werden. Stofflich handelt es sich aber um Phenole, Terpene oder Alkaloide.

An dieser Stelle soll auch auf die Verteidigungssubstanzen der Bakterien und Pilze hingewiesen werden, die funktionell als "Antibiotika" meist separat betrachtet werden. Chemisch gesehen stellen viele der Antibiotika jedoch Stickstoffheterozyklen dar, die man deshalb auch als Alkaloide ansprechen könnte. Ihre Wirkorte sind wesentlich besser untersucht:

Abb. 9. Beispiele für antibakteriell wirksame Alkaloide

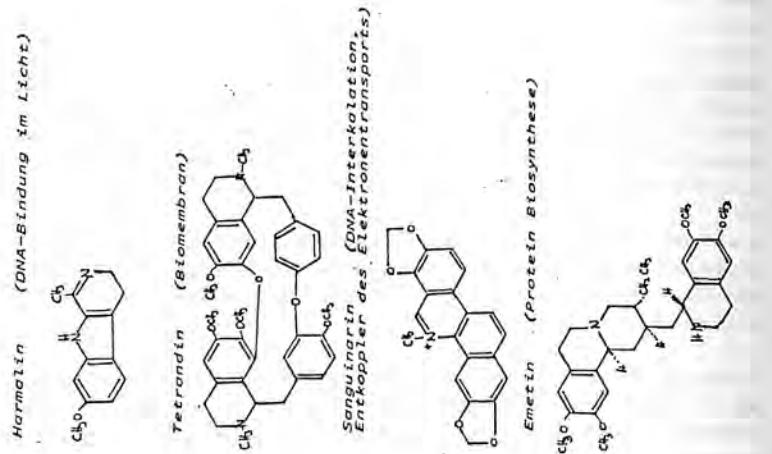
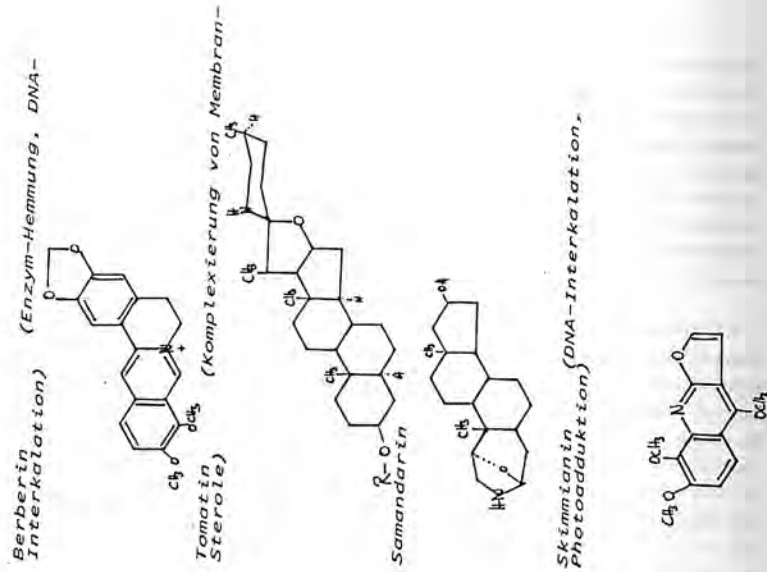


Abb. 10. Beispiele für antifungal wirksame Alkaloide



Interkalation oder Bindung an DNA: Actinomycine, Bleomycin, Calicemycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Esparymycin und Mitomycin C.

Hemmung von DNA- und RNA-Polymerasen: Actinomycine, Bleomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Novobiocin, Rifampicin und Rifamycin.

Hemmung der Translation: Actinobolin, Bleomycin, Chloramphenicol, Cycloheximid, Demeclocyclin, Erythromycin, Gentamycin, Josamycin, Kanamycin, Neomycin, Oxytetracyclin, Spectinomycin, Spiramycin, Streptomycin, Tetracyclin und Tobramycin.

Erhöhung der Membranpermeabilität: Amphotericin B, Calcimycir, Gramicidin, Nystatin A, Polymyxine A- und Tyrothricin.

Hemmung der Zellwandbiosynthese: Bacitracin, Cephalosporine, Cephamicine, Penicilline und andere β -Lactame und Vancomycin.

V.4. Interaktion Pflanze-Pflanze

Pflanzen stehen untereinander in Konkurrenz um Licht, Wasser, Nährstoffe und Raum. Neben anderen Lebensstrategien werden wahrscheinlich auch Sekundärstoffe eingesetzt, die das Keimen und die Keimlingsentwicklung anderer Pflanzen hemmen können. Insbesondere in Wüsten wird die allelopathische Interaktion deutlich (Übersichten in Rice 1984, Putnan & Tang 1986, Waller 1987). Sekundärstoffe werden entweder von den Wurzeln sezerniert, von den Blattoberflächen mit Regenwasser heruntergespült, oder stammen von abgeworfenen Blättern.

Allelopathische Substanzen hat man in allen Stoffklassen, u.a. bei den Alkaloiden (n=50) nachgewiesen. Neben einer Keimungshemmung wird meist eine Entwicklungshemmung von Keimlingen beobachtet. Bei Lupinen und *Colchicum* konnte gezeigt werden, daß die arteigene Entwicklung nicht durch die eigenen Alkaloide gehemmt wird.

Allelopathische Alkaloide sind: Chinin und andere Chinolinalkaloide, Harman-Alkaloide, Berberin, Sanguinarin, Veratrum-Alkaloide, Emetin, Chinolizidinalkaloide, Colchicin, Papaverin, Chelidonin, Castanospermin, Coffein, DIMBOA, Gramin, Deltosin, Delsolin, Nicotin und Trigonellin (Übersicht in Wink 1992c). Die molekularen Zielgruppen sind im Einzelnen noch nicht untersucht, dürften jedoch vielfach mit den oben diskutierten Toxizitätsmechanismen korreliert sein.

Damit ist klar, daß Alkaloide als multifunktionelle Wirkstoffe auch im Problemkreis Pflanze-Pflanze-Interaktion zu beachten sind. Zum Gesamtverständnis fehlen hier jedoch noch grundlegende experimentelle Studien.

VI. RAISON D'ETRE DER ALKALOIDE

VI.1. Vorkommen am rechten Ort, zur rechten Zeit und in der rechten Konzentration

Nachdem wir in Kapitel V gezeigt haben, daß Alkaloide multifunktionell sowohl antiherbivore, als auch antimikrobielle und allelopathische Aktivitäten haben können, stellt sich jetzt die Frage nach den Konzentrationen in der Pflanze. Leider werden in der phytochemischen Literatur meist nur die Strukturen der vorkommenden Substanzen ermittelt, seltener jedoch ihr quantitatives Vorkommen in den verschiedenen Pflanzenteilen, unterschiedlichen Entwicklungsstadien bzw. Jahreszeiten oder ihre interindividuelle Variation.

Für die Lupinenalkaloide haben wir die Zusammenhänge jedoch genauer untersucht und können definitiv belegen,

daß die in allen Organen der Pflanze gespeicherten Mengen an Chinolizidinalkaloiden meist deutlich höher liegen, als die *in vitro* ermittelten Hemmkonzentrationen (Übersicht in Wink 1992a-c). Besonders die für das Überleben und die Fortpflanzung wichtigen Teile (z.B. Samen) sind besonders alkaloidreich. D.h. die Pflanze geht meist "auf Nummer sicher". Für andere Alkaloidpflanzen dürften ähnliche Voraussetzungen gegeben sein.

Wenn Sekundärstoffe zur Verteidigung eingesetzt werden, so müssen sie zur rechten Zeit und am rechten Ort vorkommen (Tab. 4). Lupinenalkaloide werden z.B. nicht in allen Zellen, sondern bevorzugt in den Epidermen der Blätter und Stengel gespeichert, wo sie Konzentrationen zwischen 20 und 200 mM erreichen können. Aus Sicht der Chemischen Ökologie ist diese exponierte Lokalisierung besonders vorteilhaft, denn wenn ein kleines Herbivor oder ein Pathogen versucht, eine Lupine zu fressen und in sie einzudringen, so stößt es zuerst auf eine chemische Barriere. Die Speicherung vieler Alkaloide in der Rinde von Wurzeln oder Stämmen, wie z.B. von Berberin, Cinchonin oder Chinin dürfte ähnlich zu interpretieren sein.

Auch die Sequestrierung von Isochinolinalkaloiden und von Lobelin im Latex der Papaveraceen (*Papaver*, *Macleaya*, *Sanguinaria*) bzw. von Lobelin verstärkt ihre Abwehrfunktion. Wird eine solche Pflanze verletzt, z.B. durch einen Pflanzenfresser, so quillt der unter Druck stehende Latex heraus. Nicht nur werden die Mundwerkzeuge eines Insektes verklebt, es kommt zusätzlich noch zu einer Intoxifikation durch die vorhandenen Alkaloide, die deutlich insektizide Eigenschaften aufweisen (s.o.). Eine Wunde stellt einen potentiellen Infektionsherd für Mikroorganismen dar. Da diese Alkaloide außerdem starke antimikrobielle Wirkungen aufweisen (s.o.), kommt es zusätzlich zu einem antibakteriellen und antifungalen Schutz.

Diese wenigen Beispiele sollen zeigen, daß offensichtlich die Akkumulation und Speicherung der Alkaloide in den Pflanzen so optimiert wurde, daß sie an strategisch wichtigen Posten in ausreichend hoher Menge vorkommen.

Die meisten Alkaloide werden konstitutiv gebildet, d.h. sie sind immer vorhanden, was jedoch nicht heißt, daß ihre Konzentration immer gleich hoch ist. Für Lupinenalkaloide, Nicotin und Tropanalkaloide hat man zeigen können, daß die Alkaloide einen schnellen Turnover durchlaufen und tagesrhythmisch produziert werden (Abb.1). Dieses Phänomen überrascht auf den ersten Blick. Alle drei Alkaloidtypen binden an Acetylcholinrezeptoren von Tieren, aber nur dann, wenn sie intakt sind, d.h. in der richtigen Raumkonfiguration vorliegen. Dadurch, daß diese Alkaloide ständig neu produziert werden, kann die Pflanze sicher sein, daß auch wirklich aktive Moleküle vorliegen und nicht nur inaktive Razemate.

Auch für einige Alkaloide hat man gefunden, daß ihre Bildung im Verteidigungsfall noch verstärkt werden kann, so wie man es für andere Sekundärstoffe, wie z.B. für Isoflavone, Phenole, Terpene, Protease-Inhibitoren, Cumarine und Furanocumarine kennt. In Zellkulturen werden Sanguinarin, Canthin-6-on und Rutacridonalkaloide verstärkt gebildet, wenn die Zelle mit Elizitoren mikrobiellem Ursprungs gereizt werden. Nach Verwundung nimmt die Bildung von Chinolizidinalkaloiden in Lupinen, Tropanalkaloiden in *Atropa* und Aporphinalkaloiden im Tulpenbaum (*Liriodendron tulipifer*) deutlich zu, so daß der bereits vorhandene Antiherbivor-Effekt noch verstärkt wird (Übersicht in Wink 1992b,c).

VI.2. Bedeutung der Alkaloide für die Fitness der Pflanze

Die bislang dargestellten Argumente unterstützen klar die Hypothese, daß Alkaloide als chemische Verteidigungssubstanzen der Pflanzen anzusehen sind. Aber zusätzlich hätte man gerne experimentelle Befunde, daß diese Annahme auch wirklich stimmt, d.h. den Beweis, daß die Fitness und das Überleben einer Pflanze gesteigert ist, wenn sie Alkaloide produziert. Für Chinolizidinalkaloide in Lupinen läßt sich dieser Beweis tatsächlich antreten.

Abb. 11. Beispiele für allelopathisch wirkende Alkaloide

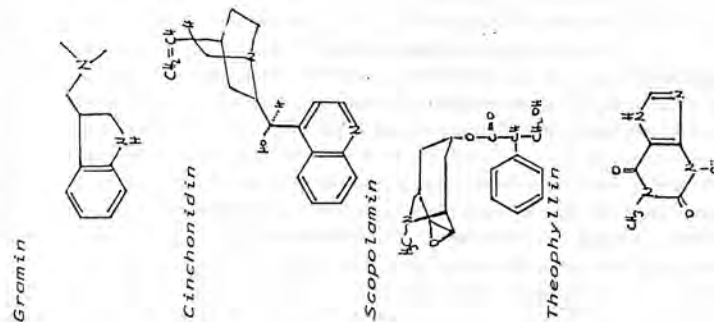
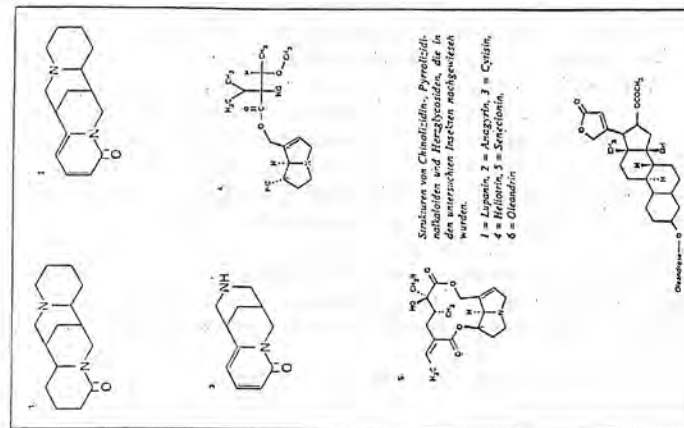


Abb. 12. Strukturen von Lupinenalkaloiden, Pyrrolizidinalkaloiden und Herzglykosiden.



Lupinen haben relativ große Samen, die bis 40% Protein und bis 20% Öl aufweisen können. Ernährungsphysiologisch ist die Lupine damit der Soyabohne ebenbürtig, wenn die Alkaloide nicht wären, die in Lupinensamen bis zu 2-8% des Trockengewichts ausmachen können. Um die Lupine nutzbar zu machen, haben deutsche Pflanzenzüchter vor 90 Jahren begonnen, alkaloidarme Varietäten zu selektieren. Obwohl solche Formen in der Natur äußerst selten sind, ist es inzwischen gelungen, nahezu alkaloidfreie Varietäten von *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. mutabilis* und von *L. polyphyllus* zu züchten. Die sog. Süßlupinen unterscheiden sich, soweit wir es heute wissen, nur in ihrem Alkaloidgehalt von den wilden, alkaloidreichen "Bitterlupinen". Diese Süßlupinen eignen sich bestens, um die Frage experimentell zu testen, ob die Lupinenalkaloide für die Lupinen denn wirklich von Vorteil sind. Im Gewächshaus, wo externe Bedrohungen fehlen, sieht man in der Tat keinen Unterschied zwischen Süß- und Bitterlupinen. Pflanz man Süß- und Bitterlupinen jedoch unter Freilandbedingungen ohne Zäune und ohne Pestizidanwendungen an, so sind die Unterschiede nicht zu übersehen, was jeder Lupinenanbauer bestätigen kann:

1) Werden die Süßlupinen bevorzugt von Schafen, Hasen, Kaninchen und Insekten, wie Blattläusen (Bohnen-, Pfirsich- und Erbsenblattlaus), Agromyziden, Käfern (*Sitona lineatus*), Thrips (*Franklinella*) befallen, so bleiben die alkaloidreichen Bitterlupinen nahezu unbeschadet stehen (ausführliche Darstellung in Wink 1985, 1988, 1992b).

2) Auch der Befall mit Bakterien, Pilzen und Viren scheint bei Süßlupinen erhöht zu sein, doch sind die Zusammenhänge nicht so klar zu erkennen.

Diese Experimente belegen die Wirksamkeit der Chinolizidinalkaloide insbesondere gegenüber Herbivoren und beweisen, wie wichtig die Alkaloide für die Lupine sind. Ähnlich wie bei den Lupinen ist man bei vielen unserer Kulturpflanzen vorgegangen: Ohne zu wissen, welche Bedeutung die ursprünglich vorhandenen Sekundärstoffe haben, hat man auf Ertrag gezüchtet und dabei sehr oft die Sekundärstoffe und damit die natürliche Resistenz der Pflanze verloren. Als Konsequenz muß man chemische Insektizide und Fungizide einsetzen mit den bekannten Problemen für unsere Umwelt.

Daß es auch anders ginge, zeigen neuere Entwicklungen auf dem Lupinensektor. Es ist technologisch möglich und ökonomisch vorteilhaft, aus den Samen der Bitterlupinen die Alkaloide zu entfernen. Bei diesem Prozeß, der z.B. von der Firma Mitex (Ravensburg) vorangetrieben wird, werden die bitteren Lupinensamen raffiniert, d.h. es wird reines Protein, Öl, Fiber und Alkaloide gewonnen. Während Ansatzmärkte für die ersten 3 Produkte bestehen, stellt sich die Frage nach dem "Wohin?" mit den Alkaloiden. Wir denken daran, dieses "Beiprodukt" der Raffinierung als natürliches Insektizid im Pflanzenschutz einzusetzen (s. Wink 1992d).

Jede Pflanzenart hat im Verlauf ihren eigenen Weg entwickelt um zu überleben. Wenn alle Arten das gleiche Konzept hätten, fielen es den Herbivoren und Pathogenen leicht sich anzupassen. Denn einmal angepaßt würde heißen, angepaßt für alle Arten. Dieser Selektionsdruck fördert die Mannigfaltigkeit, die wir gerade bei den Sekundärstoffen beobachten. Betrachtet man das Muster der Sekundärstoffe bei Pflanzen, so beobachten wir regelmäßig 1-5 Hauptalkaloide, die von bis zu 80 Nebenalkaloiden begleitet sein können. Dieses qualitative Muster ist nicht stabil, sondern variiert zwischen den Organen einer Pflanze, aber auch zwischen Individuen und Populationen einer Art. Wenn wir diese Substanzen auch häufig als eine chemisch einheitliche Gruppe betrachten, heißt das noch lange nicht, daß ihre physico-chemischen Eigenschaften und damit ihre biologischen Aktivitäten identisch sind. Hängt die Pflanze z.B. an die Lupinenalkaloide eine lipophile Seitenkette, z.B. beim 13-Tigloyloxylupanin, so wird das Molekül damit lipophiler und kann leichter in einen abzuwehrenden Organismus hineindiffundieren. In der Tat, liegt die insektizide Aktivität der Lupinenalkaloidester fast um den Faktor 10 höher als die der freien Alkaloide.

Für ein Herbivor oder ein Pathogen stellt die variable Zusammensetzung der Alkaloide eine schwierige Situation dar, da sie sich damit an eine größere Anzahl von aktiven Molekülen anpassen müssen. In der Medizin wird bei der Antibiotika-Therapie eine ähnliche Strategie verfolgt. Anstelle der Gabe von nur 1 Antibiotikum, was die Herausbildung

von resistenten Stämmen äußerst fördern würde, wird ein breites Spektrum von Antibiotika, manchmal sogar in Kombination eingesetzt.

Zusammenfassend kann man schon jetzt, obwohl noch viele Einzelheiten fehlen sagen, daß die Alkaloide mit Sicherheit keine wertlosen Abfallprodukte darstellen, sondern daß sie eine wichtige Rolle in der Verteidigung von Pflanzen gegenüber Fressfeinden und Mikroorganismen einnehmen.

VII. DIE AUSNAHME VON DER REGEL: DIE ANPASSUNG AN DIE CHEMIE DER WIRTS-PFLANZEN

Pflanzen, die sich erfolgreich verteidigen, stellen eine ökologische Nische dar, die nahezu frei von Herbivoren und Mikroorganismen ist. Es ist daher nicht überraschend, daß sich während der Evolution eine Reihe von Organismen herausgebildet hat, die sich geradezu auf diese Nische hin spezialisiert hat. Diese Organismen haben einen Weg gefunden, die Wirtschemie zu tolerieren oder sogar zum eigenem Nutzen weiterzuentwickeln. Verglichen mit der großen Zahl an potentiellen Feinden, ist die Zahl der angepaßten Spezialisten meist jedoch sehr klein. Meist herrscht ein "Status quo" zwischen Wirtspflanze und ihren Spezialisten, denn diese wären schlecht beraten, ihre Wirtspflanze auszurotten.

VII.1. Pilze und Bakterien

Spezialisten finden wir bei den Bakterien, Pilzen und Herbivoren, insbesondere den Insekten. Viele Bakterien und Pilze produzieren Phytotoxine, von denen man annimmt, sie wären nur dazu da, die Wirtspflanze zu schwächen. Aber möglicherweise ist dies nur die halbe Wahrheit:

Viele Gräser sind von Pilzen befallen, die Ergotalkaloide bilden. Bislang hatte man angenommen, daß diese Pilze, z.B. *Claviceps* ganz eindeutig parasitisch leben. Inzwischen mehren sich die Beobachtungen, daß es sich in Wirklichkeit um eine Symbiose handelt. Der Pilz lebt zwar von der Pflanze, bringt sie aber nicht um. Die von ihm produzierten Alkaloide sind ausgesprochen toxisch für Tiere, da sie an mehrere Rezeptoren für Neurotransmitter (Serotonin, Dopamin, Noradrenalin) binden können. Tatsächlich zeigt sich, daß Wirtspflanzen mit Pilzen einen deutlich verringerte Herbivorie zu beklagen haben, als pilzfreie Gräser. Wir nehmen an, daß ähnliche Zusammenhänge auch für andere Pflanze-Pilz-Interaktionen zu Tage treten werden.

VII.2. Insekten

Ein Pflanzenfresser, der erfolgreich überleben will, muß sich in vielfältiger Hinsicht mit der Wehrchemie seiner Futterpflanze auseinandersetzen. In diesem Zusammenhang werden viele koevolutive Prozesse und Anpassungen sichtbar, die aber erst bei wenigen Organismen gut erforscht sind, aber spannende Ergebnisse erwarten lassen.

Im Folgenden möchte ich auf die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe eingehen. Wir konzentrieren uns auf pflanzenfressende Insekten, denen es nicht nur gelungen ist, die Abwehrchemie ihrer Wirtspflanzen zu tolerieren, sondern in der Lage sind, diese Abwehrsubstanzen für die eigene Fitness zu nutzen, z.B. als Verteidigungssubstanzen, als Signalsubstanzen oder als Morphogene, die die Genexpression bzw. Entwicklung bestimmter Organe modulieren können.

Bei den von uns untersuchten Insektenarten handelt es sich besonders um Schmetterlinge, aber auch um Wanzen und Blattläuse; bei den Naturstoffen, die in diesen Interaktionen eine zentrale Rolle einnehmen, um Alkaloide (Pyrrolizidin- und Chinolizidinalkaloide) und Herzglykoside (S. Abb.12).

VII.2.1. Chinolizidin-Alkaloide (QA):

QA leiten sich biogenetisch von der Aminosäure Lysin ab und über 150 Einzelstrukturen sind bekannt, die sich vom

Alkaloidgrundgerüst, wie es im Lupanin oder Cytisin vorliegt (Abb.12) ableiten. Diese Alkaloide stellen die charakteristischen Inhaltsstoffe vieler Schmetterlingsblütler (Fabaceae) dar und zeichnen sich durch eine breite biologische Wirkung aus: Neben allelopathischen, antiviralen, antibakteriellen und antifungalen Aktivitäten schrecken sie das Fressen vieler Herbivoren ab und sind zugleich toxisch für die meisten Insekten und Vertebraten. Zellulär wurden mehrere Wirkorte erkannt: So hemmen QA z.B. die Proteinbiosynthese oder führen durch Aktivierung von Ionenkanälen und des Acetylcholin-Rezeptors zur gravierenden Störung der neuro-muskulären Reizleitung. Als Langzeitwirkungen wurde für einige QA, wie Anagyrin, mutagene Effekte beschrieben, die zu verkrüppelten Gliedmaßen bei neugeborenen Tieren führen. Aufgrund ihrer Giftigkeit (und bitteren Geschmacks) werden QA-Pflanzen, wie Lupinen, Ginster und Goldregen von Pflanzenfressern weitgehend gemieden.

Dennoch ist es einigen wenigen Herbivoren gelungen, in diese "ökologische Nische" einzudringen, indem sie nicht nur die Alkaloide tolerieren, sondern diese speichern und sie zur eigenen chemischen Verteidigung gegen Fraßfeinde einsetzen.

Von uns untersuchte Beispiele sind einige Blattlausarten, wie *Macrosiphum albifrons*, die auf Lupinen lebt, oder *Aphis cytisorum* und *A. genistae* auf Ginster und Goldregen. Hier konnte experimentell gezeigt werden, daß insektenfressende Käfer und deren Larven, wie Laufkäfer und Marienkäfer, nach Fressen von alkaloid-haltigen Blattläusen deutlich gelähmt oder sogar tödlich vergiftet wurden (Wink 1988, 1992a).

In einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Bernays (Department of Entomology, Tucson) untersuchen wir eine Schmetterlingsart, *Uresiphita reversalis* (Pyralidae), deren Larven auf QA-Pflanzen leben. Die Raupen nehmen Alkaloide vom Cytisin-Typ (der besonders toxisch ist) selektiv aus ihrer Nahrung auf und speichern sie in ihrer Haut. Die Alkaloidaufnahme erfolgt nicht passiv, sondern, wie wir experimentell zeigen konnten, unter Beteiligung eines Transportsystems, das offensichtlich nur bei QA-speichernden Insekten vorkommt (Wink et al. 1991). Bevor die Larve sich verpuppt, webt sie sich einen mechanisch stabilen Kokon, den sie zusätzlich chemisch schützt, indem sie ihre als Larve gespeicherten Alkaloide dorthin transferiert. Die Puppe und die schlüpfende Motte enthalten keine Alkaloide mehr. Fraßfeinde können offensichtlich erkennen, daß diese Raupen Alkaloide speichern und verschmähen sie im Wahlversuch. Das unterschiedliche Alkaloidspeicherverhalten von Larven, Puppen und Imagines, spiegelt sich auch im Verhalten und Aussehen der Tiere wider: Während die alkaloid-reichen Raupen bunt und auffällig gefärbt und tagaktiv sind, haben die Falter eine Tarnfärbung und leben versteckt (Wink et al. 1991, Wink 1992a).

VII.2.2. Pyrrolizidin-Alkaloide (PA)

Pyrrolizidinalkaloide, von denen über 200 Strukturen beschrieben sind, leiten sich von der Aminosäure Ornithin ab und kommen bei ca 3% aller Pflanzen, insbesondere bei Korbblütlern (Asteraceae) und Rauhblattgewächsen (Boraginaceae) vor. Neben einer Modulation von Ionenkanälen sind es mutagene und karzinogene Effekte, die diese Alkaloide als chemische Abwehrsubstanzen auszeichnen. Die letztgenannten Eigenschaften kommen erst dadurch zustande, daß die PA im Tier in der Leber "entgiftet" werden. Erst durch die dabei ablaufenden biochemischen Reaktionen entsteht ein Pyrrolderivat, das DNA alkyliert und damit mutagene und karzinogene Effekte verursachen kann. Als Verteidigungskonzept scheint dieses Prinzip gut zu wirken, da PA-haltige Pflanzen von den meisten Pflanzenfressern gemieden werden. Davon kann man sich auch leicht auf Viehweiden selbst überzeugen: Wenn alles andere bereits gefressen wurde, bleiben PA-Pflanzen wie das Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobaea*) meist unberührt stehen. Trotz dieser Toxizität ist es im Verlauf der Evolution einer Reihe von Insekten gelungen, sich auf PA-Pflanzen zu spezialisieren und die Alkaloide in vielfältiger Weise zu nutzen, wie z.B. unser "Haustier", der südost-asiatische Bärenspinner *Cretonotos transiens*. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D. Schneider (MPI für Verhaltensphysiologie, Seewiesen) konnten wir einige der biochemischen Prozesse aufklären, die im Zusammenhang mit der PA-Nutzung wichtig sind (Wink & Schneider 1988, 1990, Wink et al. 1988, 1990, Egelhaaf et al. 1990, v. Nickisch-Rosenegk et al. 1990): Die Raupen sind in der Lage, PA-haltige Nahrung zu erkennen; d.h. für sie sind PA nicht fraß-abschreckend sondern vielmehr Phagostimulantien. Die Raupen nehmen die Alkaloide selektiv aus ihrer Nahrung mit

Hilfe eines Transportsystems auf, während strukturell unterschiedliche Alkaloide nicht resorbiert, sondern mit dem Kot ausgeschieden werden. Nach Aufnahme werden die PA, wenn sie nicht bereits als N-Oxide vorliegen, in PA-N-Oxide umgewandelt. Ferner werden PA, deren Hydroxylgruppe in 7-Position S-konfiguriert ist in die R-Form überführt (was für die spätere Pheromonbildung wichtig ist). Die Alkaloide sind nach Aufnahme nur kurzzeitig in der Hämolymphe nachweisbar und werden bevorzugt im Integument, d.h. der Haut des Insekts abgelagert. Es ist bislang ein Rätsel, wie der Speicherprozess auf zellulärer Ebene bewerkstelligt wird, so daß die gespeicherten Alkaloide nicht die Raupe selbst schädigen. Im Gegensatz zur oben besprochenen *U. reversalis* verliert *C. transiens* seine Alkaloide nicht während der Verpuppung, sondern überführt sie in das fertige Imago. Hier finden dann jedoch spannende Umverteilungen statt: Beim Weibchen wird kurz vor dem Schlüpfen ein Teil der Alkaloide aus dem Integument mobilisiert und in das Ovar bzw. in die Eier transferiert. Das schließlich produzierte Gelege ist damit stark alkaloidhaltig (4-6 mg/ g Frischgewicht) und erhält damit einen chemischen Schutz vor Eiräubern. Aber auch die Männchen sind nicht tatenlos: Sie transferieren einen Teil der Alkaloide in ihre Spermatophore, die bei der Kopulation auf das Weibchen übertragen wird. So erhält das Weibchen PA als Brautgeschenk, das jedoch auf die Eier übergeht, die somit auch einen chemischen Schutz vom Vater mitbekommen. Für das Weibchen sollte es deshalb wichtig sein, einen Partner mit möglichst viel PA zu finden. Inzwischen ahnen wir, wie dies möglich ist: Von Prof. Dr. D. Schneider und Prof. Dr. M. Boppré wurde bereits 1982 gezeigt, daß nur männliche Raupen, die als Larve PA gefressen haben, als Falter große schlauchförmige Duftorgane (sog. Corema) an ihrem Abdomen ausbilden, die während der Balz aufgeblasen werden. PA-frei gezogene Tiere haben dagegen nur kümmerliche Coremata. Diese stark behaarten Duftorgane enthalten Pheromone, die sich biogenetisch von den gefressenen Alkaloiden ableiten, nämlich 7R-Hydroxydanaidal. Die Menge an Pheromon scheint mit der Menge an gespeichertem PA korreliert zusein, d.h. je intensiver so ein Bärenmann duftet, desto mehr PA hat er gespeichert, die er potentiell an seine Nachkommen weitergeben kann. Die Weibchen besitzen Chemorezeptoren auf ihren Antennen, mit denen sie Hydroxydanaidal riechen und damit ein PA-reiches Männchen erkennen können. Auf diese Weise tragen Weibchen und Männchen zur chemischen Verteidigung ihrer Nachkommen bei, indem sie Alkaloide aus ihren Futterpflanzen verarbeiten und weiterreichen. Ob diese im Labor klar zu Tage tretenden Zusammenhänge aber auch in der freien Natur stattfinden, darüber lassen sich z.Z. noch keine eindeutigen Aussagen machen. Dieses Beispiel illustriert bereits die Komplexität der möglichen Spezialisierungen, mit denen wir zu rechnen haben.

VII.2.3. Herzglykoside (HG):

Die Herzglykoside zählt man zur Gruppe der Steroidglykoside. Als Substituent am C-17 befindet sich bei den Cardenoliden ein einfach ungesättigter 2-Buten-1,4-diol-Ring, bei den Bufadienoliden dagegen ein zweifach ungesättigter 2,4-Pentadien-1,5-diol-Ring (Abb.12). Herzglykoside kommen bei einigen Scrophulariaceen, Apocynaceen, Asclepiadaceen, Liliaceen, Ranunculaceen, Brassicaceen u.a. Familien vor. Herzglykoside modulieren die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase des Herzmuskels und sind in höherer Dosierung stark wirksame Gifte für Vertebraten und Insekten. In der richtigen Dosierung sind sie jedoch wichtige und wertvolle Phytotherapeutika, die einen festen Platz in der Herzmedikation haben.

Während die meisten Herbivoren HG-Pflanzen meiden, haben sich einige Insekten geradezu darauf spezialisiert. Die Larven leben auf HG-Pflanzen und sind in der Lage, Herzglykoside zu speichern, die ihnen dann wiederum Schutz vor Prädatoren gewähren. Die meisten HG-speichernden Insekten sind auffällig gefärbt (sog. aposematische Färbung) und signalisieren bereits damit ihr chemisches Arsenal. Ein klassisches Beispiel der Chemischen Ökologie ist der Monarchfalter (*Danaus plexippus*), der von Blauhähern aktiv gemieden wird, sobald die Vögel einmal schlechte Erfahrung gemacht haben (d.h. wenn sie nach dem Fressen von einem Falter stark erbrechen mußten). In der Mimikryforschung spielen Schmetterlinge eine große Rolle, die dem Monarchen sehr ähnlich sehen und damit dessen chemischen Schutz mitnutzen, ohne selbst HG speichern zu müssen.

Wir untersuchen die Frage, wie diese Insekten die in der Nahrung vorhandenen HG aufnehmen, wie und wo sie ge-

speichert werden und wie die Insekten selbst das Problem der Autotoxizität meistern.

Die Ctenuchidenart, *Syntomeida epilais*, lebt als Larve nahezu ausschließlich auf dem HG-reichen Oleander (*Nerium oleander*). Cardenolide werden durch ein spezifisches Transportsystem in die Darmzellen aufgenommen, d.h. die Resorption erfolgt nicht durch freie Diffusion. Diese Anpassung ist offensichtlich nur bei den HG-speichernden Arten entwickelt, nicht aber bei den übrigen Arten, die keine HG akkumulieren, selbst wenn man sie ihnen über die Nahrung verabreicht. Sowohl die Larven als auch die fertigen Falter speichern die Herzglykoside, besonders in ihrem Integument. Beide Formen sind auffällig gezeichnet und sind tagaktiv. Ebenso wie die Monarchfalter werden sie von Vögeln weitgehend verschmäht.

Weitere "Haustiere" sind der Monarch und die Wanze *Oncopeltus fasciatus*. Zusätzlich zu den Aufnahmemechanismen wollen wir herausfinden, wie diese Insekten es erreichen, nicht ihre eigenen Na^+/K^+ -ATPasen zu hemmen. Wir nehmen an, daß dieses Enzym an den HG-Bindungsstellen so modifiziert ist, daß HG nicht länger binden können und so für den speichernden Organismus ungiftig sind. Durch molekularbiologische Methoden ist es uns unlängs gelungen (Frick, Holzinger, Wink, in Vorbereitung), das Gen, das für die Na^+/K^+ -ATPase des Monarchen kodiert, zu klonieren und zu sequenzieren. Unsere Annahme scheint sich zu bestätigen: Offensichtlich ist die Bindungsstelle für Herzglykoside blockiert, d.h. im Vergleich zu sensitiven Arten sind beim Monarchen 4 Aminosäuren ausgetauscht worden.

Um die hier kurz skizzierten Fragestellungen bearbeiten zu können, bedarf es der Verwendung besonders empfindlicher und leistungsfähiger Methoden aus den Disziplinen Biochemie, Physiologie, Molekularbiologie und der analytischen Chemie. Der Einsatz von HPLC, GLC, GLC-MS und NMR ist aus diesem Forschungsbereich nicht mehr wegzudenken und hat sicher entscheidend zu seinem Durchbruch beigetragen. Wir hoffen, daß der interdisziplinäre Ansatz von Biologie, Chemie und Pharmazie auch weiterhin Einblicke in die Geheimnisse der Natur ermöglicht, die als "Spin off" auch einige biotechnologisch verwertbare Ergebnisse liefern.

VII.3. Vertebraten

Während Insekten häufig wirtspflanzenstet sind, finden wir bei den herbivoren Vertebraten eher den Typ des Generalisten. Ausnahmen sind eher die Raufußhühner, die vornehmlich Ericaceen und Coniferen, Kreuzschnäbel, die Coniferensamen und Koalobären, die Eucalyptusblätter fressen.

Meist neigen Vertebraten jedoch dazu, sekundärstoffreiche Nahrungspflanzen zu meiden. Ferner wird die Nahrung von vielen, und nicht einer Pflanzenart gewonnen. Besonders ausgeprägt sind aber die Detoxifizierungsmechanismen, z.B. in der Leber durch Entgiftungsenzyme oder durch symbiotische Mikroorganismen im Magen- Darmtrakt. Einige herbivoren Tierarten, wie Affen, Papageien oder Gänse, fressen regelmäßig Erde. Wie wir für Gänse zeigen konnten (Wink, Schneider in Vorbereitung), bindet die aufgenommen Erde Alkaloide und schwächt somit deren Giftwirkung. Zusätzlich muß man bedenken, daß höhere Tiere intelligent sind und lernen können. Erfahrung spielt bei der Vermeidung von Vergiftungen eine große Rolle.

Während wir für die meisten Tiere keine Ahnung haben, wie sie das Problem der sekundärstoffreichen Nahrung meistern, können wir für das Herbivor *Homo sapiens* einige detaillierte Angaben machen. Bei dieser Art wird klar, daß sie durch die kulturelle Evolution einige Methoden erfand, die eigentlich im Wechselspiel Pflanze-Pflanzenfresser nicht vorgesehen waren:

1. Wir Menschen meiden normalerweise Nahrungspflanzen, die bitter und scharf schmecken oder intensiv riechen. Die Entwicklung von Bitterrezeptoren auf der Zunge muß in diesen Zusammenhang gesehen werden. Auf diese Weise werden viele alkaloid- und terpenreiche Arten vermieden.

2. Unsere Leber enthält noch immer eine Batterie an entgiftenden Enzymen, u.a. die Cytochrom Oxidase p450, die durch Sekundärstoffe und andere Xenobiotika (Umweltchemikalien oder Arzneimittel) induzierbar ist.

3. Neben diesen biologisch-physiologischen Strategien hat *Homo sapiens* auch sein Hirn in diesem Zusammenhang eingesetzt:

3a. Viele Früchte oder Gemüsearten werden geschält. Damit werden Alkaloide und andere Sekundärstoffe, die vermehrt in der peripheren Schichten gespeichert werden, selektiv entfernt. Beispiele sind die Steroidalkaloide in Kartoffelknollen, Cucurbitacine in Gurken, Terpene in Zitronen und Apfelsinen.

3b. Die meiste Nahrung wird gekocht oder gebraten. Dies führt zur thermischen Zersetzung vieler Gifte (z.B. Lektine, oder Proteaseinhibitoren). Andere Substanzen werden in das Kochwasser ausgeschwemmt (z.B. Alkaloide) und nach dem Kochen durch Abgießen entfernt.

3c. Indios in Südamerika essen Lehm, wenn sie alkaloidreiche Kartoffeln verspeisen. Durch diese Geophagie kommt es zur Adsorption der Alkaloide an die Erde und damit zur Giftminderung.

3d. *Homo sapiens* hat seine Kulturpflanzen sekundärstoff-frei gezüchtet. Wie oben bei den Lupinen erläutert, hat er sich jedoch damit das sekundäre Problem der Umweltschädigung durch Pestizide eingehandelt.

3e. Betrachtet man die über 300.000 Pflanzenarten, die unsere Erde besiedeln, so nutzen wir Menschen nur eine sehr kleine Anzahl an Arten für unsere Ernährung. Die meisten Pflanzenarten bleiben für uns ungenießbar, was die Bedeutung der Sekundärstoffe gut unterstreicht.

VIII. Produktion von Alkaloiden durch Tiere

In diesem Zusammenhang sollte man erwähnen, daß nicht nur Pflanzen Alkaloide produzieren, sondern auch einige Tiere dazu in der Lage sind. Die meisten dieser Arten haben gemeinsam, daß es sich um sessile, oder langsame und weichhäutige Tiere handelt, die sich nicht durch Waffen wehren können.

Marine Tiere, wie Würmer (*Nerets*), Mollusken, Schwämme, Zooanthide und einige Fische produzieren ihre eigenen Alkaloide, wie Acryloholin, Neosaxitoxin, Murexin, Pahutoxin, Palytoxin, Petrosin, Tetramin, 2,3-Bipiperidyl, Anabasein, Nemertellin, Nereistoxin. Landlebende Arthropoden synthetisieren Glomerine (*Glomerus*), Adalin (*Adalia*), Coccinellin, Euphoccocinin (Marienkäfer, *Coccinella*; *Epilachna*) oder Stenusin (*Stenus*). Ameisen des Genus *Solenopsis* produzieren giftige Piperidinalkaloide, die dem Pflanzenalkaloid Coniin sehr ähneln. Nicht nur niedere Tiere sind Giftproduzenten, sondern auch Vertebraten, wie Salamander, Kröten und Pfeilfrösche sind dazu fähig; *Dendrobates* enthält Steroidalkaloide, wie Batrachotoxin, Pumiliotoxin A-C, Gephyrotoxin oder Histronicotoxin in seiner Haut. Von den südamerikanischen Eingeborenen wurden diese Alkaloide als Pfeilgifte eingesetzt. *Salamandra maculosa* produziert das toxische Salamandrin und Derivate, die paralytisch und antibiotisch wirken. Kröten enthalten in ihrer Haut Herzglykoside und Alkaloide wie Adrenalin, Bufotenin und Bufotoxin.

