

M. Wink (Hrsg.)

Fortschritte in der Lupinenforschung und im Lupinenanbau



1995

Universität Heidelberg

M. Wink (Hrsg.)

Fortschritte in der Lupinenforschung und im Lupinenanbau



1995
Universität Heidelberg

Anschrift des Herausgebers:

Prof. Dr. Michael Wink

Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
D-69120 Heidelberg

FAX: 06221 564884

e-mail: F01@ix.urz.uni-Heidelberg.de

Fortschritte in der Lupinenforschung und im Lupinenanbau
(M. Wink, Hrsg.), Universität Heidelberg, 1995

Autorenverzeichnis

Seite

Brunner, J.	215
Feiler, E.	142, 248
Geiss, H.K.	126
Hanke, M.	58
Hartmann, C.	19
Höflich, G.	29
Jost-Ullmann, M.	126
Käss, E.	39
Merbach, W.	4
Möller, W.	204
Ohlenmacher, U.	126
Reichling, J.	126
Römer, P.	195,239,253
Ruhl, E.-M.	223
Schmeller, T.	92
Schmidt, H.	244
Schmiechen, U.	204
Twardowski, T.	111
Väth, D.	173
Weißmann, E.A.	160
Wink, M.	1,39,58,92,

1 Vorwort	1		
2 Beziehungen zwischen ^{15}N -Translokation und ^{15}N -Verarbeitung in Weiß- und Gelblupinen	4		
2.1 Einleitung	5		
2.2 Wachstumsverlauf bei Weißlupinen während der Ontogenese	5		
2.3 Gerichteter Stofftransport als Prinzip der pflanzlichen Stoffbildung	6		
2.4 ^{15}N -Verteilung in Weiß- und Gelblupinen	7		
2.4.1 Aufnahme und Verteilung von exogen verabreichten Mineral- ^{15}N	7		
2.4.2 Verteilung von symbiotisch fixierten N_2 in Leguminosen	10		
2.4.3 ^{15}N -Sekundärverlagerung in Leguminosenpflanzen	11		
2.4.4 Zwischenfazit	11		
2.5 Beziehungen zwischen N-Akkumulation und N-Verarbeitung durch wachsende	12		
2.6 Literaturverzeichnis	16		
3 Nitratauswaschung nach dem Anbau von Weißen Lupinen (<i>Lupinus albus</i> L.)	19		
3.1 Einleitung	20		
3.2 Material & Methoden	20		
3.2.1 Probenahme	20		
3.2.2 Aufbereitung und Extraktion	21		
3.2.3 Messung	21		
3.2.4 Berechnung	22		
3.3 Ergebnisse & Diskussion	22		
3.4 Literatur	28		
4 Förderung der biologischen Luftstickstoffbindung bei Lupinen	29		
4.1 Einleitung	30		
4.2 Material und Methode	30		
4.3 Ergebnisse und Diskussion	31		
4.3.1 <i>Bradyrhizobium</i> -Inokulationen bei Gelblupinen	31		
4.3.2 Inokulationswirkungen bei verschiedenen Lupinenarten und Sorten	33		
4.3.3 Inokulation von <i>Serratella</i> und Leguminosengemenge	33		
4.3.4 Kombinierte Inokulation von Bradyrhizobien mit stoffwechsellaktiven assoziativen Rhizosphärenbakterien	36		
4.4 Diskussion	37		
4.5 Literatur	38		
5 Molekulare Phylogenie der Lupinen (<i>Lupinus</i> : Leguminosae)	39		
5.1 Einleitung	41		
5.2 Material und Methoden	43		
5.3 Ergebnisse und Diskussion	45		
5.4 Literatur	54		
6 Von den Archaeobakterien bis zu den Lupinen- Rekonstruktion der zugrundeliegenden Phylogenie anhand von abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der β -Untereinheit der H^+ -ATPase (atpB)	58		
6.1 Einleitung	59		
6.2 Material und Methode	60		
6.3 Ergebnisse	78		
6.3.1 Isolierung des ATPase-Gens (atpB) aus <i>Lupinus albus</i>	78		
6.3.2 atpB als molekularer Marker	81		
6.4 Diskussion	84		
6.5 Literatur	89		
7 Interaktion von Lupinenalkaloiden mit Acetylcholin-Rezeptoren	92		
7.1 Einleitung	92		
7.1.1 Interaktion von Naturstoffen mit Rezeptoren und Ionenkanälen	95		
7.2 Material und Methoden	96		
7.2.1 Prinzip des Bindungsassays	96		
7.2.2 Gewebepreparation	97		
7.2.3 Synaptosomen-Präparation	97		
7.2.4 Bindungstests: Muskarinerge Rezeptoren (m-AChR)	97		
7.2.5 Bindungstest: Nikotinerge Rezeptoren (n-AChR)	100		
7.2.6 Verdrängungskurven	102		
7.2.7 Auswertung der Rezeptorbindungsstudien: Sättigungsexperimente	105		
7.2.8 Isolierung der Chinolizidin-Alkaloide	105		
7.3 Ergebnisse und Diskussion	105		
7.4 Literatur	108		
8 Lupinen-Proteinbiosynthese: Aktivitäts- und Regulationstests mit Oligodeoxynukleotiden	111		
8.1 Einleitung	111		
8.2 Ergebnisse	115		
8.3 Perspektiven	125		
8.4 Literatur	125		
9 1'-Hydroxyeugenolderivate aus <i>Coreopsis</i> -Arten mit spezieller Wirkung gegen Staphylokokken	126		
9.1 Einleitung	127		
9.2 Material & Methoden	129		
9.3 Ergebnisse & Diskussion	132		
9.3.1 Antimykotische Wirkung	132		
9.3.2 Antibakterielle Wirkung	132		
9.3.3 Struktur-Wirkungsbeziehung	135		
9.3.4 Klinische Bedeutung	136		
9.3.5 Mutagene, genotoxische und cytotoxisch Wirkung	137		
9.3.6 Wirkung auf die Erythrocytenmembran	138		
9.3.7 Weitere Arbeiten	139		
9.4 Literatur	139		
10 Untersuchungen zur Pathogenität von wurzel- und stengelbesiedelnden Pilzen bei <i>Lupinus luteus</i>	142		
10.1 Einleitung	142		
10.2 Material und Methoden	143		
10.3 Ergebnisse und Diskussion	145		
10.3.1 Artenvorkommen an <i>Lupinus luteus</i>	145		
10.3.2 Pathogenität ausgewählter Pilzarten an <i>Lupinus luteus</i>	146		
10.3.3 Symptomausprägung	152		
10.4 Literatur	158		

11 Ergebnisse des Bitterlupinenprojektes in Sachsen-Anhalt (1992-1994)	160		
11.1 Einleitung	161		
11.2 Material und Methoden	162		
11.3 Ergebnisse	163		
11.3.1 Kornertrag	163		
11.3.2 Blühbeginn	166		
11.3.3 Reife	168		
11.3.4 Lagerneigung	168		
11.3.5 Wuchshöhe	169		
11.3.6 Anthraknose	169		
11.3.7 Protein- und Ölgehalt, Protein- und Ölertag	170		
11.3.8 Alkaloide	172		
12 Einfluß von Standort und Genotyp auf die Erträge von <i>L. albus</i> und <i>L. mutabilis</i> in Südchile	173		
12.1 Einleitung	174		
12.2 Material & Methoden	174		
12.3 Ergebnisse & Diskussion	177		
12.3.1 Kornerträge	177		
12.3.2 Grünmasseerträge	184		
12.3.3 Korninhaltsstoffe	185		
12.4 Dank	192		
12.5 Literatur	192		
13 Neue Möglichkeiten zur Züchtung frühreifer Andenlupinen (<i>Lupinus mutabilis</i>)	195		
13.1 Einleitung	196		
13.2 Ergebnisse des Mutationsprogrammes	197		
13.3 EU-Projekt: "Anpassung von <i>Lupinus mutabilis</i> an Europäische Boden- und Klimabedingungen"	199		
13.3.1 Artkreuzung	199		
13.3.2 Fremdstäubungsrate	200		
13.3.3 Ertragsversuch	202		
13.3.4 Schlußfolgerung	203		
13.4 Literatur	203		
14 Die Bedeutung der <i>Fusarium</i>-Resistenz und der Reifezeit für den erfolgreichen Anbau der Gelblupine	204		
14.1 Einleitung	204		
14.2 Die Bedeutung fusariumresistenter Sorten	206		
14.2.1 Die Bedeutung der Reifezeit bzw. des Druschtermins für die Ertragsstabilität Gelber Lupinen.	207		
14.3 Sorten mit determiniertem Wuchs	212		
14.4 Frühreifende Gelblupinensorten	212		
15 Neue Erkenntnisse in der Produktionstechnik bei gelben und weissen Süßlupinen	215		
15.1 Einleitung	215		
15.2 Material und Methoden	215		
15.3 Ergebnisse und Diskussion	216		
		16 Untersuchungen zur Ertragsstruktur neuerer Sorten der Gelben und Weißen Süßlupine	223
		16.1 Einleitung	224
		16.2 Material und Methoden	224
		16.2.1 Versuch 1 (Wannenmühle)	224
		16.2.2 Versuch 2 (Saatzucht)	224
		16.3 Ergebnisse	225
		16.3.1 Klima (Abb. 1 + 2)	225
		16.3.2 Entwicklung von Blüten zu Hülsen bei <i>L. albus</i> (Abb. 3 - 6)	227
		16.3.3 Entwicklung von Blüten zu Hülsen bei <i>L. luteus</i> (Abb. 7 + 8)	230
		16.3.4 Blütenumwandlungsrate (Abb. 9)	230
		16.3.5 Körner/ Hülse (Abb. 10)	231
		16.3.6 Kornerträge der Einzelpflanzen (Tab. 1)	231
		16.3.7 Parzellenkornerträge (Tab. 2 + 3)	231
		16.3.8 Tausendkorngewicht	235
		16.4 Diskussion und Abschluß	235
		16.4.1 Versuchsanlage	235
		16.4.2 Sortencharakteristik	236
		16.4.3 Einfluß der Bestandesdichte auf den Kornertrag	237
		16.4.4 Einfluß der Rhizobium-Impfung auf den Kornertrag	237
		16.5 Literaturverzeichnis	237
		17 Round-Table-Diskussionen auf der 3. Heidelberger Lupinentagung,	239
		17.1 Aktuelle Probleme im praktischen Lupinenanbau: Anthracnose, Unkrautregulierung, Impfung	239
		17.1.1 Anthracnose	239
		17.1.2 Unkrautregulierung	241
		17.1.3 Impfung	243
		17.2 Herbizidversuch mit Weißlupinen (<i>Lupinus albus</i>)	244
		17.2.1 Forschungsfrage	244
		17.2.2 Ergebnisse	244
		17.2.3 Fazit	247
		17.3 Round-Table, Biotechnologie 2000	248
		17.3.1 Grünfütter/Silage	248
		17.3.2 Bodensanierung	248
		17.3.3 Tierernährung	249
		17.3.4 Humanernährung	249
		17.3.5 Krankheiten, Analytik	251
		17.3.6 Sortencharakterisierung (Fingerprinting mit RFLP, AFLP, RAPD, Mikrosatelliten)	251
		17.3.7 Anwendung der Gentechnologie bei Lupinen	251
		18 Gesellschaft zur Förderung der Lupine (GFL)	253

1 Vorwort

Lupinen (Gattung *Lupinus*, Familie Leguminosae) sind weltweit verbreitet und zeichnen sich durch eine gute Widerstandsfähigkeit und Robustheit aus.

Da Lupinen mit Knöllchenbakterien in Symbiose leben, können sie auch auf stickstoffarmen Böden gedeihen, da die Rhizobien zur Fixierung des Luftstickstoffs in der Lage sind. Diese Eigenschaft kann auch landwirtschaftlich genutzt werden, indem man Lupinen zur Bodenverbesserung anbaut. In Australien hat man mehrfach zeigen können, daß Lupinen als Zwischenfrucht die Erträge von Getreide signifikant erhöhen können. Als Pionierpflanzen können Lupinen selbst unwirtliche Lebensräume, wie z.B. Lavafelder zu besiedeln. Diese Pionierfähigkeit macht man sich auch bei uns zu Nutze: neu geschaffene Autobahnböschungen sind leicht der Bodenerosion preisgegeben. Um dies zu verhindern, wird vielerorts die nordamerikanische Art *Lupinus polyphyllus* angesiedelt, die auf diese Weise zu einer Charakterpflanze der Autobahnen, insbesondere im Mittelgebirgsbereich geworden ist.

Eine Reihe von Lupinenarten, wie z.B. die altweltlichen Arten *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* und die neuweltliche *L. mutabilis* haben große Samen, die bis zu 50% Protein aufweisen können, neben maximal 20% Öl und 2-6% Chinolizidinalkaloiden. Proteine und Öl stellen wichtige Grundstoffe für die Tier- und Humanernährung dar. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß Lupinen seit Jahrtausenden vom Menschen genutzt werden, wenn auch die Alkaloide, die bitter schmecken und zusätzlich toxisch sind, zunächst ein Hindernis darstellten. Die frühen Bewohner der Mittelmeerländer, aber auch die Indios in Südamerika haben die Samen aufgeköchelt und anschließend mehrere Tage gewässert. Auf diese Weise konnte der Alkaloidgehalt reduziert und die Samen genießbar gemacht werden.

Eine andere Strategie wurde von den Pflanzenzüchtern zu Beginn dieses Jahrhunderts begonnen, indem man versuchte, das Merkmal „Alkaloide“ wegzuzüchten. Diese Strategie war weitgehend erfolgreich: heute gibt es alkaloidarme Varietäten von *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. mutabilis*, die im Gegensatz zu den „Bitterlupinen“ als „Süßlupinen“ bezeichnet werden. Samen der „Süßlupinen“ können direkt in der Tierernährung analog zur Sojabohne genutzt werden. Die oberirdischen Teile der Süßlupinen lassen sich als Grünfutter ebenfalls landwirtschaftlich nutzen.

Die Entwicklung der Süßlupinen hat jedoch ihren Preis, denn die Alkaloide stellen keine Abfallstoffe dar (wie man früher einmal glaubte), sondern dienen als chemische Schutzmittel hauptsächlich gegen Fraßfeinde (Insekten, Vertebraten), weniger gegen

Mikroorganismen und konkurrierende Pflanzen (Wink, 1992). Am Beispiel der Süßlupinen kann man die Funktion der Alkaloide auch gut belegen: Während die alkaloidreichen Wildformen weitgehend gegen Herbivore geschützt sind, werden die Süßlupinen, die zudem meist geringere Erträge zeitigen als die Bitterlupinen, von einer Vielzahl von Insekten und Vertebraten (z.B. Hasen und Kaninchen) befallen. Als Schutz muß man Zäune oder aber synthetische Pflanzenschutzmittel einsetzen, die bekanntermaßen eine Reihe von unerfreulichen Nebeneffekten haben. Aus ökologischer Sicht ist deshalb der Anbau der resistenten Bitterlupinen weitaus sinnvoller.

Um diese Bitterlupinen genauso nutzen zu können wie die Süßlupinen, wurde in den letzten 10 Jahren von der Firma Mittex Anlagenbau eine alternative Strategie verfolgt. Durch den Einsatz moderner Trennverfahren (wie sie in der Lebensmitteltechnologie üblich sind) werden die Samen der Bitterlupinen zum einen von den Alkaloiden befreit, zum anderen in ökonomisch wertvolle Produkte aufgetrennt, wie z.B. Proteine, Diätfasern und Öl. Die Restfraktion kann als Dünger und als pflanzenstärkendes Mittel genutzt werden. Aber auch die Alkaloide lassen sich nutzen, denn da sie insektizide und antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, kann man sie im Pflanzenschutz als biorationale Insektizide und Fungizide einsetzen (Wink, 1992, 1994). Nach Diversifizierung haben die Einzelprodukte eine wesentlich besseres marktwirtschaftliches Potential als die unverarbeiteten Süßlupinensamen.

Faßt man alle diese Eigenschaften der Lupine zusammen, so haben wir hier eine wahre „Vielzweck-Pflanze“ vor uns. Der Anbau der Lupinen, die Herstellung und Anwendung ihrer Produkte stellen spannende Herausforderungen an Landwirtschaft und Industrie dar. Obwohl die Lupinen seit Jahrzehnten zu den wichtigen Versuchspflanzen der Wissenschaft zählen, sind noch viele Aspekte ihrer Biologie, Ökologie, Physiologie, Biochemie und Molekularbiologie unbekannt.

Weltweit finden jetzt regelmäßig Konferenzen statt, auf den die neuesten Ergebnisse aus Anbau, Forschung und Verwertung vorgetragen und diskutiert werden. Neben den internationalen Tagungen der „International Lupin Association, ILA“ (zuletzt 1993 in Evora, Portugal) haben die Treffen der deutschsprachigen Lupinenexperten in Heidelberg schon eine gewisse Tradition: Die 1. Heidelberger Lupinentagung fand 1990 und die 2. Lupinentagung 1991 (Wink, 1992). Die 3. Heidelberger Lupinentagung wurde in den Räumen des Internationalen Wissenschaftsforum (IWF) der Universität Heidelberg vom 21.-23.11.1994 veranstaltet.

Um die 1994 gehaltenen Vorträge einem größeren Kreis von Interessierten zugänglich zu machen, haben wir uns entschlossen, die Proceedings zu publizieren.

Unterstützt wurde die Tagung dankenswerterweise durch Spenden u.a. der Firma Mittex, Saatzucht Dr. Hege, Saatzucht Steinach, Saatzucht Dr. Späht und Saatzuchtgesellschaft Streng's Erben. Frau I. Selg bin ich für organisatorische Hilfe, Herrn Dipl. Biol. F. Holzinger und Herrn Apotheker T. Schmeller für die Hilfe bei der Drucklegung der Proceedings zu Dank verpflichtet. Beim Internationalen Wissenschaftsforum der Universität Heidelberg (IWF) möchten wir uns für die freundliche Aufnahme und Gastfreundschaft bedanken.

Heidelberg, den 2. August 1995

Prof. Dr. M. Wink

2 Beziehungen zwischen ^{15}N -Translokation und ^{15}N -Verarbeitung in Weiß- und Gelblupinen

Wolfgang Merbach

Institut für Ökophysiologie der Primärproduktion
Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF), Müncheberg,
Eberswalder Str. 84
D-15374 Müncheberg

Zusammenfassung

In Gefäßversuchen wurde der N-Transport in Weiß- und Gelblupinen, aber auch Ackerbohnen, Erbsen und Sojabohnen zu verschiedenen Wachstumsstadien mit Hilfe von ^{15}N untersucht. Es zeigte sich, daß die im Verlauf der Ontogenese jeweils am stärksten wachsenden Pflanzenteile sich den zu ihrer Ernährung erforderlichen N bevorzugt vor anderen Organen aneignen können. Dabei war es gleichgültig, ob es sich um exogen verabreichten Mineral-N, symbiontisch fixierten N_2 oder bereits in der Pflanze befindlichen (zwischenlagerten) N handelte. Ein Vergleich der Verlagerung der proteinogenen Aminosäure L-Alanin und der nicht proteinogenen Aminosäure α -Aminobuttersäure sowie selektive Hemmung der Proteinsynthese in Hülsen bzw. Samen der Weißlupine mittels Antibiotika zeigte, daß die Aminosäuren- ^{15}N -Akkumulation in diesen Pflanzenorganen wahrscheinlich von den dort stattfindenden Synthesevorgängen (primär) weitgehend unabhängig ist. Sie scheint aber Aufnahmevorgänge einzuschließen, an denen möglicherweise Aminosäure-spezifische Trägerproteine beteiligt sein könnten.

Summary

Grain legumes absorbed mineral ^{15}N at every stage of development and transported it directly (just as symbiotically fixated $^{15}\text{N}_2$) into the plant parts growing at the respective stage. The ^{15}N accumulation in the grains after long-lasting ^{15}N supply can be ascribed, for the major part, to a secondary ^{15}N translocation after a temporary incorporation into older plant parts (leaves, stems). Inhibition experiments with antibiotics revealed no direct relation between the accumulation of amino acid ^{15}N in growing pods and seeds and the protein synthesis in this target organs. It may include, however, processes of (active?) uptake and transport with a possible contribution of carrier systems specific for distinct amino acids.

Key words:

Amino acids, antibiotics, carrier systems, grain legumes, *Lupinus albus* L., *Lupinus luteus* L., ^{15}N accumulation in seeds, ^{15}N translocation, N_2 -fixation, protein synthesis, source-sink relationships

2.1 Einleitung

Im Unterschied zum Einzeller wächst bei der höheren Pflanze nicht der gesamte Organismus, sondern es zeigen in der Regel nur bestimmte, meist die jüngeren Pflanzenteile Substanzzuwachs (Lit. bei MERBACH und SCHILLING 1980). Dies wurde u. a. für Weißen Senf (TROBISCH 1967), Zuckerrüben (SCHAU u. SCHUMANN 1975) bzw. Wintergerste (RÖMER 1971) nachgewiesen. Da Leguminosen bekanntlich hinsichtlich ihrer N-Ernährung eine Sonderstellung einnehmen, sollte zunächst geprüft werden, ob diese Fruchtarten das gleiche Wachstumsablauf-Muster wie andere einjährige Samenpflanzen besitzen.

2.2 Wachstumsverlauf bei Weißlupinen während der Ontogenese

Dies geschah am Beispiel der Weißlupine (*Lupinus albus*). Zur Untersuchung des zeitlichen Ganges der Trockensubstanz(TS)-Bildung werden die Pflanzen in üblicher Weise in Mitscherlichgefäßen mit Boden bei einer N-Gabe von 0,8 g N/Gefäß (als NH_4NO_3) herangezogen, zeitlich gestaffelt geerntet (15, 22, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 105, 120 d nach dem Auflaufen) und in einzelne Organfraktionen aufgetrennt (Einzelheiten vgl. MERBACH 1982a, 1984 sowie Ergebnistabellen).

Abbildung 1 zeigt am Beispiel der Weißlupine, daß zunächst sehr zögernd im vegetativen Stadium (bis zum 40. Lebenstag) und viel stärker im Blühstadium (40. bis 70. Tag) fast ausschließlich Blätter, Stengel und Wurzeln gebildet wurden. Erst im eigentlichen generativen Stadium (nach Ende der Blüte) erfolgte eine "Umschaltung" des Wachstums auf die Hülsen und (ab 80. d) auf die Samen, während die vegetativen Teile teilweise bereits wieder Substanzverluste erlitten.

Alle anderen geprüften Körnerleguminosen (Gelblupinen, Ackerbohnen, Erbsen, Sojabohnen) verhielten sich prinzipiell in gleicher Weise.

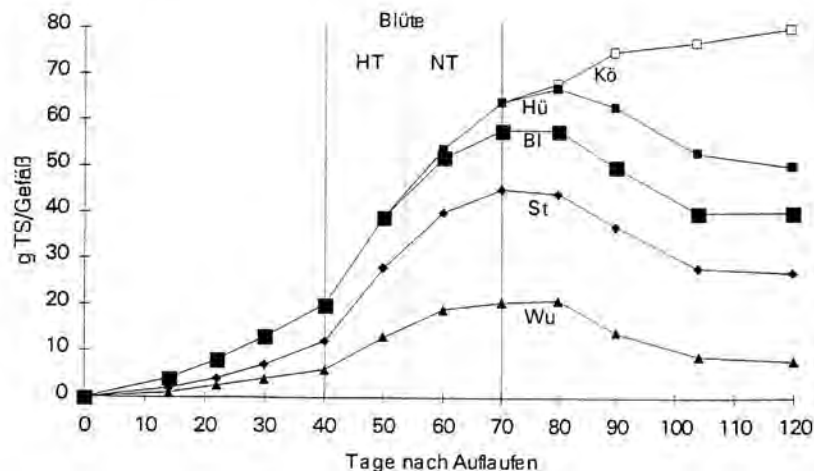


Abb. 1: Wachstumsverlauf bei Weißlupine (Kiewskij mutant) während der Ontogenese. Gefäßversuch mit Boden als Substrat (4,2 mg NH_4^+ - und NO_3^- -N/100 g Boden). Impfung mit *Rhizobium lupini*. Mittel aus 3 Wiederholungen. HT = Haupttriebe, NT = Nebentriebe, Wu = Wurzel, St = Stengel, BI = Blätter, Hü = Hülsen und Blüten, Kö = Körner

2.3 Gerichteter Stofftransport als Prinzip der pflanzlichen Stoffbildung

Da **Substanzzuwachs** stets das **Resultat der Synthese organischer C- und N-Verbindungen** darstellt, müssen die jeweils wachsenden Teile (**sinks**) ausreichend mit Baustoffen (also vornehmlich C und N) versorgt werden. Dies geschieht in der Regel durch Transport aus anderen, als Spender fungierenden Pflanzenorganen (**sources**). Eine gezielte Untersuchung der Beziehungen zwischen Empfänger- und Spenderorganen wurde erst nach der **Einführung der Isotopenmarkierungstechnik** möglich, als mit Hilfe von **Radionukliden** oder **stabilen Isotopen** der innerpflanzliche Stofftransport und -umsatz quantitativ verfolgt werden konnte. Dabei stellte sich im Laufe der Jahre heraus, daß der **gerichtete Baustofftransfer** in die **Synthesezentren** als ein beherrschendes **Prinzip der pflanzlichen Stoffakkumulation**, vor allem in den (oftmals wirtschaftlich genutzten) Speicherorganen (Samen, Wurzeln) gelten kann. Dies wurde für Phosphor und Kalium bei Getreide (FAUST 1959), für ^{32}P bei Hopfen (RÖMER u. DOLZMANN 1968), für ^{14}C bei Gerste, bei Weißem

Senf (RÖMER 1971) und bei Zuckerrüben (SCHAU u. SCHUMANN 1975) gezeigt. Nach der Entwicklung der **emissionsspektrometrischen ^{15}N -Bestimmung** zu einem leistungsfähigen Analysenverfahren durch FAUST (Lit. bei FAUST 1960, 1965a, 1981) konnte die Gültigkeit dieses Prinzips auch für den **Stickstoff** nachgewiesen werden (Weizen, Gerste: MICHAEL et al. 1960, FAUST 1965b, Weißer Senf: TROBISCH 1967).

2.4 ^{15}N -Verteilung in Weiß- und Gelblupinen

Da Leguminosen mit ihrer symbiotischen Luftstickstoffbindung eine zur Mineral-N-Ernährung alternative Art der N-Versorgung besitzen, erschien es interessant, die N-Transportmuster in diesen Pflanzenarten zu untersuchen.

2.4.1 Aufnahme und Verteilung von exogen verabreichten Mineral- ^{15}N

Zu diesem Zweck bekamen in Gefäßversuchen kultivierte Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und für verschieden lange Zeit Mineral- ^{15}N (über das Substrat) verabreicht. Nach Beendigung des jeweiligen Experimentes erfolgte die Ermittlung der ^{15}N -Mengenverteilung in einzelnen Organanteilen im Vergleich zu deren TS-Ertrag bzw. TS-Ertragszuwachs. Letzterer ergab sich aus der Differenz der Haupternte zu Versuchsende und einer Variante zu Beginn des Experimentes. Weitere Einzelheiten gehen aus den Tabellen 1 und 2 hervor. Zur Ernte erfolgte hier -wie in allen später beschriebenen Versuchen- eine Zerlegung der Pflanzen in untere Blätter (1. bis 11. Blatt, bei Erbsen und z.T. Weißlupinen 1. bis 7. Blatt), untere Stengel (die den betreffenden Blättern entsprechenden Stengelabschnitte), obere Blätter, obere Stengel, Wurzeln (Auswaschung des Substrates mit H_2O) und (soweit vorhanden) Hülsen, Blüten und Samen. Das Pflanzenmaterial wurde nach Abtötung mit flüssigem N_2 lyophilisiert, gewogen (TS-Ermittlung) und staubfein (0,2 mm Durchmesser) vermahlen. Die N-Bestimmung in den Pflanzenproben erfolgte nach Kjeldahl in Anlehnung an FAUST (1959) mit Hilfe von Ferrum reductum und Selenreaktionsgemisch, die ^{15}N -Analyse emissionsspektrometrisch (FAUST et al. 1981).

Tabelle 1 zeigt zunächst -wiederum am Beispiel der Weißlupine- die ^{15}N -Verteilung auf die einzelnen Organfraktionen nach **kurzfristigem Mineral- ^{15}N -Angebot (5d)** zu **zwei verschiedenen Entwicklungsstadien**. Zur späten vegetativen Phase (linke Tabellenseite) hatten die oberen Blätter den stärksten TS-Zuwachs, gefolgt von den oberen Stengeln und den Wurzeln.

Gegen Blühende (rechte Seite der Tabelle 1) waren dann Hülsen und Körner die Orte des stärksten Wachstums. Die jeweils rechten Spalten weisen aus, daß die Weißlupinen den aufgenommenen ^{15}N (9 bzw. 19% des Angebots) gerichtet in die jeweiligen Wachstumszentren transportiert hatten (vegetatives Stadium 47% in oberen Blättern, Blühende: 42% in Hülsen und Samen).

Tabelle 1: TS-Zuwachs und ^{15}N -Verteilung bei Weißlupinen ("Kiewskij mutant") 5 d nach Verabreichung von 0,3 g N als $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (95 at-% ^{15}N exc.).

Gefäßversuch mit Quarzsand als Substrat. Impfung mit *Rhizobium lupini*. Angaben pro Gefäß (Mittel aus 4 Wdhg.).

Organfraktion	Entwicklungsstadium			
	kurz vor Blühbeginn (14-16 Blätter)		kurz vor Blühende der Nebentriebe	
	TS-Zuwachs mg * (5d)-1	^{15}N -Menge mg	TS-Zuwachs mg * (5d)-1	^{15}N -Menge mg
Hülsen und Körner	-	-	4658 (48,2)	23,0 (42,4)
obere Blätter ¹⁾	1749 (50,3)	12,4 (47,0)	2317 ³⁾ (24,0)	11,4 (21,0)
untere Blätter ¹⁾	35 (1,0)	1,1 (4,2)	28 (0,3)	2,2 (4,1)
obere Stengel	865 (24,8)	6,0 (22,7)	1448 ³⁾ (15,0)	6,5 (12,0)
untere Stengel ¹⁾	84 (2,4)	1,1 (4,2)	34 (0,4)	3,3 (6,0)
Wurzeln	748 (21,5)	5,8 (21,9)	1169 (12,1)	7,9 (14,5)
Gesamtpflanze	3481 (100,0)	26,4 (100,0)	9654 (100,0)	54,3 (100,0)
Aufgenommener ^{15}N in % zum ^{15}N -Angebot ²⁾	-	9,3	-	19,1

1) 1. bis 7. Blatt bzw. zugehörige Stengelteile (von unten gezählt)

2) ^{15}N -Angebot 0,3 g N mit 95 at-% ^{15}N exc. 285 mg ^{15}N

3) Darin ist der Zuwachs der zu dieser Zeit noch stark wachsenden Blätter und Stengel der Nebentriebe enthalten.

Die ^{15}N -Verteilung in verschiedenen Körnerleguminosen zur Reifezeit nach einer Mineral- ^{15}N -Gabe zur Blüte weist Tabelle 2 aus. Daraus läßt sich erkennen, daß die Pflanzen den angebotenen ^{15}N zu etwa 50 bis 75% aufgenommen und davon 63 bis 93% in die (zwischen Blühende und Reife am stärksten wachsenden) Samen (vgl. Abb.1 und jeweils linke Spalten der Tabelle 2) eingelagert hatten.

Tabelle 2: ^{15}N -Verteilung in einzelnen Organfraktionen verschiedener Körnerleguminosen nach einer ^{15}N -Gabe zur Zeit der Blüte.

Gefäßversuch mit Quarzsand (Erbse, Ackerbohne) bzw. Boden (Weiß- und Gelblupine, Sojabohne) als Substrat¹⁾. Impfung mit *Rhizobium leguminosarum* (Erbse, Ackerbohne), *Rhizobium lupini* (Weiß- und Gelblupine) bzw. *Rhizobium japonicum* (Sojabohne). ^{15}N -Gabe zur Blüte²⁾, Ernte zur Reife, Mittel aus 4 Wdhg. Angaben in mg ^{15}N /Gefäß.

Organfraktion	Weißlupine ("Kiewskij mutant")	Gelblupine ("Gülzower Süße Gelbe")	Sojabohne ("Fiskeby V")	Erbse ("Auralia")	Ackerbohne ("Fribo")
	abs. rel.	abs. rel.	abs. rel.	abs. rel.	abs. rel.
Samen	38,4 (77,9)	21,3 (62,5)	47,7 (93,2)	24,9 (64,3)	30,1 (74,5)
Hülsen	2,9 (5,9)	2,0 (5,9)	1,5 (2,9)	2,9 (7,5)	1,9 (4,8)
obere Blätter	2,8 (5,8)	2,5 (7,3)	0,8 (1,6)	1,0 (2,6)	3,2 (7,9)
untere Blätter ²⁾	0,6 (1,2)	1,7 (5,0)	0,6 (1,1)	2,2 (5,7)	0,6 (1,5)
obere Stengel	1,7 (3,4)	1,8 (5,3)	0,1 (0,2)	0,9 (2,3)	1,1 (2,7)
untere Stengel ²⁾	1,4 (2,8)	3,9 (11,4)	0,2 (0,4)	5,8 (15,0)	1,1 (2,7)
Wurzeln	1,5 (3,0)	0,9 (2,6)	0,3 (0,6)	1,0 (2,6)	2,4 (5,9)
Gesamtpflanze	49,3 (100)	34,1 (100)	51,2 (100)	38,7 (100)	40,4 (100)
Aufgenommener ^{15}N in % des ^{15}N -Angebotes ³⁾	74,7	51,7	48,9	58,6	61,2

1) NO_3^- -u. NH_4^+ - Gehalte der verwendeten Versuchsböden (mg N/100g): Weißlupine 9,4; Gelblupine 0,45; Sojabohne 3,2. 2) Bei Weiß- u. Gelblupinen, Sojabohnen u. Ackerbohnen 1.-11. Blatt, bei Erbse 1.-7. Blatt sowie entsprechende Stengelabschnitte. 3) Bei Sojabohnen 0,8 g N mit 13,1 at-% ^{15}N exc. 104,8 mg ^{15}N , bei allen anderen Leguminosen 0,6 g N mit 11 at-% ^{15}N exc. 66 mg ^{15}N .

Diese Befunde machen deutlich, daß auch bei Körnerleguminosen von außen applizierter Mineral-N unabhängig vom Entwicklungsstadium gerichtet in die jeweils am stärksten wachsenden Organteile transportiert wird.

2.4.2 Verteilung von symbiotisch fixierten N₂ in Leguminosen

Es war nun zu prüfen, ob symbiotisch fixierter Luftstickstoff sich in der Leguminosenpflanze genau so verhält. Dazu wurden Gelblupinenpflanzen im späten vegetativen Stadium in sog. Doppelkompartimentgefäßen (vgl. MERBACH 1992) über den Wurzelraum mehrere Tage lang mit ¹⁵N₂-Gas versorgt, das aus (¹⁵NH₄)₂SO₄ hergestellt worden war (OHYAMA u. KUMAZAWA 1981). Nach der Ernte zur Reife erfolgte die analytische Aufarbeitung wie unter Punkt 3.1. beschrieben.

Das Ergebnis läßt sich aus Tabelle 3 entnehmen. Es besagt, daß der symbiotisch fixierte Luftstickstoff dem gleichen Translokationsmuster wie der Mineral-N gehorcht; er wird ebenfalls in die am stärksten wachsenden Organe (hier die Samen) verlagert.

Tabelle 3: ¹⁵N-Verteilung in einzelnen Organfraktionen der Gelblupine nach ¹⁵N₂-Begasung des Wurzelraumes.

¹⁵N₂-Applikation im 14-16 Blatt-Stadium, Ernte zur Reife (Gefäßversuch mit Quarzsand als Substrat, Impfung mit *Rhizobium lupinum*, ohne Mineral-N, Entwicklung des ¹⁵N₂ aus (¹⁵NH₄)₂SO₄ [95 at-% ¹⁵N exc.], Mittel aus 4 Wdhg.).

Organfraktionen	TS-Ertrag g/Gefäß	mg ¹⁵ N/Gefäß
Samen	46,3 (62,4)	9,36 (74,3)
Hülsen	5,3 (7,1)	0,91 (7,2)
obere Blätter	6,1 (8,2)	0,95 (7,5)
untere Blätter	2,6 (3,5)	0,34 (2,7)
obere Stengel	6,9 (9,3)	0,38 (3,0)
untere Stengel	3,4 (4,6)	0,20 (1,6)
Wurzeln	3,6 (4,9)	0,46 (3,7)
Gesamtpflanze	74,2 (100)	18,6 (100)

2.4.3 ¹⁵N-Sekundärverlagerung in Leguminosenpflanzen

Schließlich blieb noch zu untersuchen, ob der (zu Vegetationsbeginn) in die zuerst gebildeten Blätter eingebaute und später bei der Alterung möglicherweise wieder ausgelagerte N ebenfalls einem gerichteten Transport in die Synthesezentren unterliegt. Zu diesem Zweck bekamen die Pflanzen 0,8 g N/Gefäß als ¹⁵NH₄¹⁵NO₃ (10 at-% ¹⁵N exc.) zur Saat verabreicht. Dabei sollten Ernten zur Blüte und Reife eine Einschätzung des N-Aufnahme- und Transportverhaltens nach der Blüte ermöglichen.

Tabelle 4 zeigt am Beispiel der Weißlupine (letzte Spalte), daß die Pflanzen bis zur Blüte bereits 71% der Gesamtaufnahme (48,45 von 68,28 mg ¹⁵N) realisiert hatten. Davon wurden bis zur Reife (Tabelle 4, Zeile 3) mindestens 39,38 mg ¹⁵N (= 81%) aus den vegetativen Teilen in die zu dieser Zeit stark wachsenden Samen verlagert. Die sekundäre N-Umlagerung folgt also dem gleichen Prinzip wie der mineralisch bzw. symbiotisch gebundene N, nämlich gerichtet in die Attraktionszentren der Pflanzen.

2.4.4 Zwischenfazit

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die im Verlauf der Ontogenese jeweils am stärksten wachsenden Pflanzenteile der betrachteten Körnerleguminosen -ähnlich wie für Nichtleguminosen beschrieben (vgl. SCHILLING 1971; MERBACH u. SCHILLING 1980) - sich den zu ihrer Ernährung erforderlichen N bevorzugt vor anderen Organen aneignen können. Dabei ist es offensichtlich gleichgültig, ob es sich um exogen verabreichten Mineral-N, symbiotisch fixierten N oder bereits in der Pflanze eingebauten N handelt. Wie weitere, hier nicht besprochene Versuche zeigten, gilt dies auch für andere Nährelemente (z.B. ¹⁴C, ³⁵S) sowie für den Einbau des ¹⁵N in die Sameneiweiße (MERBACH 1985) und unabhängig von der verabreichten N-Form (NO₃⁻, NH₄⁺, vgl. MERBACH 1994).

Die Attraktion für Nährstoffe durch stark wachsende Organe stellt daher auch bei Körnerleguminosen ein allgemeingültiges Prinzip dar, dem nicht nur der Stickstoff, sondern auch andere Baustoffe gehorchen.

Tabelle 4: ^{15}N -Umsatz in Weißlupine ("Kiewskij mutant") nach einer ^{15}N -Düngung zur Saat (0,8g N als $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 10 at-% ^{15}N exc.) Gefäßversuch mit Boden als Substrat (5,56 mg NH_4^+ - u. NO_3^- -N/100g Boden), Ernte zur Blüte und zur Reife. Mittel aus 4 Wdhg.

Pflanzenart	Meßzeitpunkt	^{15}N -Mengenverteilung (mg ^{15}N /Gefäß)				Gesamtpflanze
		Samen	Hülsen und Blüten	sonstige oberirdische Teile	Wurzeln	
Weißlupine	a) Bis zur Blüte aufgenommen	-	5,33 (11,0)	40,21 (83,0)	2,91 (6,0)	48,45 (100)
	b) Nach der Blüte aufgenommen	19,83	-	-	-	19,83
	c) Nach der Blüte umgelagert	+ 39,38 ¹⁾	- 2,84 ²⁾	- 36,39 ²⁾	- 0,15 ²⁾	-
	d) Zur Reife	59,21 (86,7)	2,49 (3,6)	3,82 (5,6)	2,76 (4,1)	68,28 ³⁾ (100)

¹⁾ Eingelagert

²⁾ Ausgelagert

³⁾ Entspricht 85,4% des ^{15}N -Angebotes

2.5 Beziehungen zwischen N-Akkumulation und N-Verarbeitung durch wachsende Organe von Weißlupinen

Fragt man nach den Ursachen dieses gerichteten Baustofftransportes, so wären dafür zwei Möglichkeiten denkbar:

- Das Attraktionsvermögen ist unmittelbare Folge der Proteinsynthese am Zielort.
- Beide Vorgänge existieren relativ unabhängig voneinander (vgl. SCHILLING 1971).

Um herauszufinden, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden an Weißlupinen im generativen Stadium die Beziehungen zwischen Proteinsynthese in Hülsen und Körnern und dem Transport von (auf die unteren Blätter aufgebracht) ^{15}N -markierten Aminosäuren (AS) zu diesem Zielort untersucht. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Vergleich der Verlagerung der proteinogenen AS L-Alanin (Ala) und der nicht proteinogenen AS - Aminobuttersäure (AIB) (vgl. SCHILLING 1971) und ihres Einbaus in die Eiweiße am Zielort. Ein AIB-Transport trotz fehlender Inkorporierung in das Protein würde auf die Unabhängigkeit beider Vorgänge hindeuten.
2. Untersuchungen des Transportverhaltens beider AS, wenn die Proteinsynthese am Zielort gehemmt wird. Dies sollte erreicht werden durch:
 - a) Verdunklung der Hülsen, die bei *Sinapis alba* L. die Proteinsynthese der Fruchtstände unterbunden hatte (TROBISCH 1967).
 - b) Verabreichung von D-threo-Chloramphenikol (CAP), einem Inhibitor der Proteinsynthese an den 70 S-Ribosomen der Chloroplasten und Mitochondrien (z.B. PARTHIER et al. 1964).
 - c) Applikation von Cycloheximid (CHM), das die Eiweißsynthese an den 80 S-Ribosomen des Cytoplasmas hemmt (z.B. FLOCH u. PENOT 1978).

Ein weiterlaufender AS-Transport in die Hülsen und Samen trotz dort gehemmter Eiweißbildung (= mangelnder AS- ^{15}N -Einbau in das Protein) würde auf die Unabhängigkeit der Attraktionswirkung von der Verarbeitung schließen lassen. Eine selektive Hemmung der Verlagerung nur einer der beiden AS durch die Antibiotika wäre ein Hinweis auf spezifische Attraktionsmechanismen für bestimmte AS, die z.B. Träger- oder Membranstruktureiweiße einschließen könnten (vgl. z.B. CAVALIERI u. HUANG 1980, McLAREN u. BARBER 1977).

Die praktische Versuchsdurchführung gestaltete sich wie folgt: Die in Mitscherlichgefäßen herangezogenen Weißlupinen blieben bis zu 3 Wochen nach Blühende stehen. Zu dieser Zeit hatten die Hülsen eine Länge von 4 cm. Alle Nebentriebe wurden vor Versuchsbeginn entfernt,

um an den Pflanzen nur ein Hauptwachstumszentrum (Hülsen und Samen des Haupttriebes) zu belassen.

Die Versuchsdauer betrug 10 d. Die Behandlungsvarianten sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Zu Behandlungsbeginn erfolgte eine Vorernte, um einen Bezugspunkt für Ermittlung des TS- und N-Mengenzuwachses während der Versuchszeit zu besitzen. Die Hülsenverdunklung geschah durch Überstülpen lichtundurchlässiger Papierhauben. Die Applikation von CAP und CHM erfolgte durch wiederholte Injektion (über 10 d bis Versuchsende) von insgesamt 200 µl 10⁻³ M wäßriger Lösung in jede Hülse (Kontrollpflanzen H₂O). 5 d nach Beginn der Antibiotikabehandlung begann die Ala- bzw. AIB-Applikation (2%ige wäßrige Lösung, 95,3 at-% ¹⁵N exc.) auf die drei untersten, noch an den Pflanzen befindlichen Blätter mittels feuchtgehaltener Wattebäusche. Sie dauerte 5 d. Nach der Ernte und Fraktionierung der Pflanzen würden die TS sowie (nach vorheriger Eiweißfällung) die N- und ¹⁵N-Mengen in allen Organenfraktionen bestimmt (Methodik vgl. weiter oben).

Die Resultate sind in Tabelle 5 aufgeführt. Betrachtet man zunächst die Kontrollpflanzen (Zeile 1), so erkennt man, daß Hülsen und Samen als Hauptwachstumszentren fungierten, denn auf sie entfielen 71% der während der Versuchszeit (10 d) ermitteltem TS-Zuwachses (Zeile 1b) der Gesamtpflanzen.

Es zeigt sich ferner, daß der ¹⁵N aus Ala und AIB in gleichem Ausmaß dem gerichteten Transport in das Wachstumszentrum der Hülsen unterlag (74 bzw. 77% des Gesamt-¹⁵N erschienen dort, vgl. Zeile 1e), obwohl der AIB-¹⁵N im Gegensatz zu Ala-¹⁵N praktisch nicht in das Eiweiß eingebaut wurde (Zeile 1d). Dies befindet sich in Übereinstimmung mit früheren Befunden an *Sinapis alba* L. (SCHILLING 1971) und läßt auf einen von der N-Verarbeitung unabhängigen Attraktionsmechanismus schließen. Die Verdunklungsvariante veränderte weder die Eiweißsynthese in den Hülsen noch den AS-¹⁵N-Transport dorthin (Zeile 2).

Die Antibiotikabehandlungen (Zeilen 3 und 4 in Tabelle 5) hingegen zogen starke Beeinträchtigungen des TS-Zuwachses (Zeilen 3a und 4b) sowie der Eiweißsynthese (hier nicht dargestellt, vgl. MERBACH 1982) nach sich, wobei diese Hemmwirkungen auf die Hülsen und Körner beschränkt blieb, wie z.B. der sinkende Anteil des TS-Zuwachses an der Gesamt-TS-Zunahme (Zeilen 3b und 4b) ausweist (vgl. MERBACH 1982).

CAP vermochte trotz einer Hemmung des Ala-¹⁵N-Einbaus in das Protein (Zeile 3d) die Akkumulation in den Hülsen nicht zu hemmen (Zeile 3c), was auf eine von der Verarbeitung am Zielort primär unabhängige Alaninattraktion hinweist. Dagegen wurde der AIB-¹⁵N-Transport in die Hülsen fast unterbunden (Zeilen 3c und 3d). Danach könnte ein spezifischer Attraktionsmechanismus für AIB existieren (vgl. SCHILLING 1971), der einen aktiven

Membrandurchtritt unter Beteiligung eines (in seiner Synthese durch CAP selektiv hemmbaren) Trägerproteins einschließen könnte (vgl. CAVALIERI u. HUANG 1980).

CHM verursachte i. Vgl. zu CAP in den Hülsen eine weitere drastische Hemmung der TS-Bildung (Zeilen 4a,b) und Eiweißsynthese (hier nicht dargestellt). Die Akkumulation beider AS in den Hülsen war stark gehemmt (Zeile 4c). Danach scheint also die cytoplasmatische Eiweißsynthese entscheidend für den Aufnahmemechanismus der beiden untersuchten AS zu sein.

Tabelle 5: Einfluß von Verdunklung und Stoffwechsellinhibitoren auf die ¹⁵N-Akkumulation von Hülsen und Samen der Weißlupine nach Applikation von ¹⁵N-Alanin bzw. ¹⁵N-Aminobuttersäure (95,3 at-% ¹⁵N exc.) auf das 3. bis 6. Blatt.

(Gefäßversuch mit Boden, Behandlungsbeginn 3 Wochen nach Blühende der Haupttriebe (Hülsenlänge 4 cm, Nebentriebe entfernt, 5 d Vorbehandlung mit Inhibitoren, 200µl 10⁻³ M Lösungen in die Hülsen, danach 5 d AS-Applikation mittels Wattebausch (2%ige Lösungen bei lfd. Befruchtung), danach Ernte).

Behandlung	TS-Zuwachs				¹⁵ N-Einbau					
	absolut g*(10d) ⁻¹		rel. zu TS-Zuwachs d. Gesamtpflanze %		absolut mg ¹⁵ N		davon im Eiweiß %		% zur ¹⁵ N-Menge in der Gesamtpflanze	
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)					
	Ala	AIB	Ala	AIB	Ala	AIB	Ala	AIB	Ala	AIB
1 Kontrolle (H ₂ O)	10,88	10,74	71	71	7570	7363	51	4 ^{xx}	77	74
2 Dunkel (H ₂ O)	9,91	9,98	67	68	7416	7503	44	5 ^{xx}	75	76
3 Chloramphenikol	5,36	5,29	39	38	7573	1170 ^{xx}	21	6 ^{xx}	78	12 ^{xx}
4 Cycloheximid	2,12	2,16	20	20	646	577	19	4 ^{xx}	9	8
GD _{0,05} TUK EY	2,45	2,73	19,5	17,3	1364	1590	15,3	9,6	17,1	16,1

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die **AS-Akkumulation in wachsenden Hülsen und Samen** der Weißlupine wahrscheinlich von den dort stattfindenden **Synthesevorgängen primär weitgehend unabhängig** ist. Sie scheint aber **Aufnahmeprozesse** einzuschließen, an denen möglicherweise **AS-spezifische Trägereiweiße** beteiligt sein könnten. Zur Aufklärung der dabei wirkenden Mechanismen wäre u.a. beispielsweise die spezifische Beeinflußbarkeit von Membranen zu untersuchen.

2.6 Literaturverzeichnis

- CAVALIERI, A.J.; HUANG, A.H.C.: Carrier protein-mediated transport of neutral amino acids into mung bean mitochondria. *Plant Physiol.* **66**, 588-591 (1980)
- FAUST, H.: Untersuchungen über die Mineralstoffabgabe einjähriger Pflanzen. Diss. Landw. Fak. Univ. Jena 1959
- FAUST, H.: Zur spektroskopischen ^{15}N -Bestimmung unter Anwendung eines Stufenfilters. *Z. analyt. Chemie* **175**, 9-18 (1960)
- FAUST, H.: Zur Probenchemie von Stickstoffverbindungen für die emissionsspektrometrische Isotopenanalyse des Stickstoffs. *Isotopenpraxis* **1**, 62-65 (1965a)
- FAUST, H.: Untersuchungen über Verteilung und Umsatz spät gedüngten Stickstoffs bei *Triticum aestivum* L. und *Hordeum vulgare* L. *Habil.-Schrift Landw. Fak. Univ. Jena* (1965b)
- FAUST, H.; BORNHACK, H.; HIRSCHBERG, K.; JUNG, K.; JUNGHANS, P.; KRUMBIEGEL, P.: ^{15}N -Anwendung in der Biochemie, Landwirtschaft und Medizin. - Eine Einführung. Schriftenreihe Anwendung v. Isotopen u. Kernstrahlungen in Wiss. u. Technik. Berlin, Nr. 5 (1981)
- FLOCH, I.-Y.; PENOT, M.: Influence de la cycloheximide sur le transport a longue distance du ^{32}P chez *Laminaria digitata* (Linné) Lamouroux. *Bot. Mar.* **21**, 5-11 (1978)
- MC LAREN, J.S.; BARBER, D.J.: Evidence for carrier - mediated transport of L-leucine into isolated pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* **136**, 147-151 (1977)
- MERBACH, W.: Untersuchungen über Stickstoffumsatz und symbiotische N_2 -Fixierung bei Körnerleguminosen Diss. (B) Sektion Pflanzenproduktion, Univ. Halle-Wittenberg 1982
- MERBACH, W.: N-Umsatz und symbiotische N_2 -Fixierung bei Körnerleguminosen. *Collqu. Pflanzenphysiologie HU Berlin* **7**, 311-323 (1984)

- MERBACH, W.: Carbon balance in the system plant-soil, in: L. KUTSCHERA, E. HÜBL, E. LICHTENEGGER, H. PERSSON, M. SOBOTIK (eds): *Root ecology and its practical application*, Verein für Wurzelforschung Klagenfurt 1992, pp. 299-301
- MERBACH, W.: Distribution of externally applied $^{15}\text{NH}_4^+$ or $^{15}\text{NO}_3^-$ in white lupins at different development stages. *Isotopenpraxis* **30**, 173-178 (1994)
- MERBACH, W.: Ablauf der Sameneiweißbildung bei Weißlupinen und seine Beeinflußbarkeit durch Mineral-N-Gaben. *Arch. Acker- und Pflanzenbau, Bodenk.* **29**, 687-694 (1985)
- MERBACH, W.; SCHILLING, G.: Beziehungen zwischen C- und N-Stoffwechsel bei höheren Pflanzen. *Colloq. Pflanzenphysiologie HU Berlin* **3**, 134-150 (1980)
- MICHAEL, G.; FAUST, H.; BLUME, B.: Die Verteilung von spät gedüngtem ^{15}N in die reifende Gerstenpflanze unter der besonderen Berücksichtigung der Korneiweiße. *Z.Pflanzenernährung, Dgg., Bodenk.* **91**, 158-169 (1960)
- OHYAMA, F.; KUMAZAWA, K.: A simple method for the preparation, purification and storage of $^{15}\text{N}_2$ -gas for biological nitrogen fixation studies. *Soil Sci. Plant Nutr.* **27** (2), 263-265 (1981)
- PARTHIER, B.; MALAVIYA, B.; MOTHES, K.: Effects of chloramphenicol and kinetin on uptake and incorporation of amino acids by tobacco leaf discs. *Plant Cell Physiol.* **5**, 401-410 (1964)
- RÖMER, W.: Untersuchungen über die Auslastung des Photosyntheseapparates bei Gerste und Weißem Senf in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen. *Arch. Bodenfruchtbarkeit, Pflanzenprod.* **15**, 415-423 (1971)
- RÖMER, W.; DOLZMANN, H.: Untersuchungen über die gerichtete P-Verlagerung und den P-Umsatz bei Hopfen (*Humulus lupulus*, L.) mit Hilfe markierter Substanzen. *Thaer-Archiv* **12**, 479-486 (1968)
- SCHALLDACH, I.: Untersuchungen über Stickstoffumsatz und -verwertung bei Leguminosen, durchgeführt mit ^{15}N -markierten Verbindungen bei *Pisum sativum* L. *Diss. Landw. Fak. Univ. Jena* 1965
- SCHAU, R.; SCHUMANN, F.: Untersuchungen über die Regulation der Assimilatbildung und des Assimilattransportes bei Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L., *spp. altissima*) *Diss. (A) Sektion Pflanzenproduktion, Univ. Halle-Wittenberg* 1975
- SCHILLING, G.: Untersuchungen über die Ertragsbildung bei einjährigen Samenpflanzen. *Mitt. Dt. Akademie Naturforscher Leopoldina, Reihe* **3**, **17**, 99-114 (1971)

TROBISCH, S.: Untersuchungen über die physiologischen Grundlagen der Samenertragsbildung bei einjährigen Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von *Sinapis alba* L. Habil.-Schrift Landw. Fak., Univ. Jena 1967

3 Nitratauswaschung nach dem Anbau von Weißen Lupinen (*Lupinus albus* L.)

Christoph Hartmann

GeoTeam

Matrosengasse 10

D- 95448 Bayreuth

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der Nitratbelastung des Grundwassers werden Körnerleguminosen als Problemfrüchte angesehen, da sie hohe Stickstoffmengen in den Ernterückständen hinterlassen. Dadurch liegt der Nitratgehalt des Bodens zum Beginn des Winterhalbjahres deutlich höher als nach den meisten anderen Kulturen (63-140 kg N/ha). Die bisher nach dem Anbau von Weißen Lupinen gemessenen Nitratgehalte sind mit 10-81 kg N/ha in 0-90 cm Bodentiefe vergleichsweise gering. Die für Ackerbohnen und Körnererbsen vorliegenden Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß durch unverzüglichen Nachbau von Winter-/Zwischenfrüchten mit hohem Stickstoffaufnahmevermögen (Raps, Senf, Ölrettich) ein grundwasserverträglicher Anbau dieser Kulturen möglich ist. In Zukunft sollte mehr Wert auf frühreife Genotypen mit hohem Stickstoff-Ernteindex gelegt werden.

Summary

Grain legumes are regarded to be responsible for nitrate leaching into ground water, because they leave high amounts of nitrogen in crop residues. At the beginning of winter period the nitrate content of soil is therefore much higher than after growing most other crops (63-140 kg N/ha). Nitrate content in 0-90 cm soil depth measured after the cultivation of white lupin ranged from 10 to 81 kg N/ha. Investigations with faba beans and grain peas showed, that cultivation of these crops is compatible with ground water protection, if catch crops or winter crops with high ability for nitrogen uptake follow immediately (*Brassica napus*, *Sinapis alba*, *Raphanus sativus*). In future, attention should be addressed on selection and cultivation of early maturing lupin varieties a high harvest index for nitrogen.

Key words

White lupin, N fixation, N balance, nitrate leaching, ground water

3.1 Einleitung

Infolge der Probleme, die durch die Agrarpolitik der Europäischen Union für die Landwirtschaft entstanden sind, wird inzwischen neuen oder in Vergessenheit geratenen Kulturpflanzen wieder mehr Beachtung geschenkt. Insbesondere die Weiße Lupine fristet hierzulande ein Schattendasein, das in krassem Widerspruch zu ihrem Ertrags- und Verwertungspotential steht. So hat sich die 1992 gegründete Gesellschaft zur Förderung der Lupine (GFL) zum Ziel gesetzt, die Züchtung, den Anbau und die Verwertung von und die Forschung über Lupinen und ihre Inhaltsstoffe zu fördern.

Im Zusammenhang mit der steigenden Nitratbelastung des Grundwassers werden seit einigen Jahren jedoch auch Körnerleguminosen als Problemfrüchte gehandelt, da sie hohe Stickstoffmengen in den Ernterückständen hinterlassen. Es liegt nahe, daß dieses negative Image der Ausweitung des Lupinenanbaus nicht förderlich wäre. Daher war es notwendig, das vorhandene Datenmaterial in der Literatur zu sichten, um entsprechende Anbauempfehlungen sowie den zukünftigen Forschungsbedarf formulieren zu können.

3.2 Material & Methoden

Neben einer Literaturlauswertung wurde 1993 unter den Mitgliedern der GFL eine Fragebogenaktion durchgeführt, bei der neben Angaben zu den Anbau- und Standortverhältnissen auch um die Bestimmung des Restnitratgehaltes in 0-90 cm Bodentiefe gebeten wurde. Die Methodik der Nitrat-Bodenuntersuchung ist nachfolgend in verkürzter Form beschrieben (in Anlehnung an VDLUFA 1991):

3.2.1 Probenahme

Termin: - leichte Böden vom 15.10. bis 15.11.
- schwere Böden vom 01.11. bis 15.12.

Durchführung: je nach Schlaggröße werden 10-16 Einschlüge bis 90 cm Bodentiefe mittels eines konischen PÜRKHAUER-Bohrstocks oder des GÖTTINGER Bohrstocksatzes vorgenommen und in drei Mischproben (0-30 cm, 30-60 cm und 60-90 cm) unterteilt. Dabei ist die Verschleppung humushaltigen Bodenmaterials in tiefere Bodenschichten zu vermeiden. Im Gelände ist der Skelettgehalt der drei Bodenschichten (Gehalt an Steinen > 2 mm in %) abzuschätzen sowie Besonderheiten des Bodenprofils (z.B. Schichtwechsel) festzuhalten.

Lagerung: Die Bodenproben sind in einer Kühltasche zu transportieren. Sie dürfen im Labor maximal 24 h im Kühlschrank gelagert werden. Darüber hinaus ist die Tiefkühlung der Proben zulässig.

3.2.2 Aufbereitung und Extraktion

Reagenzien: Extraktionslösung (0,0125 M CaCl_2): 1,838 g Calciumchlorid in aqua dest. zu 1 l lösen. Schwefelsäure (10%-ig): Zu ca. 500 ml aqua dest. langsam und unter Rühren 100 ml konz. Schwefelsäure geben und nach Abkühlung mit aqua dest. auf 1 l auffüllen. Kupfersulfatlösung (2,5%-ig): 25 g Kupfer(II)sulfat-5-hydrat in aqua dest. zu 1 l lösen. Zinkgranalien, verkupfert: 250 g Zink in einem 1 l Becherglas mit 150 ml aqua dest. und 15 ml Schwefelsäure versetzen und solange rühren, bis Oberfläche der Granalien sauber ist. Abgießen und in der Nutsche 2-3 mal mit aqua dest. nachspülen. Danach mit 150 ml aqua dest. versetzen und unter ständigem Umschwenken 25 ml Kupfersulfatlösung zugeben. Wenn die Zinkgranalien vollkommen mit einer schwarzen Schicht bedeckt sind, abgießen, 2-3 mal in der Nutsche mit 150 ml Aqua dest. nachspülen und lufttrocknen (Aufbewahrung in geschlossenem Glasgefäß). Eich-Vorratslösung (1 g/l bzw. ppt $\text{NO}_3\text{-N}$): 6,0682 g Natriumnitrat oder 7,2187 g Kaliumnitrat in Extraktionslösung zu 1 l lösen (Aufbewahrung in PE-Flasche im Kühlschrank). Für die Eich-Gebrauchslösung (0,1 g/l bzw. 100 ppm $\text{NO}_3\text{-N}$) werden 10 ml der Eich-Vorratslösung in Extraktionslösung zu 100 ml gelöst.

Durchführung: Bodenprobe durch ein Sieb mit 2 mm Maschenweite drücken und gut homogenisieren. 50 g feldfrischen Boden in 250 ml PE-Schüttelflaschen einwiegen und mit 100 ml Extraktionslösung versetzen. 30 min schütteln und abfiltrieren, dabei erste Anteile des Filtrats verwerfen. Zur Wassergehaltsbestimmung weitere 50 g feldfrischen Boden in Becherglas o.ä. einwiegen und 24 h bei 105°C trocknen (Angabe in Gewichts-%).

3.2.3 Messung

Meßlösungen: Je 2 ml des Filtrats in 2 Reagenzgläser geben, 1 ml Schwefelsäure und 7 ml Extraktionslösung hinzufügen und mischen. In eines der Reagenzgläser 2-3 verkupferte Zinkgranalien zugeben und zur Reduktion des Nitrats 10-20 h stehenlassen. Wegen Gasbildung Stopfen nur leicht aufsetzen.

Eichlösungen: Jeweils 0 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml der Eichgebrauchslösung in 50 ml Meßkolben pipettieren, 1 ml Schwefelsäure hinzufügen und mit Extraktionslösung auffüllen (entspricht Konzentrationen von 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm und 1,5 ppm).

Durchführung: Die Extinktion der Eichlösungen sowie der nicht reduzierten und reduzierten Meßlösungen zum gleichen Zeitpunkt im Spektralphotometer bei 210 nm in 10 mm Quarzküvetten messen. Die Eichgerade ist bis 1,6 ppm linear, der Endpunkt (1,5 ppm) liegt bei ca. 0,720. Bei Werten von 0,800-1,500 empfiehlt sich eine Verdünnung des Filtrats von 1:1, bei Werten über 1,500 von 1:5. Die Messung kann auch direkt aus dem Filtrat mittels HPL-Chromatographie erfolgen.

3.2.4 Berechnung

Durchführung: Aus der Differenz der Extinktionswerte der nicht reduzierten und reduzierten Meßlösungen ergibt sich die NO₃-N-Konzentration im verdünnten Filtrat in ppm (c). Der NO₃-N-Gehalt einer Bodenschicht (B) wird nach Einsetzen der Filtratmenge in der Meßlösung in ml (f), dem Skelettgehalt (Sg) und dem Wassergehalt (Wg) wie folgt berechnet:

$$B \text{ (in kg N/ha)} = \frac{6 \cdot 10^5 \cdot c \cdot Ld}{f \cdot (100 - Sg) \cdot (100 - Wg)}$$

Für die Lagerungsdichte (Ld) wird für die Bodenschicht 0-30 cm ein Wert von 1,2 g/cm³, für die Bodenschichten 30-60 cm bzw. 60-90 cm ein Wert von 1,4 g/cm³ angenommen. Wurde von der Ernte bis zum Zeitpunkt der Probenahme keine Bodenbearbeitung durchgeführt gilt für alle drei Bodenschichten ein Wert von 1,4 g/cm³.

Anmerkung: Wenn Probenahme, Probenaufbereitung oder Laboranalyse nicht selbst durchgeführt werden können, empfiehlt sich die Vergabe von Teilschritten oder der gesamten Untersuchung an ein geeignetes Institut/Labor.

3.3 Ergebnisse & Diskussion

Mehrere Ursachen kommen für die erhöhte Nitratauswaschung nach dem Anbau von Körnerleguminosen und damit auch der Weißen Lupine in Betracht. Findet eine effektive Knöllchenbildung statt, werden in Abhängigkeit von Sorte, Standort und Anbaumaßnahmen häufig hohe Stickstoffmengen fixiert (vgl. Tab. 1). Bei den bisher für die Weiße Lupine in Feldversuchen gemessenen Maximalerträgen von 60-70 dt/ha ist von ca. 340-460 kg N/ha auszugehen. Bei gleichem Kornertrag sind die fixierten Stickstoffmengen beim Anbau auf schweren Böden geringer, da diese zum Zeitpunkt der Aussaat über einen höheren Gehalt an

mineralischem Stickstoff sowie nachfolgend über eine höhere Stickstoffnachlieferung verfügen. Die geringere Stickstofffixierung frühreifer Sorten ist auf deren höheren Ernteindex für Stickstoff zurückzuführen. Die Gefahr der Nitratauswaschung ist dabei umso höher, je höher die Differenz aus fixierter Stickstoffmenge minus der in den Körnern enthaltenen Stickstoffmenge ist.

Der Restnitratgehalt im Boden wird in erster Linie von der Menge leicht abbaubarer Ernterückstände beeinflusst. Als solche werden die nach der Ernte auf dem Feld verbleibenden Pflanzenteile mit einem C/N-Verhältnis < 20 bezeichnet (Blätter, Seitenwurzeln und Knöllchen). Nach eigenen Messungen und Modellrechnungen (HARTMANN 1992) kann die Stickstoffmenge in den leicht abbaubaren Ernterückständen (N-Nachfrucht) für die Sorte Amiga wie folgt grob abgeschätzt werden:

$$\text{N-Nachfrucht (kg N/ha)} = \text{Kornertrag (dt/ha)} + 45$$

Für frühreifere Sorten liegen die Werte tendenziell niedriger, für spätreifere Sorten entsprechend höher. Darüber hinaus sind auch die schwer abbaubaren Ernterückstände (C/N-Verhältnis > 20) zu berücksichtigen. Dies betrifft den in den Stengeln, Hülsen und Hauptwurzeln enthaltenen Stickstoff, der i.d.R. jedoch erst in der folgenden Vegetationsperiode teilweise verfügbar wird.

Im Vergleich zu den anderen Kulturarten liegen für Körnerleguminosen bisher nur wenige Ergebnisse aus Nitrat-Bodenuntersuchungen vor. MAIDL et al. (1991) stellten nach der Ernte von Ackerbohnen und Körnererbsen Nitratgehalte von 60-70 kg N/ha in 0-80 cm Bodentiefe fest. Diese lagen damit etwa doppelt so hoch wie nach dem Anbau von Winterweizen. Ohne Anbau einer Winter-/Zwischenfrucht stiegen die Nitratgehalte bis zum Beginn der Auswaschungsperiode noch auf 120-140 kg N/ha an.

Die Ergebnisse der Nitrat-Bodenuntersuchungen in den Wasserschutzgebieten Baden-Württembergs lassen nur für die Jahre 1989 und 1990 Aussagen für einzelne Körnerleguminosen zu (MLRELF 1990, 1991). Demnach hinterlassen Ackerbohnen und Körnererbsen ähnlich hohe Nitratmengen im Boden wie konventionell bewirtschafteter Silomais. Dagegen liegen Sojabohnen in etwa auf dem Niveau von Getreide (vgl. Abb. 1).

Dies dürfte einerseits auf das im Vergleich zu Ackerbohnen und Körnererbsen geringere Fixierungspotential und Ertragsniveau der Sojabohne zurückzuführen sein. Außerdem weist die Sojabohne einen höheren Ernteindex für Stickstoff auf, wodurch weniger Nitrat aus

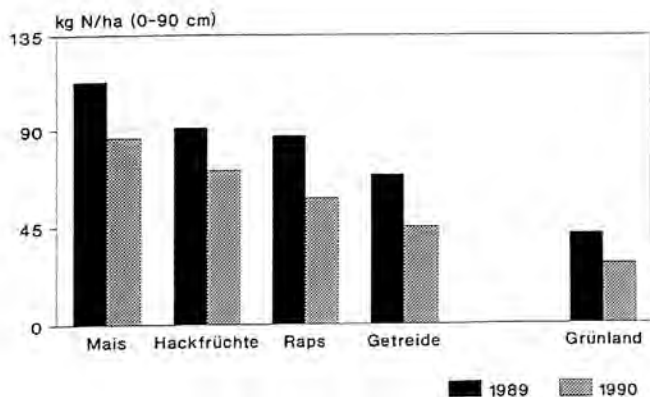


Abb. 1: Nitratgehalte im Boden bei Acker- und Grünlandnutzung in Baden-Württemberg (MLRELF 1990, 1991)

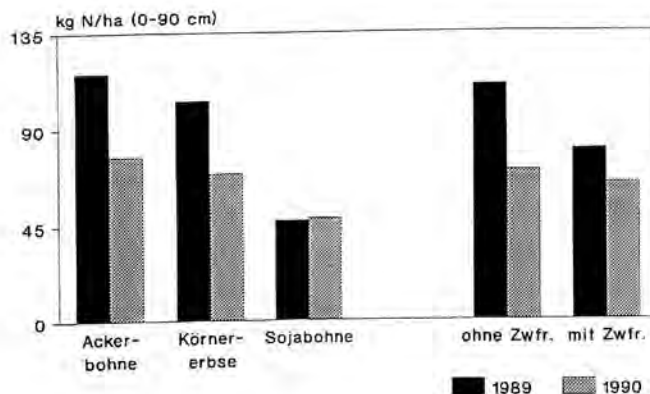


Abb. 2: Nitratgehalte im Boden nach dem Anbau von Körnerleguminosen in Baden-Württemberg (MLRELF 1991)

Tab. 1: Fixierte Stickstoffmenge (N-Fixierung) und Differenz aus fixierter Stickstoffmenge minus der in den Körnern enthaltenen Stickstoffmenge (N-Bilanz) bei der weißen Lupine in Abhängigkeit von der Reifegruppe, der Bodenart sowie dem erzielten Kornertrag. (Berechnung mittels eines multiplen Regressionsmodells unter der Voraussetzung effektiver Knöllchenbildung, Beschreibung bei HARTMANN 1992)

Reifegruppe	sehr früh (Minori/Vladimir)				spät (Nelly/Ares)			
	IS		tL		IS		tL	
Kornertrag (dt/ha)	25	45	25	45	25	45	25	45N-
Fixierung (kg N/ha)	119	249	85	215	171	301	150	267
N-Bilanz (kg N/ha)	+1	+33	-37	-5	+28	+60	-10	+22

den Ernterückständen gebildet werden kann. Durch den Anbau von Zwischenfrüchten nach Ackerbohnen und Körnererbsen konnten die Restnitratgehalte zwar verringert werden, lagen jedoch trotzdem noch auf relativ hohem Niveau. Für Lupinen wurden in Baden-Württemberg bisher keine Daten erhoben.

Die 1993 unter den Mitgliedern der GFL durchgeführte Befragung erlaubt nur begrenzte Aussagen, da von 25 verschickten Fragebögen nur fünf ausgewertet werden konnten. Die verwendeten Sorten der Weißen Lupine waren Amiga, Ida, Weibit und Bardo. Die Kornerträge schwankten von 17-39 dt/ha mit einem Mittelwert von 24 dt/ha.

Die gemessenen Restnitratgehalte (10-81 kg N/ha in 0-90 cm Bodentiefe) waren dabei positiv mit dem Kornertrag korreliert. Mit einem Mittelwert von 46 kg N/ha bei der Messung im Oktober/November 1993 lag der Restnitratgehalt für die Weiße Lupine damit deutlich niedriger als die bisher für Ackerbohnen und Körnererbsen gemessenen Werte. Allerdings sind Ergebnisse aus verschiedenen Jahren nicht direkt vergleichbar. Außerdem ist davon auszugehen, daß bei höheren Kornerträgen aufgrund der dann ebenfalls höheren Stickstoffmenge in den Ernterückständen auch höhere Restnitratgehalte festgestellt werden.

Je nach Standortbedingungen führen hohe Restnitratgehalte im Boden zu verstärkter Nitratauswaschung während des Winterhalbjahres. Ist das Nitrat einmal unter die durchwurzelte Bodenzone verlagert, spielt der Nitratabbau nur noch eine untergeordnete Rolle. Da die meisten zur Trinkwasserversorgung genutzten Grundwasserleiter hohe Sauerstoffgehalte aufweisen, findet auch dort kein nennenswerter Nitratabbau mehr statt. Als

Kriterium für einen grundwasserverträglichen Ackerbau muß demnach der Grenzwert der Trinkwasserverordnung (50 mg/l) herangezogen werden. Wird dieser im Sickerwasser überschritten, ist die vorangegangene Kulturführung als nicht vereinbar mit dem Grundwasserschutz anzusehen.

Unter Berücksichtigung der Boden- und Witterungsverhältnisse ist es möglich, einen Zusammenhang zwischen dem Restnitratgehalt im Boden und dem Nitratgehalt im Sickerwasser herzustellen (vgl. Abb. 3). Aus Gründen der Praktikabilität wurden die Bodenzahl als Maß für die Auswaschungsgefährdung des Bodens gewählt, da sie im Maßstab 1:5.000 flächendeckend kartiert vorliegt (Reichsbodenschätzung) und auch den Landwirten vertraut ist. Als Maß für die Grundwasserneubildung wurde die Differenz aus Niederschlag und aktueller Verdunstung gewählt, die in Karten der Jahresabflußhöhen ebenfalls flächendeckend dargestellt ist. So ergibt sich, daß z.B. bei einem Abfluß von 350 mm/Jahr für eine Ackerfläche mit der Bodenart lehmiger Sand (Bodenzahl 40) ein Restnitratgehalt von 45 kg N/ha noch tolerierbar ist. Bei geringerer Grundwasserneubildung bzw. Bodenzahl wäre nach den bisherigen Ergebnissen demnach vom Anbau der Weißen Lupine abzusehen.

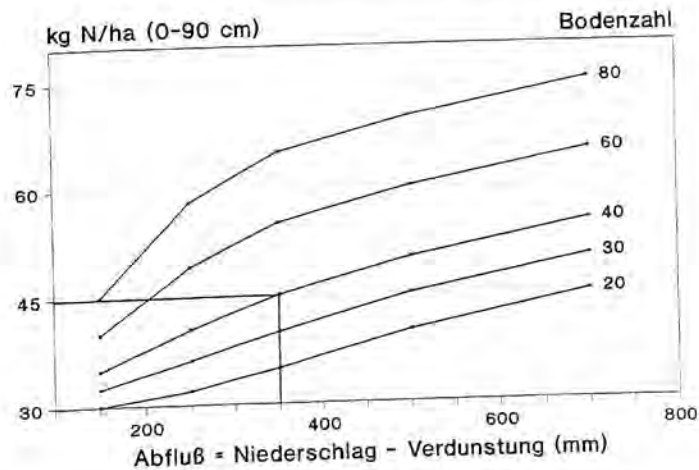


Abb. 3: Nomogramm zur Ermittlung des tolerierbaren Nitratgehalts im Boden bei einer Probenahme im Spätherbst in Abhängigkeit von den Boden- und Witterungsverhältnissen (Kriterium: Nitratgehalt des Sickerwassers = 50 mg/l, im angegebenen Beispiel darf der Nitratgehalt demnach maximal 45 kg N/ha betragen)

Als Konsequenz daraus lassen sich für die Züchtung und den Anbau der Weißen Lupine mehrere Empfehlungen ableiten. Nach der Ernte ist es von entscheidender Bedeutung, eine geeignete Winter-/Zwischenfrucht ohne weitere Stickstoffdüngung anzubauen. MAIDL et al. (1991) stuften das Stickstoffaufnahmevermögen verschiedener Nachfrüchte wie folgt ein: Winterweizen < Wintergerste < Winterraps. Senf und Ölettrich entziehen dem Boden zwar vergleichbare Stickstoffmengen, je nach Witterungsverlauf kann es jedoch auch nach dem Umbruch oder auch nach Frühfrösten noch zu verstärkter Mineralisation und Nitratauswaschung kommen. Dieses Problem entfällt, wenn die Zwischenfrüchte zur Futtermutzung geschnitten werden.

Die Entscheidung Winter- oder Zwischenfrucht hängt sowohl von den betrieblichen Gegebenheiten (Marktfrucht- oder Veredelungsbetrieb, Haupt- oder Nebenerwerb, etc.) als auch den Standortbedingungen ab. Je nach Witterungsverlauf kann auch der Fall eintreten, daß es nach der Ernte der Weißen Lupine bereits zu spät für den Nachbau von Winterraps oder -gerste ist. Entscheidend für die Vermeidung von Nitratverlusten sind möglichst kurze Brachezeiten zwischen der Ernte und der Aussaat der Nachfrucht (HESS et al. 1992). Auf schweren Böden (sL, L, LT) kann bei später Ernte der Nachbau einer Sommerung akzeptiert werden, wenn der Umbruch der Stoppel nicht vor Mitte November durchgeführt wird. Auf leichten Böden (Sl, IS, SL) sollte jedoch in jedem Fall eine winterharte Begrünung etabliert werden. Auf niederschlagsarmen Standorten wird man dabei Winterfrüchten den Vorzug geben, um den Bodenwasservorrat und den Vorfruchtwert der Weißen Lupine optimal nutzen zu können.

Bei der Züchtung und dem Anbau der Weißen Lupine sollte zukünftig mehr Wert auf frühreife Genotypen mit hohem Stickstoff-Ernteindex gelegt werden. Einheitlich abreifende und auch nach längeren Trockenperioden nicht durchwachsende Bestände dienen ebenfalls der Verringerung der Nitratauswaschung, da so eine optimale Kulturführung im Herbst gewährleistet wird. Der Reihenabstand sollte möglichst gering, die Aussaatstärke für die jeweilige Sorte optimal gewählt werden. Werden auf einem Standort zum ersten Mal Lupinen angebaut, sollte zudem kontrolliert werden, ob eine effektive Knöllchenbildung stattgefunden hat.

Für den kommenden Herbst 1995 ist eine weitere Beprobungskampagne unter den Mitgliedern der GFL vorgesehen. Dabei soll insbesondere der Einfluß der Sorte und der Nachfrüchte auf den Restnitratgehalt untersucht werden. Wenn möglich, werden auch vergleichende Untersuchungen an anderen Körnerleguminosen durchgeführt.

3.4 Literatur

- HARTMANN, C.: Die Ertragsbildung und Stickstofffixierung der Weißen Süblupine (*Lupinus albus* L.) in Abhängigkeit von Genotyp, Standort und Anbaumaßnahmen. Bayreuther Bodenkundliche Berichte Band 30, Universität Bayreuth (1992)
- HARTMANN, C.: Ein Prognosemodell für die N-Fixierung und Ertragsbildung der Weißen Lupine (*Lupinus albus* L.), in WINK, M.: Lupinen 1991 - Forschung, Anbau und Verwertung, S. 200-209. Universität Heidelberg (1992)
- HESS, J., A. PIORR und K. SCHMIDTKE: Grundwasserschonende Landwirtschaft durch Ökologischen Landbau? Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 45 (1992)
- MAIDL, F.X., J. SUCKERT, R. FUNK und G. FISCHBECK: Standorterhebungen zur Stickstoffdynamik nach Anbau von Körnerleguminosen. J. Agronomy & Crop Science, (1991)
- MLRELF (Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Baden-Württemberg): Ergebnisse der Nitratuntersuchungen in den Böden der Wasserschutzgebiete Baden-Württembergs zu Vegetationsende 1989. Informationen für die Pflanzenproduktion, Heft 1/1990
- MLRELF (Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Baden-Württemberg): Nitratbericht 1990 - Pflanzenbauliche Auswertungen der Nitratuntersuchungen der Böden im Rahmen der SchALVO-Kontrolle zu Vegetationsende (1991)
- VDLUFA (Verband der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten) Methodenbuch Band I - Die Untersuchung von Böden. Darmstadt (1991)

4 Förderung der biologischen Luftstickstoffbindung bei Lupinen

Gisela Höflich

Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung Münchenberg
Institut für Ökophysiologie der Primärproduktion
Eberswalder Str. 84
D-15374 Münchenberg

Zusammenfassung

Durch Saatgutinokulation mit selektierten leistungsfähigen *Bradyrhizobium*-Bakterien wurde der Sproßtrockenmasse- und Samenertrag von Lupinen und Serradella in Feld- und Großversuchen auf unterschiedlichen Standorten (lehmigem Sand und sandigem Lehm) ohne zusätzlichen Düngereinsatz in mehreren Jahren wiederholt erhöht. Die Inokulation war bei unterschiedlichen Sorten von gelben, weißen und blauen Lupinen und bei Leguminosengemenge in Frühjahrs- und Sommeraussaaten wirksam. Sie wirkte sich auch positiv auf die Wurzelentwicklung aus. Ca. 1% der Bakterienisolate waren wiederholt wirksam. Durch kombinierte Inokulation mit wachstumsfördernden assoziativen Bakterien konnte der Inokulationseffekt in ersten Versuchen verbessert werden.

Summary

Seed inoculation with selected *Bradyrhizobium* strains repeatedly stimulated shoot dry matter and seed grain of lupins and serradella in field and large-scale experiments over several years on different sites (loamy sand, sandy loam) of Germany without additional fertilization. The inoculation was effective in different cultivars of yellow, white and blue lupines and legume mixtures in spring and summer cultures. Inoculation also enhanced the development of the root system. Approx. 1% of the bacterial isolates were reproducibly effective. The effect could be improved in first experiments by combined inoculation with growth promoting associative bacteria.

Keywords: lupin, serradella, *Bradyrhizobium*, nitrogen fixation, plant nutrition, seed yield

4.1 Einleitung

Die Bedeutung der biologischen Luftstickstoffbindung durch *Rhizobium*-Bakterien für das Wachstum von Leguminosen wurde bereits im vergangenen Jahrhundert von HELLRIEGEL (1887) und BEIYERINCK (1888) nachgewiesen. *Rhizobium*-Bakterien können mit Hilfe ihres Enzyms Nitrogenase den molekularen Luftstickstoff (N_2) zu pflanzenaufnehmbaren Ammoniumstickstoff reduzieren. Die dazu notwendige Energie wird über die Photosynthese der Pflanzen bereitgestellt. Zwischen den in den Wurzelknöllchen der Leguminosenpflanzen lebenden *Rhizobium*-Bakterien und der Wirtspflanze besteht ein direktes Transportsystem für Kohlenhydrate und fixiertem Stickstoff. Die Leguminosenpflanzen können deshalb in Abhängigkeit von der Art und Umweltfaktoren ihren Stickstoffbedarf bis zu 90 % aus der Luft abdecken (DONATH et al. 1979, MERBACH 1982).

Die Höhe der biologischen Luftstickstoffbindung wird von der Leistungsfähigkeit der *Rhizobium*-Bakterien in Wechselbeziehung zu den Wirtspflanzen bestimmt. Sie kann durch Umweltfaktoren variiert werden. Da im Boden oft ungenügend oder wenig effektive *Rhizobium*-Bakterien vorhanden sind, ist eine gezielte Stimulierung der Luftstickstoffbindung und des Leguminosenertrages durch Impfung mit geeigneten *Rhizobium*-Präparaten möglich (HÖFLICH et al. 1989).

Ziel vorliegender Untersuchungen war es, aus der genetischen Formenmanigfaltigkeit der *Rhizobium*-Wildpopulation nitrogenaseaktive, konkurrenzfähige Bakterienstämme zu selektieren, die bei Lupinen die Luftstickstoffbindung und das Wachstum unter Feldbedingungen wiederholt fördern. Außerdem sollte die Effektivität der für Lupinen spezifischen *Bradyrhizobium lupinii* Stämme bei unterschiedlichen Lupinenarten und Sorten sowie bei Serradella - eine Wirtspflanze von *Bradyrhizobium lupinii* - und bei Leguminosengemenge untersucht werden. Die Inokulationswirkungen wurden bei Beachtung der Leistungsstabilität der Bakterien, der Nutzungsformen (Haupt- oder Zwischenfrucht), des Einflusses der N-Düngung und von Aussatterminen ermittelt. Außerdem wurden Möglichkeiten einer Wachstumsförderung durch kombinierte Inokulation stoffwechselaktiver Rhizosphärenmikroorganismen getestet.

4.2 Material und Methode

Die Untersuchungen erfolgten in den Jahren 1981 bis 1994 zunächst vorwiegend mit *Lupinus luteus* (Gelblupinen). Die besten *Bradyrhizobium*-Stämme wurden hinsichtlich ihrer Effektivität bei *Lupinus albus* (Weißlupine), *Lupinus angustifolius* (blaue Lupine) und

Ornithopus sativus (Serradella), z. T. durch Einbeziehung unterschiedlicher Sorten überprüft. 210 Bakterienisolate wurden vorwiegend aus Wurzelknöllchen gut entwickelter Lupinenpflanzen von verschiedenen Standorten isoliert. Die Effektivitätsermittlung erfolgte auf unterschiedlichen Böden in Gefäß-, Feld- und Großversuchen. Effektivitätskriterien waren: Nitrogenaseaktivität, Nodulation, Sproß- und Wurzelrockenmasse, Kornertrag und z.T. Rohproteinertrag. Zur Beschreibung der Isolations- und Untersuchungsmethoden siehe HÖFLICH und HICKISCH (1986). Die Inokulation erfolgte in Gefäßversuchen mit Kultursuspension (10^6 cfu je Samen) und in Feldversuchen mit Torfpräparaten (HÖFLICH et al. 1987).

Feldversuche wurden auf lehmigem Sand und sandigem Lehm in Müncheberg, Dedelow, Potsdam, Trossin, Milmersdorf und in den Saatzuchtstationen Bornhof, Trebatsch und Rastatt als vollrandomisierte Blockanlagen mit 4-6 Wiederholungen angelegt. Die Durchführung der Großversuche erfolgte auf mindestens 5 ha großen Flächen in Landwirtschaftsbetrieben. Zur Ertragsermittlung wurden 3 Teilstrecken maschinell bzw. 10 mal $1m^2$ Proben manuell geerntet. Die Düngung erfolgte zur Saat mit 30 bis 40 kg P und 100 bis 133 kg K je ha. Stickstoff wurde in den Inokulationsversuchen nicht gedüngt. In speziellen Feldversuchen wurde die Wirkung einer N-Düngung und *Rhizobium*-Impfung vergleichend getestet.

Die Versuchsergebnisse wurden bei $\alpha = 0,05$ statistisch verrechnet. Zur Auswertung der Ergebnisse aus mehreren Versuchen wurde die Berechnung der statistischen Maßzahlen auf der Basis von Relativwerten genutzt und durch Vergleich der Konfidenzintervalle signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur ungeimpften Kontrolle ermittelt.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 *Bradyrhizobium*-Inokulationen bei Gelblupinen

In Gefäßversuchen mit lehmigem Sand stimulierten von 210 *Bradyrhizobium*-Isolaten 7 Isolate (3%) wiederholt die Sproß- und Wurzelentwicklung bei Gelblupinen in Gefäßversuchen bis zur Blüte um 10 bis 20%. Wirksame Isolate erhöhten die Nitrogenaseaktivität (30 - 40%) und den Stickstoffgehalt im Sproß (0.4%). Bei den Knöllchenzahlen je Pflanze zeichneten sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Kontrolle und den inokulierten Varianten ab. In Feld- und Großversuchen wurde der Trockenmasseertrag zur Zeit der Blüte mit den besten *Bradyrhizobium*-Stämmen wiederholt erhöht (Tab.1). Es waren jedoch nicht alle in Gefäßversuchen vorselektierten Stämme auch in Feldversuchen wirksam.

Tab. 1: Ertragswirksamkeit selektierter *Bradyrhizobium*-Stämme bei Gelblupine z.Zt. der Blüte in Feld- und Großversuchen 1985...1993 (Trockenmasseertrag in dt ha⁻¹)

Stamm	Feldversuche				Großversuche			
	An- zahl	Kontr. dt ha ⁻¹	Mehrertrag dt ha ⁻¹	rel.	An- zahl	Kontr. dt ha ⁻¹	Mehrertrag dt ha ⁻¹	rel.
lup2	4	35.1	1.6	5	-	-	-	-
lup4	4	33.1	0.4	1	-	-	-	-
lup84	9	39.4	3.5	9*	7	37.0	5.0	14*
lup108	13	42.3	2.3	5*	35	38.5	5.5	14*
lup152	13	44.1	2.2	5*	2	43.4	3.9	9
lup169	2	38.0	2.1	5	-	-	-	-
lup170	7	33.3	1.7	5	14	61.4	3.5	6

* Signifikanz der relativen Mittelwertdifferenzen bei $\alpha = 5\%$

Die Feldversuche wurden z.T. auf Flächen angelegt, auf denen bereits Wirtspflanzen von *Bradyrhizobium*-Bakterien (Lupinen, Serradella) in Haupt- oder Zwischenfruchtstellung wiederholt angebaut wurden. Anbaupausen von nur 2 bis 3 Jahren führten zu hoher Nodulation der Jungpflanzen (ca. 30 Knöllchen je Pflanze). Die Ertragswirksamkeit der Impfung war hier geringer als in Großversuchen mit längeren Anbaupausen. In der Lupinen-Zuchtstation in Bornhof war z. B. die Inokulation wirkungslos.

Untersuchungen zur Ertragssicherheit der Inokulation in 58 Großversuchen über mehrere Jahre zeigten, daß die Sproßtrockenmasseerträge in 76 bis 83 % der Versuche um mindestens 1 dt je ha, in 75 bis 78 % um mindestens 2 dt und in 60 bis 74 % der Versuche um über 3 dt je ha erhöht wurden.

Der Körnertrag wurde ebenfalls erhöht, die Effektivität der Impfung war in Feldversuchen meist geringer als in Großversuchen (Tab. 2). Mit der Impfung konnten ähnliche oder höhere Trockenmasse- bzw. Körnerträge als durch N-Düngung (40 - 50 kg N je ha) erreicht werden (HÖFLICH et al. 1994 a).

Tab. 2: Effektivität selektierter *Bradyrhizobium*-Stämme bei Gelblupine hinsichtlich Körnertrag in Feld- und Großversuchen 1985...1993

Stamm	Feldversuche				Großversuche			
	An- zahl	Kontr. dt ha ⁻¹	Mehrertrag dt ha ⁻¹	rel.	An- zahl	Kontr. dt ha ⁻¹	Mehrertrag dt ha ⁻¹	rel.
lup84	2	20.5	2.0	10	2	5.6	1.0	18
lup108	5	13.8	0.5	4	42	11.4	1.3	11*
lup152	2	16.8	1.0	6*	3	10.0	1.5	15
lup170	6	13.6	0.9	7	12	12.0	0.9	8*

* Signifikanz der relativen Mittelwertdifferenzen bei $\alpha = 5\%$

4.3.2 Inokulationswirkungen bei verschiedenen Lupinenarten und Sorten

Mit den besten *Bradyrhizobium*-Stämmen wurde nicht nur bei Gelblupinen (*L. luteus*), sondern auch bei Weißlupinen (*L. albus*) und Blauen Lupinen (*L. angustifolius*) die Sproß- und Wurzelentwicklung stimuliert (Tab. 3). Bei *L. luteus* reagierten die Sorten Borluta, Bornova, Refusa Nova, Borsaja, Borena und Schwako in Gefäß- und/bzw. in Feld- oder Großversuchen positiv auf die Impfung. Der *Rhizobium* Stamm lup84 förderte auch das Wachstum der Weißlupinensorten Lublanc, Vladimir, Amiga, Wat und Bordo jedoch nicht immer signifikant in Gefäß- bzw. Feldversuchen (Tab. 3, 4). Bei *L. angustifolius* zeichneten sich positive Wirkungen mit der Sorte Azuro ab (Tab. 3).

4.3.3 Inokulation von Serradella und Leguminosengemenge

Da Serradella zum Wirtspflanzenkreis von *Bradyrhizobium lupinii* gehört, konnte mit den selektierten Stämmen auch das Wachstum von Serradella (Sorte Mecklenburger) in Feld- und Großversuchen erhöht werden (Tab. 5). Die Inokulation war zu unterschiedlichen Aussaatterminen im Frühjahr bzw. im Sommer, nach der Ernte der Hauptfrüchte, bei Lupinen und Serradella wirksam (Tab. 5). Positive Wirkungen wurden auch beim Anbau von Lupinen-Erbsen-Hafer-Gemenge und Lupinen-Erbsen-Serradella-Gemenge durch kombinierte Inokulation mit Präparaten von *R. lupinii* und *R. leguminosarum* in Feld- und Großversuchen wiederholt erzielt (Tab. 5). Der Samenertrag von Serradella wurde im Durchschnitt von 14 Großversuchen um 1,4 dt je ha erhöht.

Tab. 3: Effektivität der Impfung mit den Stämmen lup84 und lup108 bei Lupinenarten und -sorten (Trockenmasse zur Blüte in Gefäß- und Feld- bzw. Großversuchen 1985...1993)

Art	Sorte	Gefäßversuche				Feld- und Großversuche							
		lup84		lup108		lup84			lup108				
		Sproß	Wurzel	Sproß	Wurzel	Sproß	An- zahl	Mehrertrag dt·ha ⁻¹	rel.	Sproß	An- zahl	Mehrertrag dt·ha ⁻¹	rel.
Gelb- lupine	Borluta	147*	114	149	100	-	-	-	4	3.9	8*		
	Bornova	116*	129*	101	159	5	4.2	11*	17	3.8	8*		
	Refusa Nova	114	124*	110	121*	2	4.5	13	3	2.2	6		
	Borsaja	111	121	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Boresa	-	-	-	-	1	2.0	8	11	6.1	17*		
	Schwako	118*	109	-	-	-	-	-	4	9.1	37*		
Weiß- lupine	Lublanc	127*	131*	107	104	Sproß 125 ¹⁾ Wurzel 121 ¹⁾							
	Watt	105	100	-	-								
	Bardo	107	100	-	-								
Blaue Lupine	Azuro	109	130*	-	-								

1) Einzelpflanzenbonitur Kontrolle = 100

Tab. 4: Einfluß der Impfung mit lup84 bei Weißlupinensorten auf den Samenertrag in Feldversuchen 1993 (ZALF Müncheberg, Süd-Westdeutsche Saatzeit Rastatt)

Sorte	Anzahl Versuche	Kontrolle dt·ha ⁻¹	Mehrertrag	
			dt·ha ⁻¹	rel.
Lublanc	3	19.6	1.0	5
Amiga	2	21.3	1.6	8
Vladimir	2	17.6	0.8	5
gesamt	7	19.5	1.13	6*

Tab. 5: Effektivität der Bradyrhizobium-Impfung im Zwischenfruchtanbau mit Rein- und Mischsaaten bei Frühjahr- und Sommeraussaat 1985 - 1989 (Trockenmassemehrertrag in dt·ha⁻¹ und relativ)

Fruchtarten	Aussaat- termin	Feldversuche				Großversuche			
		An- zahl	Kontr. dt·ha ⁻¹	Mehrertr. dt·ha ⁻¹	rel.	An- zahl	Kontr. dt·ha ⁻¹	Mehrertrag dt·ha ⁻¹	rel.
Gelblupine	Frühjahr	30	42.6	2.3	5*	53	44.7	4.9	11*
	Sommer	4	23.5	3.3	14*	5	38.6	2.5	6
Serradella	Frühjahr	13	35.3	3.5	10*	12	24.4	6.7	27*
	Sommer	-	-	-	-	1	14.6	3.0	21
Lup., Erbse, Hafer	Frühjahr	12	48.1	2.4	5*	3	41.0	11.0	27
	Sommer	8	29.0	1.4	5*	2	12.8 [^]	2.2	17
Lup., Erbse, Serradella	Frühjahr	6	18.1	3.2	18*	-	-	-	-
	Sommer	2	57.4	2.9	5*	-	-	-	-

Tab. 6: Einfluß einer Saatgutnukulation mit dem *Pseudomonas*-Stamm PsIA12 auf den Effekt der *Rhizobium*-Impfung in Lupinen-Erbsen-Hafergemenge und Lupinen-Erbsen-Serradellagemenge (Feldversuche 1989, D2 Standort Müncheberg, Trockenmasse-ertrag in dt·ha⁻¹ und relativ zur Kontrolle)

Impforga- nismen	Lupine-Erbse-Serradella			Lupine-Erbse-Hafer		
	Kontr. dt·ha ⁻¹	Mehrertrag dt·ha ⁻¹	rel.	Kontr. dt·ha ⁻¹	Mehrertrag dt·ha ⁻¹	rel.
ohne	18,1	0.0	0	35.2	0.00	0
lup108+E164	-	0,4	2		0.0	0
lup108+PsIA12	-	3.0	17		9.2*	26
GD α=5%		3.2			6.8	

4.3.4 Kombinierte Inokulation von Bradyrhizobien mit stoffwechselaktiven assoziativen Rhizosphärenbakterien

Durch kombinierte Inokulation selektierter Bradyrhizobien mit assoziativen Bakterien, die das Wachstum von Getreide und Mais fördern (HÖFLICH et al. 1994b) z.B. *Pseudomonas fluorescens* (PsIA12, isoliert von Weizen), *Rhizobium trifolii* (R39, isoliert von Rotklee), *Agrobacterium rhizogenes* (A1A4, isoliert von Raps) wurde in ersten Feldversuchen auf lehmigem Sand (Müncheberg) und sandigem Lehm (Dedelow) 1994 die Nährstoffaufnahme (N, P, K, Mg) und der Kornertrag im Vergleich zur *Rhizobium*-Impfung verbessert (Tab. 7). Kombinierte Inokulationen wirkten sich auch positiv bei Leguminosengemenge aus (Tab. 6). Die assoziativen Bakterien bildeten in Reinkultur Phytohormone (Cytokinin, Auxin) und wirkten antagonistisch gegen pilzliche Wurzelschaderreger.

Tab. 7: Einfluß der Bakterieninokulation auf die Nährstoffaufnahme und den Kornertrag bei Weißlupine unter Feldbedingungen auf lehmigem Sand (Amiga) und sandigem Lehm (Lubanc) 1994

Bakterienstamm	N-Aufnahme				P-Aufnahme				Kornmehr- ertrag		
	Sproß		Wurzel		Sproß		Wurzel		dt·ha ⁻¹		
	6-8 Blatt	IS	6-8 Blatt	sL	6-8 Blatt	IS	6-8 Blatt	sL	IS	sL	
ohne	100	100	100	100	100	100	100	100			
	190 ¹	124 ¹	47 ¹	10 ¹	36 ¹	13 ¹	10 ¹	2 ¹	19.0 ²	24.1 ²	
lup84	111*	142	100	166*	110*	143	105	183*	1.1	0.0	
lup84+R39	123*	179*	100	387*	109	191*	111	414*	1.6	4.1	
lup84+A1A4	115*	177	98	411*	119*	171*	109	444*	1.5	4.5	
GD α=5%	11	61	13	66	10	60	14	92	2.2	5.9	
		K-Aufnahme				Mg-Aufnahme					
ohne	100	100	100	100	100	100	100	100			
	193 ¹	151 ¹	58 ¹	16 ¹	18 ¹	8 ¹	4 ¹	3 ¹			
lup84	111*	125	93	168	108	134	93	166			
lup84+R39	108	127	104	254*	114+	173+	107	286*			
lup84+A1A4	117*	124	101	263*	113*	147	98	277*			
GD α=5%	10	52	13	78	10	56	13	83			

¹ mg je 10 Pflanzen, ² Basisertrag

4.4 Diskussion

Eine hohe biologische Luftstickstoffbindung erfordert effektive Symbiosen zwischen Makro- und Mikrosymbionten. Da im Boden landwirtschaftlicher Betriebe oft ungenügend oder wenig leistungsfähige *Bradyrhizobium*-Bakterien vorhanden sind, ist es möglich, durch Inokulation selektierter wirtspflanzenspezifischer nitrogenaseaktiver und konkurrenzfähiger Bradyrhizobium-Bakterien bei unterschiedlichen Lupinenarten und Serradella die Sproß- und Wurzelentwicklung bereits im Jugendstadium bis zur Blüte zu stimulieren sowie den Samenertrag ohne zusätzlichen Einsatz von mineralischem Dünger zu erhöhen. Über eine stimulierte Wurzelentwicklung kann sich die Inokulation auch positiv auf die Nachfrucht auswirken. Die Höhe der Inokulationswirkung kann von Versuch zu Versuch schwanken.

Eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Inokulation ist die Leistungsstabilität der Bakterien. Nicht alle in den ersten Jahren nach der Inokulation wachstumsstimulierend wirkenden Bakterienisolate waren nach 10 Jahren noch effektiv. Die Leistungsstabilität der Bakterienisolate muß deshalb ständig überprüft werden. Nodulationsvermögen und Nitrogenaseaktivität sind nur erste Selektionskriterien, entscheidend sind Wachstumsstimulierungseffekte am Standort. Eine wachstumsstimulierende Luftstickstoffbindung setzt die Bereitstellung ausreichender Assimilate durch die Wirtspflanze voraus. Im Rahmen des Pflanzenbaus müssen deshalb optimale Entwicklungsbedingungen für die Wirtspflanze abgesichert werden. Dazu gehören Vermeidung hoher Schaderregerpopulationen durch Einhaltung erforderlicher Anbaupausen, ausreichende Bereitstellung von Phosphor und Kalium und im Bedarfsfall auch von Mikronährstoffen. Eine Stickstoffdüngung ist nicht notwendig. Der hohe Samenstickstoff ermöglicht eine gute Jungpflanzenentwicklung bis zum Aufbau der Symbiose. Von besonderer Bedeutung ist die Absicherung der für die Leguminosenarten spezifischen optimalen pH-Werte. Für eine gezielte Anwendung kombinierter Bakterieninokulationen sind bei Lupinen weitere Untersuchungen notwendig.

Danksagung

Für die Bereitstellung von Ertragswerten aus Feldversuchen danke ich Prof. Kühn, Dedelow, Prof. Görlitz, Potsdam, Dr. P. Römer Rastatt, Dr. Brummund, Bornhof und Dr. Hellmund, Trebatsch. Für die Bereitstellung von Ertragswerten aus Großversuchen danke ich den Betreuern der zahlreichen Großversuche in den Landwirtschaftsbetrieben. Für die Unterstützung bei den Experimenten in Feld- und Laborversuchen danke ich Frau B. Leske, Frau V. Birke, Frau A. Schnabel, Herrn L. Weinert, Frau E. Streblov, Frau M. Roth, Frau I.

Bär und Frau E. Harlfinger. Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt vom BMFT Projekt Nr. 0319959B.

4.5 Literatur

- Beijerinck, M.W.: Bot. Ztg. **46** (1888), S. 725-735
- Donath, G.; Fraustein, R. M.; Reichelt, A.: Untersuchungen über den Einfluß von Mineral-N-Gaben auf die symbiotische N₂-Fixierung und die Trockenmasse- bzw. Proteinerträge von Gelblupinen, durchgeführt mit Hilfe von ¹⁵N-markiertem Ammoniumnitrat. Belegarbeit, Sekt. Pflanzenprod. MLU Halle (1979)
- Giddens, J. E.; Dunningan, E. P.; Weaver, R. W.: Legume inoculation in the Southeastern USA. Southern Cooperative Series Bull., Spec. Volume 283 (1982)
- Hellriegel, H.: Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote? Landwirtschafts. Versuchs.-Stat. **33** (1887), S. 464-465
- Höflich, G.: Einfluß von Sorten und Umweltfaktoren auf die Phytoeffektivität von Bakterieninokulationen bei Erbsen. Zbl. Mikrobiol. **148** (1993), S. 315-324
- Höflich, G.; Hickisch, B.: Isolierung und Effektivitätsprüfung von Rhizobium-Bakterien unter den Bedingungen der DDR. Zbl. Mikrobiol. **141** (1986), S. 401-408
- Höflich, G.; Kühn, G.; Görlitz, H. et al.: Förderung der biologischen Luftstickstoffbindung bei Lupinen und Serradella, ein Beitrag für die Ressourcensparende Pflanzenernährung. Arch. Acker-Pfl. Boden. (1994a), S. 1-10
- Höflich, G.; Wiehe, W.; Kühn, G.: Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere mikroorganisms. Experientia **50** (1994b), S. 897-905
- Höflich, G.; Wolf, H.-J.; Kühn, G. et al.: Erfahrungen und neue Ergebnisse zum Einsatz von *Rhizobium*-Präparaten zur Erhöhung der biologischen Luftstickstoffbindung und des Ertrages bei Leguminosen. Feldwirtschaft **30** (1989)8, S. 354-355
- Höflich, G.; Wolf, H.-J.; Rupprich, A.: Availability and sterilization of peat as carrier for *Rhizobium* inoculants. Zbl. Mikrobiol. **142** (1987), S. 581-586
- Merbach, W.: Untersuchungen über Stickstoffumsatz und symbiotische N₂-Fixierung bei Körnerleguminosen. Diss. B, MLU Halle-Wittenberg (1982), S. 146-160

5 Molekulare Phylogenie der Lupinen (*Lupinus*: Leguminosae)

Ernst Käss und Michael Wink

Universität Heidelberg
Institut für Pharmazeutische Biologie
Im Neuenheimer Feld 364
D-69120 Heidelberg

Zusammenfassung

Die Gattung *Lupinus* ist mit 12 Arten in der Alten Welt (Mittelmeerraum und Nordafrika) und mit über 200 Arten in der Neuen Welt (Nord- und Südamerika) verbreitet. Hybridisierung und die große Ähnlichkeit morphologischer Merkmale haben bislang eine systematische Einordnung und Unterteilung der Gattung erschwert. Durch die Analyse von DNA-Sequenzen (rbcL-Gen und ITS-Bereiche der rDNA) konnten die phylogenetischen Beziehungen der Lupinen sowohl untereinander als auch zu verwandten Gruppen aufgezeigt werden: Die Gattung *Lupinus* bildet eine monophyletische Gruppe innerhalb des Tribus Genisteeae; eine Abspaltung von *Lupinus* als eigener Tribus erscheint nicht gerechtfertigt. Aufgrund der genetischen Distanzen bilden die Gattungen *Lupinus* und *Genista* die größten Gruppen innerhalb der Genisteeae. Die Genisteeae haben mit den Thermopsidae/Podalyrieae, diese wiederum mit den Sophoreae, die die Basis der Papilionoideae bilden, gemeinsame Vorfahren. Die Gattung *Lupinus* selbst zerfällt in mehrere mehr oder weniger deutlich getrennte Gruppen: Erstens die Gruppe der den einfachblättrigen Lupinen nahestehenden Arten aus dem östlichen Südamerika (Argentinien, Brasilien). Zweitens die Altweltarten, bei denen sich die Gruppe der rauhsamigen Arten (Scabrispermae) deutlich von den glattsamigen Arten (Malacospermae) unterscheidet. Drittens die glattsamigen *Lupinus*-Arten mit der Untergruppierung *L. angustifolius*, *L. hispanicus* und *L. luteus* und die Gruppe der nordamerikanischen Arten und südamerikanischen Arten westlicher Verbreitung. Die letztgenannte Gruppe bildet auch die jüngste und am wenigsten differenzierte Untergruppe der Lupinen. Hier ließen sich Gruppierungen um *L. mutabilis*, *L. nanus*, *L. microcarpus*, *L. arboreus* und *L. polyphyllus* erkennen, wobei Hybridisierung in dieser Gruppe häufig vorkommt und die Bearbeitung erschwert.

Aufgrund der geringen genetischen Distanzen zwischen den alt- und neuweltlichen Lupinen kann ausgeschlossen werden, daß die Kontinentalverschiebung mit dem jetzigen

Verbreitungsareal der Arten ursächlich im Zusammenhang steht. Vielmehr müssen Ausbreitungswellen (Verfrachtung von Samen im Meer und durch Orkane) in den letzten 10 Millionen Jahren angenommen werden. Nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Lupinen des östlichen Südamerika oder die altweltlichen Arten die ursprünglichen Formen repräsentieren; jedoch sprechen die Sequenzdaten eher für einen altweltlichen Ursprung der Lupinen.

Summary

The genus *Lupinus* consists of 12 species in the Old World (Mediterranean region and North Africa) and more than 200 species in the New World (North and South America). Similar morphological characters made classification and division of the genus difficult. Employing DNA-sequences (rbcL gene and ITS-region of rDNA) it is possible to solve some of the questions concerning the phylogeny of the lupins: The genus *Lupinus* forms a monophyletic group belonging to the tribe Genisteae; a separation as a tribe of its own does not appear appropriate. Genetic distances show that *Lupinus* and *Genista* are the largest genera of the Genisteae. The Genisteae share ancestry with the Thermopsidae/Podalyrieae and the Sophoreae, which represent basic taxa of the Papilionoideae. The genus *Lupinus* itself is divided into several more or less distinct groups: First the species from the eastern part of South America (Argentina and Brasil). Second the Old World species, where the rough seeded group (Scabrispermae) is well distinguished from the smooth seeded group (Malacospermae). Third the smooth seeded lupins with a smaller subgroup of *L. angustifolius*, *L. hispanicus* und *L. luteus* form a separate clade and the group of North and South American species with a western distribution. The last mentioned group does also represent the youngest and least differentiated group of the lupins. Some groupings around the species *L. mutabilis*, *L. nanus*, *L. microcarpus*, *L. arboreus* und *L. polyphyllus* are visible, but hybridisation is apparently very common and genetic variability therefore low.

Genetic distances imply that old and new world lupins may have diverged less than 10 million years ago. This disputes the hypothesis that the Old/New world disjunction can be explained in terms of the continental drift theory. A more recent transport of seeds by sea or wind is more plausible. Although some evidence points out the eastern part of South America as the origin of lupins, the sequence data would rather support an Old world origin.

Key words

Leguminosae, Papilionoideae, Genisteae, *Lupinus*, molekulare Phylogenie, cpDNA, Chloroplasten-DNA, RbcL, Rubisco, rDNA, ribosomale DNA, ITS 1 und 2

5.1 Einleitung

Früheste Zeugnisse für die Nutzung von Lupinen durch Menschen geben die Grabbeigaben von *Lupinus albus*-Samen in ägyptischen Gräbern, die auf etwa 2000 Jahre vor Christus datiert wurden (GLADSTONES, 1976). Erste schriftliche Überlieferungen finden sich bei HIPPOKRATES VON KOS (400-356 v. Chr.) und bei THEOPHRAST (372-288 v. Chr.), mit dessen Werken die botanische Literatur überhaupt erst begann. THEOPHRAST lieferte eine genaue Beschreibung des Lupinenanbaus: Bereits damals wurden Lupinen auf sandigen Böden als Winterfrucht angebaut und er wies auch auf das Problem der aufspringenden Hülsen hin. CATO (234-149 v. Chr.) und VARRO (116-27 v. Chr.) beschrieben die Verwendung der Lupine zur Gründüngung und Viehfutter, ebenso ihre Entbitterung durch Kochen und Wässerung.