Die Tiergifte stammen entweder aus den Wirtspflanzen (s. VII.2) oder werden selbst synthetisiert. Gemeinsam ist die Nutzung als chemische Abwehrsubstanzen. In diesem Zusammenhng ist es verwunderlich, daß man seit jeher diese tierischen Sekundärstoffe als Verteidigungssubstanzen angesehen hat, während man die analoge Situation bei Pflanzen gänzlich anders interpretiert hat.

IX. AUSBLICK

In diesem Vortrag habe ich versucht aufzuzeigen, daß Sekundärstoffe keine funktionslosen Moleküle sind, sondern im Verlauf der Evolution als chemische Verteidigungsstanzen entwickelt wurden, die einen Schutz vor Pflanzenfressern, aber auch vor Mikroorganismen und konkurrierenden Pflanzen gewähren. Die Struktur dieser Schutzsubstanzen wurde durch "Molecular modelling" demaßen optimiert, daß sie häufig selektiv zelluläre Zielstrukturen wie Rezeptoren erkennen und modulieren können (s. Analoge der Neurotransmitter).

Da Pflanzenfresser und viele Mikroorganismen auf Pflanzen als Nahrung angewiesen sind, mußten sich Mechanismen entwickeln, die es diesen Organismen gestattet, die Wirtschemie zu vermeiden oder zu tolerieren. Bei einigen Tiergruppen, z.B. den Insekten haben sich enge Anpassungen herausgebildet, bei denen die Sekundärstoffe der Wirtspflanze aktiv aufgenommen und vom Insekt, z.B. als erworbene Schutzsubstanzen genutzt werden.

Diese interdisziplinäre Disziplin der Chemischen Ökologie, die zwischen Pflanzen, Tieren, Mikroorganismen und Naturstoffchemie angesiedelt wird, ist ein spannendes Feld, auf dem noch viele spannende Ergebnisse zu erwarten sind, insbesondere was die evolutiven Zusammenhänge betrifft.

DANK

Unsere Forschungsprojekte wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Danken möchte ich meinen Mitarbeitern und Kollegen, die an den besprochenen Ergebnissen maßgeblich beteiligt waren: Dr.P.Mende, Dr. E.von Nickisch-Roseneck, Dr.L.Witte, A.Detzel, P.Heidrich, F. Sporer, C.Frick, F.Holzinger, H.Wurm, U.Dostal und H.Martin.

Literatur (zitierte und relevante Übersichtsliteratur)

BALDWIN,I.T., *Oecologia* 75, 376 (1988)
BERNAYS, E.A., R.F. CHAPMAN, *Ecol. Entomol.* 2, 1 (1977)
BERNAYS,E.A. S.J. SIMPSON, *Adv. Insect Physiol.* 16, 59, 1982
BLUM,M.S. *Chemical defenses of arthropods*, 562 pp, Academic press, New York, 1981
BOPPRE,M. *Naturwissenschaften* 73,17 (1986).
BRATTSTEN, L.B. AND S. AHMAD, *Molecular aspects of insect plant associations*, Plenum Press, New York, 1986
CAMPBELL,B.C., R.J. MOLYNEUX, AND K.C.JONES, *J. Chem. Ecol.* 13, 1759 (1987).
DICOSMO,F. A. QUESNEL, M. MISAWA, S.G. TALLEVI, *Appl. Biochem. Biotech.* 14, 1010 (1987)
DIXON,R.A. AND C.L.LAMB, *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41,339, 1990.
DREYER,D. JONES,K.C. AND MOLYNEUX, R.J., *J. Chem. Ecol.*11,1045-1051,1985
DUSSOURD,D.E. C.A. HARVIS, J. MEINWALD, T EISNER, *Experientia* 45, 896, 1989
EDMUNDS,M. "Defense in animals",Longman, Harlow, 1974.
EGELJAAF,A. K. CÖLLN, B. SCHMITZ, M. BUCK, M. WINK, AND D. SCHNEIDER, *Z. Naturforsch.* 45c, 115, 1990.
EIMKE,A. M. ROWELL-RAHIER, J.M. PASTEELS, T. HARTMANN, *J. Chem. Ecol.* 17, 2376-2379, 1991.
EILERT,U. W.G.W.KURZ, AND F.CONSTABEL, *J. Plant Physiol.* 119, 65 (1985).
EISNER,T. (1980) in "Insect biology in the future" (M. Locke, S. Smith, T. Eisner, eds), pp 847, Academic Press, New York
FENICAL,W. In *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, S.W. Pelletier, ed, Vol 4, pp.276-330, Wiley, New York
FREY,F. F.E. WUERGLER, H. JUAN, C.B. HALL, U. GRAF (1985) *Arch. Toxicol.* 56, 151
GRISEBACH, H. AND J.EBEL, *Angew. Chem.* 90, 668 (1978).
HABERMEHL, G.H. AND H.C. KREBS, *Naturwissenschaften* 73, 459 (1986)
HABERMEHL,G., "Gifftiere und ihre Waffen". Springer, Berlin, Heidelberg, 1983.

HARBORNE,J.B. "Introduction to ecological biochemistry", Academic Press, London, New York, 1982.
JOHNSON, N.D.,RIGNEY, L., AND BENTLEY, B.L., *J. Chem. Ecol.* 15,2425-2434,1989.
JOHNSON,N.D. AND BENTLEY, B.B.,*J. Chem. Ecol.* 14, 1391-1403,1988.
KAISSLING,E. R.H. *Wright lectures on insect olfaction*, Simon Fraser Univ., Burnaby, 1987.
KEELER,R.F. J. *Tox. Environm. Health*, 1, 887 (1976)
KEELER,R.F. S.YOUNG, D. BROWN, G.F. STALLKNECHT, D. DOUGLAS, *Teratology* 17, 327 (1978).
KHAN, M.B.AND J.B. HARBORNE (1990), *Chemoecology* 1, 77
LARSON,R.A., K.A.MARLEY, R.W.TUVESON, AND M.R.BERENBAUM, *Photochem. & Photobiol.* 48,665 (1988)
LEVIN, D.A. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 7,121 (1976).
LEVINSON,H.Z. *Experientia* 32,408 (1976).
LOVETT, J.V. AND W.C. POTTS, *Plant and Soil* 98, 137 (1987).
MEBS,D., *Gifte im Riff*. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1989.
MEINWALD,J. *Pure & Appl. Chem.*, 62, 1325 (1990)
MERCCK Index, 11.th edition, Merck & Co, Rahway, 1989
NAHRSTEDT, A. *Planta Med.* 55,333, 1989.
NICKISCH-ROSENECK, E.V. AND M. WINK (in preparation)
NICKISCH-ROSENECK,E.V., D. SCHNEIDER AND M. WINK, *Z. Naturforsch.* 45c, 881, 1990
PASTEELS,J.M. M. ROWELL-RAHIER. *Annu. Rev. Entomol.* 28, 263, 1983
PREUSSER,H.J. G. HABERMEHL, M. SABLOFSKI, D. SCHMALL-HAURY, *Toxicol* 13, 285 (1975)
PUTMAN,AR, C.S. TANG, *The science of allelopathy*. 332 pp, J. Wiley, Chichester, 1986.
RICE,E.L. *Allelopathy*, 2nd edn., 422 pp, Academic press, New York, 1984.
RIMPFER,H *Pharmazeutische Biologie II, Biogene Arzneistoffe*, Thieme, Stuttgart, 1990;
ROBINSON,T. *The biochemistry of alkaloids*. 2nd ed., Springer, Heidelberg, New York, 1981
ROSENTHAL, G.A. AND D.H. JANZEN, "Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites", Academic press, London, New York, 1979.
ROSENTHAL,G.A., "Plant nonprotein amino acids and imino acids", Academic Press, London, New York, 1982.
ROTH,L. M.DAUNDERER, K.KORMANN, *Giftpflanzen, Pflanzengifte, Ecomed*. 3rd ed. 1984, Landsberg, München
ROWELL-RAHIER,M. J.M. PASTEELS, *J. Chem. Ecol.* 12, 1189, 1986
SCHLEE,S, "Ökologische Biochemie", Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1986.
SCHNEIDER, D. in "Perspectives in chemoreception behaviour", (R.F. Chapman, and E.A. Bernays, eds) p. 123, Springer, Berlin, New York.
SCHNEIDER,D. M. BOPPRE, ZWEIF, J., HORSLEY, S.B., BELL, T.W., MEINWALD, J., HANSEN, K.,DIEHL, E.W., *Science* 215, 1264, 1982.
SCHUMACHER,HM, H. GUNDLACH, F. FIEDLER, AND M.H.ZENK, *Plant Cell Rep.* 6, 410 (1987)
SWAIN, T.*Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 479 (1977).
SZENTESI,A. AND WINK, M. *J. Chem. Ecol.*17,1557, 1991
TEUSCHER,E. U. LINDEQUIST, *Biogene Gifte*. Fischer Verlag, Stuttgart, New York,1987.
TURSCH,B., D. DALOZE, M. DUPONT, J.M. PASTEELS, M.-C. TRICOT, *Experientia* 27, 1380 (1971)
VERPOORTE, R. in *Antiseptika* (A. Kramer et al., eds), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1987,
WAGNER,H. *Pharmazeutische Biologie*, Fischer-Verlag, Stuttgart, 3.ed. 1989
WALLER, G.R., AND NOWACKI, E., *Alkaloid biology and metabolism in plants*. Plenum Press, New York, London, 1978.
WALLER,G.R. "Allelochemicals: role in agriculture and forestry", *ACS Symp. Ser.* 330, 1987.
WHITACKER, R.W. AND R.P.FEENEY, *Science* 171, 757, 1971.
WINK, M. AND L. WITTE, *Z. Naturforsch.* 40c, 767 (1985)
WINK, M., HARTMANN,T.,WITTE,L., AND RHEINHEIMER,J., *Z. Naturforsch.* 37c,1081-1086, 1982.
WINK, M., HEINEN,H.J., VOGT,H., AND SCHIEBEL, H.M., *Plant Cell Rep.* 3,230-233, 1984.

- WINK, M., *Plant Syst. Evol.* 150,65-81, 1985.
 WINK, M., *Planta Med.* 53,509-514, 1987.
 WINK, M., *Proc. 3rd Intl. Lupin Conf.*, La Rochelle, pp 326-343, 1984.
 WINK, M., *Z. Naturforsch.* 41c,375-380, 1986.
 WINK, M. *ACS Symp. Ser.* 330,524-533, 1987.
 WINK, M. in "Methods of plant biochemistry" 1992a
 WINK, M. in *Focus on plant-insect interactions* 1992b
 WINK, M., in *The Alkaloids* (G. Cordell, Hrg.) Vol. 43 (1992c)
 WINK, M. AND D. SCHNEIDER, *Naturwissenschaften* 75, 524, 1988
 WINK, M. AND D. SCHNEIDER, *Z. Naturforsch.* 43c, 737, 1988
 WINK, M. AND D. SCHNEIDER, *J. Comp. Physiol. B* (1990)160, 389
 WINK, M. AND L. WITTE, *Entomol. Gener.* 15, 237, 1991
 WINK, M. AND L. WITTE, *Planta* 161, 519 (1984).
 WINK, M. AND RÖMER, P., *Naturwissenschaften* 73, 210-212, 1986.
 WINK, M. AND T. TWARDOWSKI, in *Allelopathy: Basic and applied aspects*, S.J.H. Rizvi and V. Rizvi, Chapman & Hall, London, 1992, pp129.
 WINK, M. C.B. MONTLLOR, E.A. BERNAYS, AND L. WITTE, *Z. Naturforsch.* 46c, 1991
 WINK, M. E. VON NICKISCH-ROSENEGK, AND D. SCHNEIDER, *Symp. Biol. Hung.* 39, 53, 1990.
 WINK, M. in "Cell culture and somatic cell genetics of plants", (F. Constabel and I.K. Vasil, eds.), Vol.4, p. 17, Academic Press, London, New York, 1987.
 WINK, M. *Planta* 158,365-368, 1983.
 WINK, M. *Theor. Appl. Genet.* 75, 225 (1988).
 WINK, M., *Z.f. Naturforsch.* 39c,553-558, 1984
 WINK, M., *Z. Naturforsch.* 38c,905-909, 1983.
 WIPPICH, C. AND WINK, M., *Experientia* 41,1477-1478, 1985.

DIE SUCHE NACH DEN GENEN DER ALKALOIDBIOSYNTHESE BEI

LUPINEN

Michael Hanke und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
 Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 364
 6900 Heidelberg

ABSTRACT

Search for the genes of alkaloid biosynthesis in lupins

Lupin alkaloids derive from lysine via cadaverine, which is directly used as a precursor for the tetracyclic quinolizidine alkaloids of the lupanine type. Only 3 enzymes seem to be necessary. Strategies are discussed to detect and isolate the genes which encode lysine decarboxylase and oxosparteine synthase. The respective molecular techniques are described.

RESUMEN

La búsqueda de los genes de la biosíntesis de alcaloides en lupinos

Los alcaloides de los lupinos derivan de la lisina via cadaverina, que es la precursora de los alcaloides tetracíclicos quinolizidínicos del tipo de la lupanina. Aparentemente sólo 3 enzimas son necesarias para la síntesis de dichos alcaloides. En este trabajo se discuten las estrategias y las técnicas respectivas para detectar y aislar los genes que codifican la lisina-descarboxilasa y la oxosparteína sintetasa.

1. EINLEITUNG

Seit langem versuchen die Pflanzenzüchter, durch traditionelle Züchtungsversuche Lupinensorten zu finden, die einen möglichst geringen Alkaloidgehalt aufweisen, da diese besser als Futtermittel (Samen oder Grünmasse) zu nutzen sind. Bei den heute angebauten Lupinensorten, die durch zahlreiche Züchtungsversuche entstanden sind, kann eine pragmatische Unterscheidung nach ihrem Alkaloidgehalt, in Süßlupinen und Bitterlupinen vorgenommen werden. Die sogenannten Süßlupinen produzieren weitaus weniger Alkaloide als die Bitterlupinen; ihr Alkaloidgehalt liegt meist unter 0,05% im Samen, während alkaloidreiche Bitterlupinen 2-8% Alkaloid in den Samen speichern.

Dieser Unterschied ist in der DNA, den Genen einer Pflanze gespeichert und bewirkt, daß die Synthese von Alkaloiden bei Süßlupinen stark herabgesetzt wird. Der Informationsgehalt der DNA kann auf verschiedenen Ebenen Einfluß

nehmen, vom Ablesen der Information (Transkription) bis hin zur Umsetzung in ein Protein (Translation).

Zum Beispiel könnte die Regulation von intakten Genen, die für die Synthese von Alkaloiden verantwortlich sind, gestört sein. Dies würde bewirken, daß sehr wenig von diesen Enzymen gebildet und damit verbunden auch wenig Alkaloid in der Pflanze synthetisiert werden kann.

Andererseits könnten Süßlupinen auch strukturell veränderte Biosyntheseenzyme besitzen. Dies würde bedeuten, daß normale Mengen der Enzyme für die Alkaloidsynthese gebildet werden, welche aber gegenüber den Enzymen einer Bitterlupine eine wesentlich geringere Aktivität besitzen, so daß weniger Alkaloid synthetisiert werden kann.

Der Unterschied zwischen Süß- und Bitterlupinen ist unzweifelhaft im Erbgut der Pflanze, in Form von DNA, gespeichert. Worin aber unterscheiden sich die Gene und wie wirkt sich dieser Unterschied in der Pflanze aus?

Enzymatische Versuche mit Zellsuspensionskulturen (WINK 1987a, WINK et al. 1992), Kreuzungsversuche zwischen Süß- und Bitterlupinen (WALLER & NOWACKI 1979) und die Beobachtung, daß Süßlupinen graduell sehr schnell wieder eine hohe Alkaloidbiosyntheserate entwickeln, wenn man sie nicht weiter selektiert, sprechen dafür, daß die erstgenannte Vorstellung vermutlich richtig ist.

Die Frage kann endgültig nur mit Hilfe von modernen molekularbiologischen Untersuchungsmethoden beantwortet werden. Der in dieser Zusammenfassung aufgeführte Weg soll zeigen, wie man mit Hilfe von molekularbiologischen Arbeitstechniken bisher unbekannte Gene aus einem Organismus (und dies trifft für die Gene der Lupinenalkaloid-Biosynthese zu) isolieren und charakterisieren kann.

Um eine Antwort auf die Frage nach der Alkaloidmenge bei verschiedenen Lupinenvarietäten zu geben, bedarf es einer gezielten Suche nach den Genen, die für die Biosynthese der Alkaloide eine Rolle spielen. Die Tatsache jedoch, daß über diese oder ähnliche Gene keinerlei Information vorhanden ist, erschwert die Suche ganz erheblich. Bisher konnte man zwar den Ort der Alkaloidsynthese im Chloroplasten lokalisieren (WINK & HARTMANN 1982), sowie einige Enzymaktivitäten im Biosyntheseweg des Lupanins nachweisen (Review: WINK & HARTMANN 1985), jedoch liegen hochreine Enzymaufreinigungen, die man zur Sequenzierung einsetzen könnte, nicht vor. Wie gezeigt werden konnte, verläuft die Alkaloidbiosynthese vorwiegend in den Blättern der Pflanzen. Nach der Synthese können die Alkaloide in den Vakuolen der Blattzellen gespeichert werden oder über das Phloem in andere Pflanzenteile, zum Beispiel in die Samen oder Epidermen transportiert werden (Reviews: WINK, 1987b, 1992).

Ausgehend von der Aminosäure Lysin verläuft der Biosyntheseweg wahrscheinlich über zwei Zwischenstufen zu den Alkaloiden Lupanin und Spartein (Abb.1): Lysin wird durch das Enzym Lysin-Decarboxylase zu Cadaverin umgesetzt (SCHOofs et al. 1982) und anschließend entstehen aus drei Molekülen Cadaverin durch eine Transaminase das Produkt Dehydrospartein. Dieses kann von einem dritten, noch unbekanntem Enzym zu den Alkaloiden Lupanin und Spartein umgewandelt werden (WINK & HARTMANN 1985, WINK, 1987b) (Abb.1.).

Lupinen-ALKALOID - BIOSYNTHESE

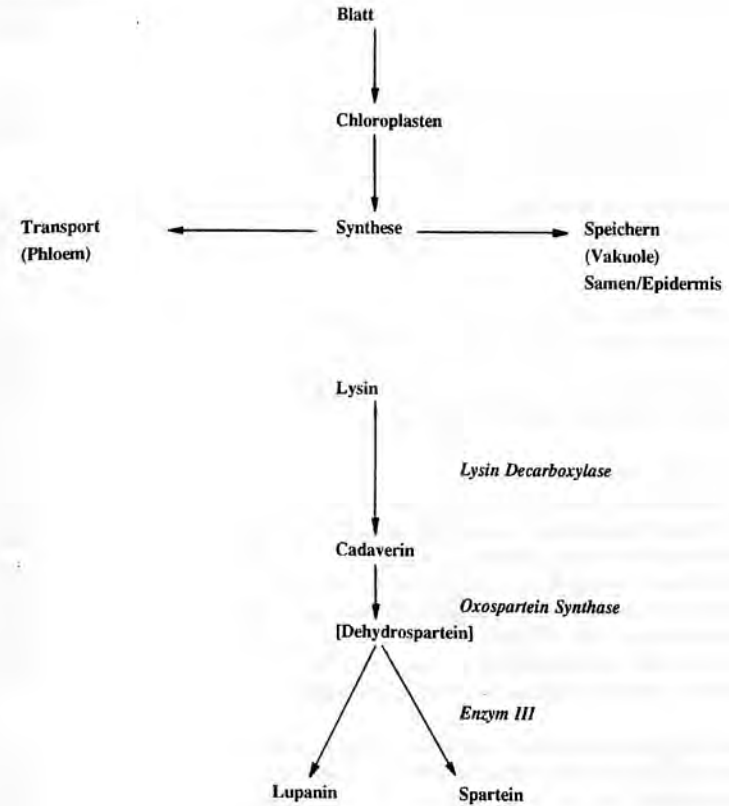


Abb. 1: Bildungsort und Biosynthese von Alkaloiden in Lupinen

Die Alkaloide werden bei *Lupinus*-Arten vorwiegend in den Blättern gebildet. Die Biosynthese verläuft in den Chloroplasten. Nach der Synthese können die Alkaloide in den Vakuolen der Blätter abgespeichert oder über das Phloem in andere Pflanzenteile, z.B. Stengelepidermen, transportiert und dort in den Vakuolen akkumuliert werden.

Die Biosynthese der Alkaloide Lupanin und Spartein geht von der Aminosäure Lysin aus. Lysin wird enzymatisch decarboxyliert, dabei entsteht Cadaverin. Über die Zwischenstufe des Dehydrospartein könnten aus drei Cadaverin Molekülen die tetrazyklischen Chinolizidinalkaloide Lupanin und Spartein gebildet werden.

2. DER WEG ZU DEN GENEN DER ALKALOID-BIOSYNTHESE

Die Voraussetzung einer "Gen-Suche" ist die Herstellung einer Genbank. Darunter versteht man eine Sammlung aller Gene eines bestimmten Organismus, aus der man die gesuchten Gene isolieren kann. Es gibt zwei Arten von Genbanken.

Zum Einen die **genomische Genbank**, die sämtliche Information eines Organismus beinhaltet, also auch die Information über die Regulation von Genen und über Bereiche, die keine direkte Information vermitteln, sogenannte Introns oder andere nicht-kodierende Sequenzen (s. SWATSCHEK & WINK, in diesem Band).

Zum Anderen gibt es die **cDNA-Bank**, die von ihrem Informationsgehalt kleiner, aber dafür wesentlich spezifischer ist, weil sie nur die Gene repräsentiert, welche in einem Teil der Pflanze, z.B. den Blättern, tatsächlich abgelesen werden.

Würde man von einer Süßlupine und von einer Bitterlupine eine genomische Genbank herstellen, so würde ein Vergleich aufzeigen, daß sich keine nennenswerten genetischen Unterschiede zwischen den beiden Varietäten ergeben. Führt man den Vergleich jedoch mit zwei cDNA-Genbanken durch, so müßte sichtbar werden, daß in der Bitterlupine die Gene für die Alkaloidsynthese angeschaltet sind, in der Süßlupine jedoch nicht. Dies kann man sich für die Suche und Isolierung der Alkaloid-Synthesene zu Nutze machen.

Die Erstellung einer cDNA-Bank ist ein komplexer Weg. Aus diesem Grund soll hier nur ein kurzer Überblick gegeben werden, wie man zu einer solchen Genbank gelangen kann. Als erstes beginnt man mit der Isolierung von RNA aus den zu untersuchenden Pflanzenzellen, in unserem Falle den Blättern, wo die Lupinenalkaloidsynthese stattfindet. Diese Gesamt-RNA besteht nur zu wenigen Prozent aus messenger RNA (mRNA), welche die Information der abgelesenen Gene widerspiegelt. Der Großteil repräsentiert ribosomale RNA (rRNA und tRNA). Nur die mRNA besitzt an einem ihrer Enden eine Sequenz aus etwa 100 Adenin-Molekülen, den sog. "Poly-A⁺-Schwanz", die man sich für eine Isolierung zu Nutze machen kann. Dazu wird in unserem Labor eine moderne und elegante Methode angewandt, bei der die mRNA mit Hilfe eines Magneten von der übrigen RNA getrennt wird (System Promega). Der genaue Mechanismus ist aus dem schematischen Diagramm in Abbildung 2 zu ersehen.

Da RNA gegenüber DNA wesentlich schwerer zu handhaben ist und es zudem noch keine geeigneten Klonierungsmethoden für RNA gibt, wird die mRNA zunächst in DNA umgeschrieben. Das Umschreiben von mRNA in cDNA (c=copy oder complimentary) wird von einem Virusenzym (Reverse Transkriptase) katalysiert. Nach der reversen Transkription ist die Information der mRNA in einem komplementären DNA Strang gespeichert. Der ursprüngliche RNA-Strang wird nun mittels RNase H abgebaut und mit Hilfe der DNA-Polymerase in einen zweiten DNA-Strang übersetzt. Diese cDNA wird nun kloniert, d.h. sie wird in einen geeigneten Vektor eingesetzt (z.B. in ein Plasmid) und anschließend in ein Bakterium eingeschleust (Transformation). Somit trägt jedes transformierte Bakterium ein Stück DNA aus einer Lupine in sich. Da aus einem Bakterium immer erbgleiche Bakterien hervorgehen (Klon), verdoppelt sich mit jeder Teilung des Bakteriums auch die Lupinen cDNA. Diese Art der Klonierung hat den Vorteil, daß die Lupinen DNA in unbegrenzter Menge vorhanden ist und sich in einem Organismus befindet, der leicht zu handhaben ist.

Da es sehr viele verschiedene mRNA Moleküle in einer Pflanzenzelle gibt und diese alle in cDNA umgeschrieben werden, gibt es auch sehr viele verschiedene Bakterienklone. Die Gesamtheit der Bakterien, in die ein cDNA Molekül kloniert wurde, bezeichnet man als cDNA Genbank.

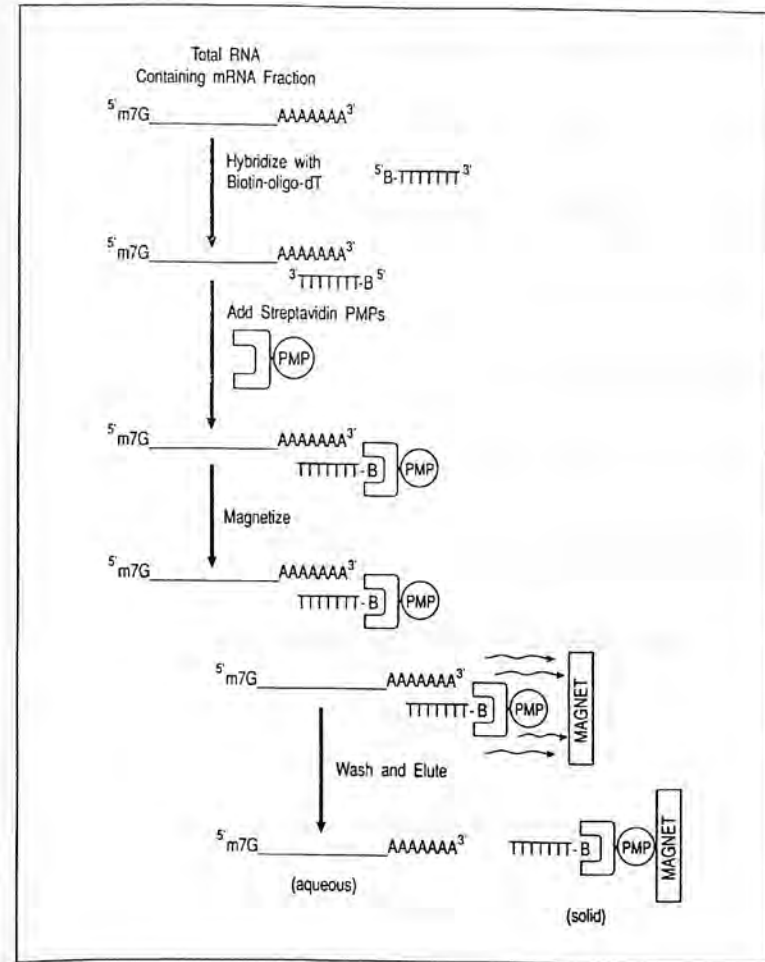


Abb. 2: Isolierung von mRNA aus einer Gesamt-RNA-Isolierung

Nur messenger RNA (mRNA) besitzt eine poly A⁺-Sequenz, an die sich komplementär ein kurzes Stück einer poly T-Sequenz ("Primer") binden kann. An diesem Primer ist ein Biotin-Molekül (B) gekoppelt, welches zu dem Protein Streptavidin eine sehr hohe Bindungsaffinität besitzt. Zusätzlich ist das Streptavidin mit einem paramagnetischen Partikel (PMP) gekoppelt, der sich nur innerhalb eines Magnetfeldes polar verhält. Wird der Komplex aus mRNA, Primer und Streptavidin-PMP einem magnetischen Feld ausgesetzt, so wird das PMP polarisiert und von dem Magneten angezogen. Die restlichen RNA-Moleküle werden nicht angezogen und verbleiben in der Lösung, die abgossen werden kann. Nach der Isolierung kann die mRNA wieder von dem Primer abgelöst werden und für die cDNA Synthese verwendet werden.

WEG ZUR ERSTELLUNG EINER cDNA GENBANK

- Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen
- Isolierung von mRNA (poly A⁺ RNA) aus Gesamt-RNA
- Umschreiben von mRNA in cDNA *Reverse Transkription*
- Einsetzen der cDNA in einen Vektor *Ligation*
- Vektor mit cDNA in Bakterien einschleusen *Transformation*
- Vermehrung der 'Lupinen Gene' in Bakterien *Klonierung*

Gesamtheit aller klonierten Lupinen Gene, die im Blatt exprimiert sind

cDNA BANK

Suche nach den Alkaloid-Biosynthese-Genen

screening

Abb. 3: Schematische Darstellung zur Herstellung einer cDNA-Genbank

Nachdem die mRNA isoliert wurde (siehe Abb.2), kann diese mit Hilfe eines Enzyms (Reverse Transkriptase) in komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Danach wird diese in einen Vektor eingesetzt und durch ein Enzym (Ligase) fest mit dem Vektor verknüpft. Bakterienzellen, z.B. *E. coli*, können mit diesem Konstrukt transformiert werden, so daß die Bakterien nun ein Stück Lupinen-DNA in sich tragen. Vermehrt man die Bakterien, so wird die DNA der Lupine mitvermehrt. Somit wurden Lupinen Gene in einen fremden Organismus kloniert.

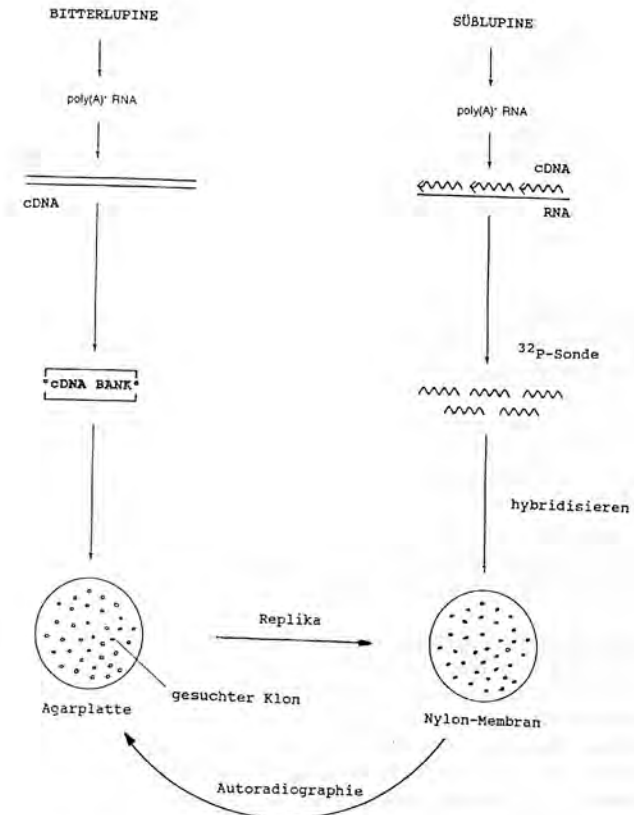


Abb. 4: Schematische Übersicht des differentiellen Screenings

Zum differentiellen Screening wird eine cDNA-Bank von einer Bitterlupine benötigt. In dieser Genbank sind Gene enthalten, die essentiell für die Alkaloidproduktion der Bitterlupine sind. Die Genbank besteht aus Bakterienkolonien (Klone), welche auf einem Nährmedium (Agarplatte) wachsen. Diese Klone enthalten jeweils ein spezifisches Lupinen-Gen. Von dieser Agarplatte wird ein Abdruck auf eine Nylon-Membran (Replika) gemacht, so daß einige der Bakterien daran haften. Als Screening-Sonde benutzt man cDNA einer Süßlupine. Bei der Synthese der cDNA werden radioaktiv markierte Bausteine (³²P-dCTP) hinzugefügt; somit kann diese cDNA somit als Sonde zur Detektion benutzt werden. Die Sonde bindet (hybridisiert) an komplementäre DNA Sequenzen von der cDNA Bank der Bitterlupine. Die Hybridisierung kann mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden (Autoradiographie). Dort wo eine Bindung mit der Sonde stattfindet, erscheinen die Klone schwarz. Da in beiden Lupinensorten fast alle Gene identisch sind (bis auf die Gene der Alkaloidbiosynthese), wird man überwiegend ein Signal erhalten. Nur Gene welche nicht, bzw. in sehr geringer Anzahl in der Süßlupine vorkommen, werden kein Signal bewirken. Diese Klone enthalten also Gene, welche nur in der Bitterlupine, nicht aber in der Süßlupine vorkommen, also u.U. unsere gesuchten Gene, die für die Enzyme der Alkaloidbiosynthese kodieren.

Nun gilt es, den Klon zu finden, der das gesuchte Gen in sich trägt, z.B. für ein Alkaloid-Biosynthese-Enzym. Diese Suche in einer Genbank wird als 'Screening' bezeichnet.

Da über das gesuchte Gen nichts bekannt ist, wird keine herkömmliche Form der Gensuche angewendet, sondern eine etwas modifizierte Form, das sogenannte "Differenzielle Screening":

Hierbei wird eine cDNA Bank von einer Bitterlupine benötigt (in der die cDNA von Alkaloid-Biosynthesegenen vorhanden sein muß), sowie cDNA von einer Süßlupine, in der die entsprechenden Transkripte nicht vorhanden sein sollten.

Durch *Differenzielles Screening*, (wie in Abb. 4 aufgezeigt), müßten die gesuchten Gene gefunden werden können. Nach einem *Differenziellen screening* erhält man somit Gene, die in der Bitterlupine, nicht aber in der Süßlupine abgelesen werden. Nachfolgend müssen die Klone noch identifiziert werden, was nicht einfach sein wird.

Zunächst wird die DNA sequenziert (z.B. nach der Didesoxymethode nach Sanger), d.h. die Nukleotidabfolge wird bestimmt. Die damit gewonnene Information kann mit bereits bekannten DNA-Sequenzen verglichen werden. Die gesamten DNA-Sequenzen, die bereits sequenziert wurden, sind in einer Großrechenanlage des EMBL in Heidelberg zusammengetragen, abgespeichert und für unsere Recherchen zugänglich. Findet der Rechner eine Homologie zwischen der DNA-Sequenz des isolierten Klons und den in einer Gen-Datenbank gespeicherten DNA-Sequenzen, so kann man Rückschlüsse auf das isolierte Gen ziehen. Da die Lupinenalkaloidgene oder verwandte Gene bislang unbekannt sind, werden wir bei dieser Recherche "leer" ausgehen.

Welche Möglichkeiten bleiben uns? Zur näheren Charakterisierung der isolierten Sequenz ist es möglich, diese in Protein übersetzen zu lassen und ihre biosynthetische Aktivität zu überprüfen, d.h. nach Aktivitäten der Lysin-Decarboxylase und Oxosparteïn-Synthase zu forschen. Dazu setzt man die spezifische cDNA in einen geeigneten Expressionsvektor ein und transformiert damit einen gewünschten Organismus. Dazu eignen sich bestimmte Bakterien, Hefen oder Zellkulturen. Die Information der cDNA wird in dem Organismus abgelesen und in ein Protein umgesetzt, das man weiter charakterisieren kann. Nach Aufreinigung des synthetisierten Proteins kann man das Molekulargewicht bestimmen und seine enzymatische Aktivität überprüfen, z.B. ob es eine spezifische Reaktion in der Biosynthese der Alkaloide katalysiert.

Würde der Nachweis positiv ausfallen, so wäre es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der isolierten DNA Sequenz aus einer Bitterlupine um ein kodierendes Gen für ein spezifisches enzymatisches Protein der Alkaloidsynthese handelt.

Hätte man ein spezifisches Gen für die Alkaloidsynthese gefunden, so könnte man gezielt in den Biosyntheseweg einer Pflanze eingreifen. Es wäre denkbar, das Gen in der Pflanze abzuschalten oder sogar so zu regulieren, um damit die Alkaloidbiosynthese zu steuern. Somit könnte man Pflanzen erzeugen, die während der Wachstumsphase und der Blütezeit sehr viel Alkaloide, aber während der Samenreife keine Alkaloide synthetisieren. Damit verbunden könnte keine Speicherung in den Samen stattfinden.

Ein weiteres Forschungsziel in unserer Arbeitsgruppe ist es, etwas über die Gene zu erfahren, die Proteine kodieren, die den Transport der Alkaloide über Biomembranen katalysieren (MENDE & WINK 1987). Wenn es möglich wäre, den Transport der Alkaloide in die Samen zu unterbinden, so könnte man Pflanzen züchten, die in den Blättern Alkaloide anreichern, nicht jedoch in den Samen. Solche Pflanzen würden ihre natürliche Resistenz gegenüber Pflanzenfressern in der Grünmasse bewahren, andererseits Samen liefern, die wie die Süßlupinensamen, direkt für die Tierer-

nährung eingesetzt werden könnten (WINK 1991).

Eine andere Möglichkeit, Gene für die Alkaloidsynthese zu nutzen, läge in der großtechnischen Herstellung von Alkaloiden. Die Alkaloide könnten aus Vorstufen synthetisiert werden, wobei die Enzyme für die Katalyse von klonierten Genen aus einer Pflanze stammen (*in vitro*). Wären die Gene des ganzen Biosynthesewegs bekannt, so könnte das Alkaloid von transgenen Bakterien oder Hefen in Fermentern synthetisiert (*in vivo*), anschließend aufgereinigt und z.B. zu pharmazeutischen Produkten weiterverarbeitet werden (vergl. WINK 1989).

Literatur

- WALLER, G.R., NOWACKI, E.K. 1979. Alkaloid biology and metabolism in plants. Plenum Press
- WINK M., WITTE L. (1984) Turnover and transport of quinolizidine alkaloids: diurnal variation of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus*. *Planta* 161:519-524
- WINK, M., HARTMANN, T. (1982) Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloids in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physiol.* 70, 74-77
- WINK M., MENDE P. (1987a) Uptake of lupanine by alkaloid-storing epidermal cells of *Lupinus polyphyllus*. *Planta medica* 53:465-469
- WINK M. (1987b) Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism and function in cell suspension cultures, *Planta medica* 53:509-514
- WINK, M. (1992). Quinolizidine alkaloids. In "Methods of plant biochemistry (in press)
- WINK, M., PERREY, R., SCHNEIDER, M., WARSKULAT, U., VON BORSTEL, K., MENDE, P. (1992). Alkaloid metabolism and gene expression in cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii* (in press)
- PROMEGA, Poly AT tract mRNA Isolation System, Serva Feinbiochemica, D-6000 Heidelberg, Carl-Benz-Strasse 7

GENEXPRESSION IN LUPINENZELLKULTUREN

Dorothee Maercker, Ralf Perrey, Michael Schneider und Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg

ABSTRACT

Gene expression in cell cultures of lupins

Cell cultures look microscopically undifferentiated. In order to understand the metabolism of lupin cell cultures with respect to alkaloid formation, the status of gene expression in these systems is analyzed and compared with that of different organs of the intact plant. Methods employed are the separation of proteins by 2D-electrophoresis and Northern analysis of cDNA clones which derived from a cDNA library of cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus*. Preliminary data of the Northern analysis show, that not only "house keeping" genes are expressed in cell cultures, but also stress-related genes, such as HSP 70 and HSP 60. It is assumed that cultured cells show a unique pattern of gene expression.

RESUMEN

La expresión genética en el cultivo celular de lupinos

Se estableció que microscópicamente el cultivo celular no muestra ninguna diferenciación. Se analizó la expresión genética del cultivo celular de lupinos y se la comparó con la de diferentes órganos de la planta intacta. El estudio se realizó, para poder entender el metabolismo de la formación de alcaloides. El método empleado fue la separación de proteínas por 2D-Electroforesis y el análisis Northern. Los materiales utilizados fueron clones de cDNA obtenidos de la biblioteca de cDNA de células en suspensión de *Lupinus polyphyllus*. Los resultados preliminares del análisis Northern mostraron que, no sólo los genes elementales "House keeping genes" se expresan en el cultivo celular, sino también aquellos relacionados con estados de estrés, como el HSP 70 y el HSP 60. Se presupone que el cultivo celular muestra un patrón único de expresión genética.

1. EINLEITUNG

In der intakten Lupine verläuft die Bildung der Chinolizidinalkaloide in einem koordinierten, aber äußerst komplexen Zusammenspiel von Biosynthese, Transport, Speicherung und Abbau (Übersichten: WINK 1987, 1992a, WINK et al. 1992). Wir nehmen an, daß die Komplexität notwendig ist, um die Alkaloide als chemische Abwehrsubstanzen in ausreichend hoher Konzentration am rechten Ort und zur rechten Zeit einsatzbereit zu haben (WINK 1992a,b).