Um die Zeitenwende erschienen die landwirtschaftlichen Werke von HORAZ (65-8 v. Chr.) und VIRGIL (70-19 v. Chr.). Lupinen wurden als Getreidevorfrucht zusammen mit anderen Leguminosen angebaut. Bereits zu dieser Zeit wurden gewässerte und gesalzene Lupinensamen als "Snack" gegessen, wie heute noch in einigen südeuropäischen Ländern oder in Ägypten.

Auch medizinisch wurde die Lupine verwendet (DIOSKORIDES AUS ANAZARBOS, 1. Jahrh. n. Chr.); so z.B. innerlich als Wurmmittel, äußerlich gegen Geschwüre und Hautkrankheiten. Lupinenmehl wurde ferner als Kosmetikum zur Hautverbesserung eingesetzt. Die erste deutschsprachige Erwähnung, die nur die medizinische Verwendung enthält, ist bei HILDEGARD VON BINGEN (1098-1178) zu finden (HANELT, 1960). Bis zum Erscheinen der "Kräuterbücher" im 16. Jahrhundert (BRUNFELS, 1530; BOCK, 1539; FUCHS, 1542) gab es keine weiteren botanischen Werke. Auch die Beschreibungen der Kräuterbücher gehen hauptsächlich auf die antiken Werke zurück. Drei *Lupinus*-Arten waren zu dieser Zeit bekannt, *L. albus*, *L. luteus* und *L. angustifolius*, später wurden noch *L. pilosus* und *L. micranthus* beschrieben.

Ende des 17. Jahrhunderts wurden die ersten amerikanischen Lupinen (*L. perennis*, *L. polyphyllus*) nach Europa gebracht. In der ersten Ausgabe von SPECIES PLANTARUM beschrieb LINNÉ 1773 sechs Arten: *L. perennis*, *L. albus*, *L. varius*, *L. hirsutus*, *L.*

angustifolius, *L. luteus*. Anfang des 19. Jahrhunderts entstanden die Arbeiten von DE CANDOLLE (1825, 36 Arten) und AGARDH (Synopsis Generis Lupini, 1835, 76 Arten), wobei die Arbeit von AGARDH die letzte Gesamtmonographie der Gattung darstellt. AGARDH teilte die ihm bekannten Arten in Gruppen auf, denen er die Namen der "Leitart" gab (zum Beispiel "albi", "lutei", "angustifoli"). Die Zusammensetzung der Gruppen ergibt aber keinen phylogenetischen Sinn ("albi" zum Beispiel enthält *L. mutabilis*, "angustifoli" *L. nanus*). Die einzige spätere Beschreibung der gesamten Gattung mit ihrer Untergliederung findet sich bei TAUBERT (1894). Alle anderen wichtigen Systematiker, etwa BENTHAM (1865) oder HUTCHINSON (1964) beschrieben die Gattung nur noch oberflächlich, obwohl die übrigen Genistee sehr fein unterteilt wurden.

Die Bearbeitung der nord- und südamerikanischen Arten durch SMITH (1938-45) hat insofern Verwirrung gestiftet, als er insgesamt etwa 600 Arten von fragwürdigem Status beschreibt. SMITH (1941) und vor ihm WATSON (1873) versuchen aber als einzige eine Untergliederung der nordamerikanischen Arten. Es stehen heute also nur Bearbeitungen von Teilen der Gattung zur Verfügung, zusätzlich natürlich regionale Floren, wobei die südamerikanischen Arten vergleichsweise schlecht erfaßt sind. Lupinen der Alten Welt wurden von GLADSTONES (1974) und PLITMAN (1981) die der Neuen Welt von WATSON (1873), SMITH (1944), DUNN (1966), PHILLIPS (1955) und PLANCHUELO (1984) systematisch bearbeitet.

Wahrscheinlich war die Größe und schlechte Zugänglichkeit der Gattung an der mangelhaften Bearbeitung schuld; auch die Ähnlichkeit der morphologischen Merkmale machte eine Einordnung immer schwer. Aber nicht nur die Beziehungen innerhalb der Gattung sind aufgrund morphologischer Daten schwierig zu erkennen, auch die Stellung innerhalb der Papilionoideae und des Tribus Genistee wurde aufgrund der abweichenden Morphologie (meist vielfach gefingerte Blätter, überwiegend krautiger Wuchs, häufig blaue oder mehrfarbige Blüten in Trauben, ein abweichender Wurzelknöllchen-Typ) oft diskutiert, so daß sie bereits als eigener Tribus abgetrennt wurde (HUTCHINSON, 1964).

Durch die Verwendung molekularer Marker lassen sich erstmals die Grenzen überschreiten, die durch das Fehlen gemeinsamer morphologischer Merkmale bei weiter entfernt stehenden Pflanzengruppen gegeben waren. Zudem spielen konvergente Entwicklungen hier nur eine untergeordnete Rolle. Zwei Gene beziehungsweise Genbereiche erwiesen sich für taxonomische und phylogenetische Fragestellungen als besonders geeignet: Das im Chloroplastengenom lokalisierte RbcL-Gen, das für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase kodiert und der Bereich der ribosomale RNA

kodierenden Gene des Kerngenoms (rDNA) (CHASE, 1993; DOYLE et al., 1992, DOYLE, 1994; SOLTIS et al., 1992). Durch die zentrale Funktion der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase bei der Photosynthese (Fixierung von CO₂) weist das RbcL-Gen niedrige Mutationsraten auf und ist besonders für die tieferen Verzweigungen des Stammbaumes geeignet. Die Analyse von RbcL-Sequenzen wurde in dieser Arbeit zur Abklärung verwandter Gruppen von *Lupinus* verwendet (Abb. 1).

Die Gene für die ribosomale RNA liegen in sogenannten "Tandem Repeats" vor, wobei die Repeats von 18S-, 5,8S- und 26S-RNA immer wieder aufeinander folgen und durch nicht kodierende Bereiche, sogenannte "Spacer"-Bereiche, getrennt werden. Diese Spacerbereiche weisen erhöhte Mutationsraten auf und sind vor allem für die feineren Verzweigungen des Stammbaumes geeignet. Die hier untersuchten ITS (Internal Transcribed Spacer)-Bereiche liegen zwischen 18S und 5,8S-rDNA (ITS1) und 5,8S und 26S-rDNA (ITS2). Die Auswertung der ITS-Sequenzen wurde für die Analysen herangezogen, die die Verzweigungen innerhalb der Gattung *Lupinus* aufzeigen sollten (Abb. 2-4).

5.2 Material und Methoden

DNA-Isolation

Aus frischem Pflanzenmaterial wurde Gesamt-DNA nach einer modifizierten Vorschrift der CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode extrahiert (DOYLE & DOYLE, 1990). Die wichtigsten Quellen für Pflanzenmaterial waren der Botanische Garten Heidelberg und eigene Sammlungen an Wildstandorten. Samenmaterial von *Lupinus* wurde hauptsächlich über den Samentausch Botanischer Gärten und von den Samenbanken der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL) und des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK) bezogen. Eine detaillierte Ausstellung der Herkünfte ist in KÄSS (1995) zu finden.

Polymerasekettenreaktion, PCR

Mit den PCR-Primern RbcL-N (5' ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC 3') und RbcL-R (5' TATCCATTGCTGGGAATTCAAATTG 3'), die Anfang und Ende des RbcL-Gens flankieren, wurde ein 1420 bp großes DNA-Stück amplifiziert.

Um die ITS-Bereiche der rDNA zu amplifizieren, wurden die Primer ITS18 (5' GTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGG 3') und ITS26 (5' GCCGTTACTAAGGGAA

TCCTTGTTAG 3') konstruiert, die am Ende des 18SRNA-Gens (ITS18) beziehungsweise am Anfang des 26SRNA-Gens (ITS26) liegen und ein etwa 700 bp langes Produkt ergeben.

Für eine PCR wurden 1 µg DNA, je 25 pmol der Primer, 1,5 mM MgCl₂ und 2 U Taq-Polymerase (Promega) eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte in einem Biometra Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm: nach einer erstmaligen Denaturierung von 2 min bei 94° C folgten 30 Zyklen mit je 45 sec bei 94° C (Denaturierung), 45 sec bei 45° C (Annealing) und 1 min bei 72° C (Verlängerung). Nach Ablauf der Zyklen folgte ein abschließender Verlängerungsschritt von 4 min bei 72° C. Die Reaktion wurde schließlich durch Abkühlen auf 4° C gestoppt.

Zur Überprüfung der Amplifizierung wurden 5-10 ml des Reaktionsgemisches auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung des doppelsträngigen PCR-Produktes erfolgte nach dem Prinzip der Didesoxysequenzierung (SANGER et al., 1977) nach dem SEQUENASE-PCR-PRODUCT-SEQUENCING KIT-Protokoll (USB-Amersham) unter Verwendung von [α-³⁵S]dATP. Um das gesamte PCR-Produkt zu sequenzieren mußten mehrere Sequenzreaktionen mit verschiedenen Sequenzierprimern ausgeführt werden (Rbcl: NR: ab 399 bp reverse, 5'-ATTCGCAAATCTTCCAGACG-3', 0F: ab 174 bp, 5'-GCCGAATCTTCTACTGGTAC-3', 2F: ab 426 bp, 5'-TGCTTATGTTAAAACCTTCC-3', 3F: ab 635 bp, 5'-TGCGTTGAGAGACCGTTTC-3', 1R: ab 1207 bp reverse, 5'-GGGTGCCCTAAAGTTCCTCC-3', RF: ab 1105 bp, 5'-TATTCACTCAGGATTGGG-3').

ITS-Bereich: S1: ab 61bp der 5,8s r-DNA reverse, 5'-CGCATTTCGCTACGTTCTTC-3', S2: ab 101 bp der 5,8s r-DNA, 5'-TCTTTGAACGCAAGTTGCGC-3', S3: ab 23 bp vor ITS1, 5'-AACCTGCGGAAGGATCATTG-3', S4: ab 23 bp nach ITS2 reverse, 5'-TAGCCCCGCTGACCTGAGG-3', S5: ab 124 bp der 5,8s r-DNA reverse, 5'-TTCGGGCGCAACTGCGTTC-3', S6: ab 19 bp der 5,8s r-DNA, 5'-ATATCTCGGCTCTTG CATCG-3').

Die Sequenzreaktionen wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (6 % Polyacrylamid/7 M Urea) bei 65 W elektrophoretisch getrennt. Das getrocknete Gel wurde dann für 3-4 Tage auf einen Röntgenfilm (USB-Amersham) aufgelegt, danach entwickelt (x-ray developer und fixer, Kodak).

Sequenzanalyse

Pro Sequenzreaktion konnten etwa 350 Basen gelesen werden. Diese Teilsequenzen wurden zur Gesamtsequenz zusammengefaßt. Die Gesamtsequenzen der unterschiedlichen Taxa wurden dann unter Verwendung der Sequenz von *Lupinus polyphyllus* als Leitsequenz zu einer Matrix zusammengestellt (Alignment), in der homologe Basen untereinander stehen und die die Grundlage der Computerauswertung bildet. Die Sequenzen werden in der EMBL-Datenbank veröffentlicht werden.

Die Auswertung der Matrix erfolgte mit Computerprogrammen, die entweder aufgrund der Berechnung einzelner homologer Positionen ("Maximum Parsimony"-Methoden; PAUP 3.1.1, SWOFFORD, 1993) oder durch Berechnung der Distanz zwischen zwei Sequenzen ("Neighbour-Joining"-Methoden; MEGA, KUMAR et al., 1993) phylogenetische Bäume erstellen. Da die Analyse fast immer identische Ergebnisse erbrachte, werden in dieser Arbeit nur die Stammbäume der "Maximum Parsimony"-Analyse dargestellt.

Wurde bei der Analyse nur ein Stammbaum gefunden, so erfolgt die Darstellung als Phylogramm, das genetische Distanzen (Anzahl der Nukleotidsubstitutionen) in die graphische Darstellung einbezieht (Abb. 1-2). Wurden mehrere Stammbäume gefunden, werden sie als "Strict Consensus"-Kladogramm dargestellt, hierbei werden nur die Verzweigungen gezeigt, die allen Stammbäumen gemeinsam sind (Abb. 3-4).

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Um die Gattung *Lupinus* in den Gesamtzusammenhang der Papilionoideae stellen zu können, wurden Arten aus verschiedenen Triben der Leguminosae in die Analyse einbezogen (Abb. 1). Insgesamt wurden 19 Taxa der Leguminosae und 32 Taxa von *Lupinus* analysiert. Eine ausführlichere Behandlung verwandter Gruppen und Triben innerhalb der Unterfamilie (UF) Papilionoideae ist in KÄSS & WINK (1995) zu finden.

Die Stellung der Gattung *Lupinus* innerhalb der Papilionoideae

Die Papilionoideae bilden eine monophyletische Gruppe, die auf die Caesalpinioideae zurückgeht (DOYLE, 1994; KÄSS & WINK, 1996), daher wurde zunächst *Cercis siliquastrum* (UF Caesalpinioideae) als "Outgroup" verwendet (Abb. 1). Die Wurzelung eines Baumes anhand einer "Outgroup" geht von der Überlegung aus, daß von gemeinsamen Vorfahren Merkmale übernommen werden. Je mehr gemeinsame Merkmale ein Taxon mit der "Outgroup" verbindet, umso näher muß dieses Taxon zur Wurzel des Baumes stehen.

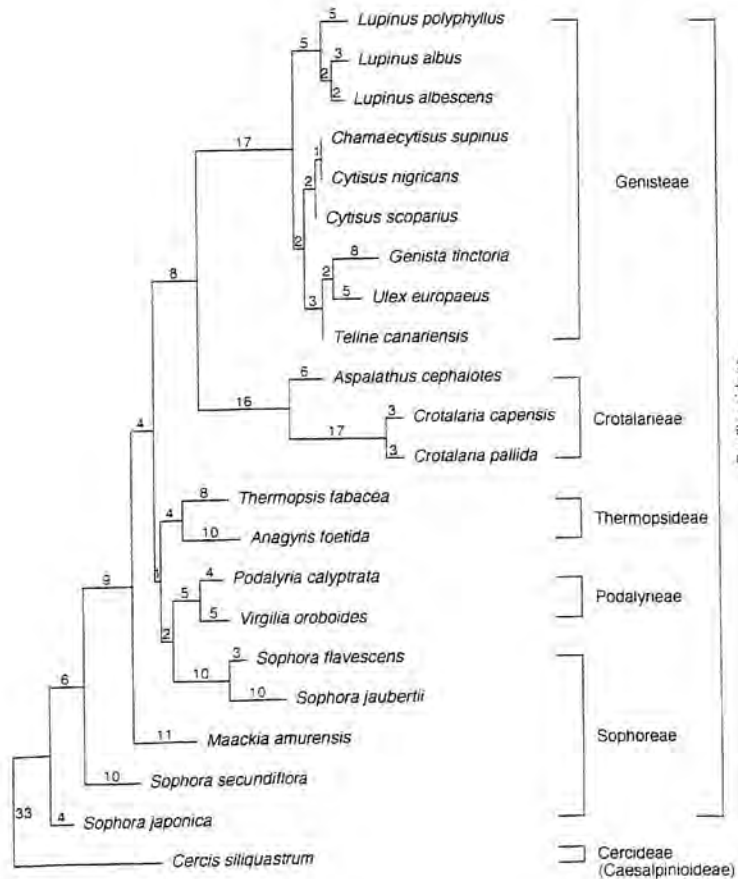


Abb. 1: Phylogramm der Verwandtschaftsbeziehungen von Vertretern der Papilionoideae aus einer "Branch and Bound"-Suche mit *Cercis siliquastrum* als "Outgroup". Die Werte geben die Anzahl der Basenaustausche im entsprechenden Abschnitt des Astes an (Länge 249, min/max Länge 183-545; CI=0,735, HI=0,265, RI=0,818, RC =0,601).

Die frühesten Verzweigungen der Papilionoideae werden von Vertretern der Sophoreae gebildet, die aber in mehreren Ästen zu finden sind und bereits auf den schwierigen Status dieser polyphyletischen Gruppe hinweisen. Alle weiteren Triebe zweigen dann von den Sophoreae ab, wobei der Weg zu den Genisteae und *Lupinus* über die Thermopsidae/Podalyrieae und Crotalariae führt. Die beiden Triebe Crotalariae und Genisteae bilden Schwestergruppen; aufgrund der Anzahl der Basenaustausche erscheinen sie als die am weitesten entwickelten Triebe innerhalb der Papilionoideae.

Die Genisteae bilden eine monophyletische Abstammungsgemeinschaft. Innerhalb der Genisteae lassen sich drei Gruppen erkennen, die eigentlichen Ginster, unterteilt in 1. *Cytisus* (*Cytisus* und *Chamaecytisus*)- und 2. *Genista* (*Genista*, *Ulex* und *Teline*)-Gruppe, und 3. die durch eine höhere Zahl von Basenaustauschen abgetrennte Gattung *Lupinus*. Betrachtet man die genetischen Distanzen innerhalb dieser Gruppen, so wird das Problem taxonomischer Rangstufen innerhalb der Genisteae deutlich: Die Gattung *Lupinus* erreicht etwa gleich hohe Distanzen wie die *Cytisus*- bzw. *Genista*-Gruppen, die aber je nach Autor bis zu 20 Gattungen zählen (BISBY, 1981). Hier macht sich die weitaus intensivere Bearbeitung der Ginster bemerkbar, der sich auch in den Gattungsgrößen niederschlägt. Der Versuch, einheitliche Maßstäbe anzulegen, würde zum Kollabieren vieler Gattungen der Genisteae führen oder aber *Lupinus* müsste als Subtribus in mehrere Gattungen unterteilt werden.

Gruppierungen und Zusammenhänge innerhalb der Gattung *Lupinus*

Für die Stammbäume der Gattung *Lupinus* wurde der zu den Genisteae zählende Goldregen, *Laburnum anagyroides* als "Outgroup" gewählt (Abb. 2-4). Würde weiterhin *Cercis siliquastrum* als "Outgroup" verwendet, so würde zuviel Information der Sequenzdaten verloren gehen, da *Cercis* von der Gattung *Lupinus* zu weit entfernt steht.

- Alle geographischen Gruppen von *Lupinus*

Dieser Datensatz soll zunächst einen Überblick über die verschiedenen geographischen Gruppen geben (Abb. 2). In den aus ITS-Sequenzen aufgestellten Bäumen zeigt sich eine Dreiteilung innerhalb der Gattung:

- Der erste Ast enthält die südamerikanischen Arten östlicher Herkunft mit der deutlich abweichenden Art *L. paraguayensis*. Dieser Ast wird als erster abgetrennt, die frühere Trennung ist aber nur durch ein Merkmal abgesichert.
- Die rauhsamigen Arten (*L. princei*, *L. pilosus* und *L. cosentinii*) bilden den zweiten Ast, die zwar eindeutig abgetrennt werden, aber als Gruppe sehr dicht zusammenstehen.

- Zuletzt trennt sich die Gruppe, der die nord- und südamerikanischen Arten westlicher Verbreitung und die in eher basaler Stellung stehenden glattsamigen Altweltarten (*L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. albus*) angehören.

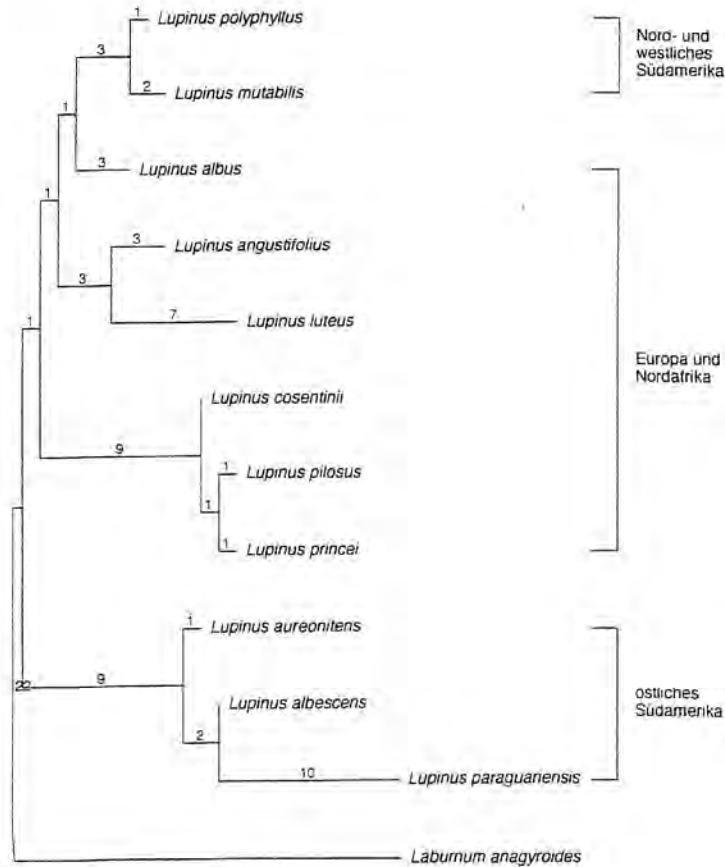


Abb. 2: Phylogramm von Vertretern der Gattung *Lupinus* aus einer "Branch and Bound"-Suche mit *Laburnum anagyroides* als "Outgroup". Die Werte geben die Anzahl der Basenaustausche im entsprechenden Abschnitt des Astes an (Länge 81, min/max Länge 72-133; CI=0,889, HI=0,111, RI=0,852, RC=0,758).

Nach diesen Bäumen käme für den Ursprung der Gattung *Lupinus* am ehesten Europa/Afrika oder Südamerika in Frage. Ein Ursprung in Nordamerika, -heute ein Hauptverbreitungsgebiet von *Lupinus*-, erscheint eher unwahrscheinlich. Ob ein europäisch-afrikanischer oder südamerikanischer Ursprung anzunehmen ist, läßt sich nicht sicher feststellen, da die Trennung dieser Linien etwa zeitgleich erfolgte und jeweils nur durch einen Basenaustausch gekennzeichnet ist.

- *Lupinus*-Arten der Alten Welt

Die Auswertung des ITS-Datensatzes (Abb. 3) zeigt innerhalb der Altweltarten von *Lupinus* wiederum eine Dreiteilung. Es wurden jeweils mehrere Individuen verschiedener Herkünfte bearbeitet, die mit römischen Zahlen gekennzeichnet sind:

- Die deutlichste Abtrennung erfahren die rauhsamigen *Lupinus*-Arten (*Scabrispermae*), die sich durch eine hohe Zahl von Basenaustauschen von den übrigen Altweltarten unterscheiden, aber innerhalb der Gruppe nur wenig Variabilität zeigen.

Die glattsamigen *Lupinus*-Arten (*Malacospermae*) sind klar in zwei Gruppen getrennt:

- Erstens die Gruppe mit *L. albus* und *L. micranthus*, die aber keine besondere Affinität zueinander haben, wie die Zahl der Basenaustausche zwischen beiden Taxa zeigt.
- Zweitens die Gruppe mit *L. angustifolius*, *L. hispanicus* und *L. luteus*, die zwar deutlich differenziert sind, aber doch eng zusammenstehen.

Geht man bei den Altweltarten von *Lupinus* davon aus, daß die hohe Zahl der Basenaustausche des ITS-Bereiches ein verlässliches Bild ergibt, so resultieren ganz klar die beiden Gruppen *Scabrispermae* und *Malacospermae*. Weniger eindeutig ist das Ergebnis innerhalb der *Scabrispermae*, die auch nach den ITS-Bereich-Daten so eng zusammenstehen, daß die Frage, ob es mehrere Arten oder vielleicht nur Unterarten einer polytypischen Art sind, schwierig zu beantworten sein wird.

- *Lupinus*-Arten Nordamerikas und des westlichen Südamerikas

Den wenigen europäisch-afrikanischen *Lupinus*-Arten stehen möglicherweise mehrere hundert nord- und südamerikanische Arten gegenüber, wobei der Artstatus häufig nicht klar ist. Gerade die nordamerikanischen Arten scheinen, geht man von ihrer Hybridisierungsneigung aus, zumindest in Teilen noch im Stadium der Artbildung begriffen zu sein.

Der Datensatz des ITS-Bereiches (Abb. 4) brachte zwar eine Differenzierung, aber die Gruppierungen sind oft nur durch einzelne Basenaustausche gestützt:

- Deutlich differenziert durch die Zahl der Basenaustausche ist vor allem die *L. microcarpus*-Gruppe.

- Ebenfalls noch gut getrennt werden die einjährigen Arten *L. nanus*/*L. polycarpus* und die Vertreter des westlichen Südamerikas, *L. mutabilis* und *L. cruckshanskii*.
 - Zwei weitere undeutlich getrennte Gruppe umfassen hauptsächlich strauchige Arten (*L. albifrons*, *L. arboreus*, *L. rivularis*) beziehungsweise Arten, die von ihrer geographischen Herkunft eher nach Mittelamerika tendieren (*L. aschenbornii*, *L. elegans* und *L. pubescens*).
- Eine Auflösung der Topologie der Bäume des ITS-Datensatzes ist hier aber kaum noch möglich, da mehr Taxa als informative Merkmale vorhanden sind. Auch scheint es eine fast gleichzeitige Aufspaltung verschiedener Linien gegeben zu haben. Zusätzlich erschwert wird die Auswertung durch die häufig Hybridisierung von Arten. Dies dürfte auch der Grund dafür sein, daß zum Beispiel *L. polyphyllus*, *L. arcticus*, *L. perennis* und *L. nootkatensis* keine Sequenzvariation zeigen.

Biogeographie und Phylogenie der Gattung *Lupinus*

Für die Biogeographie und Phylogenie der Gattung *Lupinus* wurden in der Literatur viele Möglichkeiten diskutiert:

- Die Entwicklung als eigene Linie, die direkt von den südamerikanischen Sophoreae ausgeht und die mit den Genisteae nicht näher verwandt ist (DUNN, 1971).
- Die Entwicklung ausgehend von *Crotalaria* ebenfalls mit Südamerika als Entstehungszentrum (GROSS, 1984).
- Die Entwicklung ausgehend von den Thermopsidae (*Thermopsis*) mit Zentrum Nordamerika und einer späteren Verbreitung nach Europa/Afrika. Die rau- und glattsamigen Arten könnten dabei entweder gemeinsam entstanden sein oder getrennte Linien darstellen (PLITMANN, 1981).
- Die Entwicklung aus primitiven Formen der Genisteae im Mittelmeerraum und eine spätere Ausbreitung nach Nord- und Südamerika (CRISTOFOLINI & FEOLICHIAPPELLA, 1984).
- Die Entwicklung gemeinsam mit den restlichen Genisteae ausgehend von den Thermopsidae (im sino-himalayischen Raum; TURNER, 1981) und spätere Besiedlung des Mittelmeerraumes und Amerikas (CRISTOFOLINI, 1989).

Aufgrund der Auswertung der molekularen Daten lassen sich folgende Aussagen machen: Die Thermopsidae/Podalyrieae und Genisteae lassen sich mit ziemlicher Sicherheit auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen. Die Trennung von den Thermopsidae/Podalyrieae hätte demnach, vorausgesetzt, daß die Kombination von molekularen Daten und Fossilfunden ein verlässliches Bild gibt, vor etwa 20 Millionen Jahren stattgefunden (HERENDEEN, 1992; KÄSS, 1995). Danach wäre am ehesten ein sino-himalayischer Ursprung, ausgehend von

einem gemeinsamen Vorfahren mit den Thermopsidae zu vermuten. Der Mittelmeerraum würde dann ein sekundäres Zentrum der Verbreitung der Genisteae darstellen.

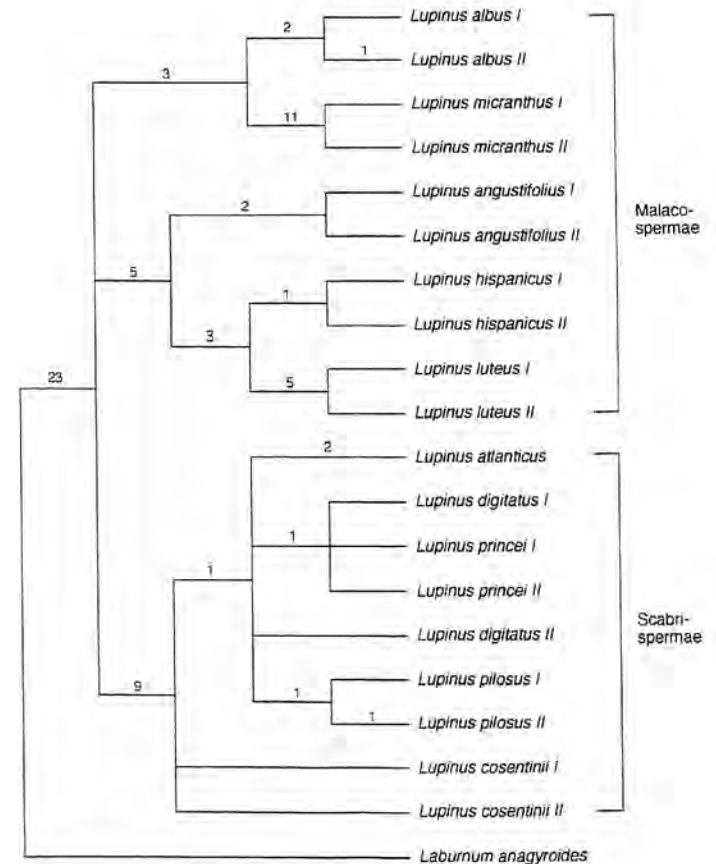


Abb. 3: "Strict Consensus" Kladogramm aus 3 Bäumen einer "Branch and Bound"-Suche von Vertretern der Gattung *Lupinus* mit *Laburnum anagyroides* als "Outgroup". Die Werte geben die Anzahl der Basenaustausche im entsprechenden Abschnitt des Astes an (Länge 70, min/max Länge 64-214; CI=0,914, HI=0,086, RI=0,960, RC=0,878).

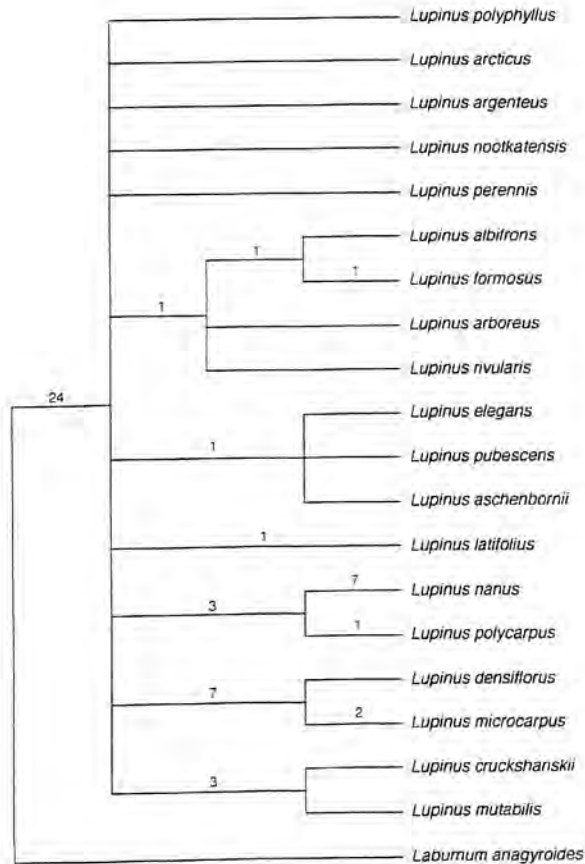


Abb. 4: "Strict Consensus" Kladogramm aus 21 Bäumen einer "Branch and Bound"-Suche von Vertretern der Gattung *Lupinus* mit *Laburnum anagyroides* als "Outgroup". Die Werte geben die Anzahl der Basenaustausche im entsprechenden Abschnitt des Astes an (Länge 52, min/max Länge 47-72; CI=0,904, HI=0,096, RI=0,800, RC=0,723).

Eine Entwicklung der Gattung *Lupinus* aus der Gattung *Crotalaria* ist nach den molekularen Daten sicher auszuschließen; beide Gattungen gehen aber auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück (Abb. 1). Ebenfalls auszuschließen ist eine direkte Verwandtschaft mit den Sophoreae. Gegen Südamerika als Entstehungszentrum würde sprechen, daß keine der nah verwandten Gruppen und Triben dieser Region entstammen.

Den molekularen Daten zufolge clustern die rauhsamigen *Lupinus*-Arten mit den südamerikanischen und die *L. angustifolius*-Gruppe (und *L. albus*) mit den nordamerikanischen *Lupinus*-Arten (Abb. 2). Danach hätte die Besiedlung der neuen Welt mindestens zweimal stattgefunden. Die Berechnung der Divergenzzeiten anhand der Distanzen des ITS-Bereiches ergab für beide Trennungen sehr unterschiedliche Werte. Die früheste Trennung innerhalb der Gattung dürfte etwa 7 Millionen Jahre zurückliegen und betrifft die Trennung der südamerikanischen Arten östlicher Verbreitung und der rauhsamigen *Lupinus*-Arten. Die Trennung der rauhsamigen und glattsamigen Arten erfolgte vor etwa 3-4 Millionen Jahren. Die jüngste Trennung betrifft die Trennung der glattsamigen Arten und der nord- und südamerikanischen Arten westlicher Verbreitung (KÄSS, 1995).

Die geographische Verteilung der Lupinenarten kann daher unmöglich mit dem Auseinanderdriften der Kontinente zusammenhängen (wie manchmal angenommen wurde), da deren geographische Lage zu diesem Zeitpunkt bereits in etwa der heutigen Lage entsprach.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß *Lupinus*-Arten zunächst mit den restlichen Genisteeae den Mittelmeerraum besiedelten, danach aber mindestens in zwei Wellen die Neue Welt besiedelten.

Die nordamerikanischen *Lupinus*-Arten stehen nach den molekularen Daten immer am Ende der Entwicklungslinie. Obwohl vielleicht die hohe Artenzahl in Amerika einen neuweltlichen Ursprung der Lupinen implizieren könnte, scheint ein Ursprung in Nordamerika unwahrscheinlich zu sein. Welche Wege die Lupinen tatsächlich genommen haben, ist heute aufgrund fehlender Reliktorkommen, zum Beispiel im asiatischen Raum, nur schwer nachzuvollziehen. Zumindest hätten verschiedene Zwischeneiszeiten mit Landbrücken eine Verbreitung nach Nordamerika ermöglicht. Ob für die Besiedlung Europa/Afrika und Südamerika ein "long range dispersal" (durch Vögel) in Frage kommt, wie DUNN (1971) ihn für die einfachblättrigen Lupinen in Florida postuliert hat, kann nicht gesagt werden, denn auch an eine Verdriftung der Samen im Meer oder noch eher durch die Luft (durch Orkane und Zykclone) muß gedacht werden.

Auch unser auf molekularen Daten fußender Vorschlag zur Phylogeographie der Gattung *Lupinus* bleibt eine, wenn auch plausible Spekulation, da die Evolutionsraten zu gering sind, um klarere Zuordnungen treffen zu können.

Dank: Wir danken für die Unterstützung der Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogrammes "Molekulare Grundlagen der Evolution bei Pflanzen" (Wi 719/8-1,2).

5.4 Literatur

- BENTHAM, G.: Leguminosae. In: Genera Plantarum, Vol 1(2), Bentham, G., Hooker, J.D. (Hrsg.). Reeve and Co., London, 434-600 (1865)
- BISBY, F.A.: Genisteae (Adans.) Benth. (1865). In: Advances in Legume Systematics Vol.I. POLHILL, R.M., & RAVEN, P.H. (Hrsg.), Royal Botanic Gardens, Kew, 409-425 (1981)
- CARSTAIRS, S.A., BUIRCHELL, B.J. & COWLING, W.A.: Chromosome number, size and interspecific crossing ability of three Old World lupins, *Lupinus princei* Harms, *L. atlanticus* Gladstones and *L. digitatus* Forskål, and implications for cyto-systematic relationships among the rough-seeded lupins. Journal of the Royal Society of Western Australia 75, 83-88 (1992)
- CHASE, M.W., et al.: Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. Annals of the Missouri Botanical Garden 80, 528-580 (1993)
- CHRISTOFOLINI, G., & CHIAPPELLA, L.F.: Origin and diversification of Genisteae (Fabaceae): a serosystematic purview. Webbia 38, 105-122 (1984)
- CRISTOFOLINI, G.: Serological relationships among Sophoreae, Thermopsidae and Genisteae (Fabaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 94, 421-432 (1987)
- CHRISTOFOLINI, G.: A serological contribution to the systematics of the genus *Lupinus* (Fabaceae). Plant Systematics and Evolution 166, 265-278 (1989)
- DE CANDOLLE, A.P.: Prodrromus Systematis Naturalis, Vol. 2. Treuttel & Würtz, Paris (1825-27)

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L.: Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-15 (1990)
- DOYLE, J.J., LAVIN, M. & BRUNEAU, A.: Contributions of molecular data to papilionoid legume systematics. In: Molecular systematics of plants. SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. & DOYLE, J.J. (Hrsg.), Chapman & Hall, New York, 223-251 (1992)
- DOYLE, J.J.: Phylogeny of the legume family: An approach to understanding the origins of nodulation. Annual reviews of Ecology and Systematics 25, 325-349 (1994)
- DUNN, D.B. & GILLETT, J.M.: The lupines of Canada and Alaska. Canada Department of Agriculture, Monograph Nr. 2, Queen's Printer, Ottawa (1966)
- DUNN, D.B.: A case of long range dispersal and "rapid speciation" in *Lupinus*. Transitions of the Missouri Adademy of Sciences 5, 26-38 (1971)
- DUNN, D.B.: Genetic resources: Cytotaxonomy and distribution of new world lupin species. In: Proceedings of the Third International Lupin Conference. International Lupin Association, La Rochelle, France, 68-85 (1984)
- GLADSTONES, J.S.: Lupins of the Mediterranean region and Africa. Western Australian Department of Agriculture, Technical Bulletin 26, 1-48 (1974)
- HANELT, P.: Die Lupinen. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg (1960)
- HERENDEEN, P.S. & DILCHER, D.L. (Hrsg.): Advances in Legume systematics. Part 4: The fossil record. Royal Botanic Gardens, Kew (1992)
- HEYWOOD, V.H. & BALL, P.W.: Leguminosae. In: Flora Europaea, Vol. II (1). TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M., WEBB, D.A. (Hrsg.). University Press, Cambridge, (1968)
- HUTCHINSON, J.: The genera of flowering plants, Vol. 1. Oxford University Press, (1964)
- KÄSS, E.: Molekulare Phylogenie der Schmetterlingsblütler (Familie Leguminosae). Dissertation, Universität Heidelberg (1995)
- KÄSS, E. & WINK, M.: Molecular phylogeny of the Papilionoideae (Family Leguminosae): *rbcl* gene sequences versus chemical taxonomy. Botanica Acta 108, 149-162 (1995)

- KÄSS, E. & WINK, M.: Molecular evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on rbcL-sequences. *Zeitschrift f. Naturforschung* (eingereicht).
- KUMAR, S., TAMURA, K., & NEI, M.: MEGA-Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 1.0. Pennsylvania State University (1993)
- PALMER, J.D., OSORIO, B. & THOMPSON, W.F.: Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Current Genetics* 14, 65-74 (1988)
- PHILLIPS, L.L.: A revision of the perennial species of *Lupinus* of North America exclusive of Southwestern United States. *Research Studies of the State College of Washington* 23, 161-201 (1955)
- PHILLIPS, L.L.: Chromosome numbers in *Lupinus*. *Madroño* 14, 30-36 (1957)
- PLANCHUELO, A.M.: Literature review of the genus *Lupinus*. *Lupine Newsletter* 4, 37-39 (1982)
- PLANCHUELO, A.M. & DUNN, D.B.: The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71, 92-103 (1984)
- PLANCHUELO, A.M.: Taxonomic studies of *Lupinus* in South America. In: *Proceedings of the Third International Lupin Conference*. International Lupin Association, La Rochelle, France, 39-54 (1984)
- PLITMANN, U.: Evolutionary history of the Old World lupines. *Taxon* 30, 430-437 (1981)
- PLITMANN, U. & HEYN, C.C.: Old World lupins: Taxonomy, evolutionary relationships, and links with New World species. In: *Proceedings of the Third International Lupin Conference*. International Lupin Association, La Rochelle, France, 56-66 (1984)
- POLHILL, R.M.: Genisteae (Adans.) Benth. and related tribes. In: *Botanical Systematics* 1. Heywood, V.H. (Hrsg.), 143-380 (1976)
- POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. (Hrsg.): *Advances in Legume systematics*. Part 1+2. Royal Botanic Gardens, Kew (1981)
- RIGGINS, R. & SHOLARS, T.: *Lupinus*. In: *The Jepson Manual, higher plants of California*. Hickman, J.C (Hrsg.), University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 622-636 (1993)

- SMITH, C.P.: *Lupinus*. In: *Illustrated flora of the pacific states* Vol. II. ABRAMS, L. (Hrsg.), Stanford University Press, Stanford University, California, 483-519 (1944)
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. & DOYLE, J.J. (Hrsg.): *Molecular systematics of plants*. Chapman & Hall, New York (1992)
- STIRTON, C.H. (Hrsg.): *Advances in Legume systematics*. Part 3. Royal Botanic Gardens, Kew (1987)
- SWOFFORD, D.L.: PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois (1991)
- TAUBERT, P.: Leguminosae. In: *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Vol. III (3). ENGLER, A., PRANTL, K. (Hrsg.), Engelmann, Leipzig, 70-396 (1894)

6 Von den Archaeobakterien bis zu den Lupinen- Rekonstruktion der zugrundeliegenden Phylogenie anhand von abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der β -Untereinheit der H^+ -ATPase (atpB)

M. Hanke und M. Wink

Universität Heidelberg, Institut für Pharmazeutische Biologie
Im Neuenheimer Feld 364
D-69120 Heidelberg

Zusammenfassung

Ausgehend vom atpB-Gen, das aus einer cDNA-Bank von *Lupinus albus* isoliert wurde, haben wir die abgeleitete Aminosäure-Sequenz mit homologen Sequenzen von über 50 weiteren Organismen aus allen Reichen des Lebens verglichen. Über die Phylogeniemethoden Maximum Parsimony (MP) und Neighbour Joining (NJ) wurde die zugrundeliegende Evolution der A-Typ-, V-Typ- und insbesondere F-Typ (atpB)- H^+ -ATPase untersucht. Beide Verfahren ergaben Stammbäume mit weitgehend identischer Topologie. Die Ergebnisse bestätigen eine Reihe von Annahmen, so z.B. daß alle 3 ATPasen von einem gemeinsamen Vorläufermolekül abstammen, und daß die A- und V-Typ- ATPase näher mit einander verwandt sind als mit der F-Typ-ATPase. Die atpB-Daten liefern eine weitere Bestätigung für die Endosymbionten-Hypothese, daß die Mitochondrien von alpha-Purpurbakterien (oder Vorläufern) und die Plastiden sich von Cyanobakterien (oder Vorläufern) ableiten. Das atpB-Gen eignet sich demnach als Molekularer Marker zur Rekonstruktion der Evolution der F-Typ- H^+ -ATPasen und besonders für die Untersuchung der Evolution der Organellgene der Eukaryonten.

Summary

Starting with the atpB-gene, which we had isolated from a cDNA library of *Lupinus albus*, the derived amino acid sequence was compared with those of more than 50 other organisms covering all major groups of life. The phylogeny methods Maximum parsimony and Neighbour-Joining were employed to reconstruct the evolution of A-type, V-type and F-type (atp b) H^+ -ATPasen. Both methods produced trees with almost identical topologies, which confirm a number of assumptions: All 3 ATPases derive from a common ancestor protein, but A- and V-type ATPase are closer related to each other than to the F-type ATPase. The atp b trees provide another confirmation of the endosymbiont hypothesis, that mitochondria derived

from alpha purple bacteria (or progenitors) and plastids from cyanobacteria (or progenitors). The atp b gene is therefore a good molecular marker to study the evolution of H^+ -ATPasen and of organell genes in eucaryotes.

Key Words: *Lupinus*, atpB; phylogeny; endosymbiont evolution; H^+ -ATPase

6.1 Einleitung

Eine phylogenetische Gliederung der Organismen unserer Erde zu erstellen, ist ein altes Ziel der Biologen. Nach diversen Vorläufermodellen, wurden die Organismen in den 60er Jahren in 5 Reiche eingeteilt: 4 Eukaryontenreiche [Einzeller, Pilze, Pflanzen und Tiere] und 1 Prokaryontenreich (Margulis & Schwartz, 1982). Dieses Konzept wurde durch die Analyse von molekularen Daten (insbesondere DNA- und Protein-Sequenzen) in den letzten Jahrzehnten weiter modifiziert. Woese und Mitarbeiter unterteilten die Bakterien in die Archaeobakterien und Eubakterien (Woese & Fox, 1977; Woese et al., 1990), die den Eukaryonten gegenübergestellt werden. Auf die Analyse von rRNA-Sequenzen fußend hat Cavalier-Smith (1989, 1992) sogar ein "Acht-Reiche"-Konzept aufgestellt, das die folgenden Gruppen enthält: Eubacteria, Archaeobacteria, Archezoa, Protozoa, Chromista, Fungi, Plantae und Animalia. Woese et al. (1990) haben versucht, in einem umfassenden Modell molekulare, biochemische und morphologische Daten zu vereinen. Die Domänen Bacteria (=Eubakterien), Archaea (=Archaeobakterien) und Eucarya (=Eukaryonten) werden jeweils in eine oder mehrere Reiche untergliedert, so z.B. umfaßt die Domäne Eucarya die Reiche Tiere, Pflanzen, Pilze und diverse Einzeller.

Für das Verständnis der Evolution dieser Reiche war die Frage nach der Herkunft der Organelle der Eukaryontenzelle (d.h. Mitochondrien und Chloroplasten) von großer Bedeutung. Da diese Organelle ringförmige DNA und Ribosomen aufweisen, die den Strukturen in Bakterien sehr ähneln, und aufgrund weiterer struktureller und chemischer Merkmale hat man postuliert, daß die Mitochondrien und Chloroplasten auf Bakterien zurückgehen, die von der Urzelle aufgenommen und dann weiter beibehalten wurden (sog. Endosymbionten-Hypothese) (Margulis, 1970). Während man zunächst annahm, daß der Prozeß nur jeweils einmal in der Evolution erfolgte, gehen manche Autoren davon aus, daß Mitochondrien und Plastiden einen polyphyletischen Ursprung haben (Gray et al., 1989).

Um solche evolutionären Zusammenhänge zu klären, hat man bislang die Sequenzen ribosomaler RNA vergleichend analysiert. Aber auch andere DNA- und Protein-Sequenzen hat man als molekulare Marker herangezogen (Avice, 1994). Als Voraussetzung für solche globale

Analysen muß der der Marker in den Organismen aller Reiche vorkommen und ausreichend konserviert sein, um noch informative Merkmale aufzuweisen. In dieser Arbeit wurde das *atpB*-Gen ausgewertet, daß bislang noch nicht in dieser Breite untersucht worden war.

Die H^+ -transportierende ATP-Synthase (auch F_0 - F_1 ATPase genannt) spielt eine fundamentale Rolle in der Energiegewinnung der Zellen. Der ATP-Synthase-Komplex ist ein Transmembran-Multienzymkomplex von über 500 kDa Größe. Bei Eukaryonten liegt dieser Komplex in der inneren Mitochondrienmembran und in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten; bei Bakterien ist er an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert (Alberts et al., 1993).

Der ATP-Synthase-Komplex besteht aus mindestens 8 Untereinheiten. Neben dem Transmembran-Proton-Transporter (F_0 ATPase) enthält sie eine periphere katalytische Domäne (F_1 ATPase), die die eigentliche ATP-Synthase bewirkt. Der Gesamtkomplex ist in der Lage, ATP zu synthetisieren, indem der in Elektronentransportketten aufgebaute Protonengradient ausgenutzt wird. Isolierte F_1 ATPasen hydrolysieren ATP zu ADP und P_i , während rekonstituierte Komplexe ATP aus ADP und P_i synthetisieren können. Strukturell und funktionell ähnliche Proteinkomplexe findet man in Membranen von Bakterien, Mitochondrien und Plastiden. (Alberts et al., 1993).

Da die ATP-Synthase ein wichtiger Prozess von grundsätzlicher Bedeutung ist, wurden die Aminosäure-Sequenzen der ATP-Synthase in allen Organismen, von Bakterien über Pflanzen, Pilzen bis hin zu den Tieren stark konserviert. Deshalb eignen sich ihre Sequenzen heute, um die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Reichen des Lebens und innerhalb der Großgruppen zu analysieren. Insbesondere kann man prüfen, ob die Hypothese, daß die Mitochondrien auf Eubakterien und Chloroplasten auf Cyanobakterien zurückgehen, auch mit diesem molekularen Marker abgesichert werden kann.

Ausgehend vom *atpB*-Gen aus *Lupinus albus*, haben wir in dieser Arbeit versucht, anhand der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von 52 weiteren Organismen aus allen Reichen des Lebens, einen Einblick in die Evolution dieses Proteins und die Endosymbionten-Hypothese zu gewinnen.

6.2 Material und Methode

Aminosäure- und Nucleotidsequenzdaten

Aus einer cDNA Bank aus *Lupinus albus* wurde ein Klon isoliert, der für die B -Untereinheit der H^+ -ATPase kodiert (Hanke, 1995). Aus der Nucleotidsequenz wurde die zugehörige Aminosäuren-Sequenz abgeleitet.