Wir haben den Stoffwechsel der Lupinenalkaloide in Zellsuspensions- und Kalluskulturen von *Lupinus polyphyllus*, *L. albus*, *L. mutabilis*, *L. hartwegii*, *L. luteus* und anderen Leguminosentaxa wie *Cytisus*, *Laburnum*, *Baptisia* und

Sophora genauer untersucht (Übersichten: WINK 1987 a,b; 1990, WINK et al. 1983, 1992). Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Zellkulturen sind alle in der Lage, Lupinenalkaloide zu bilden. Während die intakten Pflanzen ein komplexes Alkaloidmuster aufweisen, wurde in den Zellkulturen fast ausschließlich nur Lupanin als Hauptprodukt nachgewiesen. Jedoch liegt die Gesamtmenge an produziertem Alkaloid um 2-3 Zehnerpotenzen niedriger als in der intakten Pflanze. Was sind die Gründe dafür? 1. Liegt die Aktivität der Biosynthesenzyme, Lyso-Decarboxylase und Oxosparteine Synthase, um ca 1 Zehnerpotenz niedriger. 2. Ist die Ausbildung von Chloroplasten und Licht für die Alkaloidbildung notwendig - in der intakten Pflanze verläuft die Alkaloid-Biosynthese im Chloroplasten. 3. Die produzierten Alkaloide werden in das Kulturmedium sezerniert, in dem sich aber ebenfalls alkaloidabbauende Enzyme, wie z.B. die Peroxidase befinden. 4. Die Kapazität der kultivierten Zellen, Alkaloide zu speichern, liegt um ein Vielfaches niedriger als in den spezialisierten Geweben, wie z.B. den Epidermen. 5. Der Abbau der Alkaloide scheint in den Zellkulturen verstärkt abzulaufen, die offensichtlich sogar Sparteine als N-Quelle nutzen können. 6. In differenzierten Sproßkulturen erfolgt eine deutlich höhere Alkaloidproduktion als in den undifferenzierten Zellsuspensionskulturen. Wurzelkulturen sind erwartungsgemäß völlig inaktiv.

Offensichtlich ist in der Zellkultur die Fähigkeit zur Biosynthese und Alkaloidspeicherung stark reduziert, aber gleichzeitig die Abbaupotenz drastisch erhöht. Wir nehmen an, daß eine räumliche Trennung von Biosynthese- und Speicherort notwendig ist, um zu einer optimalen Alkaloidproduktion zu gelangen. Eine koordinierte und differenzielle Genexpression müßte diesen Prozessen in der Pflanze zugrunde liegen. Um die zugehörige Genexpression im Einzelnen zu verstehen, haben wir begonnen, allgemein über die Genexpression in Zellkulturen im Vergleich zu den Organen der Pflanze zu arbeiten.

Man unterscheidet zwischen der primären und sekundären Genaktivität. Unter primärer Genaktivität versteht man die Bildung der einem Gen zugehörigen mRNA, also das Ausmaß der Transkription. Alle weiteren Etappen von der Translation bis zur Merkmalsbildung werden unter dem Begriff der sekundären Genaktivität zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß zur Feststellung der Genexpression die Bestimmung der primären Genaktivität gegenüber der sekundären Vorteile hat: Fehlerhafte Aussagen zur Genaktivität, die durch Abbau oder Abtransport eines Sekundärstoffes vorgetäuscht werden, sind hier ausgeschlossen.

2. METHODEN (RNA-ISOLIERUNG, cDNA-KLONIERUNG, DNA-SEQUENZIERUNG)

Am Beispiel von Zellkulturen von *Lupinus polyphyllus* sollen mit dem unten vorgestellten Verfahren Aussagen zur primären Genaktivität der Pflanzenzellen in Suspensionskultur, Kalluskultur im Vergleich zur derjenigen im differenzierten System, Blatt, Stengel und Wurzel gemacht werden.

Die primäre Genaktivität wurde wie folgt bestimmt: Zunächst wird aus Zellsuspensionskultur von *L. polyphyllus* mRNA isoliert und über Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Zellulose angereichert. Diese mRNA war biologisch aktiv, was durch Kontrollversuche in Reticulocytensystem belegt wurde (PERREY 1990). Diese mRNA wird durch Reverse Transkriptase in die sogenannte copy DNA (cDNA) übersetzt (s. Kapitel M. HANKE & M. WINK). Die erhaltenen cDNA-Moleküle wurden nun in Plasmide ligiert und in *Escherichia coli* kloniert (PERREY 1990, WARSKULAT 1990, SCHNEIDER 1990). Nach Vermehrung der Bakterienklone wird anschließend die Plasmid DNA isoliert und durch Sequenzierung nach der Didesoxynucleotid-Methode nach Sanger charakterisiert (SANGER et al 1977).

Bislang konnten wir die DNA-Sequenzen von 29 cDNA-Klonen ermitteln und mittels Protein- und Gendatenbanken (EMBL) charakterisieren. Diese Klone werden als pPLZ 01-29 bezeichnet. Einige dieser auf diese Weise definierten Lupinengene zeigen signifikante Homologien zu bereits bekannten Eukaryontengen: So kodieren pPLZ 08, pPLZ 09 und pPLZ 15 offensichtlich für ribosomale Proteine (WARSKULAT et al. 1991; MAERCKER & WINK, unveröff.); pPLZ 11 kodiert für ein basisches Isoenzym der Peroxidase (PERREY & WINK 1991); pPLZ 17 und pPLZ 18 kodieren

Kapillarblot

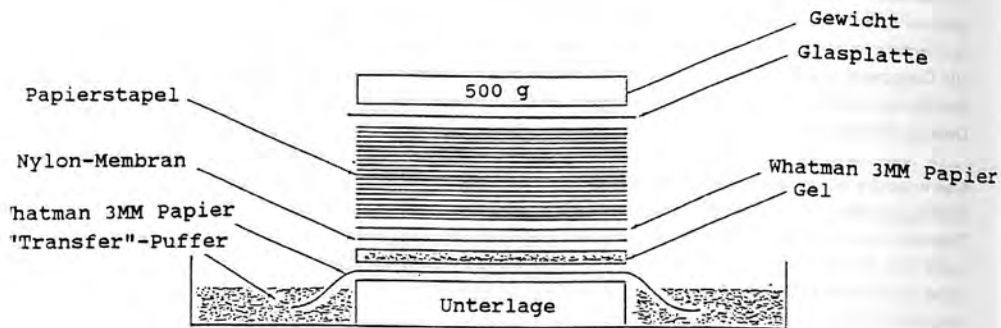


Abb.1: In einem Agarosegel aufgetrennte RNA wird durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen

Radioaktive Markierung von DNA mittels "Nick-Translation"

In diesem Verfahren wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase aus *E. coli* ausgenutzt, die sequentielle Addition eines radioaktiv markierten Nukleotids an den 3'-Terminus eines "nicks" (d.h. des Bruches einer Phosphodiesterbindung) mit der Eliminierung von Nukleotiden am 5'-Phosphoryl-Terminus des "nicks" zu koppeln.

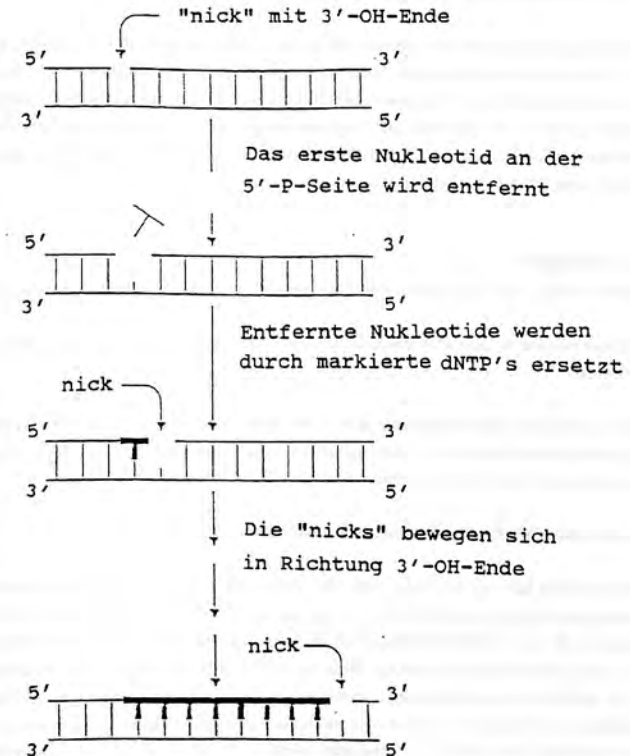


Abb.2: DNase- und DNA-Polymerase-Aktivität während der Nick-Translation

ren für zwei Hitzeschockproteine (HSP 70) (PERREY et al. 1991) bzw. (HSP 60; MAERCKER & WINK, unveröff.). Welche Proteine durch die anderen Sequenzen kodiert werden, ist noch unbekannt (PERREY et al. 1990 a,b; MAERCKER & WINK, unveröff.).

Von den isolierten cDNA-Klonen wissen wir, daß die zugehörigen Gene in Zellkultur angeschaltet waren. Mit diesen Klonen als Sonde können wir mittels der "Northernblot"-Analyse (SAMBROOK et al. 1989) analysieren, ob und wo dieselben Gene in der intakten Pflanze aktiv sind. Beim "Northernblot" wird die aus Zellen isolierte mRNA auf einem Agarosegel durch Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, sodann durch Kapillarsaufwirkung auf eine Nylonmembran übertragen ("Kapillarblot"-Technik) und anschließend durch Erhitzen auf 80°C immobilisiert (Abb. 1).

Die Membran wird anschließend mit dem zuvor durch ³²P-α dCTP radioaktiv markierten cDNA-Klon (Abb. 2) inkubiert, der mit der nachzuweisenden genspezifischen mRNA korrespondiert und daher mit ihr hybridisieren kann. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt über Autoradiographie mit Röntgenfilmen.

Die Stärke der in der Autoradiographie gefundenen Radioaktivität läßt eine semiquantitative Abschätzung der Expression des betreffenden Gens im untersuchten Gewebe zu. Läßt sich umgekehrt in der Autoradiographie keine Radioaktivität nachweisen, so konnte die jeweilige mRNA nicht isoliert werden, was auf eine dann ruhende Genaktivität im entsprechenden Organ zurückgeführt wird. Alternativ zur Northernanalyse kann die Genexpression auch über das "Dot-Blot-Verfahren" bestimmt werden (SAMBROOK et al. 1989), bei dem die isolierte mRNA auf ein Nylonfilter pipettiert und anschließend mit einer DNA-Sonde hybridisiert wird.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Es liegen bislang die Ergebnisse über die Genexpression von 15 der bislang 29 bekannten cDNA-Klone vor (Tab. 1).

Inwieweit stimmen nun Genexpression in Zellkultur einerseits bzw. in differenzierten Pflanzengeweben andererseits bei *Lupinus polyphyllus* überein?

1.) Alle untersuchten Gene sind in der Suspensionskultur aktiv. Dies ist auch zu erwarten, da die hier verwendete cDNA via mRNA einer Zellsuspensionskultur von *L. polyphyllus* gewonnen worden war (s. Methoden). Soweit bestimmt, sind diese Gene auch in der Kalluskultur angeschaltet (Tab. 1).

2.) Die Gene lassen sich nach dem erhaltenen Expressionsmuster in drei Gruppen einteilen:

Gruppe 1: Eine Expression läßt sich nur in der Zellkultur (Kallus sowie Suspension), also bei den entdifferenzierten Zellen nachweisen, nicht jedoch bei den Zellen der differenzierten Gewebe von Blatt, Stengel oder Wurzel (pPLZ 17). Dieser Klon kodiert für das Hitzeschockprotein HSP 70, das in der intakten Lupine nur nach Hitzeschock aktiv wird (PERREY et al. 1991). Hitzeschockgene werden durch Hitze, aber auch durch andere Stressfaktoren aktiviert. Wir nehmen an, daß die Kultivierungsbedingungen, sowohl in der Suspensions- als auch in der Kalluskultur, für die Zellen Stress darstellen, der chemisch, osmotisch oder mechanisch bedingt sein kann. Auch in anderen Zellsystemen wurde die verstärkte Expression von Stressgenen beobachtet, die für Chitinase, Osmotin-ähnliche Proteine, aber auch HSP70 kodieren.

Auch die Analyse der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese belegt, daß eine größere Anzahl von Genen ausschließlich in Lupinenzellkulturen exprimiert wird (SCHNEIDER 1990, WINK et al. 1992).

Gruppe 2: Man findet die Genexpression in Zellkultur und allen Pflanzengeweben. (pPLZ 02, pPLZ 09,

Tab. 1: Expression der cDNA-Klone, die aus *L. polyphyllus* Zellsuspensionskultur isoliert wurden, in Kalluskultur und in der intakten Pflanze
SK = Suspensionskultur, CK = Kalluskultur, ++ = hohe Expression, + = Schwache Expression, - = keine nachweisbare Expression

cDNA-Klon	Länge (bp)	Expression in					
		Zellkultur		Blatt	Pflanze		Wurzel
		SK	CK		Stengel		
pPLZ02	875	++	n.b.	++	++	++	++
pPLZ06	623	++	n.b.	++	++	++	++
pPLZ09	588	++	n.b.	++	++	++	++
pPLZ10	600	++	+	++	++	++	++
pPLZ11	701	++	n.b.	++	++	++	++
pPLZ12	790	++	n.b.	++	++	++	++
pPLZ15	650	++	++	++	++	++	++
pPLZ17	1005	++	++	-	++	++	++
pPLZ18	1500	++	++	++	++	++	++
pPLZ19	700	++	++	++	++	++	++
pPLZ22	800	++	++	++	++	++	++
pPLZ23	1000	++	++	++	++	++	++
pPLZ24	600	++	++	++	++	++	++
pPLZ26	380	++	++	++	++	++	++
pPLZ27	900	++	++	++	++	++	++

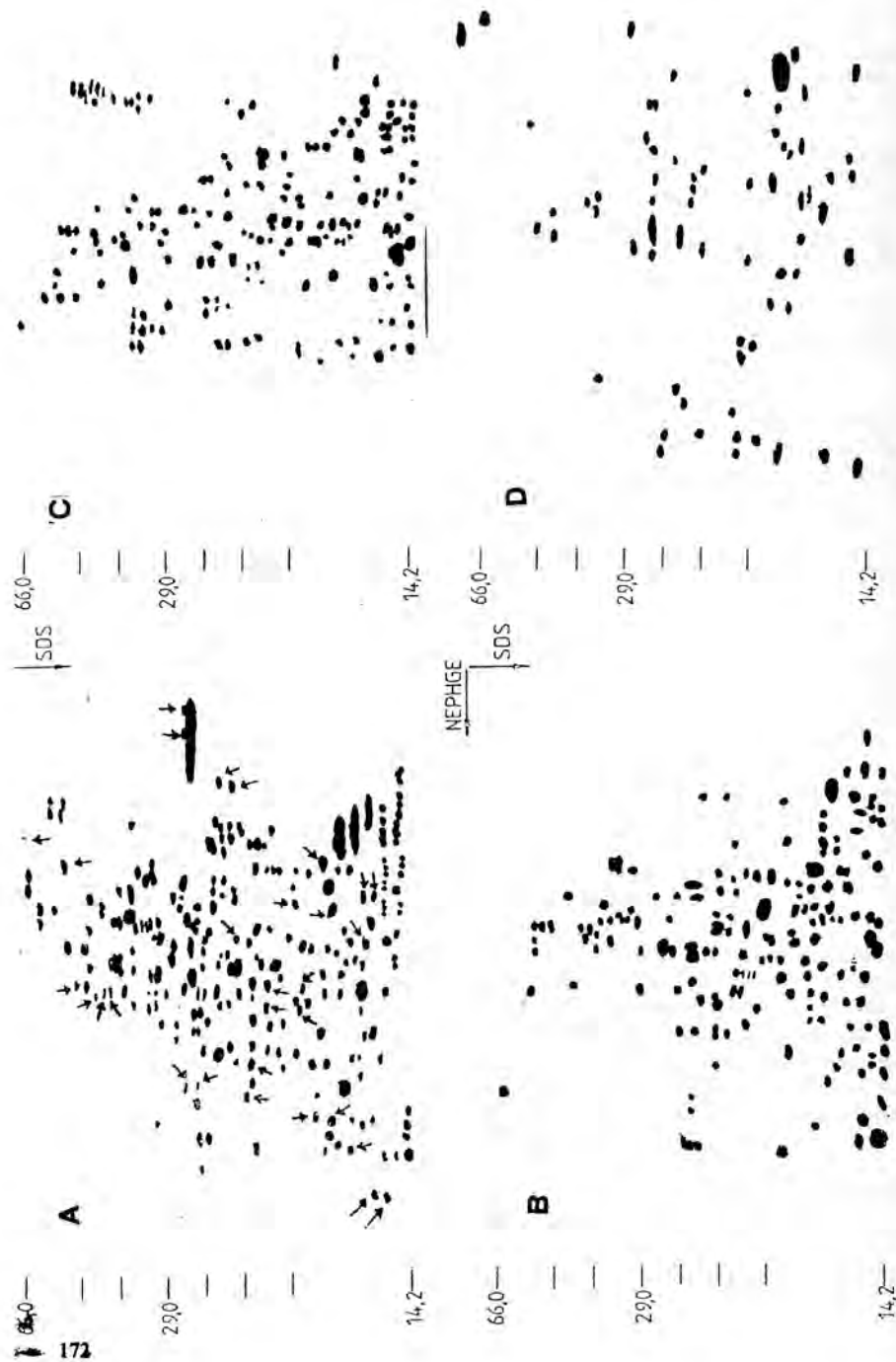


Abb.3. 2-D-Elektrophorese der Proteine von Zellsuspensionskulturen (A), Stengeln (B), Blättern (C) und Wurzeln (D) von *Lupinus polyphyllus*

pPLZ 10, pPLZ 12, pPLZ 15, pPLZ 22, pPLZ 24, pPLZ 26). Hierbei handelt es sich offensichtlich um sog. "Housekeeping genes", wie z.B. die Gene, die für ribosomale Proteine kodieren (s.o.).

Gruppe 3: Eine Genexpression existiert außer in der Suspensionskultur nur in einem oder zwei der drei untersuchten Gewebe (pPLZ 06, pPLZ 11, pPLZ 18, pPLZ 19, pPLZ 23, pPLZ 27). Dies deutet darauf hin, daß unter Zellkulturbedingung eine chaotische, d.h. unkoordinierte Genexpression stattfinden kann. Eine abschließende Interpretation dieses Musters ist z.Z. noch nicht möglich, da wir einerseits die Funktion der betreffenden Gene meist nicht kennen und andererseits erst noch mehr Gene analysieren müssen, um zu bewerten, ob es sich hierbei um einen generellen Trend handelt.

Obwohl die Zellen mikroskopisch entdifferenziert aussehen, sind sie doch biochemisch differenziert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Genexpression in Zellkulturen offensichtlich komplex ist, da die kultivierten Zellen einen eigenen Expressionstyp darstellen. Sobald wir die Gene für die Alkaloidbiosynthese und -Speicherung (s. HANKE & WINK in diesem Band) isoliert haben, werden wir diese Daten zusätzlich mit Fragen nach der Regulation der Alkaloidbildung verbinden können. Betrachtet man die Situation auf der Proteinebene mittels 2D-Gelelektrophorese (Abb.3), so erhält man ebenfalls den Eindruck, daß die Zellkulturen eher mehr als weniger und vor allem andere Proteine exprimieren als die intakte Pflanze. Es erscheint uns deshalb vielversprechend, den Expressionszustand der Lupinenzellkulturen auf molekularer Ebene weiter zu verfolgen und zu entziffern.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der "Northernblot"-Analyse wird eine Methode zur Bestimmung der primären Genexpression in *Lupinus polyphyllus* Zellsuspensionskulturen im Vergleich zu differenzierten Geweben der intakten Pflanze, wie Blatt, Stengel und Wurzel beschrieben. Die Ergebnisse der Analyse von 15 cDNA-Klonen zeigen bereits, daß kultivierte Zellen zwar morphologisch entdifferenziert erscheinen, aber vom Standpunkt der Genexpression ein eigenes Aktivierungsmuster aufweisen.

5. DANK.

Unsere Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Für die experimentelle Unterstützung möchten wir Frau H. Martin, U. Dostal und Herrn Dipl. Biol. F. Holzinger, U. Warskulat und U. Warskulat danken.

6. LITERATUR:

- PERREY, R. u. M. WINK: J. Plant Physiol. 137: 744-748 (1991)
 PERREY, R., M. T. HAUSER u. M. WINK: Z. Naturforsch. 44c: 931-936, (1989)
 PERREY, R., SCHNEIDER, M., WINK, M., Plant Mol. Biol. 14: 1055-1056, (1990)
 PERREY, R., WARSKULAT, U., WINK, M., Plant Mol. Biol. 15: 175-176 (1990)
 PERREY, R.: Dissertation, Universität Mainz, 1990
 PERREY, R., U. WARSKULAT u. M. WINK: J. Plant Physiol. 137: 537-540, (1991)
 SAMBROOK, J. MANIATIS, T., E. F. FRITSCH u. : Molecular cloning. Cold Spring Harbour 1989.
 SANGER, F., S. NICKLER u. A. R. COULSON: Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467, (1977)
 SCHNEIDER, M.: Diplomarbeit, Universität Mainz, 1990
 WARSKULAT, U.: Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, 1990
 WARSKULAT, U., R. PERREY u. M. WINK: Plant Mol. Biol. 1: 739-740, (1991)
 WINK, M., In " Insect-plant interactions (E.A. BERNAYS, Hrg.), Vol. IV, 133-169 (1992a)
 WINK, M., In "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures" (W.G.W. KURZ, Hrg.), Springer Verlag, p. 239-251 (1989)

- WINK, M., In "The Alkaloids" (G. CORDELL, Hrg.), Academic Press, Vol. 43 (in press)
WINK, M., PERREY, M., SCHNEIDER, U., WARSKULAT, U., BORSTEL, K. VON, MENDE, P., Proc. German-Japan workshop of plant tissue culture (1992, in press)
WINK, M., Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 8: 103-111 (1987)
WINK, M., Planta Med. 53: 509-514 (1987)
WINK, M., Theor. Appl. Genet. 75: 225-233 (1988)
WINK, M., Z. Naturforsch. 42c: 868-872 (1987)
WINK, M. u. T. HARTMANN in: Natural products chemistry 1984 (R. J. ZALEWSKY, J. J. SKOLIK eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 511-520, 1985

DIE ANWENDUNG DER EMBRYOKULTUR NACH INTERSPEZIFISCHEN KREUZUNGEN IN DER GATTUNG *LUPINUS* ZUR RETTUNG ABORTIVER BASTARDEMBRYONEN

Wolfgang Kasten
Institut für Züchtungsforschung Quedlinburg
Neuer Weg 22
O-4300 Quedlinburg

ABSTRACT

The partially shown results are to express in brief that, by means of the given embryo culture method, self-pollinating embryos of very early stages of embryogenesis of internationally important lupin species can be developed into plantlets usable in plant breeding. The main reasons for losses are known. Results which are not presented in this paper verify that a further optimization of the method will be possible.

Besides looking for more optimal embryo culture conditions the improving of the embryo yield is of importance. When using phytohormonal stimulation *in vivo*, the hybrid embryo development is with high certainty positively affected. In the present stage of studies it is possible to reach flowering and fructifying hybrid plants from crosses between *L. mutabilis* x *L. hartwegii*. A use in practical breeding is thinkable.

With the creation of the first experimental hybrid plant between *L. angustifolius* x *L. luteus*, it was possible for the first time to demonstrate the successful using of embryo culture after interspecific hybridization between old world lupins of different sections. There is still a lot of work to be done to increase the embryo yield and the part of greenhouse adapted plantlets in relation to cultivated hybrid embryos to a point of breeding relevant use of species hybridization between old world lupins in combination with embryo culture. Hybrid plants from such difficult combination will be in future important experimental material for physiology of fertilization and development, cytogenetics and other fields of fundamental research.

RESUMEN

La aplicación del cultivo de embriones como medio de rescate de los embriones abortivos en los híbridos logrados por cruzamientos interespecíficos de lupinos

Los resultados parciales de esta investigación muestran que el método de cultivo de embriones inmaduros, de especies autóгамas de lupinos de importancia internacional, puede ser usado para obtener los plantines necesarios en el mejoramiento vegetal. Se verificó también que las causas de pérdida de los embriones son conocidas y que el método puede ser optimizado.

Por otro lado, queda demostrado que las chances del desarrollo del embrión son mayores cuando se usan fitohormonas de estimulación *in vivo*. A la altura de estas investigaciones es posible lograr plantas de híbridos entre *L. mutabilis* x *L. hartwegii*, que llegan a los estados de floración y fructificación, y por lo tanto, pueden ser usadas en el mejoramiento vegetal.

La importancia de las técnicas de cultivos de embriones, quedó demostrada con la obtención del primer híbrido experimental entre dos lupinos del viejo mundo, *L. angustifolius* x *L. luteus*. Todavía queda mucho trabajo por realizar para poder incrementar la producción de embriones y la adaptación de los plantines a las condiciones de cultivo. El cultivo de embriones permiten obtener híbridos entre combinaciones taxonómicas dificultosas. Además provee de un material importante a las investigaciones fisiológicas, citogenéticas y otros campos de la investigación biológica.

1. Einleitung

Seit man sich pflanzenzüchterisch mit Lupinen befaßt, besteht der Wunsch, interspezifische Bastardierungen zu realisieren, um neue oder verbesserte Resistenz- und Qualitätsmerkmale sowie veränderte morphologisch-anatomische Eigenschaften in die landwirtschaftlich genutzten Arten und Sorten zu integrieren (PRUWIRTH 1910; ROEMER 1916; FEDOTOV 1947; GLADSTONES 1984). Im Fall von *L. luteus*, bislang die bedeutendste Lupinenart in Deutschland, ist die Introgression von Genen zur Erhöhung der Platzfestigkeit der Hülsen und zur Verbesserung der Hülsenabbruchfestigkeit aus *L. albus* und *L. angustifolius* wünschenswert (RAABE und SENGBUSCH 1935; BRUMMUND 1988, pers. Mitt.). Weiterhin könnten Resistenzen gegen das Gelbe Bohnen Mosaik Virus (BYMV) und das Gurken Mosaik Virus (CMV) aus *L. albus* integriert werden. Nicht zuletzt ist eine Verbesserung des Proteingehaltes und der Proteinzusammensetzung durch Kreuzungen mit *L. mutabilis* denkbar. *L. luteus* ist nur ein Beispiel. Der Gedanke, andere ökonomisch bedeutsame Lupinenarten, wie *L. mutabilis* (Lateinamerika), *L. albus* (Osteuropa) und *L. angustifolius* (Australien) durch Artkreuzungen zu verbessern, ist nicht neu (RÖMER und DEESBACH 1986; SWIECICKI 1986).

Für einige ökonomisch weniger bedeutsame Arten sind Kreuzungen aufgrund einer relativ normalen Bastardembryogenese und Samenbildung auf konventionellem Weg möglich (Tabelle 1). Bisher sind aber noch keine Kreuzungen zwischen Altweltlupinenarten unterschiedlicher Sektionen und zwischen Lupinenarten der verschiedenen Genzentren beschrieben, die zu vitalen Pflanzen führten.

Seit Mitte der 30er Jahre ist bekannt (GOLLMICK 1937), daß Bastardierungen auch zwischen den Altweltlupinenarten *L. luteus*, *L. albus* und *L. angustifolius* möglich sind. Diese Befunde konnten von JARANOWSKI (1962) bestätigt werden. Beide Autoren fanden, daß in Abhängigkeit von der Kreuzungsrichtung eine differenziert ausgeprägte postgame Inkompatibilität zu konstatieren ist. Eine sogar bis ins Keimblattstadium reichende Embryoentwicklung wurde für Kreuzungen mit *L. angustifolius* als weiblichem Elter gefunden. JARANOWSKI (1962) vertrat auf der Basis seiner histologischen Untersuchungen die Auffassung, daß es mit einer geeigneten Embryokulturmethode möglich sein müßte, Embryonen aus Kreuzungen zwischen Altweltlupinen zu vitalen Pflanzen aufzuziehen.

In Kenntnis des pflanzenzüchterischen Problems und der histologischen Befunde begannen in den 80er Jahren in verschiedenen europäischen In-vitro-Labors Arbeiten zur Entwicklung von Embryokulturmethoden (SATOR 1985; SCHÄFER-MENUHR 1986; VUILLAUME und HOFF 1986; PODYMA u.a. 1988). Erstmals erfolgreich in der Realisierung

interspezifischer Bastarde zwischen *L. mutabilis* x *L. hartwegii* unter Nutzung einer Embryokulturmethode waren SCHÄFER-MENUHR und Mitarbeiter (1988). In Quedlinburg wurde 1984 mit ersten Lupinen-embryokulturarbeiten begonnen. Die vorliegende Arbeit gibt einen kurzen Überblick über das entwickelte Embryokultursystem und über erste In-vivo- und In-vitro-Befunde nach interspezifischen Bastardierungen.

Tabelle 1
Überblick über konventionell realisierbare Artbastarde in der Gattung *Lupinus*

Kreuzungskombination	Literaturangaben
<i>L. albus</i> x <i>L. graecus</i>	LENOBLE (1982)
<i>L. albus</i> x <i>L. vavilowii</i>	LENOBLE (1982)
<i>L. atlanticus</i> x <i>L. consentinii</i>	ROY u.a. (1985)
<i>L. atlanticus</i> x <i>L. digitatus</i>	ROY u.a. (1988)
<i>L. campestris</i> x <i>L. bilineatus</i>	SCHALLER (1977)
<i>L. consentinii</i> x <i>L. digitatus</i>	ROY u.a. (1988)
<i>L. elegans</i> x <i>L. mutabilis</i>	HUYGHE u.a. (1987)
<i>L. hartwegii</i> x <i>L. mutabilis</i>	LENOBLE (1982)
<i>L. hartwegii</i> x <i>L. polyphyllus</i>	KAZIMIERSKI (1964)
<i>L. hispanicus</i> ssp. <i>hispanicus</i> x <i>L. luteus</i>	SWIECICKI (1985)
<i>L. luteus</i> x <i>L. hispanicus</i> ssp. <i>hispanicus</i>	KAZIMIERSKI u.a. (1965)
<i>L. luteus</i> x <i>L. hispanicus</i> ssp. <i>bicolor</i>	KAZIMIERSKI u.a. (1965)
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. albococcineus</i>	KAZIMIERSKI (1964)
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. elegans</i> annuell	LENOBLE und PAPINEAU (1984)
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. elegans</i> bienne	anonym (1990)
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. ornatus</i>	NOWACKI (1961)
<i>L. palaestinus</i> x <i>L. pilosus</i>	PAZY u.a. (1981)
<i>L. pilosus</i> x <i>L. atlanticus</i>	PAZY u.a. (1981)
<i>L. pilosus</i> x <i>L. consentinii</i>	PAZY u.a. (1981)
<i>L. polyphyllus</i> x <i>L. mutabilis</i>	BAER und BARRA (1990)
<i>L. rothmaleri</i> x <i>L. luteus</i>	KAZIMIERSKI u.a. (1965)
RUSSEL'S Lupine x <i>L. hartwegii</i>	KAZIMIERSKI (1962)

2. Material und Methode

Eine detaillierte Beschreibung der angewandten Methodik zur Embryokultur von *Lupinus*-Selbstungsembryonen, als Vorarbeiten zur Kultur von Bastardembryonen und zu 1990 durchgeführten Bastardierungsexperimenten liegen in KASTEN und KUNERT (1991) und KASTEN u.a. (1991) vor. Die Kreuzungsexperimente 1991 und die Kultur erhaltener Embryonen wurde in analoger Weise durchgeführt. Als Bestäuber wurde 1991 ausschließlich *L. luteus* 'Borsaja' verwendet. Als weibliche Kreuzungspartner dienten verschiedene *L. angustifolius*-Genotypen (Tabelle 2).

Zur Stimulation der Bastardembryogenese in vivo wurde GA₃, BAP und GA₃ + BAP in einer Konzentration von jeweils 50 mg/l in wässriger Lösung ab dem 5. Tag nach der Bestäubung exogen auf die gebildeten Hülsen appliziert.

Tabelle 2
In den Kreuzungsexperimenten verwendete
L. angustifolius-Genotypen

Genotyp
'Pflugs Allerfrüheste'
'Turkus'
'988/55'
'Sidal'
'Gülzower Stamm 1009'
'12018/83'
'1954/82'
'Lad 88'
'411/83'

3. Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Arbeit mit Selbstungsembryonen war es, eine reproduzierbare Methode zu entwickeln, die auch die Aufzucht sehr früher Embryogenesestadien zu pflanzenzüchterisch nutzbaren Pflanzen erlaubt. Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Embryo- bzw. Pflanzenverluste in den einzelnen Etappen der Kultur und die erhaltenen umweltangepaßten Pflanzen im Durchschnitt aller getesteten Genotypen und Versuchsvarianten. Die Abbildung zeigt zwei Verlustmaxima. Ein großer Anteil Embryonen (43,9 %) stirbt in der Phase der Inkulturnahme. Darüber hinaus erreichen viele Embryonen (29,2 %) nicht den Status einer erdüberführbaren Pflanze. Im Vergleich dazu unbedeutend erscheinen Verluste in der Kulturführung *in vitro* bis zur Erdüberführung, durch Infektionen und bei der Anpassung an unsterile Umweltbedingungen. Den Verlustquellen gegenüber stehen 8,5 % pflanzenzüchterisch nutzbare Pflänzchen.

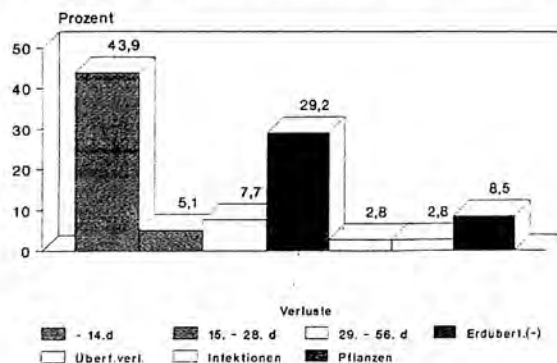


Abbildung 1
Gesamtüberblick über die Embryo- und Pflanzenverluste in den einzelnen Kulturstadien des für *Lupinus*-Arten entwickelten Embryokultursystems, Angaben als Mittelwerte aller eingesetzten Genotypen und Varianten

Nach 1258 im Jahr 1990 durchgeführten Kreuzungen wurden in unterschiedlichen Kreuzungsvarianten 111 Samen gefunden, die eine Größe hatten, daß präparierfähige Embryonen in ihnen vermutet werden konnten (Tabelle 3). 48 Embryonen (mittlerer Embryoertrag 47,3 %) konnten präpariert und nach der im vorangestellten Absatz angegebenen Methode *in vitro* kultiviert werden. Aus diesen Embryonen entwickelten sich letztlich 3 Pflanzen, die an unsterile Gewächshausbedingungen angepaßt und isoenzymatisch untersucht werden konnten (Abbildung 2). Neben zwei Bastardpflanzen aus Kreuzungen zwischen *L. mutabilis* x *L. hartwegii* konnte ein Experimentalbastard aus einer Kreuzung zwischen *L. angustifolius* 'Pflugs Allerfrüheste' x *L. luteus* Stamm 17459 erhalten werden.

Tabelle 3
Primärdaten der kultivierten Embryonen aus Artkreuzungsexperimenten

Kreuzungskombination	Wachstumsreguliertorbehandlungsvariante	präparierte Samen	kultivierte Embryonen *)	Embryoertrag (%)	mittlere Größe Samen Embryo min. max.			
					(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. albus</i> 'Helwan'	-	16	6	37,5	7,7	7,5	6,2	9,1
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. albus</i> 'Helwan'	BAP	4	3	75,0	8,4	6,5	5,6	7,0
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. albus</i> 'Helwan'	GA ₃	9	6	66,6	8,8	7,0	5,6	9,5
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. albus</i> 'Helwan'	BAP + GA ₃	8	8	100,0	10,9	8,6	7,4	9,8
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. luteus</i> 'Bor nova'	BAP	7	1	14,3	5,9	10,5		
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. luteus</i> 'Bor nova'	BAP + GA ₃	36	10	27,8	5,9	7,7	3,0	10,5
<i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste' x <i>L. luteus</i> (St. 17459)	-	7	1	14,3	5,2	2,1		
<i>L. luteus</i> (St. 17459) x <i>L. angustifolius</i> 'Pflugs Allerfrüheste'	-	8	1	12,5	6,5	2,6		
<i>L. mutabilis</i> (80) x <i>L. hartwegii</i>	-	3	1	33,3	5,4	0,8		
<i>L. mutabilis</i> (85) x <i>L. hartwegii</i>	-	12	11	91,7	7,7	4,5	0,1	7,4
Summe / Mittelwerte		111	48	47,3	7,1	6,6	0,1	10,5

*) gibt den Prozentwert kultivierbarer Embryonen zu präparierten Samen an

Bande-
AAT-

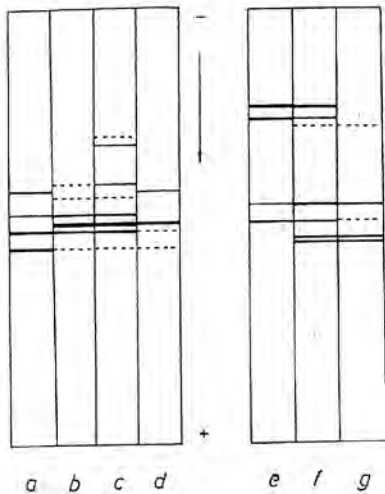


Abbildung 2

Zymotypen der Aspartataminotransferase

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| a) <i>Lupinus mutabilis</i> (BS) | e) <i>Lupinus angustifolius</i> |
| b) Bastard B1BW7 Nr. 4 | 'Pflugs Allerfrüheste' |
| c) <i>Lupinus hartwegii</i> | f) Bastard B4BW7 Nr. 6 |
| d) Bastard B1BW7 Nr. 6 | g) <i>Lupinus luteus</i> |
| | Stamm 17459 |

Nachdem mit den Befunden des Jahres 1990 die prinzipielle Möglichkeit der Aufzucht von Embryonen selbst nach schwierigen Artbastardierungen zwischen Altweltlupinen unterschiedlicher Sektionen nachgewiesen werden konnte, wurde 1991 der Kreuzungsumfang nahezu verdoppelt. In Tabelle 4 wird ein Überblick über das Ansatzverhalten in einem Zeitraum bis zu 20 Tagen nach der Bestäubung gegeben. Während in allen Kreuzungsvarianten ein allmähliche Abnahme des Hülsenansatzes im Beobachtungszeitraum festzustellen ist, wird der Hülsenabwurf durch Gibberellinsäure bzw. Gibberellinsäure und Benzylaminopurin (in den angegebenen Konzentrationen 5 Tage nach Behandlungsbeginn inhibiert. Darüber hinaus hat vor allem Gibberellinsäure einen signifikant positiven Einfluß auf die Hülsenlänge, Form und Farbe der behandelten Hülsen werden verändert. Basis für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Wachstumsregulatoren war die Frage ob die Bastardembryogenese, durch Erhöhung des Differenzierungsgrades, exogen beeinflusst werden kann. Erste histologische Untersuchungen lassen auf eine Annahme der Vermutung schließen.

Tabelle 4
Kreuzungskombinationen zwischen verschiedenen *L. angustifolius*-Genotypen und *L. luteus* 'Borsaja' und zwischen *L. mutabilis* und *L. polyphyllus*, Anzahl gekreuzter Blüten und Ansatz nach 5, 10, 15 und 20 Tagen nach der Bestäubung

Genotyp	Anzahl gekreuzter Blüten	Hülsenansatz nach Tagen							
		5		10		15		20	
		abs.	(%)	abs.	(%)	abs.	(%)	abs.	(%)
<i>L. angustifolius</i> x <i>L. luteus</i> 'Borsaja'									
'Pflugs Allerfrüheste'	662	616	93,0	552	83,4	541	81,7	529	79,9
'Turkus'	177	156	88,1	119	67,2	101	57,1	68	38,4
'Sidal'	174	159	91,4	125	71,8	91	52,3	73	42,0
'Gölsower Stamm 1009'	148	101	68,2	85	57,4	78	52,7	76	51,4
'12018/83'	139	111	79,8	85	61,2	79	56,8	59	42,4
'1954/82'	65	61	93,8	49	75,4	41	63,1	35	53,8
'Lad 88'	19	11	57,9	7	36,8	4	21,1	2	10,5
'411/83'	149	116	77,8	112	75,2	112	75,2	106	71,1
'986/55' Kontrolle	103	95	92,2	79	76,7	69	67,0	65	63,1
BAP	52	34	65,4	31	59,6	30	57,7	30	57,7
GA ₃	69	51	73,9	49	71,0	49	71,0	49	71,0
BAP + GA ₃	55	51	92,7	47	85,4	47	85,4	47	85,4
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. polyphyllus</i>									
	334	59	17,7	31	9,3	15	4,5	5	1,5
Σ	2192	1622	74,0	1371	62,5	1258	57,4	1144	52,2

In der Tabelle 5 wird die mittlere Anzahl Tage bis zur Hülsenentnahme, die Anzahl der entnommenen Bastardhülsen, die Anzahl der Selbstungen sowie die durchschnittliche Anzahl Samenanlagen/Hülse dargestellt. Im Mittel aller Kreuzungskombinationen wurde ein Hülsenansatz zum Entnahmezeitpunkt von 62 % erhalten. Als unbefriedigend ist der Hülsenansatz nach Kreuzung zwischen *L. mutabilis* x *L. polyphyllus* zu beurteilen. Vermeintliche Selbstungen traten mit 4,5 % in geringer Frequenz auf. In den entnommenen Hülsen wurden im Mittel 4,5 meist sehr verkümmerte Samenanlagen gefunden. Nur 1120 Samen war soweit entwickelt, daß präparierfähige Embryonen in ihnen vermutet werden konnten (Tabelle 6). Präpariert werden konnten nur 17 (!) Embryonen. Der Embryoertrag lag mit 1,5 % weit unter den Erwartungen im Vergleich zum Vorjahr. Die Ursache, die zum frühzeitigen Embryoabort führte, könnte in den extrem hohen Temperaturen im Untersuchungszeitraum liegen.

Aus diesen 17 Embryonen konnten zwei zu Pflänzchen entwickelt werden, die an Gewächshausbedingungen adaptiert werden konnten. Eine der Pflanzen ging nach Chlorophyllmangelsymptomen ein. Die letzte Pflanze existiert weiterhin unter Gewächshausbedingungen. Die biochemische Charakterisierung steht noch aus.

Tabelle 5
Tage bis zur Hülsenentnahme, Anzahl entnommener Hülsen, Anzahl Selbstungen und durchschnittliche Anzahl Samenanlagen/Hülse

Kreuzungskombination	Tage bis zur Hülsenentnahme	Anzahl entnommener Bastardhülsen		\bar{x} / Pflanze	Anzahl Selbstungen		durchschnittliche Anzahl Samenanlagen/Hülse
		absolut	% ¹⁾		absolut	% ²⁾	
<i>L. angustifolius</i> x <i>L. luteus</i> 'Borsaja'							
'Pflugs Allerfrüheste'	25	481	72,7	3,4	27	5,3	4,4
'Turkus'	24	53	29,9	1,2	4	7,0	4,0
'Sidral'	22	65	37,4	2,0	1	1,5	5,8
'Gülzower Stamm 1009'	22	72	48,6	2,3	3	4,0	4,2
'12018/83'	20	50	36,0	2,0	6	10,7	4,4
'1954/82'	20	32	49,2	2,3	2	6,2	3,8
'Lad 88'	20	2	10,5	2,0	0	0,0	5,0
'411/83'	24	96	64,4	2,5	2	2,0	4,2
'988/55' Kontrolle	23	58	56,3	2,8	2	3,3	4,3
BAP	20	27	51,9	3,0	0	0,0	4,3
GA ₃	20	48	69,6	3,0	1	2,0	4,4
BAP + GA ₃	20	47	85,4	2,9	0	0,0	4,2
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. polyphyllus</i>	18	4	1,2	1,0	0	0,0	5,2
Σ	21	1035	61,9	2,8	48	5,7	4,5

1) bezogen auf gekreuzte Blüthen; 2) bezogen auf die Gesamthülsenanzahl zum Entnahmzeitpunkt

Tabelle 6
Primärdaten der kultivierten Embryonen aus Artkreuzungsexperimenten

Kreuzungskombination	präparierte Samen	kultivierte Embryonen	Embryo ertrag 1)	mittlere Größe		Embryogröße	
				Samen (mm)	Embryo (mm)	min. (mm)	max. (mm)
<i>L. angustifolius</i> x <i>L. luteus</i> 'Borsaja'							
'Pflugs Allerfrüheste'	504	1	0,2	5,9	1,2	1,2	1,2
'Turkus'	36	1	2,8	5,6	1,2	1,2	1,2
'Sidral'	44	1	2,3	4,3	0,7	0,7	0,7
'Gülzower Stamm 1009'	73	1	1,4	4,8	2,2	2,2	2,2
'12018/83'	73	2	2,7	4,2	0,6	0,3	0,8
'1954/82'	45	1	2,2	4,9	0,3	0,3	0,3
'Lad 88'	5	2	40,0 (!)	4,5	1,3	0,2	2,5
'411/83'	70	2	2,9	5,2	1,9	0,8	3,0
'988/55' Kontrolle	109	0	0,0	-	-	-	-
BAP	33	0	0,0	-	-	-	-
GA ₃	64	2	3,1	5,6	1,7	0,7	2,6
BAP + GA ₃	51	3	5,9	5,3	1,2	0,7	2,0
<i>L. mutabilis</i> x <i>L. polyphyllus</i>	13	1	7,7	3,0	0,3	0,3	0,3
Σ	1120	17	1,5	5,4	1,2	0,2	3,0

1) gibt den Prozentwert kultivierbare Embryonen zu präparierten Samen; 2) kultivierte Samen

4. Zusammenfassung

Die auszugsweise dargestellten Ergebnisse sollen insgesamt zum Ausdruck bringen, daß mit der vorgestellten Embryokulturmethode Selbstungsembryonen sehr früher Embryogenesestadien aller weltwirtschaftlich bedeutsamen Lupinenarten zu pflanzenzüchterisch nutzbaren Pflanzen entwickelt werden können. Die Verlustschwerpunkte des Systems sind bekannt. In dieser Arbeit nicht vorgestellte Befunde belegen, daß eine weitere Optimierung der Methode möglich ist.

Neben der Suche nach optimaleren Embryokulturbedingungen ist die Erhöhung des Embryoertrages von Bedeutung. Mit der Anwendung phytohormonaler Stimulation in vivo läßt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bastardembryogenese positiv beeinflussen. Mit dem vorliegenden Stand der Arbeiten ist es möglich, blühende und fruchtende Bastardpflanzen aus Kreuzungen zwischen den lateinamerikanischen Arten *L. mutabilis* x *L. hartwegii* zu erhalten. Eine Anwendung in der praktischen Züchtung ist denkbar.

Mit Schaffung des nicht bis zur Samenbildung gelangten Experimentalbastardes zwischen *L. angustifolius* x *L. luteus* konnte erstmalig der Nachweis der erfolgreichen Nutzung der Embryokultur nach interspezifischer Bastardierung zwischen Altweltlupinen verschiedener Sektionen erbracht werden. Umfangreiche Entwicklungsarbeit zur Erhöhung des Embryoertrages und des Anteils umweltangepaßter Pflanzen bezogen auf die eingesetzten Bastardembryonen ist bis zur züchterisch relevanten Nutzung der Artbastardierung zwischen Altweltlupinen in Kombination mit der Embryokultur noch zu leisten. Bastarde aus solchen schwierigen Kombinationen zwischen Altweltlupinen werden in nächster Zukunft wichtiges Experimentiermaterial für die Befruchtungs- und Entwicklungsphysiologie, Zytogenetik und andere Gebiete der Grundlagenforschung sein.

Literatur

- Anonym: zit. nach BAER und BARRA Interspezific Crossing, *L. polyphyllus* x *L. mutabilis*. Proceedings of the 6th International Lupin Conference, Temuco, Chile, 1990, S. 138.
- BAER, von E.; BARRA, M.: Interspezific Crossing, *L. polyphyllus* x *L. mutabilis*. Proceedings of the 6th International Lupin Conference, Temuco, Chile, 1990; S. 138.
- FEDOTOV, V.S.: Modern problems and methods of breeding Lupin. Plant Breeding Abstracts 18 (1947), S. 85-86.
- FRUWIRTH, C.: Die Züchtung der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 3 (1910), S. 133.
- GLADSTONES, J.S.: Present Situation and Potential of Mediterranean/African Lupins for Crop Production. Proceedings of the 3rd International Lupin Conference, La Rochelle, France, 1984, S. 17-37.
- GOLLMICK, F.: Über Artkreuzungen bei Lupinen. Der Züchter 9 (1937), S. 65-68.

- HUYGHE u. a. (1987) zit. nach RÖMER, P.; JAHN-DEESBACH, W.: Developments in *Lupinus mutabilis* breeding. Proceedings of the 5th International Lupin Conference, Poznan, Poland, 1988, S. 40-50.
- JARANOWSKI, J.: Fertilization and embryo development in the genus *Lupinus* Tourn. Part II. Fertilization and embryo development following reciprocal species hybridization. *Genetica Polonica* 3 (1962) 3, S. 333 - 368.
- KASTEN, W.; KUNERT, R.: A Culture Method for Isolated Immature Embryos of Different *Lupinus* species. *Biol. Zent. Bl.* 110 (1991) 4, S. 290 - 300.
- KASTEN, W.; PARADIES, T.; KUNERT, R.; STRAKA, P.: Progress in Realization of Interspecific Hybrids in the Genus *Lupinus* by Means of an Embryo Rescue Technique. *Biol. Zent. Bl.* 110 (1991) 4, S. 301 - 309.
- KAZIMIERSKI, T.: Certain abnormalities in the hybrid: Russel's lupin x *Lupinus hartwegii*. *Genetica Polonica* 3 (1962) 1, S. 19-25.
- KAZIMIERSKI, T.: Interspecific crossing in the Mediterranean and American lupin species. *Wiss. Zeitschrift der Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. Reihe* 13 (1964), S. 697-698.
- KAZIMIERSKI, T.; KAZIMIERSKA, E.M.: Studies on a species hybrid *Lupinus rothmaleri* Klink. x *Lupinus luteus* L. *Genetica Polonica* 6 (1965), S. 124-140.
- LENOBLE, M.: Travaux sur le lupin. INRA Lusignan, (1982) 14 S.
- LENOBLE, M.; PAPINEAU, (1984) zit. nach BAER und BARRA Interspecific Crossing, *L. polyphyllus* x *L. mutabilis*. Proceedings of the 6th International Lupin Conference, Temuco, Chile, 1990, S. 138.
- NOWACKI, E.: An interspecific hybrid: *L. mutabilis* Sweet x *L. ornatus* Dougl. x *L. douglasii* Lindl. *Genetica Polonica* 2 (1961), S. 1-17.
- PAZY, B.; PLITMANN, U.; HEYN, C.C.: Genetic relationship between *Lupinus pilosus* and *L. palaestinus* (Fabaceae). *Pl. Syst. Evol.* 137 (1981), S. 39-41.
- PODYMA, E.; TURZYNSKI, D.; RYBCZYNSKI, J.J.: An immature embryo culture, vegetative propagation and somatic cell genetic manipulation of *Lupinus* taxa. Proceedings of the 5th International Lupin Conference, Poznan, Poland, 1988, S. 439 - 443.
- RAABE, A.; SENGBUSCH, R.: Züchterisch wichtige Beobachtungen an einigen Lupinenarten. *Der Züchter* 7 (1935), S. 244 - 248.
- RÖMER, P.; JAHN-DEESBACH, W.: Developments in breeding of *Lupinus mutabilis*. Proceedings of the 4th International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia, 1986, S. 31-39.
- ROEMER, T.: Züchtung alkaloidarmer Lupinen? *Landw. J.b.* 50 (1916), S. 433-443.
- ROY, N.N.; GLADSTONES, J.S.: Prospects for interspecific hybridization of *Lupinus atlanticus* Gladst. with *Lupinus consentinii* Guss.. *Theor. Genet.* 71 (1985), S. 238-241.
- ROY, N.N.; GLADSTONES, J.S.: Further studies with interspecific hybridization among Mediterranean/African lupin species. *Theor. Appl. Genet.* 75 (1988), S. 606-609.
- SATOR, C.: Regeneration von Lupinenpflanzen aus Embryonen. *Landbauforschung Völkenrode* 35 (1985), S. 1 - 4.
- SCHÄFER-MENUHR, A.: Embryo culture of lupin species. Proceedings of the 4th International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia, 1986, S. 288
- SCHÄFER-MENUHR, A.; CZERWINSKI, T.; BUSMANN, A.: Der Einsatz der Embryokultur zur Gewinnung von Artbastarden aus der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii*. *Landbauforschung Völkenrode* 38 (1988b) 3, S. 173 - 177.
- SCHALLER, L.M.: A study of the progeny of hybridization in *Lupinus*. Ph. D. thesis, Univ. of Missouri, 1977, Columbia (Diss. Abstr. Int. B. 38)
- SWIECICKI, W.: Studies on the interspecific hybrid *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reut. x *Lupinus luteus* L. *Lupin Newsletter* No. 8 (1985), S. 24-25.
- SWIECICKI, W.: Developments in breeding *L. luteus* and its relatives. Proceedings of the 4th International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia, 1986, S. 20-24.
- VUILLAUME, E.; HOFF, T.: Développement in vitro d'embryons immature de *Lupinus albus* L. et de *Lupinus mutabilis* Sweet par culture de gousses, d'ovules ou d'embryons isolés. *Agronomie* 6 (1986), S. 925 - 930.

STRATEGIEN ZUR (WIEDER-) EINFÜHRUNG DER LUPINE IN DIE LANDWIRTSCHAFTLICHE PRAXIS

Peter Römer
Südwestdeutsche Saatzeit
7550 Rastatt

ABSTRACT

Strategies to (re-)introduce lupins into our agricultural system

The situation of the German agriculture is reviewed with respect to the growing of legume crops. Special emphasis is laid on the situation of lupin farming in West and East Germany (the former DDR). Yields and protein contents of *L. albus*, *L. angustifolius* and *L. albus* are compared and discussed in relation to Soy bean, beans and peas. The utilization of lupin seeds and further breeding aims are reviewed and strategies for the (re-) introduction of lupins are discussed.

RESUMEN

Las estrategias para reintroducir el cultivo de los lupinos en el sistema agrícola de Alemania

Se presenta una revisión de la agricultura alemana con respecto a los cultivos de leguminosas, haciendo énfasis en la situación de los lupinos en el oeste y este de Alemania (ex DDR). Los rendimientos y contenidos de proteínas de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, son discutidos y comparados con los de soya, arveja y frejoles. Se analiza la utilización de las semillas de lupinos, los propósitos de su mejoramiento vegetal y las estrategias para reintroducir el cultivo en Alemania.

1. Die Ausgangssituation im Oktober 1991

Die Körnerleguminosen haben bei der momentanen Preis-Kosten-Konstellation allgemein einen schweren Stand in der landwirtschaftlichen Praxis.

Tabelle 1 verdeutlicht den Boom nach der Einführung der EG-Beihilfe mit einem Anbauhöhepunkt in 1987 und seit dieser Zeit einen mehr oder weniger kontinuierlichen Rückgang der Anbaufläche.

Tabelle 1: Anbauflächen Körnerleguminosen (alte Bundesländer)

Jahr	ha
1984	16500
1986	69100
1987	110000
1990	49000
1991	41000

Diese Statistik umfaßt im wesentlichen die Pflanzenarten Erbsen und Ackerbohne, Lupinen spielen im Gebiet der alten Bundesländer nach wie vor eine geringe Rolle. Nennenswerte Lupinen-Anbauflächen befanden sich bis zur Wiedervereinigung im Gebiet der neuen Bundesländer, hier hauptsächlich Gelbe Lupinen zur Grünnutzung (ca. 100000 ha).

Ein Blick auf die Flächenentwicklung der Lupinen-Saatgutproduktion zeigt, daß der Anbau von Gelben Lupinen in den neuen Bundesländern dramatisch abgenommen hat.

Demgegenüber zeigt die Vermehrungsfläche für die anderen Lupinenarten eine leicht ansteigende Tendenz. Vor allem bei der Weißen Lupine ist ein Flächenzuwachs von 72,2 % zu verzeichnen. Hierin ist berücksichtigt, daß sich die Vermehrungsfläche von VLADIMIR 1991 bei etwa 4 ha im Bundesgebiet gehalten hat.

Als Ergebnis dieser Entwicklung bleibt festzuhalten, daß sich Ost und West hinsichtlich der Fläche zu Ungunsten der Lupine angenähert haben.

Dennoch besteht ein großer Unterschied: Während im Westen die Lupine auch produktionstechnisch Neuland für die Landwirte darstellt, können die Kollegen im Osten auf eine reiche Erfahrung im Lupinenanbau zurückgreifen. Somit muß man im Westen von der Einführung und im Osten von der Wiedereinführung der Lupine in die landwirtschaftliche Praxis sprechen.

2. Voraussetzungen für die Wiederbelebung des Lupinenanbaues

Die erste und wichtigste Grundlage für einen zunehmenden Anbau von Lupinen ist die Erschließung geeigneter Absatzmärkte und die Erzeugung der speziellen von dem jeweiligen Markt geforderten Qualitäten.

2.1. Verwertung und Absatzmarkt

Die wesentliche Voraussetzung für die Grünnutzung der Lupinen ist die Minimierung der Saatgutkosten. Da die Bedeutung von Leguminosen im Feldfutterbau weiter zurückgeht, wird der zukünftige Schwerpunkt dieser Nutzungsrichtung in Gründüngung und Grünbrache liegen.

Wie auch bei Grünerbsen ist ein niedriges Tausendkorngewicht der wichtigste Faktor, um die Kosten je Hektar gering zu halten. Aus diesem Grund werden frohwüchsige Formen der Schmalblättrigen, auf den Sandböden auch der Gelben Lupine bevorzugt Verwendung finden.

Prinzipiell spielt es keine Rolle, ob alkaloidreiche oder alkaloidarme Sorten verwendet werden. Wegen der geringeren Anfälligkeit gegen Allgemeinschädlinge wird aber sicher auch in Zukunft bitterstoffreichen Sorten der Vorzug gegeben werden.

Tabelle 2: Lupinen-Saatgutproduktion 1990 und 1991 (ha)

Art	Sorte	1990			1991
		D 11	D 5	D 16	D 16
L. luteus	BORNOVA	-	20325	20325	100
	BORESA	-	1183	1183	-
	REFUSA NOVA	-	130	130	25
	SCHWAKO	-	478	478	533
	JUNO	-	-	-	161
	BORSAJA	-	-	-	101
	BORSELFA	-	-	-	14
L. angustifolius	KUBESA	4	-	4	8
L. albus	LUBLANC	54	-	54	89
	VLADIMIR	4	-	4	?
?	Sonstige	-	-	-	28
Summe Lupinen		62	22116	22178	1059

Veränderung 1991 zu 1990: - 95,2 %

Veränderung 1991 zu 1990: - 95,2 %

Vielfältigere Perspektiven gibt es meines Erachtens aber bei der Nutzung der Lupine als Körnerfrucht.

Ein Blick auf die wertbestimmenden Inhaltsstoffe der Lupinen des Genbank-Sortimentes der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig-Völkenrode (FAL) (Tabelle 3) zeigt, daß vor allem die Weiße und die Gelbe Lupine hohe Proteingehalte aufzuweisen haben. Demgegenüber ist der Fettgehalt aller drei Arten vergleichsweise gering.

Tabelle 3: Protein- und Fettgehalte im Korn von 3 Lupinenarten (% der Korn-Trockenmasse)

Art	Protein			Fett			n
	φ	Min	Max	φ	Min	Max	
L. albus	45,35	43,4	48,0	9,25	8,2	11,3	36
L. angustif.	34,90	32,5	38,2	7,70	6,9	8,6	44
L. luteus	47,60	43,9	50,4	6,70	6,1	7,7	92

Quelle: Evaluierungsdaten zu Lupinen, FAL 1989

Tabelle 4: Korninhaltsstoffe von Lupinen im Vergleich mit anderen Körnerleguminosen (% der Korn-TM)

Art	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser	Rohasche	N-freie Extraktst.
L. albus	39,5	9,6	10,0	4,5	36,4
L. angustif.	35,6	5,6	16,9	4,0	38,4
L. luteus	45,1	4,9	16,6	4,7	28,7
Sojabohne	38,9	21,6	6,2	5,5	27,8
Ackerbohne	30,0	1,6	9,1	4,0	55,3
Körnererbse	26,0	1,5	6,7	3,7	62,1

Quelle: PLANK, A.: Untersuchungen über den Anbau der Lupine (L. albus, L. angustifolius, L. luteus) in Österreich und ihre Verwendung als Eiweiß- und Alkaloidpflanze; Dissertation, Wien 1989

Vergleicht man die Korninhaltsstoffe von Lupinen mit denen anderer Leguminosen (Tabelle 4), so ist vor allem der höhere Proteingehalt auffällig. Da Lupinen im Unterschied zu Sojabohnen keiner Hitzebehandlung zur Zerstörung antinutritiver Inhaltsstoffe bedürfen, ist die Verwertung im eigenen Betrieb, wie auch die Verarbeitung im Mischfutterwerk erheblich einfacher möglich. Die gute Wertigkeit des Proteins ist vielfach bewiesen worden. Wird die erste limitierende Aminosäure, das Methionin, ergänzt, so läßt sich die Eiweißqualität auf das Niveau von Casein steigern. Den gleichen Effekt erreicht man, wenn man Lupinen- und Getreideprotein kombiniert.

Untersuchungen über den Einsatz von Lupinen in der Tierernährung erbrachten für die Tierarten unterschiedliche Höchstgrenzen in der Futtermittelration (Übersicht).

Für Monogaster, wie Geflügel oder Mastschweine, wäre der Einsatz von Lupinen im Mischfutter sinnvoll, welches wegen der notwendigen Limitierung und der Methioninergänzung zweckmäßigerweise im Mischfutterwerk hergestellt wird. Im Gegensatz dazu ist die innerbetriebliche Verwertung in der Bullenmast und in der Milchviehhaltung gar kein Problem.

Übersicht: Höchstgrenzen für den Einsatz von Lupinen im Futter verschiedener Tierarten (% der Ration)

Broiler,	bis 4. Lebenswoche	20 %
	ab 4. " " "	35 %
Legehennen		10 %
Bei Geflügel ist eine Methioninergänzung erforderlich!		
Schweine (nur in der Mast)		5 %
	(oder 30 % des Proteins in der Ration)	
alle Wiederkäuer		keine Einschränkung

Ein für Deutschland neuer Bereich ist die Verwendung von Lupinen in der menschlichen Ernährung. In den Herkunftsländern der Lupinen rund um das Mittelmeer sowie in den Anden ist der Genuß von gequollenen Lupinenkörnern als "Snack" und sogar als proteinhaltiges Grundnahrungsmittel seit hunderten von Jahren bekannt. Neue Beispiele z. B. aus Chile zeigen, daß Lupinen mit Erfolg in der Ernährung, beispielsweise in Schulmilchprogrammen, eingesetzt werden können. Aus Untersuchungen der Universität Lissabon (Portugal) geht hervor, daß Lupinen prinzipiell geeignet sind, um sogenannte "Substitutprodukte" ("Miso", "Shoyu", "Tofu") herzustellen. Durch das Verarbeiten in Extrudern ließe sich ein hochwertiges Nahrungsmittel zum Beispiel für Müsli-Produkte bereiten.

Eine neue Variante ist schließlich die Betrachtung der Lupine als "Nachwachsender Rohstoff". Durch die von der MITTEX GmbH in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut entwickelte Fraktionierung des Lupinenkornes ergeben sich prinzipiell vielfältige Verwendungsmöglichkeiten. Hierbei erfolgt zunächst eine mechanische Trennung des Lupinenkornes in Samenschale und Kern. Erstere ist als Diätfaser verwendbar, letzterer wird mittels Wasser in eine feste und eine flüssige Fraktion zerlegt. Daraus gehen zwei hochkonzentrierte Protein-, eine Alkaloid-, eine Öl- sowie zwei Restfraktionen hervor. Der wichtigste Unterschied dieser Verarbeitung zu allen anderen Verwertungsmöglichkeiten in der Ernährung von Mensch und Tier besteht in der Möglichkeit, auch bitterstoffreiche Lupinen zu verwenden.

Viele dieser möglichen Nutzungen der Lupine sind bisher erst im Labormaßstab untersucht worden. Es wäre wichtig, dies nun in Zusammenhang mit verarbeitenden Unternehmen der Lebensmittelindustrie in größerem Maßstab zu wiederholen und die Marktchancen dieser Produkte auszuloten. Anschließend könnte eine Lupinenproduktion im Vertragsanbau erfolgen, was die Möglichkeit eröffnen würde, den Lupinenanbau auch ohne Subventionen rentabel zu machen.

2.2. Züchtung

Der nächste Schritt nach der Erschließung der Absatzmärkte ist die Bereitstellung von Sorten, die den Anforderungen dieser Märkte gerecht werden. Wegen des notwendigen zeitlichen Vorlaufes, den die Züchtung naturgemäß nötig hat, sollten beide Schritte zeitgleich begonnen werden.

Die wichtigsten Forderungen sind zunächst Frühreife und Ertrag. Um die Wirtschaftlichkeit des Anbaues zu gewährleisten muß ein möglichst hoher Ertrag bei sicherer Abreife erzielt werden.

Tabelle 5 gibt Auskunft über die Reife und die Erträge von 15 Sorten bzw. Stämmen der Weißen Lupine am Standort Gießen (Hessen) im Jahr 1991.

Die Tabelle zeigt, daß eine Größenordnung von 40 dt/ha auf guten Böden durchaus realistisch ist und daß diese Erträge auch mit frühreifen Sorten erzielt werden können. Allerdings kann man ebenso die Tendenz erkennen, daß spätreife Sorten ein höheres Ertragspotential besitzen. Während bei den frühreifen Sorten 3 von 10 (30 %) über 40 dt/ha liegen, sind es in der spätreifen Gruppe 3 von 5 (60 %). Dennoch muß hervorgehoben werden, daß sich die Sorte mit dem höchsten Ertrag in der frühen Gruppe befindet.

Diese Werte geben das Ertragspotential der Weißen Lupine auf gutem Boden wieder. Um der Frage nachzugehen, inwieweit die Weiße Lupine auch auf klassischen Gelblupinenstandorten konkurrenzfähig sein kann, wurde eine Ertragsprüfung in Trebatsch (Frankfurt/Oder) auf Sandboden angelegt. Die Ergebnisse des Jahres 1991 gehen aus Tabelle 6 hervor.

Ein Grund für das schlechte Abschneiden der (bitterstoffreichen) Gelblupine SCHWAKO ist der höhere Fusariumbefall. Ob die Weiße Lupine generell auf Sandböden höhere Erträge bringt, muß im nächsten Jahr auf mehreren Standorten und nach Möglichkeit im Vergleich mit Fusarium-resistenten Gelblupinen untersucht werden.

Tabelle 5: Reife und Erträge von 16 Sorten bzw. Stämme der Weißen Lupine (*L. albus*) in Gießen 1991

Bezeichnung	Erntetermin	% H ₂ O im Korn zur Ernte	dt/ha (TM)
Stamm 1	05.09.91	10,7	32,2
Stamm 2	- " -	13,1	47,7
Stamm 3	- " -	9,3	39,0
Stamm 6	- " -	8,8	35,2
Stamm 7	- " -	9,7	33,7
Stamm 9	- " -	17,7	37,9
Stamm 10	- " -	9,4	41,5
Vladimir	- " -	8,9	42,0
Amiga	- " -	13,0	31,1
Lublanc	- " -	12,2	35,2
Stamm 4	17.09.91	17,4	42,5
Stamm 5	- " -	16,8	35,0
Stamm 8	- " -	16,6	42,7
Stamm 14	- " -	15,1	41,3
Multolupa	- " -	29,1	33,1
φ frühe St.	05.09.91	11,3	37,6
φ späte St.	17.09.91	19,0	38,9

Tabelle 6: Erträge und Fusariumbefall von 6 *Lupinus albus*- und 1 *Lupinus luteus*-Herkünften in Trebatsch 1991

Bezeichnung	Fusariumbefall am 16.07.91	Ertrag dt/ha
Stamm 6	2,7	17,6
Stamm 8	3,0	16,5
Stamm 9	3,5	13,0
Amiga	3,2	16,3
Vladimir	2,7	22,8
Lublanc	2,7	16,25
Schwako	4,5	7,5

Hinsichtlich der Sortenfrage bleibt festzuhalten, daß frühe, ertragreiche Sorten der Weißen Lupine bereits existieren und innerhalb der nächsten 2 bis 4 Jahre weitere Sorten zugelassen werden.

Ob die Weiße Lupine ihre in den diesjährigen Versuchen gezeigte Überlegenheit gegenüber der Gelben Lupine auf

Sandböden behaupten kann, bleibt weiteren Versuchen überlassen.

2.3. Anbautechnik

Der nächste Schritt zur (Wieder-) Einführung der Lupine in die Landwirtschaft ist die Kenntnis der speziellen Anforderungen an die Produktionstechnik.

Da in dieser Beziehung auf ein breites Wissen in den neuen Bundesländern zurückgegriffen werden kann, sollte es keine Probleme geben. Wichtigste Punkte sind das Auffinden geeigneter Herbizide und Techniken zur Impfung der Lupinen mit Rhizobien, besonders auf denjenigen Standorten, die lange Zeit keine Lupinen getragen haben.

3. Schlußfolgerungen

Wie könnte man also vorgehen, um die Lupine in die Praxis zurückzuführen?

1. Das Wichtigste ist das Vorhandensein von Absatzmärkten. Diese müssen getreu dem Motto: "Märkte werden nicht gefunden, Märkte müssen geschaffen werden" in den verschiedenen Bereichen, vor allem der Nahrungs- und Futtermittelindustrie, aufgebaut werden.

2. Gleichzeitig müssen geeignete Sorten gezüchtet und im Demonstrationsanbau vorgeführt werden. Die Sortenprüfung (Landessortenversuche) in Kombination mit produktionstechnischen Fragen könnte eine Aufgabe von Landwirtschaftskammern und -ämtern sein, um so die Landwirte mit dem Lupinenanbau vertraut zu machen.

3. Durch gezielte Öffentlichkeitsarbeit, z.B. Vorträge oder Berichte in der Fachpresse, müssen der Wert und die Rentabilität der Lupine publik gemacht werden. Dies kann am überzeugendsten durch die Darstellung gelungener praktischer Beispiele geschehen.

Wenn alle diese Gedanken in die Praxis umgesetzt werden, sollte es möglich sein, die Lupine in Ost und West als realistische Anbau-Alternative zu etablieren.

LUPINUS ALBUS ALS MARKTFRUCHT

Joachim Bayer
Saatzucht Dr. h.c. Hans Hege
Domäne Hohebuch
D - 7112 Waldenburg

ABSTRACT

Lupinus albus as a cash crop

Several strains of *L. albus* were grown at three sites in Germany which differed in pedoclimatic conditions. Yields were strongly dependent on soil and climate. Market values are evaluated for these *L. albus* yields and compared with those of other field crops. In order to be competitive with other crops, yields of *L. albus* must be in the range of 4 t/ha.

RESUMEN

El *Lupinus albus* como un cultivo rentable

Se cultivaron varias líneas de *L. albus* en tres lugares de Alemania con diferentes condiciones de clima y suelo. Se comprobó que el rendimiento depende marcadamente de dichas condiciones. Se compararon los rendimientos de *L. albus* con el valor de mercado de otros cultivos. Se determinó que los rendimientos del lupino deben ser más o menos de 4 t/ha para que sean económicamente comparativos con los rendimientos de otros cultivos.

1. EINLEITUNG

Bei *Lupinus albus* wurde in der BRD in den letzten Jahren der Züchtungsfaden, der Ende der 50er Jahre losgelassen wurde wieder aufgenommen. Ertragsversuche, verschiedene acker- und pflanzenbauliche Versuche wurden durchgeführt. Süßlupinen wurden in die EG-Marktordnung für Körnerleguminosen aufgenommen. Aber der großflächige Anbau ist bisher ausgeblieben. Deswegen gilt es, das Interesse für den Lupinenanbau und die Lupinenverwendung zu wecken. In meinem Vortrag möchte ich mich dem Lupinenanbau zuwenden. Dabei werde ich vor allem die Wirtschaftlichkeit des Lupinenanbaus betrachten, da sie den Landwirt als Anbauer primär interessiert. Diese Berechnungen vergleiche ich dann mit der Wirtschaftlichkeit anderer Marktfrüchten.

Als Kriterien für die Wirtschaftlichkeit gelten Ertrag, Erzeugerpreise, Kosten und der daraus folgende Deckungsbeitrag.

Abgeleitet von diesen Stichpunkten möchte zuerst das Ertragspotential von L.albus aus unseren Versuchen an 3 verschiedenen Standorten darstellen. Danach werde ich daraus eine Deckungsbeitragsrechnung entwickeln, wie sie in der Landwirtschaft üblich ist. Für L.albus tue ich dies ausführlich. Diese Deckungsbeiträge stelle ich dann den Deckungsbeiträgen anderer Marktfrüchte gegenüber um die Attraktivität bezüglich der Wirtschaftlichkeit, die Konkurrenzfähigkeit und auch die Grenzen von L.albus aufzuzeigen.

2. MATERIAL UND METHODE DER FELDVERSUCHE

Material: Die Lupinen, die geprüft wurden, sind Sorten und Zuchtlinien aus verschiedenen L.albus-Zuchtgebieten der Erde. Der größte Teil dieser Lupinen ist alkaloidarm, der kleinere Teil ist alkaloidreich.

Methode: Geprüft wurden diese Lupinen an 3 verschiedenen Orten in Gitteranlagen mit 3 Standards und in 3 Wiederholungen. Parzellengröße betrug 7 m².

Bodenbearbeitung: Winterfurche

Krankheiten: An allen 3 Standorten traten keine besonderen Krankheiten auf. Lediglich an den Hülsen war ein genotypisch unterschiedlicher Befall mit braunen Flecken zu beobachten. Die Körner waren jedoch ohne sichtbaren Befall.

Aussaat: Drillsaat mit 50 Körnern/m², Beizung mit TMTD.

Impfung: "Dipex Lupino". Diese Impfung war jedoch ohne Erfolg, wie sich bei Beobachtung der Versuche herausstellen sollte, da gleichzeitig gebeizt und geimpft wurde. Entgegen einer falschen Empfehlung überlebten die Rhizobien eine gleichzeitige Beizung nicht.
pH-Wert: Lag bei den Versuchsstandorten zwischen 6.8 und 7,0.

Die 3 Versuchsstandorte hatten die folgend aufgezählten unterschiedlichen Bedingungen:

Hohebuch (Hohenlohekreis):

- **Boden:** toniger Lehm über Keuperboden
- **Vorfrucht:** Sommergerste
- **Aussaat:** am 28.3.91
- **Düngung:** 100 kg P₂O₅ und 160 kg K₂O zur Vorfrucht
- **Unkrautbekämpfung:** 1 x Maschinenhacke und 1 x Handhacke
- **Klima:** Frost bis - 8°C im Rosettenstadium, das die Lupinen wider Erwarten mit gar keinen oder geringen Schäden überstanden. Der Sommer war sehr trocken, 165 mm NS bis zum Beginn der Blüte und danach bis zur Ernte nur noch 50 mm, was die Abreife und die Ernte begünstigte aber gleich-

zeitig der Ertrag drückte. Denselben Effekt hatte die große Hitze von Ende Juni bis August, die zu Blüten- und Hülsenabwurf führte.

- **Nodulation:** sehr gering
- **Ernte:** am 28.8.

Bohlingen (Landkreis Konstanz):

- **Boden:** Sandiger Lehm auf Geschiebemergel
- **Vorfrucht:** Winterweizen
- **Aussaat:** am 2.4.91
- **Düngung:** 50 kg P₂O₅ und 80 kg K₂O
- **Unkrautbekämpfung:** 3,5 l Stomp im Voraufbau und 1 x Maschinenhacke
- **Klima:** Nach der Saat bis zur Blüte geringere Niederschläge als üblich. Auch hier Frost im Rosettenstadium bis -7°C. Sehr heiße Temperaturen führten auch hier zum Abwurf von Blüten und Hülsen. Wegen der besseren Wassernachlieferung aus dem Boden fiel dieser Abwurf geringer aus als in Hohebuch. Während der fortgeschrittenen Hülsenbildung führte eine starke Gewitterschauer dazu, daß der Bestand sich zu Großteil legte. Bei der Abreife richteten sich die Lupinen wieder leicht auf, so daß kein Bodenkontakt mehr da war.
- **Nodulation:** gut
- **Ernte:** am 5.9.

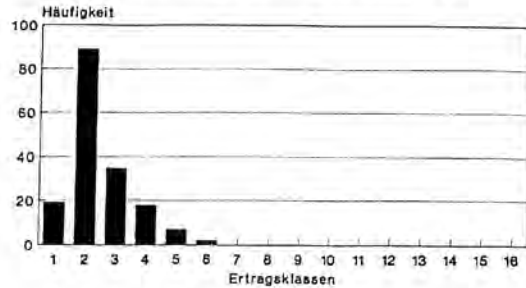
Hildesheim:

- **Boden:** Löß
- **Vorfrucht:** Winterweizen
- **Aussaat:** am 26.3.91
- **Düngung:** 15 kg N-Startgabe, sowie 400 kg K₂O und 350 kg P₂O₅ zu Vorfrucht Zuckerrüben.
- **Klima:** im Rosettenstadium frostig, Niederschläge etwas geringer als normal, aber gute Wassernachlieferung aus dem Boden. Trockenes und heißes Wetter im Juli/August begünstigte auch hier die Abreife. Vermehrte Niederschläge vor der Ernte. Deswegen konnte erst am 12.9. gedroschen werden.
- **Nodulation:** mäßig. Aber durch das örtlich hohe Düngungsniveau ist eine gute N-Nachlieferung aus der Vorfrucht anzunehmen.

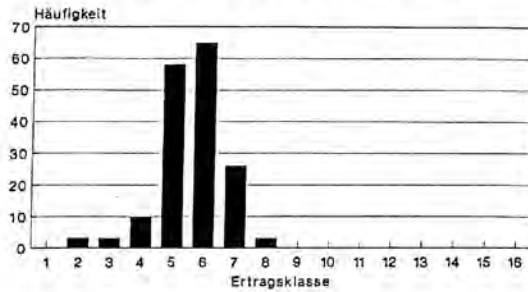
3. ERGEBNISSE DER FELDVERSUCHE

Die Erträge an den verschiedenen Standorten sollen anhand der Häufigkeitsverteilungen (Abb.1) dargestellt werden. Aus der dazugehörigen Tabelle lassen sich das Niveau und die Breite der Ertragsklassen ablesen. Die Häufigkeit zeigt, wieviele Genotypen aus dem Prüfungssortiment in der jeweiligen Ertragsklasse vertreten waren.

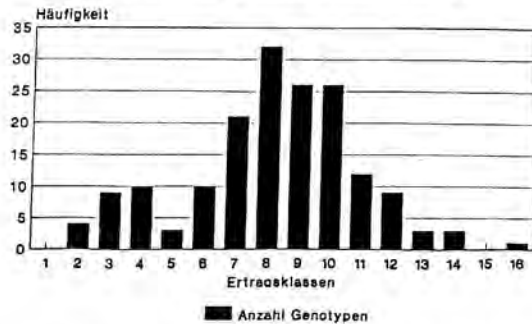
Kornertrag L.albus Hohebuch '91



Kornertrag L.albus Bohlingen '91



Kornertrag L.albus Hildesheim '91



Merkmal: Kornertrag

Klasse	Klassenbreite
1	10 - 14,9 dt/ha
2	15 - 19,9 dt/ha
3	20 - 24,9 dt/ha
4	25 - 29,9 dt/ha
5	30 - 34,9 dt/ha
6	35 - 39,9 dt/ha
7	40 - 44,9 dt/ha
8	45 - 49,9 dt/ha
9	50 - 54,9 dt/ha
10	55 - 59,9 dt/ha
11	60 - 64,9 dt/ha
12	65 - 69,9 dt/ha
13	70 - 74,9 dt/ha
14	75 - 79,9 dt/ha
15	80 - 84,9 dt/ha
16	85 - 89,9 dt/ha

Abb. 1: Häufigkeitsverteilung für das Merkmal Kornertrag an 3 Versuchsstandorten

In Hohebuch lagen die meisten Genotypen in der Ertragsklasse von 15 - 20 dt/ha. Das Versuchsmittel an diesem Standort lag bei ca. 20 dt/ha. Durch ungünstige Bodenbearbeitung, die ausgebliebene Nodulation, die Hitze und die Wasserknappheit wurden viele Genotypen in ihrer Entwicklung abgestoppt und konnten ihr Ertragspotential nicht voll entwickeln. Deshalb ist die Verteilung nach links verschoben.

Durch das natürliche Nodulationsvermögen des Bodens konnten sich die Lupinen in Bohlingen besser entwickeln als in Hohebuch. Außerdem ist die Bodenart besser für den Lupinenanbau geeignet als in Hohebuch. Der Ertragsdurchschnitt dieses Standort war 37 dt/ha und die am häufigsten belegte Ertragsklasse lag bei 35 - 40 dt/ha. Die Verteilung ist ausgeglichener als in Hohebuch.

In Hildesheim das Ertragsniveau von allen 3 Standorten am höchsten. Durch die besseren klimatischen Bedingungen und den Boden mit den besten Eigenschaften läßt sich dieses hohe Ertragsniveau erklären. Die meisten Genotypen sind im Bereich von 45 - 60 dt/ha angesiedelt. Der durchschnittliche Ertrag lag an diesem Standort bei 50 dt/ha. Zu beachten sind die Genotypen, die in den Klassen von 15 - 30 dt/ha eingetragen sind. Sie wurden von Hasen angefressen und mußten deshalb eigentlich im Bereich von 40 - 60 dt/ha auftauchen.

Je besser die Anbaubedingungen waren um breiter war die Verteilungskurve, d.h. umso mehr konnten sich die einzelnen Genotypen bezüglich des Kornertrages differenzieren und sich entfalten. In Abb. 1 ist deutlich der Einfluß verschiedener Umwelten auf das Ertragsniveau an den verschiedenen Standorten zu sehen. Die bitteren Lupinenstämme hatten ein durchschnittlich höheres Ertragsniveau als die alkaloidarmen Stämme.

4. DECKUNGSBEITRAGSRECHNUNGEN

Abgeleitet vom Ertragsniveau der einzelnen Standorte wurde für L.albus eine Deckungsbeitragsrechnung erstellt (Tab. 1), wie sie in der Landwirtschaft üblich ist, um die Entscheidung über den Anbau zu treffen. Als Marktpreis wurde der EG-Mindestpreis incl. MWSt. angenommen. Die erwarteten Kornerträge basieren auf den oben geschilderten Feldversuchen, wobei sich die Erträge von 40 und 60 dt/ha nicht am Durchschnitt sondern am Überdurchschnitt, der für die Sortenentwicklung selektiert wird, orientieren.