Tab. 1. Alignment der Aminosäure-Sequenzen von A-, V- und F-Typ- H^+ -ATPasen

=Lücke; *= Aminosäure invariabel;

Lalb	M-----SKNTTTTSDPKFSAFQKENP-----
NplC	M-----RINPTTSGSGVSTLEKKNP-----
ZmaC	M-----RTNPTTSRPGISTIEEKSV-----
Taes	M-----RTNPTTSPPGASTIEEKST-----
Mpol	M-----KTNFLAF--GMSTLVAKNI-----
Alyg	M-----KTNPLVF--VVSTAVEKNA-----
Cell	M-----SVST-----ETKSS-----
CreC	M-----PWGILIPLTMSDSIETKNM-----
Egra	M-----KSS-----LRLNT-----
Pdid	M-----VATTETNI-----
Scol	M-----VTTTEKNI-----
ZmaM	MAS---RRVSSLLRSASR---LRAASPAAPRPRAPPH---RPSPAGYL--FNRA
NplM	MAS---RRLASLLRQSAQRGGGLISRLGNSIPKSASRASS---RASPKGFL--LNRA
CreM	MLS---S-----VRLAALRAG-----
Rbla	M-----
Rrub	M-----AKNN-----L-----
Spom	MLK---KQALS-----GIRRFSLAT--KQSFVKTSY---KLPRKSWL--NTAK
NcrM	MPK-----S-----GISAFARTA--RPSFAAASR---RAVRPAAL--NLRA
Rnor	MLS-----LVGRV--ASASASGALRGLNPLAALPQAH-----LL--LRTA
Hsap	MLG---FVGRV--AAAPASGALRRLTPSASLPPAQ-----LL--LRAA
NcrV	MAP--QQNGAEVDGIHTGKIYS---VSGPVVVAEDMIGVAMYELVKGHDQVGVGVIIRL
Dcar	MPSVYGDRLTTFEDSEKESEYGVVRKVSQVVDGMMGAAMYELVVRVGHNDLIGIIRL
Ghir	MPAVYGSRLTTFEDSEKESEYGVVRKVSQVVDGMMGAAMYELVVRVGHNDLIGIIRL
Hsal	M-----
Mbar	M-----VK-----
Saci	M-----SLL--NVR-----
	*
Lalb	-----GRIAQIIG-PVLDVVFPPG-KM
NplC	-----GRVVQIIG-PVLDVAFPPG-KM
ZmaC	-----GRIDQIIG-PVLDITFPPG-KL
Taes	-----GRIDQIIG-PVLDVTFPPG-KL
Mpol	-----GSITQVIG-PVLDVAFSPG-KM
Alyg	-----GYITQIIG-PVLDVAFSPG-KL
Cell	-----GRITQIIG-PVLDVVFPPG-KM
CreC	-----GRIVQIIG-PVLDIVFAKG-QV
Egra	-----GIILQIIG-PVMDISFPPG-KM
Pdid	-----GKITQIIG-PVVDVAFSPG-KM
Scol	-----GYIRQVIG-PVVDVVFPPG-KL
ZmaM	AAAYASSAAAQAPATPPPATGKTGGGKITDEFTGAGATGQVCQVIG-AVVDVRFDEG--L
NplM	VQYATSAAPASQPSTPPKSGSEPSGKITDEFTGAGSITGKVCQVIG-AVVDVRFDEG--L
CreM	NSVFPQAVRAFAEPAATAATDA-----GFVSVQVIG-PVVDVRFDEG--L
Rbla	ATTV-----SKGKVTQVIG-AVVDVQFEGV--L
Rrub	-----GTITQVIG-AVVDVVFEGE--L
Spom	FNTIRYASTEAAKHN-----KGSIKQVIG-AVVDVQFEDADSL
NcrM	PALSRPASSAGV--G-----DGKIYQVIG-AVVDVVF-DTDLK
Rnor	PAGVHPARDYAAQSSAAPKAGT-----ATGQIVAVIG-AVVDVQFDEG--L
Hsap	PTAVHPVRDYAAQTSFSPKAGA-----ATGRIVAVIG-AVVDVQFDEG--L
NcrV	NGDQATIQVYEETAGVMVGDVPLRTHKPLSVELGPGLLNIIYDGIQRPLEKIAEASNSIY
Dcar	EGDSATIQVYEETAGLMVNDPVLRTHKPLSVELGPGILGNIFDGIQRPLKTIARRSGDVI
Ghir	EGDSATIQVYEETAGLMVNDPVLRTHKPLSVELGPGILGNIFDGIQRPLKTIARRSGDVI
Hsal	-----EY-----QTITEVSG-PLVIVE----TDE
Mbar	-----EY-----KITITQIAG-PLVFVE----KTE
Saci	-----EY-----SNISMIGK-PLIAVQ----GVS

Lalb PNIYNALIVKGDQTVGQQINITCEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLS
 NplC PNIYNALIVQGRDVSQGPINVACEVQQLLGNRRVRAVAMSATDGLT-RGMEVIDTGAPIS
 ZmaC PPIYNALIVKSRDADTKQINVTCEVQQLLGNRRVRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLS
 Taes PPIYNALIVKSRDADTKQINVTCEVQQLLGNRRVRAVAMSATDGLM-RGMEVIDTGAPLS
 Mpol PNIYNSLIVKQDQNSAGEEINVTCEVQQLLGNRRVRAVAMSATDGLM-RGMKVIDTGAPLT
 Alyg PNIYNSLIVKQDQNSAGEEINVTCEVQQLLGNRRVRAVAMSATDGLM-RGMKVIDTGAPLS
 Cell PNIYNALTIVGGKNEAGQIEISVTCVQQLLGDHCVRAVAMSATDGLM-RGMEVIDTGAPLN
 CreC PNIYNALTIRAKNSAGTEMAVTCVQQLLGDNCVRAVAMSATDGLM-RGMEVIDTGAPLN
 Egra PNIYNSLLIEGKTESGDRKLVVCEVQQLLGDNVVRAVAMSATDGLQ-RGKVIDTGAPLS
 Pdid PPIILTALEVL-----DNQIRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 Scol PQIYNALIVKGRNEAGQDLSVTCVQQLLGDNRVRAVAMSATDGLV-RGLEVIDTGAPIS
 ZmaM PPIILTALEVL-----DNQIRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 NplM PPIILTALEVL-----DNQIRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 CreM PSILSALEVQ-----GHNVRVLEVAQHMGNVTRVAVMSATDGLV-RGQVRLNTGSPIT
 Rbla PAILNALET-----NNGKKLILEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGAPVSDSGTSPIS
 Rrub PSILSALETD-----NHNRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 Spom PSILNALEVK-----LPDNKRLVLEVAQHVGEVVRTIAMDGTEGLV-RGTAVIDTGSPIS
 NcrM PPIILNALETQ-----NNGQKLVLEVSQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGAKASDTGAPIT
 Rnor PPIILNALEVQ-----GRESRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 Hsap PPIILNALEVQ-----GRETRLVLEVAQHLGEMVVRTIAMDGTEGLV-RGQVRLNTGSPIT
 NcrV IPRGIATPALDRKKKWEFTPT-MKVGDHIAAGDVGTVVENSFIVSVHKILLPPRARGTIT
 Dcar IPRGVSVPALDKDLWDFQPKKIGEGDILLTGGDLYATVFNLSMQ-HHVALPPDAMGKIT
 Ghir IPRGVSVPALDKDLWDFQPKKIGEGDILLTGGDLYATVFNLSMQ-HHVALPPDAMGKIT
 Hsal PTGYDEIVQITPNGDVVRGQVLESSDGFVAIQV----FEGTEGVG-KDASVRFLETGTLK
 Mbar PVGYKEIVTINLPGDTRRGEVLDSSSDIVVVIQI----FEGTTGLD-KECGVVFLETGTLK
 Saci DAAYNELVIEIMPDSGKRRGLVDSQMGVTFVQV----FEGTTGISPTGSKVRFLEGRLE

Lalb VPVGGKTLGRIFNVLGEPIDNL-GPVDTRTTSPIHRSAPAFIQLDTKLSIFETGIKVVDL
 NplC VPVGGATLGRIFNVLGEPVDNL-GPVDTSSTSPHRSAPAFIQLDTKLSIFETGIKVVDL
 ZmaC VPVGGATLGRIFNVLGEPIDNL-GPVDTSATFPIHRSAPAFIELDTKLSIFETGIKVVDL
 Taes VPVGGATLGRIFNVLGEPVDNL-GPVDSSATFPIHRSAPAFIELDTKLSIFETGIKVVDL
 Mpol VPVGEATLGRIFNVLGEPVDNL-GPVEVTTTFPIHRAAPAFIQLDTKLSIFETGIKVVDL
 Alyg VPVGEVTLGRIFNVLGEPVDNL-GPVDAGTTSPIHRSAPAFIQLDTKLSIFETGIKVVDL
 Cell VPVGAATLGRIFNVLGEPVDNL-GPVNTRKQPLIHRSAFVLDLTKLSIFESGIKVVDL
 CreC VPVGKVTLGRIFNVLGEPVDNM-GNVKVEETLPIHRTAPAFVLDLTKLSIFETGIKVVDL
 Egra VPVGVTTLGRIFNVLGEPVDNM-GLIDYSITLPIHRAAPFVLDLTKLSIFETGIKVVDL
 Pdid VPVGRATLGRIFNVLGEPVDNQ-GPVYTAETSPHRAAPKFTDLTKTVPFETGIKVIDL
 Scol VPVGEATLGRIFNVLGEPVDEL-GPVNAATTSPIHRAAPKFTDLTKTVPFETGIKVIDL
 ZmaM VPVGRATLGRIFNVLGEPIDEK-GDIKTNHFLPIHRAAPFVLDLTKLSIFETGIKVVDL
 NplM VPVGRATLGRIFNVLGEPIDEK-GDIKTNHFLPIHRAAPFVLDLTKLSIFETGIKVVDL
 CreM VPVGRATLGRIFNVLGEPIDEK-GDIKTNHFLPIHRAAPFVLDLTKLSIFETGIKVVDL
 Rbla VPVGNATLGRIFNVLGEPIDER-GPIAATEKRAIHQKAPDFQSQSTESQILVTVGKVIDL
 Rrub VPVGPQVLGRIFNVLGEPVDER-GPVVTAQRYPIHRAAPFVLDLTKLSIFETGIKVIDL
 Spom IPVPGPTLGRIFNVLGEPVDER-GPIKAVKYSPIHADAPSFEEQSTTPEILETVGKVIDL
 NcrM IPVGPATLGRIFNVLGEPIDER-GPIKTKQFAPIHAEAPEFIEMSVEQEILVTVGKVIDL
 Rnor IPVGPETLGRIFNVLGEPIDER-GPIKTKQFAPIHAEAPEFIEMSVEQEILVTVGKVIDL
 Hsap IPVGPETLGRIFNVLGEPIDER-GPIKTKQFAPIHAEAPEFIEMSVEQEILVTVGKVIDL
 NcrV RIAEKGXYTVEEKLILEVEFDGKKTETVPMQTPVVRVPPRAAEKHSANQFPL-VGQVRVDA
 Dcar YVAPAGQYSLKDTVLELEFQGVKQPTMLQTPVVRVPPRAAEKHSANQFPL-VGQVRVDA
 Ghir YIAPPQYSLKDTVLELEFQGVKQPTMLQTPVVRVPPRAAEKHSANQFPL-VGQVRVDA
 Hsal MPVTEDLLGRVLDGSGNPIDGG-PDIVPDRVDIVGEAINPHAREYPEEFQTVGSGIDG
 Mbar LPASIDLLGRVLDGSGNPIDGG-PDIVPDRVDIVGEAINPHAREYPEEFQTVGSGIDG
 Saci VKISEEMLGRIFNVLGEPDLNG-PPVIGGKERNINGDIPINPATREYPEEFQTVGSGIDG

Lalb LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 NplC LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 ZmaC LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Taes LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Mpol LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Alyg LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Cell LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 CreC LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Egra LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Pdid LTPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Scol LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 ZmaM LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 NplM LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 CreM LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Rbla LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Rrub IAPYTKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Spom LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 NcrM LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Rnor LAPYRRGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNIKAHGGVS-----VFGGVGERTR
 Hsap LFPVSQGGTVAIPGAFGGCTVVISQSVKFSNSD-----VIVYVCGGERGN
 NcrV LFPVSQGGTVAIPGAFGGCTVVISQSVKFSNSD-----VIVYVCGGERGN
 Dcar LFPVSQGGTVAIPGAFGGCTVVISQSVKFSNSD-----VIVYVCGGERGN
 Ghir LFPVSQGGTVAIPGAFGGCTVVISQSVKFSNSD-----VIVYVCGGERGN
 Hsal MNTLVRRGKLPVIFSGSGLPHSDLALQIARQASVPEEAEATDDDEGSFAVVFAMGITAE
 Mbar TMTLVRRGKLPVIFSGSGLPHSDLALQIARQASVPEEAEATDDDEGSFAVVFAMGITAE
 Saci LNSLRRGSKITDLSGSLPANTLAAQIAKQATVRGEE-----SNFAVVFAAIGVRYD

Lalb EGNLYMEMKESGVINEQNI-AE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 NplC EGNLYMEMKESGVINEENI-AE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 ZmaC EGNLYMEMKESGVINEKNI-EE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Taes EGNLYMEMKESGVINEKNI-EE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Mpol EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Alyg EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Cell EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 CreC EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Egra EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Pdid EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Scol EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 ZmaM EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 NplM EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 CreM EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Rbla EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Rrub EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Spom EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 NcrM EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Rnor EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Hsap EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 NcrV EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Dcar EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Ghir EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Hsal EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Mbar EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN
 Saci EGNLYMEMKESGVINEQNI-SE--SKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDVN

Lalb EQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLSTEMGSLQER--ITS-----TK
Np1C EQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLSTEMGSLQER--ITS-----TK
ZmaC KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLSTEMGSLQER--ITS-----TK
Taes KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLSTEMGSLQER--ITS-----TK
Mpol KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLSTEMGTLQER--ITS-----TK
Alyg KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSASSGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Cell KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
CreC KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Egra KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Pdid KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Scol KQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPASAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
ZmaM GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
Np1M GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
CreM GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
Rbla GTDVLFFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Rrub GQDVLFFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITS-----TK
Spom GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
NcrM GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
Rnor GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
Hsap GQDVLFFIDNIFRFVQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATEMGLQER--ITT-----TK
NcrV GNVAMMADSSRWAEALREISGRLEMPADQGGFPAYLGAALASFYERAGKVKALGSPPR
Dcar GNVSMMDSTSRWAEALREISGRLEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKALGSPPR
Ghir GNVSMMDSTSRWAEALREISGRLEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKALGSPPR
Hsal DYHVLVILDTMTNYCEALRQIGAAAREEVPGRGYPGYMYTDLAQLYERAGRIE-----GK
Mbar DMHVLVILDTMTNYCEALRQIGAAAREEVPGRGYPGYMYTDLAQLYERAGRIE-----GK
Saci DMHVLVILDTMTNYCEALRELSASREVPGRGYPGYMYTDLATLIERAGKVI-----GK

* * * * *

Lalb EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Np1C EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
ZmaC KGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Taes KGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Mpol EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Alyg EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Cell DGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRNLASKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
CreC DGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRNLASKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Egra VGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRNLASKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
Pdid EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDGTTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQA
Scol EGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRGLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQP
ZmaM KGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRQISELGIYPAVDPLDSTSRMLSP
Np1M KGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRQISELGIYPAVDPLDSTSRMLSP
CreM KGSITSVQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTSRMLNP
Rbla AGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
Rrub KGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
Spom KGSITSVQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
NcrM KGSITSVQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRQISELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
Rnor KGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRQISELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
Hsap KGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPATTF AHLDATTVLSRQISELGIYPAVDPLDSTSRMLNDP
NcrV EGSVTVGAVSPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSSVNTVSYSKYLT
Dcar NGSVTVGAVSPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSSVNTVSYSKYLT
Ghir TGSVTVGAVSPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSSVNTVSYSKYLT
Hsal EGSVTVQIPILTMPGDDTHPIPDLTGYITTEGQIVVSRRELHRKGIYPPINVLPSLSRLMNS
Mbar KGSITQMPILTMPGDDTHPIPDLTGYITTEGQIVVSRRELHRKGIYPPINVLPSLSRLMNS
Saci KGSITQMPILTMPGDDTHPIPDLTGYITTEGQIVVSRRELHRKGIYPPINVLPSLSRLMKD

* * * * *

Lalb --RIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Np1C --RIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
ZmaC --RIVG----NEHYETAQRVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Taes --RIVG----NEHYETAQRVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Mpol --WIVG----EEHYETAQGVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Alyg --WIVG----EEHYETAQGVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Cell --WIVG----DQHYQCAQNVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
CreC --WILG----EKHYDSAQSVKKTQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Egra --WIVG----EEHYNTAQS VKKTQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Pdid --GIVG----EDHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Scol --SIVG----EEHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
ZmaM --HVLG----EDHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Np1M --HILG----EDHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
CreM --NII G----AEHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Rbla --QILG----EEHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Rrub --LVVG----EEHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Spom --RILG----EEHYNTARAVQSTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
NcrM --RIVG----QEHYETAQRVKQTLQRYKELQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Rnor --NIVG----SEHYDVARGVQKILQDYKSLQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
Hsap --NIVG----SEHYDVARGVQKILQDYKSLQDI IAILGLDELSEEDRLTVARARKIERFLS
NcrV LDKWYREY PDPFRLDRIRQLLSDSEELDQVQVGVKSAALSDDPKITLDM-----TLIK
Dcar LESFYEKFDSDPDIRTKAREVLRQEDDLNEIVQLVGDALAEADTKITLETA-----KLLR
Ghir LESFYEKFDSDPDIRTKAREVLRQEDDLNEIVQLVGDALAEADTKITLETA-----KLLR
Hsal --GIGEGLTRADHGDVSDQLYAAYAEELRDLNIVGREALSERD-----RYL-
Mbar --GIGAGKTRDHHKVASDQMYAGYAEGRDLRGLVAIVGKALSERD-----KFL-
Saci --GIGEGKTRDHHKLSNQLFAAYARAQDIRGLAAIIGEDSLSEVD-----KYL-

* * * * *

Lalb QPFFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFKLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKATNLEK
Np1C QPFFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFKLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAMNLEM
ZmaC QPFFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFKLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAINLEE
Taes QPFFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFKLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAITLEE
Mpol QPFFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Alyg QPFFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Cell QPFFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
CreC QPFFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Egra QPFFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Pdid QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Scol QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
ZmaM QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Np1M QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
CreM QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Rbla QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Rrub QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Spom QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
NcrM QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Rnor QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Hsap QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
NcrV QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Dcar QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Ghir QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Hsal QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Mbar QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV
Saci QPFFVAEVFTGAPGKYVSLRETIKGFQMLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEATAKAAITLQV

```

Lalb  ESKLKK-----
NplC  ESNLKK-----
ZmaC  ESKLKK-----
Taes  ENKSQK-----
Mpol  ES-----
Alyg  ES-----
Cell  -----
CreC  -----K-----
Egra  -----
Pdid  D-----
Scol  ES-----
ZmaM  ESAS-----
NplM  ESAA-----
CreM  DVAARKDESKKAKSSEALKDVPSLEKMEIGEIKDEVIDADDSLEEDFKAEAISSENMVLNE
Rbla  A-AA-----
Rrub  E-AA-----
Spom  ELAA-----
NcrM  ELEGQA-----
Rnor  EHGS-----
Hsap  EHSS-----
NcrV  -----REATQDLQAQLKSL-KFEVPSSEGQEKICKK--YEAIQQOQLDKFASVIDE
Dcar  -----KHLRGDLFYRLVSQ-KFEDPAEGEDVLVGK--FKKLHDDLTSQFRNLEDE
Ghir  -----KHLRGDLFYRLVSQ-KFEDPAEGEELVAK--FKKLNEDLTAGFRALEDE
Hsal  GWEL-----LSMFP-----KTELNRVDEDLIEDHYVEDVADEA-TAD-
Mbar  GWKI-----LAHLP-----ENQLGRIDNKYIQKYH----PAHRKQG-
Saci  GWEV-----LSILP-----ESELSLIRSEYIKKYH----PNYRGKK-

```

```

Lalb  (Lupinus albus, cp) -----
NplC  (Nicotiana plumbaginifolia, cp) -----
ZmaC  (Zea mays, cp) -----
Taes  (Triticum sativum, cp) -----
Mpol  (Marchantia polymorpha, cp) -----
Alyg  (Angiopteris lygodifolia, cp) -----
Cell  (Chlorella ellipsoidea, cp) -----
CreC  (Chlamydomonas reinhardtii, cp) -----
Egra  (Euglena gracilis, cp) -----
Pdid  (Prochloron didemni) -----
Scol  (Synechococcus 6301) -----
ZmaM  (Zea mays, mt) -----
NplM  (Nicotiana plumbaginifolia, mt) -----
CreM  (Chlamydomonas reinhardtii, mt) -----
Rbla  (Rhodospseudomonas blastica) -----
Rrub  (Rhodospirillum rubrum) -----
Spom  (Schizosaccharomyces pombe, mt) -----
NcrM  (Neurospora crassa, mt) -----
Rnor  (Rattus norvegicus, mt) -----
Hsap  (Homo sapiens, mt) -----
NcrV  (Neurospora crassa, v67) -----
Dcar  (Daucus carota, v69) -----
Ghir  (Gossypium hirsutum, v69) -----
Hsal  (Halobacterium salinarium) -----
Mbar  (Methanosarcina barkeri) -----
Saci  (Sulfolobus acidocaldarius) -----

```

Tab. 2. Alignment der untersuchten Aminosäure-Sequenzen von F-Typ-H⁺-ATPasen (atpB)

--Lücke; *= Aminosäure invariabel;

```

Lalb  MSK-----
Psat  MTI-----
NplC  MRI-----
Sole  MRI-----
Ibat  MRI-----
Cref  MRI-----
ZmaC  MRT-----
Osat  MRT-----
Hvul  MRT-----
Taes  MRT-----
Acra  MRT-----
Mpol  MKT-----
Alyg  MKT-----
Crei  MPW-----
Cell  MSV-----
Egra  MKS-----
Ddic  MSE-----
Ccal  MST-----
Osin  MVK-----
Plit  MTK-----
Scys  M-----
Scol  M-----
Sco2  M-----
Anab  M-----
Pdid  M-----
Bmeg  M-----
Bfir  M-----
Lcas  M-----
Tps3  M-----
Ecol  M-----
Valg  M-----
Tfer  MSER-----
Mgal  MNTK-----
Bfra  MS-----
Clyt  MS-----
Clim  M-----
Pfri  M-----
Sliv  M-----
Rbla  M-----
Rrub  M-----
Spom  M-----
Scer  M-----
Nera  M-----
Rnor  M-----
Btau  M-----
Hsap  M-----
Dcar  MASRRLLSFLRSSRRSLRPSFNSRPSFLTSYCSPPAS-----ILRR---YATAAP
Hbra  MASRRLLSLLRSSRRSVSKSPI SNINPKLSSSSPSSKSRASPYGYLLTRAEYATSAA
ZmaM  MASRRVVSSLLRSASR---LRAASPAAPR-PRAPPH---RSPAGYLFNRAAYASSAA
NplM  MASRRLLASLLRQSAQRGGGLISRSLGNSI-PKSASRASSRASPKGFLLNRAVQYATSAA
Saci  M-----SLL-----
Hsal  M-----
Mbar  M-----

```


Laib -----NNTTSDPKFSAFQK-----QNPGRIAQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Paat -----TPPPSDTEVSVLEN-----KNLGRITQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPYIYN
 NplC -----NPTTSGSGVSTLEK-----KNPGRVVQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Sole -----NPTTSDPGVSTLEK-----KNLGRIAQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Ibat -----NPTTSGSEVSTVEK-----KNLGRIVKIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Cref -----NPPTYGSEISSIEK-----KNRGHIVQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Zmac -----NPTTSTRPGISTIEE-----KSVGRIDQIIGPVLVDITFFP-PGK---LPYIYN
 Osat -----NPTTSTRPGVSTIEE-----KSTGRIDQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Hvul -----NPTTSTRPGVSTSEE-----KSTGRIDQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Taes -----NPTTSPPGASTIEE-----KSTGRIDQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Acra -----NPTTSPPGVSTIEE-----KSTGRIDQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Mpol -----NPLAF--GMSTLVA-----KNIGSITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Alyg -----NPLVF--VVSTAVE-----KNAGYITQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Crei -----GILIPLTMSDSIET-----KNMGRIVQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Cell -----STET-----KSSGRITQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Egra -----SLR-----LNTGILQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPNIYN
 Ddic -----N-LNREPEL-----NIGYITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Ccal -----IAQNK-----GYISQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Osin -----TNINK-----GYVNIQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Plit -----KKTEKEKGI-----NNGYITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Scys -----VAVKEA-----TNVGTITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Sco1 -----VTTTEK-----TNIGYIRQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Sco2 -----VTTAER-----TNVGFITQVIGPVLVDVFFP-PGK---MPAIYN
 Anab -----VTTAEK-----TNIGYITQIIGPVLVDVFFP-PGK---LPYIYN
 Pdid -----VATTET-----TNIGKITQIIGPVLVDVFFP-PGK---MPRIYN
 Bmeg -----TKGRVITQVIGPVLVDVFFP-PGK---MPRIYN
 Bfir -----NTGHITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPEIYN
 Lcas -----STGKIAQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPEIYN
 Tps3 -----TRGRVITQVIGPVLVDVFFP-PGK---LPEIYN
 Ecol -----ATGKIVQIIGAVVDVFFPQDA-----VPRVYD
 Valg -----ATGKIVQIIGAVVDVFFPQSN-----VPSVYD
 Tfer -----CKENAVGHIVQVIGPVLVDVFFPQSN-----VPEIME
 Mgal -----YSYKIVQVIGAVVDVFFPQSN-----LPKIYD
 Bfra -----QIIGHISQVIGPVLVDVFFPQSN-----LPSILD
 Clyt -----KVTGKVSQIIGPVLVDVFFPQSN-----LPSILD
 Clim -----QEGKISQIIGPVLVDVFFPQSN-----LPSILD
 Pfri -----AKGKIVQVIGPVLVDVFFPQSN-----LPSILD
 Sliv -----TTTETATATGRVARVIGPVLVDVFFPQSN-----LPSILD
 Rbla -----SKGKVTQVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Rrub -----GTITQVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Spom -----NTIRYASTEAAKHN-----KGSIKQVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Scer -----WKRCMASAQPSTPI-----TGKVTAVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Ncra -----ALSRFASSAGV--G-----DGKIVQVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Rnor -----RDYAAQSSAAPKAGT-----ATGQIVAVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Btau -----RDYAAQSSAPKAGA-----TTGRIVAVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Hsap -----RDYAAQSSAPKAGA-----ATGRIVAVIGAVVDVFFPQSN-----LPSILD
 Dcar -----AKEPAASKPAGTAGT--GKGTITDEKTKGAGIQCVCQIIGAVVDVFFPQSN-----LPPILT
 Hbra -----AAAPPQPPAKPEGKGGKIDTEFTGKGAIGQCVCQIIGAVVDVFFPQSN-----LPPILT
 Zmac -----AQAAAPATPPPAT--GKTGGKIDTEFTGKGAIGQCVCQIIGAVVDVFFPQSN-----LPPILT
 NplM -----APASQPSTPPKS--GSEPSGKITDEFTGAGSIGKVCQIIGAVVDVFFPQSN-----LPPILT
 Saci -----NVREYSNISMIGPLI-----AVQGVSDAAYNELVE
 Hsal -----KEYQITIEVSGPLV-----YVETDEPIGYDEIVQ
 Mbar -----VREYKTIITQIAGPLV-----FVEKTEPVGYKEIVT

Laib ALIVKQGDVTGQQINI--TCEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Paat ALIVQGRDVTGKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 NplC ALVVQGRDVTGKQINV--ACEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Sole ALIVKGRDVTGKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Ibat ALIVQGRGN--EQTNV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMSATEGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Cref ALIVKGRD--EQMNV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Zmac ALIVKSRDVTADKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Osat ALIVKSRDVTADKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Hvul ALVVQSRDVTADKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Taes ALVVQSRDVTADKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Acra ALVVQSRDVTADKQINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Mpol SLIVKQDQNSAGEEINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Alyg SLIVKQDQNSAGEEINV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Crei ALTIRAKNSAGTEMAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Cell ALTIVGGKNEAGQEISV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Egra SLLIEGKTESGDRKLV--VCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Ddic ALEVKSRDGT--I--ICEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Ccal AISIKHKNKTI--T--C--EVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Osin ALKIBTEDGIG--T--VVEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Plit ALEVQSKREGP--I--ICEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Scys ALKIVQGRNSAGNEVAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Scol ALKIVQGRNSAGNEVAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Sco2 ALRIVQGRNSAGNEVAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Anab ALRIVQGRNSAGNEVAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Pdid ALRIVQGRNSAGNEVAV--TCEVQQLLGNRRIRAVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Bmeg ALKISHKPSSEVAIELEVAIHLGDNVTRVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Bfir ALK--STSGADKNVAVVITLVALHLGDDSVRTVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Lcas ALK--STSGADKNVAVVITLVALHLGDDSVRTVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Tps3 ALKIQHKARNENEVDIDLTLVALHLGDDSVRTVAMNDTDGLM-RGMEVIDTGAPLSVFP
 Ecol ALEVQNGNE-----RLVLEVQQLGGGIVRTIAMGSSDGLR-RGLDVKLEHPIEVPV
 Valg ALNVDSKE-----RLVLEVQQLGGGIVRTIAMGSSDGLR-RGLDVKLEHPIEVPV
 Tfer AIVVDANN-----LTIEVQQLGGGIVRTIAMGSSDGLR-RGLDVKLEHPIEVPV
 Mgal CLIID-----EPNMKHLHVAQLIGDDIARCIAMGPTGLEA-RNVKVTSTNQPIVFPV
 Bfra ALEIKRHNGK-----KLIVEVQQHIGENTVRTIAMGSSDGLR-RGMKVPFTEGPIVFPV
 Clyt SLEIKKADGS-----ILVLEVQSHIGENTVRTIAMGSSDGLR-RGAEVNTGSAIQMPV
 Clim ALTVTRQDG--S--KL--VLETQQLHGERVRIAMEGTDGLV-RGMSAKNTGKPIQVFPV
 Pfri AITIKKSG--DIDINL--TVEVMQHLGDDGTRCIAMGSSDGLR-RGAEVNTGSAIQMPV
 Sliv ALHVEVADPAKEGELKLTLEVAQHLGDDGTRCIAMGSSDGLR-RGAEVNTGSAIQMPV
 Rbla ALETT--NNGK-----KLILEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAPVSDSGTPIVFPV
 Rrub ALETD--NHGN-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Spom ALEVKLPDNK-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Scer ALEIKTPQG-----KLILEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Ncra ALETQ--NNGQ-----KLILEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Rnor ALEVQ--GRES-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Btau ALEVQ--GRET-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Hsap ALEVQ--GRET-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Dcar ALEV--IDFEI-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Hbra SLEV--LDHSI-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Zmac ALEV--LDNNI-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 NplM ALEV--LDNQI-----RLVLEVAQHLGENTVRTIAMGTEGLV-RGAEVNTGSAIQMPV
 Saci IEMPDGSKRRGLVVDVSDMGVTFVQVF-----EGTTGISPTGSKVRFGLRGLVQI
 Hsal IETPNGDVKRGQVLESSDGFVAIQVF-----EGTEGVL--KDSVRFLETGKMPV
 Mbar INLPDGTTRRGEVLDSSSDVIVQIF-----EGTGLD--KECGVFTGETLKLPA

Lalb GGKTLGRIFNVLGEPIDNLPVDTR-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Psat GGATLGRIFNVLGEPIDNLPVDTR-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Nplc GGATLGRIFNVLGEPVDNLPVDTS-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Sole GGPTLGRIFNVLGEPVDNLRPVDTR-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Ibat GGSTLGRIFNVLGEPVDNLPVDTN-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Cref GGSTLGRIFNVLGEPVDNLPVDTN-TTF-TIHRSAAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Zmac GGATLGRIFNVLGEPIDNLPVDTS-ATF-PIHRSAPAFIELDTKLSIFETGKIVVDLLA
Osat GGATLGRIFNVLGEPVDNLPVDTS-ATF-PIHRSAPAFIELDTKLSIFETGKIVVDLLA
Hvul GGATLGRIFNVLGEPVDNLPVDSS-ATF-PIHRSAPAFIELDTKLSIFETGKIVVDLLA
Taes GGATLGRIFNVLGEPVDNLPVDSS-ATF-PIHRSAPAFIELDTKLSIFETGKIVVDLLA
Acra GGATLGRIFNVLGEPVDNLPVDSS-ATF-PIHRSAPAFIELDTKLSIFETGKIVVDLLA
Mpol GEATLGRIFNVLGEPVDNLPVEVT-TTF-PIHRAAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Alyg GEVTLGRIFNVLGEPVDNLPVDAG-TTS-PIHRSAPAFIQDQTKLSIFETGKIVVDLLA
Crei GKVTLGRIFNVLGEPVDNMGVKE-ETL-PIHRTAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Cell GAATLGRIFNVLGEPVDNLPVNTK-DQL-PIHRSAPAFVLDLTKLSIFESGKIVVDLLA
Egra GVTTLGRIFNVLGESVDMGLIDYS-ITL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Ddic GKATLGRIFNVLGEPVDNLEIGTGE-DRL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Ccal GKCTLGRIFNVLGEPVDELGAISTD-RKL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Osln GISTLGRIFNVLGEPVDEQGVSYD-ETL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Plit GKATLGRIFNVLGEPVDNLSVGE-DTL-PIHRSAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Scys GTGTLGRIFNVLGEPVDNKGVPAC-ETF-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Sco1 GEATLGRIFNVLGEPVDELGPVNA-TTS-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Sco2 GTATLGRIFNVLGEPVDEKGEVNI-S-ETL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Anab GKATLGRIFNVLGEPVDNRPVNNQ-ETL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Pdid GKATLGRIFNVLGEPVDNRPVNTA-ETS-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Bmeg GDVTLGRVFNVLGEPVDELDPADAG-ARRDP-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Bfir GEATLGRVFNVLGEPVDELGPVAD-VKRDPIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Lcas GKDTLGRVFNVLGEPVDEGALDLN-HRRDPIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Ecol GKATLGRIMNVLGEPVDMKGEIGE-E-RWAHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Valg GTKTLGRIMNVLGEPVDEKGEVNI-S-ETL-PIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Tfer GHATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Mgal GTEVLRGMPNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Bfra GEQIKGLRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Clyt GDDVYGRLEFNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Clim GEEVLRGMLNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Pfri GEETLGRVFNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Sliv GDFTKGKVFNTLGEVNLVDEQYTCG---RWPIHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Rbla GNATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Rrub GPQVLRGIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Spom GPQTLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Scer GRETLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Ncra GPATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Rnor GPETLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Btau GPETLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Hsap GPETLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Dcar GRATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Hbra GRANPWTYHEVIGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Zmac GRATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
NpM GRATLGRIMNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Saci SEEMLGRIFNVLGEPVDEKGPVQTE-D-RQA-IHRAAPAFVLDLTKLSIFETGKIVVDLLA
Hsal TEDLLGRVLDGSGNPDGPPVIGG---EKRNINGDPINPATREYPEEFIQTGISADGLN
Mbar SIDLLGRVLDGSGNPDGPPVIGG---EKRNINGDPINPATREYPEEFIQTGISADGLN

Lalb PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Psat PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESR
Nplc PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Sole PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Ibat PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Cref PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Zmac PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Osat PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Hvul PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Taes PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Acra PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Mpol PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Alyg PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESK
Crei PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Cell PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Egra PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Ddic PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Ccal PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Osln PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESK
Plit PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Scys PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Sco1 PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Sco2 PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Anab PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Pdid PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Bmeg PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Bfir PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Lcas PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Tps3 PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Ecol PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Valg PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Tfer PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Mgal PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Bfra PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Clyt PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Clim PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Pfri PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Sliv PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Rbla PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Rrub PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Spom PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Scer PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Ncra PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Rnor PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Btau PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Hsap PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Dcar PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Hbra PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Zmac PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
NpM PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Saci PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Hsal PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG
Mbar PYRRGGKIGLFGGAGVGTVMELINNIKAHGGVSVFVGGERREGNDLYMEMKESG

Lalb VIN-EQN-----IAESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Psat VIN-EKN-----IAESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 NplC VIN-EEN-----IAESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Sole VIN-EQN-----IAESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Ibat VIN-EEN-----IPESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Cref VIN-EKN-----ITESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Zmac VIN-EKN-----IEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Osat VIN-EKN-----LEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Hvul VIN-EKN-----IEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Taes VIN-EKN-----IEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Acra VIN-EKN-----IEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Mpol VIN-EQN-----IESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Alyg VIN-QEN-----IESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Crei VIV-EKN-----LSDSKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Cell VIN-ESN-----IESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Egra VIN-DRN-----FKESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Ddic VIN-ESN-----LSESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Ccal VIN-EKN-----LEESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Osin VIN-ENN-----FKESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Plit VIN-ETN-----LLESKVALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Scys VIN-ADK-----PEESKIALVYGMNEPPGARMRVGLTALTMAEY
 Sco1 VID-EKN-----IANSKVALVYGMNEPPGARMRVGLSALTMAEH
 Sco2 VID-KDD-----PSKSKIALVYGMNEPPGARMRVGLSGLTMAEY
 Anab -----KNALVYGMNEPPGARMRVGLSGLTMAEY
 Pdid VIN-ADN-----LNEKIALVYGMNEPPGARMRVGLSALTMAEY
 Bmeg VIK-----KTAMVFGQMNEPPGARARVALTGLTMAEY
 Bfir VIK-----KTAMVFGQMNEPPGARMRVGLSGLTMAEH
 Lcas VME-----NTAMVFGQMNEPPGARARVALTGLTIAEY
 Tps3 VIS-----KTAMVFGQMNEPPGARARVALTGLTIAEY
 Ecol VID-----KVSIVYGMNEPPGNRLRVALTGLTMAEK
 Valg VVNV-EK-----PEESKVALVYGMNEPPGNRLRVALTGLTMAER
 Tfer VLD-----KVALVYGMNEPPGNRLRAGLTGLTMAEH
 Mgal VID-----KTALVFGQMNEPPGARARVALTGLTMAEY
 Bfra VIRYGEA-FKESMEKGHWDLSKVDYNEVEKQATLVFGQMNEPPGARASVALSGLTVAES
 Clyt IIKYGDD-FMHSMEEGGWDLKSKVDKSMKDKATFVFGQMNEPPGARARVALSGLTIAEY
 Clim VID-----KTALVFGQMNEPPGARARVALTGLSIAEY
 Pfri VIN-----KTALVYGMNEPPGARMRVGLTGLTMAEY
 Sliv VID-----KTALVFGQMDEPPGTRLRVALAGLTMAEY
 Rbla VINIDDL-----EKSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTIAEQ
 Rrub IIDL EG-----DKSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTQAEY
 Spom VIKLEG-----ESKALVFGQMNEPPGARARVALTGLTVAEY
 Scer VINLEG-----ESKVALVFGQMNEPPGARARVALTGLTIAEY
 Ncra VIQLDG-----DSKVALVFGQMNEPPGARARVALTGLTIAEY
 Rnor VINLKD-----ATSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEY
 Btau VINLKD-----ATSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEY
 Hsap VINLKD-----ATSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEY
 Dcar VIKLGDQ-----QAESKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEH
 Hbra VIKLGDK-----QADSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEH
 ZmaM VIKLDDK-----QSESKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEH
 NplM VIKLGEK-----QSESKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEH
 Saci VRYDEALFFRFFFEETG-----AINRVAMFVTLANDPPSLKLLTPKTALTIAEY
 Hsal ITABEANEFMDDFERTG-----ALERSVVFVNLADDPVAVERTVTPRMALTTAEY
 Mbar ITNEEAQYFMSDFEKTG-----ALERAVVFLNLADDPVAVERTVTPRMALTTAEY

Lalb FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Psat FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGTLQER--I
 NplC FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Sole FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Ibat FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Cref FRDV----NEQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Zmac FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Osat FRDV----IKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Hvul FRDV----NKQDVLLFDIDIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Taes FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Acra FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGSLQER--I
 Mpol FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLSTEMGTLQER--I
 Alyg FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSASSGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Crei FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGAEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Cell FRDI----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Egra FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Ddic FRDI----NRQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Ccal FRDN----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Osin FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Plit FRDI----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGLQER--I
 Scys FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Sco1 FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Sco2 FRDV----NKQDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Anab FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Pdid FRDV----NKQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Bmeg FRDE----QGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Bfir FRDR----DQQDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Lcas FRDV----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Tps3 FRDE----QGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Ecol FRD-----EGRDVLLFVDNIFRYTLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Valg FRD-----EGRDVLLFDINIFRYTLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Tfer FRD-----EGRDILMFIDNIFRYPLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Mgal FRDV----NNQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Bfra FRDMGAKSGARDILFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Clyt FRD GAGEGQKDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Clim FRDE----EGRDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQER--I
 Pfri FRDV----QHQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Sliv FRDV----EQQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Rbla FRDQ----SGTDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Rrub FRDE----EGQDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Spom FRDI----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Scer FRDE----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Ncra FRDE----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Rnor FRDQ----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Btau FRDQ----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Hsap FRDQ----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Dcar FRDA----EGEDVLLFVDNIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Hbra FRDA----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 ZmaM FRDA----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 NplM FRDA----EGQDVLLFDINIFRFVQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLGDVGLQER--I
 Saci L-----AFEKDMHVLAILDMTNYCEALRELQIGAAREVPGRRGYPGYMYTDLATYERAGK
 Hsal L-----AFEKDYHVLVILDMTNYCEALRELQIGAAREVPGRRGYPGYMYTDLAQLYERAGR
 Mbar L-----AYEHGMHVLVILDTITNYAELRQMGARNEIPGRRGYPGYMYTDLATYERAGI

Lalb TSTKEGSITSIQAVYVSADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Psat TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 NplC TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Sole TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Ibat TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Cref TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTSM
 Zmac TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Oaat TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Hvul ASTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Taes ASTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Acra ASTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Mpol TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Alyg TSTKEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Crei TSTKDGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Cell TSTKDGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Egra TSTKVGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Ddic TSTTQGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Ccal TSTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Oasin TSTTQGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Plit TSTTQGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Scys TSTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Scol TSTLEGSITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Sco2 TSTMEGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Anab TSTTEGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Pdid TSTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTVLSRGLAAGKIYPAVDPLDSTST
 Bmeg TSTSVGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Bfir TSTKVGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Lcas TSTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Tps3 TSTAKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Ecol TSTKKGSIITSIQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Valg TSTKSGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Tfer TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Mgal TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Bfra TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Clyt TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Clim TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Pfri TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Sliv TSTRGHSITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Rbla TSTKAGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Rrub TSTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Spom TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Scer TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Ncra TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Rnor TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Btau TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Hsap TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Dcar TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Hbra TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Zmam TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 NplM TTTKKGSIITSQAVYVPADDLTDPAAPATTF AHL DATTNLERKLESEMGIYPAVDPLASTSR
 Saci VIGKKGSIITQMPILTMPNDMDHPIDPLTGYITEGQIVLDRSLFNKGIYPPINVLMSLSR
 Hsal IEGKEGSIITQMPILTMPNDMDHPIDPLTGYITEGQIVLDRSLFNKGIYPPINVLMSLSR
 Mbar VKGAKGSIITQMPILTMPNDMDHPIDPLTGYITEGQIVLDRSLFNKGIYPPINVLMSLSR

Lalb MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Psat MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 NplC MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Sole MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Ibat MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Cref MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Zmac MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Oaat MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Hvul MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Taes MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Acra MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Mpol MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Alyg MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Crei MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Cell MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Egra MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Ddic MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Ccal MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Oasin MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Plit MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Scys MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Scol MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Sco2 MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Anab MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Pdid MLQPRIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Bmeg ALSPEIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Bfir ALSPEIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Lcas ALTPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Tps3 ALAPEIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Ecol QLDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Valg QLDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Tfer QLDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Mgal LLDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Bfra ILDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Clyt ILDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Clim ILDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Pfri ILDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Sliv ILDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Rbla LMDPILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Rrub ALDPILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Spom MDPILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Scer LLDAAVVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Ncra MDPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Rnor IMPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Btau IMPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Hsap IMPDIVG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Dcar MLTPES-G----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Hbra MLSPHILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Zmam MLSPHILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 NplM MLSPHILG----EEHYETAQRVKQTLQRYKELQDIIA I L G L D E L S E E D R L T V A R A R K I E R
 Saci LMKDGI GEGKTRDDHKDLNQLFAAYARAQD I RGLAAI I G E D S L S E V D R K Y L L F A ---E A
 Hsal LMDDGI GEGKTRDDHKDLNQLFAAYARAQD I RGLAAI I G E D S L S E V D R K Y L L F A ---E A
 Mbar LMSNGI GAGKTRDDHKDLNQLFAAYARAQD I RGLAAI I G E D S L S E V D R K Y L L F A ---E A

La1b FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFKLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDERTAKATN
 Psat FFSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKATN
 Np1C FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAMN
 Sole FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAMN
 Ibat FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAMN
 Cref FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIIGFTLILSGELDSLPEQAFYLVGNINEATEKAMN
 ZmaC FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEASTKAIN
 Osat FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEASTKAIN
 Hvul FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVALAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEASTKAIT
 Taes FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVALAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEASTKAIT
 Acra FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVALAETIRGFQQLILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEASTKAIT
 Mpol FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLRETIKGFQMLILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAAT
 Alyg FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLIETIKGFQMLILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAKAAT
 Crei FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLAETIEGFKIFAGELDDLPEQAFYLVGNITEAISKAA
 Cell FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLAETIQGFNLLSGELDDLPEQAFYLVGNIDEAVSKAAT
 Egra FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVTLAETIEGFKAILSGELDDEVPEQAFYLVGNIDEAISKAEI
 Ddic FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVDLENTIKGFNMILNGELDVYQSI AFYLVGDI NEAIAKAKT
 Coal FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLKESIDGFKMILNGELDDLPEQAFYLVGNIQEAIAKKADE
 Osin FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLAETIKGFTHVLKGLDELPEQAFYLVGNIQEAIAKKADE
 Plit FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVDLENTIKGFNMILNGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKAKT
 Scys FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVSLADTIKGFKAILAGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Sco1 FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLAETIKGFNMILNGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Sco2 FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVTLAETIKGFQMLILSGELDDLPEQAFYLVGNIDEAIAKAEK
 Anab FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLAETIKGFQMLILSGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKAEK
 Pdid FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVSLAETIKGFQMLILSGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKAEK
 Bmeg FLSQT-SVAEQPTGQKGSYVVPKETEIVKGFKEILEGKYDHLPEDAFRLVGRIEEVIENAKR
 Bfir FLSQNFHVAEQPTGKGSYVVPKETEIVKGFKEILEGKYDHLPEDAFRLVGRIEEVIENAKR
 Lcas FLSQNFHVAEQPTGQKGSYVVPKETEIVKGFKEILEGKYDHLPEDAFRLVGRIEEVIENAKR
 Tps3 FLSQNFHVAEQPTGQKGSYVVPKETEIVKGFKEILEGKYDHLPEDAFRLVGRIEEVIENAKR
 Ecol FLSQPPFVAEVFTGSPGKYVSLKDTIRGFKGIMEGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Valg FLTQPYHVAEVFTGDPGIYVPLKETLRGFKGLLAGEYDDIPEQAFMYCGSIDDAIENAKK
 Tfer YLSQPPFVAEVFTGSPGTYVSLKETIRAFKAI VAGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Mgal FLSQPPFVAEKFSGNKGVVPISETIKGFSEIVEGKHDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Bfra FLSQPPFVAEQPTGVPAMVAIEDTIKGFQMLILSGELDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Clyt FLSQPPFVAEQPTGLKGLVLDIKDTIKGFNMIMDGLDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Clim FLSQPPFVAEQPTGLAGKYVLEDTIKGFKEIIAGRHDNLPEAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Pfri FLSQPPFVAEQPTGSPGKYVPLKETIRGFKKEILEGKYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Sliv FLSQNTHVAKQPTGVDGSDVPLDESIAAFNAICDGEYDHPPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Rbla FLSQPPDVAQVFTGSPGVQVPLDKTIIASFRAVAGEYDHLPEAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Rrub FLSQPPFVAEVFTGSPGKLVSLAETIKGFKGLVEGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Spom FLSQPPFAVAEVFTGIEGRLVSLKDTIRSFKEILEGKHDSLPEAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Scer FLSQPPFAVAEVFTGIPGKLVRLKDTIVASFKA VLEGKYDNIPEHAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Ncra FLSQPPFVAEQVFTGIEGKLVLDKDTIIASFKA ILAGEGDDLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Rnor FLSQPPQVAEVFTGGMKLVPLKETIKGFQQLILAGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Btau FLSQPPQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGFQQLILAGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Heap FLSQPPQVAEVFTGGMKLVPLKETIKGFQQLILAGEYDHLPEQAFYLVGDI NEAIAKKADE
 Dcar FLSQPPFVAEIPFTGAPGKYVVELKESVTSFQGVLDGKYDDLPEQSFYLVGDI NEAIAKKADE
 Hbra FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVVELKESVTSFQGVLDGKYDDLPEQSFYLVGDI NEAIAKKADE
 ZmaM FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVVELKESVTSFQGVLDGKYDDLPEQSFYLVGDI NEAIAKKADE
 NplM FLSQPPFVAEVFTGAPGKYVVELKESVTSFQGVLDGKYDDLPEQSFYLVGDI NEAIAKKADE
 Saci F--ERRFVAQGVNENRSIETLLDIGWEVLSILPESELILR-----SEYIKKYH-
 Hsal F--EAEFIDQCFKTRNDIETLLDIGWELLSMFPKTELNRVD-----EDLIEDHYV
 Mbar F--EQQFVTPQGNENRNTIADTLDIGWILAHLPENQLGRID-----NKYIQKYH-

La1b (*Lupinus albus*, cp) LEKESKLLK-
 Psat (*Pisum sativum*, cp) LT-----
 Np1C (*Nicotiana plumbaginifolia*, cp) LEMESNLKK-
 Sole (*Spinacia oleracea*, cp) LEMESKLLK-
 Ibat (*Ipomoea batatas*, cp) L-----KT-
 Cref (*Cuscuta reflexa*, cp) L-----KT-
 ZmaC (*Zea mays*, cp) LEEESKLLK-
 Osat (*Oryza sativa*, cp) LEEENNLKK-
 Hvul (*Hordeum vulgare*, cp) LEEENKSKQ-
 Taes (*Triticum sativum*, cp) LEEENKSKQ-
 Acra (*Aeglops crassa*, cp) LEEENKSKQ-
 Mpol (*Marchantia polymorpha*, cp) LQVES-----
 Alyg (*Angiopteris lygodifolia*, cp) LQVES-----
 Crei (*Chlamydomonas reinhardtii*, cp) LK-----
 Cell (*Chlorella ellipsoidea*, cp) L---S-----
 Egra (*Euglena gracilis*, cp) LQ-----
 Ddic (*Dictyota dichotoma*) ITN-----
 Ccal (*Cyanidium caldarium*) LKD--K----
 Osin (*Odontella sinensis*) LK-----
 Plit (*Pyraliella littoralis*) FKN-----
 Scys (*Synechocystis 6803*) LK-EG-----
 Scol (*Synechococcus 6301*) LKAES-----
 Sco2 (*Synechococcus 6716*) LKA-----
 Anab (*Anabaena spec.*) IK--G-----
 Pdid (*Prochloron didemni*) LK-QD-----
 Bmeg (*Bacillus megaterium*) MGVEV-----
 Bfir (*Bacillus firmus*) TA-----
 Lcas (*Lactobacillus casei*) MGFAF-----
 Tps3 (*Thermophiles. Bakterium PS3*) MGVEV-----
 Ecol (*Escherichia coli*) L-----
 Valg (*Vibrio alginolyticus*) L-----
 Tfer (*Thiobacillus ferroxidans*) LQQG-----
 Mgal (*Mycoplasma gallisepticum*) LTRNG-----
 Bfra (*Bacteroides fragilis*) LLEQANK---
 Clyt (*Cytophaga lytica*) MLAEA-----
 Clim (*Chlorobium limicola*) L-----
 Pfri (*Pectinatus frisingsensis*) IKQEA-----
 Sliv (*Streptomyces lividans*) LGVS-----
 Rbla (*Rhodopseudomonas blastica*) LAAAA-----
 Rrub (*Rhodospirillum rubrum*) MAEAA-----
 Spom (*Schizosaccharomyces pombe*, mt) IAQELAA---
 Scer (*Saccharomyces cerevisiae*, mt) LAREAN---
 Ncra (*Neurospora crassa*, mt) ILAELEGQA-
 Rnor (*Rattus norvegicus*, mt) LAEEHGS---
 Btau (*Bos taurus*, mt) LAEEHS---
 Hsap (*Homo sapiens*, mt) LAEEHSS---
 Dcar (*Daucus carota*, mt) MAKENPQ---
 Hbra (*Hevea brasiliensis*, mt) IAKESAS---
 ZmaM (*Zea mays*, mt) IAKESAS---
 NplM (*Nicotiana plumbaginifolia*, mt) IAKESAA---
 Saci (*Sulfolobus acidocaldarius*) ---PNYRGKK
 Hsal (*Halobacterium salinarium*) EDVAEATAD
 Mbar (*Methanosarcina barkeri*) ---PAHRKGG

Für die Rekonstruktion der Phylogenie der Pro- und Eukaryonten wurden alle weiteren Sequenzen unter Verwendung des HUSAR-Programmpaketes aus der EMBL-(Ausgabe 38), GenBank (Ausgabe 83) oder Swiss-Prot-Datenbank (Ausgabe 25) entnommen. Eine Dokumentation der zugehörigen "Accession numbers" findet sich in Hanke (1995).

Aus den Nucleotidsequenzen wurden die zugehörigen Aminosäuresequenzen abgeleitet. Zur Phylogenieanalyse müssen die Sequenzdaten so ausgerichtet ("aligned") werden, daß alle homologen Merkmale untereinander angeordnet stehen und fehlende Positionen ("gaps") durch einen "Platzhalter" markiert sind. Das Alignment der Sequenzen wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm ClustAl V (im HUSAR implementiert) ausgeführt und anschließend manuell korrigiert (Tab. 1 und 2).

Zur Phylogenie-Rekonstruktion wurden die Programm-Pakete PAUP 3.1.1. (Swofford, 1993) und MEGA 1.0 eingesetzt (Kumar et al., 1993); PAUP zur Berechnung von Maximum Parsimony Analysen (MP) und MEGA zur Erstellung von Neighbour-Joining Bäumen (NJ). Während MP eine "Character state" Methode darstellt, liegt mit NJ eine Distanz-Methode vor. Wenn Stammbäume, die nach beiden unterschiedlichen Algorithmen berechnet wurden, ähnliche oder identische Topologien aufweisen, so kann diese Kongruenz als ein Hinweis für die wahrscheinlich richtige Struktur der entsprechenden Verzweigungen genommen werden. Zur statistischen Absicherung der Verzweigungen wurde eine Bootstrapanalyse durchgeführt. Dabei werden die homologen Merkmale des Datensatzes, die zur Berechnung des Baumes dienen, nach einem zufälligen Schema ausgewählt, d.h. eventuell weggelassen oder verdoppelt. Für jeden neuen Datensatz wird ein neues Phylogramm erstellt. Nach 100 Wiederholungen wird geprüft, wie oft dieselbe Verzweigung gefunden wurde. Ein Bootstrap-Wert über 80% wird allgemein als verlässlich interpretiert; kleinere Werte deuten daraufhin, daß auch andere Kombinationen möglich sind. Die Darstellung der rekonstruierten Phylogenien kann in Form eines Phylogramms oder Kladogramms erfolgen. Bei den Phylogrammen ist die Astlänge proportional zur Zahl der Aminosäuren-Austausche zwischen zwei Taxa.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Isolierung des ATPase-Gens (*atpB*) aus *Lupinus albus*

Aus einer cDNA-Bank aus Blättern von *Lupinus albus* wurde ein 2383 Basenpaare langer Klon isoliert ("Klon 4") und sequenziert (Abb. 1). Der Vergleich mit DNA-Sequenzen aus der EMBL- und GenBank- Sequenzdatenbank zeigte eindeutig, daß unser Klon mehrere

```

      T Y Y T L K Y D K V G A K F G V S A K
1  AGAGTATAATAAGTCAATTTATAATCTTTAACACCGGCTTTGAACCCACACTTGGCTTTA
      T E T Q P S M < rbcL
61  GTCTCTGTTTGTGGTGACATAAATCCCTCCCTACAACACTCATGAATTAAGAATTCTCACAA
      121  CAACAAGGCTACTCGACTGAGGGTTAATGAAACCTTTCACTTCACAGGAATCTTTCAC
      181  AAAATGATCAACTAATATTATCAATTAATCCGAATGGTTCGTTAGTAAACCGTGGTATTT
      241  GATTTGCCAAATACATCATTATTGTA TACTCTTTCATATGATGCGCCAAACCCCTTGT
      cpt1 cpt2
301  TTTTTTTGAAATTTGGAATCGAAATATAAAAAATCTCTGTGAAATATCGAATCTAAATA
      361  CTAATAAATTAACCTCTTGACCTTGACAGCGGATATATATTGTATATGTAATCCTAGATGT
      cpt3 cpt4
421  AAAAATAGGCAGAATTAGCCCCGAAAATAAATAGGTAAAAAATAATGCTAGGTATAAA
      481  TCATATGCTGATAAAAATATGAAATTGAAATAAGGGCCAATGAGATAAAAAACGTAATCG
      541  TAAATAAAGTTCAAGTTCAATTTCTATATCCATAGATAATAGAAATGGTATTGTCTGTCT
      cpt5
601  AATAAATAGACAAATGAAAAAAGAACTTTTGAAGATTTGAGCAATTTGATATTGA
      cpt5
661  TATCTAAAAAATGACTTGGTTGAACTTGAATTTAAATCAATTGGTTGGATGATACCAAG
      721  AAAATAGAGTACTCACTCCCATTTATTATTGAATTAACCGATTAACCTGCTTGTGTAGCG
      781  AACATTTCTTTTTGATTTCCAAAAATTTTCGAAAAAAGAACAGCTATATTGTAATATG
      atpB > M
841  AGCAAAAATACTACCCTTCGGATCCCAAGTTTCTGCGTTTCAAAAAGAAAACCCGGGA
      S K N T T T S D P K F S A F Q K E N P G
901  CGTATCGCCAAAATAATTGGTCCGACTGGATGATCTTTTCCCGGGGAAGATGCCG
      R I A Q I I G P V L D V S F P P G K M P
961  AATATACAACGCTCTGATAGTTAAGGSAAGATACTGTTGGTCAACAAATTAACATT
      N I Y N A L I V K G Q D T V G Q Q I N I
1021  ACTTGTGAAGTACAGCAATTATTAGGAAATAATCGAATCAGAGCTGTAGCTATGAGTGT
      T C E V Q Q L L G N N R I R A V A M S A
1081  ACAGAGGTTCTAATGAGAGGAATGGAAGTGATTGACACAGGGCTCCTCTAAGTGTTC
      T E G L M R G M E V I D T G A P L S V P
1141  GTCGGCGCAAGACTCTARGACGCATTTCAACGTGCTTGGAGAGCCTATTGACAATTTA
      V G G K T L G R I F N V L G E P I D N L
102

```

```

1201 GGTCTGTAGATACTCGCACAAACATCACCTATTCATCGATCCGCACCTGCCCTTATACAA
122   G P V D T R T T S P I H R S A P A F I Q
1261 TTAGATACAAAATTATCCATTTTTGAAACAGGGATTAAGTAGTCGATCTTTTAGCTCCC
142   L D T K L S I F E T G I K V V D L L A P
1321 TATCGCCGTGGAGGAAAAATAGGACTTTTCGGTGGAGCTGGAGTGGGTAACACAGTACTC
162   Y R R G G K I G L F G G A G V G K T V L
1381 ATTAGGAATTGATCAATAACATTGCCAAAGCTCATGGGGGTGTATCTGTTTTGGCGGA
182   I M E L I N N I A K A H G G V S V F G G
1441 GTAGGTGAACGTACTCGTGGGAAATGATCTTTACATGGAAATGAAAGAACTGGAGTA
202   V G E R T R E G N D L Y M E M K E S G V
1501 ATTAATGAACAAAATTGCGAATCAAAAAGTGGCTTAGTCTACGGTCAAAATGAATGAA
222   I N E Q N I A E S K V A L V Y G Q M N E
1561 CCGCCTGGAGCTCGTATGAGAGTTGGGTTAACTGCCCTAACTATGGCGGAATATTTCCGG
242   P P G A R M R V G L T A L T M A E Y F R
1621 GATGTCAATGAACAAGACGTACTTCTATTTATCGACAATATCTCCGTTTCGTTCAAGCA
262   D V N E Q D V L L L F I D N I F R F V G G
1681 GGATCCGAAGTATCTGCTTTATGGGTAGAATGCCTTCTGCTGTGGGTATCAACCACC
282   G S E V S A L L G R M P S A V G Y Q P T
1741 CTTAGTACCGAAATGGGTTCTTACAAGAAAGAAATTAATCTACCAAGAAAGGGTCCATA
302   L S T E M G S L O E R I T S T K E G S I
1801 ACTTCTATTCAAGCAGTTTATGTACCTGCGGACGATTTGACCGATCCTGCTCCTGCCACG
322   T S I Q A V Y V P A D D L T D P A P A T
1861 ACATTGCGACATCTCGATGCCACTACCGTACTATCAAGAGGATAGCTGCCAAAGGTATC
342   T F A H L D A T T V L S R G L A A K G I
1921 TATCCAGCAGTAGATCCTTTAGATTCAACGTCAACTATGCTCCAACCTAGGATCGTTGGC
362   Y P A V D P L D S T S T M L D P R I V G
1981 GAAGAACATTATGAAACTGCCCAAGAGTTAAACAACCTTACAGCGTTACAAGAAGAACTT
382   E E H Y E T A Q R V K Q T L D R Y K E L
2041 CAGGACATTATAGCTATCCTTGGGTTGGACGAATTATCCGAAGAGGATCGTTAACCGTA
402   Q D I I A I L G L D E L S E E D R L T V
2101 GCAAGAGCACGAAAAATGAGCGTTTCTTATCACAGCCCTTTTTGTAGCAGAAGTATT
422   A R A R K I E R F L S Q P F F V A E V F
2161 ACCGGTTCACCGGGGAAATATGTTGGTCTAGCAGAAACAATAGAGGGTTAAACTGATT
442   T G S P G K Y V G L A E T I R G F K L I
2221 CTTTCTGGAGAGTTAGATGGTCTTCCGAAACAGGCCTTTTATTAGTAGGTAATATTGAT
462   L S G E L D G L P E Q A F Y L Y G N I D
                                     atpE > M T L
2281 GAAGCTACCGCGAAGGCTACGAACTTAGAAAAGGAGCAAAATGAAGAAATGACTTTA
482   E A T A K A T N L E K E S K L K K *
                                     N L C V L T P N R I V W D S
2340 AATCTTTGTGATTTGACCCCAAAATCGAATTGTTGGGATTCAGA

```

Abb. 1. Vollständige Nucleotidsequenz des *atpB*-Gens, sowie von Partialsequenzen von *rbcl*, *atpE* im cDNA-Klon 4 von *Lupinus albus*.