Nach Abzug der variablen Kosten von der Marktleistung blieben für 20 dt/ha DM 388,-, für 40 dt/ha DM 1389,- und für 60 dt/ha DM 2390,- als Deckungsbeitrag.

Die Aussagekraft dieser Zahlen für den Landwirt wird dadurch gestärkt, wenn sie den Deckungsbeiträgen anderer Marktfrüchte gegenübergestellt werden. Deshalb wird in Tab.2 der Vergleich mit anderen Marktfrüchten angestellt. Die Berechnungen für L.albus, Winterweizen (90dt/ha) und Sonnenblumen

Tab. 1: Deckungsbeitragsrechnung für L.albus bei verschiedenen Ertragshöhen: * 20, 40 und 60 dt/ha
 * durchschnittliche Feldgröße 2 ha
 * 60 ha-Betrieb mit Eigenmechanisierung
 * Daten nach KTBL-Datensammlung

Erwarteter Kornertrag	20 dt/ha	40dt/ha	60 dt/ha
Marktleistung(DM 62/dt incl.MWSt)	1240,--	2480,--	3720,--
Saatgut 1,5dt/ha (DM 150/dt)	225,--	225,--	225,--
Impfung	50,--	50,--	50,--
Saatgut insgesamt	275,--	275,--	275,--
Superphosphat 18%	59,--	119,--	178,--
Kornkali 40%	53,--	105,--	158,--
Düngung insgesamt	112,--	224,--	336,--
Herbizid (Stomp)	100,--	100,--	100,--
Fungizid (CuSO ₄)	20,--	20,--	20,--
var. Maschinenkosten	218,--	218,--	218,--
Hagelversicherung	17,--	34,--	51,--
Trocknung (20% -> 14% H ₂ O)	110,--	220,--	330,--
Summe variable Kosten	852,--	1091,--	1330,--
Deckungsbeitrag DM/ha	388,--	1389,--	2390,--

Tab 2.: Vergleich von Deckungsbeiträgen verschiedener Marktfrüchte DB von Lupinen, Sonnenblumen und Weizen(90dt) nach eigenen Erhebungen, DB für die anderen Marktfrüchte aus dem Inst. für landw. Betriebslehre/Uni Hohenheim (DOLUSCHITZ, GUTHMANN, ZEDDIES 1991; DOLUSCHITZ, KOLTSCHAK, ZEDDIES 1991)

Fruchtart	Ertrag (dt/ha)	Preis/dt (DM)	Marktleistung (DM)	var. Kosten (DM)	DB/ha (DM)
L.albus	20	62,--	1240,--	852,--	388,--
	40		2480,--	1091,--	1389,--
	60		3720,--	1330,--	2390,--
Winterweizen	60	36,--	2160,--	1194,--	966,--
	75		2700,--	1195,--	1505,--
	90		3240,--	1474,--	1766,--
Körnermais	60	38,--	2280,--	1546,--	734,--
	80		3040,--	1495,--	1545,--
Ackerbohnen	45	52,--	2340,--	955,--	1385,--
Futtererbsen	42	56,--	2352,--	1126,--	1226,--
Raps	34	80,--	2720,--	1129,--	1591,--
Sonnenblumen	30	68,--	2040,--	950,--	1090,--

wurden nach eigenen Erhebungen durchgeführt und die der anderen Früchte vom Inst. für landwirtschaftliche Betriebslehre/Hohenheim (DOLUSCHITZ, GUTHMANN, ZEDDIES 1991; DOLUSCHITZ, KOLTSCHAK, ZEDDIES 1991) übernommen.

Für Winterweizen und Körnermais wurden ebenso wie für L.albus 3 bzw. 2 Ertragserwartungen angenommen. Für Ackerbohnen, Futtererbsen, Raps und Sonnenblumen sind Deckungsbeiträge für mittlere Ertragserwartungen dargestellt.

Tab. 2 gibt Anhaltspunkte, bei welchen ha-Erträgen der Lupinenanbau im Bezug auf den Deckungsbeitrag attraktiver sein könnte als andere Marktfrüchte.

Bei einem Ertrag von 40 dt/ha bei Lupinen wäre es nötig ca. 70 dt/ha Weizen oder etwa 75 dt/ha Körnermais zu ernten. Im Vergleich zu den Deckungsbeiträgen der anderen Körnleguminosen, der Sonnenblumen und des Rapses, dessen Erzeugerpreis als inzwischen zu hoch anzusehen ist, scheint die weiße Lupine konkurrenzfähig zu sein. Zu berücksichtigen ist noch, daß bei diesen Deckungsbeiträgen der Vorfruchtwert, der bei Körnleguminosen und Raps bei 300,- 400,- DM (DOLUSCHITZ, KOLTSCHAK, ZEDDIES 1991) liegt, noch nicht berücksichtigt worden ist.

Können bei der Lupine Erträge von 40 dt/ha erreicht werden steht sie anderen Marktfrüchten im mittleren Ertragsniveau nicht nach. Bei einem Ertrag von 60 dt/ha ist der Anbau von Lupinen selbst bei Spitzenerträgen der anderen Marktfrüchte attraktiver.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Sortiment von L.albus wurde an 3 Standorten geprüft. Die verschiedenen Umwelten ergaben einen deutlichen Einfluß auf den Kornertrag von L.albus. Abgeleitet von diesen Kornerträgen wurden für L.albus Deckungsbeiträge errechnet und mit denen anderer Feldfrüchte verglichen. Um bei den derzeitigen Erzeugerpreisen mit dem Mittelmaß anderer Feldfrüchte konkurrieren zu können sollte bei L.albus ein Kornertrag von ca. 40 dt/ha erreicht werden.

6. LITERATUR

DOLUSCHITZ, R., GUTHMANN, B., ZEDDIES, J. (1991): Wie aktuell ist Mais?, Landwirtschaftliches Wochenblatt, LWBW 7/91, Landesbauernverband Baden Württemberg, Stuttgart, 17 - 20.

DOLUSCHITZ, R., KOLTSCHAK, S., ZEDDIES, J. (1991): Eiweiß von heimischen Flächen, Landwirtschaftliches Wochenblatt, LWBW 37/91, Landesbauernverband Baden Württemberg, Stuttgart, 32 - 34.

EIN PROGNOSEMODELL FÜR DIE N-FIXIERUNG UND ERTRAGSBILDUNG DER WEIßEN LUPINE (*Lupinus albus* L.)

Ch. Hartmann
Abt. Agrarökologie
Universität Bayreuth

ABSTRACT

A model for nitrogen fixation and yield of *Lupinus albus*

Field trials with *L. albus* were performed in 1989 and 1990 on various sites, which differed in pedoclimatic factors. Their influence on nitrogen fixation and yields were studied. High nitrate levels, water and oxygen shortage inhibited N-fixation and resulted in negative N balances. These negative effects could be prevented by watering, aeration and inoculation with *Rhizobium lupini* cells.

A model using multiple regression analysis is introduced to predict time of harvest, yield and N-fixation, which should allow a lupin farmer to choose the right soils and lupin varieties or species.

RESUMEN

Un modelo para la evaluación de la fijación del nitrógeno y la predicción del rendimiento de *Lupinus albus*

Se llevaron a cabo varios ensayos de campo con *L. albus* en 1989 y 1990, en lugares con diferentes factores de clima y suelo. Se estudió la influencia de las condiciones ambientales en la fijación de nitrógeno y en los rendimientos. Se comprobó que el alto contenido de nitratos y, las deficiencias de agua y oxígeno del suelo inhibieron la fijación de N, dando como resultado un balance negativo del N absorbido. Se verificó que este efecto negativo puede ser evitado por medio del riego, la aereación y la inoculación con *Rizobium lupinii*.

Se presenta un modelo de análisis de regresión múltiple para predecir la fecha de cosecha, el rendimiento y la fijación de nitrógeno, que permitiría al agricultor elegir el suelo, la especie o la variedad correcta de lupino a sembrar.

Zusammenfassung

In mehreren Feldversuchen wurde 1989-90 der Einfluß von Boden- und Klimafaktoren auf die N-Fixierung und Ertragsbildung verschiedener Genotypen der Weißen Lupine geprüft. Die N-Fixierung wurde vor allem durch hohe Nitratgehalte sowie Wasser- oder Sauerstoffmangel im Boden behindert, was zu negativen N-Bilanzen führte. Gezielte Bewässerungs-, Belüftungs- und Beimpfungsmaßnahmen hatten dagegen deutliche Ertragssteigerungen zur Folge.

Mittels eines multiplen Regressionsmodells wurde versucht, nach Erfassung der entsprechenden Klima- und Bodendaten, Prognosen bezüglich Abreife, Kornertrag und fixierter N-Menge zu treffen. Dem Landwirt wird dadurch die Wahl standortgerechter Sorten und Anbaumaßnahmen erleichtert. Durch die Optimierung der N-Düngung für die Nachfrucht kann außerdem eine Reduzierung der Nitratauswaschung erreicht werden.

Einleitung

Von den einjährigen Lupinenarten weist die Weiße Lupine unter mitteleuropäischen Bedingungen gegenwärtig das höchste Ertragspotential auf (KURZ 1988, LOPEZ-BELLIDO & FUENTES 1990). Im Vergleich zu anderen Körnerleguminosen besitzt sie außerdem ein hohes N-Fixierungspotential (HARTMANN & ALDAG 1989). Zwar besteht bei Körnerleguminosen ein Zusammenhang zwischen Kornertrag und fixierter N-Menge (HAUSER 1987, KÖPKE 1989), die präzise Abschätzung der fixierten N-Menge in Abhängigkeit von Genotyp und Standortbedingungen ist jedoch bis jetzt nicht möglich. Zur Klärung entsprechender Wechselwirkungen wurden daher verschiedene mehrfaktorielle Feldversuche mit der Weißen Lupine angelegt.

Material & Methoden

Verwendet wurde Handelssaatgut bzw. noch in der Züchtung befindliches Material von sieben süßen Genotypen (Alkaloidgehalt < 0,02%, vgl. Tab 3). Die Feldversuche wurden, außer in Großbardorf, als randomisierte Blockanlagen mit vier Wiederholungen jeweils Anfang April ausgesät. Die Pflanzdichte wurde nach dem Aufgang einheitlich auf 35 m⁻² eingestellt (Versuchsfragen vgl.

Tab.1). Der Standort Lehen befindet sich ca. 10 km östlich von Bayreuth, der Standort Großbardorf ca. 30 km nordöstlich von Schweinfurt und der Standort Grenzach ca. 5 km östlich von Basel (Beschreibung vgl. Tab.2).

Tab.1: Darstellung der Versuchsfragen

Versuch	Varianten (Stufen)
FV1/89	N-Angebot zur Saat (30, 80, 130 kg N _{min} -N/ha) x pH-Wert (5.2, 5.9) x Luftkapazität in 0-30 cm Bodentiefe (38, 61 mm); verwendeter Genotyp: Golf
FV2/90	2 Genotypen (Golf, Amiga) x Wasserangebot (0, 70, 100, 170 mm Bewässerung) x Erntetermin (Kornfüllungsbeginn, Vollreife)
FV3/90	3 Genotypen (Achat, Amiga, Golf) x LK in 0-30 cm Bodentiefe (29, 49 mm) x Beimpfung (ohne, mit 10 ³ <i>R.lupini</i> -Zellen/Korn)
FV4/90	3-7 Genotypen (Achat, Amiga, Golf, Ida, Llaima, Lublanc, Wat) x 5 Standorte (Speyer, Grenzach, Großbardorf, Bayreuth, Lehen)

Die Bestimmung der fixierten N-Menge erfolgte nach der erweiterten Differenzmethode mit Sommerraps als Referenzfrucht (STÜLPNAGEL 1982). Die N-Menge in Sproß und Blattabwurf wurde dabei zu vier Terminen über den N-Gehalt der Blätter und den Blattflächenindex regressiv ermittelt (HARTMANN, in Vorb.). Da die Berücksichtigung der N-Mengen in den Wurzelsystemen von Leguminose und Referenzfrucht die fixierte N-Menge um maximal 10% erhöht, gleichzeitig aber sehr arbeitsaufwendig ist (HAUSER 1987), wurden nur am Standort Bayreuth Wurzeluntersuchungen mit der Bohrmethode durchgeführt. An den Standorten Bayreuth und Lehen wurde die Wasserspannung mit Einstichtensometern in drei Bodentiefen (15, 45 u. 75 cm) wöchentlich gemessen, um über die pF/Wg-Beziehung die aktuelle Evapotranspiration abzuschätzen.

Tab.2: Beschreibung der Standorte (1)Jahressumme bzw -mittel 1930-60, 2)bis zur effektiven Durchwurzelungstiefe, 3)in 0-60 cm Bodentiefe zur Saat, 4)log₁₀ (Zellen/g Boden) in 0-30 cm Bodentiefe)

Standort	Bay-reuth	Lehen	Groß-bardorf	Speyer	Gren-zach
Niederschlag ¹⁾ (mm)	702	750	550	584	863
Temperatur ¹⁾ (°C)	7,7	7,5	8,5	9,7	9,8
n. Feldkapazität ²⁾ (mm)	165	99	201	148	240
Luftkapazität ²⁾ (mm)	106	69	87	164	119
Bodenart	IS	IT	uL	mS	tL
pH-Wert (CaCl ₂)	5,2	6,9	6,0	6,3	7,0
N _{min} -N ³⁾ (kg/ha)	19	59	38	42	51
<i>R.lupini</i> -Gehalt ⁴⁾	3,6	1,9	5,2	4,2	2,5

Ergebnisse

Im FV1/89 verringerte sich die N-Bilanz mit zunehmender N-Düngung. In den Varianten mit künstlich verdichtetem Oberboden war sie sogar z.T. negativ, daß heißt, die fixierte N-Menge war geringer als die mit den Körnern entzogene N-Menge. Wie auch im FV3/90 bei allen drei Genotypen führte die durch Verdichtung erzeugte Reduktion der Luftkapazität zu einem deutlichen Rückgang der N-Fixierung. Die Ertragsbildung war demgegenüber nicht so stark betroffen, mit der Folge, daß die Rohproteingehalte durchweg geringer waren (vgl. Abb.1).

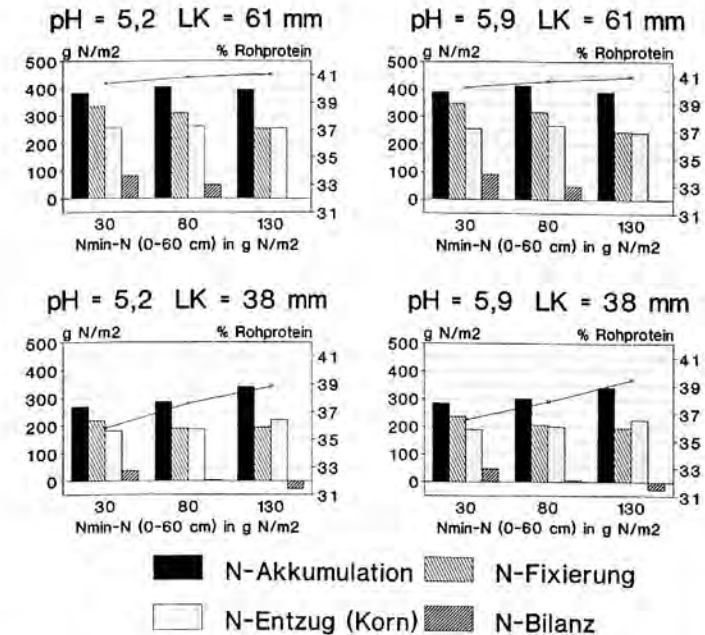


Abb.1: N-Bilanzen und Rohproteingehalte im FV1/89 für den Genotyp Golf in Abhängigkeit von pH-Wert, Luftkapazität in 0-30 cm (LK) und Nmin-Angebot zur Saat (N-Bilanz = N-Fixierung - N-Entzug (Korn))

Im FV2/90 erhöhte sich die fixierte N-Menge durch die höchste Bewässerung (170 mm) von 29 auf 58 g N/m², die N-Bilanz von 8 auf 15 g N/m². Auffallend war die geringere Verdunstung der bewässerten Variante im Juni, was auf Sauerstoffmangel im Boden schließen läßt (vgl. Abb.2). Wurzeluntersuchungen ergaben, daß die bewässerte Variante unter 15 cm Bodentiefe eine deutlich geringere Wurzellängendichte aufwies und auch den Boden zwischen den Reihen weniger durchwurzelte.

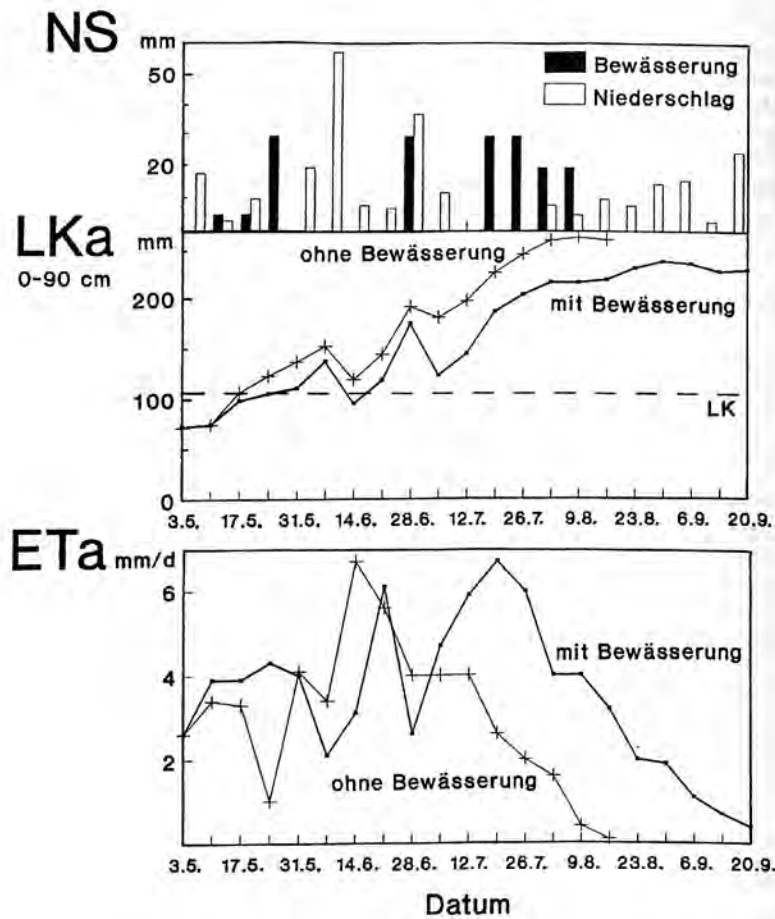


Abb.2: Wasserangebot, aktuelle Luftkapazität (LK_a) und aktuelle Evapotranspiration (ET_a) des Genotyps Golf mit und ohne Bewässerung im FV2/90

In Tab.3 sind die Kornerträge der Feldversuche 1990 zusammengestellt. Die Genotypen sind dabei in der Reihenfolge zunehmender Spätreife angeordnet. I.d.R. erbrachten die spätreifen Genotypen höhere Erträge (der hohe Ertrag des Genotyps Ida in Großbardorf ist auf wechselnde Bodenverhältnisse innerhalb des Versuchsfeldes zurückzuführen).

Tab.3: Kornerträge der Feldversuche 1990 in g/m^2 (13% Wg, Werte einer Spalte mit gleichen Buchstaben sind bei $P = 0.05$ nicht signifikant verschieden; ^{1/}Klimatische Wasserbilanz = Niederschlag + Bewässerung - potentielle Evapotranspiration (April-August); ^{2/}nicht angebaut)

Standort	Bayreuth	Lehen	Großbardorf	Speyer	Grenz-zach	
KWB ^{1/} mm	-73	-243	-245	-285	-228	-70
Achat	. ^{2/}	310 ^c	309 ^c	462	-	475 ^c
Lublang	-	360 ^{bc}	-	-	446 ^b	489 ^c
Wat	-	370 ^{bc}	-	-	-	500 ^{bc}
Amiga	512 ^b	369 ^{bc}	337 ^b	-	490 ^a	-
Ida	-	404 ^b	-	737	476 ^{ab}	525 ^b
Golf	758 ^a	414 ^b	373 ^a	510	489 ^a	558 ^b
Llaima	-	518 ^a	-	-	-	625 ^a

Zur Bewertung der Standortfaktoren wurden alle Feldversuchsdaten ($n=50$) einer multiplen Regressionsanalyse mit folgenden Zielvariablen unterzogen: Kornertrag, fixierte N-Menge (N_{fix}), Rohproteingehalt (Eiweiß) und Rohölgehalt (ÖI) sowie Vegetationszeit. Die Zahl der erforderlichen Prädiktoren wurde dabei soweit wie möglich reduziert, gleichzeitig wurden aber alle wichtigen Variablen zur Beschreibung von Klima, Boden und Genotyp einbezogen. Die zur Validierung eingesetzten Feldversuchsdaten 1986-88 ($n=12$, HARTANN & ALDAG 1989) zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem Modell ($r > 0,98$).

Tab.4: Multiple Regression mit Kornertrag (g/m^2), fixierter N-Menge ($g N/m^2$) und Vegetationszeit (d) als Zielvariablen (* $P = 5\%$, ** $P = 1\%$, *** $P = 0.1\%$; ^{1/}Klimatische Wasserbilanz = Niederschlag + Bewässerung - pot. Evapotranspiration; ^{2/}April-August, ^{3/}Summe der täglichen Temperaturmittel); ^{4/} bis zur effektiven Durchwurzelungstiefe; ^{5/} in 0-60 cm zur Saat; ^{6/} \log_{10} (Zellen/g Boden) in 0-30 cm;

4.1: Prädiktoren

Name	Beschreibung	Spannweite
Wasser	n. Feldkapazität + KWB ^{1/2/}	-129 - +335 mm
Sonne	Sonnenscheindauer ^{2/}	896-1221 h
Wärme	Temperaturmittel ^{2/}	13,0-17,0°C
Genotyp	$\Sigma T^3/(\text{Blühende})/\Sigma T(\text{Blühbeginn})$	1,16-1,69
Luft	Luftkapazität - 0,5 x KWB ^{1/}	70-278 mm
pH	pH-Wert ($CaCl_2$) in 0-30 cm	5,2-7,2
N(Bod)	$N_{min} - N$ zur Saat + 0,01 N_t in 0-60 cm	5,0-16,8 g/m^2
N(Sym)	\log_{10} (<i>R. lupini</i> -Zellen/g Boden) in 0-30 cm	0,8-5,2

4.2: standardisierte Regressionskoeffizienten

Variable	Ertrag	N(Fix)	Eiweiß	Öl	Zeit
Wasser	1,72***	1,71***	0,54**	0,49**	1,77***
Wärme	-1,04***	-1,48***	-1,30***	-0,37***	-1,91***
Sonne	1,21***	0,95***	0,27***	0,37***	1,24***
Genotyp	0,28***	0,46***	0,28***	0,33***	0,47***
Luft	0,62***	1,02***	0,83***	-0,31*	0,45**
pH	0,35*	0,78**	-0,17*	0,41**	0,29
N(Bod)	0,16	-0,78***	0,46***	-0,17*	0,29*
N(Sym)	0,19***	0,15*	0,17*	0,01	0,01
B (=r ²)	0,92***	0,88***	0,71***	0,69***	0,90***

4.3: Prognosebeispiele (Anmerkungen vgl. Tab.4)

Genotyp	Achat		Golf		Llaima
Niederschlag ¹⁾ (mm)	300		300	500	400
Temperatur ¹⁾ (°C)	13		15		17
Sonnenscheindauer ¹⁾ (h)	1000		1000		1200
n. Feldkapazität ⁴⁾ (mm)	130	150	220	180	
Luftkapazität ⁴⁾ (mm)	120	80	100	100	
Bodenart	IS	tL	uL	sL	
pH-Wert (CaCl ₂)	6,0	7,0	6,5	6,5	
N _{min} -N ⁵⁾ (kg/ha)	30	50	50	140	
R.lupini-Gehalt ⁶⁾	3,0	3,0	3,0	1,0	
Ertrag (g/m ² , 13% WG)	335	376	192	565	484
N(fix) (g N/m ²)	26,5	26,3	11,4	34,8	18,6
Eiweiß (% TrS)	39,9	41,9	36,8	38,1	34,8
Öl (% TrS)	10,7	12,0	10,7	14,1	11,5
Zeit (d nach Aussaat)	142	151	115	170	144
N(fix)-N(Korn) (g N/m ²)	+7,6	+4,0	+1,4	+4,3	-5,2

In einem zweiten Schritt wurden daher alle Feldversuchsdaten 1986-1990 zur Modellierung verwendet. Dies hatte neben der Erhöhung der Bestimmtheitsmaße zur Folge, daß die Wirkungen der Prädiktoren Luft, N(Bod) und N(Sym) höhere Signifikanzniveaus erreichten (Beschreibung vgl. Tab. 4.1). Außerdem wurde der Einfluß des Prädiktors Wasser gegenüber den anderen deutlich abgeschwächt.

Diskussion

Neben der bekannten Abhängigkeit der Ertragsbildung und N-Fixierung von der Wasserversorgung (SCHRÖDER 1985, JACKSON u.a. 1986, LARSON u.a. 1989) bzw. der Vegetationszeit von der Temperatur kann nun auch der Einfluß der Bodenparameter genauer beschrieben werden. Die standardisierten Regressionskoeffizienten geben Auskunft über Stärke und Richtung der Wirkung eines Prädiktors (vgl. Tab. 4.2).

Hohe Temperaturen und/oder Sauerstoffmangel im Boden reduzieren die N-Fixierung demnach stärker als den Kornertrag, was sich in geringeren Rohproteingehalten im Korn äußert. Während eine mineralische N-Düngung im Rahmen der in das Modell einbezogenen Versuche keinen Einfluß auf den Kornertrag hatte, verzögert sie die N-Fixierung wie auch Abreife. Die jeweils unterschiedliche Wirkung der Prädiktoren Luft, pH und N(Bod) auf die Zielvariablen Eiweiß und Öl erklärt die häufig gefundene negative Korrelation zwischen Rohprotein- und Rohölgehalt. Die geringeren Bestimmtheitsmaße bei diesen Ertragsparametern sind wohl darauf zurückzuführen, daß für die Eiweiß- und Ölbildung vor allem die Standortbedingungen während der Kornfüllungsperiode entscheidend sind. Außerdem wurden die in den Feldversuchen gefundenen Wechselwirkungen in diesem Modell nicht berücksichtigt.

In Tab. 4.3 sind für drei Genotypen Prognosebeispiele dargestellt. Der frühreife Genotyp Achat erbringt dabei an einem kühlen Standort (z.B. Frankenalb) auf zwei verschiedenen Böden vergleichbare Ergebnisse. Der Ertrag ist auf dem Sandboden, die N-Bilanz (fixierte N-Menge minus geerntete N-Menge im Korn) dagegen auf dem Lehmboden etwas geringer. Die Bewässerung des Genotyps Golf auf einem Lößboden führt erwartungsgemäß zu einer deutlichen Erhöhung bei allen Ertragsparametern. Beim spätreifen Genotyp Llaima wurde die Wirkung einer N-Startgabe von 100 kg N/ha aufgrund geringer *R.lupini*-Dichte im Boden an einem warmen Standort (z.B. Oberrheinebene) simuliert. Bei vergleichbarer Wasserversorgung und Vegetationszeit gegenüber den Beispielen mit dem Genotyp Achat wird zwar ein höherer Ertrag, aber eine geringere N-Fixierung erzielt.

Das Ertrags- und N-Fixierungspotential der Weißen Lupine steigt i.d.R. mit der Vegetationszeit. Dies trifft häufig auch für die N-Bilanz zu, da spätreife Genotypen nach Trockenperioden Niederschläge im August noch nützen können. Die tatsächlich fixierte N-Menge hängt jedoch in erheblichem Maße auch von Bodenfaktoren ab. Unter warm-trockenen Klimabedingungen ist v.a. die nutzbare Feldkapazität, unter kühl-feuchten Klimabedingungen v.a. die Luftkapazität des Bodens entscheidend. Eine zu geringe *R.lupini*-Dichte, ein hohes N_{min}-Angebot und/oder Sauerstoffmangel im Boden (durch Verdichtung oder Wasserüberschuß) beschränken die N-Fixierung und führen zu negativen N-Bilanzen. Eine vereinfachte Formel zur Bestimmung der fixierten N-Menge ist in Abb.3 dargestellt. Demnach würde z.B. die Sorte Amiga bei einem Kornertrag von 50 dt/ha auf einer Parabraunerde mit Vorfrucht Getreide ca. 317 kg N/ha fixiert haben. Bei einem Rohproteingehalt von 36% berechnet sich die N-Bilanz in diesem Fall zu +62 kg N/ha.

$$N(\text{Fix}) = 7,5 \cdot \text{Ertrag} - 0,66 \cdot N(\text{Bod}) - 11 \cdot \text{Genotyp} + 35$$

Abb.3: vereinfachte Formel zur Bestimmung der fixierten N-Menge $N(\text{Fix})$ in kg N/ha nach der Ernte (Ertrag = Kornertrag in dt/ha (13% WG); $N(\text{Bod}) = N_{\text{min}}$ -Angebot + N-Nachlieferung des Bodens in kg/ha (z.B.: IS 80, sL 100, uL/1U 120, tL/IT 140); Genotyp = Determinierungsgrad der Sorte (z.B. Achat 1.16, Amiga 1.23, Ida 1.38, Llaima 1.69); Berechnung mittels multipler Regression mit $r^2 = 0,85^{***}$ $P(\text{Prädiktoren}) < 0,01$, Datengrundlage vgl. Tab.4)

Abgesehen von gutem Wasser- und Lichtangebot sind demnach ein lockeres Saatbett, ein N_{min} -Gehalt < 50 kg N/ha und - bei zu geringer *R.lupini*-Dichte - eine Beimpfung Voraussetzung für eine hohe N-Fixierung. Insbesondere auf schluffreichen, zur Verdichtung neigenden Böden ist eine mechanische Unkrautbekämpfung vor Bestandsschluß zu empfehlen, da sie zusätzlich die Durchlüftung fördert und die Wasserverluste durch Evaporation reduziert. Je nach Standort ist der Genotyp anzubauen, der mit dem höchsten Ertrag rechtzeitig abreift, um noch eine Winter-/Zwischenfrucht bestellen zu können. Dies ist notwendig, um den N-Gewinn für die Nachfrucht nicht durch Nitratauswaschung im Winterhalbjahr zu verlieren.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. GÄRDITZ und Herrn Dr. P. RÖMER für die Bereitstellung des Saatguts

Literatur

- HARTMANN, C. & Aldag, R., 1989a: N-Fixierung und Ertragsstruktur der Weißen Lupine (*Lupinus albus* L.) im Vergleich zu *Vicia faba* L. und *Glycine max* (L.) Merr. auf verschiedenen Standorten. J. Agronomy & Crop Science **163**, 201-211
- HAUSER, S., 1987: Schätzung der symbiotisch fixierten N-Menge von Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) mit erweiterten Differenzmethoden. Dissertation Universität Göttingen
- JACKSON, K.J., BERTHELSEN, J.E. und BLIGHT, G.W., 1986: Raingrown and Irrigated Lupins in the Callide Valley, Queensland. Queensland J. Agricult. and Animal Sciences **43** (2), 127-134
- KÖPKE, U., 1989: Körnerleguminosen: N-Fixierung, Vorfruchtwirkung und Fruchtfolgegestaltung - Auswirkungen auf die Belastung von Agrarökosystemen, in: Körnerleguminosen. Schriftenreihe des BMELF, Reihe A, Heft 367, 52-63

KURZ, C., 1988: Einfluß von Saatzeit, Bestandsdichte und Wasserangebot auf Kornertrag und Ertragsstruktur von Lupinen. Dissertation Universität Hohenheim

LARSON, K.J., CASSMANN, K.G. und PHILLIPS, D.A., 1989: Yield, N-Fixation and Aboveground N-Balance of Irrigated White Lupine in a Mediterranean Climate. Agronomy Journal **81**, 538-543

LOPEZ-BELLIDO, L. & FUENTES, M., 1990: Growth, Yield and Yield Components of Lupin Cultivars. Agronomy Journal **82**, 1050-1056

SCHRÖDER, P., 1985: Einfluß von Klima und Saugspannung des Bodens auf den Wasserverbrauch, Wachstum und Ertrag von Ackerbohnen. J. Agronomy & Crop Science **154**, 171-181

STÜLPNAGEL, R., 1982: Schätzung der von Ackerbohnen symbiotisch fixierten N-Menge mit der erweiterten Differenzmethode. J. Agronomy & Crop Science **151**, 18-30

ZUM EINSATZ VON HUMMELN UND BIENEN (APOIDEA) IN BESTÄNDEN DER WEIßEN LUPINE
(LUPINUS ALBUS)

W. Gärditz
Bad Neustadt-Mühlbach

ABSTRACT

Use of honeybees and bees in cultivations of *Lupinus albus*

Allogamy is important as well for the quality of a gene pool as for grain yield of entomogamous plants. The Bumblebee, *Bombus terrestris*, is the best suited pollen vector for *Lupinus albus*. Surplus yields of grain are attainable by allogamy due the cultivar.

RESUMEN

El uso del abejas y abejorros (*Apoideae*) en el cultivo de *Lupinus albus* L.

En las plantas entomógamas la alogamia es importante tanto para la calidad del genoma como así también para el rendimiento de granos. El abejorro *Bombus terrestris* es el mejor vector de polen en *Lupinus albus*. Quedó demostrado que el excedente de producción de granos depende de la alogamia propia del cultivar.

Einleitung

Durch fossile Funde wissen wir, daß die bienenartigen Insekten (Apoideae) sich seit mindestens 85 Mio Jahren in Coevolution mit den bedecksamigen Gewächsen (Magnoliatae) befinden. Vor dem Hintergrund dieser symbiotischen Beziehungen haben sich die Blütenpflanzen im Florenbereich erfolgreich durchgesetzt. Bei allen insektenblütigen Pflanzen ist das Wechselspiel zwischen Pollenvektor und Blüte Ausdruck eines ständigen evolutionären Kräftemessens. Es geht dabei um den Transport des genetischen Materials der Pflanze mit dem Ziel, die Qualität des Genpools, als einer Voraussetzung für Adaption und Radiation der jeweiligen Pflanzenart, zu gewährleisten.

Die Allogamie ist im Vergleich zur Autogamie zwar das energetisch aufwendigere Fortpflanzungssystem, sie bietet aber bemerkenswerte Vorteile.

Es ist bekannt, daß dieses Rekombinationssystem nicht nur für die Mikro- und Makroevolution von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch für die laufende Steuerung der genetischen Plastizität und der Stabilität lokaler Populationen.

Eine enge, an anthropogenen Vorstellungen orientierte Leistungszucht ist die Ursache für die Einengung eines Genpools. Die

bienenartigen Insekten wirken durch regelmäßigen Austausch des genetischen Materials und durch die Neukombination von Kopplungsgruppen der genetischen Erosion entgegen.

Auch bei der Weißen Lupine (*Lupinus albus*) werden durch die Übertragung von Fremdpollen die Qualität der Früchte, die Keimkraft der Samen und der Fruchtansatz günstig beeinflusst. Der Umfang von Allogamie liegt bei der WL nach Angaben in der Literatur zwischen 10 und 20 %. Er kann nach eigenen Beobachtungen linienabhängig aber erheblich höher sein.

Alle Pollengenome unterliegen während der Passage von der Narbe bis zur Mikropyle einem umfassenden Selektionsdruck. Die Effektivität dieser Auslese auf der Ebene des männlichen Gametophyten wird in ihrem Umfang und ihrer Wirksamkeit nur noch von Mikrobenpopulationen übertroffen.

Die Erhaltung erkannter Schlüsselreize bei der Weißen Lupine wie Form und Farbe, hier besonders die erkannten UV-Muster und ihre Wirkung auf die Insekten, sind bei dieser Pollenblüte von besonderem Interesse.

Die von einigen Autoren postulierten Nektarien konnte ich bei der *albus*-Blüte nicht finden (Langridge und Goodman, 1985). Die Aussage, daß diese Blüte eine entomophile ist, wird auch durch Untersuchungen gestützt, bei denen das Verhältnis von Pollenzahl pro Blüte zu Eizellenzahl pro Blüte mit dem entsprechenden Quotienten bei anemogamen Pflanzen verglichen wird. Zusätzlich bestätigen die Größe und das Gewicht des Einzelpollens sowie das Vorkommen von Pollenkitt die genannten Abhängigkeiten.

Es ist nachgewiesen, daß andere partielle Fremdbefruchter wie der Raps (*Brassica napus*) oder die Ackerbohne (*Vicia faba*) durch Fremdbestäubung beachtliche Ertragssteigerungen erfahren (Kettner, 1985). Ich habe diese Leistungsreserve auch bei der Weißen Lupine nachweisen können. Bei der Linie IDA wurde unter Anwendung der Scissur-Technik durch Fremdbefruchtung ein hochsignifikanter Körnermehrertrag von 27 Gewichts-% gemessen (Gärditz, 1989).

Material und Methode

Die Scissur-Technik beruht auf dem Prinzip, daß Blüten, bei denen die orientierenden Schlüsselreize versiegelt wurden, nicht angefliegen werden. Die gleiche Wirkung auf das optische System der Hummeln erreicht man durch Entfernen des 1., 2. und 3. Blütenblattes. Das intakte Schiffchen ermöglicht eine Fruchtknotenentwicklung unter völlig natürlichen Bedingungen. Einzelheiten dieser vielseitig anwendbaren Technik sind beschrieben (Gärditz und Aldag, 1989).

Bei den Bestäubungsversuchen wurden Insekten verwendet, die aufgrund ihrer Verfügbarkeit, ihrer Nahrungspräferenzen, ihrer Jahresrhythmen und ihres speziellen Körperbaues als Pollenüberträger für die Weiße Lupine in Frage kommen. Dazu wurden Honigbienen (*Apis mellifica*) der Rassen *carnica* und *nigra*, die am Versuchsort vorkommenden Solitärbienen der Arten *Megachile*, *Osmia* und *Anthophora* sowie die lokal vorkommenden Hummelarten (*Bombus species*) überprüft.

Bei den Versuchen wurden Bienenvölker (*Apis spec.*) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien direkt in die blühenden Lupinenbestände gestellt. Durch den Entzug von Pollenwaben und das gleichzeitige Zuhängen von ungedeckelter Brut wurde ein massiver Eiweißmangel im Stock erzeugt. Durch diese experimentellen Eingriffe in die Brutnester sollte der Beflug der Lupinenblüten ausgelöst oder zumindest gefördert werden.

Die Eignung von solitär lebenden Wildbienen zur Bestäubung der Weißen Lupine wurde schwerpunktmäßig mit der Blattschneiderbiene *Megachile rotundata* überprüft. Einbezogen wurden dabei die lokalen Populationen von *Osmia* und *Anthophora*. Als Nistsystem wurde das in Canada bewährte, nach dem Baukastenprinzip funktionierende Plattensystem verwendet.

Auf ihre Eignung als Pollenvektor für die Weiße Lupine wurden die Erdhummelarten *Bombus terrestris*, *B. lucorum* und *B. magnus flavoscutellaris* sowie die Steinhummel (*Bombus lapidarius*) und die Ackerhummel (*Bombus agrorum*) geprüft.

Dazu wurden Jungköniginnen mit Drohnen ausgewählter Vaternvölker begattet, bei 3 - 6 Grad erschütterungsfrei im Kühlschrank überwintert, im Februar des folgenden Jahres zur Koloniegründung angeregt und mit Beginn der Weidenblüte (*Salix spec.*) im Freien aufgestellt.

Ergebnisse und Folgerungen

Die mehrjährigen Versuche mit Honigbienen ergaben, daß unsere Honigbienenrassen *carnica* und *nigra* die Lupinenblüte als Massentracht nicht annehmen. Einzeltiere kann man zwar beim Blütenbesuch beobachten; sie können die Blütenmechanik der *L. albus* aber nur mit sichtbarer Anstrengung auslösen. Für einen erfolgreichen Narbenkontakt brauchen die Honigbienen im Mittel 9,6 sec pro Blüte. Der Energieaufwand ist im Vergleich zum Energiegewinn aus dem Besuch der nektarlosen Blüte offenbar so reizlos, daß es den Suchbienen, wie Versuche im Schaukasten ergaben, nicht gelingt, die Trachtquelle mit Hilfe der bekannten Kommunikationstechniken im Stock zu vermitteln.

Die Vorteile beim Einsatz von Honigbienenvölkern zu Bestäubungszwecken wie die große Individuenzahl, die effektive Kommunikationstechnik der Sozietät oder die Blütenstetigkeit, können für Bestände der Weißen Lupine nicht genutzt werden.

Der Versuch, *Megachile rotundata* in großer Zahl zu züchten, wie es in Kanada der Fall ist, und bei Blühbeginn an die Bestände zu stellen, ist bei unseren Gegebenheiten technisch möglich, aber unwirtschaftlich. Das Bemühen, mengenmäßig nennenswerte Partien von Blattschneiderbienen im Vorpuppenstadium zu importieren, um sie nach der Metamorphose an die Lupinenbestände

zu bringen, wird durch behördliche Auflagen praktisch unmöglich gemacht.

Das nach dem Baukastenprinzip funktionierende Plattensystem ist bei entsprechender Kalibrierung gut geeignet. Es kann nach Saisonende leicht gereinigt, sterilisiert und wieder verwendet werden.

Eine Eigenschaft der Blattschneiderbienen ist die Abhängigkeit ihrer aktiven Phasen von der Außentemperatur. Bekanntlich tritt aber in unserem Klimagebiet während der Lupinenblüte von Ende Mai bis Mitte Juni eine Schlechtwetterperiode auf. Während dieser sog. Schafskälte lagen die Tagesmittelwerte wiederholt so niedrig, daß nicht nur die solitär lebenden Bienen, sondern auch die sozial lebenden Honigbienen für eine Bestäubungsarbeit ausfielen. Zudem existieren in dieser Jahreszeit bei den Wildbienen meist nur überwinterte Stammütter oder die Sozietäten sind zahlenmäßig noch so klein, daß die präsenten Bienen nicht in der Lage sind, einen Lupinenbestand ausreichend zu befliegen.

Als Facit der Versuche mit Hummeln (*Bombus spec.*) ergab sich, daß die Erdhummelart *Bombus terrestris* der bestgeeignete Pollenüberträger zur Bestäubung der Weißen Lupine ist. Die Stammütter werden im März, zu Beginn der Salweidenblüte (*Salix spec.*) wieder aktiv, entwickeln zügig einen Sommerstaat, so daß zur Zeit der Lupinenblüte Ende Mai/Anfang Juni eine ausreichend große Individuenzahl pro Volk vorhanden ist. Diese Spezies hat Nahrungspräferenzen für Lupinen, ist bei richtiger Völkerführung ausreichend blütenstet und bevorzugt einen kleinen Flugkreis.

Sie ist im Hinblick auf ihre Hebelverhältnisse und auf ihr Körpergewicht für den Bestäubungsmechanismus der albus-Blüte geeignet und ihre ventrale Behaarung ist so ausgebildet, daß genügende Mengen an Pollen übertragen werden können. Ihr ethologisches Repertoire ist so flexibel, daß sie leicht im Labor zu züchten ist und relativ problemlos zur Koloniegründung angeregt werden kann.

Aufgrund jüngster Erfahrungen wären noch eine Spritzmittel-

toleranz beim Besuch kontaminierter Begleitfloren, z. B. in Rapsbeständen, und - für die Zukunft - eine Eignung für eine instrumentelle Besamung wünschenswert.

Ein weiterer Vorzug dieser Hummelart ist, daß sie mit bis zu 300 Tieren pro Volk sehr individuenreich werden kann, und daß sie die albus-Blüte sicher und schnell bestäubt. Im Durchschnitt benötigt ein Tier 2,7 sec pro Blüte. Sie fliegt schon bei Temperaturen zwischen 4 - 6 Grad C. Im Vergleich dazu fliegt die Honigbiene im Sommer ab 14 Grad, die einzelnen Solitärbienen ab 18 bis 20 Grad C.

Die domestizierten terrestris-Völker bestehen Ende April bis Anfang Mai nur aus der Königin, die einen Pollenklumpen mit ca. 6 Larven bebrütet und vor sich eine gefüllte Nektarzelle angelegt hat.

Ist eine ausreichende Trachtkette am Standplatz vorhanden, so entwickeln sich solche Völker meist problemlos. Die Tiere speichern Pollen und Nektar für 5 - 8 Tage und stehen kurze Notzeiten mit diesem Futtervorrat durch. Besteht ein akuter Nahrungsmangel oder werden die notwendigen Sammelflüge witterungsbedingt längere Zeit unterbunden, reagieren die Königinnen mit Brutreduktion und eventuell sogar mit Larvenfraß. Bei Trachtmangel müssen deshalb Pollen und eine 30 %ige sterilisierte Honiglösung zugefüttert werden.

Mit Beginn der Lupinenblüte werden diese Völker, die dann im Durchschnitt über 40 - 60 Flughummeln verfügen, an die Lupinenbestände gestellt. Bei der für die Hummeln günstigen ernährungsphysiologischen Zusammensetzung des Lupinenpollens entwickeln sich solche Völker weiterhin gut. Man kann mit ihnen bei Bedarf auch andere Schläge außerhalb des bisherigen Flugkreises anwandern.

Beobachtungen von Sammelflügen der terrestris-Erdhummel bei Temperaturen über 15 Grad C während der Vollblüte der Lupinen haben ergeben, daß eine *B. terrestris* unter diesen Bedingungen Sammelflüge von ca. 20 min Dauer durchführt und in dieser Zeit 400 - 450 Blüten befliegt.

Setzt man domestizierte Völker ein, so muß man, je nach Volkgröße und dem Zustand von Konkurrenztrachten, 4 - 5 terrestris-Völker pro ha Lupinen für eine ausreichende Bestäubung vorsehen.

Die anderen in Frage kommenden Hummelarten werden später im Jahr aktiv, sind teilweise temperaturempfindlicher, sind nur unter aufwendigen Bedingungen zur Koloniebildung anzuregen und ausnahmslos individuenärmer. Sie sind für die gewünschte Verwendung weniger geeignet.

Arbeitet man mit Lupinenstämmen, die mehr zur Fremdbefruchtung neigen, muß man eine ausreichend große Hummelpopulation vor Ort verfügbar haben. Dieser Bedarf kann auf Großflächen oder in einer Flur, der Feldgehölze, Raine und Ödflächen fehlen und die deshalb nur eine lückenhafte Trachtkette hat, nur mit angewanderten Völkern gedeckt werden.

Der zur Domestikation erforderliche Aufwand an Zeit, Material und Sachkenntnis ist nicht überall gegeben. Deshalb ist es wirtschaftlicher, einmal angesiedelte Populationen durch Hegemaßnahmen so zu stützen, daß sie sich selbst erhalten können.

Als vorteilhaft in diesem Sinne erwies sich das Bereitstellen von Schutzeinrichtungen zur Überwinterung und das Aufstellen von Nistkästen. Ich habe den älteren Bautyp mit freiem Laufgang weiterentwickelt und festgestellt, daß Nistkästen häufiger bezogen werden, wenn sie mit Blende gebaut sind (Gärditz, 1989). Dabei ist offensichtlich das Loch in der Fläche der Schlüsselreiz für die nistplatzsuchenden Königinnen. Die Attraktivität eines solchen Nistkastens wird noch erhöht, wenn die Einstreu mit Mäusewitterung angereichert wird.

Wem keine lokalen Hummelpopulationen zur Verfügung stehen oder wer selbst keine Hummelvölker nachziehen will, kann inzwischen bei einer holländischen und einer belgischen Firma terrestris-Völker zu Bestäubungszwecken kaufen. Zur Zeit ist allerdings wegen der Artenschutzvorschriften noch eine Importgenehmigung für Deutschland erforderlich.

Für die praktische Züchtungsarbeit mit der Weißen Lupine ergeben sich folgende Konsequenzen:

Will man sich die Möglichkeit erhalten, mittel- oder langfristig einen Hybridmechanismus bei *L. albus* zu entwickeln oder unter heterosisartigen Bedingungen in synthetischen Populationen das Leistungspotential dieser Pflanze ganz ausschöpfen, so muß man den Pollenvektor von vorneherein in die Züchtungsarbeit mit einbeziehen. Es wird damit auch entschieden, ob diese vielseitig verwendbare Öl- und Eiweißpflanze in Zukunft mehr zum Selbst- oder zum Fremdbefruchter hin entwickelt wird.

Weiter ergibt sich daraus der Anspruch, daß die zur Wertprüfung vorgelegten Sorten der Weißen Lupine von der Prüfbehörde nicht nur mit Rhizobien geführt, sondern auch unter Berücksichtigung des Faktors Hummel beurteilt werden.

Facit

Allogamie ist sowohl für die Qualität eines Genpools als auch für den Kornertrag entomophiler Pflanzen wichtig. Die Erdhummel *Bombus terrestris* ist der bestgeeignete Pollenvektor für die Weiße Lupine. Durch Fremdbefruchtung werden linienabhängige Mehrerträge erreicht.

Literatur		
Alford, D. V.	1975	Bumblebees Davis - Poynter, London
Cousin, R.	1983	Strategies in breeding of oil- and protein crops. Eucarpia - Göttingen
Engels, W.	1990	Social insects Springer-Verlag, London
Gärditz und Aldag	1989	Petal removal as a new method to control pollen transfer in the White Lupin (<i>L. albus</i>). Plant Breeding 103, 255 - 257
Gärditz, W.	1989	Die Bedeutung der heimischen Hummeln und Bienen (Apoideae) für die Ertragsstruktur der Weißen Lupine. Dissertation, Bayreuth
Kettner, H.	1985	Grundwissen für Imker VEB Landwirtschaftsverlag Berlin
Langridge and Goodman	1985	Honeybee pollination of lupins Austr. J. Exp. Agric. 25, 220 - 223
Sperber et al.	1988	Öl- und Eiweißpflanzen Agrar-Verlag, Wien

ZUR REALISIERUNG DER ALKALOIDARMUT UND WEITERER ZUCHTZIELE BEI

LUPINUS LUTEUS, *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* UND *LUPINUS ALBUS*

Martin Brummond

0-2061 Bocksee

ABSTRACT

Breeding for low alkaloid contents and other aims in *Lupinus luteus*, *L. angustifolius* and *L. albus*

The three lupin species, *L. luteus*, *L. angustifolius* and *L. albus*, which are regularly grown in Central and Eastern Europe, differ in the level of selection and breeding. Whereas sweet varieties of *L. luteus* have already similar yields as bitter forms, yields of sweet *L. angustifolius* and *L. albus* are still less productive. Under extreme pedoclimatic conditions yields were always reduced. Therefore, plant breeders should breed for more stress-tolerant lines. Another aim should be the improvement of resistance against Fusarium, which is a problem at many sites.

RESUMEN

El mejoramiento vegetal para lograr, entre otros objetivos, bajo contenido de alcaloides en *Lupinus luteus*, *L. angustifolius* y *L. albus*

Las tres especies de lupinos, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. albus*, que se cultivan regularmente en el centro y este europeo, difieren en el nivel de selección y mejoramiento vegetal. Mientras que las variedades dulces de *L. luteus* tienen un rendimiento similar a las formas amargas, los rendimientos de las variedades dulces de *L. angustifolius* y *L. albus* son mucho menores. Bajo condiciones extremas de clima y suelo los rendimientos siempre se reducen, por lo tanto, el mejoramiento vegetal debe ser encaminado hacia obtener líneas con mayor tolerancia al estrés. Otro de los objetivos del mejoramiento vegetal de lupino debe ser la resistencia al fusarium, que es causante de problemas en muchos lugares de cultivo.

Einleitung

Die Auslese der ersten alkaloidarmen Pflanzen stand an Beginn einer sehr intensiven Züchtungsarbeit. Bei allen drei landwirtschaftlich genutzten Altweltlupinenarten, also *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* und *Lupinus albus* werden inzwischen seit etwa 50 Jahren Süßlupinensorten angebaut.

Nachfolgend soll versucht werden, am Beispiel der Alkaloidarmut und einiger weiterer Zuchtziele, den bei den einzelnen Lupinenarten erreichten Stand zu charakterisieren. Es soll geprüft werden, welche züchterischen Schritte beim Zuchtziel Alkaloidarmut, aber auch bei anderen, inzwischen realisierten Zuchtzielen bei der weiteren Arbeit Bedeutung haben sollten.

Ergebnisse

Nach den ersten Anfängen zum Anfang des 20. Jahrhunderts begann 1927 eine gänzlich neue Entwicklung in der Lupinenzüchtung. Sie wurde geprägt durch die Arbeiten, die v. Sengbusch im Kaiser-Wilhelm-Institut in Müncheberg begann.

Mit Hilfe einer sehr wirksamen Massenselektionsmethode gelang es ihm, bei der Gelblupine die ersten alkaloidarmen Pflanzen zu finden. Sie waren die Grundlage für die Züchtung der ersten Süßlupinen von *Lupinus luteus*. Auch heute noch werden die damals gefundenen genetischen Quellen genutzt.

Schon bald danach wurden auch bei *Lup. angustifolius* und *Lup. albus* alkaloidarme Pflanzen gefunden.

Die ersten alkaloidarmen Sorten (Süßlupinen) wurden bereits 1933 zugelassen.

Gleichzeitig wurde die gezielte züchterische Arbeit zur Züchtung von Sorten mit weiterhin verbesserten Eigenschaften begonnen.

Die Süßlupinen sind danach sehr schnell in Ostdeutschland, Polen, Belorußland, der Ukraine und im westlichen Teil Rußlands zu einem tragenden Element des Eiweißfutteranbaus geworden.

In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden weitere wesentliche Zuchtziele realisiert, wie die Weichschaligkeit, die Platzfestigkeit, die Frühreife, verschiedene Samenfarben, die Fusariumresistenz, die Saatzeittoleranz durch Thermoneutralität, der Wuchsdeterminismus u.a.m. Auf die Notwendigkeit einer intensiven Arbeit an diesen Zuchtzielen hatte v. Sengbusch 1930 schon frühzeitig aufmerksam gemacht.

Mit diesen Eigenschaften verloren insbesondere *Lup. luteus* und *Lup. angustifolius* ihren Wildpflanzencharakter und wurden zu Kulturpflanzen. Bei *Lup. albus* konnte der z.T. schon vorhandene Kulturpflanzentypus weiterentwickelt werden.

H. Stubbe (1955) bewertete die gelbe Lupine als das klassische Beispiel, wie mit Hilfe einer gezielten Anwendung der Erkenntnisse der Genetik und der Evolutionstheorie durch die Pflanzenzüchter in historisch kurzer Zeit aus einer primitiven Nutzpflanze eine hochwertige Kulturpflanze entwickelt wurde.

Am Beispiel einiger Zuchtziele soll versucht werden, die erreichten Ergebnisse darzustellen, auf Probleme aus ihrer Realisierung hinzuweisen und auf Wechselwirkungen zu anderen Eigenschaften der Pflanze aufmerksam zu machen.

Alkaloidarmut

Der grundlegende und seitdem das Sortenprofil bei allen drei Altweltlupinen bestimmende züchterische Schritt war die Selektion von alkaloidarmen Pflanzen, aus denen sehr schnell die ersten sog. "Süßlupinensorten" entwickelt wurden. In der Zeit von 1935 - 1950 wurden Süßlupinensorten von *Lup. luteus*, danach von *Lup. angustifolius* und *Lup. albus* in allen traditionellen Lupinenanbaugebieten Mittel- und Osteuropas etabliert.

Die Vorzüge der Süßlupinensorten waren eindeutig. Die Lupinen konnten nunmehr geweidet oder zur Gewinnung von eiweißreichem Grünfütter gemäht werden und die Samen konnten ohne Einschränkungen verfüttert werden. In den Ergebnissen von Fütterungsversuchen wurde immer wieder die hohe Eiweißqualität der Süßlupinen hervorgehoben (z.B. Mangold 1949).

Trotz ihrer unbestreitbaren Vorzüge ist jedoch Kritik an den Süßlupinen geübt worden. Ihnen werden insbesondere höhere Ansprüche an die Standortbedingungen nachgesagt. In dieser Richtung äußerten sich Schaefer (1947), Baumann und Thomas (1948), Renius (1949), Tiemann (1952), Böhl (1959), Gäde (1960), Kress (1964), aber auch andere Autoren.

Böhl (1959), Gäde (1960) und Enderlein (1969) fanden ein vermindertes Wurzelbildungsvermögen (Wurzellänge, Wurzelmasse).

Über eine niedrigere Trockenverträglichkeit berichten Schäfer (1947), Troll (1956) und Gäde (1960). Eine höhere Empfindlichkeit gegenüber naßkalter Frühjahrswitterung wird von Troll und Schander (1938) genannt.

Eine herabgesetzte Knöllchenbildung fanden Könekamp (1935/36) und Böhl (1959). Von Barbacki (1962) wird auf einen höheren Schädlingsbefall bei Süßlupinen aufmerksam gemacht.

Neben diesen konkretisierten Feststellungen wird die Kritik an den Süßlupinen in der Regel leider sehr undifferenziert auf alle drei Altweltlupinenarten übertragen.

Als zweifelsfrei muß gelten, daß die Alkaloide die im wesentlichen einzigen antinutritiven Inhaltstoffe dieser Altweltlupinen sind (Schoeneberger, 1981). Sie erbringen mit Sicherheit wesentliche vitalitätsfördernde und -stabilisierende Leistungen im Leben der Pflanze. Dieser Tatsache muß bei der Züchtung unbedingt Rechnung getragen werden.

Aufklärung darüber, in welchem Maße die vorgebrachten Kritiken sich in der Leistung der Sorten ausdrücken, können naturgemäß nur Vergleichsprüfungen bringen.

Leider sind solche direkten Anbauvergleiche aus den letzten Jahren nicht mehr bekanntgeworden. Deshalb mußten wir weiter zurückliegende Versuchsergebnisse benutzen.

Eine Auswahl von Ergebnissen bei Lup. luteus wird nachstehend dargestellt.

Tabelle 1
Sortenvergleich mit Gelblupinen, Gülzow 1951
(n.Kress 1952, Ausz.)

	Kornertrag	
	dt/ha	Rel.
Gelbe Bitterlupine	25,2	100
Gülzower Süße Gelbe	27,2	108
Weiko II	21,8	86

Bei dem in Tabelle 1 dargestellten Anbauvergleich wurde die Bitterlupinensorte Schwako (platzfest) mit zwei Süßlupinensorten verglichen. Zwischen beiden Süßlupinensorten zeigen sich deutliche Ertragsunterschiede, während die bessere Süßlupine sich von der Bitterlupinensorte nicht unterscheidet.

Tabelle 2 zeigt Lupinenerträge, die in der Hauptprüfung der DDR von 1958-1966 in jedem Jahr jeweils an mehreren Orten gefunden wurden.

Tabelle 2
Kornerträge von Süß- und Bitterlupinensorten,
Hauptprüfung DDR 1958-1966, Schwako 18,6 dt/ha = 100 %
(ZFS-DRR, 1959-1967) *)ab 1962 = Bianka

Sorte Typ	Gülzower Gelbe	Weiko III *)
	NB	NB
1958	108	91
1959	102	84
1960	95	61
1961	101	78
1962	95	93
1963	89	80
1964	91	76
1965	88	81
1966	80	55
<hr/>		
dt/ha, \bar{x} 9 Jahre	17,5	14,2
Relativ "	95	76

Auch in diesem mehrjährigen Anbauvergleich wurde zwischen der Bitterlupine Schwako und der Süßlupinensorte Gülzower Süße Gelbe kaum ein Leistungsunterschied gefunden. Demgegenüber blieb die frohwüchsige, ebenfalls alkaloidarme Sorte Weiko III in ihrer Leistung erheblich hinter beiden Sorten zurück.

Eine weitere Versuchsreihe, in der ebenfalls mehrere Sorten mit verschiedenen Wuchstypen zur Bitterlupinensorte Schwako verglichen wurden, wurde für den Zeitraum 1956-1961 von Troll vorgelegt.

Tabelle 3
Kornerträge von Süßlupinen- und Bitterlupinensorten, 1956-1961
(n.Troll 1965)

Sorte Typ	Schwako		Gülz.Gelbe	Weiko II	Weiko III
	B	Rel.	NB	NB	NB
	dt/ha	Rel.	Rel.	Rel.	Rel.
1956	27,4	100	92	33	90
1957	11,7	100	199	150	92
1958	32,0	100	98	83	89
1959	7,9	100	82	62	80
1960	29,1	100	110	93	99
1961	9,4	100	106	103	73
<hr/>					
\bar{x} Rel.		100	110	81	90

Auch hier weisen die Ergebnisse bei den alkaloidarmen Sorten eine hohe Differenziertheit aus. Die Sorte Gülzower Süße Gelbe hat zumindest das gleiche Leistungsniveau wie die Bitterlupinensorte Schwako.
Von Gäde wurden die vorstehend schon genannten Ergebnisse bestätigt.

Tabelle 4
Kornerträge von Süß- und Bitterlupinensorten bei Lup. luteus, 1957-1959, Schwako = 100 % (n.Gäde 1960)

Jahr	Ort	Boden- typ	Nieder- schläge	E r t r ä g e		Weiko III NB Rel.
				Schwako B dt/ha	Gülz.Gelbe NB Rel.	
1957	Uelitz	D1	normal	11,4	122	92
1958	Uelitz	D1	normal	21,6	104	87
1958	Lupitz	D2	normal	19,3	66	57
1959	Uelitz	D2	sehr trocken	1,4	32	28
1959	Neuhof	D3	sehr trocken	15,9	85	36
1959	Biestow	D5	sehr trocken	12,9	80	63

Gäde fand 1957 und 1958 bei Gülzower Gelbe ähnliche Leistungen wie bei Schwako. Deutlich niedriger waren die Erträge bei Weiko III.

Besonders hinzuweisen ist auf den erheblichen Ertragsrückgang der infolge der Sommertrockenheit im Jahr 1959 bei Weiko III auftrat.

Aber auch Gülzower Süße Gelbe blieb im Jahr 1959 deutlich hinter der Bitterlupine zurück, oder anders gesagt, die Anpassungsfähigkeit an extreme Standortbedingungen war bei der Sorte Gülzower Süße Gelbe niedriger.

Bei Lup. angustifolius liegen viel weniger Leistungsvergleiche vor als bei Lup. luteus. Das hat seine Ursache sicherlich auch darin, daß alkaloidarme Sorten von Lup. angustifolius eine deutlich geringere Anbauverbreitung erreicht haben. Der folgende Anbauvergleich wurde von Hackbarth und Troll über 12 Jahre durchgeführt.

Tabelle 5
Kornerträge Lup. angustifolius, x 1939-1950,
(n. Hackbarth und Troll 1959)

Sorte	Typ	Aussaat	dt/ha	Rel.
Pflugs Allerfr.	B	4.4.	31,2	100
	B	18.4.	26,6	100
Müncheb. Blaue II	NB	4.4.	26,1	84
	NB	18.4.	19,2	72
v. Sengb. Blaue (St. 411)	NB	4.4.	22,1	71
	NB	18.4.	16,2	61

Die Tabelle zeigt, daß sich auch bei der schmalblättrigen Lupine die alkaloidarmen Sorten in ihrem Leistungsniveau unterscheiden. Beide Süßlupinensorten haben deutlich niedrigere Erträge als die verglichene Bitterlupinensorte. Beide Süßlupinensorten reagierten bei ungünstigeren Standortbedingungen (Spätsaat) mit deutlichem Ertragsrückgang im Vergleich zur Bitterlupine.
Nachstehende Tabelle stammt aus Versuchen mit polnischen Sorten.

Tabelle 6
Mittlerer Kornertrag von allen geprüften Sorten bei Lup. angustifolius in Przebedowo, Polen, 1956-1961 (Barbacki u.a.)
)Anzahl nicht genannt

Jahr	Bitterlupinen Sorten dt/ha		Süßlupinen Sorten dt/ha	
	1956	3	20,3	7
1957	5	11,4	10	10,3
1958	7	8,3	16	6,5
1959	4	12,9	7	7,5
1960 *)		24,9		23,7
1961 *)		19,2		18,9
\bar{x} dt/ha		16,2		14,0

In allen Jahren brachten die Bitterlupinen im Durchschnitt der Sorten höhere Erträge als die Süßlupinen. Bemerkenswert ist, daß im sehr trockenen Jahr 1959 der Leistungsnachteil der süßen Sorten deutlich am größten war.
Die detaillierte Darstellung einiger, über mehrere Jahre verglichener Sorten zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7
Kornertrag mehrjährig geprüfter Formen von Lup. angustifolius, Przebedowo 1956-1959, Ausz. (n.Barbacki u.a.)

Sorte	Typ	1956		1957		1958		1959	
		dt/ha	Rel.	dt/ha	Rel.	dt/ha	Rel.	dt/ha	Rel.
Wielkop.	B	22,6	100	12,4	100	6,7	100	11,5	100
TL 21	B	-	-	11,7	94	8,8	131	14,0	123
Pul.Rozowy	B	18,5	82	12,6	100	9,6	143	12,5	109
Pop.Potulic	B	19,7	87	8,4	80	-	-	12,5	109
Obornicki	NB	16,9	75	10,6	88	4,7	70	5,4	47
Szarak	NB	19,4	86	10,4	87	5,5	82	7,5	65
Swiatly	NB	18,5	82	9,4	82	6,7	100	-	-
Rozowy	NB	14,6	64	11,8	94	5,3	79	9,3	81
\bar{x} Rel.	B		100		100		100		100
\bar{x} Rel.	NB		86		94		68		59

Sowohl bei den Bitterlupinensorten als auch bei den Süßlupinen finden sich Sorten mit durchschnittlich etwas besseren Leistungen, wie z.B. TL 21 und Szarak. In Jahren mit durchschnittlich höheren Erträgen sind die Ertragsunterschiede zwischen den Bitterlupinen und den Süßlupinen im Durchschnitt niedrig. Ertragsunterschiede zeigen sich deutlicher im Jahr 1958. Besonders auffällig ist das extreme Jahr 1959, in dem alle geprüften Süßlupinensorten sehr niedrige Erträge aufwiesen.

Auf die große Bedeutung der Sorte als genetisches System macht ein Vergleich aufmerksam, der mit Analogformen, d.h. jeweils einem süßen und einem bitteren Typ der gleichen Sorte über mehrere Jahre durchgeführt wurde.

Tabelle 8
Vergleich von Analogformen verschiedener Sorten von *Lup. angustifolius*, Przebedowo 1957-1960 (n.Barbacki u.a., erweitert)

Sorte	Typ	1957	1958	1959	1960	1960
		dt/ha	dt/ha	dt/ha	Mittelb. dt/ha	Sandb. dt/ha
Wielkop.	B	12,4	6,7	11,5	20,1	27,6
TL 17	NB	11,6	5,5	6,9	20,6	26,1
TL 23	B	11,7	8,5	13,5	19,4	23,6
Szybkop.	NB	12,2	10,1	7,9	19,7	23,0
TL 21	B				18,3	24,5
TL 21	NB				19,3	21,4
TL 19	B				17,8	28,6
TL 19	NB				20,3	25,1
CZ	B				17,3	28,0
CZ	NB				16,7	25,8
JZ	B				20,6	20,7
JZ	NB				18,5	22,0

Auch hier werden die unterschiedlichen Jahresleistungen sichtbar. Festzustellen ist, daß die Analogformen der gleichen Sorte in den meisten Jahren durchaus ähnliche Leistungen brachten. Im Jahr 1959 führte auch in diesen Versuchen die Auswirkung der extremen Sommerwitterung bei den alkaloidarmen Analogenen zu erheblich niedrigeren Erträgen. Beim Anbau auf besseren Böden zeigten 1960 beide Analoge keine Ertragsunterschiede. Beim Anbau auf dem leichten Boden waren 1960 die Erträge bei den alkaloidarmen Analogformen in der Regel niedriger.

Leider stehen von *Lup. albus* nur sehr wenige Ergebnisse über Ertragsvergleiche von süßen und bitteren Formen zur Verfügung. Sie wurden durch Hackbarth und Troll (1959) publiziert.

Tabelle 9
Kornerträge *Lup. albus*, 1950-1955
x 6 Versuche (n. Hackbarth und Troll 1959)

Sorte	Typ	Aussaart	dt/ha	Rel.
Zuchtstamm	B	optimal	24,1	100
Matthis		14 Tage sp.	20,4	100
Nährquell	NB	optimal	22,1	92
		14 Tage sp.	17,1	84
St. 246	NB	optimal	19,4	81
		14 Tage sp.	14,6	72

In diesem Anbauvergleich waren beide Süßlupinen dem bitteren Zuchtstamm deutlich unterlegen. Auch hier ist bei einer Aussaatverzögerung eine deutliche Ertragsminderung der süßen Formen erkennbar. Sie ist sicherlich ebenfalls als eine nicht ausreichende Standortsanpassung zu interpretieren.

Fusariumresistenz

Bei *Lup. albus* und *Lup. angustifolius* wurden bisher Schädigungen durch *Fusarium* nur vereinzelt beobachtet. Bei beiden Arten sind bisher resistente Sorten in Europa nicht bekannt.

Durch die hohe Anbauausdehnung von *Lup. luteus* auf den typischen Sandböden war in den traditionellen Lupinenanbaugebieten eine schnell fortschreitende Verseuchung mit *Fusarium* zu verzeichnen. Dadurch wurde bei *Lup. luteus* die Resistenzzüchtung zu einer zwingenden Aufgabe.

Für die Resistenzzüchtung bei *Lup. luteus* gab es schon sehr frühzeitig eine solide Grundlage, denn schon 1940 fand Wuttke (1943) die ersten Pflanzen mit *Fusarium*resistenz. Bald darauf begann auch die züchterische Arbeit. Sie führte mit "Refusa" zur Zulassung der ersten fusariumresistenten Süßlupine im Jahre 1971. Refusa wurde bald durch neue Sorten ersetzt. So konnte erreicht werden, daß z.B. in der DDR seit 1975 das gesamte Süßlupinensortiment von *Lup. luteus* fusariumresistent war. Von diesen Sorten war "Boresa" durch eine besonders gute *Fusarium*resistenz ausgezeichnet.

Die *Fusarium*resistenz hat jedoch einen quantitativen Charakter und wird charakterisiert durch den Anteil der zum Zeitpunkt der Reife geschädigten oder abgestorbenen Pflanzen im Bestand. Bei den Auswirkungen des *Fusarium*befalls handelt es sich regelmäßig um Beeinträchtigungen der Wasserversorgung der Pflanzen. Daraus ergibt sich, daß Befallsschäden bei dichten Beständen, auf leichteren Standorten und in Jahren mit starker Sommer-trockenheit besonders hoch sind.

Aber auch die Häufung des Lupinenanbaus in der Fruchtfolge hat negative Ertragswirkungen, weil es zur Erhöhung der Verseuchung kommt.

Hierzu haben wir mit Hilfe der "Datenbank Großkörniger Leguminosen" flächendeckend die seinerzeit von den Vermehrungsflächen der DDR erfaßten Daten ausgewertet. Es handelt sich um Ergebnisse, die über 10 Jahre (1980-1989) von etwa 200 T ha Vermehrungsfläche auf mehr als 4.000 Schlägen erfaßt wurden.

Tabelle 10
Ertragseinfluß der Anbauhäufigkeit von Lup. luteus, resistente Sorten (Datenanalyse 1980-1989)

Anbauwiederholung	Gelbe Lupinen	
	Fläche %	dt/ha
2. Jahr	1	6,2
3. Jahr	1	6,1
4. Jahr	3	7,7
5. Jahr	3	7,3
6. Jahr	4	8,1
7.-9. Jahr	22	8,7
länger	66	8,8

Zunächst ist zu bemerken, daß die Landwirte insgesamt eine hervorragende Fruchtfolgedisziplin geübt haben, denn bei 92 % der Lupinenbestände betrug die Anbaupausen auch bei den fusariumresistenten Sorten mehr als 5 Jahre. Gleichzeitig ist aber festzustellen, daß auch bei den als resistent geltenden Sorten Ertragsdepressionen bei zunehmender Häufigkeit des Lupinenanbaus nicht zu verhindern waren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, durch gezielte züchterische Arbeit ständig an der Züchtung von Sorten mit quantitativ verbesserter Feldresistenz zu arbeiten. Über Ergebnisse solcher Arbeiten wurde an anderer Stelle bereits berichtet (Brummund 1984).

Weichschaligkeit

Von wesentlicher praktischer Bedeutung ist naturgemäß die volle und gleichmäßige Keimung des Saatgutes, es darf also keine Hartschaligkeit bestehen.

Bei Lup. albus wurde die Weichschaligkeit bei den Landsorten schon als Domestikationsmerkmal vorgefunden. Bei Lup. luteus und Lup. albus jedoch war die Keimung bei den Landsorten infolge jahresbedingt stark modifizierter, insgesamt aber häufig recht hoher Hartschaligkeitsanteile oft deutlich beeinträchtigt.

Die Folge war ungleichmäßiges Auflaufen, wodurch es meist es meist zu einer sehr ungleichmäßigen Abreife kam. Vor allem aber wurden auch in den Folgejahren immer wieder noch neu auflaufende Lupinen gefunden, die dann zur Vermischung mit den jetzt angebauten Sorten führten.

Die Züchtung nichthartschalig werdender (weichschaliger) Sorten war deshalb schon frühzeitig ein wesentliches Zuchtziel. Die Selektion weichschaliger Samen gelang schon in relativ kurzer Zeit und bereits die Sorte Weiko I war weichschalig.

Alle seitdem zugelassenen Lupinensorten sind weichschalig.

Tabelle 11
Weichschaligkeit verschiedener Stämme von Lup. luteus nach 72 Std. Trocknung bei 45 C (n. Troll 1948/49)

Sorte	gequollene Samen (% nach Stunden)					\bar{x} 24
	2	4	6	8	24	
Stamm 8						
Nr. 2769/47	-	4	6	6	37	29,3
	-	5	6	6	29	
	-	4	5	5	22	
Stamm 8						
Nr. 3419/47	40	92	100	100	100	100,0
	44	96	100	100	100	
	34	95	100	100	100	
Stamm 8						
Nr. 3408/47	85	89	97	98	100	98,6
	72	83	91	94	97	
	89	94	95	97	99	
Stamm 80						
	1	4	7	7	17	14,6
	-	1	5	6	18	
	-	-	2	2	9	
Weiko I						
Nr. 2878/47	23	73	91	97	100	100,0
Weiko II						
Nr. 2877/47	75	99	100	100	100	100,0

Mit der Tabelle 11 wird die bereits in den Anfangsjahren erreichte Weichschaligkeit, die als grundlegender Zuchtforschritt u.a. zur Sorte Weiko I führte, ganz eindeutig demonstriert. Durch den unterschiedlichen Quellungsverlauf der einzelnen Stämme innerhalb von St. 8 zeigt sich die große Variabilität innerhalb der Lupinenpopulation.

Aber auch die quantitativen Unterschiede, die bei einer an sich nach 24 Stunden erreichten Vollquellung zwischen Weiko I und Weiko II bzw. zwischen Nr.3419 und Nr.3408 verbleiben, machen deutlich, wie unterschiedlich die Quellfähigkeit und das Quelltempo genetisch definiert ist und entsprechend dem jeweiligen genetischen Hintergrund quantitativ verschieden in Erscheinung tritt.

Untersuchungen über die Wechselwirkungen der Quellfähigkeit zu anderen biologischen Parametern sind bisher nicht bekannt geworden.

Die Analyse der Weichschaligkeit neuer Zuchtstämme muß auch bei der weiteren Arbeit bei *Lup. luteus* und *Lup. angustifolius* eine notwendige Aufgabe bleiben, weil immer an eine von Stamm zu Stamm unterschiedliche phänotypische Ausprägung der Eigenschaft Weichschaligkeit gedacht werden muß.

Diskussion

Die alkaloidarmen Zuchtsorten waren in den letzten 40-50 Jahren die Grundlage des Lupinenanbaus in Mittel- und Osteuropa. Sie waren für die Körnerfutterproduktion sowie für die Grünfütterung in einer, auf regionale Selbstversorgung mit Futtermitteln orientierten Landwirtschaft von größter Bedeutung.

Insbesondere *Lup. luteus* war für eine mit den Mitteln der Vorfrucht und der Fruchtfolge gesicherte Verbesserung der Fruchtbarkeit der in diesen Gebieten vorhandenen umfangreichen Sandbodenflächen ganz wichtig. Neben der Alkaloidarmut wurden wesentliche weitere qualitative Zuchtfortschritte erreicht, wie z.B. Fusariumresistenz, Platzfestigkeit, Weichschaligkeit, frühere Reife, Aussaatoleranz und Wuchsdeterminismus.

Mit diesen qualitativ neuen Eigenschaften, die inzwischen bei den einzelnen Lupinenarten unterschiedlich weit realisiert sind, wurden *Lup. luteus*, *Lup. angustifolius* und *Lup. albus* von primitiven Nutzpflanzen zu sehr leistungsfähigen Kulturpflanzen.

Das fordert uns auch aus heutiger Sicht zu größter Hochachtung vor solchen Züchtern, wie v.Sengbusch, Hackbarth, Troll, Kress und Plarre, deren Erfolge für die Landwirtschaft wohl nicht hoch genug bewertet werden können. Das gilt auch für die für andere Züchtungsobjekte beispielgebende Lösung der von ihnen bearbeitenden Zuchtziele.

Die hinsichtlich von Ertragsnachteilen an den Süßlupinen verschiedentlich vorgebrachten Kritiken sind schon deshalb nicht zu akzeptieren, weil die Süßlupinen einen völlig neuen Verwendungszweck repräsentieren. Sie gelten als eiweißreiche Futterpflanze mit dem für mitteleuropäische Verhältnisse höchsten Eiweißgehalt bei sehr guter Eiweißqualität.

Diese Aufgabe kann von den Bitterlupinen überhaupt nicht erbracht werden. Die Kritiken sind also vornehmlich als Hinweise zur Leistungsverbesserung der Süßlupinen zu bewerten.

Für eine Analyse zum Vergleich von Sorten aller drei Lupinenarten wurden von uns mehrere Versuche anderer Autoren vergleichend analysiert. Die Ergebnisse zeigen ein durchaus arten- und sortentypisches Verhalten.

Bei allen drei Lupinenarten weisen die mit Bitterlupinen verglichenen Süßlupinensorten sehr unterschiedliche Ertragsleistungen auf. Damit wird erkennbar, daß die Sortenleistung nicht in erster Linie von der Alkaloidarmut sondern von dem genetischen Aufbau der Sorte bestimmt wird. Das wird

insbesondere auch durch die sehr ähnliche Leistung der von Barbacki u.a. bei *Lup. angustifolius* vergleichenden Sorten-analoge unterstrichen.

Mehrfach konnte nachgewiesen werden, daß bei *Lup. luteus* die besten Lupinensorten durchaus zumindest die gleichen Erträge brachten, wie die zum Vergleich angebauten Bitterlupinen. Es handelt sich dabei immer um Sorten, die von uns (Brummund 1984) als Buschtyp charakterisiert wurden.

Mit Sicherheit war zur Gewährleistung des bei den besten alkaloidarmen Sorten von *Lup. luteus* erreichten hohen Ertragspotentials schon die Entscheidung wesentlich, die v.Sengbusch traf, indem er von den drei für Alkaloidarmut aufgefundenen Genquellen ausschließlich den St. 8 für die praktische Züchtung einsetzte, weil er die beste Ertragsleistung hatte.

Ob die besten alkaloidarmen Sorten von *Lup. angustifolius* und *Lup. albus* ebenfalls eine solche Ertragsfähigkeit aufweisen wie die Bitterlupinensorten, ist aus den zur Verfügung stehenden Versuchsergebnissen nicht nachzuweisen. Allein schon aus diesen Gründen erscheint es dringend geboten, auf Grundlage des erreichten Zuchtfortschrittes, d.h. mit den besten verfügbaren Sorten von allen drei Lupinenarten erneut Vergleichsprüfungen durchzuführen. Sie allein können über den nunmehr erreichten Leistungsstand und die von Süßlupinen- zu Bitterlupinensorten bestehenden Ertragsunterschiede Auskunft geben.

Von wesentlich praktischer Bedeutung ist die bei allen drei Lupinenarten immer wieder zu treffende Feststellung, daß Süßlupinensorten unter ungünstigeren Standortbedingungen eigentlich jeder Art, in ihrer Ertragsleistung hinter den Bitterlupinensorten zurückblieben. Wie es scheint, könnte das ein Ausdruck eingeschränkter Vitalität infolge der eingetretenen Alkaloidarmut sein. Hieraus muß bei allen drei Lupinenarten für den Züchter die Forderung abgeleitet werden, mit dem Zuchtmaterial Prüfungen unter Provokationsbedingungen durchzuführen. Damit könnte die Auswahl von alkaloidarmen Stämmen erreicht werden, die auf Streßbedingungen weniger oder gar nicht mehr mit zurückbleibenden Erträgen reagieren.

In diesem Zusammenhang darf gesagt werden, daß von uns bei der Züchtung alkaloidarmer Sorten von *Lup. luteus* bereits seit 1965 das Zuchtziel "Anspruchslosigkeit", gemeinsam mit der Ertragshöhe als bestimmende Zuchtaufgabe verfolgt wird. Dazu werden seither gezielte Kreuzungen durchgeführt und mit dem Zuchtmaterial alljährlich Provokationstests auf sehr leichten Böden zur Auswahl der am besten angepaßten Stämme angelegt.

Auch die Ergebnisse dieser Aufgabenstellung mögen zum heutigen Leistungsstand der Sorten von Gelben Süßlupinen beigetragen haben.

Wie schon in früheren Arbeiten festgestellt (Brummund 1984), ist die Fusariumresistenz sortentypisch quantitativ verschieden. Auch resistente Sorten werden unter Verseuchungsbedingungen je nach Standort und Jahreswitterung unterschiedlich stark beeinträchtigt. Ähnliche Einflüsse entstehen durch eine zu enge Fruchtfolgestellung.

Deshalb muß die Züchtung von solchen Sorten, die unter den Bedingungen des Praxisanbaus eine geringere Befallsrate aufweisen, bei *Lup. luteus* auch weiterhin zu den wichtigsten Zuchtaufgaben gehören.

Zwar ist die Weichschaligkeit seit Jahrzehnten als Zuchtziel qualitativ gelöst. Dennoch wird schon von Troll auf quantitative Ausprägungsunterschiede aufmerksam gemacht. Diese können auch in neuem Zuchtmaterial gefunden werden.

Damit wird deutlich, daß auch die Ausprägung der Weichschaligkeit, jeweils in Wechselwirkung mit dem übrigen genetischen Hintergrund quantitativ differenziert ist.