Kodierende Abschnitte sind in die entsprechenden Aminosäuren übersetzt und oberhalb bzw. unterhalb der Nucleotide angegeben. (>) markiert den Beginn der Transkription der Gene *rbcl*, *atpB* und *atpE*. Promotorbereiche sind unterstrichen.

Genbereiche umfaßt: Der Beginn liegt im *RbcL*-Gen; im Anschluß daran folgt ein Intergenbereich P/O mit den Promotoren für die *RbcL*- und *atpB*-Gene. Danach kommen 1497 Basenpaare (= 499 Aminosäuren) des *atpB* Gens, das die β -Untereinheit der H^+ ATPase kodiert, dem sich das Gen *atpE* anschließt (Abb. 1).

6.3.2 *atpB* als molekularer Marker

6.3.2.1 Beziehung zwischen F-, V- und A-Typ H^+ -ATPasen

H^+ -ATPasen kann man nach ihrer Herkunft und Funktion als F-Typ (*atpB* aus Chloroplasten, Mitochondrien, Eubakterien), V-Typ (67 kDa-Untereinheit aus Vakuolen) und A-Typ (69 kDa-Untereinheit aus Archaeobakterien) klassifizieren (Gogarten et al., 1989). In einer ersten Analyse haben wir versucht, die phylogenetischen Beziehungen zwischen den 3 ATPasen aus 26 Taxa aus allen Organismenbereichen zu rekonstruieren (Tab. 1). Von 670 Aminosäurepositionen sind 596 bedingt durch die Breite des Ansatzes variabel. Mittels NJ und MP wurden weitgehend kongruente Stammbäume rekonstruiert (Abb. 2 A,B). Drei Hauptäste lassen sich erkennen:

- An der Basis der Bäume stehen V- und A-Typ ATPasen, die als Schwestergruppen mit einem Bootstrap-Wert von 100% von den Sequenzen der F-Typ ATPasen abgetrennt werden. Demnach müssen die vakuolären ATPasen und die archaeobakteriellen ATPasen näher miteinander verwandt sein als mit den F-Typ ATPase der Eubakterien und Eukaryonten.

Der 2. Hauptast (mit einem Bootstrap-Wert von 100% abgesichert) umfaßt die F-Typ ATPasen der alpha-Purpurbakterien (Gattung *Rhodospseudomonas* und *Rhodospirillum*) und der Mitochondrien. MP und NJ-Rekonstruktionen weisen hier Diskrepanzen auf, indem sich die Positionen der mitochondrialen F-Typ ATPase der höheren Pflanzen und alpha-Purpurbakterien unterscheiden: Während die alpha-Purpurbakterien im MP-Baum am Anfang des Hauptastes, der zu den Mitochondrien führt steht, findet man im NJ-Baum eine monophyletische Gruppierung zwischen den alpha-Purpurbakterien und den Mitochondrien von Pilzen und Säugern, während die Pflanzenmitochondrien als Schwestergruppe abgetrennt werden (falls diese Zuordnung stimmt, müßte die endosymbiontische Aufnahme von Bakterien mindestens zweimal in der Evolution erfolgt sein). Die Bootstrap-Werte dieser Verzweigungen aber weisen daraufhin, daß keine eindeutige Zuordnung möglich ist.

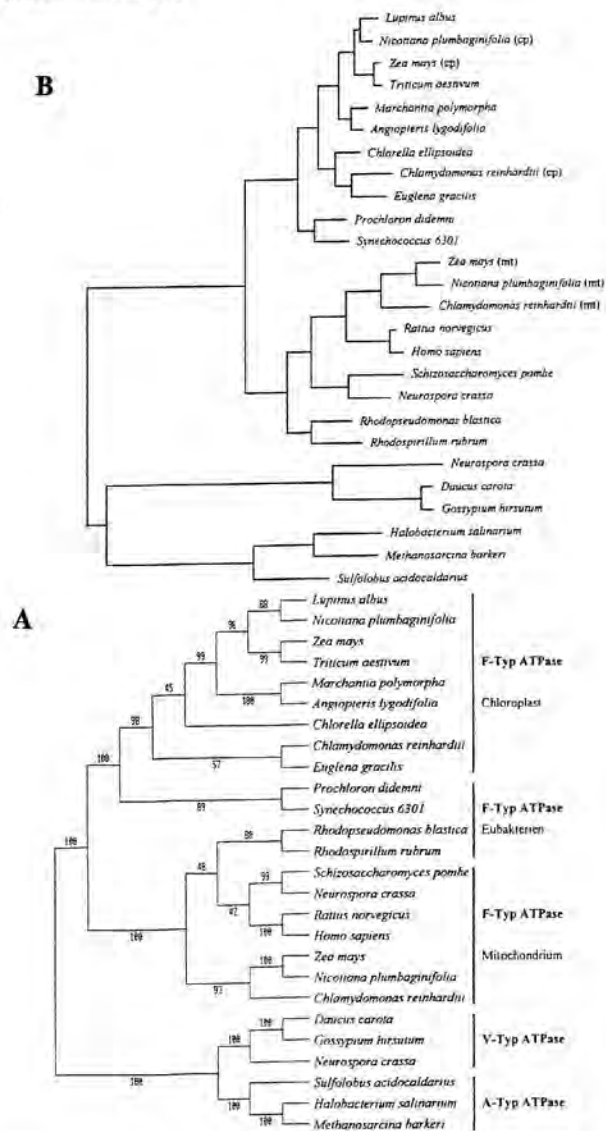


Abb. 2. Evolution der A-Typ, V-Typ und F-Typ ATPasen.

- A) Kladogramm als NJ-Rekonstruktion; berechnet mit dem Poisson-Distanz Modell. Zahlen geben Bootstrap-Werte aus 100 Wiederholungen wieder. B) Phylogramm als MP-Rekonstruktion; Astlängen sind proportional zur Anzahl der Aminosäure-Substitutionen.

- Der 3. Hauptast umfaßt die F-Typ ATPasen der phototrophen Eubakterien (hier *Prochloron* und *Synechococcus*) und der Chloroplasten. Die Abzweigungen innerhalb der Chloroplasten entsprechen der phylogenetischen Reihenfolge, wie sie aus morphologischen und paläontologischen Funden abgeleitet wurde: d.h. auf die Grünalgen folgen Farne und Moose, dann die höheren Pflanzen mit den Untergruppen der mono- und dikotyledonen Arten.

6.3.2.2 Phylogenie der F-Typ ATPase (atpB)

Die Aminosäuresequenz des atpB-Gens von *L. albus* wurde mit 52 anderen homologen Sequenzen aus den verschiedenen Urreichen des Lebens verglichen (Tab. 2). Von 610 AS-Positionen waren 541 variabel und 450 Parsimony-informativ. Wie Abb. 3 A und B zeigen, weisen die MP und NJ Rekonstruktionen viele gemeinsame Gruppierungen auf. Z.B. werden drei Hauptgruppen gefunden, die den a) Archaeobakterien, b) den Eubakterien und Mitochondrien der Pilze, Pflanzen und Tiere und c) den Cyanobakterien und den Plastiden der Algen, Farne, Moose und höheren Pflanzen entsprechen.

Der Hauptast mit den Cyanobakterien und Plastiden ist stärker differenziert als der entsprechende Ast der Mitochondrien, da mehr Taxa zur Auswertung zur Verfügung standen. An der Basis stehen die Cyanobakterien und *Prochloron* (ein Chloroxybakterium); dies würde der Hypothese entsprechen, daß aus den Cyanobakterien oder ihren Vorläufern die Plastiden hervorgingen. Die Kiesel-, Rot- und Braunalgen bilden die nächsten Verwandten, gefolgt von den Grünalgen der Euglenophyta und Chlorophyta. Moose und Farne bilden dann (mit einem Bootstrap-Wert von 91% abgesichert) eine Schwestergruppe zu den höheren Pflanzen. Bei den höheren Pflanzen ist eine klare Auftrennung in Mono- und Dicotyle sichtbar.

Der zweite Hauptast enthält neben den Mitochondrien und den alpha-Purpurbakterien eine größere Anzahl von verschiedenen Eubakterien. Im NJ-Baum sind die gram-negativen Bakterien in zwei Cluster zu finden: a) *E. coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Thiobacillus ferrooxidans* und b) *Bacteroides fragilis*, *Cytophaga lytica* und *Chlorobium limicola*. Die gram-positiven Bakterien bilden eine weitere Einheit, die mit einem hohen Bootstrap-Wert abgetrennt werden. Das zellwandlose *Mycoplasma gallisepticum* hat im MP eine eigene Stellung, während es im NJ-Baum (mit einem sehr niedrigen Bootstrap-Wert) in die Gruppe der gram-positiven Bakterien fällt. Die alpha-Purpurbakterien liegen (Bootstrap-Wert 99%), der Endosymbionten-Hypothese entsprechend, an der Basis zu den mitochondrialen Sequenzen aus Pflanzen, Pilzen und Tieren.

6.4 Diskussion

Nach Gogarten et al. (1989) leiten sich die F-Typ, A-Typ und V-Typ ATPasen von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ab. Wie aus Abb. 2 und 3 hervorgeht, unterstützen auch unsere Datensätze diese Annahme. Während die V-Typ ATPase als Schwestergruppe zur A-Typ ATPase auftritt, führt die F-Typ ATPase zu den Eubakterien und dann, im Einklang mit der Endosymbionten-Hypothese, zu den Mitochondrien und den Plastiden.

Da einige Untereinheiten der ATPase in ihrer Struktur sehr konserviert sind, eignen sie sich, phylogenetische Beziehungen über große systematische Gruppen hinweg zu untersuchen. So wählten Fagan et al. (1994) die P-Typ ATPase und Recipon et al. (1992) die c/III/9-Untereinheit der F-Typ ATPase zur Erstellung globaler Stammbäume. Auch die Untereinheit β der F-Typ ATPase eignet sich, wie Abb. 3 zeigt, als molekularer Marker zur Rekonstruktion der Phylogenie der Urreiche des Lebens und zur Überprüfung der Endosymbionten-Hypothese. Bislang war das *atpB* Gen mehr zur Untersuchung engerer Verwandtschaftsbeziehungen herangezogen worden (Iwabe et al., 1989; Ihara et al., 1991; Lill et al., 1991; Leitsch & Kowallik, 1992; Lockhart et al., 1992; Xie et al., 1993).

Unabhängig von der Methode zur Phylogenie-Rekonstruktion werden 3 Hauptäste erhalten, 1) Archaeobakterien, 2) Eubakterien (ohne Cyanobakterien) und Mitochondrien und 3) Cyanobakterien und Plastiden.

Archaeobakterien

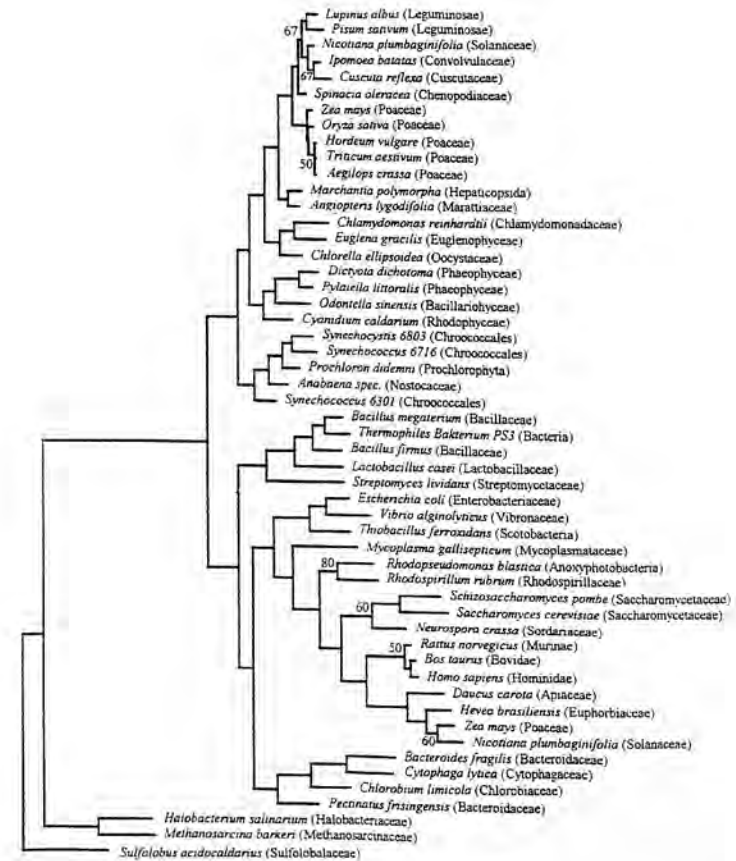
Die Trennung der Archaeobakterien von den Eubakterien wurde bereits durch eine Reihe von biochemischen Merkmalen und molekularen Markern aufgezeigt (Woese & Fox, 1977; Woese 1987; Olsen et al., 1994). Die *atpB*-Daten stimmen daher mit diesem Grundkonzept gut überein. Innerhalb der Archaeobakterien clustern *Halobacterium* und *Methanosarcina* als gemeinsame Gruppe, die als Euryarchaeota von den Crenarchaeota (in die *Sulfolobus* fällt) unterschieden werden (Olsen et al., 1994).

Eubakterien und Mitochondrien

Die Rhodospirillaceen *Rhodospirillum* und *Rhodospseudomonas* gehören zu den alpha-Purpurbakterien, die als Vorläufer der Mitochondrien angesehen werden (Woese, 1987; Cedergren et al., 1988; Gray et al., 1989). Die phylogenetischen Rekonstruktionen (Abb. 2 & 3) zeigen eindeutig den Zusammenhang zu den Mitochondrien der Pflanzen, Pilze und Tiere auf. Nach MP und NJ-Bäumen stellt das *atpB*-Gen der Mitochondrien eine monophyletische Gruppe dar, d.h. die Aufnahme eines Vorläufers der alpha-Purpurbakterien in die Ureuzyte

erfolgte nur einmal. Andere Autoren diskutieren dagegen eine polyphyletische Abstammung der Mitochondrien (Gray et al., 1989; Cedergren et al., 1989).

B.



A.

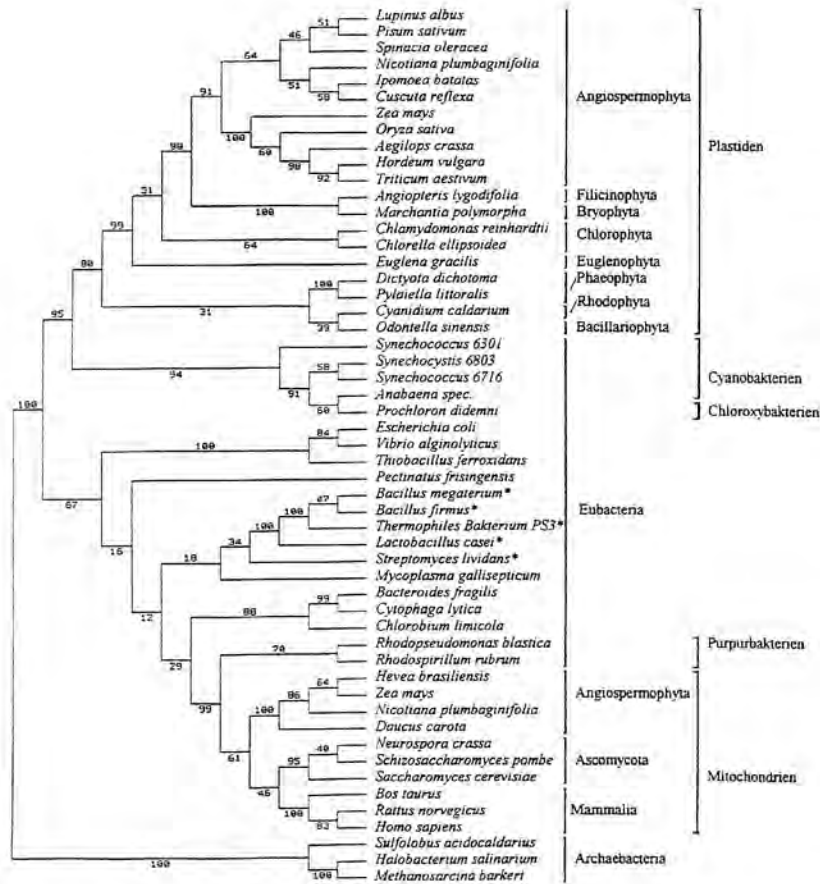


Abb. 3. Phylogenie des atpB-gens

A) Kladogramm als NJ-Rekonstruktion; berechnet mit dem Poisson-Distanz Modell. Zahlen geben Bootstrap-Werte aus 100 Wiederholungen wieder. B). Phylogramm als MP-Rekonstruktion; Astlängen sind proportional zur Anzahl der Aminosäure-Substitutionen. Dargestellt ist der "50%"-Konsensusbaum. Die Zahlen an den Verzweigungen repräsentieren Bootstrapwerte über 50% aus 100 Wiederholungen. Länge des Baumes 3508 Schritte (minimal 2077, maximal 6312 Schritte; CI=0,566; RI=0,666).

Eindeutig läßt sich aufgrund der molekularen Daten feststellen, daß die Pilze eine eigenständige Organismengruppe (im NJ-Baum mit einem Bootstrap-Wert von 95% abgetrennt) und sicher keine Pflanzen (wie noch manchmal angenommen) darstellen. Ob sie aber enger mit den Tieren verwandt sind, wie z.B. Abb. 3 A impliziert, kann nicht eindeutig beantwortet werden: Zum einen sind die Bootstrap-Werte nicht signifikant und zum anderen ist die Topologie der MP-Rekonstruktion nicht kongruent (Abb. 3B).

Innerhalb der Eubakterien bilden die gram-negativen (*E. coli*, *Vibrio*, *Thiobacillus*) und gram-positiven Bakterien (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*) eindeutige Cluster. Ähnliche Gruppierungen wurden von Olsen et al.(1994) über die Analyse der 16S rRNA von 253 Prokaryonten erhalten. Auch die Gruppierung von *Chlorobium* mit *Cytophaga* und *Bacteroides* in eine phylogenetische Gruppe wurde von Olsen et al. (1994) bestätigt; sie steht jedoch im Gegensatz zum Befund von Xie et al. (1993), der *Chlorobium* den Rhodospirillaceae zugeordnet hat.

Cyanobakterien und Plastiden

Cyanobakterien und der Prochlorophyt *Prochloron didemni* stehen an der Basis, die zu den Sequenzen der Plastiden von Algen, Farnen und höheren Pflanzen führt. *Prochloron* ist ein gram-negatives Eubakterium, das als extrazellulärer Symbiont mit Seescheiden assoziiert ist. *Prochloron* enthält Chlorophyll a und b (wie Grünalgen) aber keine Phycobiliproteine, Cyanophycin und Poly-β-hydroxybuttersäure wie die Cyanobakterien. Deshalb wurde *Prochloron* als eigene Klasse Prochlorophyta geführt und als Übergangsstufe zwischen Cyanobakterien und Grünalgen diskutiert (Morden et al., 1989). Aufgrund von 16S rRNA- und den atpB-Sequenzen (Abb. 3) steht *Prochloron* aber den Cyanobakterien näher (Turner et al., 1989; Lockhart et al., 1992). Vermutlich stellen die Prochlorophyten keine einheitliche Gruppe dar, sondern sind polyphyletisch (Palenik et al., 1992; Urbach et al., 1992).

Sequenzen der ribosomalen RNA haben zuerst aufgezeigt, daß die Vorläufer der Cyanobakterien vermutlich (Margulis, 1970; Woese et al., 1990) von der Ureucyte aufgenommen und als Plastid weitergeführt wurden. Unsere atpB-Bäume unterstützen die monophyletische Entstehung der Plastiden und die enge Beziehung zu den Cyanobakterien (Abb. 2 und 3). Nicht alle molekularen Daten stehen mit dieser Annahme im Einklang: RbcS und rbcL-Sequenzen zeigen eine Verwandtschaft der Rot- und Braunalgen zu den β-Purpurbakterien (*Alcaligenes*) und nicht zu den Cyanobakterien (Valentin, et al., 1990; Assali et al., 1991). Ob dies wirklich als Beweis für eine polyphyletische Entstehung der Plastiden angesehen werden kann (Valentin & Zetsche, 1990; Gray 1992; Assali et al., 1991), ist strittig,

da auch ein lateraler Gentransfer des *rbcLS*-operons zwischen β -Purpurbakterien und Rot- und Braunalgen erfolgt sein könnte.

Innerhalb der Algen mit Chlorophyll a und b, erhielten wir mit NJ und MP-Analysen unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 2 & 3): Während MP *Chlamydomonas*, *Euglena* und *Chlorella* in ein gemeinsames Cluster steckt, trennt NJ *Chlamydomonas* und *Chlorella* zusammen als Schwestergruppe von *Euglena* ab. Dies würde der Einteilung in die Chlorophyta und Euglenophyta entsprechen. Wir nehmen deshalb an, dass der NJ-Baum die Realität besser widerspiegelt.

Die weitere Aufgliederung in Farne/Moose an der Basis zu den höheren Pflanzen entspricht den gängigen Vorstellungen zur Evolution der Pflanzen; d.h. der molekulare Marker, der eigentlich nur die Evolution der Plastiden repräsentiert, gibt auch die Entwicklung der ncDNA verlässlich wieder. Unsere Daten implizieren eine eindeutige und basale Trennung von Mono- und Dikotyledonae. *RbcL*-Daten haben jedoch gezeigt, dass die Evolution der höheren Pflanzen wesentlich komplexer verlaufen sein muß: an der Basis stehen Gruppen wie die Gnetales; die Monocotyledonae leiten sich aus einer Seitenlinie aber nicht basal ab (Chase et al., 1993). Die Sequenz von *L. albus* fällt bei allen Rekonstruktionen mit der von *Pisum sativum* in ein eigenes Klade. Für die Untersuchung genauerer Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Leguminosen ist das *atpB*-Gen jedoch nicht geeignet, da es zu konserviert ist. Hier eignen sich das *rbcL*-Gen und die ITS-Bereiche der rDNA wesentlich besser (Käss & Wink, 1995, 1996; in Vorbereitung).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Aminosäure-Sequenz des *atpB*-Gens eindeutig die Endosymbionten-Hypothese unterstützt, d.h. daß die Mitochondrien sich aus den α -Purpurbakterien oder Vorläufern und daß die Plastiden sich aus den Cyanobakterien (oder ihren Vorläufern) ableiten. In beiden Fällen steht unser Datensatz mit der Vorstellung im Einklang, daß Mitochondrien und Plastiden monophyletisch sind, d.h. das der Endosymbioseschritt nur einmal in der Evolution erfolgte.

Dank: Unsere Arbeiten zur Molekularen Phylogenie wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (im SPP Molekulare Grundlagen der Evolution bei Pflanzen) unterstützt.

6.5 Literatur

- Alberts, B. et al.: Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, 1989.
- Assali, N.E., Martin, W.F., Sommerville, C.C., & Goer, S.L. (1991). Evolution of the Rubisco operon from Prokaryotes to algae: Structure and analysis of the *rbcS* gene of the brown alga *Pylaiella littoralis*. Plant Mol. Biol. 17, 853-863.
- Avise, J.C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Cavalier-Smith, T. (1989). Archaeobacteria and Archezoa. Nature 339, 100-101.
- Cavalier-Smith, T. (1992). Bacteria and Eukaryotes. Nature, 356, 570.
- Cedergren, R., Gray, M.W., Abel, Y., & Sankoff, D. (1988). The evolutionary relationships among known life forms. J. Mol. Evol. 28, 98-112.
- Chase, M. et al.: Ann. Missouri Bot. Gard. 80, 528 (1993)
- Fagan, M.J., & Saier, M.H. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analysis and construction of phylogenetic trees. J. Mol. Evol. 38, 57-99.
- Gogarten, J.P. et al. (1989). Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: Implication for the origin of eucaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 6661-6665.
- Gray, M.W., Sankoff, D., Cedergren, R.J. (1989). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on highly conserved structural core in small subunit rRNA. Nucl. Acids Res. 12, 5837-5852.
- Gray, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. Internat. Rev. Cyt. 144, 233-357.
- Hanke, M. (1995), Dissertation, Universität Heidelberg.
- Ihara, K. & Mukohata, Y. (1991). The ATP synthase of *Halobacterium salinarium* is an archaeobacterial type as revealed from amino acid sequences of its two major subunits. Arch. Biochem. Biophys. 286, 111-116.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. & Miyata, T. (1989). Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria and eucaryotes, inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 9355-9359.
- Käss, E. & Wink, M. (1995). Molecular phylogeny of the Papilionoideae (family Leguminosae): *rbcL* gene sequences versus chemical taxonomy. Botanica Acta 108, 149-162.
- Käss, E. & Wink, M. (1996). Molecular evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. Z. Naturforsch. (eingereicht)

- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (1993). MEGA-Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.0, Penn. State University.
- Leitsch, C.E.W. & Kowallik, K.V. (1992). Nucleotide sequence and phylogenetic implication of ATPase subunits β and ϵ encoded in the chloroplast genome of the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Plant Mol. Biol.* 19, 289-298.
- Lill, H. & Nelson, N. (1991). The *atp1* and *atp2* operons of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 17, 641-652.
- Lockhart, P.J., Beanland, T.J., Howe, C.J., & Larkum, A.W.D. (1992). Sequence of *Prochloron didemni atpBE* and the inference of chloroplast origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2742-2746.
- Margulis, L. (1970). Origin of eucaryotic cells. Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Margulis L., Schwartz, K.V. (1982). Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on the earth. WH Freeman, New York; deutsch: Die fünf Reiche der Organismen. Heidelberg: Spektrum, 1989
- Morden, C.W. & Golden, S.S. (1989). Psba genes indicate common ancestry of prochlorophytes and chloroplasts. *Nature* 337, 382-384 and 339, 400-401.
- Olsen, G.J, Woese, C.R. & Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 176, 1-6.
- Palenik, B. & Haselkorn, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll containing procaryotes. *Nature* 335, 265-267.
- Recipon, H., Perasso, R., Adoutte, A. & Quetier, F. (1992). ATP synthase subunit *c/III/9* gene sequences as a tool for interkingdom and metaphytes molecular phylogenies. *J. Mol. Evol.* 34, 292-303.
- Swofford, D.L.(1993). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 3.1.1., Illinois.
- Turner, S., Burger-Wiersma, T., Giovannoni, SJ, Mur, L.R. & Pace, N.R. (1989). The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts. *Nature* 337, 380-382.
- Urbach, E., Robertson, D.L. & Chrisholm, S.W. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355, 267-269.
- Valentin, K. & Zetsche, H. (1990). Structure of the rubisco operon from unicellular red alga *Cyanidium caldarium*: Evidence for a polyphyletic origin of plastids. *Mol. Gen. Genet.* 222, 425-430.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L.(1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 87,4576-4579.
- Xie, D.L., Lill, H., Hauska, G., Maeda, M., Futai, M. & Nelson, N. (1993). The *atp2* operon of the green bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta* 1172, 267-273.

7 Interaktion von Lupinenalkaloiden mit Acetylcholin-Rezeptoren

Thorsten Schmeller und Michael Wink

Universität Heidelberg

Institut für Pharmazeutische Biologie

Im Neuenheimer Feld 364

D-69120 Heidelberg

Zusammenfassung

Ein *in vitro*-Assay wurde entwickelt, mit dem man die Bindung von Alkaloiden an nicotinergen und muscarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) aus Schweinehirn messen kann. 14 Chinolizidinalkaloide wurden getestet: Am nAChR waren Cytisin, N-Methylcytisin und Lupanin am aktivsten, während 13-Tigloyloxylupanin, Spartein, Angustifolin und Albin bevorzugt am mAChR banden. Die in den Alkaloidgemischen der Lupinen vorkommenden Alkaloide beeinflussen in jedem Falle beide Rezeptorklassen, worauf die Toxizität der Chinolizidinalkaloide (neben Interaktionen mit Na⁺ und K⁺-Kanälen) vermutlich zurückzuführen ist.

Abstract

An *in vitro* system was developed to measure the binding of alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors (nAChR, mAChR) from porcine brains. 14 quinolizidine alkaloids were tested in this system: Cytisine, N-methylcytisine and lupanine were most active at the nAChR, whereas 13-tigloyloxylupanine, sparteine, angustifoline and albine bound preferentially to the mAChR. The alkaloids of typical mixtures (as present in lupins) affect both targets. We assume that this interaction (besides a modulation of Na⁺ and K⁺ channels) is responsible for the toxicity of lupin alkaloids.

Key Words: acetylcholine receptor, nAChR, mAChR, quinolizidine alkaloids, receptor binding

7.1 Einleitung

Ein auffälliges Merkmal der höheren Pflanze ist ihre Fähigkeit, eine Vielzahl von Naturstoffen, die sogenannten Sekundärstoffe zu produzieren. Bei Betrachtung der in Tabelle 1 aufgeführten Zahlen der derzeit bekannten Strukturen ist zu beachten, daß bislang nur ca. 15%

aller Pflanzenarten untersucht wurden. Man kann annehmen, daß die tatsächliche Zahl ein Vielfaches betragen wird. Bedingt durch neue Chromatographieverfahren, wie HPLC und Kapillargaschromatographie (GLC) sowie immer leistungsfähigere Massenspektrometer und NMR-Geräte wird die Zahl neuer Naturstoffe in den nächsten Jahren noch gewaltig erhöht werden.

Tabelle 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	12000
Nichtproteinogene Aminosäuren	400
cyanogene Glykoside	50
Glucosinolate	100

Die etwa 360000 Pflanzenarten, von denen etwa 1 Million Tierarten abhängen, stehen als autotrophe Organismen in der Nahrungskette ganz unten. Pflanzen sind unbeweglich und können weder fliehen, noch sich aktiv mit Waffen wehren. Ein Immunsystem gegen Mikroorganismen, wie es aus dem Tierreich bekannt ist, fehlt bei den Pflanzen ebenfalls. Da wir annehmen können, daß es nicht das Lebensziel der Pflanze ist, gefressen zu werden, mußten im Laufe der Evolution Strategien entwickelt werden, die ein Überleben gewährleisten (Wink, 1988; 1993). Sehr viele Beispiele für die Effektivität dieser Entwicklung finden sich unter den Alkaloiden. Neben dem unangenehmen bitteren Geschmack sind die meisten Alkaloide für Warmblüter, also auch den *Homo sapiens*, sehr toxisch (Review: Wink, 1993). Besonders giftige Alkaloide sind z.B. Aconitin, Coniin, Hyoscyamin, Curarin, Strychnin, Colchicin, Cytisin, und Nicotin. Für die toxische Wirkung der Sekundärstoffe gibt es verschiedene Angriffspunkte, wie DNA, RNA, Transkription, Translation, Replikation, Membranstabilität, Elektronentransport-Ketten, Cytoskelett, Enzyme und Rezeptoren von Neurotransmittern und Hormonen (Ulrichova et al., 1983; Robinson & Robinson, 1968; Bossi et al., 1986; Wolff & Knippling, 1993; Fadejeva et al., 1980; Roddick et al., 1988, 1990; Krey & Hahn, 1969, 1975; Wink & Twardowski, 1992; Schmeller et al., 1994, 1995; Wink & Latz-Brüning, 1995).

Auch die in Lupinen und anderen Leguminosen der Unterfamilie Papilionoideae vorkommenden Chinolizidin-Alkaloide zeigen eine Reihe von pharmakologischen und toxikologi-

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Prinzip des Bindungsassays

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Bindung eines radioaktiv markierten AChR-Liganden an ACh-Rezeptoren. Gibt man einem Versuchsansatz eine zweite Substanz hinzu, die ebenfalls am AChR bindet, so reduziert sich die Menge des gebundenen markierten AChR-Liganden. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Rezeptoren bzw. deren Bindungseigenschaften charakterisieren (Yamamura & Snyder 1974, Romano & Goldstein, 1980).

Dazu wird ein Gewebehomogenat (z.B. aus Gehirn), das die gewünschte Rezeptorenpopulation in ausreichender Dichte enthält, mit einem für den Rezeptor spezifischen tritierten Liganden inkubiert. Nach einer bestimmten Zeit stellt sich ein Sättigungsgleichgewicht ein, das dem Massenwirkungsgesetz folgt. In diesem Equilibrium trennt man den gebundenen Radioliganden von ungebundenem Radioliganden durch Vakuum-Filtration ab. Dies muß sehr rasch erfolgen, um das Gleichgewicht nicht zu stören. Der gebundene Anteil läßt sich durch Bestimmung der Radioaktivität auf der Filtermembran quantifizieren. Die gefundene Gesamtbindung setzt sich allerdings aus zwei Komponenten zusammen: Zum einen aus der spezifischen Rezeptorbindung und zum anderen aus der unspezifischen Bindung an Proteine, Lipide, Zucker (die im Homogenat enthalten sind) oder die Filtermembran selbst. Der Anteil der spezifischen Bindung wird durch Verdrängung des rezeptorgebundenen Radioliganden mit einem sehr großen Überschuß (100 bis 1000fach) eines anderen unmarkierten, selektiv bindenden Liganden („Blank“) ermittelt. Die spezifische Bindung errechnet sich also aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und der in Anwesenheit eines unmarkierten Liganden bestimmten unspezifischen Bindung (Romano & Goldstein, 1980; Yamamura & Snyder 1974; Hulme, 1990, 1992).

Für die Untersuchung der cholinergen Rezeptoren erfolgte die Inkubation des Gewebehomogenates in 10 ml Reagenzgläsern aus Glas. In die Gläser wurden zunächst der Radioligand, Puffer, Blanksubstanzen bzw. die zu untersuchende Alkaloidlösung pipettiert und die Inkubation durch Zugabe des Gewebehomogenats gestartet. Die Reaktionslösungen wurden mit einem Vortex vorsichtig gemischt. Nach Erreichen des Equilibriums wurde mit einer Rekordspritze mit Zweiwegeventil, die ein kontinuierliches Pipettieren ermöglichte, isotone und auf Eis gekühlte Kochsalzlösung zugegeben. Sofort nach Zugabe der Waschlösung wurde das Inkubationsgemisch mittels Vakuum durch Whatman GF/C-Filter gesaugt. (Zur Filtration wurde eine selbstgebaute Absaugvorrichtung mit zwölf Membranfilterhaltern eingesetzt, die

man gewöhnlich zur Sterilfiltration verwendet). Das Gewebe und daran gebundene Radioaktivität bleiben auf dem Filter zurück. Gewebe und Filter wurden mit Kochsalzlösung nachgewaschen, um den Anteil von nicht rezeptorgebundenen Liganden zu entfernen. Die Filter wurden anschließend in „Minivials C“ überführt und 30 min bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Danach wurden 4 ml UltimaGold Szintillations Cocktail zugegeben. Nach einstündigem Schütteln wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Die Radioliganden, Blanksubstanzen und alle übrigen Inkubationszusätze wurden im Assay-Puffer (s.u.) angesetzt.

7.2.2 Gewebepreparation

Zur Präparation der Rezeptorensuspension wurden Schweinehirne von frisch geschlachteten Schweinen verwendet. Innerhalb von 15 bis 20 min nach dem Tod der Tiere wurde von den Hirnhälften das Cerebellum entfernt und verworfen. Die anderen Hirnteile wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -80 °C gelagert.

7.2.3 Synaptosomen-Präparation

Zur Präparation wurde jeweils eine Hirnhälfte (ca. 50 g) zuerst mit einem Mixer in Puffer (0,32 M Saccharose, 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 1 mM EDTA und 0,1 mM PMSF) grob, und dann mit einem Ultraturax fein zerkleinert (Haga & Haga, 1990). Das so behandelte Gewebe wurde zwei- bis dreimal 15 min lang bei 1400 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand einer Ultrazentrifugation bei 100.000 x g unterworfen (4 °C, 90 min). Das so erhaltene Pellet wurde in Puffer (wie oben, ohne Saccharose) aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Am Versuchstag wurden entsprechende Aliquots entnommen, mit Assaypuffer so verdünnt, daß eine einheitliche Proteinkonzentration vorlag und für die Versuche eingesetzt.

7.2.4 Bindungstests: Muskarinerge Rezeptoren (m-AChR)

Das Inkubationsvolumen betrug bei allen Versuchen 500 µl und setzte sich aus 50 µl Radioligandlösung (³H-QNB), 50 µl Atropinlösung (20 µM) als Blank bzw. Kalium-Phosphat-Puffer und 400 µl Gewebehomogenat zusammen. In den Bindungsexperimenten wurden statt Puffer die Alkaloidlösungen einer bestimmten Konzentration eingesetzt.

Folgende Vorversuche wurden zur Optimierung des ³H-QNB-Bindungsassays durchgeführt:

a.) Zeitabhängigkeit

Das Erreichen des Bindungsgleichgewichts wurde bei einer konstanten Konzentration an $^3\text{H-QNB}$ (4000 cpm) und Protein (500 μg) bei Raumtemperatur ermittelt. Die spezifische Bindung wurde nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (7 bis 90 min) nach Whatman GF/C-Filtration bestimmt (Abb. 1).

b.) Abhängigkeit der Bindung von der Proteinkonzentration

Es wurden ansteigende Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,24 mg/ml bis 1,92 mg/ml mit einer konstanten Menge $^3\text{H-QNB}$ (4000 cpm) über 60 min bei RT inkubiert. Für jede Proteinkonzentration wurde die spezifische Bindung ermittelt (Abb. 2).

c.) Sättigungsexperiment

450 μl Gewebehomogenat (entsprechend 500 μg Protein) wurden mit 25 μl verschiedener $^3\text{H-QNB}$ -Lösungen (230 cpm - 135000 cpm) und 25 μl Puffer bzw. 25 μl Atropin (2 μM) als „Blank“ versetzt. Nach Erreichen des Equilibriums wurde über Whatman GF/C-Filter filtriert und dreimal mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden die spezifischen Bindungen für alle $^3\text{H-QNB}$ -Konzentrationen berechnet (Abb. 3 + 4).

d.) Waschversuch

Zur Minimierung der unspezifischen Bindung des Radioliganden an Filter und Gewebe mußte das Puffer-Volumen zum Waschen der Filter nach der Filtration optimiert werden. Dazu wurde eine Testreihe mit konstanten Mengen Radioligand (4000 cpm) und Protein (500 μg) 60 min bei Raumtemperatur mit Atropin (20 μM) inkubiert. Nach der Filtration über Whatman GF/C Filter wurden die Filter mit verschiedenen Volumina isotoner Kochsalzlösung gespült. Danach wurde die Radioaktivität gemessen (Abb. 6).

e.) Verdrängungsexperimente

Um festzustellen, ob die $^3\text{H-QNB}$ -Bindung reversibel ist, wurde bei konstanter $^3\text{H-QNB}$ (4000 cpm) und Protein-Menge (500 μg) mit steigenden Konzentrationen des bekannten Antagonisten Atropin (10 pM - 1 μM) inkubiert und die spezifische Bindung bestimmt (Abb. 5). Die Verdrängungskurven der Lupinenalkaloide wurden analog erhalten (Abb. 15 a - 15 n). Vorversuche zur Optimierung des $^3\text{H-QNB}$ -Bindungsassays (m-AChR):

Aus den dargestellten Vorversuchen ergab sich eine Inkubationszeit von 60 min, mit 500 μg Protein, 4000 cpm $^3\text{H-QNB}$ und Atropin (20 μM) als Blank. Es wurde dreimal mit 3 ml Kochsalzlösung gewaschen.

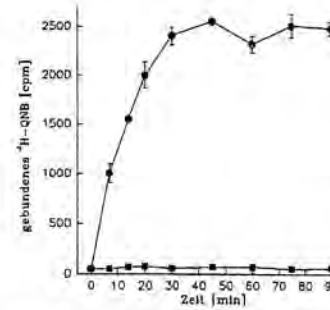


Abb. 1 Kinetik der Bindung von $^3\text{H-QNB}$. Spezifische Bindung (●), unspezifische Bindung (■).

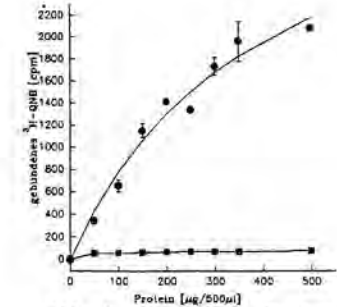


Abb. 2 Abhängigkeit der spezifischen (●) und unspezifischen (■) Bindung von der Proteinmenge.

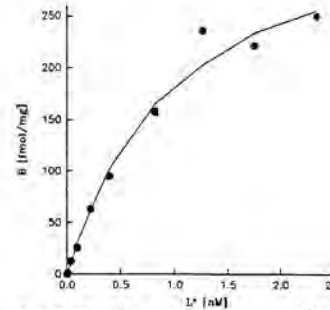


Abb 3 Sättigung der Bindung mit $^3\text{H-QNB}$.

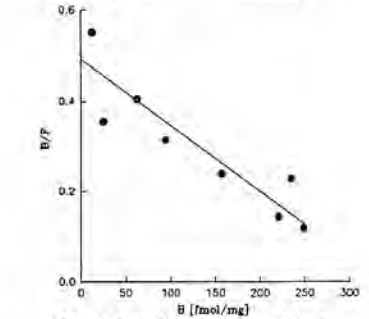


Abb. 4 Scatchard Plot zu Abb. 3.

Die Sättigung ergab einen B_{max} -Wert von 338,0 fmol/mg bei einem K_d von 0,68.

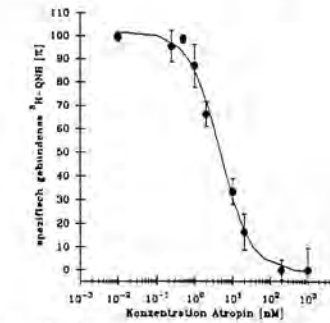


Abb. 5 Verdrängung von $^3\text{H-QNB}$ mit Atropin.

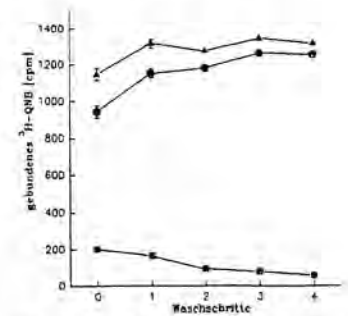


Abb. 6 Gesamtbindung (▲), spezifische (●) und unspezifische (■) Bindung in Abhängigkeit von der Zahl der Waschschrte. Ein Waschschrte entspricht 3 ml isotoner Kochsalzlösung.

7.2.5 Bindungstest: Nikotinerge Rezeptoren (n-AChR)

Für die nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren wurden die oben beschriebenen Vorversuche in gleicher Weise durchgeführt (Abb 7 - 12). Als Radioligand wurde Methyl-³H-Nicotin verwendet. Die Vorversuche ergaben folgende optimale Versuchsbedingungen: 500 µg Protein wurden mit 100 000 cpm Methyl-³H-Nicotin 45 min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung des "Blank-Wertes" wurde unmarkiertes Nikotin (1 mM) eingesetzt.

7.2.5.1 Vorversuche zur Optimierung des ³H-Nicotin-Bindungsassays (n-AChR)

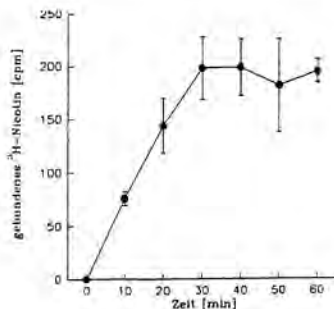


Abb. 7 Kinetik der Bindung von ³H-Nicotin; (●) spezifische Bindung.

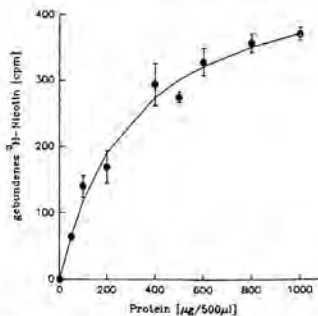


Abb. 8 Abhängigkeit der spezifischen ³H-Nicotin-Bindung (●) von der Proteinmenge.

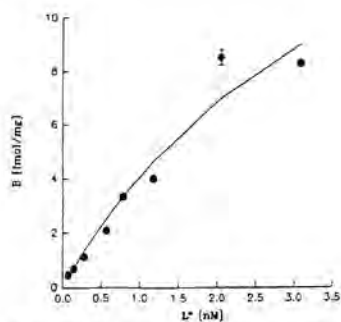


Abb. 9 Sättigung der Bindung mit ³H-Nicotin.

Die Sättigung ergab einen B_{max}-Wert von 21,4 fmol/mg bei einem K_d von 4,3.

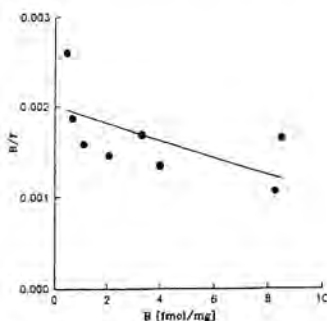


Abb. 10 Scatchard-Plot zu Abb. 9.

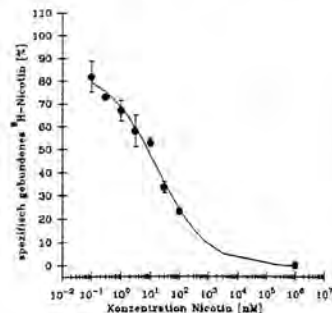


Abb. 11 Verdrängung von ³H-Nicotin mit Nicotin.

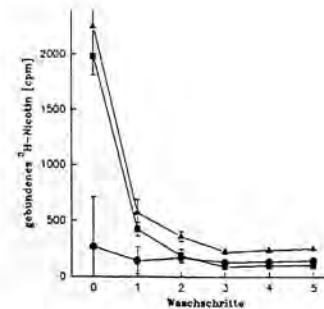


Abb. 12 Gesamtbindung (▲), spezifische (●) und unspezifische (■) Bindung in Abhängigkeit von der Zahl der Waschschröte. Ein Waschschröte entspricht 3 ml isotoner Kochsalzlösung.

Aus den dargestellten Vorversuchen ergab sich eine Inkubationszeit von 40 min, mit 500 µg Protein, 100000 cpm ³H-Nicotin und Nicotin (1 mM) als Blank. Es wurde dreimal mit 3 ml Kochsalzlösung gewaschen.

Da im Vergleich zu den muskarinergen Rezeptoren mehr Radioaktivität eingesetzt werden mußte, war es notwendig, die unspezifische Filterbindung zu verringern, um ein günstigeres Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung zu erhalten. Dazu wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen die Whatman GF/C Filter mit verschiedenen Polymeren vorinkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden 100 000 cpm ³H-Nicotin über die Filter abgesaugt und dreimal mit 3 ml isotoner Kochsalzlösung nachgewaschen. Die geringste Filterbindung ergab sich nach zweieinhalbstündiger Vorinkubation der Filter in einer 5%igen Lösung von Polyethylenglykol 8000 (Abb. 13 + 14).

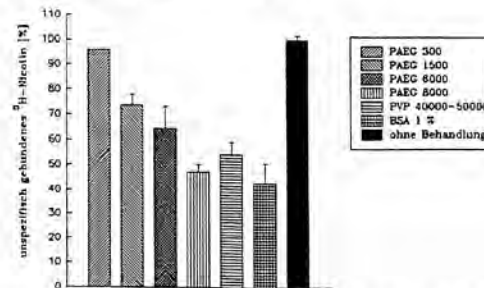


Abb. 13 Bindung von ³H-Nicotin an Filter, die 90 min mit 0,5 %igen Lösungen verschiedener Polymere behandelt waren. Die Bindung der unbehandelten Filter wurde als 100 % gesetzt.

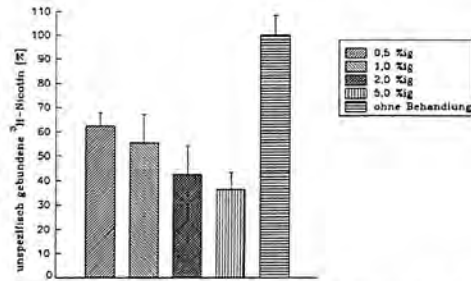
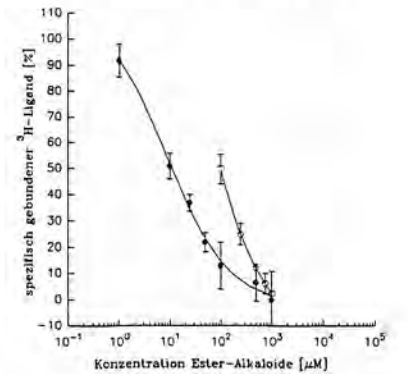
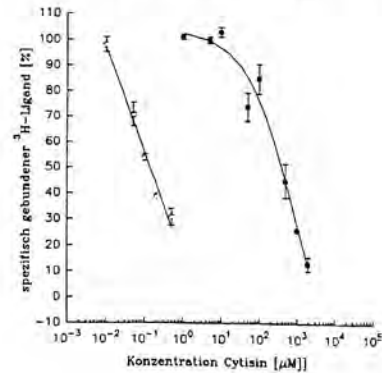
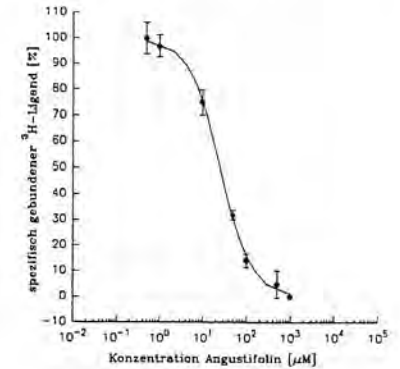
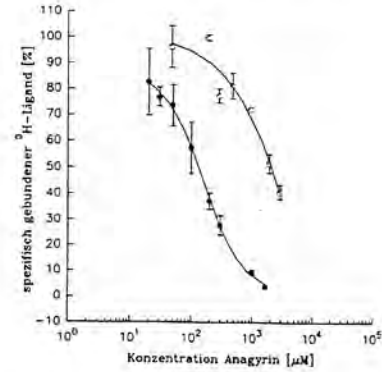
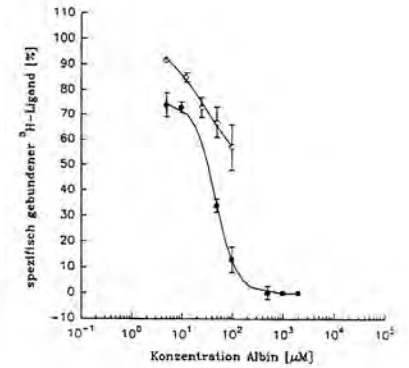
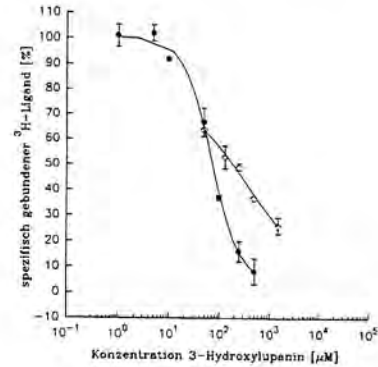
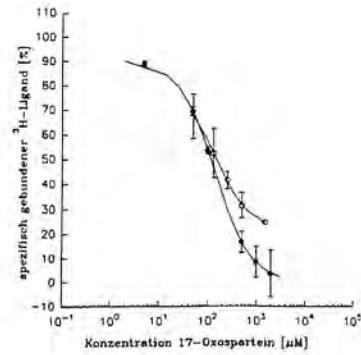
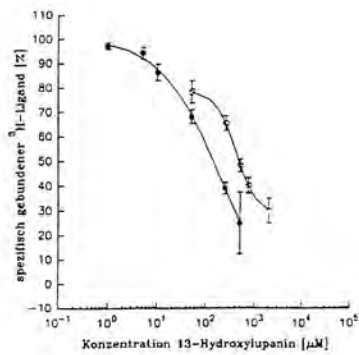


Abb. 14 Bindung von ^3H -Nicotin an Filter, die zuvor 2,5 h mit Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von PAEG 8000 behandelt waren. Die Bindung der unbehandelten Filter wurde als 100 % gesetzt.

Da die Behandlung der Filter mit einer 5 %igen Lösung von PAEG 8000 das beste Ergebnis bei der Reduzierung der Filterbindung ergab, wurden die Filter 2 - 4 h mit einer Lösung von PAEG 8000 in bidestilliertem Wasser vorbehandelt.

7.2.6 Verdrängungskurven

Die Abbildungen 15 a bis 15 n zeigen typische Verdrängungskurven für die Lupinenalkaloide.