Deshalb ist es auch künftig erforderlich, das Zuchtmaterial auf die quantitative Ausprägung der Weichschaligkeit hin zu überprüfen. So kann die Bereitstellung von Sorten mit einer uneingeschränkten Weichschaligkeit am besten gewährleistet werden.

Zusammenfassung

Zwischen den drei wichtigsten landwirtschaftlichen Lupinenarten Mittel- und Osteuropas bestehen wesentliche Unterschiede im Stand der züchterischen Bearbeitung. Leistungsfähige Süllupinensorten von *Lup. luteus* haben das gleiche Ertragniveau wie entsprechende Bitterlupinensorten. Bei *Lup. angustifolius* und *Lup. albus* sind für eine eindeutige Aussage weitere Untersuchungen erforderlich. Bei allen geprüften Süllupinensorten wurde beim Anbau unter extremen Standortbedingungen ein relativer Ertragsrückgang gefunden. Die Strebtoleranz sollte durch gezielte züchterische Maßnahmen verbessert werden.

Weitere züchterische Maßnahmen sind zur quantitativen Verbesserung der Fusariumresistenz erforderlich. Das gilt auch für andere Leistungseigenschaften der einzelnen Süllupinenarten.

Literatur:

1. Barbacki, S. et al. (1962): A comparative study of bitter and nonbitter varieties of lupin. Genet. pol. 3, 61-86
2. Baumann, H. u. J. Thomas (1948): Futterbau und Gründüngung aus eigener Saat., Berlin
3. Böhl, K. (1959): Zur Körnerproduktion und Sortenfrage bei gelben Lupinen. Dtsch. Landw. 10, 73-76
4. Brummund, M. (1984): Stand der Realisierung ausgewählter Zuchtziele und weitere Aufgaben bei der Züchtung der alkaloidarmen gelben Lupine (*Lup. luteus*). Tag.Ber. Akad. Landw. Wiss. DDR, 225, 53-71
5. Enderlein, H. (1969): Typ und Vererbung des Wurzelwachstums bei verschiedenen Formen gelbblühender Lupinen. Diss. Univ. Leipzig
6. Gäde, H. (1960): Die Schaffung alkaloidarmer Formen bei *Lupinus luteus* in ihrem Einfluß auf den Lupinenanbau in Deutschland. Diss. Rostock
7. Hackbarth, J. u. H.J.. Troll (1959): Lupinen als Körnerleguminosen und Futterpflanzen. In Roemer u.a.: Handb. Pflanzenz. Bd. 4, 1-51, 2. Aufl.
8. Könekamp, A. (1935/36): Untersuchungen über die Bewurzelung von Hülsenfrüchten. Pflanzenbau 12, 1-11
9. Kress, H. (1952): Von der gelben Bitterlupine zur gelben Süßlupine unter besonderer Berücksichtigung ihrer Unterschiede im praktischen Anbau. Dtsch. Landw. 3, 142-146
10. Kress, H. (1964): Über den Stand und die Perspektiven der Lupinenzüchtung in der DDR. Wiss. Ztschr. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturw. Reihe 13, 683-690
11. Mangold, E. (1949): Die ernährungsphysiologischen Leistungen der Süßlupinen. Sitzungsber. Dtsch. Akad. der Wissensch., Mathem.-Naturw. Klasse Nr. 3, 1-46
12. Renius, W. (1949): Samenbau für Zwischenfrucht und Gründüngung. Flugschriften der DLG Bd. 8, Hannover
13. Schaefer, E. (1947): Die Gründüngung mit Berücksichtigung des Futterbaues. Lüneburg
14. Schoeneberger, H. (1981): Ernährungsphysiologische Untersuchungen zur Beurteilung von Lupinen (*Lupinus mutabilis*) als proteinreiches Nahrungsmittel. Diss. Gießen
15. Sengbusch, R.v. (1930): Über Lupinenzüchtung am K.W.I. für Züchtungsforschung Müncheberg/Mark. Ztschr.f.Züchtung, Reihe A, Bd.15
16. Stubbe, H. (1957): Sinn und Bedeutung der Kulturpflanzenforschung. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Vorträge u. Schriften, H. 62
17. Tiemann, A. (1952): Gründüngung In Roemer u.a.: Handb. d.Landw. Bd. 1, 463-489
18. Troll, H.J. (1948/49): Entwicklung und Probleme der Müncheberger Lupinenzüchtung. Züchter 19, 153-177

19. Troll, H.J. (1956): Erbgänge der Samenfarbe bei weißkörnigen gelben Süßlupinen (*Lupinus luteus*) und ihre Bedeutung für die Erhaltungszucht im Zusammenhang mit Weichschaligkeit und Leistungsfähigkeit. Ztschr.f.Pflanzenz. 26, 41-53
20. Troll, H.J. (1965): Leistungsvergleiche bitterer und alkaloidarmer *Lupinus luteus*. Züchter 35, 233-238
21. Troll, H.J. u. H. Schander (1938): Pleiotrope Wirkung eines Gens bei *Lupinus luteus* ("Neuzucht Weiko"). Züchter 10, 266-271
22. Wuttke, H. (1943): Gegen *Fusarium oxysporum* resistente Stämme der gelben Lupine. Züchter 15, 31-33
23. Zentralstelle f. Sortenw. DDR (1958-1966): Berichte über Haupt- und Kontrollprüfungen mit *Lupinus luteus*. Nossen

**DIE REAKTION EINES AUSGEWÄHLTEN GELBLUPINENSORTIMENTS (*LUPINUS LUTEUS*
L.) AUF UNTERSCHIEDLICH LANGE KÄLTEBEHANDLUNG IM KEIMSTADIUM**

T. Paradies

Saatzucht Bornhof

0-2061 Bornhof

ABSTRACT

The influence of low temperatures on seedlings of *Lupinus luteus*

24 lines of *Lupinus luteus* were studied in relation to vernalization. Young seedlings were exposed to low temperatures for varying lengths of time. The difference in response of the 24 lines are described. Lines with a tolerance towards low temperatures were selected since they are the ones which allow an early harvest.

RESUMEN

La influencia de las bajas temperaturas en plántulas de *Lupinus luteus* L.

Se investigaron los requerimientos de vernalización de 24 líneas de *L. luteus*. Las plántulas fueron expuestas a diferentes tratamientos de bajas temperaturas. Se describen las respuestas de las 24 líneas. Se seleccionaron aquellas que mostraron tolerancia a bajas temperaturas ya que son las que permiten una cosecha temprana.

1. Einleitung

Der Lupinenanbau in Deutschland ist gegenwärtig 150 Jahre alt. Er begann, nachdem 1841 erstmals gelbe Lupinen in der Altmark als Gründungspflanze angebaut worden waren. Zwischenzeitlich hat sich die Lupine in relativ kurzer Zeit zur Grünfütter- und Körnernutzungs- pflanze hin entwickelt. Durch die intensive züchterische Bearbeitung konnten eine Reihe von Wildeigenschaften, die einem Grobanbau hinderlich gegenüberstanden, überwunden werden. (Tabelle 1)

Auf den leichten Böden ist die gelbe Lupine als einzige Körnerleguminose anbauwürdig. Sie hat unter diesen Bedingungen eine hohe spezifische Ertragsfähigkeit und zeigt sich als die einheimische Körnerfrucht mit dem absolut höchsten Eiweißgehalt.

In den letzten Jahren konzentrierten sich bei ihr die züchterischen Arbeiten auf Krankheitsresistenz, eine hohe Anspruchslosigkeit und die Frühreife des Materials sowie die Kombination der drei Merkmale. Dazu mußte umfangreiches Sortimentsmaterial geprüft und untersucht werden. Für das Merkmal "Frühreife" wurden Saatzeiten- und Stoppelsaatversuche angelegt. Daneben wurde die Wirksamkeit einer unterschiedlich langen Kältebehandlung im Keimstadium (auch Samenvernalisation genannt) untersucht. Ziel war es, mit dieser Methode Sortimentsunterschiede im Hinblick auf ihr Vernalisationsbedürfnis hin nachzuweisen.

Sortiments-Formen mit geringem Vernalisationsbedarf wurden schon in der Vergangenheit als thermoneutral beschrieben, PLARRE und VETTEL, (1958), HACKBARTH (1956), HÄNSEL (1963) RAHMANN/GLADSTONES (1972). Sie haben den großen Vorteil, das Rosettenstadium, das besonders für Wild- und normalwüchsigen Lupinenformen typisch ist, auch ohne niedrige Temperaturen im Keimstadium schnell zu durchlaufen. Dadurch verkürzt sich ihre Zeit bis zur reproduktiven Phase, und sie blühen und reifen früher.

HOFFMANN, MUDRA, PLARRE (1977) verstehen unter Vernalisation "...Die Behandlung von Keimlingen oder Jungpflanzen mit niedrigen Temperaturen (etwa + 2° C) für eine gewisse Zeit, die je nach Genotyp verschieden ist, um vor allem bei winteranuellen und zweijährigen Pflanzen die vegetative Entwicklungsphase abzukürzen und die generative Entwicklung einzuleiten, die ohne Vernalisation nicht möglich ist. Bei Freilandpflanzen wird das Vernalisationsbedürfnis beim normalen Anbau durch natürliche Vernalisationstemperaturen erfüllt..."

Tabelle 1

Einige Wild- und Kulturpflanzeigenschaften der gelben Lupine im Hinblick auf die Parallelvariabilität und den züchterischen Realisierungsstand (Brummund, M; 1984)

Situation bei *Lupinus luteus* L.: 1990

Wildeigenschaften	Zuchtziel	Sorten vorhanden	Ausgangsmaterial vorhanden	Wo durch Evolution realisiert?
stark alkaloidhaltig	Alkaloidarmut	ja	ja	<i>Pis. sativum</i>
platzende Hülsen	Platzfestigkeit	ja	ja	<i>Lup. albus</i>
dunkle Samenfarbe	helle Samenfarbe	ja	ja	<i>Lup. albus</i>
Hartschaligkeit	weiche Samenschale	ja	ja	<i>Lup. albus</i>
Abbrechende Hülsen	Abbruchfestigkeit	nein	nein	<i>Lup. albus</i>
Anspruchslosigkeit	Anspruchslosigkeit (TT)	ja	ja	<i>Lup. luteus</i>
Mittlerer Samen-ertrag	hoher Samenertrag	ja	ja	<i>Lup. luteus</i>
Mittlerer Grünmasseertrag	hoher Grünmasseertrag	ja	ja	<i>Lup. luteus</i>
Fusarium-Anfälligkeit	Fusarium-Resistenz	ja	ja	*)
Mehltauanfälligkeit	Mehltauresistenz	nein	ja	<i>Lup. luteus</i>
Virusanfälligkeit	Virusresistenz	nein	ja	*)
Spätreife	Frühreife	(nein)ja	ja	<i>Pis. sativum</i>
Hoher Eiweißgehalt	höherer Eiweißgehalt	nein	ja	<i>Lup. luteus</i>
Frühsaatempfindlichkeit	Frühsaatverträglichkeit	nein	nein	<i>V. faba</i>
Indeterminierter Wuchs	determinierter Wuchs	(nein)ja	ja	<i>Lup. angust.</i>

*) nicht bekannt

2.1. Methode der technischen Kältebehandlung (Samenvernalisation)

Die Empfänglichkeit einer Pflanze für Entwicklungsfaktoren, so HARTRICH (1939), ist schon in deren jüngsten Wachstumsstadien, d.h. also bereits während der Keimung vorhanden. Darauf begründet sich auch das technische Verfahren, anders gesagt, die Saatgutbehandlung mit niedrigen Temperaturen.

Während bei der frühen Felddausaat die Pflanzen unter natürlichen Umweltbedingungen den niedrigen Temperaturen ausgesetzt sind, geschieht dies bei der technischen Kältebehandlung des Saatgutes auf künstliche Art und Weise.

1. Schritt: die Samen werden bei Zimmertemperaturen über eine Dauer von ca. 36 Stunden vorgequollen, so daß die Keimwurzeln die Samenschale durchbrochen haben und eine Länge bis 5 mm haben, (die Hartschaligkeit der Wildformen wird durch Anritzen der Samenschale vor dem Einquellen überwunden)

Als Voraussetzung für eine erfolgsversprechende Kältebehandlung müssen nach HARTRICH (1939) die Quellung des Samenkorns abgeschlossen sein und der Keimling mit dem Wachstum beginnen.

2. Schritt: die in Petrischalen angekeimten Samen werden entsprechend der Behandlungsdauer bei + 3°C bis + 5°C aufgestellt (Luftzirkulation im Behandlungsraum verhindert weitgehend eine Verpilzung der Saat)
3. Schritt: nach Abschluß der Temperaturbehandlung werden die angekeimten Samen vorsichtig ausgepflanzt (dazu sollte nur die Wurzel vom Boden bedeckt werden)
4. Schritt: die Lupinenpflanzgefäße werden dem Wachstum günstigen Licht-, Temperatur- und Feuchtebedingungen ausgesetzt (zu empfehlen sind steuerbare Umweltbedingungen wie z.B. in einem Phytotron)

2.2. Versuchsmaterial

Bei dem untersuchten Material handelt es sich um 24 Formen des Bornhofer Sortimentes von *Lupinus luteus* L., der gelben Lupine.

Die Auswahl der Formen erfolgte nach unterschiedlichen Gesichtspunkten. Zum einen wurden "normalwüchsige" Formen ausgewählt, zu dieser Gruppe sind auch die meisten gegenwärtig im Anbau befindlichen Gelblupinensorten zu zählen.

Das Material dieser Standard- oder Vergleichsgruppe ist charakterisiert durch das typische Rosettenstadium während der Jugendentwicklung. Die gelbe Lupine verharrt etwa bis fünf Wochen in diesem Stadium. Das Merkmal tritt in der Gruppe der Wildformen noch stärker in Erscheinung, so daß unter unseren Klimabedingungen einige Formen kaum über dieses Wuchsstadium hinauskommen. Hier besteht eine enge Beziehung zwischen Entwicklungsrhythmus und Umwelt.

Im Zeitraum der züchterischen Bearbeitung wurden viele unterschiedliche Wuchs- und Entwicklungstypen selektiert. Aus ihnen wurden die Gruppe der determinierten Lupinenformen (auch "Achselblüher" genannt) und die des "frühreifen" Materials zusammengestellt. Die letzte Gruppe verdient besonderes Augenmerk, da für den mitteleuropäischen Lupinenanbau frühreifende Sorten über den Ertrag und dessen Qualität in zunehmendem Maße entscheiden.

Insgesamt sollte mit diesem Material ein Querschnitt der gegenwärtig vorhandenen Formenvielfalt untersucht werden.

Ein ausgewähltes Gelblupinensortiment

Prüfglied-Nr.	Sorte/Stamm	Gruppe
1	Borluta	} normalwüchsiges Material
2	Bornova	
3	Refusa nova	
4	Gülzower Süße Gelbe	} determinierter Wuchstyp
5	Schwako	
6	(St. 20307) Borselfa	
7	St. 50515	
8	St. 50803	} frühes Material
9	St. 408	
10	Baltyk	
11	Baltyk 2	
12	Narodschanski	
13	Shitomirski Jubljena	} Wildformen
14	Kastritschnik	
15	Akademitscheski 1	
16	WTD 685	} Wildformen
17	St. 17464	
18	(St. 17459) Borsaja	
19	Abrantes 1/2	
20	B 489	} Wildformen
21	Cardiga	
22	Biscounhos	
23	Monte dos Alhos	
24	Sizilien 2	

3. Versuchsergebnisse

Nachdem die Lupinen mit Kälte behandelt worden waren, wurden sie zur Weiterkultur ins Freiland bzw. Gewächshaus unter kontrollierbare Bedingungen gestellt.

Als wichtige Merkmale wurde die "Anzahl Tage von der Aussaat bis zur Blüte", die "Pflanzenhöhe zur Blüte" und die "Anzahl Laubblätter zur Blüte" erfaßt (Tabelle 2-4, Graphik 1).

Die Modifizierbarkeit des Phentyps sowie einzelner Ertragskomponenten wird durch Samenvernalisation deutlich (Gladstones J.S. et al. 1969). Besonders in der Gruppe der Wildformen ist die Entwicklungsbeschleunigung durch Kältebehandlung unverkennbar. Es besteht also ein hohes Vernalisationsbedürfnis in dieser Gruppe. Dies hängt eng mit dem an das mediterrane Heimatgebiet gebundenen Entwicklungsrhythmus der Pflanzen zusammen, siehe Fischer und Sengbusch (1935).

Die Versuchsergebnisse machen deutlich, daß durch die zunehmende Kältebehandlung auch bei den "Normalwüchsigen Formen" eine Vegetationsverkürzung eintritt (Tabelle 2), diese findet bei 30 Tagen jedoch ihre größte Steigerung. Für die in dieser Gruppe zugelassenen Sorten bedeutet das, eine möglichst frühe Aussaat vorzunehmen. Dadurch können die natürlichen Vernalisationstemperaturen ausgenutzt werden, um in der Lupine den nötigen Bedarf abzudecken. Dies ist erforderlich, um die Pflanzen in die reproduktive Phase zu überführen. Eine verspätete Aussaat Mitte bis Ende April würde zu erhöhtem vegetativem Wachstum und damit zum Hinauszögern der Samenreife führen. Dies wäre für die Körnerernte ungünstig. Ähnlich verhalten sich auch die determinanten Wuchstypen. Ihr im Mittel der Jahre früherer Reifetermin gegenüber den normalwüchsigen Sorten liegt in der Ausbildung nur eines Haupttriebes begründet. Anstelle der Seitentriebe bilden sie nur Achselknospen aus.

Tabelle 2

Reaktion eines ausgewählten Gelblupinensortiments auf unterschiedlich lange Kältebehandlung im Keimstadium (KB) unter Langtagbedingungen im Freiland (1989)

Lfd. Nr.	Sorte/Stamm	Anz. Tage von d. Aussaat bis zur Blüte, Kontrolle ohne Kältebehandl. im Keimstadium	Differenz der Entwicklungstage im Vergleich zur Kontrolle		
			10d KB	20d KB	30d KB
			1	Borluta	73
2	Bornova	72	7	22	28
3	Ref.nova	77	10	26	32
4	GSG	81	10	16	30
5	Schwako	83	3	30	37
6	St. 20307	75	3	15	24
7	St. 50515	83	10	22	32
8	St. 50803	80	8	26	33
9	St. 408	71	11	17	27
10	Baltyk	65	12	22	25
11	Baltyk 2	65	12	24	26
12	Narodsh.	59	9	19	22
13	Shit. J.	59	5	12	20
14	Kastr.	50	0	4	8
15	Akadem. I	50	4	4	8
16	WTD 6/85	50	2	4	4
17	St. 17464	50	2	5	5
18	St. 17459	50	3	5	5
19	Abrantes 1/2	108	8	29	-
20	B 489	118	17	34	-
21	Cardiga	108	7	43	54
22	Biscomhos 2	111	-	-	-
23	Monte d. Alhos 9	83	5	40	59
24	Sizilien 2	94	12	16	31
			23	27	43

Das frühe Material unterscheidet sich von den anderen Gruppen durch seine schnellere Jugendentwicklung. Die unbehandelte Variante blüht dadurch im Vergleich zu dem normalwüchsigen- und determinanten Sortimentmaterial früher (Tab. 2, Graphik 1).

Während die Varianten 9-13 auf Kältebehandlung im Merkmal "Tage bis zur Blüte" z.T. recht deutlich reagieren, kann dies bei den Varianten 14 bis 18 nur in geringem Umfang festgestellt werden. Das trifft sowohl für die 10tätige als auch die 40tätige Behandlungsvariante zu (Graphik 1). Diese Formen können in diesem Sinne als thermoneutral eingeschätzt werden. Eine Spätsommer-Aussaat (Stoppelsaat: Tab. 4) unterstreicht dies noch einmal; Hp St. 1.17459 (Sorte Borsaja) und Vp St. 1.17464, als thermoneutrale Formen eingestuft, kommen gegenüber der Standardorte "Bornova" schnell zur Blüte und produzieren dabei gleichzeitig viel Grünmasse.

Einige praktische Einsatzmöglichkeiten der unterschiedlichen Wuchstypen sind in Tabelle 5 zusammengestellt und unterstreichen noch einmal den Wert der thermoneutralen Formen für den Landwirt.

Tabelle 3

Wachstum- und Entwicklungsverlauf von Gelblupinenformen, die sich im Wuchstyp und Entwicklungsrhythmus deutlich voneinander unterscheiden (nach unterschiedlich langer Kältebehandlung im Keimstadium) GWH, 1989

Merkmal	Behandlung	Sorte/Stamm					
		normaler Wuchstyp		frühe Typen		determinierter Wuchs	
		Borluta	Bornova	St. 17464	St. 17459	St. 50515	St. 50803
- Blühbeginn (prozentual)	K	100	100	100	100	100	100
	10dKB	96	100	98	102	99	98
	20dKB	85	83	95	98	86	84
- Anz. Tage v. d. Aussaat bis Blüte	30dKB	80	80	95	98	74	78
	K	100	100	100	100	100	100
	10dKB	107	103	103	89	112	116
- Pfl.höhe cm (prozent.)	20dKB	80	76	107	97	81	78
	30dKB	82	72	101	91	84	83
	K	2,5	2,5	2,0	2,0	1,8	1,7
- Hülsen/Pfl. (Anzahl)	10dKB	1,9	2,7	1,8	1,9	2,0	1,8
	20dKB	1,8	1,5	1,9	1,6	1,6	2,3
	30dKB	1,7	1,2	1,9	2,1	1,3	2,1
- Körner/Hülse (Anzahl)	K	2,4	2,7	2,1	2,8	1,9	1,6
	10dKB	3,1	2,7	2,4	2,4	2,1	1,6
	20dKB	2,1	2,3	2,4	2,2	2,5	2,5
- TKH (g)	30dKB	2,5	2,8	2,6	2,7	2,0	1,9
	K	95	85	80	95	80	75
	10dKB	90	90	90	90	75	85
- Gewicht/Pfl. (g)	20dKB	75	90	100	110	85	75
	30dKB	100	100	90	100	100	100
	K	0,57	0,59	0,34	0,53	0,27	0,21
- (g)	10dKB	0,52	0,65	0,39	0,41	0,32	0,26
	20dKB	0,28	0,32	0,45	0,37	0,35	0,44
	30dKB	0,43	0,35	0,45	0,56	0,25	0,40

K - Kontrolle (unbehandelt) KB - Kältebehandlung im Keimstadium
d - Tage

GWH-Gewächshaus

Graphik: 1

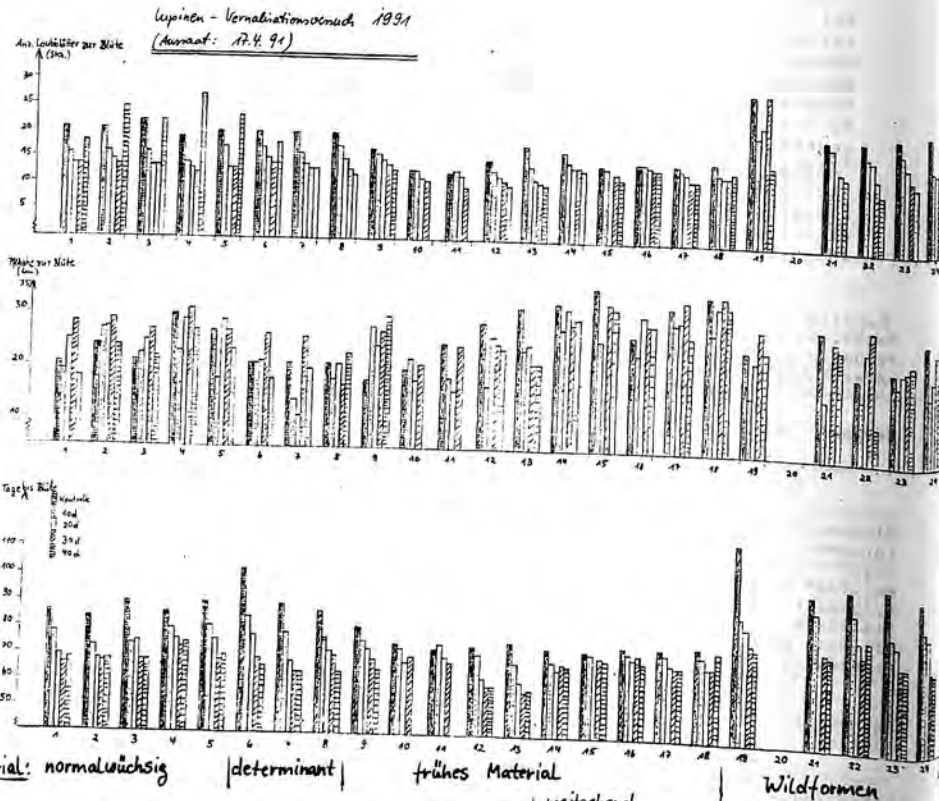


Tabelle 4
Stoppelfruchtprüfung Grünmasse d. Lupinensortiments 1989 (Bölke, 1989)

Sorte/Stamm	GM dt/ha	rel.z. Bornova	TM dt/ha	Blühbeg. Datum	(Aussaat 30.7.89)		
					Tage von Aufgang bis Blühbeginn	Sommerausfrühjahrsauss.	
Kastritschnik	188,9	93	20,7	24.9.	57	59	
HpSt.1.74264	196,6	96	22,2	-	> 81	-	
G 72-66	3. 239,7	118	28,8	23.9.	56	-	
HpSt.1.20307	223,1	110	24,1	-	> 81	68	
Bornova	203,2	100	21,7	-	-	66	
HpSt.1.17459	2. 242,1	119	30,5	16.9.	49	57	
VpSt.1.408	226,9	112	23,6	18.10.	81	66	
VpSt.1.17464	1. 271,6	137	35,3	19.9.	52	60	
VpSt.1.30	216,6	107	27,1	18.9.	51	59	
ZAP St.1.13	231,6	114	29,6	19.9.	52	59	
Cyt	196,7	97	21,0	-	81	72	
	1.09	181,5	89	15,1	19.9.	52	58
	1.17544	166,7	82	24,3	17.9.	50	59
	1.107	115,0	57	15,6	21.9.	54	62
	1.109	168,4	83	18,2	24.9.	57	62
		204,6					

Tabelle 5

Zwei bislang wesentliche Nutzungsrichtungen der Gelben Lupine
(Verschiedene Wuchstypen und ihre Gebrauchseigenschaften)

I. Grünfütternutzung

- A Normalwüchsiger Typ
- thermolabil
- hoher Zeitleistungsfaktor des Massenzuwachses
in Hauptfrucht (HF): Aussaat (A), ab Mitte April in Zweit-Zwischenfrucht (ZF): A, Mitte Mai - Ende Juli

- B Frühreifer Typ
- weitgehend thermoneutral
HF: keine Aussaatzeitbeschränkungen
ZF: A. Anfang April - Mitte August schnellwüchsig, hohe Grünmasseerträge

- C Selbststreifender Typ
HF: hoher Massenzuwachs ab A., Ende April
ZF: hoher Massenzuwachs ab A., Mai - Juli
- verhält sich ähnlich den normalwüchsigen Sorten

II. Körnernutzung

- Sorte "Bornova"
- hohes Vernalisationsbedürfnis
HF: frühe Aussaat 15. März - 15. April (natürl. Vernalisationstemperaturen)
- Defoliation erforderlich

- Sorte "Borsaja"
- deutlich vermindertes Vernalisationsbedürfnis
- spätsaatverträglich (A., Anfang April)
- frühe Samenreife = frühe Ernte - dadurch höhere Ertragssicherheit (geringe Verluste)
- Defoliation nur bei ungünstiger Witterung

- Sorte "Borselfa"
- sicherer Samenertrag bei A. bis 10. April (spätsaatverträglich)
- eingeschränkte Seitentrieb- und Blattbildung
- Hülsenstände oberhalb der Blätter - Ursache für das zeitige Abreifen
- keine Defoliation

4. Zusammenfassung

- Ein ausgewähltes Gelblupinensortiment (*Lupinus luteus* L.) wurde auf sein Vernalisationsbedürfnis hin untersucht.
- Das erfolgte anhand der Methode der Samenvernalisation. Die Lupinen wurden unterschiedlich lange einer Kältebehandlung im Keimstadium ausgesetzt.
- Zwischen den Lupinenformen gab es z.T. deutliche Unterschiede in den einzelnen Merkmalen. Die vorabgewählte Einleitung des Versuchsmaterials hat sich bestätigt.
- Auf der Suche nach thermoneutralen Formen konnten diese innerhalb der "frühen Gruppe" bestätigt und noch weiter eingengt werden.
- Für das Zuchtziel "Frühreife" spielen thermoneutrale Formen eine wichtige Rolle, wie durch Praxis-Ergebnisse bereits bestätigt werden konnte.

Literatur

1. FISCHER A. und R.v. SENGBUSCH (1935) Die Anbauggebiete der Lupine auf der Erde, besonders in Europa Züchter 7, 284-293, 321-324
2. GLADSTONES, J.S. HILL, G.D. (1969) Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus* 2. Time of flowering. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry. Vol. 9, S. 213-220
3. HACKBARTH, J. (1955) Die ökologischen Ansprüche der Lupinenarten. I. Anbau zur Körnergewinnung. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, Bd. 35, H. 2, S. 149-178
4. HARTISCH, J. (1939) Über die Wirkung der Keimstimmung auf landwirtschaftliche Nutzpflanzen. Pflanzenbau 15, S. 265-288
5. HACKBARTH, J. (1956) Der Entwicklungsrhythmus bei *Lupinus albus* und seine Bedeutung für Anbau und Züchtung. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, Bd. 36, H. 4, S. 434-444

6. HÄNSEL, H. (1963)

Physiologische und genetische Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der Anzahl steriler Nodi und der Zeitspanne bis zum Blühbeginn der Erbse (*Pisum sativum*)
Der Züchter, S. 15-24

7. PLARRE, W. und VETTEL, F. (1958)

Vergleichende Untersuchungen an mehrjährig durchgeführten Saatzeiten- und Vernalisationsversuchen mit *Lupinus albus*. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, Bd. 40, H. 2, S. 125-150

8. RAHMAN, M.S. GLADSTONES, J.S. (1972)

Control of lupin flower initiation by vernalization photoperiod and temperature under controlled environment.
Austr. J. of Exp. Agric. and A.H. Vol. 12, S. 638-645

ERGEBNISSE UND ÜBERLEGUNGEN ZUM ERTRAGSPOTENTIAL VON *LUPINUS MUTABILIS*

Elmar Weißmann

Saatzucht Dr.h.c.Hans Hege

Domäne Hohebuch

D-7112 Waldenburg/Württ.

ABSTRACT

Seed yields of 32 different *Lupinus mutabilis* lines

32 lines of *Lupinus mutabilis* were grown at three sites in Germany and analyzed for seed yields and growth. Seed yields of 1 t/ha are possible under German pedoclimatic conditions at present and thus much lower than those of *L. albus*. It is proposed to further select the existing material of *L. mutabilis* to improve the relation between seed and green matter production.

RESUMEN

Los rendimientos en grano de 32 líneas de *Lupinus mutabilis*

Se analizó el desarrollo de la planta y el rendimiento en grano de 32 líneas de *Lupinus mutabilis* cultivadas en tres lugares de Alemania. Bajo las condiciones de clima y suelo de los lugares de ensayo se obtuvieron rendimientos de 1 t/ha, que resultaron ser mucho más bajos que los que se obtienen normalmente con *L. albus*. Se propone por lo tanto un mayor trabajo en la selección de los materiales existentes de *L. mutabilis* para mejorar la relación entre producción de semilla y materia seca.

EINLEITUNG

Gegenüber *Lupinus albus* besitzt *Lupinus mutabilis* in der Regel, einen höheren Gehalt an Öl im Korn. Aus dem Gesichtspunkt der rentableren Ölausbeute erscheint daher der Anbau von *Lupinus mutabilis* in unseren Breiten interessant. Jedoch wird der Ölertag/ha außer durch den Gehalt an Öl wesentlich durch den Kornertag bestimmt.

Im folgenden werden Ergebnisse aus Ertrags-Prüfungen von *Lupinus mutabilis* untersucht und Rückschlüsse über das Ertragspotential dieser aus den Anden bei uns eingeführten Art angestellt.

MATERIAL:

Für Ertragsermittlungen wurden 32 weitgehend homogene Linien verwendet, die aus Genbank-Material hervorgingen und sich im 4. bzw. 6. Selektionszyklus befinden. Die Prüfung erfolgte 1990 in jeweils zwei Wiederholungen in 12 m² Parzellen in Hohebuch, 1991 in jeweils drei Wiederholungen in 6 m² Parzellen als Gitteranlage an drei Orten. Die Orte Hohebuch und Hildesheim zeichnen sich durch relativ schwere Böden (sT) aus, während in Bohlingen (Krs.Konstanz) sandiger Lehm vorherrschend ist. Aufgrund einer sehr kühlen Periode im April/Mai 1991 verlief in Hohebuch die Jugendentwicklung sehr langsam. Im Sommerregenarmen Jahr 1991 fielen in Bohlingen und auch in Hildesheim zur Zeit der Kornausbildung mehr Niederschläge als in Hohebuch. Weitere 273 weniger homogene Linien wurden mit einer Wiederholung in Hohebuch geprüft (Standardprüfung).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kornerträge von *Lupinus mutabilis* 1990 und 1991

Vergleicht man die Ergebnisse der Hauptprüfungen 1990 und 1991, so ergibt sich für 1991 über die drei Versuchsorte gemittelt generell ein geringeres Ertragsniveau als 1990 (Abb.1). Auch die Variationsbreite ist 1991 gegenüber 1990 eingeschränkt. Auf den ersten Blick kann man diese Entwicklung auf den ungünstigen Witterungsverlauf 1991 mit sehr kaltem Frühjahr und starker Sommertrockenheit zurückführen.

Den ungünstigen Witterungseinfluß verdeutlicht auch Abb.2, wo die Ergebnisse der Hauptprüfung 1991 an den einzelnen Orten aufgezeigt sind. Am Ort Hohebuch herrschten klimatisch die ungünstigsten Verhältnisse. In Hohebuch wurden 1991 vielfach keine Nebentriebe dritter Ordnung gebildet.

Generell ist zu ersehen, daß auch 1991 ein mittleres Ertragsniveau von 11 dt/ha nicht überschritten wurde und die Variationsbreite zum höheren Ertrag hin sich gegenüber 1990 nicht verbessert hat.

Abb.3. zeigt die Variationsbreite des Kornertags von 273 Prüflingen aus der Standardprüfung. Nur wenige Linien zeigen einen Ertrag von über 13 dt/ha. Die Linien mit einem Kornertag unter 5 dt/ha waren zumeist durch schlechtem Feldaufgang bzw. Frostschäden gekennzeichnet.

Ertragsleistung - grundsätzliches

Aufgrund dieser nicht sehr ermutigenden Ertragsergebnisse ist zu fragen, ob im Falle von *Lupinus mutabilis* die Ertragsleistung gerecht bewertet wird. Nach G.Geißler (1990) kann man Ertrag wie folgt definieren:

"Die Ertragsleistung der pflanzlichen Produktion wird nach der gewichtsmäßig zu bestimmenden Menge beurteilt; hierbei repräsentiert die von der Pflanze produzierte Trockenmasse, also die chemisch gebundene Energie, der Ertrag. Neben der Menge ist auch die Zusammensetzung der Ernteprodukte für die Beurteilung der Ertragsleistung zu berücksichtigen."

Folgenden Parameter stellen also Ertragsleistung dar:

- Kornmasse, Strohmasse
- Gehalt an Inhaltsstoffen
- Energie für Synthese der Inhaltsstoffe

Aus dieser Überlegung heraus ist als erste Konsequenz ist neben der Kornmasse die Strohmasse zu berücksichtigen. Daten aus Ermittlungen an Einzelpflanzen 1988 bzw. 1989 zeigen, daß bei *Lupinus mutabilis* Korn:Stroh-Verhältnisse von 1:5 bis 1:9 zu finden sind (Abb.4). Vergleicht man dies mit der im Kornertag ergiebigeren *Lupinus albus*, so ist festzustellen, daß *Lupinus albus* günstigere Korn:Stroh-Verhältnisse von 1:1 bis 1:7 aufweist. Dies alles spiegelt die Beobachtung wieder, daß *Lupinus mutabilis* in unseren Breiten normalerweise eine enorme vegetative Masse entwickeln. Man könnte also auch sagen: ein Teil der assimilierten Energie wird an die Produktion von Grünmasse "verschwendet", die *Lupinus mutabilis* besser zur Kornmasseproduktion verwenden sollte. Daraus ergibt sich die

Häufigkeitsverteilung
Kornertrag, LM 90 HP, N=32



Kornertrag, LM 91 HP über 3 Orte, N=32

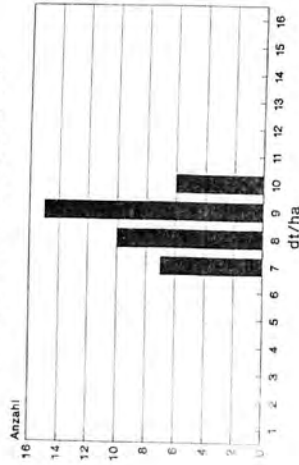
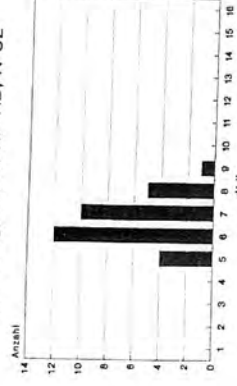
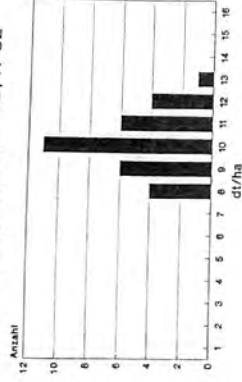


Abb. 1

Häufigkeitsverteilung
Kornertrag, LM 91 HP HB, N=32



Kornertrag, LM 91 HP BO, N=32



Kornertrag, LM 91 HP HI, N=32

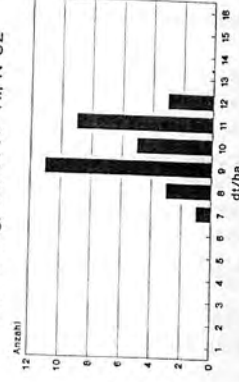


Abb. 2

Abkürzungen:

- LA Lupinus albus
- LM Lupinus mutabilis
- HP Hauptprüfung
- SP Standardprüfung
- HB Hohebuch
- BO Bohltingen
- HI Hildesheim

Häufigkeitsverteilung
Kornertrag, LM 91 SP, N=273

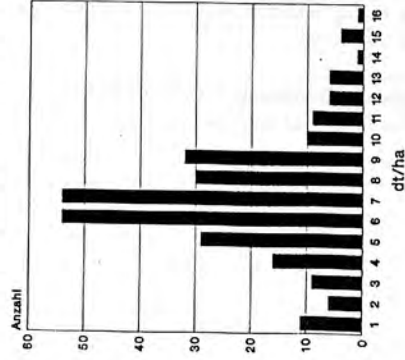
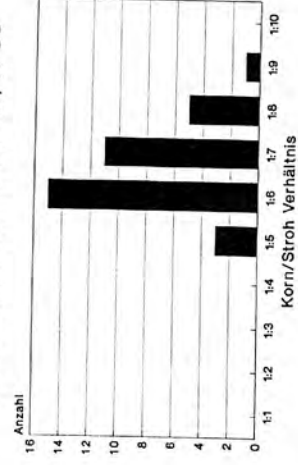


Abb. 3

Häufigkeitsverteilung
Korn : Stroh, LM 89 EX HB, N=35



Korn : Stroh, LA 88 EP HB, N=637

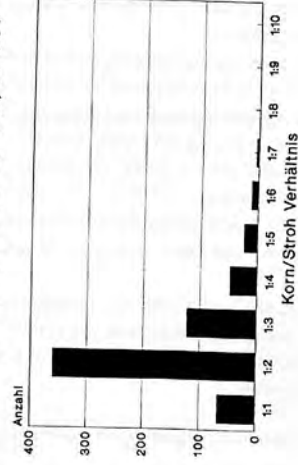


Abb. 4

Frage, wieviel Energie ansich *Lupinus mutabilis* produziert.

Energieproduktion von *Lupinus mutabilis*

Um die Energieproduktion von *Lupinus mutabilis* besser einordnen zu können, wird diese mit der von *Lupinus albus* und Sommerweizen verglichen.

Zur Berechnung der Energieproduktion werden folgende Annahmen getroffen:

1. Energie wird in ATP-Einheiten ermittelt.
2. Die Energie für den Grundumsatz ist außen vor gelassen, d.h. wir nehmen an, daß der Grundumsatz bei allen Arten gleich ist.
3. Tab.1 zeigt die zugrundegelegten Energieaufwendungen zur Synthese von Aminosäuren, Glucose und Ölsäure sowie zur Umwandlung von Luftstickstoff in Nitrat-N und zur NH₃-Aufnahme.
4. Vorausgesetzt werden die in Tab.2 gezeigten Gehalte an Inhaltsstoffen, sowie die in Tab.3 und Tab.4 angenommenen Erträge von *Lupinus mutabilis*, *Lupinus albus* und Sommerweizen (Dabei ist festzustellen, daß *Lupinus albus* eine enorme Öl- und Proteinertragsleistung aufweist, obwohl die Gehalte geringer sind als bei *Lupinus mutabilis*).
5. Aus den Trockensubstanzerträgen errechnen sich die in Tab.5 gezeigten nutzbaren Erträge in Mol/ha.
6. Aus Tab.1 und Tab.5. ergeben sich die nutzbaren Erträge ausgedrückt in ATP-Einheiten (Tab.6).