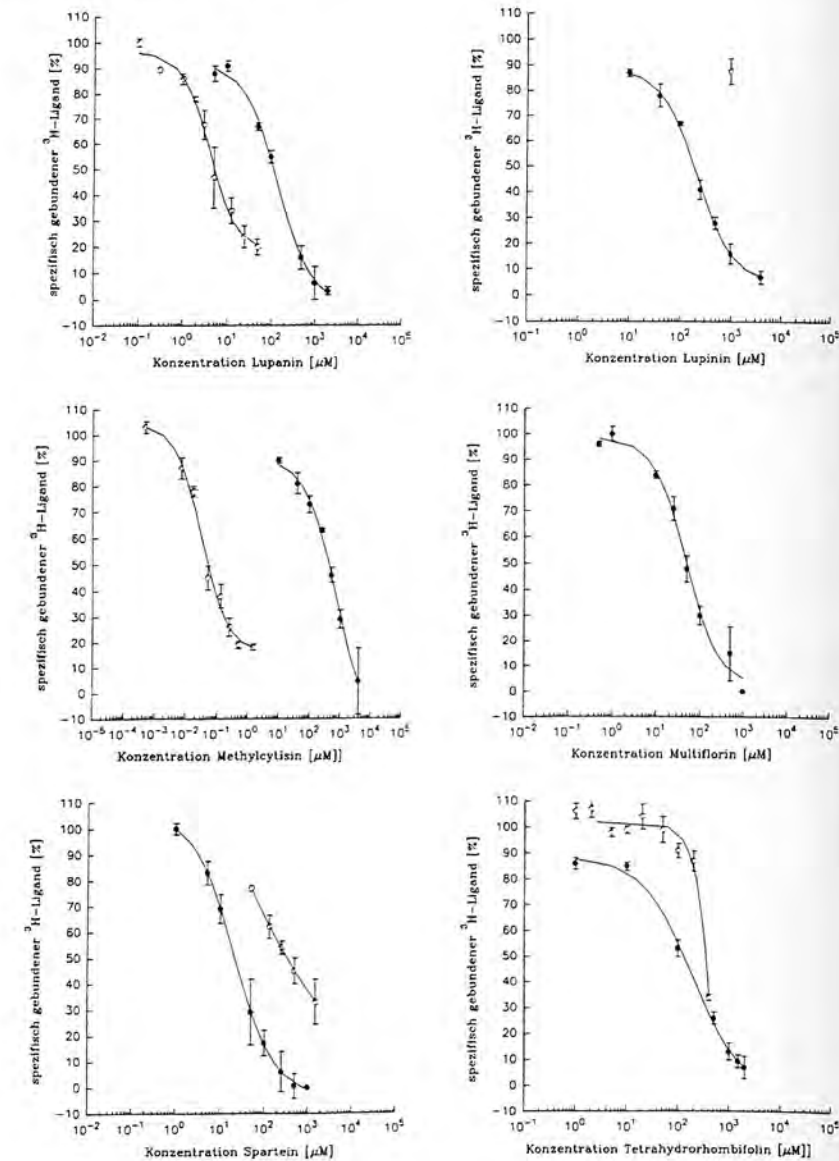


Abb. 15 a - 15 n Verdrängungskurven der untersuchten Lupinenalkaloide; (●) m-AChR, (○) n-AChR.

7.2.7 Auswertung der Rezeptorbindungsstudien: Sättigungsexperimente

Alle Bindungsparameter wurden aus den experimentellen Bindungsdaten unter Verwendung des Computerprogrammes SigmaPlot 5.01 ermittelt. Zur Linearisierung der Bindungsdaten wurde das Verfahren von Scatchard (1949) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen angewandt. Danach gilt folgende Beziehung:

$$B/F = (-1/Kd) * B + (1/Kd) + B_{max}$$

B: gebundener Anteil des Radioliganden

F: freier in Lösung befindlicher Anteil des Radioliganden

Kd: Dissoziationskonstante des Ligand-Rezeptor-Komplexes

B_{max}: Anzahl der Bindungsstellen

Den Scatchard Plot erhält man durch Auftragen der Konzentration des gebundenen Radioliganden (B) gegen den Quotienten von gebundenem und freiem Radioliganden (B/F) (Abb. 4 + 10). Die Steigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert der Gleichgewichts-Konstanten (-1/Kd), ihr Schnittpunkt mit der Abszisse (B/F = 0) die Konzentration der Bindungsstellen (B_{max}).

7.2.8 Isolierung der Chinolizidin-Alkaloide

Alkaloide wurden aus Samen von *Lupinus mutabilis*, *Lupinus albus* und *Anagyris foetida* isoliert. Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte mittels Vakuum-Flüssigchromatographie (Pelletier et al., 1986). 12 g Rohextrakt aus *L. albus* ergaben 6 g Lupanin, 0,8 g Multiflorin, 0,3 g 13- α -Hydroxylupanin, 0,2 g einer Mischung aus 13- α -Angeloyl- und 13- α -Tigloyloxyupanin, 0,15 g Albin und 0,05 mg Angustifolin. Tetrahydrorhombifolin und 3- β -Hydroxylupanin wurden aus *L. mutabilis*, Methylcytisin und Anagyrin aus *Anagyris foetida* isoliert. 17-Oxosparteine wurden aus Spartein synthetisiert (Wink, 1993b), Cytisin, Spartein und Lupinin wurden bei Sigma Chemie gekauft.

Die Identität der Alkaloide wurde mittels Gaschromatographie, Hochdruck-Flüssig-Chromatographie, Massenspektroskopie, und ¹³C-NMR überprüft (Wink, 1993b).

7.3 Ergebnisse und Diskussion

Am nicotinergen Acetylcholin-Rezeptor (n-AChR) zeigten Cytisin und Methylcytisin die höchste Affinität (IC₅₀ 0,137 μ M bzw. 0,051 μ M) (Tab. 2) was auch schon von anderen

Autoren beschrieben wurde (Barlow & Johnson, 1989). Von den tetrazyklischen Chinolizidinalkaloiden wies Lupanin die höchste Bindungsaffinität zum n-AChR (IC_{50} 5,3 μ M) auf. Bis auf Angustifolin, Lupinin und Multiflorin waren alle anderen QA an diesem Rezeptor aktiv.

Am muscarinergen Acetylcholin-Rezeptor (m-AChR) zeigten die Chinolizidin-Alkaloide ebenfalls eine Bindungsaffinität. Dabei ist auffällig, daß Cytisin und Methylcytisin eine geringe Aktivität besitzen, während z.B. Spartein, Angustifolin und Albin eine etwa 10 fach höhere Affinität zum m-AChR als zum n-AChR besitzen (Tab. 2).

Tab. 2 IC_{50} -Daten (μ M) der Lupinen-Alkaloide an den beiden AChR. Die IC_{50} bezeichnet die Konzentration, bei der der Radioligand zu 50 Prozent verdrängt wurde.

Alkaloid	n-AChR	m-AChR
13-Hydroxy-Lupanin	467,2	139,7
17-Oxospartein	155,0	117,9
3-Hydroxy-Lupanin	192,4	74,1
Albin	237,7	32,9
Anagyrin	2095,8	132,1
Angustifolin	>500	25,3
Cytisin	0,137	398,2
Esteralkaloide	99,8	11,1
Lupanin	5,3	118,0
Lupinin	>500	189,9
Methylcytisin	0,051	416,7
Multiflorin	>500	49,4
Spartein	330,8	21,3
Tetrahydro-Rhombifolin	347,6	128,8

Mit der vorliegenden Studie konnte der molekulare Wirkmechanismus der Chinolizidin-Alkaloide, die eine wichtige Rolle in der chemischen Verteidigung der Lupinen und anderer Leguminosen spielen, aufgezeigt werden. Dabei muß allerdings offen bleiben, ob es sich um Agonisten oder um Antagonisten an den cholinergen Rezeptoren handelt, da man nur

Aussagen über das Bindungsverhalten der Substanzen machen kann. Da es sich bei Cytisin und Methylcytisin um nicotinerge Agonisten handelt, liegt der Schluß nahe, daß auch andere Lupinenalkaloide zumindest am n-AChR agonistisch wirken könnten. Auch Spartein wirkt in kleinen Dosen erregend, in höheren Dosen lähmend auf die glatte Muskulatur. Dieser Effekt läßt sich auf einen Agonismus an n-AChR im autonomen Nervensystem zurückführen, da man mit Nicotin die gleiche Wirkung feststellen kann. Nicotin wirkt zuerst durch Depolarisation der postsynaptischen Membranen ganglienerregend, dann durch Dauerdepolarisation ganglienblockierend. Daß die erregende Wirkung des Nicotins nur wenige Millisekunden dauert, ist mit dessen hoher Affinität (IC_{50} 8,2 nM) und der damit schlechten Dosierbarkeit zu erklären. Demgegenüber ist die „therapeutische Breite“ von Spartein durch die verhältnismäßig geringe Affinität (330,8 μ M) zu deuten, so daß dosisabhängig gezielte Resultate erreicht werden können. Das Ergebnis mit Spartein ist bemerkenswert, da man bisher angenommen hatte, daß es nur an den n-AChR binden würde.

Wie Tabelle 2 zeigt, binden alle QA mit hoher Affinität an einem der beiden ACh-Rezeptoren; die meisten binden aber ebenso an den jeweils anderen Rezeptor.

In den Pflanzen liegen im Allgemeinen Gemische von Chinolizidin-Alkaloiden vor. In Lupinen liegt Lupanin als Hauptalkaloid mit anderen Hauptkomponenten wie Angustifolin und 13- α -Hydroxylupanin (*L. angustifolius*), Albin und Multiflorin (*L. albus*) oder Lupinin und Spartein (*L. luteus*) vor. Dies bedingt, daß sowohl der n-AChR als auch der m-AChR moduliert werden. Da diese Rezeptoren unterschiedliche physiologische Funktionen steuern, bewirken die Alkaloide in jedem Falle eine starke Stoffwechselstörung. Da die QA gleichzeitig Na^+ - und K^+ -Kanäle beeinflussen, kommt es zu einer Wirkungsverstärkung. Wir nehmen an, daß über diese „Hybrid“-Wirkung die toxikologische Eigenschaft der Lupinen-Alkaloide zu erklären ist.

Aus evolutionärer Sicht ist es also für die Pflanze von Vorteil, wenn sie ein komplexes Gemisch von Sekundärstoffen bildet, um möglichst viele verschiedene Angriffspunkte abzudecken, und damit die Anpassung durch den Fraßfeind zu erschweren. Ein weiterer Aspekt in der erfolgreichen Verteidigung ist, möglichst viele Organe im Körper des Herbivoren zu beeinflussen, um ihn damit zu vergiften. Da die cholinergen Rezeptoren im Organismus weit verbreitet sind, ist es aus evolutionären Gesichtspunkten sinnvoll die Verteidigung gegen diese Targets zu richten.

Aus angewandter Sicht läßt sich aus dieser Eigenschaft sicher ein Nutzen ziehen. Da bei vielen Erkrankungen und Stoffwechselstörungen AChR beteiligt sind, könnte man einzelne QA

vermutlich medizinisch anwenden. Da AChR und Na⁺- und K⁺-Kanäle auch bei Insekten vorkommen, läßt sich die insektizide Wirkung der Lupinen-Alkaloide (Wink 1992) rational nachvollziehen. Eine Anwendung als biorationale Insektizide wäre demnach eine weitere Anwendungsmöglichkeit für die Lupinenalkaloide (Wink 1993b).

7.4 Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (Hrsg.): Molecular biology of the cell. 2nd edition, Garland Publishing, Inc., New York (1993).
- Barlow, R.B., Johnson, O.: Relations between structure and nicotine-like activity: X-ray crystal structure analysis of (-)-cytisine and (-)-lobeline hydrochloride and a comparison with (-)-nicotine and other nicotine-like compounds. *Brit. J. Pharmacol.* 98, 799 - 808 (1989).
- Brossi, A., Schönenberger, B., Clark, O.E., Ray, R.: Inhibition of acetylcholinesterase from electric eel by (-)- and (+)-physostigmine and related compounds. *FEBS* 201, 190 - 192 (1986).
- Changeux, J.P., Devillers-Thiery, A., und Chemouille, P.: Acetylcholine receptor: An allosteric protein. *Science*, 225, 1335 - 1345 (1984).
- Fadejeva, M.D., Belyaeva, T.N., Novicov, J.P., Shalabi, H.C., Braun, A.: Possibility of intercalation of the alkaloid sanguinarine to native DNA. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 253, 491 - 494 (1980).
- Gilman, A.G.: Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 8th edition in two volumes. Pergamon press, New York (1991).
- Haga, T., Haga, K.: In: Receptor biochemistry. A practical approach, (E.C. Hulme Hrsg.), IRL press, Oxford, 51, (1990).
- Hucho, F.: Neurochemistry, fundamentals and concepts, VCH, Weinheim (1986a).
- Hucho, F.: The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel. *Eur.J.Biochem.*, 158, 211 - 226 (1986b).
- Hulme, E.C. (Hrsg.) Receptor-ligand interactions, a Practical approach, IRL Press, Oxford, (1990).
- Hulme, E.C. (Hrsg.). Receptor biochemistry, a Practical approach, IRL Press, Oxford, (1992).

- Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F.: In: Alkaloids: Chemical and biological perspectives. Pelletier, W.S. (Hrsg.) Wiley, New York, Vol. 2, 105 - 148 (1984).
- Krey, A.K., Hahn, F.E.: Berberine: Complex with DNA. *Science* 166, 755 - 757 (1969).
- Krey, A.K., Hahn, F.E.: Studies on the methylgreen-DNA complex and its dissociation by drugs. *Biochemistry* 14, 5061 - 5067 (1975).
- Meißner, C., Wink, M.: In: "Lupinen 1991- Forschung, Anbau und Verwertung", (M. Wink, Hrsg.), University Heidelberg, 91 - 129 (1992).
- Pelletier, S.W., Chokshi, H.P., Desai, H.K.: Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* 49, 892 - 900 (1986).
- Robinson, B., Robinson, J.B.: The anti-acetylcholinesterase activities of the alkaloids of *Physostigma venenosum* seeds. *J. Pharm. Pharmac.* 20, Suppl., 213 S - 217 S (1968).
- Roddick, J.G., Rijnenberg, A.L., Osman, S.F.: Synergistic interaction between potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to destabilization of cell membranes: ecological implementations. *J. Chem. Ecol.* 14, 889 - 903 (1988).
- Roddick, J.G., Rijnenberg, A.L., Weissenberg, M.: Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasodine and solamargine. *Phytochem.* 29, 1513 - 1518 (1990).
- Romano, C., Goldstein, A.: Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science* 210, 647 - 650 (1980).
- Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. Acad. Sci.* 51, 660 - 672 (1949).
- Schmeller, T., Sauerwein, M., Sporer, F., Wink, M., Müller, W.E.: Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Nat. Prod.* 57, 1316 - 1319 (1994).
- Schmeller, T., Sporer, F., Sauerwein, M., Wink, M.: Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie* 50, 493 - 495 (1995).
- Stoll, L., Müller, W.E.: Der Radiorezeptorassay. Ein elegantes Prinzip zur quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen in biologischen Materialien. *Pharm. Ztg. Wiss.* 2, 53 - 66 (1991).

- Ulrichová, J., Walterová, D., Preininger, V., Slavik, J., Lenfeld, J., Cushman, M., Šimanek, V.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta med.* 48, 111 - 115 (1983a).
- Ulrichová, J., Walterová, D., Preininger, V., Šimanek, V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta med.* 48, 174 - 177 (1983b).
- Wink, M.: Chemical ecology of quinolizidine alkaloids. In: ACS Symp. Ser. 330, American Chemical Society, Washington DC, 524 - 533 (1987a).
- Wink, M.: Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Med.* 53, 509 - 514 (1987b).
- Wink, M.: Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75, 225 - 233 (1988).
- Wink, M.: The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. In: *Insect-Plant Interactions*. Bernays, E. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, Vol 4, 131 - 166 (1992).
- Wink, M.: Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In: *The alkaloids*, Cordell, G. (Hrsg.), Academic press, New York, Band 43, 1 - 118 (1993a).
- Wink, M.: Quinolizidine alkaloids. In: *Methods in plant biochemistry*, P. Waterman (Hrsg.), Alkaloids and sulfur compounds 8, Academic press, 197 - 239 (1993b).
- Wink, M.: Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In: *Phytochemistry and agriculture*. Beek, T.A. van, Bretler, H. (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 173 - 213 (1993c).
- Wink, M., Twardowski, T.: Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. In: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. (S.J.H. Rizvi and V. Rizvi, eds), Chapman & Hall, London, 129 - 150 (1992).
- Wolff, J., Knipling, L.: Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochem.* 32, 13334 - 13339 (1993).
- Yamamura, H.I., Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1725 - 1729 (1974).

8 Lupinen-Proteinbiosynthese: Aktivitäts- und Regulationstests mit Oligodeoxynukleotiden

Tomasz Twardowski

Institut für Bioorganische Chemie, Polnische Akademie der Wissenschaften,
ul. Noskowskiego 12,
P-61-704 Poznań, Polen

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Funktionen der sogenannten alpha-Sarcin-Domäne von 28S rRNA und der C-loop von 5S rRNA im Lupinensystem charakterisiert. Es werden die zentralen Aussagen für die beiden Domänen für ribosomale Polypeptidsynthese während des Elongationszyklus präsentiert.

Abstract

The functions of the alpha sarcin domain of 28S rRNA and of the C-loop of 5S rRNA were characterized in lupins. It can be shown that both domains are important for the polypeptide synthesis during the elongation phase.

Key Words: Lupin protein biosynthesis, 28S rRNA, 5S rRNA, sarcin, elongation

8.1 Einleitung

Die Ribosomen bilden den Ort der Proteinbiosynthese und nehmen auch aktiv daran teil. Man kann zwei große Klassen unterscheiden: Die Ribosomen der Eukaryoten (80S-Ribosomen) und die der Prokaryoten (70S-Ribosomen). Die Ribosomen in den Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryoten ähneln dem bakteriellen Typ (Abb. 1). Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die Zusammensetzung von Ribosomen.

Ribosomen sind Zellorganelle, die in jedem Zelltyp vorkommen, sowohl bei den Prokaryoten als auch bei den Eukaryoten. Ihre Erforschung begann in den 50er Jahren. Schon bald nach ihrer Entdeckung wurde ihre herausragende Rolle in der Proteinbiosynthese, also der Übersetzung des genetischen Materials in die Proteinstruktur, deutlich. Die Funktion der Ribosomen in allen Organismen ist gleich, und die Proteinsynthese läuft bei beiden Ribosomenklassen nach demselben Prinzip ab, wobei die Synthese in Eukaryoten komplizierter

ist, indem mehr ribosomale Proteine und verschiedene zytoplasmatische Faktoren vorhanden sind. Die Proteinbiosynthese beinhaltet drei Phasen: Initiation, Elongation, Termination.

Abb. 1: Zusammensetzung der Ribosomen (für Prokaryote Daten am Beispiel von *Escherichia coli*; die genaue Anzahl für höhere Eukaryoten, z. B. Pflanzen, ist nicht bekannt).

Untereinheit	RNA	Protein	Molekulargewicht (D) x 10 ⁶
70S	3	54	3
30S	16S	21	0.85
50S	23S	33	1.45
	5S		
80S	4	70-80	4
40S	18S	30-35	1,5
60S	26-28S	40-45	2,5
	5,8S		
	5S		

Das Ribosom nimmt an allen drei Phasen aktiv teil. In der Elongationsphase wird die Peptidkette gebildet, wobei immer neue Aminoacyl-tRNA-Moleküle mit dem 80S-Komplex in Wechselwirkung treten. Die sogenannten Elongationsfaktoren und GTP sind notwendig. Biochemische Untersuchungen zeigen, daß der Elongationskomplex drei tRNA-Bindungsstellen aufweist:

- A: Sitz der neuankommenden Aminoacyl-tRNA,
- P: Sitz der bereits synthetisierten Polypeptidkette,
- E: mit dieser Bindungsstelle tritt die deacylierte tRNA in Wechselwirkung.

Nach diesem Prinzip für die beiden Systeme (70S und 80S) akzeptieren wir das allosterische Dreistellen-Modell der Elongation (nach K.Nierhaus): 1 - Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-Bindungsstelle, 2 - Peptidyltransfer, 3 - Translokation.

Die Lokalisierung der beschriebenen Funktionen auf dem Ribosom ist noch nicht genau möglich. Die Strukturinformationen und biochemischen Zusammenhänge zur großen Untereinheit zeigen uns, wie wichtig die konservativen RNA-Strukturen sind (Abb. 2).

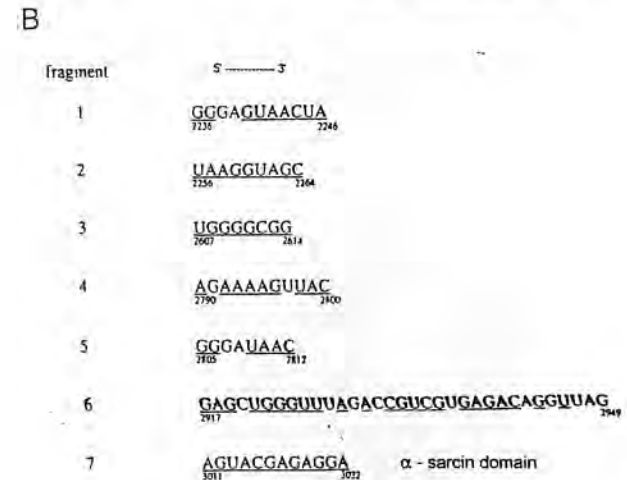
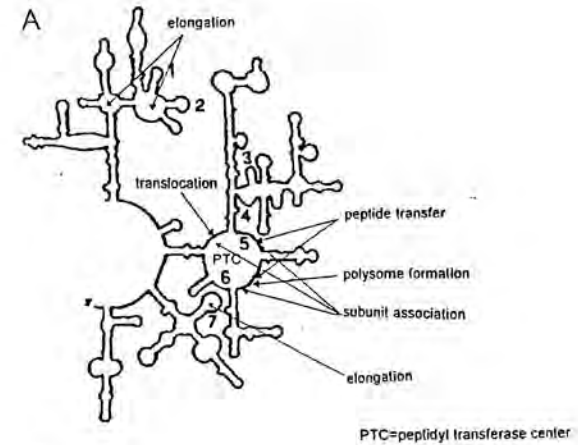


Abb.2. Lokalisierung der konservierten Regionen auf der großen rRNA

A. Schematische Darstellung der L-rRNA; B. Nucleotidsequenzen mit wichtigen Funktionen

In dieser Arbeit werden die Funktionen der sogenannten alpha-Sarcin-Domäne von großen rRNA (LrRNA) (Abb. 2B) und C-loop von 5S rRNA (Abb. 3) beschrieben.

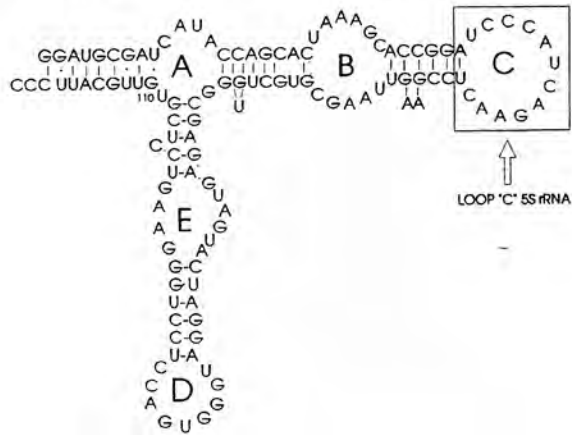


Abb. 3. Darstellung der 5S rRNA

In Abbildung 4 ist zu erkennen, daß die beiden Strukturelemente (alpha-Sarcin-Domäne und C-loop von 5S rRNA) in Nachbarschaft des Peptidyltransferase-Zentrums bleiben.

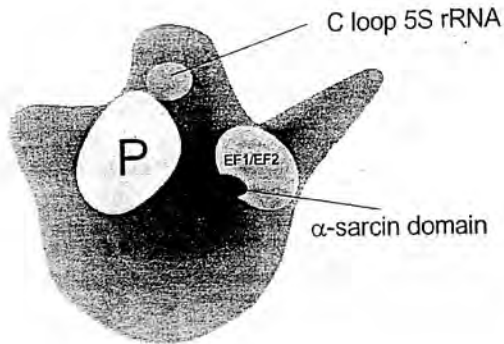


Abb. 4: Darstellung für die große Untereinheit mit einer alpha-Sarcin-Domäne und C-loop von 5S rRNA

8.2 Ergebnisse

Die Anwendung der Antisense-Oligonukleotid-Strategie ermöglicht die biologische Aktivitätsanalyse der ribosomalen Funktion. In Abbildung 5A und 5B sind die analysierten Fragmenten der alpha-Sarcin Domäne und des C-loop der 5S rRNA mit Antisensnukleotide (a-DNA) aufgeführt. Alle a-DNA wurden in Hybridisationstests zu den poly(U)-programmierten Ribosomen aufgenommen (Abb. 6).

Sequence of oligomers complementary to		α-sarcin domain	
5'	3'	5'	3'
I.	AATCAACGGTTCCCTCT	XIII.	TCCTCTCGTA
II.	ATCAACGGTTCCCTCT	XIV.	CGTACTAGG
III.	AATCAACGGTTCCCT	XV.	CTCGTACTAG
IV.	ATCAACGGTTCCCT	XVI.	TCTCGTACT
V.	TCAACGGTTCCCT	XVII.	TTCCCTCTCG
VI.	TCAACGGTTCCCTCT	XVIII.	CGGTTCCCTCT
VII.	TCAACGGTTCCCT	XIX.	AACGGTTCCCT
VIII.	TCAACGGTTCCCTCTG	XX.	CTCGTACTAGGTTGA
IX.	CCTCTCGTACTAGGTTGA	XXI.	TCAACGGTTTCC
X.	CTCTCGTACTAGGTTGA	XXII.	GTTCCCTCTCGTACTA
XI.	TCTCGTACTAGGTTGA	C	CACATGTTA
XII.	CTCGTACTAGGTTGA		

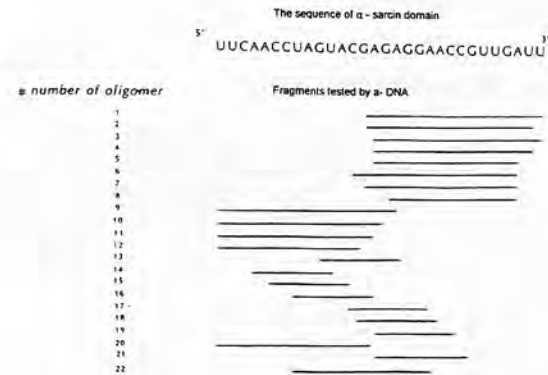


Abb. 5.: Eingesetzte a-DNA Oligomere

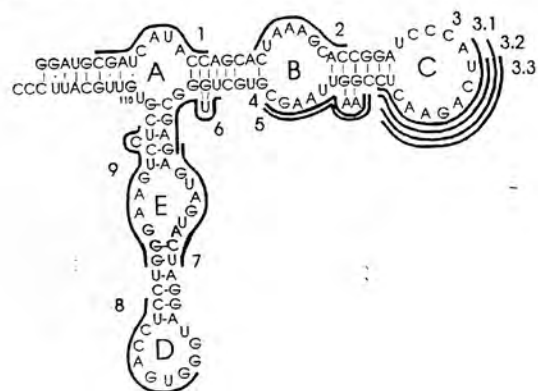
- für die alpha-Sarcin-Domäne der L-rRNA;
- für die 5S rRNA.

Oligomers complementary
to fragments of 5S rRNA

5' _____ 3'

1. GGTATGATCG
2. GTGCATTAG
- 3.0 GAGTTCTGAT
- 3.1 GAGTTCTGA
- 3.2 AGTTCTGAT
- 3.3 AGTTCTGA
4. CTTAACTTCG
5. CTTAACTT
6. CTCGCCAAG
7. AGTACTACTC
8. GAGGTCAC
9. AGGACTTCCC

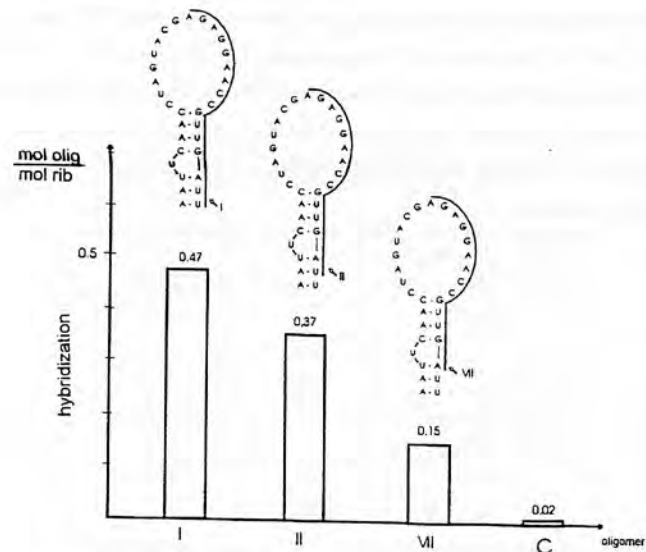
The tested fragments of 5S rRNA:



Oligomer with the sequence
identical to loop "C" of 5S rRNA

10. TCAGAACT

A. α -sarcin domain



B. 5S rRNA

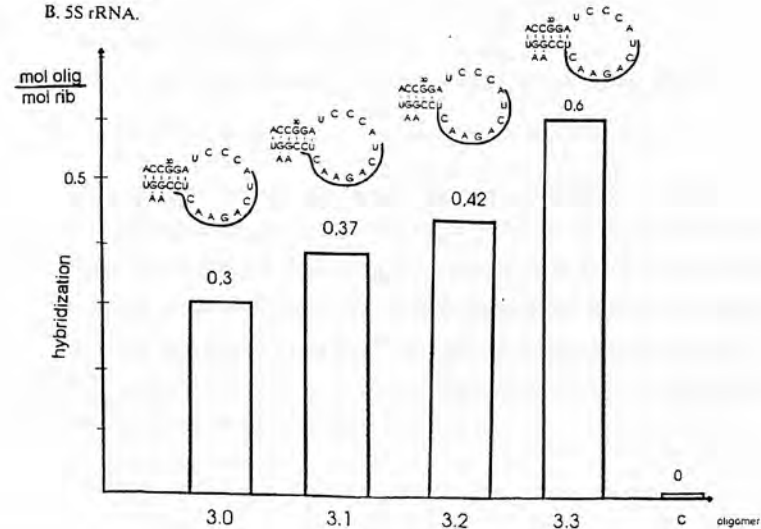


Abb.6.: Hybridisierung der analysierten Antisensnucleotiden, die komplementär für die α -Sarcin-Domäne von L-rRNA (A) und B.5S rRNA sind.

Es ist möglich, die Sekundärstrukturen von RNA/DNA Molekülen mittels Computersystemen errechnen zu lassen. Das sogenannte Zucker-Programm (1989) erstellt anhand der vorgegebenen Sequenz die möglichen Sekundärstrukturen. Wir verwendeten dieses Programm für die Berechnung der dazugehörigen Stabilitätswerte. Das Prinzip ist, eine Struktur mit minimaler freier Energie zu ermitteln. Dabei wird die freie Bindungsenergie (ΔG) in kcal/mol angegeben. Die Ergebnisse für die alpha-Sarcin-Domäne sind in Abb. 7 zusammengefaßt und zeigen, das eine Hybridisation von a-DNA zum 3' Fragment der alpha-Sarcin-Domäne möglich ist.

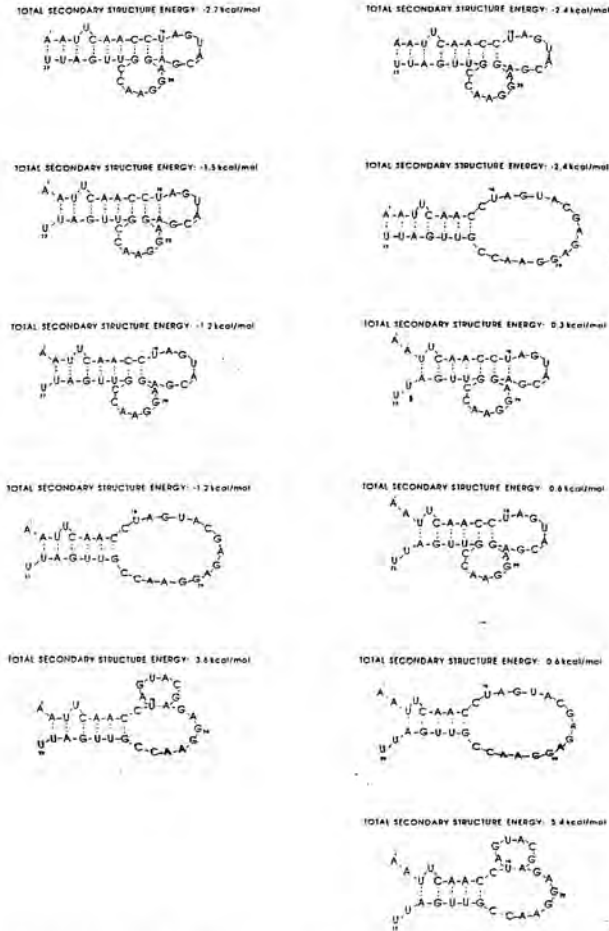


Abb. 7.: Stabilitätsberechnungen für die alpha-Sarcin-Domäne

Eine Hemmung der biologischen Aktivität wurde in zwei Modelltests ermittelt: Bindung von Phe-tRNA zu Ribosomen und Poly-Phe Synthese zeigen, daß nicht alle a-DNA Proben aktiv sind (Abb.8). Wir glauben, daß der Effekt spezifisch ist.

oligomers complementary to	binding of Phe-tRNA (% of remaining activity)	poly(Phe) synthesis (% of remaining activity)
α -sarcin domain		
I	41,6	59
II	46,8	61
VII	62,9	75
C	99,5	100
5S rRNA		
3.0	70	40
7	100	60
c	100	100

Abb. 8.: Hemmung der biologischen Aktivität:

A. Bindung von Phe-tRNA zu Ribosomen; B. Polypeptidsynthese (Poly-Phe) mit den Faktoren EF1 und EF2.

Es ist eine wichtige Frage, wieviele identische Sequenzen wir in ganzen Ribosomen (zwischen allen Nucleinsäuren) finden können. Wir haben nur eine universale konservative alpha-Sarcin-Sequenz in der L-rRNA Sequenz, aber vier komplementäre und eine identische für C-loop von 5S rRNA gefunden. Diese Sequenzen (Abb. 9) haben wir mit Oligomeren getestet, die "identisch" zum C-loop waren (Abb. 10). Mit identischen Sequenzen haben wir keine Hemmung erhalten; mit komplementären Sequenzen (a-DNA) ca. 60%. Das ist eine gute Grundlage und ein Beweis für die Spezifität dieser Interaktionen.

Abb. 9.: Vier komplementäre Sequenzen und eine identische Sequenz für den C-loop der 5S rRNA in ribosomaler RNA

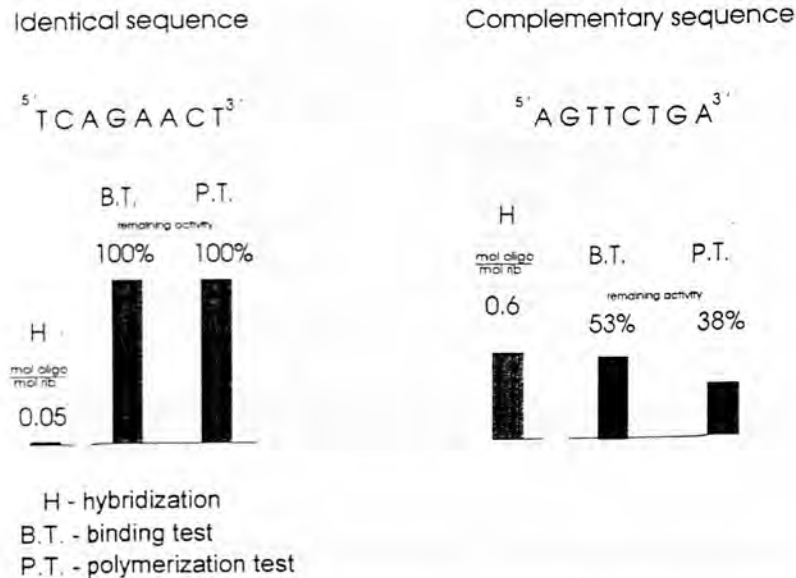
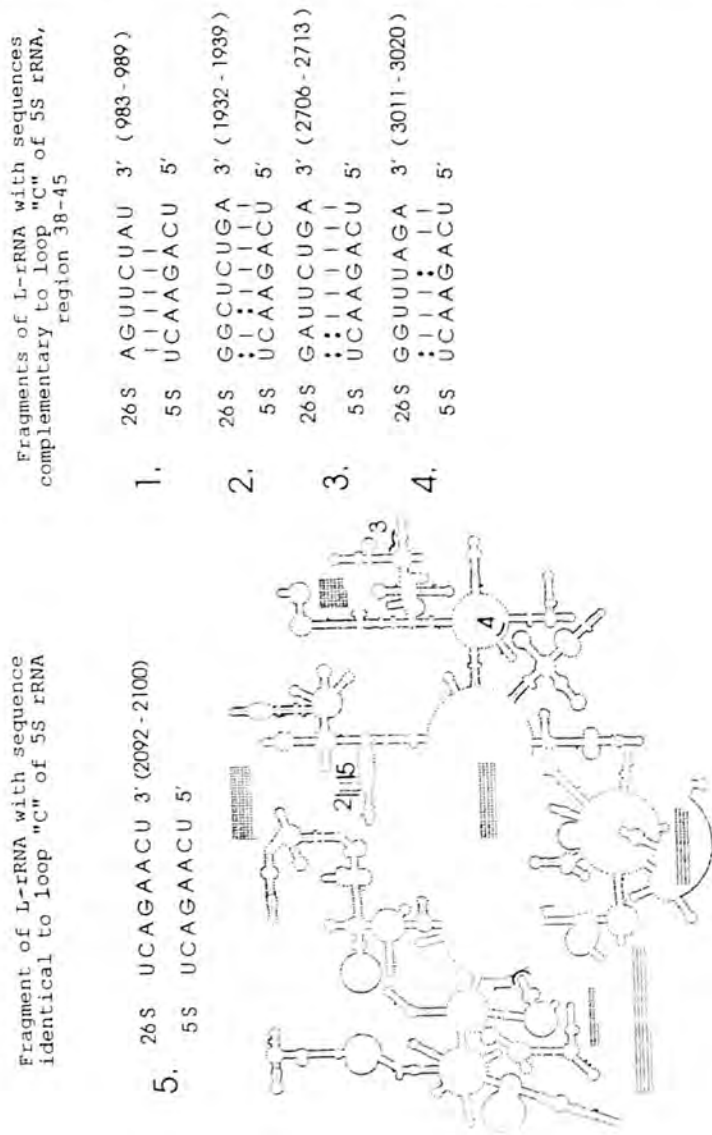


Abb. 10.: Aktivitätstests mit Oligomeren aus Abb. 9.

Auslegung und Hypothese

Die Ribonukleinsäuren nutzen die korrekte stereochemische Struktur. Die Erkennungsprozesse bei der ribosomalen Übersetzung (Translation) nutzen die spezifische Stereochemie. Die komplementären Oligonukleotide beruhen auf der Paarung mit der rRNA auf Grund der Wasserstoffbrücken (Watson-Crick-Strukturen). Für 5S rRNA (Abb. 11) haben wir eine 5-malige Differenz zwischen zwei ribosomalen Staaten gefunden: „prä“- und „post“ im Hybridisierungstest. Es ist klar, daß die Dekodierung am Ribosom nur mit spezifisch molekularer Erkennung möglich ist.

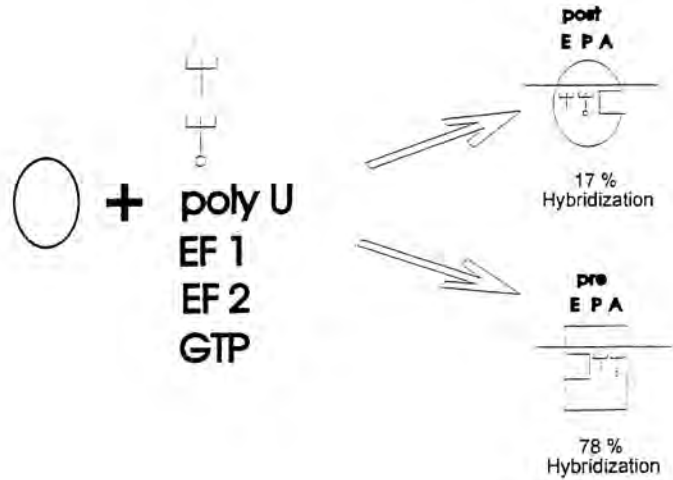
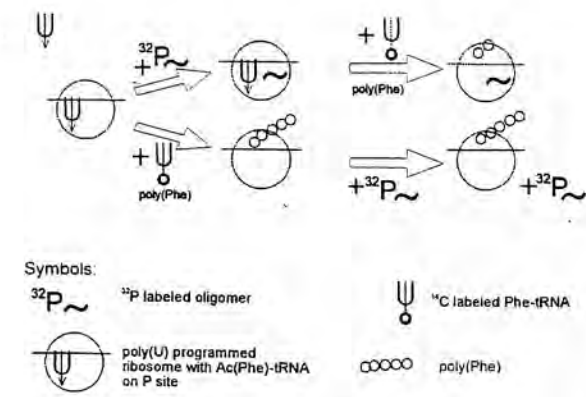


Abb. 11: Hybridisierung zwischen Oligomeren und dem C-loop der 5S rRNA in zwei ribosomalen Zuständen: prä- und post-Translokation

Die programmierten Ribosomen mit den neuen Polypeptiden in P-Stelle sind nicht in der Lage, komplementäre Oligomere zu hybridisieren - das entstehende Peptid schützt die Ribosomen (Abb. 12). Wir glauben, daß die exponierte alpha-Sarcin-Domäne als ein Schlüssel für beide Einheiten fungiert. Die komplementäre Basenpaarung mit spezifischen Oligomeren dissoziiert die Ribosomen (Abb. 13).

Für Ribosomen haben wir das in Abb. 4 dargestellte Modell genutzt. In diesem Modell sind die wichtigen Strukturelemente: alpha-Sarcin-Domäne L-rRNA und C-loop von 5S rRNA benachbart lokalisiert. Alle diese stereochemischen Konformationen sind wichtig für die Dynamik der ribosomalen Funktionen. Unsere Ergebnisse zeigen:

- 1) Anteil und Bedeutung ribosomaler RNA in der Polypeptidsynthese;
- 2) Kooperationen zwischen zwei rRNA: 5S rRNA mit L-rRNA.



Schematic diagram presenting the idea of experiment. Upper part: oligomer labeled with ³²P hybridized to the ribosome with prebound Ac(Phe)-tRNA followed by synthesis of poly(Phe) under standard conditions. Lower part: to the ribosome with prebound Ac(Phe)-tRNA synthesis of poly(Phe) was performed and then the level of hybridization of the same oligomer was determined.

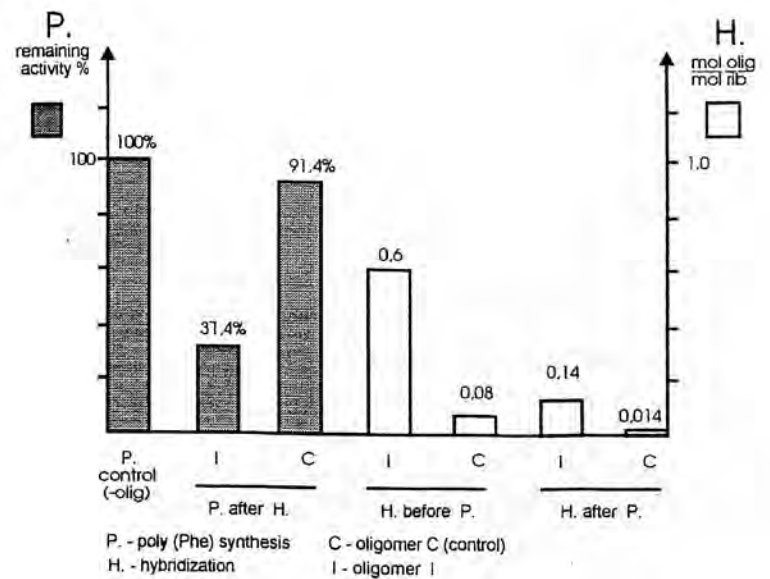


Abb. 12.: Protektionseffekt der entstehenden Peptiden

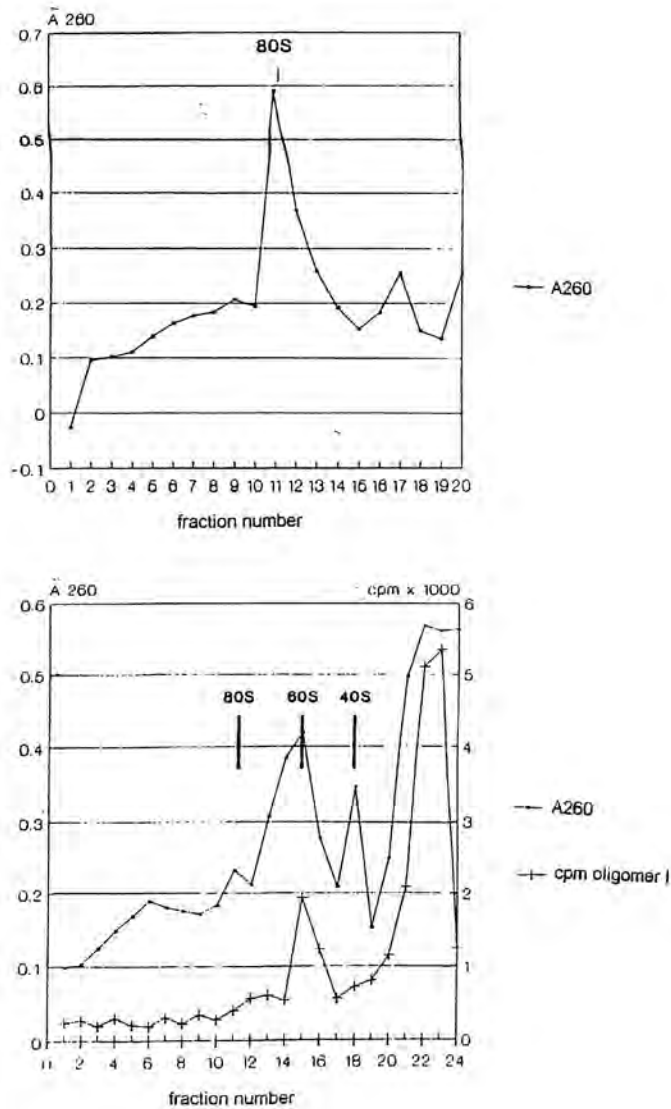


Abb. 13. Dissoziation der Ribosomen

8.3 Perspektiven

Die Antisens-Strategie erlaubt wichtige Eingriffe in den Stoffwechsel der Pflanzen, die grundsätzliche und angewandte Aspekte umfassen. So konnte zum Beispiel bei Petunien und Chrysanthemen die Blütenfarbe genetisch manipuliert werden. Weltberühmt sind die Tomaten "Flavr savr" - diese Modifikation ermöglicht einen 7 bis 10 Tage längeren Transport oder Lagerung.

Über die Antisens-Strategie können wir im Prinzip die biologische Synthese eines Enzyms blockieren, das an der Ausbildung wichtiger biologischer Funktion beteiligt ist. Die LDC (Lysine Decarboxylase) ist das Schlüsselenzym der Alkaloidsynthese (Chinolizidinalkaloide). Das spezifische Gen oder die mRNA können wir mit Antisense Oligomer in umgekehrter Richtung ausschalten. Diese zwei Fragmente sind komplementär und gepaart, so daß zu hoffen bleibt, daß die Synthese der normalen Genprodukte oder mRNA Produkte gehemmt wird. Durch diese Aktion können wir die Proteinsynthese und weitere nachfolgende Synthesen, wie die z. B. von Alkaloiden, regulieren.

Danksagung: Mein Dank für die gute Zusammenarbeit, Hilfe und Kritik geht an:

Ewa Bohun, Jan Barciszewski, Krystyna Ludwiczak, Maciej Nawrot, Andrzej Sobkiewicz. Arbeit von der KBN Projekt-Nr 6 6283 92 03.

8.4 Literatur:

- Bohun, E. & T. Twardowski: A-sarcin domain is a fragment of 23S and 26S rRNA strategic for ribosome function. *Acta Biochim. Pol.*, 40, 11-16, 1993.
- Bohun, E. & T. Twardowski: A-sarcin domain of large ribosomal RNA is a strategic fragment for plant ribosome function. *J. Plant Physiology*, 143, 670-674, 1994.
- Grzywacz-Bohun, E. & T. Twardowski: Blocking of the function of a-sarcin domain of 28S ribosomal RNA using the synthetic oligonucleotides as antisense DNA probes. *Acta Biochim. Pol.*, 39, 1992, 65-73.
- Shaikhin, S. A. Sobkiewicz, J. Barciszewski & T. Twardowski: Evidence for plant 5S rRNA involvement in elongation of polypeptide chain biosynthesis. *Acta Biochim. Pol.*, 41, 57-62, 1994.
- Wink, M. & T. Twardowski: Allochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. ed. Chapman & Hall, ed. S.J.H. Rizvi and V. Rizvi, 1992, pp 129-149, in "Allelopathy - basis and applied aspects."

9 1'-Hydroxyeugenolderivate aus *Coreopsis*-Arten mit spezieller Wirkung gegen Staphylokokken

Jürgen Reichling*, Ulla Ohlenmacher*, Monika Jost-Ullmann* und Heinrich K. Geiss†

*) Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer feld 364, D-69120 Heidelberg +) Hygiene Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer feld 324, D-69120

ZUSAMMENFASSUNG

1'-Hydroxyeugenolderivate aus *Coreopsis*-Arten sind eine neue Klasse von Antibiotika mit spezieller Wirkung gegen verschiedene Staphylokokken. Da keine Parallelresistenzen zwischen den getesteten Substanzen und verschiedenen gängigen Antibiotikagruppen (Oxacillin, Cephalosporine, Chinolone) bestehen und bisher orientierende Untersuchungen zur Mutagenität und Genotoxizität negativ verliefen, könnte sich hier eine vielversprechende Alternative zu den herkömmlichen Antibiotika zeigen.

ABSTRACT

1'-Hydroxyeugenolderivatives (phenylpropanoids) from the genus *Coreopsis* are a new class of antibiotics with special effects against different Staphylococci. Because there is no parallel resistance between tested phenylpropanoids and different known antibiotic and since first orientating experiments with genotoxicity and mutagenity were negative, the natural occurring compounds could be a new promising alternative to traditional antibiotics.

KEY WORDS

Coreopsis, Asteraceae, Phenylpropanoide, 1'-Hydroxyeugenol-Derivate, Antibiotika, Staphylokokken.

9.1 EINLEITUNG

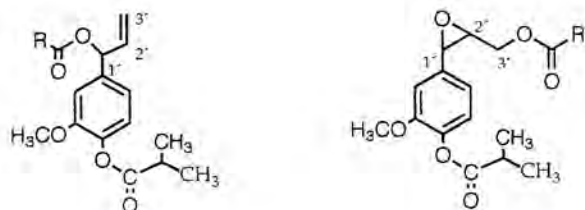
Pflanzen produzieren vielerlei Inhaltsstoffe, die nicht in den primären Metabolismus integriert sind. Die spezifische Funktion dieser sog. sekundären Naturstoffe (= Sekundärstoffe) ist vielfach noch nicht untersucht worden. Einige Zeit war man der Auffassung, daß diese Substanzen Abfallprodukte der Pflanzen darstellen und für den Produzenten nicht von Nutzen seien.

In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch deutlich, daß manche Sekundärstoffe eine entscheidende Rolle in der Ökologie der Pflanzen spielen können, z.B. bei Interaktionen zwischen Pflanzen und Pflanzen, Pflanzen und Mikroorganismen sowie Pflanzen und Insekten. Eine wichtige Funktion der pflanzlichen Sekundärstoffe, scheint u.a. die chemische Abwehr gegen Insekten, pathogene Mikroorganismen oder konkurrierende Pflanzen zu sein. Die Produktion von Sekundärstoffen verleiht also der Pflanze die Fähigkeit, mit ihrer Umwelt zu kommunizieren und sich am Standort zu behaupten, indem biologisch wirksame Substanzen in die Umgebung abgegeben oder von Fraßfeinden aufgenommen werden [Rizvi et al., 1992; Ohlenmacher, 1993]. Vom Standpunkt des "Pharmazeutischen Biologen" interessiert dabei besonders ihr Einfluß auf physiologische Prozesse und ihr Wirkmechanismus auf molekularer Ebene. Erst die Kenntnis der biochemisch-pharmakologischen Wirkungsweise der Sekundärstoffe erlaubt es, sie als Wirkstoffe oder Leitsubstanzen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Medizin oder Landwirtschaft nutzbar zu machen.

Die Gattung *Coreopsis* gehört zur Familie der Asteraceae (Tribus Heliantheae). Sie ist in Afrika, Nord- und Südamerika heimisch. In Europa werden ca. 20 Arten als beliebte Zierpflanzen kultiviert, darunter *C. tinctoria*, *C. lanceolata* und *C. grandiflora*, die von Thron et al. [1989] sowie Reichling et al. [1994a] in den letzten Jahren intensiv bearbeitet wurden.

In der Gattung *Coreopsis* wurden in der Vergangenheit eine Reihe von seltenen Flavonoiden, Terpenen und Phenylpropanoiden nachgewiesen, die ansonsten in Angiospermen nur sporadisch oder überhaupt nicht vorkommen. Eine Übersicht findet sich bei Reichling et al. [1994a]. Typische Sekundärstoffe in *Coreopsis*-Arten sind Phenylpropanoide mit ungewöhnlichen Strukturmerkmalen (Abb.1). Es handelt sich dabei um Diester des 1'-Hydroxyeugenols und des Epoxy-Z-coniferylalkohols, die an der phenolischen Hydroxylgruppe stets mit Isobuttersäure, an der alkoholischen Hydroxygruppe dagegen variierend mit kurzkettigen Carbonsäuren verestert sind. Wie eigene Arbeiten [Thron et al., 1989; Reichling et al., 1994a] und Arbeiten von Bohlmann und Zdero [1968, 1969] gezeigt haben, scheint das

Vorkommen dieser Phenylpropanoide weitgehend auf die Gattung *Coreopsis* beschränkt zu sein. Bisher wurde lediglich im Samen von *Alpinia galanga*, einer Zingiberaceae, mit 1'-Acetoxyeugenolacetat ein weiteres Derivat des 1'-Hydroxyeugenols identifiziert [Mitsui et al., 1976]. Höchst interessant dabei ist, daß diese Substanz bei Ratten eine deutliche Antiulkuswirkung (2-10 mg/kg KG i.p.) zeigte [Mitsui et al., 1976] und sich bei Mäusen gegenüber dem transplantierbaren Sarkom 180 Ascites als potent wirksames Antitumormittel erwiesen hat [Itokawa et al., 1987].



R:

Eu1	-CH ₃	Co1
Eu2	-CHCH ₃ CH ₃	Co2
Eu3	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	Co3
Eu4	-CH ₂ CHCH ₃ CH ₃	Co4

Abb. 1 Strukturen der 1'-Hydroxyeugenolderivate

Die Diester des 1'-Hydroxyeugenols sind mit dem Eugenol strukturverwandt. Eugenol stellt den Hauptbestandteil des ätherischen Öls (Caryophylli aetheroleum) von *Syzygium aromaticum* dar. Die antibakterielle und antivirale Aktivität von Eugenol ist seit langem bekannt [vgl. Horz, Reichling, 1994]. Seine antiseptischen und lokalanästhesierenden Eigenschaften werden hauptsächlich in der Zahnheilkunde als Zusatz zu Zahnfüllungen, zur Wurzelbehandlung und in Mundwässern genutzt [Gafar et al., 1974; Thomas et al., 1980]. Außerdem sind Eugenol und seine Derivate sehr potente Hemmstoffe des Larvenwachstums bei *Drosophila* (Ohigashi und Kashimizu, 1976).