Tab.7. zeigt, daß *Lupinus albus* den höchsten Energieertrag von 127,5*10²⁸ Mol ATP aufweist. Sommerweizen hat eine etwas geringeren Energieertrag von 124*10²⁸ Mol ATP, während sich bei *Lupinus mutabilis* ein Energieertrag von nur 102*10²⁸ Mol ATP errechnet. Gründe für die insgesamt geringere Energieleistung von *Lupinus mutabilis* sind zu suchen in:

- der schlechten Adaptation von *Lupinus mutabilis* an unser Klima

oder:

- einer generell geringeren Leistungsfähigkeit von *Lupinus mutabilis*

Interessant ist, daß relativ zur Gesamtmenge die Energie zur N-Assimilation einen sehr geringen Anteil ausmacht. (Bei Sommerweizen wird N durch Düngung zugeführt, sodaß hier die N-Assimilationsleistung anders zu bewerten ist). Für die Strohbildung wird bei allen Arten mehr als 50% der Energie aufgewendet. *Lupinus mutabilis* verwendet sogar 80% der assimilierten Energie auf die Bildung vegetativer Masse. Dies wiederum ist ein Hinweis auf die schlechte Adaptation von *Lupinus mutabilis* an unser Klima.

Tab.1 bis Tab.6: Datenbasis und Umrechnungen zur Berechnung der Energieertragsleistung in ATP-Einheiten für die Kulturarten *Lupinus mutabilis* (LM), *Lupinus albus* (LA) und Sommerweizen (WS).

Tab.1: Vorausgesetzter Energieaufwand zur Synthese verschiedener Stoffgruppen (u.a. nach SCHLEGEL und nach LEHNINGER)

Stoffgruppe	ATP	Summe	Molmasse	Mol/kg
Aminosäuren	3+30	33	140	7,143
Glucose	30 (38)	30	180	5,555
Ölsäure	42+3*30	132	282	3,54
N --> NO ₃	8	8	14	71,458
N --> NH ₃	12	12		
NO ₃ --> NH ₃	4	4		

Tab.2: Inhaltsstoffe des Kornes (%TS) aus Prüfungsergebnissen 1991

Fruchtart	Protein	Öl	Kohlehydrate	Alkaloide
LM	38	20	40	2
LA	34	12	54	1
WS	12	0	88	0

Tab.3: Nutzbare Erträge in dt/ha

Fruchtart	Korn	Stroh	Korn : Stroh	N
LM	11	77	1 : 7	1,05
LA	37	74	1 : 2	0,80
WS	55	66	1 : 1,2	- 2,00

Tab.4: Nutzbare Erträge in kg/ha, Ertrag an Inhaltsstoffen

Fruchtart	Protein im Korn	Öl	Kohlehydrate	Alka- loide	Stroh	N
LM	418	220	440	22	7700	105
LA	1258	444	1998	37	7400	80
WS	660	0	4840	0	6600	-200

Tab.5: Nutzbare Erträge in Mol/ha

Fruchtart	Aminosäuren	Öl	Kohlehydrate	Stroh	N
LM	2985	779	2444	45000	7499
LA	8985	1572	11099	41111	5714
WS	4714	0	26888	36667	-14286

Tab.6: Nutzbare Erträge in 10^{28} ATP (Adenosintriphosphat)

Fruchtart	Aminosäuren	Öl	Kohlehydrate	Stroh	N	gesamt
LM	5,9	6,2	4,4	82,8	3,6	102,4
LA	17,9	12,5	20,1	74,3	2,8	127,5
WS	9,4	0	48,6	66,3	-6,9	117,3

Tab.7: Anteil der eingesetzten Energie relativ zur gesamten Energieertragsleistung in ATP-Einheiten für die Kulturarten *Lupinus mutabilis* (LM), *Lupinus albus* (LÄ) und Sommerweizen (WS).

Fruchtart	Aminosäuren	Öl	Kohlehydrate	Stroh	N	gesamt
	%	%	%	%	%	* 10^{28} ATP
LM	5,8	6,0	4,3	80,4	3,5	102,4
LA	14,0	9,8	15,7	58,3	2,2	127,5
WS	7,5	0	39,1	53,3	(5,5)	124,2

SCHLUBFOLGERUNGEN:

- Die hier geprüften frühreifen Linien von *Lupinus mutabilis* sind weniger leistungsfähig als *Lupinus albus* und Sommerweizen.
- Bei *Lupinus mutabilis* sind Kornertragssteigerungen von ca. 10 dt/ha zu erreichen, wenn das Korn:Stroh-Verhältnis verbessert wird
- *Lupinus albus* ist vom Energieertrag her eine ebenso leistungsfähige Kulturart wie Sommerweizen.

Um bei *Lupinus mutabilis* die Leistungsfähigkeit in unseren Breiten generell zu steigern sind unspektakuläre, langfristige Selektionsprogramme vonnöten. Dabei ist auf geringe genetische Einengung bzw. Erzeugung von Variabilität mittels Durchkreuzung zu achten. Unter Umständen sollte ein erneutes Sammelprogramm in geeigneten Klimazonen Südamerikas erwogen werden.

Wer kurzfristig schnelle Ertragssteigerungen bei Lupinen erreichen will, kann dies am schnellsten mit *Lupinus albus* erreichen.

GENOTYPENANALYSE UND VERSUCHE ZUR MUTATIONSINDUKTION BEI
LUPINUS MUTABILIS SWEET

F. SCHNETTLER, U. RUBENSCHUH und W. JAHN-DEESBACH*

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I,
Justus-Liebig-Universität
6300 Giessen

ABSTRACT

Genotype analysis and mutation experiments of *Lupinus mutabilis*

Since the early eighties the institute of agronomy and plant breeding of the Justus-Liebig-University is engaged in investigations of Tarwi (*Lupinus mutabilis*). In case of grain production under european conditions one of the main breeding aims is early maturity. For that reason our breeding program includes selection of early maturing plants.

In 1991 we conduct examinations on induced mutation by gamma irradiation and methanesulfonic acid ethyl ester treatment in order to increase the genetical variability. Furthermore 635 genotypes obtained by the genetic resource center of Braunschweig (FAL) were evaluated with special regard to early maturing plants.

This communication includes the first findings of the mutation experiments and results of the evaluation of the genotype collection.

RESUMEN

El análisis de los genotipos y la inducción de mutaciones en *L. mutabilis* Sweet

Desde principios de los años 80 el Instituto de Agronomía y Mejoramiento Vegetal de la Justus-Liebig University está dedicado al estudio del Tarwi (*Lupinus mutabilis*). Bajo las condiciones europeas de cultivo, uno de los principales objetivos en las investigaciones para producción de grano fue la de lograr precocidad de maduración. Por esta razón, los programas de mejoramiento vegetal de dicha universidad incluyen la selección para maduración temprana de las plantas.

Para incrementar la variabilidad genética, en el año 1991 se condujeron ensayos de mutaciones inducidas por irradiación gama y por tratamiento con un ester del ácido etilmetanosulfónico. Más de 635 genotipos obtenidos del Centro de Recursos Genéticos de Braunschweig (FAL) fueron evaluados con especial atención respecto al caracter de maduración temprana.

Esta comunicación incluye los primeros hallazgos de mutaciones experimentales y los resultados de la evaluación del germoplasma mencionado.

* Leiter der Arbeitsgruppe

1 EINLEITUNG

Das gestiegene Interesse an Lupinen hat sich erneut durch die rege Beteiligung am 2. Heidelberger Lupinensymposium gezeigt. Die Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf die "Alte Welt"-Arten *Lupinus albus* (Weiße Lupine) und *Lupinus luteus* (Gelbe Lupine), die bereits eine gewisse agronomische Bedeutung besitzen (HONDELMANN, 1984). So richten sich auch die Schwerpunkte der züchterischen Aktivitäten in Österreich und Deutschland auf diese Lupinenspezies.

Die Andenlupine (*Lupinus mutabilis*) besitzt in Mitteleuropa noch keine größere Bedeutung. In ihren Heimatländern hingegen ist sie Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten, was vor allem auf die Zusammensetzung der Korninhaltsstoffe zurückzuführen ist. Mit einem Proteingehalt bis über 50 % und einzelnen Genotypen, die neben bis zu 25 % Öl im Samen enthalten können, ähneln diese stark der Soja und werden in dieser Beziehung von keiner anderen Lupinenart übertroffen (GROSS et al., 1983).

Bereits Mitte der 30er Jahre wurden erste Überlegungen von HEUSER et al. (1935) angestellt, die eine mögliche Adaption von *Lupinus mutabilis* für den mitteleuropäischen Anbau zum Inhalt hatten.

Mit dem Wiederanstiegen des Interesses an Körnerleguminosen und damit auch an Lupinen erscheint es daher sinnvoll, das alte Gedankengut erneut aufzugreifen und den Versuch zu unternehmen, die positiven Eigenschaften von *Lupinus mutabilis* der europäischen Landwirtschaft verfügbar zu machen (RUBENSCHUH, SCHNETTLER und JAHN-DEESBACH, 1991).

Am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I der Universität Giessen werden bereits seit Beginn der 80er Jahre verschiedene Untersuchungen an *Lupinus mutabilis* unter hiesigen Bedingungen durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse bezüglich der photoperiodischen Tagneutralität von HACKBARTH (1936) und des Angepaßteins an gemäßigtes Klima von GROSS (1983) bestätigt werden, so daß ein Anbau in Europa durchaus möglich erscheint (RÖMER und JAHN-DEESBACH, 1986). In Übereinstimmung mit MASEFIELD (1975 und 1976) wurde für eine Körnernutzung als Hauptzuchtziel die Vorverlegung der Reife definiert (RÖMER, 1990). Als weiteres vorrangiges Zuchtziel wurde die Senkung des Alkaloidgehaltes, der über 3 % im Korn betragen kann (BAER, 1980), verfolgt. Aufgrund der frühzeitig auf diese beiden Zuchtziele gerichteten Selektion, kann das uns heute am Institut vorliegende Material in eine alkaloidärmere aber spätreife Teilpopulation und eine alkaloidreiche Teilpopulation mit vorverlegter Reife untergliedert werden. Durch fortgesetzte Selektion auf Frühreife konnten anfangs deutliche Fortschritte erreicht werden, so daß die Ernte der relativ frühreifen Genotypen unter Giessener Bedingungen ab Mitte September erfolgen kann. Eine weitere Vorverlegung des Reifetermins erscheint innerhalb des uns zur Verfügung stehenden, genetisch eingegrenzten Materials jedoch mittels einfacher Selektion nicht möglich. So haben wir uns dazu entschlossen, das Ausgangsmaterial und damit die verfügbare genetische Variation durch den Anbau und die Evaluierung des *L. mutabilis* Genotypensortiments der FAL¹⁾ Braunschweig unter besonderer Berücksichtigung des Abreifeverhaltens zu erweitern sowie Mutationsversuche zur Induktion von Frühsaatverträglichkeit und determiniertem Wachstum anzulegen.

Im folgenden werden die ersten Ergebnisse aus diesem Teilbereich der Giessener Arbeiten an *Lupinus mutabilis* dargestellt.

2 MATERIAL UND METHODEN

¹⁾Forschungsanstalt für Landwirtschaft

Das Genotypensortiment wurde 1991 von der FAL Braunschweig bezogen. Es handelt sich um insgesamt 635 Genotypen, von denen 597 als frühreif und 38 als spätreif deklariert waren.

Die Aussaat erfolgte am 11.04.91. Von jedem Genotyp wurden 15 Körner in Reihen zur freien Abblüte und fünf Körner im Isolationskäfig ausgelegt. Nach dem Aufgang wurde im Isolationskäfig auf drei Pflanzen je Genotyp vereinzelt.

An phänologischen Merkmalen wurden der Aufgangszeitraum, die Wuchshöhe, der Wuchstyp, das Fehlen bzw. Vorhandensein von Anthocyanfärbungen an Stengel oder Blattstielgrund, die Blütenfarbe, die Blüh- und Reife-terminen sowie das Grünmassewachstum und der Hülsenansatz bonitiert. Des weiteren wurden das TKG und die Samenfarbe erfaßt.

Die Ernte des FAL-Materials erfolgte reihenweise im Freilandversuch und einzelpflanzenweise im Isolationskäfig. Für die Mutationsversuche wurde relativ frühreifes, alkaloidreiches Material eigener Produktion herangezogen.

Die Mutationsinduktion erfolgte durch γ -Bestrahlung aus einer Cobalt 60 Strahlenquelle²⁾ mit Dosisleistungen von 5 kr, 10 kr, 20 kr, 30 kr und 40 kr an lufttrockenen Samen sowie durch die Behandlung mit Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) der Konzentrationen 0,2 %, 0,4 % und 0,6 % über eine Einwirkungsdauer von drei, fünf und sieben Stunden.

Die Aussaat der durch γ -Strahlung behandelten Varianten erfolgte an zwei Terminen am 18.03.91 (im folgenden als Frühsaat bezeichnet) und am 19.04.91 (Bestrahlungsversuch II). Von jeder Bestrahlungsvariante und einer unbehandelten Kontrolle wurden jeweils 1100 lufttrockene Körner mit einer Parzellensämaschine in Parzellen mit 1,5 Meter Breite und 26 Meter Länge ausgesät. Dies entspricht einer Aussaatstärke von 28 Körnern/m².

Die Aussaat des EMS-Versuchs erfolgte am 23.04.91. Je Variante wurden 500 Körner direkt nach der Behandlung in gequollenem Zustand von Hand mit einer Aussaatstärke von ca. 30 Körnern/m² ausgelegt.

Aus den Mutationsversuchen wurden lediglich Einzelpflanzen ausgelesen, welche die Selektionskriterien Frühreife und hohe Hülsenzahl an Haupt- und Nebentrieben erster Ordnung bei gleichzeitig geringer Wuchshöhe und kräftigem Habitus erfüllten. Des weiteren wurden die Mortalitätsraten ermittelt.

Die Bestandespflege beschränkte sich auf eine Unkrautbekämpfung im Voraufbau mit 6 Liter/ha Stomp und der Unkrautkontrolle im Nachaufbau durch mehrmaliges Hacken. Bei Bedarf erfolgte eine partielle Insektizidbehandlung mit 0,1 %iger Pirimorbrühe.

3 ERGEBNISSE

3.1 FRÜHSAATVERSUCH

Im Frühsaatversuch wurde zunächst der Blühbeginn der ersten 100 blühenden Pflanzen ermittelt. Dieser erstreckte sich über einen Zeitraum von 12 Tagen und erfolgte zwischen dem 16.6.91 und dem 28.6.91. Ein großer Anteil von frühblühenden Pflanzen entstammte der unbehandelten Parzelle. Ebenso konnte in der 10 kr Variante eine erhebliche Zahl an frühblühenden Pflanzen festgestellt werden. In den Behandlungsstufen 5 kr, 20 kr und 30 kr war der Anteil an frühblühenden Pflanzen deutlich geringer, in der 40 kr Variante war keine frühblühende Pflanze zu finden.

Zwischen den einzelnen Varianten ließ sich kein eindeutiger Einfluß der Strahlendosis auf das Verhalten hinsichtlich einer früheren Blüte feststellen.

Die Wuchshöhen der als frühblühend bonitierten Einzelpflanzen lagen bei Blühbeginn zwischen 18 cm und 64 cm.

²⁾Die Bestrahlung erfolgte am Strahlencentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Auch auf dieses Merkmal hatte die Behandlung keinen Einfluß, die Schwankungen innerhalb der Parzellen umfaßten jeweils die gesamte Variationsbreite.

Gegen Ende der Vegetationsperiode wurden die Bestandesdichten der einzelnen Varianten ermittelt. Die Ergebnisse und die hieraus errechneten Mortalitätsraten sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Behandlungen mit 5 kr und 10 kr zeigten keinen erheblichen Unterschied zur unbehandelten Variante. Bei einer Strahlendosis von mehr als 10 kr nahm die Mortalitätsrate stark zu.

Ab dem 23.08.91 wurden totreife Einzelpflanzen die den Selektionskriterien entsprachen ausgelesen. Ein Zusammenhang zwischen früher Blüte und früher Abreife konnte hierbei nicht festgestellt werden. In der unbehandelten Parzelle wurden 17, in der 5 kr Variante 20, in der 10 kr Variante 15 und in der 20 kr Variante 4 Pflanzen, die diesen Kriterien entsprachen, gefunden. In der 30 kr und 40 kr Variante wurden keine Pflanzen ausgelesen.

Die Wuchshöhen der selektierten Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte variierten zwischen 37 und 99 cm. Dabei konnte ein höherer Wuchs der unbehandelten Parzelle gegenüber den bestrahlten Varianten festgestellt werden.

Tab. 1: Anzahl frühblühender und selektierter Einzelpflanzen in den Varianten unter Berücksichtigung der Wuchshöhen

	Unb.	5kr	10kr	20kr	30kr	40kr
Anzahl der Frühblühenden	31	11	28	13	17	-
Wuchshöhe bei Blühbeginn in cm (ϕ)	41	43	47	44	36	-
Variationsbreite in cm	23-61	26-52	35-63	26-64	18-57	-
Gesamtpflanzenzahl	613	582	588	187	60	26
Mortalitätsrate in %	44	47	47	83	94	98
Selektierte Pflanzen	17	20	15	4	-	-
Wuchshöhe bei Ernte in cm (ϕ)	67	58	58	56	-	-
Variationsbreite in cm	41-99	40-72	37-74	50-63	-	-

An Krankheiten wurden vor allem jene der Stengelbasis, wie *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Ascochyta pisi* und *Phoma lupini*, ermittelt. In den meisten Fällen führten diese zum Absterben der Pflanzen. Auffällig war der hohe Anteil kranker Pflanzen in der 20 kr Variante, während in den anderen Varianten kein erhöhter Anteil kranker Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle festzustellen war. Der gesamte Bestand war mit den Mehltaupilzen *Erysiphe polygoni* oder *E. pisi* befallen, deren Auftreten jedoch keinen Einfluß auf die Auswertung des Versuches genommen hat. An Wuchstypen wurden der Verzweigungstyp V und der Bestockungstyp festgestellt. Der Anteil der Bestockungstypen steigt in den ersten drei Varianten von 52,04 % auf 65,65 % an, in den weiteren Varianten liegt der Anteil bestockter Pflanzen um 50 %.



Abb. 1: Bestandesdichte, Krankheitsbefall und Wuchstypenverteilung im Frühsaatversuch

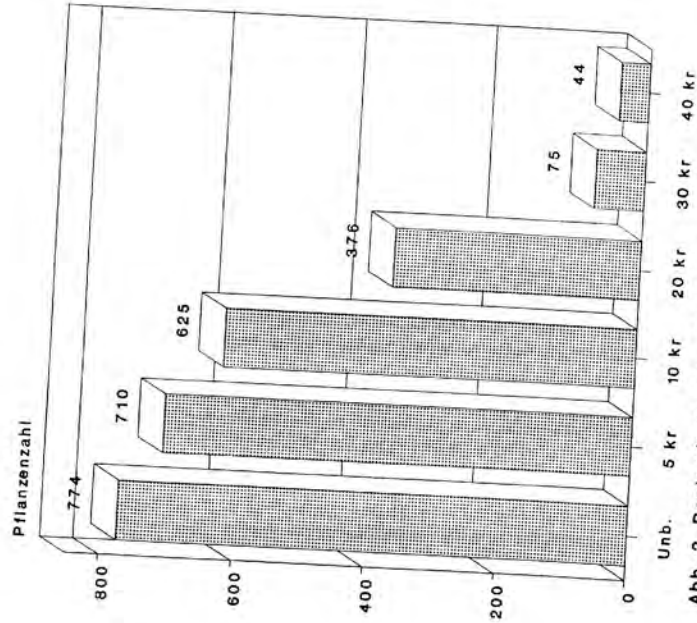


Abb. 2: Bestandesdichten des Mutationsversuches II

In Abbildung 1 sind einige Ergebnisse des Frühsaatversuches graphisch dargestellt.

3.2 Bestrahlungsversuch II

Auch im zweiten Bestrahlungsversuch konnte ein Einfluß der Behandlung auf die Bestandesdichte festgestellt werden. Mit zunehmender Strahlungsintensität sinkt erwartungsgemäß die Anzahl an Pflanzen in den einzelnen Parzellen. Wie im Frühsaatversuch war ein deutlicher Rückgang ab der 20 kr Variante zu beobachten, der bereits 66 % der Aussaatstärke betrug. Die Varianten 30 kr und 40 kr zeigten mit 93 % und 96 % eine noch höhere Mortalitätsrate.

In der unbehandelten Variante wurden 9, in der 5 kr 11, in der 10 kr 5 und in der 20 kr Variante wurden 8 Pflanzen selektiert. In der 30 kr Variante konnte nur eine Pflanze ausgelesen werden, in der 40 kr Variante war keine Pflanze vorhanden, die den Auslese Kriterien entsprach. Abbildung 2 zeigt die festgestellte Gesamtpflanzenzahl und die Anzahl selektierter Pflanzen in den verschiedenen Varianten.

Wie im Frühsaatversuch wurden die Wuchshöhen der selektierten Pflanzen bei der Ernte gemessen. Sie lagen zwischen 67 cm und 124 cm und damit etwas höher als im Frühsaatversuch. Auch im zweiten Bestrahlungsversuch wiesen die unbehandelten Pflanzen einen höheren Wuchs als die Behandelten auf (s. Tab. 2).

Tab. 2: Ergebnisse des zweiten Bestrahlungsversuches

	Unb.	5kr	10kr	20kr	30kr	40kr
Gesamtpflanzenzahl	774	710	625	376	75	44
Mortalitätsrate in %	30	35	43	66	93	96
Selektierte Pflanzen	9	11	5	8	1	-
Wuchshöhe in cm (ϕ)	103	97	94	86	92	-
Variationsbreite in cm	85-124	81-117	83-110	67-96	92	-

3.3 EMS-Versuch

Im EMS behandelten Mutationsversuch zeigten die Pflanzen der verschiedenen Varianten keine phänologischen Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß mit zunehmender Konzentration des Mutagens eine erhöhte Mortalitätsrate auftrat. Von der Einwirkungsdauer ging in der vorliegenden Untersuchung kein Einfluß auf die Gesamtpflanzenzahl aus. Ebenso läßt sich kein Einfluß von Konzentration und Einwirkungsdauer auf die Anzahl der ausgelesenen Pflanzen erkennen (s. Tab. 3).

Tab. 3: Vitale Pflanzen nach EMS Behandlung (Saatstärke 500)

	0,2%	0,4%	0,6%	Σ
3 h	275 (6)	94 (2)	138 (1)	507
5 h	186 (0)	193 (2)	160 (0)	539
7 h	225 (2)	171 (2)	106 (2)	502
Σ	686	458	404	1548

(Anzahl selektierter Pflanzen in Klammern)

3.4 Genotypanalyse

Die bei der Bonitur des FAL Materials erfaßten Parameter sind in Tabelle 4 aufgeführt. In vielen erfaßten Merkmalen war eine weite Variationsbreite festzustellen. Nicht nur zwischen den Genotypen sondern auch innerhalb der Reihen lag in einigen Merkmalen eine große Heterogenität vor. Auffallend war, daß bei keinem Genotyp Anthocyanfärbungen vorhanden waren und alle angebauten Genotypen dem Verzweigungstyp V entsprachen.

Tab. 4: Boniturmerkmale des FAL Materials

Boniturmerkmal	
Aufgang	2.5. - 16.5.91
Wuchshöhe in cm	83 - 239 (im Isolationskäfig)
Wuchstyp	Verzweigungstyp V 100,0 %
Anthocyane	keine
Blütenfarben	blau/weiß 74,0 % violett/weiß 19,3 % blau-violett/weiß 4,8 % weiß 1,8 %
Blühtermine	25.6. - 2.8.
Reifetermine	ab Mitte Oktober
TKG	125 - 286 g (φ 186 g)
Samenfarbe	weiß 85,8 % weiß/braun gefleckt 8,0 % andere 6,2 %

Einige Pflanzen zeigten eine sehr hohe Grünmasseproduktion, der Hülsenansatz war bei nur wenigen Genotypen zufriedenstellend.

Die ersten reifen Pflanzen konnten erst ab Mitte Oktober geerntet werden und entsprachen damit nicht unseren

Anforderungen bezüglich des Merkmals Frühreife.

4 DISKUSSION

Eine Hauptaufgabe bei der züchterischen Bearbeitung von *Lupinus mutabilis* zur Körnernutzung ist, unter europäischen Bedingungen, die Suche nach frühreifenden Genotypen und deren Integration in das Zuchtprogramm. Abweichungen einzelner Individuen innerhalb einer Population sind häufig auf Mutationen zurückzuführen.

Das Auffinden von spontanen Mutanten mit erwünschten Eigenschaften ist, wenn überhaupt, nur in großen Pflanzenbeständen zu erwarten und die Suche danach ist mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Durch die Steigerung der Mutationsrate mittels induzierter Mutation läßt sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der gesuchten Merkmale erhöhen. Aus diesem Grund werden Mutationsinduktionen durch X-Strahlung (Röntgen- und Radiumstrahlen) oder Neutronenstrahlen (γ -Strahlen = Radioisotope, Cobalt⁶⁰ und Caesium¹³⁷ bzw. β -Strahlen = Phosphor³²) durchgeführt. Chemische Mutagenzien wie EMS eignen sich ebenfalls zur Mutationsinduktion (KRESS, 1953; PAKENDORF, 1970 und 1974; PLARRE, 1990; PORSCHE, 1963; SAWICKA, 1990).

Nach HACKBARTH und PAKENDORF (1970) können Mutationen unter anderem die Eigenschaften Pflanzhöhe und Reifezeit beeinflussen. PORSCHE (1963) fand bei Mutanten der Gattung *Lupinus* vor allem Veränderungen in den Merkmalen Wüchsigkeit, Hülsenansatz, Frühreife sowie Blatt- und Stengelfarbe. TEDIN (1954) konnte beispielsweise das Merkmal Frühreife nach einer Behandlung durch X-Strahlung feststellen.

Die Behandlung mit Mutagenen kann in Abhängigkeit von der Dosis bzw. der Konzentration zu Punktmutationen, Genmutationen, Genommutationen und Chromosomenmutationen führen. Erwünscht sind in der Pflanzenzüchtung Punktmutationen, die eine Veränderung nur einzelner Merkmale bewirken (HOFFMANN, MUDRA, PLARRE, 1971).

Die von uns in einem kleineren Umfang durchgeführten Mutationsversuche sollten zunächst einen Aufschluß über die Wirkung unterschiedlicher Dosisleistungen auf das *Lupinus mutabilis* Material geben. In Übereinstimmung mit KRESS (1953) und PAKENDORF (1970 und 1974) konnte festgestellt werden, daß Behandlungen über 10 kr zu einem starken Anstieg der Mortalität führen (s. Abb. 1 und 2). Hieraus schließen wir, daß Punktmutationen nach γ -Bestrahlung vor allem in den Dosen bis 10 kr zu erwarten sind. Für zukünftige Mutationsprogramme planen wir daher eine Behandlung mit diesen Strahlungsintensitäten.

Die Mutationsinduktion durch chemische Agentien wie EMS hat den Vorteil, daß die Häufigkeit von Punktmutationen größer ist als bei Strahlungsbehandlungen (HOFFMANN, MUDRA und PLARRE, 1971). Unsere Untersuchungen mit EMS zeigen tendenziell Einflüsse der höheren Konzentrationen auf die Mortalitätsrate, die Einwirkungsdauern im untersuchten Spektrum blieben hingegen ohne erkennbare Wirkung. Phänotypische Unterschiede zwischen den vitalen Pflanzen der EMS-Varianten waren nicht festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Bestrahlungsversuchen Einflüsse der Behandlungen auf phänologische Merkmale. So lagen beispielsweise die Wuchshöhen in den unbehandelten Parzellen durchschnittlich um ca. 10 cm höher als in den bestrahlten Varianten. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von KRESS (1953) und PORSCHE (1963) sowie HACKBARTH und PAKENDORF (1970), die ebenfalls eine Reduzierung der Wuchshöhe nach Mutationsinduktion durch Strahlenbehandlung feststellten. Den hohen Anteil an Bestockungstypen von teilweise über 60 % hingegen führen wir nicht auf die Bestrahlung zurück, sondern vermuten vielmehr einen Einfluß niedriger Temperaturen während der Jugendentwicklung des Bestandes.

Wie die Abbildungen 3 und 4 zeigen, herrschten zunächst gute Keimungsbedingungen. Die Bodentemperaturen lagen deutlich über dem Nullpunkt und Niederschläge sorgten für eine ausreichende Bodenfeuchtigkeit. 12 Tage nach der Aussaat trat jedoch eine Kälteperiode mit Temperaturen bis zu -6 °C ein. Solch niedrige Temperaturen können bereits zu erheblichen Frostschädigungen führen, wie sich in Versuchen von RAABE und SENGBUSCH

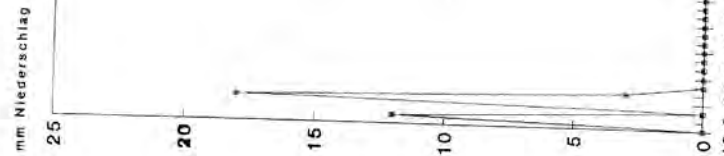


Abb. 4: Niederschlagsmenge Gießen 1991

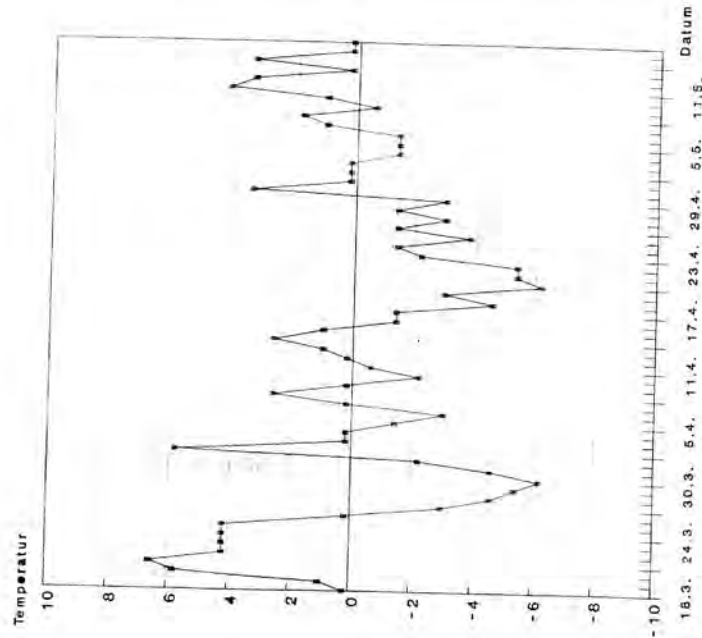


Abb. 5: Bodentemperaturen Feld Gießen 1991 (Erbodenminimum)

(1935) zeigte. Die genannten Autoren stellten an Keimlingen von *Lupinus mutabilis* fest, daß diese Nachfröste von $-3,7^{\circ}\text{C}$ vertrugen, aber bei Temperaturen von -6 bis -7°C abstarben.

Eine zweite Kälteperiode, 30 Tage nach Aussaat, erfolgte während sich die Pflanzen des Fröhsaatversuches im Keimblattstadium befanden. Die Temperaturen lagen ebenfalls um 6°C unter dem Nullpunkt und damit in einem Bereich, der bei *Lupinus mutabilis* in der Jugendentwicklung zu Schädigungen führen kann (BAER et al., 1977; RÖMER, 1990). Der Einfluß der zweiten Kälteperiode zeigte sich vor allem durch die Schädigung des Vegetationskegels junger Pflanzen. Dies führte zu einer verstärkten Bestockung im Jugendstadium, so daß ca. die Hälfte aller Pflanzen durch die kältebedingte Modifikation phänologisch dem Bestockungstyp entsprachen.

Der Einfluß der Kälteperioden wird auch durch den Vergleich von Fröhsaatversuch und Bestrahlungsversuch II deutlich.

Der zweite Bestrahlungsversuch zeigte tendenziell die gleichen Ergebnisse wie der Fröhsaatversuch. Die Mortalitätsraten lagen jedoch in der unbehandelten Kontrolle, in der 5 kr, 10 kr und 20 kr Variante deutlich unter denen des Fröhsaatversuches (s. Abb. 5). So nehmen wir einen nicht unbeträchtlichen Anteil der frühen Kälteperiode an dem schwächeren Aufgang im Fröhsaatversuch und damit an den verhältnismäßig hohen Mortalitätsraten an. Die 30 kr und 40 kr Variante unterschieden sich in ihren Mortalitätsraten nur geringfügig, hier scheint der Einfluß der Bestrahlung auf die Mortalitätsrate größer als der Temperatureinfluß.

Eine Selektion in der M_1 kann nur bei Mutationen die dominant sind erfolgen. Da der größte Teil aller Mutationen aber rezessiven Ursprungs ist, kann eine Selektion auf die gewünschten Merkmale frühestens ab der M_2 durchgeführt werden (HOFFMANN, MUDRA und PLARRE, 1971). Dennoch führten wir bereits in der M_1 erste Selektionen auf Frühreife durch, auch wenn dieses Merkmal rezessiv vererbt wird. In den folgenden Anbaujahren sollen die Nachkommenschaften auf die Stabilität der als Selektionskriterien zugrunde gelegten Eigenschaften überprüft werden. Erst dann kann eine endgültige Aussage über die Eignung der durchgeführten Induktionsverfahren getroffen werden.

Auch für eine endgültige Beschreibung des Genotypensortiments der FAL ist ein weiterer Nachbau der in diesem Jahr geselbsteten Pflanzen erforderlich. Die Evaluierung des frühreifen Materials zeigte eine große Variationsbreite in einigen Merkmalen, wie Wuchshöhe oder Blühtermin. Große Übereinstimmung lag hingegen bspw. im Wuchstyp und in der Anthocyanfärbung vor. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch das FAL Material nur über eine eingeschränkte genetische Variabilität verfügt. In Bezug auf den Reifetermin konnten keine Genotypen ermittelt werden, die einen unseren Anforderungen entsprechenden, frühen Reifetermin gehabt hätten.

Danksagung

Wir danken der GFP³⁾ für die finanzielle Unterstützung unserer züchterischen Arbeiten an *Lupinus mutabilis*.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits seit Beginn der 80er Jahre wird am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I der Justus-Liebig-Universität Gießen intensiv mit der Andenlupine (*Lupinus mutabilis*) gearbeitet. Als Zuchtziele für eine mögliche Körnernutzung wurde unter anderem die Vorverlegung der Reife definiert. Schon in frühen Zuchtstadien erfolgte die Selektion auf das genannte Merkmal. Das dem Institut zur Verfügung stehende Zuchtmaterial erscheint hinsichtlich dieses Merkmals erschöpft zu sein, so daß eine weitere Vorverlegung der Reife durch einfache Selektion nicht zu erwarten ist.

3) Gesellschaft zur Förderung der privaten deutschen landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung e.V.

Um eine breitere Ausgangsbasis für zukünftige Arbeiten zu schaffen, wurden daher im Vegetationsjahr 1991 Mutationsversuche angelegt und Genmaterial der FAL-Braunschweig für eine erste Evaluierung angebaut. In der vorliegenden Arbeit werden die aus den Mutationsversuchen gewonnenen Erfahrungen und die ersten Ergebnisse der Evaluierung des Genotypensortiments der FAL beschrieben.

6 LITERATUR

- BAER, D. VON** (1980): Alkaloide in *Lupinus mutabilis*. Bestimmungsmethoden und Gehalt in Samen und Produkten. Dissertation, Kiel
- GROSS, R.** (1983): Untersuchungen über den Einfluß von Genotyp und Umwelt auf die Korninhaltsstoffe von Tarwi (*Lupinus mutabilis*) aus peruanischem Anbau. Dissertation, Gießen
- GROSS, R.; HATZOLD, T.; ELMADFA, I. UND RUIZ, O.** (1983): Genetically and environmentally dependent variability of protein and fat content in the seeds of *Lupinus mutabilis* of Peruvian origin. *Z. Pflanzenzüchtung* **90**, 324-330
- HACKBARTH, J.** (1936): Versuche über Photoperiodismus III. *Der Züchter* **8**, 81-92
- HACKBARTH, J.; PAKENDORF, K.W.** (1970): *Lupinus mutabilis* SWEET, eine Kulturpflanze der Zukunft? *Z. Pflanzenzüchtung* **63**, 237-245
- HEUSER, W.; BOEKHOLT, K. UND Ulich, G.** (1935): Der Gehalt der Samen von *Lupinus albus* an Eiweiß, Fett und Alkaloiden im Vergleich zu anderen Lupinenarten und unter dem Einfluß äußerer Bedingungen. *Pflanzenbau* **11**, 29-138
- HOFFMANN, W.; MUDRA, A.; PLARRE, W.** (1971): Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen, Band 1: Allgemeiner Teil, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- HONDELMANN, W.** (1984): The lupin - ancient and modern crop plant. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 1-9
- KRESS, H.** (1953): Ergebnisse der Röntgenbestrahlung bei der Gülzower Stüßen Gelblupine (*L. luteus*). *Der Züchter* **23**, 168-172
- KRESS, H.** (1964): Über den Stand und die Perspektiven der Lupinenzüchtung in der DDR. *Wissenschaftliche Zeitung der Karl-Marx-Universität Leipzig* **13**, 683-690
- MASEFIELD, G.B.** (1975): A preliminary trial of the Pearl Lupin in England. *Expl. Agric.* **11**, 113-118
- MASEFIELD, G.B.** (1976): Further trials of Pearl Lupin in England. *Expl. Agric.* **12**, 97-102
- PAKENDORF, K.W.** (1970): Studies on the use of mutagenic agents in *Lupinus*. I. The effect of gamma-ray dose on plant survival in *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus* and *L. mutabilis*. *Z. Pflanzenzüchtung* **63**, 102-113
- PAKENDORF, K.W.** (1974): Studies on the use of mutagenic agents in *Lupinus*. II. Some mutants of *Lupinus mutabilis* after the application of gamma-irradiation. *Z. Pflanzenzüchtung* **72**, 152-159
- PLARRE, W.** (1990): Mutation Breeding. 6th International Lupin Conference Chile, Abstracts, 132
- PORSCHKE, W.** (1963): Mutationsversuche mit Weißen Lupinen (*Lupinus albus* L.). *Der Züchter* **33**, 33-39
- RAABE, A. UND SENGBUSCH, R. VON** (1935): Züchterisch wichtige Beobachtungen an

einigen Lupinenarten. *Der Züchter* **7**, 224-248

- RÖMER, P.** (1990): Genetische und physiologische Untersuchungen an *Lupinus mutabilis* SWEET. Dissertation Gießen
- RÖMER, P.; UND JAHN-DEESBACH, W.** (1986): Developments in breeding of *Lupinus mutabilis*. Proceedings of the 4th International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia
- RUBENSCHUH, U.; SCHNETTLER, F. UND JAHN-DEESBACH, W.** (1991): Genotypenanalyse und züchterische Bearbeitung der "Andenlupine" (*Lupinus mutabilis*) als öl- und proteinliefernde Pflanze. In: Schriftenreihe des BML. Sonderheft Produktions- und Verwendungsalternativen für die Land- und Forstwirtschaft: Nachwachsende Rohstoffe. (Hrsg. Bundesamt für Ernährung und Forstwirtschaft), Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, 285-291

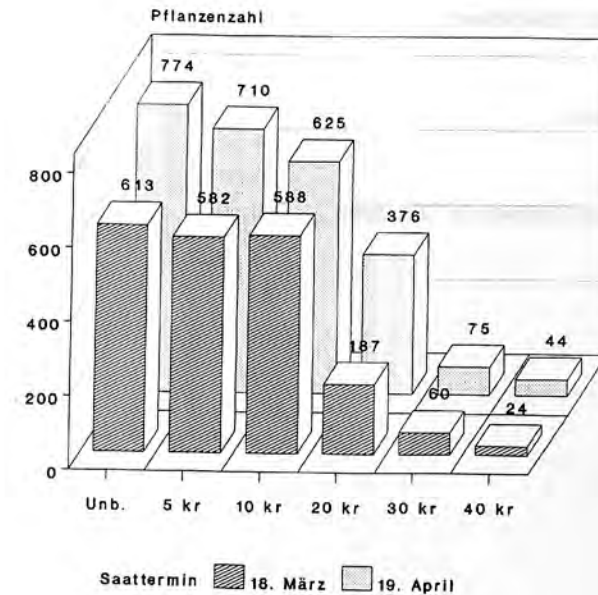


Abb. 5: Vergleich der Bestrahlungsversuche

GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER LUPINE (GFL)

Auf der 2. Heidelberger Lupinentagung wurde die Gründung der "Gesellschaft zur Förderung der Lupine" beschlossen.

Zweck des Vereins ist die Förderung des Lupinenanbaus und der Forschung über Lupinen und ihre Inhaltsstoffe. Er soll für alle an Lupinen interessierten Personen ein Kommunikationsforum sein, mit dem Ziel der gegenseitigen Information, des Gedankenaustausches und der Koordinierung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben.

1. Vorsitzender: Dr. Peter Römer

Nähere Information:

Dr. P. Römer
c/o Südwestdeutsche Saatzucht Dr. H.R. Späth
7550 Rastatt