Abkömmlinge des Eugenols zeigen ebenfalls eine starke biologische Aktivität. Masuda und Mitarbeiter [1991] isolierten aus *Piper sarmentosum*, Nair und Burk [1990] aus *Piper hispidum* antimikrobiell wirksame Phenylpropanoide. Das in *Heteromorpha trifoliata* (Apiaceae) enthaltene Fungizid Sarisan zeigt im Vergleich zu Eugenol am Phenylring ein anderes Substitutionsmuster. Es ist ein Isomeres zu Myristicin und besitzt 3-Methoxy-4,5-methylenedioxygruppierungen [Villegas et al., 1988].

Die ungewöhnlichen Strukturmerkmale sowie die strukturelle Verwandtschaft zu Eugenol und anderen biologisch aktiven Eugenolabkömmlingen gaben Anlaß, die in Abb.1 dargestellten Substanzen Eu1, Eu2 und Eu4 auf ihre mögliche antimikrobielle Wirkung zu untersuchen [Ohlenmacher, 1993; Reichling et al., 1994 a-c].

9.2 MATERIAL & METHODEN

Synthese der 1'-Hydroxyeugenolderivate: Die Synthese der 1'-Hydroxyeugenole Eu1, Eu2 und Eu4 geht von Vanillin als Edukt aus. Zunächst wird die phenolische OH-Gruppe verestert und anschließend die Aldehydgruppe mit dem Grignardreagens Vinylmagnesiumbromid reduziert, wobei gleichzeitig die endständige Doppelbindung eingeführt wird. Zum Schluß wird die 1'-Hydroxygruppe mit dem entsprechenden Säurechlorid verestert [Bohlmann, Zdero, 1968].

Antimikrobielles Screening: Die in Abb.1 dargestellten und durch Synthese in größeren Mengen zugänglichen Phenylpropanoide Eu1, Eu2 und Eu4 wurden an einer repräsentativen Auswahl von humanpathogenen Pilzen und Bakterien auf ihre antimikrobielle Wirkung überprüft. Das antimikrobielle Screening erfolgte an Referenzstämmen (Laborstämmen) sowie an Stämmen, die im Rahmen der Routinediagnostik im Hygiene-Institut der Universität

Heidelberg aus Patientenmaterialien isoliert wurden (frische, klinische Isolate). **Pilze:** Verschiedene *Candida*- und *Torulopsis*-Arten (z.B. *Candida albicans*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*; *Torulopsis glabrata*, *T. dattila*, *T. candida*, *T. inconspicua*). **Bakterien:** Vgl. Tab.1. sowie Kapitel antibakterielle Wirkung [Ohlenmacher,1993; Reichling et al.,1994c].

Da für die "Coreopsis-Phenylpropanoide" Eu1, Eu2 und Eu4 noch keine In-vivo-Studien vorliegen, wurde die Einstufung der Erreger als "empfindlich" oder "unempfindlich" durch den Vergleich mit den MHK-Werten der Referenzsubstanzen Eugenol und Phenol vorgenommen.

Ein Erreger ist unempfindlich (resistent) gegen eine Substanz, wenn die zu seiner Hemmung oder Abtötung notwendige Wirkstoffkonzentration in vitro höher ist als die in vivo realisierbare. Ein Erreger gilt als empfindlich (sensibel), wenn seine minimale Hemmkonzentration in vitro niedriger ist als der unter therapeutischen Bedingungen bei üblicher Dosierung in vivo erreichbare Wirkstoffspiegel am Ort der gewünschten Wirkung.

Agar-Dilutionsmethode: Die in 100 µl DMSO gelösten 1'-Hydroxyeugenoldiester wurden in 10 ml erwärmten Müller-Hinton-Agar homogen verteilt. Nach Erstarren des in Petrischalen abgefüllten Agars wurden die Mikroorganismen (0,3 µl Inokulum) mit Hilfe eines Multipoint-Inokulators auf das Medium gegeben. Die Herstellung des Inokulums erfolgte durch Verdünnung mit isotonomischer NaCl-Lösung einer Übernachtskultur in CSB (Casin-Sojapepton-Bouillon). Die Keimdichte pro Impfpunkt lag gemäß DIN 58940 bei 10⁴ bis 10⁵ KBE [Ohlenmacher,1993].

Minimale Hemmkonzentration (MHK): Die Versuchsansätze wie auch die Kontrollen wurden nach 24h Bebrütung bei 37 °C abgelesen und so die **MHK** bestimmt. Die MHK ist als diejenige Konzentration definiert, bei der makroskopisch kein Wachstum der Mikroorganismen mehr feststellbar ist [Ohlenmacher,1993].

Ames-Test: Der Ames-Test wurde an *Salmonella typhimurium* nach dem Verfahren von Maron und Ames [1984] durchgeführt. Den Versuch begleitete als Positivstandard 2-Aminoanthrazen. Die Negativkontrolle bestand aus 50 µl DMSO. Teststämme: TA 98; TA 98+S9 Mix (S9 Mix = Leberhomogenat der Ratte); TA 100; TA 100+S9 Mix. Eu1, gelöst in DMSO, wurde in vier Konzentrationen in jeweils doppelten Ansätzen getestet: 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg pro Platte.

Genotoxizität: Die genotoxischen Untersuchungen wurden an isolierten Hepatozyten der Ratte nach der Methode von Schmetzer et al. [1987] durchgeführt. Die parenchymalen Leberzellen wurden durch in situ Perfusion aus der Ratte isoliert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlußtest. Geprüft wurde auf eventuell auftretende DNA-Strangbrüche mittels alkalischer Filterelution. Eu2, gelöst in DMSO, wurde den Hepatozyten in Konzentrationen von 1, 10, 50, 100, 250 µmol/l zugesetzt. Als Negativkontrolle diente reines DMSO, als Positivkontrolle Natriumchromat.

Cytotoxische Wirkung: Als Testsystem dienten RBL-1 (Rat Basophilic Leukaemia) Zellen, die in einem RPMI 1640 Medium, supplimentiert mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mmol/l Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin G, im Brutschrank bei 37 °C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in Luft/CO₂ 95:5 kultiviert wurden. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/Petrischale in 3 ml RPMI 1640 Medium ausgesäht. Nach einer Adhäsionszeit von 2h wurde Eu2, gelöst in 20 µl Ethanol, in verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 20, 30, 50, 60, 100, 200 µmol/l) zugesetzt und weitere 4h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Scraper abgeschabt und in einer Neubauerzählkammer mit Hilfe von Trypanblau auf ihre Vitalität untersucht [Wolf,1993].

In einem weiteren Testsystem wurden Lungenfibroblasten verwendet, die in einer Dichte von 10⁵ Zellen/ml Nährlösung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und bei 37 °C kultiviert wurden. In Konzentrationen von 94, 188, 375 und 750 µmol/l wurde Eu2, gelöst in 10 µl DMSO, dem Testansatz zugegeben. Nach 3 und 24 Stunden wurde das Wachstum und das Aussehen der Zellen mikroskopisch ausgewertet [Ohlenmacher,1994].

Erythrocytenmembrantest: Zu 2 ml Schafblut, stabilisiert mit 3,8%iger Citratlösung, wurden 7 ml PBS (isotonischer Phosphatpuffer, pH 7,4) zugegeben und 3 min. lang bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet enthielt die Erythrocyten. Anschließend wurden die Erythrocyten 30 min. lang mit 8 µCi 3-O-Methyl(1-³H)glucose gefüttert. Es wurden dann 7 ml PBS-Cytochalasin B (1 µmol/l) hinzugefügt und 3x3 min. lang bei 2000 rpm zentrifugiert. Die so vorbehandelten Erythrocyten wurden in PBS-Cytochalasin B suspendiert und Eu2 in verschiedenen Konzentrationen (1 µmol/l 10 µmol/l 0,1 mmol/l; 1 mmol/l, gelöst in Ethanol) zugegeben. Beim Kontrollansatz wurde lediglich Ethanol zugefügt. Die Versuchsansätze wurden dann 1h bei 20 °C inkubiert und anschließend wurde einige Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde geteilt. Ein Teil wurde für die

Messung der Radioaktivität verwendet, der andere für die Hämoglobinbestimmung [Latz-Brüning, 1994].

9.3 ERGEBNISSE & DISKUSSION

9.3.1 Antimykotische Wirkung

Gegen die getesteten *Candida*- und *Torulopsis*-Arten waren die Substanzen Eu1, Eu2 und Eu4 nur schwach bzw. gar nicht antimykotisch wirksam (MHK: > 12 mmol/l) [Ohlenmacher, 1993].

9.3.2 Antibakterielle Wirkung

Screening: In einem zunächst breit angelegten Screening wurden Eu1, Eu2 und Eu4 im Vergleich zu Eugenol und Phenol auf ihre antibakterielle Wirkung getestet [vgl. Tab.1]. Von den Vergleichssubstanzen zeigte Eugenol mit MHK-Werten zwischen 2 und 7 mmol/l bei allen Teststämmen die beste Wirkung. Somit konnte mit der Methode der Agardilution die in der Literatur beschriebenen, jedoch mit anderen Verfahren (Bouillon-Verdünnungsmethode) ermittelte antibakterielle Aktivität von Eugenol bestätigt werden. Phenol war dagegen wesentlich weniger wirksam als Eugenol, seine MHK-Werte lagen bei 10 bis > 25 mmol/l für alle Testkeime [Morris, 1979; Ohlenmacher, 1993; Reichling et al., 1994].

Die meisten Erreger waren mit MHK-Werten von über 12 mmol/l relativ unempfindlich gegen Eu1, Eu2 und Eu4. Hier lagen die MHK-Werte deutlich über den für Eugenol ermittelten Werten. Andererseits fiel die relativ gute antibakterielle Potenz von Eu1 und Eu2 gegen alle geprüften *Staphylococcus aureus*-Stämme, gegen *Acinetobacter calcoaceticus* und *Bacillus cereus* auf. Die MHK-Werte lagen hier unter 0,75 mmol/l. Damit waren in diesen Fällen Eu1 und Eu2 deutlich wirksamer als die Vergleichssubstanzen Eugenol und Phenol. Lediglich Eu4 erwies sich gegen alle Testkeime als unwirksam.

Wirkung gegen Staphylokokken: Die Wirkung von Eu1 und Eu2 gegen *Staphylococcus aureus* fand zunächst unser besonderes Interesse. In einer umfangreichen Arbeit wurden beide Substanzen bei verschiedenen koagulasnegativen Staphylokokken (Patientenisolate) sowie bei *Staphylococcus-aureus*-Stämmen (Patientenisolate und Laborstämmen) auf ihre antibakterielle Wirkung getestet. Bei den *Staphylococcus-aureus*-Stämmen war vor allem Eu2 gut wirksam (Abb.2). Bei einer Konzentration von 160 µmol/l zeigten die weitaus meisten Stämme kein

sichtbares Wachstum mehr. Bei den koagulasnegativen Staphylokokken sprachen vor allem *Staphylococcus epidermidis* (Abb.2) (MHK: Eu1: 63-640 µmol/l), *Staphylococcus haemolyticus* (MHK: Eu1: 23-640 µmol/l; Eu2: 50-640 µmol/l), *Staphylococcus capitis* (MHK: Eu1: 63-320 µmol/l; Eu2: 40-320 µmol/l), *Staphylococcus chromogenes* (MHK: Eu1: 50-320 µmol/l; Eu2: 63-320 µmol/l), *Staphylococcus hominis* (MHK: Eu1: 63-640 µmol/l; Eu2: 20-640 µmol/l) und *Staphylococcus lugdunensis* (MHK: Eu1: 50-320 µmol/l; Eu2: 20-320 µmol/l) besonders gut auf Eu1 und Eu2 an.

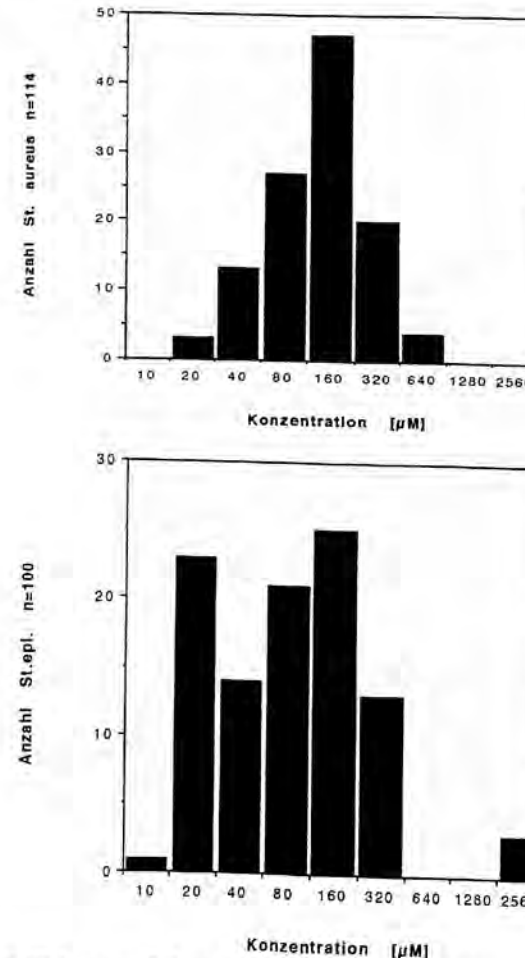


Abb. 2. Wirkung von Eu2 gegen *S. aureus* und *S. epidermidis*

Tab. 1: Wirkung (MHK-Werte) von 1'-Hydroxyeugenolderivaten auf Bakterien

Keime	Herkunft	Eu2		Eu3		Eu4		Eugenol		Phenol	
		MHK [mM]	>12	MHK [mM]	>12	MHK [mM]	>12	MHK [mM]	>12	MHK [mM]	>12
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	klinisches Isolat	<0,75	>12	<0,75	>12	1,2	>12	2	2	1,1	1,1
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 4342	<0,75	>12	1,5	>12	>12	>12	2	2	1,5	1,5
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6659	<0,75	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,4	1,4
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	ATCC 10648	3	>12	1,2	>12	>12	>12	2	2	1,0	>25
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 8562	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	>25	>25
<i>Enterococcus faecium</i>	clp 5655	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	>25	>25
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 6057	1,2	>12	1,2	>12	>12	>12	3	3	>25	>25
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	1,6	1,6
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43822	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	1,8	1,8
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 8196	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	1,8	1,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4356	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,8	1,8
<i>Micrococcus luteus</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	7	7	1,0	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	7	7	1,0	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	>12	>12	>12	>12	>12	>12	2	2	1,0	1,0
<i>Pseudomonas diminuta</i>	ATCC 19146	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,2	1,2
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6599	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	1,9	1,9
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	>12	>12	>12	>12	>12	>12	4	4	2,5	2,5
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	3	>12	1,5	>12	>12	>12	4	4	1,1	1,1
<i>Serratia marcescens</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,2	1,2
<i>Shigella flexneri</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,1	1,1
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 25929	>12	>12	>12	>12	>12	>12	3	3	1,1	1,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolat 315	<0,75	>12	<0,75	>12	6	>12	4	4	2,1	2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	<0,75	>12	<0,75	>12	6	>12	3	3	1,8	1,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	clp 53154	<0,75	>12	<0,75	>12	1,2	>12	4	4	2,5	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 4163	<0,75	>12	<0,75	>12	1,2	>12	4	4	1,9	1,9
nicht haemolisierende Streptokokken	klinisches Isolat	>12	>12	1,2	>12	>12	>12	3	3	2,0	2,0
Streptokokken der Gruppe A	klinisches Isolat	6	>12	1,2	>12	>12	>12	2	2	2,0	2,0
nicht haemolisierende Streptokokken	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	-	-	-	-
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	klinisches Isolat	>12	>12	>12	>12	>12	>12	1,0	1,0	1,0	1,0

Andererseits erwiesen sich *Staphylococcus warneri* (MHK > 2,5 mM), *Staphylococcus simulans* (MHK > 2,5 mM) und *Staphylococcus xylosus* (MHK > 2,5 mM) gegenüber Eu1 und Eu2 als primär resistent.

Wirkung im Vergleich zu Cefuroxim: Bei Cefuroxim handelt es sich um ein Cephalosporin-Antibiotikum der 2. Generation, das zur Behandlung von Staphylokokken-Infektionen eingesetzt wird.

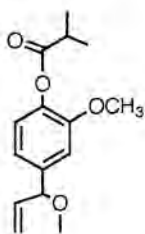
Die Resistenzbestimmung der Teststäme zeigte, daß alle geprüften *Staphylococcus aureus*-Stämme mit einer MHK von 3-6 µmol/l Cefuroxim-empfindlich waren. Die gleiche Feststellung gilt für die meisten koagulasenegativen Staphylokokken (Ausnahmen: *Staphylococcus haemolyticus*; *Staphylococcus epidermidis*), die mit MHK-Werten von 0,4-6 µmol/l ebenfalls gegen Cefuroxim sensibel waren.

Vergleicht man nun die oben angeführten MHK-Werte von Eu1 und Eu2 mit denen von Cefuroxim, dann wird die relativ gute antibakterielle Wirkung beider Naturstoffe deutlich. Besonders interessant fiel der Vergleich bei *Staphylococcus haemolyticus* aus. Resistenzbestimmungen haben gezeigt, daß dieser bekanntermaßen multiresistente Problemkeim auch gegen Cefuroxim resistent ist (MHK: > 190 µmol/l). Demgegenüber erwies sich *Staphylococcus haemolyticus* gegen Eu1 und Eu2 als besonders sensibel. In vitro lagen ihre MHK-Werte bei den meisten *Staphylococcus-haemolyticus*-Stämmen bei 90 bis 180 µmol/l. Ein sicherlich interessantes Ergebnis, das zu weiteren Arbeiten auf diesem Sektor ermuntert.

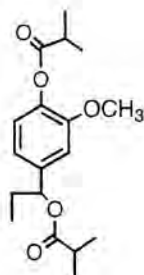
9.3.3 Struktur-Wirkungsbeziehung

Bei den Arbeiten mit den Staphylokokken fiel auf, daß sowohl das 1'-Hydroxyeugenol als auch das 1'-Hydroxyeugenolisobutytrat mit MHK-Werten zwischen 5 und 25 mmol/l deutlich schwächer wirksam waren als die entsprechenden Diester. Dieser Befund wies darauf hin, daß für die antibakterielle Wirksamkeit von Eu1 und Eu2 vor allem der allylständige Ester an der Arylseitenkette von entscheidender Bedeutung sein mußte. Durch Synthese des 1'-Methoxyeugenolisobutytrates und des hydrierten Eu2 (Abb.3) konnten wir zeigen, daß diese Annahme zutrifft. Sowohl der Methylether als auch das hydrierte Eu2 waren gegen die verschiedenen Staphylokokken-Arten völlig unwirksam.

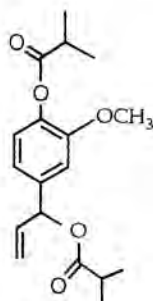
Bei der Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehung tauchte auch die Frage auf, ob möglicherweise die reinen Enantiomeren wirksamer sein könnten als die zugehörigen Racemate. Wir prüften diese Frage am Beispiel von Eu2, dessen Enantiomeren über die Synthese und anschließende Trennung des Racemates über eine chirale Phase gut zugänglich waren [Herweck et al., 1992]. Bei allen im Test eingesetzten Staphylokokken konnte zwischen dem Racemat und den entsprechenden Enantiomeren kein Unterschied in der Wirksamkeit festgestellt werden [Ohlenmacher, 1993].



Methylether



Hydr. Eu2



Eu2

Abb. 3. Strukturvarianten der Eugenolester

9.3.4 Klinische Bedeutung

In den letzten Jahren kam es bei Krankenhauspatienten zu einer ständigen Zunahme mit Infektionen durch grampositive Erreger. Diese weltweit zu beobachtende Entwicklung ist vor allem durch die Zunahme von Infektionen mit koagulasenegativen Staphylokokken bedingt. Die lange Jahre als apathogen betrachteten Kommensalen der menschlichen Haut gelangen besonders durch im Rahmen der invasiven Diagnostik und Therapie in den menschlichen Körper eingebrachte Kunststoffmaterialien in sterile Körperbereiche, wo sie insbesondere bei immunsupprimierten Patienten trotz ihrer geringen Virulenz Infektionen hervorrufen können. Das Hauptproblem der durch koagulasenegative Staphylokokken hervorgerufenen Infektionen ist die hohe Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika. Insbesondere die

Methicillinresistenz von Staphylokokken ist ein weltweites Problem von weitreichender Konsequenz. Die Methicillinresistenz ist gleichbedeutend mit einer kompletten Unwirksamkeit aller Betalactamantibiotika, zudem sind viele dieser Stämme gleichzeitig gegen Aminoglykoside und Chinolonderivate unempfindlich. Während europaweit von Nord nach Süd zunehmend Resistenzquoten von *Staphylococcus aureus* gegen Methicillin von 2% bis über 40% beschrieben werden, beträgt die Vielfachresistenz bei koagulasenegativen Staphylokokken aus allen klinischen Materialien inzwischen 60%. Die Methicillin- und Vielfachresistenz erzwingt eine Therapie mit Glykopeptid-Antibiotika (z.B. Vancomycin). Hierbei droht die Gefahr der Glykopeptid-Resistenz aufgrund des weltweit exzessiven und vielfach unkontrollierten Einsatzes dieser Substanzen.

Die Strategie gegen dieses Problem beinhaltet verschiedene Ansätze, u.a. muß es das Ziel der Forschung sein, hochselektiv wirksame Substanzen zu entwickeln, die für den Einsatz in solchen Problemsituationen vorbehalten bleiben. Die in den letzten Jahren neuentwickelten, außerordentlich breit wirksamen Antibiotika waren nicht in der Lage die Situation positiv zu beeinflussen. Im Gegenteil, ihr weit verbreiteter Einsatz führte eher zum beschleunigten Auftreten von multiresistenten Bakterien. Es besteht somit ein erheblicher Bedarf bei der Entwicklung von gegen grampositive Erreger selektiv wirksamen Antibiotika. Deshalb sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung von besonderem Interesse.

9.3.5 Mutagene, genotoxische und cytotoxisch Wirkung

Die gute antibakterielle Wirkung der geprüften Phenylpropanoide lenkte unser Interesse auf die mögliche mutagene, genotoxische und cytotoxische Wirkung dieser Substanzen. An ausgewählten Testsystemen wurde dieser Problembereich näher untersucht.

Mutagene Wirkung: Der Ames-Test wurde mit den Salmonella-typhimurium-Stämmen TA 98 und TA 100, jeweils mit und ohne Zusatz von S9-Mix, durchgeführt. Dabei erwies sich Eu1 als nicht mutagen. Die Anzahl der His⁺-Revertanten unterschied sich nicht von der der DMSO-Kontrolle (67-83). Positivkontrolle: 2-Aminoanthrazen: 1266-1620 His⁺-Revertanten [Ohlenmacher, 1994].

Genotoxische Wirkung: Die Prüfung auf Genotoxizität beruht auf dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen in Hepatozyten, hervorgerufen durch die Testsubstanzen. Dabei verfolgt man das Verhalten von alkalidenaturierten DNA-Strängen, wenn diese sich nach Freisetzung aus

den Zellen auf Membranfilter befinden. Hierbei wird die Rate gemessen, mit der diese DNA-Einzelstränge unter alkalischen Elutionsbedingungen durch die Filterpore penetrieren. Bei diesem Vorgang verzögert die Porengröße des Filters (2 µm) das Penetrieren der langen DNA-Einzelstränge in einer größenabhängigen Weise. Die Elutionszeit steigt mit der Stranglänge. Der "K-T-Wert", der sich aus der Differenz des Prozentsatzes von DNA auf dem Filter von Kontrolle und Test ergibt (% DNA auf Filter Kontrolle - % DNA auf Filter Test), ist ein Maß für die Genotoxizität der geprüften Substanz. Vor einer eindeutigen DNA-schädigenden Wirkung kann bei einem K-T-Wert von > 20% ausgegangen werden [Schmetzer, 1987]. Im Hepatozyten-Testsystem konnte für Eu2 keine genotoxischen Aktivitäten (K-T-Wert: um 10%) nachgewiesen werden. Positivkontrolle: Natriumchromat: 27-45% [Ohlenmacher, 1994].

Cytotoxische Wirkung: Eu2 erwies sich im RBL-1 Zellsystem als cytotoxisch wirksam, wobei die Cytotoxizität konzentrationsabhängig war. Bei einer Konzentration von 55 µmol/l Eu2 konnten nach 4-stündiger Inkubation nur noch 50% lebende Zellen nachgewiesen werden [Wolf, 1993; Ohlenmacher, 1994].

Ähnliche Ergebnisse erhielten wir auch mit Lungenfibroblasten (Zelllinie Rita). Nach 24-stündiger Einwirkzeit war bei 94 µmol/l das Zellwachstum stark gehemmt, bei 188 µmol/l verformten sich die Zellen und bei 375 µmol/l trat Zelyse ein [Ohlenmacher, 1994].

9.3.6 Wirkung auf die Erythrocytenmembran

Aufgrund der Lipophilie der Substanzen lag zunächst der Verdacht nahe, daß sie ihre antibakterielle und cytotoxische Wirkung durch Beeinflussung der Zellmembranpermeabilität entfalten könnten. Diese Hypothese sollte durch Untersuchungen an Erythrocytenmembranen überprüft werden.

Nach Fütterung der Erythrocyten mit 3-O-Methyl-D-(1-³H)glucose wurden die Glucosekanäle in der Membran durch Cytochalasin B partiell verschlossen. Durch wiederholte Messung der Radioaktivität im Zellüberstand konnte ein kontinuierlicher Methylglucoseausstrom beobachtet werden. Eine Störung der Membranpermeabilität bzw. Membranfunktion (z.B. Protonenpumpen, Transportprozesse) durch Adsorption oder Bindung der Testsubstanzen an die Cytoplasmamembran hätte sich in einer höheren oder niedrigeren Radioaktivität pro Zeiteinheit im Vergleich zur Kontrolle bemerkbar machen müssen. Es konnte jedoch kein Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden. Möglich wäre auch eine Hämolyse der Erythrocyten gewesen, was einen Ausstrom von Hämoglobin in den

Zellüberstand zur Folge gehabt hätte. Es konnte jedoch im Überstand kein Hämoglobin photometrisch nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen zunächst den Schluß zu, daß Eu2 seine antibakterielle und cytotoxische Wirkung wahrscheinlich nicht über eine Beeinträchtigung der Biomembran (Fluidität, Dichte etc.) bewerkstelligt.

9.3.7 Weitere Arbeiten

Das Ziel der weiteren Arbeiten muß es sein, den eigentlichen Wirkmechanismus der antibiotisch wirksamen Phenylpropanoide Eu1 und Eu2 bei Staphylokokken aufzuklären. Weiterhin ergibt sich die Fragestellung nach den Resistenzmechanismen der primär resistenten Mikroorganismen (z.B. *Staph. warneri*, *Staph. simulans*) und der Möglichkeit einer Resistenzentwicklung der primär empfindlichen Keimarten (z.B. *Staph. haemolyticus*, *Staph. epidermidis*).

9.4 LITERATUR

- Bohlmann F. & Zdero Ch. (1968) Über die Inhaltsstoffe von *Coreopsis nucensis* HELLER. Chem. Ber. 101, 3243
- Bohlmann F. & Zdero Ch. (1969) Über die Inhaltsstoffe von *Coreopsis gigantea*. Chem. Ber. 102, 1691
- Gafar M., Ionita R. & Vladescu A. (1974) In vitro studies of the antimicrobial action of the major drugs employed in the endocanalicular therapy. Stomatologia 11, 383
- Herweck U., Zimmerman H. & Reichling J. (1992) Suitable chiral packing material for the high-performance liquid chromatographic separation of derivatives of 1'-hydroxyeugenol. J. Chromatogr. 600, 312
- Horz K.H. & Reichling J. (1994) Syzygium. In: Hänsel R., Keller K., Rimpler H. & Schneider G. (Hrsg.) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis Bd.6, 5.Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 854
- Itokawa H., Morita H., Sumitomo T., Totsuka N. & Takeya K. (1987) Antitumour principles from *Alpinia galanga*. Planta Med. 53, 32

- Latz-Brüning B. (1994) Molekulare Wirkmechanismen von Alkaloiden. Dissertation, Heidelberg
- Maron D.M. & Ames B.N. (1984) Revised methods for Salmonella mutagenicity test. In: Kilbey B.J., Legetor M., Nichols W., Ramel C. (eds.) Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Science Publishers, S. 93
- Masuda T., Inazumi A., Yamada Y., Padolina W.G., Kikuzaki H. & Nakatani N. (1991) Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum* Phytochemistry 30, 3227
- Mitsui S., Kobayashi S., Nagahori H. & Ogiso A. (1976) Constituents from seeds of *Alpinia galanga* WILD. and their anti-ulcer activities. Chem. Pharm. Bull. 24, 2377
- Morris J.A., Khettry A. & Seitz E. (1979) Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J. Amer. Oil Chem. Soc. 56, 595
- Nair M.G. & Burke B.A. (1990) Antimicrobial Piper metabolite and related compounds. J. Agric. Food Chem. 38, 1093
- Ohigashi H. & Koshimizu K. (1976) Chavicol, as a larva-growth inhibitor, from *Viburnum japonicum* SPRENG. Agr. Biol. Chem. 40, 2283
- Ohlenmacher U. (1993) Allelochemische und antimikrobielle Wirkung von Derivaten des 1'-Hydroxyeugenols und der E/Z-Coniferylalkohole aus der Gattung *Coreopsis*. Dissertation, Heidelberg
- Reichling J., Horz K.H. & Ohlenmacher U. (1994a) *Coreopsis* spp.: In vitro culture and the formation of phenylpropanoids and other secondary metabolites. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 26. Medicinal and aromatic plants VI. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 106
- Reichling J., Ohlenmacher U. & Hingst V. (1994b) Phenylpropanderivate und ihre Verwendung als Antibiotika. Deutsche Patentanmeldung P 43 38 796.9 Deutsches Patentamt, München
- Reichling J., Ohlenmacher U., Jost-Ullmann M., Hingst V. & Geiss H.K. (1994c) 1'-Hydroxyeugenole, eine neue Klasse von Antibiotika mit spezieller Wirkung gegen Staphylokokken. In: Christiansen B., Gundermann K.O., Höller C., Rautenberg P.,

- Schubert S. & Ullmann U. (Hrsg.) Fortschritte in der Hygiene und Mikrobiologie. Pechstein Verlag, Dobersdorf, S. 46
- Rizvi S.J.H. & Rizvi V. (ed.) (1992) Allelopathy, basic and applied aspects. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo
- Schmetzer P. (1987) Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen durch organspezifische Nitrosamine in primären Hepatozyten. Inter- und Intra-Speziesvergleich. Dissertation, Heidelberg
- Thomas P.A., Bhat K.S. & Kotian K.M. (1980) Antibacterial properties of dilute formocresol and eugenol and propylene glycol. Oral Surg. 49, 166
- Thron U., Martin R. & Reichling J. (1989) Rare eugenol- and Z-coniferylalcohol derivatives in roots of three *Coreopsis* species. Z. Naturforsch. 44c, 7
- Villegas M., Vargas D., Msonthi J.D., Marston A. & Hostettmann K. (1988) Isolation of antifungal compounds Falcarindiol and Sarisan from *Heteromorpha trifoliata*. Planta Med. 54, 36
- Wolf G. (1993) Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Hemmstoffen der 5-Lipoxygenase sowie Untersuchungen zur Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) und dessen biologische Aktivität. Dissertation, Heidelberg

10 Untersuchungen zur Pathogenität von wurzel- und stengelbesiedelnden Pilzen bei *Lupinus luteus*

Uta Feiler

Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung,
Institut für Landnutzungssysteme, Eberswalder Str. 72,
15374 Müncheberg

Zusammenfassung

Es wird von Untersuchungen zur Feststellung der Virulenz von Pilzarten berichtet, die häufig von *L. luteus* isoliert wurden. Außerdem werden das Gesamtpilzspektrum sowie die Artenzahl/Pflanze aufgezeigt. Anhand von Befallsymptomen und des Befallsindex wird die Wirkung verschiedener Inokulumkonzentrationen (Intensitätsstufen) der Arten *Fusarium culmorum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Cylindrocarpon destructans*, *Gliocladium catenulatum* und *Botrytis cinerea* auf die Sorten "Schwako" (fusariumanfällig) und "Borselfa" (fusariumresistent) beschrieben.

Summary

Investigations on the pathogenicity of fungi isolated from roots and stems of *Lupinus luteus*. This article deals with the analysis of pathogenicity of fungi which were frequently isolated from *Lupinus luteus*. The spectrum of fungi and the number of species per plant are shown. Disease indices and symptoms illustrate the influence of inoculum concentrations of the species *Fusarium culmorum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Cylindrocarpon destructans*, *Gliocladium catenulatum* and *Botrytis cinerea* when tested on the lupin varieties "Schwako" (fusarium-susceptible) and "Borselfa" (fusarium-resistant).

10.1 Einleitung

Die Bedeutung der Lupine als Nahrungs-, Futter-, Düngungs- und Arzneipflanze ist bekannt. Trotz dieser universellen Nutzbarkeit ist ihr Anbau jedoch oftmals wenig attraktiv, denn ihre Ertragsfähigkeit ist relativ gering und wird häufig durch das Auftreten von Schadernegern begrenzt. Diese sind in hohem Maße für die Instabilität des Samen- und Futterertrages, die Nichtverwertbarkeit von Saatgutchargen bei hoher parasitärer Belastung

oder sogar für Verluste ganzer Tierbestände bei Aufnahme von mit Mykotoxinen verseuchtem Pflanzenmaterial verantwortlich. So hat der Lupinenanbau an Popularität verloren und es ist ein weltweiter Rückgang der Lupinenbaufläche um 35% zu verzeichnen, der vor allem durch Pilzkrankheiten bedingt ist (WILLIAMS 1984). Das Schadausmaß wird durch Berichte aus verschiedenen Ländern deutlich. In Brasilien verminderte sich die Anbaufläche eines Betriebes innerhalb kurzer Zeit durch das starke Auftreten von Schadmykosen von 50 000 ha auf 10 ha (FREY 1985). Auch aus Ägypten wird von einer geringeren Anbauausdehnung wegen eines hohen Krankheitsbefalles berichtet (SAHAB et al., 1985). Die Lukrativität des Anbaues wird von Jahr zu Jahr durch eine Instabilität des Samenertrages in Folge eines hohen Schaderregerbesatzes gefährdet (FRENCEL 1988). Hinzu kommt, daß bei einem Befall mit bestimmten Schaderregern erhebliche Gefahren bei Verwertung dieser Chargen durch das Auftreten von Mykotoxinen bestehen (MACKIE et al. 1992 ; MORCOMBE & ALLEN 1990). Die bei Verzehr durch die Mykotoxine bei Warmblütern hervorgerufene Krankheit, die im Endstadium mit Verendung einhergeht, wird als Lupinose bezeichnet. Die rasche Verbreitung von Krankheitsfällen wird deutlich in Aufzeichnungen von HANELT (1960), in denen er berichtet, daß allein in drei Kreisen des früheren Pommern in den Jahren 1878-79 über 14 000 Schafe an Lupinose eingingen. Nicht zuletzt war es das gehäufte Auftreten des lupinoseverursachenden Pilzes und die damit einhergehenden Ausfälle, die für starke Einbrüche der Schafzucht und die Minimierung des Lupinenanbaues in Deutschland auf lange Zeit verantwortlich waren.

Obwohl ausreichend Belege zur Bedeutung von Schadorganismen pilzlicher Herkunft vorliegen, gibt es vor allem in Deutschland bisher relativ wenig detaillierte Untersuchungen zum Auftreten und zur Bedeutung von bodenbürtigen Mikropilzen an Lupinen. Bestimmte Arten sind als Schadereger bekannt und in ihrer Wirkung auf Lupinen zum Teil ausführlich beschrieben, insbesondere *Fusarium oxysporum*. Als phythopathologisch wichtige Arten werden oftmals nur einige wenige erwähnt. Da innerhalb von eigenen Untersuchungen zum Artenspektrum an *Lupinus luteus* mehr als 65 Pilzarten an Wurzeln und Stengeln erfasst werden konnten, stand die Aufgabe, die Virulenz der häufig vorkommenden Arten zu testen. Im folgenden sind daher einige bisher an Lupinen weniger bekannte Arten in ihrer Wirkung auf zwei Sorten von *L. luteus* dargestellt.

10.2 Material und Methoden

Für die Aufnahme des Artenspektrums wurden 3300 Lupinenpflanzen verschiedener Herkunft entsprechend bestimmter Boniturrichtlinien untersucht (FEILER 1992). Nach

Aufnahme der Pilzarten ist die Artenanzahl/Pflanze erfasst, sowie sind die häufigsten Arten für die Virulenztests bestimmt worden.

Nach Pflanzen- bzw. Saatgutuntersuchungen wurden 10 Pilzarten für die Pathogenitätsuntersuchungen ausgewählt (Tab.1). In den folgenden Ausführungen wurden *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon destructans*, *Gliocladium catenulatum* und *Botrytis cinerea* für die Darstellung von Pathogenitätsergebnissen ausgewählt.

Tab.1: Übersicht über die für Virulenzuntersuchungen verwendeten Pilzarten

Pilzarten
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Fusarium solani</i>
<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Fusarium equiseti</i>
<i>Fusarium torulosum</i>
<i>Cylindrocarpon destructans</i>
<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Phoma medicaginis</i>
<i>Gliocladium catenulatum</i>

Von jeder Pilzart sind 6 Stämme/Test geprüft worden. Um die Resistenzmerkmale, vor allem gegenüber den verschiedenen Fusariumarten prüfen zu können, gehörten eine anfällige (Sorte Schwako) und eine fusariumresistente (Sorte Borselva) *L.luteus* - Sorte zum Testmaterial. Für die Auswertung wurden pro Pilzstamm je 10 Einzelpflanzen/Sorte berücksichtigt.

In 100ml Versuchsgefäßen mit einem Torf-Sandgemisch (1:1), 30ml B5- Nährlösung (1:4) ist das Inokulum als pilzbewachsenes Agarstück plaziert worden. Der Bewuchs der Agarplatten (SNA-Medium) mit dem jeweiligen Pilzstamm wurde vorher mikroskopisch geprüft. Gleichmäßig bewachsene Regionen der Platten sind dann mittels Stanzbohrer (d=1,0 cm) ausgestanzt worden. Um eine Nutzung von nicht kontaminierten Saatgut zu gewährleisten, sind die Lupinenkörner nach 5min. Oberflächensterilisation mit 15%igem NaOCl auf BMA-Medium ausgelegt und nach 11 Tagen bonitiert worden. Nach dem Einpflanzen von einem vorgekeimten Saatkorn/Gefäß begann die Prüfzeit von 33 Tagen. Um optimale

Klimabedingungen zu gewährleisten wurde ein entsprechendes Klimaprogramm erarbeitet (Tab.2). Als Testräume dienten Ökophyten der Firma Haereus.

Tab.2: Klimaprogramm für die Pathogenitätstests

Einstellgröße	Meßwert
Lichtdauer	12h
Lichtstärke	2000 Lux
Temperatur Tag	22°C
Temperatur Nacht	20°C
Feuchtegehalt	60%

Nach der Testphase erfolgte die Aufnahme der Prüfmerkmale: Sproß- und Wurzeltrockenmasse, Sproß- und Wurzellänge, Blattzahl und Symptombonitur. Die Aufnahme der Wurzelschäden anhand von Symptomen wurde nach einem Boniturschlüssel vorgenommen und ebenfalls in Befallsindices umgerechnet (FEILER 1992). Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Befallsindex vorgestellt.

Das Versuchsprogramm beinhaltete 3 Intensitätsstufen :

- Test mit einfacher Inokulummenge
- Test mit doppelter Inokulummenge
- Test mit doppelter Inokulummenge und gewundeter Pflanzenwurzel.

10.3 Ergebnisse und Diskussion

10.3.1 Artenvorkommen an *Lupinus luteus*

Von den in Tabelle 3 aufgezeigten 65 Pilzarten waren in der Regel mehrere an ein und derselben Pflanze zu finden. Nur 5%, der in die Auswertung einbezogenen 750 Pflanzen, waren mit einer Pilzart besiedelt und nur 2% der Pflanzen zeigte keinen Pilzauswuchs. Das Spektrum der Artenanzahl reichte von 0 - 12 Pilzarten/Pflanze, wobei zwischen 2 und 6 Pilzarten/Pflanze am Häufigsten aufzufinden waren (Abb.1).

Tab.: 3 Pilzspektrum an *Lupinus luteus*

Acremonium spp.
Arthrobotrys oligospora
Aureobasidium pullulans
Botrytis cinerea
Cercospora sp.
Chaetomium elatum
Colletotrichum gloeosporioides
Dendryphon nanum
Fusarium avenaceum
Fusarium equiseti
Fusarium poae
Fusarium solani
Geotrichum spp.
Gliocladium roseum
Mortierella spp.
Microspora olivacea
Nigrospora sphaerica
Phialophora spp.
Phoma glomerata
Phoma medicaginis
Phomopsis leptostromiformis
Pleiochaeta setosa
Pleurophomopsis sp.
Pseudophialophora brevicatenatum
Pythium ultimum
Rhizoctonia solani
Sclerotium spp.
Sympodiella sp.
Trichocladium asperum
Trichoderma polysporum
Ulocladium charitarum
Zygorrhynchus heterogamus

Alternaria alternata
Aspergillus spp.
Beauveria alba
Candida albicans
Chaetomium bostrychodes
Cladosporium herbarum
Cylindrocarpon destructans
Eppicoccum purpurascens
Fusarium culmorum
Fusarium oxysporum
Fusarium redolens
Fusarium torulosum
Gliocladium catenulatum
Humicola grisea
Mucor spp.
Neurospora sp.
Penicillium spp.
Phoma eupyrena
Phoma levillei
Phoma pomorum
Phytophthora cactorum
Pleospora herbarum
Preussia aemulans
Pythium oligandrum
Ramularia sp.
Sclerotinia sclerotiana
Skytalidium lignicola
Thielaviopsis basicola
Trichoderma hamatum
Trichoderma viride
Ulocladium consortiale

Diese Ergebnisse belegen, welch enorme Artenvielfalt an Mikropilzen in der Mykoflora von Lupinen anzutreffen ist und läßt vermuten, daß außer den wenigen in der deutschsprachigen Literatur beschriebenen Schaderregern weitere Pilzarten phytopathologisch bedeutsam sein könnten.

10.3.2 Pathogenität ausgewählter Pilzarten an *Lupinus luteus*

Zur Darstellung der Pathogenitätsergebnisse der unter 2. aufgeführten Species wurde jeweils der Befallsindex herangezogen.

Anzahl Pilzarten / Pflanze Durchschnitt von 750 Pflanzen

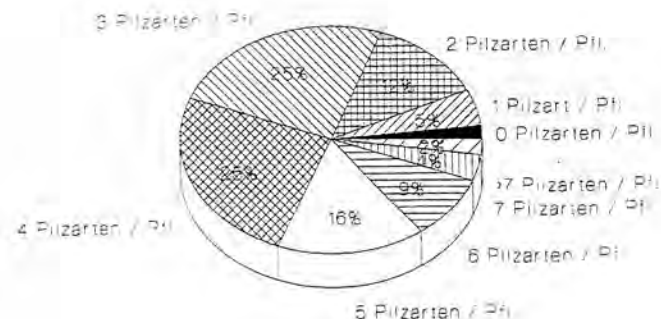


Abbildung 1: Pilzartenanzahl pro Pflanze

Fusarium culmorum Virulenztest-Intensitätsstufe 1

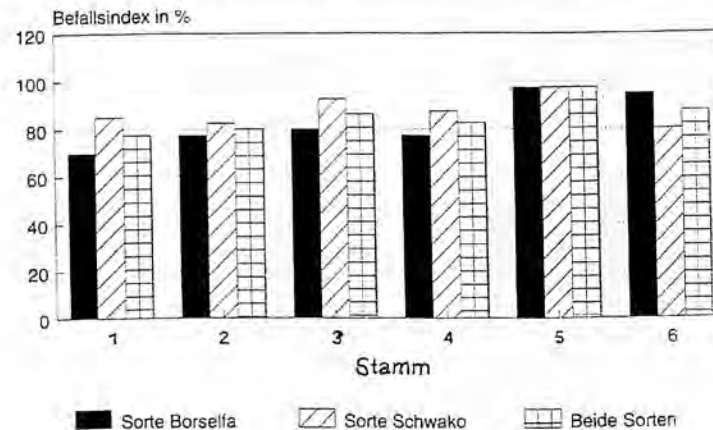
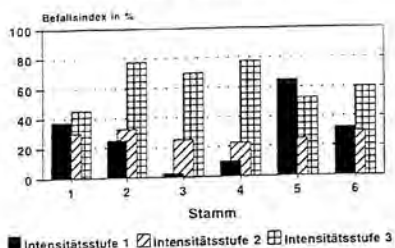


Abbildung 2: Auswirkung des *F.culmorum*-Befalls auf den Befalls-index der Sorten Borselfa und Schwako, Intensitätsstufe 1

Fusarium equiseti Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3 Sorte Borselfa



Fusarium equiseti Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3 Sorte Schwako

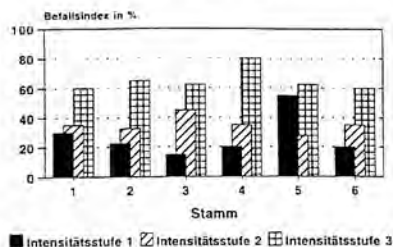
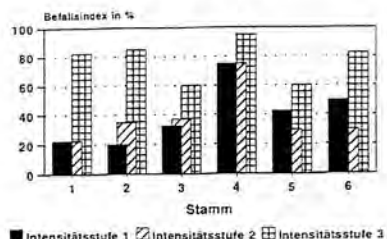


Abbildung 3: Auswirkung des *F. equiseti*-Befalls auf den Befallsindex der Sorten Borselfa und Schwako, Intensitätsstufen 1-3.

Fusarium solani Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3 Sorte Borselfa



Fusarium solani Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3 Sorte Schwako

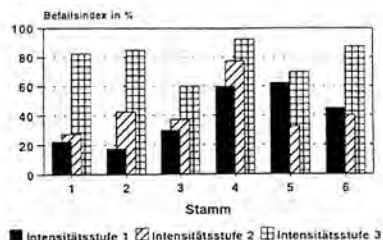


Abbildung 4: Auswirkung des *F. solani*-Befalls auf den Befallsindex der Sorten Borselfa und Schwako, Intensitätsstufen 1-3.

10.3.2.1 Fusarium culmorum

Fusarium culmorum ist ein an Lupinen weniger bekannter Vertreter aus der Gattung der Fusarien, der aufgrund der häufigen Isolation auf Pathogenität geprüft wurde. *F. culmorum* zeigte bei der Intensitätsstufe 1 die stärkste Virulenz gegenüber beiden Lupinensorten (Abb.2). Der Unterschied zwischen den Sorten ist gering. Mit einem Befallsindex von 97,5% bei beiden Sorten ist Stamm 5 als sehr virulent einzustufen. Jedoch auch die Werte der anderen geprüften *F. culmorum*-Stämme, die immer >60% liegen, deuten insgesamt eine beträchtliche Virulenz von *Fusarium culmorum* gegenüber *Lupinus luteus* an. Die Ergebnisse stimmen mit denen von GONDRAN (1992) überein, wonach diese Species als Wurzelmykoseerreger von beträchtlicher Pathogenität eingestuft wird.

10.3.2.2 Fusarium equiseti

Ebenfalls als Schaderreger an Lupinen wenig bekannt, machte sich durch die hohe Frequenz auch für *Fusarium equiseti* die Feststellung der Pathogenität erforderlich. Der Befallsindex stieg bei den untersuchten Stämmen in der Regel von Intensitätsstufe 1 zu Intensitätsstufe 3 recht erheblich an (Abb.3). Selbst die *F. equiseti*-Stämme 3 und 4, die bei der ersten Intensitätsstufe kaum einen Pflanzenbefall verursachten, induzierten nach der Wundung der Wurzel hohe Befallsindizes. Die bei den ersten beiden Intensitätsstufen zum Teil erheblichen Befallsunterschiede werden beim Test der Intensitätsstufe 3 relativ gut ausgeglichen. Die Sorten Schwako und Borselfa zeigen kaum Unterschiede in Befall sowie Befallsgrad, jedoch ist bei der letzteren der Anstieg des Befallsindex bei Intensitätsstufe 3 ausgeprägter (siehe vor allem Stämme 2, 3, 4).

10.3.2.3 Fusarium solani

Fusarium solani ist in anderen Ländern häufig als Wurzel-, Hypokotyl- und Stengelfäule-Erreger beschrieben worden (ARNON 1972; BATEMAN et al.1991; KLIMEK & FLIESS 1992), der oft zusammen mit *F. oxysporum* von kranken Pflanzen isoliert werden konnte (FILIPOWICZ & WAGNER 1988) und die ganze Vegetationszeit über aggressiv ist (FAHIM et al.1983). Ähnlich wie bei *F. equiseti* steigt die Virulenz gegenüber den Lupinenpflanzen proportional zur erhöhten Inokulumkonzentration an (Abb.4). Krasser ist allerdings der Unterschied in der Wirkung der einzelnen Stämme. So können die Stämme 1, 2, 4 und 6 bei beiden Sorten als stark aggressiv eingeschätzt werden (Intensitätsstufe 3), Stamm 4 jedoch auch schon bei geringer Pilzkonzentration. Auch die restlichen beiden *F. solani*-

Stämme zeigen eine beachtliche Aggressivität gegenüber den beiden geprüften Lupinensorten. Die beiden Sorten verhalten sich gleich gegenüber dem Befall mit dem Schaderreger.

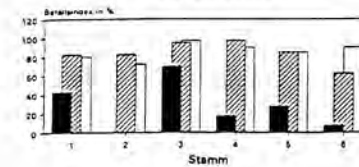
10.3.2.4 *Cylindrocarpon destructans*

In Erhebungen des französischen Phytopathologen GONDRAN (1988, 1989, 1992) ist *Cylindrocarpon destructans* oftmals gemeinsam mit *Fusarium* spp. an Lupinen gefunden worden und gehört zu den Pilzen, die einen Wurzelbefall auslösen. Auch bei diesem Pathogen steigt die Wurzelfäule bei erhöhter Inokulumkonzentration an (Abb.5). Bei einfacher Konzentration des Pilzes scheint die Sorte Schwako anfälliger, was sich bei den nachfolgenden beiden Intensitätsstufen wieder ausgleicht. Größere Virulenzunterschiede zwischen den geprüften Stämmen sind nur bei der Intensitätsstufe 1 sichtbar. *C.destructans* wird offensichtlich nicht durch die Schaffung von Eintrittspforten in die Pflanze beeinflusst, denn zwischen den Intensitätsstufen 2 und 3 liegen kaum Unterschiede. Bei einfacher Inokulummenge reagiert die Sorte Schwako stärker auf den Befall. Mit höherer Konzentration des Erregers werden die Unterschiede im Befallsindex der Sorten nivelliert.

10.3.2.5 *Gliocladium catenulatum*

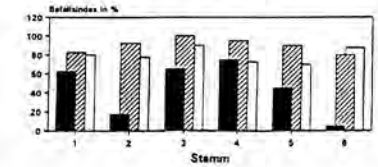
Die Angaben zum Vorkommen von *G. catenulatum* sind relativ selten. DOMSCH & GAMS (1968) beschreiben eine durch *G. catenulatum* induzierte Entwicklungshemmung an Keimlingswurzeln von Weizen, Erbsen und Raps, die der Wirkung von echten Wurzelparasiten vergleichbar ist. Da auch diese Deuteromycetenart zahlreich von Lupinen isoliert werden konnte, wurde diese Species ebenfalls in die Virulenzprüfungen einbezogen. Im Gegensatz zu dem vielfach aufgetretenen Anstieg des Pflanzenbefalls mit steigender Intensitätsstufe, nimmt der Befall mit *G. catenulatum* nur bis Intensitätsstufe 2 zu und geht dann wieder zurück (Abb.6). Hier haben wir es sicherlich mit dem Mechanismus der induzierten Resistenz zu tun. Bei der Sorte Schwako kann eine geringe Inokulumkonzentration schon einen teils erheblichen Befall auslösen. Für die Infektion der Pflanzen der Sorte Borselfa benötigt der Pilz jedoch ein höheres Inokulumpotential. Gegenüber den Intensitätsstufen 2 und 3 verhalten sich die Sorten allerdings sehr ähnlich.

Cylindrocarpon destructans
Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3
Sorte Borselfa



■ Intensitätsstufe 1 ▨ Intensitätsstufe 2 □ Intensitätsstufe 3

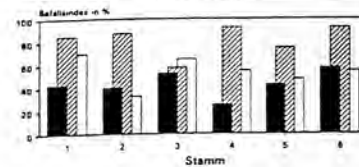
Cylindrocarpon destructans
Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3
Sorte Schwako



■ Intensitätsstufe 1 ▨ Intensitätsstufe 2 □ Intensitätsstufe 3

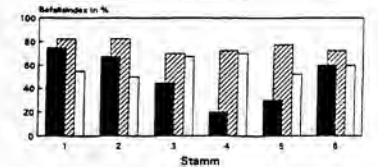
Abbildung 5: Auswirkung des *C.destructans*-Befalls auf den Befallsindex der Sorten Borselfa und Schwako, Intensitätsstufen 1-3.

Gliocladium catenulatum
Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3
Sorte Borselfa



■ Intensitätsstufe 1 ▨ Intensitätsstufe 2 □ Intensitätsstufe 3

Gliocladium catenulatum
Virulenztests-Intensitätsstufen 1-3
Sorte Schwako



■ Intensitätsstufe 1 ▨ Intensitätsstufe 2 □ Intensitätsstufe 3

Abbildung 6: Auswirkung des *G.catenulatum*-Befalls auf den Befallsindex der Sorten Borselfa und Schwako, Intensitätsstufen 1-3

10.3.2.6 Botrytis cinerea

Vor allem in Portugal zählt *Botrytis cinerea* als Stengelkrebserreger der Lupinen zu den Hauptkrankheitsursachen (RODRIGUES DA SILVA & NEVES MARTINS 1989). Jedoch auch anderorts sind Auflaufschäden, Hülsen-, Blatt-, Stengel- und Wurzelbefall beobachtet worden (BATEMAN et al. 1991; KAMÜSCHKOW 1983; KAY 1979; SALT & SMALLEY 1979; WOOD & MC LEAN 1992). Das durch dieses Phytopathogen tatsächlich ein erheblicher Befall verursacht werden kann zeigt Abb.7. Bis auf Stamm 3 der Sorte Schwako bewirkten alle *B. cinerea*-Stämme einen Anstieg des Befallsindex mit steigender Erregermenge. Die Wundung der Pflanzenwurzel hat wenig Einfluß auf das Befallsgeschehen. Zwischen den Sorten gibt es keine bemerkenswerten Unterschiede.

10.3.3 Symptomausprägung

Da oftmals ähnliche Symptome durch verschiedene Pilze ausgelöst werden können, soll die Beschreibung der Symptome für die getesteten Species gemeinsam abgehandelt werden. Bei einem Pflanzenbefall war für alle beschriebenen Erreger eine Wurzelfäule (Abb.9-16) charakteristisch, die jedoch je nach Befallsstärke und Widerstandsfähigkeit der Pflanze unterschiedliche Auswirkungen haben konnte. Wurzelverfärbungen traten in der Regel immer auf, wobei sich ein Fusariumbefall vielfach durch rötlichbraune Flecken bis hin zu fast vollständiger Verbräunung äußerte. Die Befallsstellen waren meist durch Einschnürungen gekennzeichnet an denen häufig eine Trennung der Wurzeln eintrat. Wenn das die Hauptwurzel betraf versuchte die Pflanze diesen Verlust durch die Bildung von neuen Sekundärwurzeln zu kompensieren, allerdings gelingt dies nur selten wie aus Abb.9 deutlich wird. Obwohl bei dem beschriebenen Fusariumbefall keine Gefäßverbräunung auftrat, hatte eine fortschreitende Wurzelfäule ebenfalls deutliche Welkesymptome zur Folge (Abb.10). Solche "falsche Lupinenwelke" wurde in besonderem Maße durch *F.culmorum* ausgelöst. Mißbildungen der Blätter, Verkürzung und Verkrümmung der Sproßachse sind vielfach durch *Fusarium* spp. induziert worden (Abb.9, 11, 12, 13) traten aber gelegentlich auch bei Befall mit den anderen Pilzarten auf. Typisch für einen Befall mit *Cylindrocarpon destructans* war die völlige Verbräunung und weiche Konsistenz der Wurzeln (Abb.14). Im Gegensatz dazu zeichnete sich ein *Botrytis*-Befall vor allem durch Läsionen an Wurzel und Stengelbasis aus (Abb.15, 16), wobei selten die Wurzel vollständig verbräunt war.

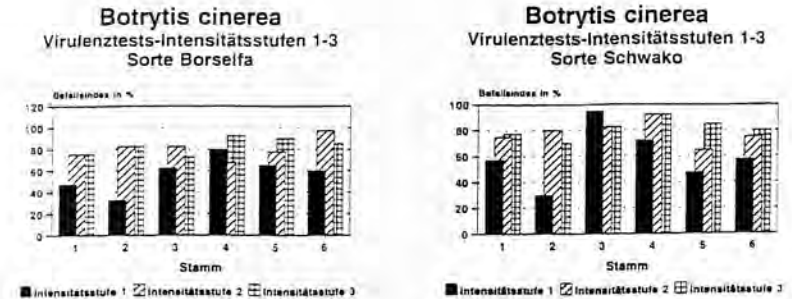


Abbildung 7: Auswirkung des *B.cinerea*-Befalls auf den Befallsindex der Sorten Borselva und Schwako, Intensitätsstufen 1-3



Abbildung 8: Gesunde *L.luteus*-Pflanze



Abbildung 9: *L.luteus*-Keimling mit *Fusarium culmorum*-Befall

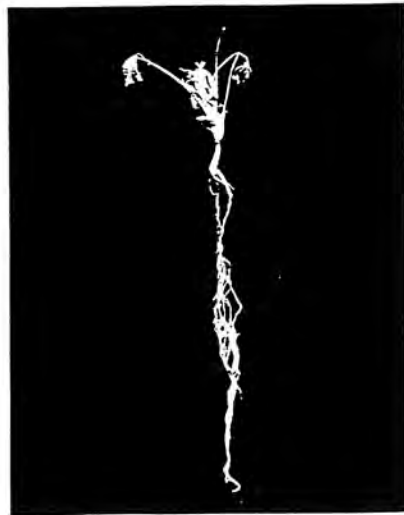


Abbildung 10: *L.Luteus*-Pflanze mit Welkesymptomen bei *F.culmorum*-Befall



Abbildung 11: Mißbildung und Wurzelverfärbung durch *F.solani*-Befall



Abbildung 12: Mißbildung und Wurzelverfärbung durch *F.solani*-Befall



Abbildung 13: Blattmißbildungen durch Fusarium-Befall



Abbildung 14: Wurzelfäule durch Befall mit *C.destructans*



Abbildung 15: *L.luteus* Pflanze mit Stengelfleck und abgefallener Wurzel durch *B.cinerea*-Befall



Abbildung 16: Flecken und Verfärbung am Stengelgrund durch *B.cinerea*-Befall

10.4 LITERATURVERZEICHNIS

- ARNON, I.(1972) Crop production in dry regions. N. Polunin, Leonard Hill London, 683pp.
- BATEMAN, G.I.; JENKYN, J.F.; JOHNSON, S.A.; SILVA, L.(1991) Fungal pathogens of grain lupins 1986 - 1991. Aspects of Applied Biology, 27, 129-132.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.(1968) Die Bedeutung vorfruchtabhängiger Verschiebungen in der Bodenmikroflora. 1. Der Einfluß von Bodenpilzen auf die Entwicklung von Weizen, Erbsen und Raps. Phytopath. Z. 63, 64-74.
- FAHIM, M.M.; SAHAB, A.F.; OSMAN, A.R.; ABD EL-KADER, M.M.(1983) Studies on some soil borne fungi attacking lupin plant. Egypt. J. Phytopath., 15(1-2), 17-26.
- FEILER, U.(1992) Erste Ergebnisse zum endogenen Pilzbefall von *Lupinus luteus* (Wurzel und Stengel) in Abhängigkeit von Standort und Fruchtfolge. In: Lupinen 1991-Forschung, Anbau und Verwertung, M.Wink (Hrsg.), Universität Heidelberg, 14-25.
- FILIPOWIC, A.; WAGNER, A.(1988) Pathogenic mycoflora of *Vicia faba*; var. *minor*; of *Lupinus albus*; *Lupinus angustifolius* and *Lupinus luteus* cultivated in Poland. Annales ANPP.(France), 2, 1015-1022.
- FRENCEL, I.M.(1988) Infectious diseases of lupins in Poland; with special reference to the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). Lupin Newsletter, 11, 13-19.
- FREY, F.(1985) Pflanzenschutzprobleme beim Anbau von Lupinen in Südbrasilien; Kanzen. Vorgelegt der GTZ, 58 S.
- GONDRAN, J.(1988) Fungal diseases of white lupin sown in autumn in France: special studies on *Fusarium* spp. and *Pleiochaeta setosa* Kirchn. Hughes. Proc.5th Int.Lupin Conf., 201-216.
- GONDRAN, J.(1989) Diseases in autumn and spring sown white lupin in France; anthracnose (*Colletotrichum gloeosporoides*) brown spot disease (*Pleiochaeta setosa*) root rot (*Fusarium* spp.; *Cylindrocarpon* spp.). Phytoma (France), No.4113, 64-66.
- GONDRAN, J.(1992) The diseases of the white lupin crops in France. Proc. of the 1st conf. on grain legumes. 1.-3. June 1992 France, 373-374.
- HANELT, P. (1960) Die Lupinen. A.Ziensen Verlag - Wittenberg. 104 S.
- KAMÜSCHKOW, A.B.(1983) Mnogoletnij lupin - Reserw rastitelnowo BjelkaKolos. Leningrad otd.-nie, 78pp.
- KAY, D.E.(1979) Crop and Product Digest No.3 - Food Legumes. London:Tropical Products Institute; xvi, 435pp.

- KLIMEK, S.; FLIESS, H.(1990) Neue Ergebnisse der Lupinenforschung in Polen. Giessener Abhandlungen zur Agrar-und Wirtschaftsforschung des europäischen Ostens (Hrsg.M.Zoschke), 177(1), 164 S.
- MACKIE, J.T.; RAHELEY, R.S.; BENNETT, R.(1992) Lupinosis in yearling cattle. Aust. Veter. Journal, 697, 172-173
- MORCOMBE, P.; ALLEN, J.(1990) The incidence of lupinosis in sheep grazing *Phomopsis*-resistant lupin stubbles. J. of Agric., WA, 31, 3-4.
- RODRIGUES DA SILVA, P.M.; NEVES MARTINS, J.M.(1989) Some lupin diseases and pests in Portugal. Lupin Newsletter, 12, 58-65.
- SAHAB, A.F.; OSMAN, A.R.; SOLEMAN, N.K.; MIKHAIL, M.(1985) Studies on root-rot of lupin in Egypt and its control. Egypt.J.Phytopath., 17(1), 23-35.
- SALT, G.A.; SMALLEY, J.(1979) Root rot of Lupins, *Lupinus albus* cv. Kievsky. Report of Rothamsted Ex. Station for 1978, Part 1, 218-219.
- WILLIAMS, W.(1984) Lupins in crop production. Outlook on Agriculture, 13, 69-76.

11 Ergebnisse des Bitterlupinenprojektes in Sachsen-Anhalt (1992-1994)

E.A. Weißmann

c/o: Mittex Anlagenbau GmbH
Brechenmacherstr.2
D-88250 Weingarten

Zusammenfassung

Produktionstechnik: Was sich bei Versuchen des Jahres 1992 bereits abzeichnete, wurde auch unter den Bedingungen des Jahres 1993 bestätigt:

1. Mit einer Impfung konnten keine signifikanten Ertragsverbesserungen erzielt werden. Auf den gut mit Nährstoffen versorgten Böden konnten sogar nachteilige Wirkungen festgestellt werden. Daher ist eine Impfung des Saatguts mit Rhizobien nicht mehr pauschal zu empfehlen.
2. Da eine niedrigere Aussaatstärke von 50 Körnern/m² keine Nachteile gegenüber der höheren Aussaatstärke von 65 Körnern/m² brachte, kann -auch aus phytosanitären Gründen- eine Aussaatstärke von 50 Körnern/m² empfohlen werden.

Sorten: Mit der Wahl der richtigen Sorte kombiniert der Landwirt rechtzeitige Abreife mit höchstem Ertrag. Wie die Ertragsleistung der geprüften Stämme und Sorten zeigt, ist die Weiße Lupine eine äußerst ertragreiche Frucht. Ein bitterstoffhaltiger Stamm erzielte über 70 dt/ha, im Normalfall sind also 50 dt/ha eine realistische Ertragserwartung. Damit ist die Weiße Lupine auch ökonomisch konkurrenzfähig.

Summary

Plant management: The main results of the experiments in 1993 have generally confirmed the results of 1992.

1. In comparison to untreated seed inoculation of seed with *Bradyrhizobium* did not result in higher seed yields. On soils with good conditions a reduction of seed yield was observed. Therefore, we do not generally recommend an inoculation with *Bradyrhizobium*.
2. It was shown that the seed yield of *L. albus* was not reduced when reducing the plant density down to 50 seeds/square-meter. More over a lower pressure of fungal diseases was observed.

Varieties: The results show that we have few varieties to be grown in the Altmark. One variety shows a good combination of early maturity and high yield. Most tested varieties

showed a good performance. The best bitter variety yielded 70 dt/ha. It was shown that under farmer's conditions we can expect an average yield of 35-50 dt/ha when we grow bitter *L. albus* varieties. Therefore, we can easily state that *L. albus* is able to become a cash-crop.

Key words

L. albus, yield, plant management, oil, protein, variety, lupanine, alkaloid, white lupine.

11.1 Einleitung

Das Ziel der landwirtschaftlichen Versuche, die im Rahmen des Bitterlupinenprojektes Sachsen-Anhalt 1992 und 1993 durchgeführt wurden, war es folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Lupinenarten (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*) haben in der Altmark das größten Ertragspotential?
- Gibt es innerhalb der besten Lupinenarten anbauwürdige Sorten?
- Gibt es bezüglich der Inhaltsstoffgehalte Unterschiede?
- Durch welche Faktoren werden die Inhaltsstoffgehalte beeinflusst?
-

Die Versuche zu den Artenvergleichen haben 1992 und 1993 ergeben, daß auf den mittleren und besseren Böden der Altmark die Weiße Lupine (*L. albus*) die ertragssicherste und ertragsstärkste Lupinenart ist. Selbst auf leichten Böden ist sie den Gelben Lupinen (*L. luteus*) ebenbürtig.

Hinsichtlich der Verwendung im Non-Food-Bereich ist festzuhalten, daß die Weiße Lupine (*L. albus*) das Hauptalkaloid Lupanin enthält, das als biogenetischer Ausgangspunkt der meisten Alkaloide in Lupinen gilt. Lupanin hat interessante pharmakologische und toxikologische Eigenschaften, die es erlauben, Lupanin in Pestiziden als Wirkstoff einsetzen zu können.

Die Weiße Lupine (*L. albus*) hat eine weiße Samenschale und cremefarbene Kotyledonen ohne Grauschleier! Diese beiden Eigenschaften sind für die Vermarktung von Produkten aus Lupinen für Nahrungsmittel von ausschlaggebender Bedeutung.

Dies und weitere Gründe (N-Fixierung nur bis kurz nach der Blüte, natürliche Reife ohne Defoliation) haben die Firma Mittex Anlagenbau GmbH dazu bewogen, die industrielle Anlage zur Verarbeitung von Lupinen auf die Weiße Lupine (*L. albus*) auszulegen.

Aus diesen Gründen sollen hier die Versuchsergebnisse eines orthogonalen Versuches aus 1993 mit einigen ausgewählten Sorten (Stämmen) der Weißen Lupine (*L. albus*) dargestellt werden.

Die Versuchsergebnisse aus 1992 und 1993 sowie Erfahrungen aus der Literatur und den Sortenversuchen des Bundessortenamtes haben als Grundlage zur Erarbeitung eines Anbauprospktes für die Weiße Lupine (*L. albus*) geführt, das beim Verfasser bezogen werden kann.

11.2 Material und Methoden

Im produktionstechnischen Sortenversuch wurden 8 Stämme der Weißen Lupine geprüft. Stämme 1 - 5 sind alkaloidarm (süß) mit einem Alkaloidgehalt bis zu 0,05%. Stämme 6 - 8 sind alkaloidreich (bitter) mit einem Alkaloidgehalt über 1%. Diese 8 Stämme wurden bereits 1992 einotig geprüft und erwiesen sich unter jenen Bedingungen als für den Anbau geeignet.

Unter Berücksichtigung der wichtigsten Bodenarten der Region Tangerhütte/Magdeburg wurde der Versuch auf einem Lößstandort bei Dahlenwarsleben (Löß), einem lehmigen Sandstandort (lehm. Sand) bei Möringen sowie einem Sandstandort bei Möringen (Sand) angelegt.

Der Versuch enthielt folgende Faktoren:

- 3 Orte (Löß, lehm. Sand, Sand)
- Rhizobienimpfung (mit und ohne Impfung)
- 2 Aussaatstärken (50 und 65 Körner/m²)
- 8 Stämme der Weißen Lupine

Diese Versuche wurden in zweifacher Wiederholung als geteilte Blockanlage (Split Plot) ausgesät, getrennt nach geimpfter und ungeimpfter Variante (Abb.1). Folgende Merkmale wurden erfaßt:

- Blühbeginn (Bonitur)
- Reife (Bonitur)
- Lagerneigung (Bonitur)
- Anthracnosebefall (Bonitur)
- Wuchshöhe (cm)
- Korntrag (dt/ha)
- Eiweiß- und Ölgehalt (%TM)
- Alkaloidgehalt (mg/g)

Bonitur bedeutet eine Klassifizierung von 1 - 9, wobei 1 die geringste oder früheste Ausprägung und 9 die höchste oder späteste Ausprägung eines Merkmals beschreibt. Die Vegetationsperiode 1993 war gekennzeichnet durch ein trockenes, sehr warmes Frühjahr und durch große Niederschlagsmengen im Spätsommer zur Kornfüllung und zur Abreife der Weißen Lupinen.

13 15 10 16 9 12 14 11	27 29 31 26 28 32 25 30
14 16 9 11 10 15 13 12	32 30 28 25 31 26 27 29
7 4 5 6 8 3 2 1	18 19 24 21 22 17 20 23
1 2 3 4 5 6 7 8	20 17 22 23 19 21 24 18
Erklärung: 1 - 8: 5 süße und 3 bittere Stämme, 50 K/m ² 9 - 16: dto. 65 K/m ² 17 - 24: dto. 50 K/m ² , geimpft mit Rhizosarb 25 - 32: dto. 65 K/m ² , geimpft mit Rhizosarb	

Bodenbearbeitung: Winterpflugfurche
 Saatbettbereitung: Saatbettkombination 3 cm tief
 Aussaat: Anfang April mit einer Parzellendrimmaschine (HEGE-80), 3 cm tief
 Saatgutbehandlung: Beizung mit Thiram
 Rhizobienimpfung: mit Rhizosarb durch Beidrillen von Mikrogranulat
 Unkrautbekämpfung: 3,5 l/ha Stomp im Vorauflauf
 Ernte: am 28.9.1993 in Möringen
 am 8.10.1993 in Dahlenwarsleben

Abb. 1: Aussaatplan für den Bitterlupinenversuch 1993 an 3 Standorten in Sachsen-Anhalt. (Parzellenformat 12 x 1,25 m)

Auch in dieser Vegetationsperiode traten nur geringe Schäden durch tierische oder pilzliche Schaderreger auf. Lediglich am Standort lehmiger Sand in Möringen war ein starker Befall von Anthraknose zu beobachten, der entsprechend durch Bonitur erfaßt wurde.

11.3 Ergebnisse

11.3.1 Korntrag

Tab.2 zeigt die durchschnittlichen Kornträge über den gesamten Versuch hinweg, sowie an den drei Standorten. Die Varianzanalyse erbrachte hochsignifikante Unterschiede zwischen Orten und Sorten, sowie hochsignifikante Interaktionseffekte zwischen Sorten und Orten.

Tab.1: Ergebnisse der Varianzanalyse, Darstellung der signifikanten Variationsursachen.

Ursache	Ertrag	Blüh- beginn	Reife	Lager	Wuchs-Anthrak- höhe nose	Protein- gehalt	Öl- gehalt	Protein ertrag	Öl- ertrag
Ort (A)	**	*	**	**	**	-	ns	**	**
Impfung (B)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+
Ort * Impfung	ns	**	**	**	**	-	**	**	ns
Fehler (ABE)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Saatstärke (C)	ns	+	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
Sorte (D)	**	**	**	**	**	**	+	ns	**
Ort * Sorte (AD)	**	**	**	**	*	-	+	+	**
Impf * Sorte (BD)	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Saat * Sorte (CD)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fehler (ABCDE)									

ns keine, + 90%, * 95%, ** 99% Signifikanz; - nur einortig aufgetreten

Tab. 2: Der Einfluß des Standortes auf den Kornertrag (dt/ha)

	Sand	lehm.Sand	Löß	Mittel
Stamm 1	50,3	40,3	57,6	49,4
Stamm 2	36,6	30,0	34,6	34,6
Stamm 3	33,7	31,4	41,1	35,4
Stamm 4	44,6	34,6	48,0	42,4
Stamm 5	34,0	27,4	28,4	30,0
Stamm 6	56,9	62,0	78,6	65,8
Stamm 7	34,6	35,4	47,7	39,2
Stamm 8	35,1	32,9	40,6	36,2
Ortsmittel	40,7	36,8	47,4	41,6

Tab. 3: Der Einfluß der Rhizobienimpfung auf den Kornertrag (dt/ha)

	ohne Impfung	Präparat Rhizosarb	Sortenmittel
Stamm 1	52,7	46,1	49,4
Stamm 2	35,1	34,2	34,6
Stamm 3	35,5	35,3	35,4
Stamm 4	43,8	41,0	42,4
Stamm 5	30,5	29,4	30,0
Stamm 6	69,8	61,8	65,8
Stamm 7	40,2	38,3	39,2
Stamm 8	34,3	38,1	36,2
Durchschnitt	42,7	40,5	41,6

Tab.4: Der Einfluß der Aussaatstärke auf den Kornertrag (dt/ha)

	Saatstärke 1 50 Körner/m ²	Saatstärke 2 65 Körner/m ²	Differenz S2 - S1
Stamm 1	50,6	48,2	- 2,4
Stamm 2	33,7	35,5	1,8
Stamm 3	37,0	33,9	- 3,1
Stamm 4	43,1	41,7	- 1,4
Stamm 5	29,4	30,5	1,1
Stamm 6	65,2	66,4	1,2
Stamm 7	38,4	40,1	1,7
Stamm 8	33,6	38,8	5,2
Durchschnitt	41,4	41,9	0,5

Tab.5: Der Einfluß des Standortes und der Rhizobiumimpfung auf den Blühbeginn (1 = sehr früh, 9 = sehr spät)

	Sand	lehm.Sand	Löß	ohne Impfung	Rhizosarb	Mittel
Stamm 1	4,0	4,0	5,0	4,3	4,3	4,3
Stamm 2	3,3	3,0	3,5	3,3	3,3	3,3
Stamm 3	2,9	3,0	3,0	3,3	2,7	3,0
Stamm 4	6,3	3,9	6,3	6,0	4,9	5,5
Stamm 5	7,0	4,8	7,4	6,0	6,8	6,4
Stamm 6	2,3	3,0	2,3	2,3	2,7	2,5
Stamm 7	3,9	4,0	4,8	4,1	4,3	4,2
Stamm 8	4,0	3,9	5,3	4,3	4,4	4,4
Ortsmittel	4,2	3,7	4,7	4,2	4,2	4,2
LSD5%	0,7	0,7	0,7	0,5	0,5	1,2

Tab.6: Der Einfluß des Standortes und der Rhizobiumimpfung auf die Reife (1 = sehr früh, 9 = sehr spät)

	Sand	lehm.Sand	Löß	ohne Impfung	Rhizosarb	Mittel
Stamm 1	4,5	4,5	7,8	5,8	5,4	5,6
Stamm 2	4,3	3,9	7,4	5,6	4,8	5,2
Stamm 3	4,3	3,8	7,1	5,4	4,7	5,0
Stamm 4	1,8	2,8	4,4	3,6	2,3	3,0
Stamm 5	7,3	8,9	9,0	8,7	8,1	8,4
Stamm 6	6,9	8,4	7,4	7,8	7,3	7,6
Stamm 7	1,1	1,9	3,5	2,2	2,2	2,2
Stamm 8	1,1	1,9	2,6	1,8	2,0	1,9
Durchschnitt	3,9	4,5	6,1	5,1	4,6	4,8
LSD5%	1,1	1,1	1,1	0,9	0,9	1,5

Das Ertragsniveau im Gesamtdurchschnitt lag bei 41,63 dt/ha. Damit ist ein durchaus leistungsfähiges Niveau erreicht. Über alle Orte hinweg zeigte der bittere Stamm 6 mit Abstand den höchsten Körnertrag von 65,8 dt/ha, gefolgt von Stamm 1 mit knapp 50 dt/ha. Im Mittelfeld liegen die Stämme 2, 3, 4, 7 und 8 mit 34 bis 39 dt/ha. Lediglich Stamm 5 enttäuschte mit einem durchschnittlichen Körnertrag von unter 30 dt/ha.

Erwartungsgemäß war das höchste Niveau des Körnertrags am Lößstandort mit durchschnittlich 47,4 dt/ha zu finden, was sich im einzelnen auch bei allen Stämmen bis auf Stamm 5 wiederfinden ließ. An diesem Standort zeigte Stamm 6 eine sehr gute Leistung von 78,6 dt/ha (Wert aus 8 Einzelwerten!).

Wider Erwarten waren die Körnerträge am Sandstandort höher als beim lehmigen Sand. Eine Ausnahme machen die Stämme 6 und 7. Die Ursache für den niedrigeren Körnertrag beim lehmigen Sand ist im starken Anthraknosebefall an diesem Standort zu suchen.

Für das Merkmal Körnertrag brachte die Varianzanalyse (Tab. 1) keine signifikanten Effekte, die durch die Aussaatstärke oder die Rhizobiumimpfung verursacht wurden. Dennoch zeigt die Betrachtung der entsprechenden Mittelwerte, daß die geimpften Prüfglieder durchschnittlich ca. 2 dt/ha weniger Ertrag brachten als die ungeimpften (Tab.3). Der Einfluß der Rhizobienimpfung fiel damit wie 1992 aus.

Auf die Aussaatstärken von 50 bzw. 65 Körner/m² reagierten die Stämme verschieden (Tab.4). Einen Mehrertrag von über 5 dt/ha erbrachte Stamm 8. Von den Stämmen Nr. 2, 5, 6, und 7 konnten in der höheren Aussaatstärke 1 - 1,8 dt/ha mehr geerntet werden. Die Stämme 1, 3, und 4 hatten bei einer Aussaatstärke von 50 Körnern/m² einen höheren Körnertrag. Bei Stamm 3 lag diese Differenz sogar bei 3 dt/ha. Die durchschnittliche Tendenz erbrachte für die Aussaatstärke von 65 Körnern/m² einen nicht signifikanten Mehrertrag von 0,51 dt/ha gegenüber 50 Körnern/m².

11.3.2 Blühbeginn

Für den Blühbeginn ergab die Varianzanalyse hochsignifikante Sortenunterschiede und signifikante Ortseffekte. Es zeigten sich außerdem hochsignifikante Interaktionen zwischen Sorten und Orten, sowie Sorten und Rhizobiumimpfung. Die entsprechenden Mittelwerte befinden sich in Tab.5.

Am frühesten begann der Stamm 6 zu blühen und als letztes der Stamm 5. Die Versuchsvarianten Aussaatstärke und Rhizobienimpfung hatten keinen Einfluß auf den Blühbeginn. An den beiden Standorten bei Möringen begannen die Lupinen zum gleichen Zeitpunkt zu blühen, während der Blühbeginn am Lößstandort bei Dahlenwarleben etwa 2

Tab.7: Der Einfluß des Standortes und der Rhizobiumimpfung auf die Lagerneigung (1 = kein 9 = stark)

	Sand	lehm.Sand	Löß	ohne Impfung	Rhizosarb	Mittel
Stamm 1	1,9	1,9	5,5	3,3	2,8	3,1
Stamm 2	3,0	4,8	7,0	5,6	4,3	4,9
Stamm 3	3,5	4,8	6,8	5,4	4,6	5,0
Stamm 4	2,4	4,5	6,5	4,4	4,5	4,5
Stamm 5	5,1	7,3	7,0	7,0	5,9	6,5
Stamm 6	3,8	6,8	5,5	5,8	4,8	5,3
Stamm 7	4,4	6,9	7,0	6,6	5,6	6,1
Stamm 8	4,3	7,1	7,8	6,6	6,2	6,4
Durchschnitt	3,5	5,5	6,6	5,6	4,8	5,2
LSD5%	1,6	1,6	1,6	1,3	1,3	1,5

Tab.8: Der Einfluß des Standortes und der Rhizobiumimpfung auf die Wuchshöhe (cm)

	Sand	lehm.Sand	Löß	ohne Impfung	Rhizosarb	Mittel
Stamm 1	73,5	74,5	107,5	86,7	83,7	85,2
Stamm 2	70,4	69,0	83,8	77,0	71,8	74,4
Stamm 3	66,8	71,5	83,8	76,2	71,8	74,0
Stamm 4	75,0	74,9	95,0	84,4	78,8	81,6
Stamm 5	92,8	100,5	126,3	110,2	102,8	106,5
Stamm 6	100,6	119,4	127,5	118,3	113,3	115,8
Stamm 7	70,6	78,4	93,8	83,2	78,6	80,9
Stamm 8	75,9	75,6	91,3	80,8	81,1	80,9
Durchschnitt	78,2	83,0	101,1	89,6	85,2	87,4
LSD5%	10,4	10,4	10,4	8,5	8,5	9,4

Tab.9: Der Einfluß der Aussaatstärke auf die Ausprägung des Anthraknosebefalls am Standort "lehmiger Sand" (1 = kein Befall 9 = sehr starker Befall)

	Aussaat1 50 Korn/m ²	Aussaat2 65 Korn/m ²	Differenz S2 - S1	ohne Impfung	Rhizosarb	Mittel
Stamm 1	2,5	5,0	-2,5	3,5	4,0	3,8
Stamm 2	5,0	5,0	0	5,0	5,0	5,0
Stamm 3	4,3	5,5	-1,2	4,8	5,0	4,9
Stamm 4	5,0	5,5	0,5	5,5	5,0	5,3
Stamm 5	6,5	7,0	-0,5	6,5	7,0	6,8
Stamm 6	4,3	5,5	-1,2	4,3	5,5	4,9
Stamm 7	4,5	5,0	-0,5	4,5	5,0	4,8
Stamm 8	5,3	6,5	-1,2	5,3	6,5	5,9
Durchschnitt	4,7	5,6	-0,9	4,9	5,4	5,1
LSD5%	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,2

Tage später war. Die Rangfolge der Blühbeginnbonituren der Sorten blieb bei allen Standorten gleich. Ausnahmen sind Nr.4 und 5, die am lehmigen Sandstandort früher zu blühen begannen. Vermutlich ist dies ein Standorteffekt, da dort die mittlere Abweichung vom Standortmittelwert am geringsten ist. An diesem Standort differenzierte die Ausprägung des Merkmals Blühbeginn nicht deutlich.

11.3.3 Reife

Die Reife hat sich besonders 1993 als das wichtigste agronomische Merkmal erwiesen. Spätreifen Lupinen kann dies die Anbaueignung versagen, da sie bei entsprechend wüchsigen Witterungseinflüssen, wie sie 1993 herrschten, Probleme bei der Ernte mit sich bringen. Wiederum ergab die Varianzanalyse hochsignifikante Unterschiede bei Orten und Sorten. Auch schien die Rhizobiumimpfung einen gewissen Effekt auf die Reife zu haben, da diese Varianzursache signifikant ist.

Die beiden spätreifsten Stämme sind Stamm 5 und 6, allerdings wies Stamm 6 den höchsten Ertrag auf. Als frühreif zu bezeichnen sind die Stämme 4, 7 und 8. In der mittleren Reifeklasse liegen die Stämme 1, 2, und 3 (Tab.6).

Bei der Reihenfolge der Reife der verschiedenen Orte waren die Lupinen erwartungsgemäß am Sandstandort am frühesten und am Lößstandort am spätesten reif. Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit der Wasserverfügbarkeit, die bei Löß am besten ist. Die Reihenfolge der Stämme an den verschiedenen Standorten im Bezug auf das Merkmal Reife war an allen Standorten gleich (Tab.6).

Während die Aussaatstärke keinen signifikanten Einfluß auf die Reife ausübte, zeigte sich ein jedoch nicht signifikanter Effekt der Rhizobienimpfung. Im Durchschnitt war die ungeimpfte Variante später reif als die geimpfte.

11.3.4 Lagerneigung

Lagernde Bestände bedeuten Ernte-Erschwernis. Daher ist dieses Merkmal bei einer Untersuchung nicht zu vernachlässigen. Die Varianzanalyse ergab hochsignifikante Unterschiede bei den Ursachen Ort und Sorte. Ein gewisser Einfluß durch die Impfung kann in der Wechselwirkung Impfung * Ort abgelesen werden. Die Aussaatstärke spielte wiederum keine Rolle. Mittelwerte für die verschiedenen Standorte und Impfungen befinden sich in Tab.7.

Insgesamt zeigte Stamm 1 die geringste und Stamm 5 die stärkste Lagerneigung. Das geringste Lager war am Sandstandort und das stärkste Lager am Lößstandort zu beobachten.

Die rhizobiengespimpfte Variante neigte weniger zum Lager als die ungeimpfte. Möglicherweise hängt dies auch mit dem Kornertrag zusammen. Das Gewicht der Hülsen trägt hauptsächlich zum Lager bei. Der genotypische Einfluß auf das Lager ist jedoch nicht zu vernachlässigen, wie bei Stamm 5 ersichtlich. Dieser Stamm weist bei geringstem Kornertrag gleichzeitig die größte Lagerneigung auf.

11.3.5 Wuchshöhe

Neben dem Kornertrag beeinflusst die Wuchshöhe die Lagerneigung. Tab.8 zeigt die gemessenen Wuchshöhen der Stämme. Ähnlich wie bei der Lagerneigung ergab die Varianzanalyse hochsignifikante Unterschiede bei den Faktoren Ort und Sorte. Eine signifikante Wechselwirkung zwischen Ort und Sorte (Genotyp), sowie Ort und Rhizobiumimpfung ist außerdem aufgetreten.

Wie Tab.8 zeigt, waren die Stämme 5 und 6 die höchsten im Sortiment. Die geringste Wuchshöhe wiesen Stämme 2 und 3 auf. Der Wuchshöhenunterschied zwischen den Stämmen beruhte im wesentlichen auf dem Wachstum der Seitentriebe. Diese sind bei den Stämmen 5 und 6 besonders lang. Der Unterschied der Merkmalsausprägung zwischen Sand und Lehmigem Sand war nicht so groß wie zum Lößstandort. Besonders geringe Unterschiede zeigten die Stämme 2 und 3, die als Kurztypen mit hoher phänotypischer Stabilität anzusehen sind. Das Gegenteil sind die Stämme 5 und 6, die stark mit der Wuchshöhe auf verschiedene Standorte reagieren. Am Lößstandort zeigte sich das ausgeprägteste Längenwachstum. Dort haben nicht nur die späten Niederschläge, sondern auch die bessere Wasserverfügbarkeit und der höhere Nährstoffgehalt das Wachstum der Seitentriebe stärker angeregt. Mit außergewöhnlicher Wuchshöhenzunahme hat der Stamm 1 am Lößstandort reagiert. Die Impfung mit Rhizobien führte im Durchschnitt zu einem geringeren Längenwachstum, das durchgehend bei allen Stämmen auftrat.

11.3.6 Anthraknose

Anthraknose wird von dem Pilz *Colletotrichum gloeosporioides* verursacht. Aufgetreten ist Anthraknose nur an dem lehmigen Sandstandort, der sich in einer Senke befand und an dem dadurch ein pilzfreundliches Mikroklima entstand. Gefördert wurde die Krankheit auch durch die Niederschläge. Da Anthraknose nur an einem Standort aufgetreten ist, zeigt Tab.9 nur Beobachtungswerte vom Standort lehmiger Sand.

Die Varianzanalyse ergab neben den zu erwartenden sortentypischen Effekten auch hochsignifikante Effekte der Aussaatstärke (LSD5% für die Durchschnittswerte 0,65). Der Effekt der Aussaatstärke ist erklärlich, da die Anthraknose nesterweise auftritt und ein dichter

Bestand die Ausbreitung stärker fördert. Jedoch sind diese einortigen Ergebnisse nicht überzubewerten. Außer der Anthraknose konnten keine anderen Krankheiten oder Schadorganismen beobachtet werden.

11.3.7 Protein- und Ölgehalt, Protein- und Ölertrag

Die Varianzanalyse ergab für den Proteingehalt lediglich für die Aussaatstärke signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten. Beim Ölgehalt dagegen zeichneten sich wiederum hochsignifikante Ortseffekte ab, ebenso signifikante Wechselwirkungen zwischen Sorte und Ort.

Tab.10 zeigt die durchschnittlichen Protein- und Ölgehalte der Lupinensamen, sowie den Protein- und Ölertrag. Den höchsten Proteingehalt zeigt der Stamm 3 mit 35,9% und den niedrigsten Proteingehalt der Stamm 5 mit 34,0%. Die Unterschiede zwischen den Stämmen können nach statistischer Auswertung nicht als signifikant bezeichnet werden. Die Proteinträge sind mit der Komponente des Korntrages signifikant unterschiedlich. Hier ist die gleiche Rangfolge wie beim Korntrag festzustellen (Tab.2).

Die Ölgehalte der einzelnen Stämme unterscheiden sich nicht signifikant. Wie beim Proteintrag beeinflusst die Komponente Korntrag den Ölertrag so stark, daß die Ölerträge der einzelnen Stämme sich signifikant unterscheiden. Auch hier ist die Rangfolge dieselbe wie beim Korntrag. Der durchschnittliche Ölgehalt liegt bei 11,1%.

Der Anbaustandort hat auf den Proteingehalt keinen signifikanten Einfluß, während dies beim Ölgehalt der Fall ist. Am Sandstandort waren die höchsten Ölgehalte mit durchschnittlich 11,5% zu verzeichnen, gefolgt vom sandigen Lehm Boden mit 11,0% und dem Lößboden mit 10,7%.

Die Aussaatstärke hat signifikanten Einfluß auf den Proteingehalt. Durchschnittlich ist der Proteingehalt um 0,5% höher bei der Aussaatstärke von 65 Körner/m² (Tab. 11). Die Rhizobienimpfung hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Gehalt an Protein oder Öl, jedoch waren in Wechselwirkung mit Ortseffekten für beide Merkmale hochsignifikante Effekte zu verzeichnen.

Bei diesen Merkmalen ist die geringe genotypische Variabilität des verwendeten Materials bemerkenswert. Der hohe Ortseinfluß beim Ölgehalt kann aber auch den Schluß zulassen, daß die herrschenden Umweltbedingungen für eine optimale genotypische Ausprägung von Öl- und Proteingehalt nicht günstig waren.

Tab.10: Mittelwerte der Protein- und Ölgehalte (%), Protein- und Ölerträge (dt/ha) der verschiedenen Genotypen von *Lupinus albus* über den gesamten Versuch.

	Proteingehalt (%)	Proteintrag (dt/ha)	Ölgehalt (%)	Ölertrag (dt/ha)
Stamm 1	34,8	17,2	11,0	5,4
Stamm 2	35,5	12,3	11,3	3,9
Stamm 3	35,9	12,7	11,3	3,4
Stamm 4	34,7	14,7	11,2	4,7
Stamm 5	34,0	10,3	11,0	3,3
Stamm 6	35,7	23,5	11,1	7,3
Stamm 7	35,7	14,0	10,9	4,3
Stamm 8	35,5	12,8	10,9	3,9
Durchschnitt	35,2	14,7	11,1	4,6
LSD5%	1,3		0,4	

Tab.11: Der Einfluß der Aussaatstärke auf den Proteingehalt (%), sowie der Einfluß des Standorts auf den Ölgehalt(%) in Samen der Weißen Lupine

	Ölgehalt (%)			Proteingehalt (%)	
	Sand	lehm.Sand	Löß	50 Korn/m ²	65 Korn/m ²
Stamm 1	11,2	10,7	11,0	34,49	35,17
Stamm 2	11,7	11,3	10,9	35,19	35,74
Stamm 3	11,6	11,2	11,0	35,21	36,55
Stamm 4	11,8	10,8	11,0	34,84	34,48
Stamm 5	11,4	11,0	10,6	33,60	34,47
Stamm 6	11,4	11,4	10,6	35,31	36,09
Stamm 7	11,2	11,0	10,5	35,54	35,91
Stamm 8	11,4	11,0	10,3	35,64	35,42
Durchschnitt	11,5	11,0	10,7	34,98	35,48

Tab.12: Durchschnittliche Alkaloidgehalte (mg/g) in Samen von Weißen Lupinen in Abhängigkeit von Standort und Aussaatstärke.

Ort Saatmenge	Sand		lehm.Sand		Löß		Mittel
	50	65	50	65	50	65	
Stamm 1	0,471	0,319	0,139	0,395	0,337	0,175	0,306
Stamm 2	0,194	0,156	0,066	0,369	0,338	0,175	0,223
Stamm 3	0,461	0,180	0,226	0,311	1,146*	0,212	0,278
Stamm 4	0,120	1,242*	0,342	0,174	0,371	0,481	0,298
Stamm 5	0,234	0,452	0,121	0,419	1,129*	0,534	0,352
Stamm 6	4,309	4,867	2,449	4,297	4,116	7,529	4,595
Stamm 7	0,984*	3,437	3,029	4,299	3,536	4,118	3,683
Stamm 8	2,950	3,890	2,517	4,245	2,927	4,111	3,440
Mittel	1,248	1,899	1,111	1,814	1,938	2,172	
		1,574		1,463		2,055	

*Diese Werte werden als Ausreißer betrachtet und sind in den Mittelwert nicht mit einbezogen worden.

11.3.8 Alkaloide

In Tab.12 sind die Alkaloidgehalte aufgelistet und gemittelt, welche über Kapillar-GLC am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg gemessen wurden. Den höchsten Alkaloidgehalt hat Stamm 6, den geringsten Stamm 2. Neben sortentypischen Effekten zeigt sich ein bemerkenswerter Einfluß der Umwelt auf den Gesamtalkaloidgehalt. Der Alkaloidgehalt am Löbstandort ist am höchsten. An diesem Ort herrschten die wüchsigsten Bedingungen.

In Tab.13 sind die wichtigsten Alkaloide in % vom Gesamtalkaloidgehalt aus Tab.12 aufgelistet. Auffallend ist, daß es für die einzelnen Alkaloidfraktionen große Variabilität gibt. Generell läßt sich dabei feststellen, daß bei dem verwendeten Sortenmaterial die bitterstoffarmen Formen (Stamm 1 bis 5) einen höheren relativen Anteil an Lupanin (ca. 60%) aufweisen als die bitterstoffreichen Formen, welche einen Anteil von etwa 30% Lupanin zeigen. Absolut gesehen enthalten die bitterstoffreichen Formen jedoch in jedem Falle mehr Lupanin als die bitterstoffarmen Formen.

Tab.13: Anteilige Alkaloide des Gesamtalkaloidgehalts in % der Werte aus Tab.12.

Stamm	Ammodend.	Albin	Angustifol.	Lupanin	N-Me-Albin	Multi-florin	13-OH Lupan.	Sonstige
1	4,0	3,6	3,1	72,1	2,0	11,0	11,0	1,3
2	3,8	1,4	1,2	74,9	2,5	4,0	10,7	1,6
3	2,6	3,8	0,8	69,3	4,1	7,5	10,3	1,7
4	4,6	9,2	1,6	62,1	0,8	4,0	12,7	5,1
5	1,9	4,7	2,2	61,3	3,6	6,4	15,1	4,8
6	2,5	20,6	6,4	25,5	8,9	20,5	10,3	5,3
7	1,6	23,0	6,8	37,2	6,5	7,6	13,5	3,9
8	1,8	24,2	7,4	32,5	6,0	7,1	15,6	5,4

Das hier verwendete Material zeigt die Tendenz, daß mit zunehmendem Gesamtalkaloidgehalt der relative Anteil des Lupanins zurückgeht. Das gilt auch bei der Betrachtung der drei bitteren Stämme 6, 7 und 8. Stamm 6 mit dem höchsten Gesamtalkaloidgehalt zeigt den geringsten Anteil an Lupanin.

Dank: Wir danken der Landesregierung von Sachsen-Anhalt sowie den Saatzeitfirmen Dr. h.c. Hans Hege und Steinach für die Finanzierung des Projektes und die technische Durchführung.

12 Einfluß von Standort und Genotyp auf die Erträge von *L. albus* und *L. mutabilis* in Südchile

Doris Väth

Mittlere Flur 10

D-97877 Wertheim/M

Zusammenfassung

In Abhängigkeit von Standort und Genotyp erreichte *L. albus* Kernerträge von 24 - 47 dt/ha, alkaloidarme *L. mutabilis* - Linien 1 - 32 dt/ha und alkaloidreiche 8 - 35 dt/ha. Die Ergebnisse zeigen, daß *L. albus* gut an die drei geprüften Standorte angepaßt ist, während *L. mutabilis* tiefgründige Böden und ausreichende, gut verteilte Niederschläge für hohe Erträge benötigt. Unter solchen Bedingungen waren ihre Kernerträge mit denen von *L. albus* vergleichbar. Die höchsten Kernerträge wurden von beiden Lupinenarten in Gorbea erzielt, die geringsten in Cañete, wo die Durchwurzelungstiefe besonders von *L. mutabilis* gering war und die Pflanzen unter Wasserstress litten. Unter diesen trockenen Bedingungen waren bittere Genotypen ertragreicher als süsse. Auf Standorten mit ausreichender Wasserversorgung (Cajón und Gorbea) wurden Grünmasseerträge bis zu 12,3 t TS/ha bei *L. albus* und 17,6 t TS/ha bei *L. mutabilis* erreicht. Unter diesen Bedingungen könnten besonders die indetermierten Wuchstypen von *L. mutabilis* die Aufgabe einer leistungsstarken, eiweißreichen Futter - oder Gründüngungspflanze erfüllen. Mit Rohproteingehalten von 36 - 51 % i. d. TS und Rohfettgehalten von 15 - 20 % i. d. TS war die Zusammensetzung der Korninhaltsstoffe bei *L. mutabilis* äußerst günstig, doch kompensierte *L. albus* geringere Gehalte (31 - 42 % Protein, 11 - 15% Fett) mit höheren Kernerträgen und erzielte somit gleiche oder sogar höhere Protein - und Fetterträge pro Flächeneinheit als *L. mutabilis*.

Summary

Grain yields depending on site and genotype ranged from 24 - 47 dt/ha for *L. albus*, 1 - 32 dt/ha for low - alkaloid and 8 - 35 dt/ha for high - alkaloid lines of *L. mutabilis*. Results indicated that *L. albus* is well adapted to all three sites, whereas *L. mutabilis* requires deep soils and sufficient, well distributed precipitations for high yields. Under such circumstances grain yields were comparable to those of *L. albus*. Both Lupin species produced highest seed yields in Gorbea, the poorest yields were obtained in Cañete, where a deep penetration

especially of the roots of *L. mutabilis* was impeded and the plants suffered from water stress. Under those dry conditions sweet lupins yielded lower than bitter ones. Green matter yields of 12,3 t DM/ha were achieved by *L. albus* in Cajón and 17,6 t DM/ha by *L. mutabilis* in Gorbea. Under ideal moisture conditions especially genotypes of *L. mutabilis* with indeterminate growth habitus might serve as an efficient, protein - rich forage or green manure crop. *L. mutabilis* had high protein and oil contents of 36 - 51 % and 15 - 20 %, respectively, but *L. albus* compensated lower contents (31 - 42 % protein, 11 - 15 % oil) with higher seed yields and thus achieved equal or even higher protein - and oil - yields per area than *L. mutabilis*.

Key words: *L. albus*, *L. mutabilis*, Kornträge, Grünmasseerträge, Protein, Fett

12.1 Einleitung

Die meistangebaute Lupinenart in Südchile ist *L. albus*. In den letzten Jahren ist allerdings ein starkes Interesse an *L. mutabilis* erwacht, die aufgrund ihres hohen Protein - und Ölgehaltes im Samen vom ernährungsphysiologischen Standpunkt besonders bedeutsam ist. Aufgrund ihrer schnellen Jugendentwicklung könnte diese Art außerdem gut für die Grünmasseproduktion geeignet sein und als Gründüngungs- oder Grünfütterpflanze für die viehstarken Betriebe des Südens, besonders in den trockenen Sommermonaten, lokale Bedeutung erlangen. In dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen *L. mutabilis* eine Alternative zur Weißlupine darstellt, da Ergebnisse aus vergleichendem Anbau beider Arten noch nicht vorlagen. Bei *L. mutabilis* wurden außerdem Sorten mit unterschiedlichen Alkaloidgehalten gewählt, um zu klären, ob nicht wertvolle Eigenschaften, die für die Pflanze von Bedeutung sind, mit dem Merkmal "Alkaloidreichtum" weggezüchtet wurden, da nach Ergebnissen aus Europa alkaloidarme im allgemeinen geringere Erträge als die von Natur aus alkaloidreichen Formen erzielten (TROLL 1956, GÄDE 1962).

12.2 Material & Methoden

Die Feldversuche wurden in den Aussaatjahren 1989/90, 1990/91 und 1991/92 an drei Standorten als Frühjahrssaat (Aussaat: Mitte August) durchgeführt. Die Charakteristika der drei Standorte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften. Kreuzungen und Eigenschaften des Kornmaterials sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 1: Geographische Lage der Standorte und Klimadaten aus langjährigem Mittel

	Cañete	Cajón	Gorbea
Breite	37° 71 S	38° 40 S	39° 06 S
Länge	73° 25 W	72° 28 W	72° 40 W
Höhe ü. NN [m]	70	150	92
mittl. Jahrestemperatur	13,1 °C	10,0 °C	12,5 °C
Temperaturmaximum	25,1 °C	21,5 °C	27,1 °C
Temperaturminimum	4,5 °C	2,3 °C	3,3 °C
Temperatursumme (5 °C)	2900 °C	1824 °C	2737 °C
Temperatursumme (10 °C)	1180 °C	479 °C	1094 °C
Ø jährl. Niederschläge	1330 mm	1394 mm	2139 mm
Evapotranspiration (Jahressumme)	941 mm	921 mm	1065 mm

Tabelle 2: Beschreibung der Böden

I. Bodenart und Gründigkeit						
Bodenart	Cañete		Cajón		Gorbea	
	L u		U l s		U l s	
Gründigkeit [cm]	40		> 180		120	
II. Ergebnisse der chemischen Bodenanalyse [mg / 100 g Boden]						
Bodenschicht [cm]	Cañete		Cajón		Gorbea	
	0-30	30-50	0-30	30-50	0-30	30-50
pH (H ₂ O)	5,42	5,56	5,72	6,06	5,57	5,42
C [%]	4,93	3,13	6,58	4,82	6,63	5,14
N [%]	0,18	0,13	0,36	0,28	0,34	0,23
P	11,03	0,38	4,63	3,19	0,92	0,29
C : N	27,40	24,08	18,28	17,21	19,50	22,35

Tabelle 3: Kreuzungen und Eigenschaften des in den Versuchen verwendeten Kornmaterials

Art	Sorte/Linie	Kreuzung/Herkunft	Alkaloide [%]	Eigenschaften	TKG
<i>L. albus</i>	Prima	Multolupa x (Kievsky Mutant x SK Kali)	0,023	frühreif, süß	410 g
<i>L. albus</i>	Amiga	Astra x UB 601	0,022	sehr frühreif, süß	345 g
<i>L. mutabilis</i>	SCG 9	Selektion Cusco, Peru	3,200	bitter, dunkelkörnig	210 g
<i>L. mutabilis</i>	Inti	Selektion aus Ökotypen	0,007	sehr spätreif, süß	165 g
<i>L. mutabilis</i>	L-5	Inti x SCG 9	0,009	spätreif, weißkörnig, süße Auslese	185 g
<i>L. mutabilis</i>	L-6	Inti x SCG 9	0,078	spätreif, dunkelkörnig halbsüße Auslese	185 g
<i>L. mutabilis</i>	L-7	(Inti x SCG 9) x Potosi	0,007	frühreif, süß	225 g
<i>L. mutabilis</i>	Coya	(Inti x SCG 9) x Potosi	3,680	frühreif, bitter	235 g

Die Feldversuche wurden als randomisierte Blockanlagen mit 4 Wiederholungen angelegt. Jede Parzelle hatte eine Größe von 5 m x 1,5 m, wobei eine Parzelle aus drei Reihen mit einem Abstand von jeweils 50 cm bestand. Die Bestandesdichte betrug 20 Pflanzen pro m². Die Bodenvorbereitung erfolgte an allen drei Standorten mit Scheibenege, Tiefengrubber und anschließendem Eggenstrich. Grunddüngung und N - Startdüngung unterblieben. Das Saatgut wurde mit dem Fungizid Vitavax Flo (Wirkstoffe: Carboxin, Thiram; BASF) und dem Insektizid Furadan 4 F (Wirkstoff: Carbofuran; Bayer) gebeizt und mit Rhizobien (*Rhizobium lupinii*; Dipex) beimpft. Zur Unkrautbekämpfung wurden 2 l Simazin/ha (Wirkstoff Atrazin) im Voraufbauverfahren verwendet und eine einmalige Handhacke durchgeführt. Auf weitere chemische Maßnahmen zur Unkrautbekämpfung und zum Pflanzenschutz wurde in allen Versuchen verzichtet.

Die Ernte der Grünmasse erfolgte bei Blühende. Geerntet wurden jeweils 1,5 m² aus zwei Wiederholungen. Die Körnerernte, die normalerweise Ende Februar stattfindet, zog sich 1989/90 und 1991/92 wegen der extremen Spätreife einiger Genotypen bis Ende März hin. Zur Bestimmung des Kornertrages wurde die mittlere Reihe jeder Parzelle geerntet. Die Kornerträge wurden auf 10 % TS bezogen. Für die Analysen der Korninhaltsstoffe wurde ein repräsentatives Durchschnittsmuster aus den vier Wiederholungen einer Variante gezogen.

Trockensubstanzbestimmung: Sofort nach der Ernte der grünen Lupinen wurden 2 kg Frischmasse im Trockenschrank unter Umluft 48 Stunden lang bei 65 °C getrocknet.

Von jeder Kornprobe wurden drei mal 10 g unzerkleinerte Lupinenkörner eingewogen und bei 105 °C drei Stunden lang getrocknet. Über die Gewichtsdiﬀerenz wurde der Wassergehalt bestimmt.

Rohfettbestimmung: Die Bestimmung des Fettgehaltes wurde an ganzen, getrockneten Samen nach der Methode der kernmagnetischer Resonanz (NMR) mit einem Newport Analyzer MK II (Oxford Instruments, UK) durchgeführt (MADSEN 1976).

Rohproteinbestimmung: Der Stickstoffgehalt im getrockneten Lupinenmehl wurde nach der Kjeldahl - Methode mit dem Gerät Vadopest 5 der Fa. Gerhardt bestimmt. Proben mit einem Alkaloidgehalt von mehr als 0,3 % wurden durch Abzug des Alkaloidstickstoffes folgendermaßen korrigiert (BAER 1991):

$$\% \text{XP} = (\% \text{N Kjeldahl}) - (\% \text{Alkaloide} \times 0,1129) \times 6,25$$

12.3 Ergebnisse & Diskussion

12.3.1 Kornerträge

In Abb. 1 sind die Kornerträge von *L. albus* und *L. mutabilis* im Jahr 1989/90 an den drei Standorten gegenübergestellt. An allen Versuchsorten erreichte *L. albus* mit der Sorte Prima die höchsten Erträge, mit einem Maximum von 40,6 dt/ha in Gorbea. Die frühreife Amiga erzielte den höchsten Ertrag mit 28,5 dt/ha in Cajón. Die bitteren *L. mutabilis* SCG9 und Coya hatten in Cañete und Gorbea bzw. in Cajón und Gorbea höhere Kornerträge als Amiga (*L. albus*). SCG9 wurde nur in Cajón von der ebenfalls bitteren Linie Coya um 9,6 dt/ha übertroffen, während sie den höchsten Ertrag in Gorbea mit 35,2 dt/ha erzielte. Die mit Abstand geringsten Erträge an allen drei Standorten wies die süße *L. mutabilis* Inti auf (7 - 9 dt/ha). Die ebenfalls alkaloidarme Kreuzung Inti x SCG9 (L - 5) nahm eine Mittelstellung zwischen ihren Eltern ein. Sie erreichte in Gorbea mit 23,6 dt/ha annähernd das Ertragsniveau der bitteren Linie Coya, hatte aber einen um 11,6 dt/ha geringeren Ertrag als SCG9.

Im Anbaujahr 1990/91 wurden die höchsten Kornerträge auf dem Standort Gorbea erzielt (Abb. 2). Bei allen Versuchsgliedern ließ sich die gleiche Rangfolge der Standorte (Gorbea - Cajón - Cañete) nachvollziehen, allerdings mit mehr oder weniger starken

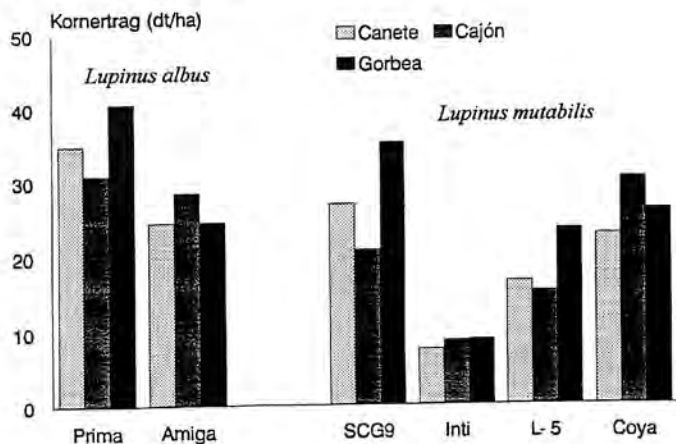


Abb. 1: Kornträge [dt/ha] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* an drei Standorten im Versuchsjahr 1989/90

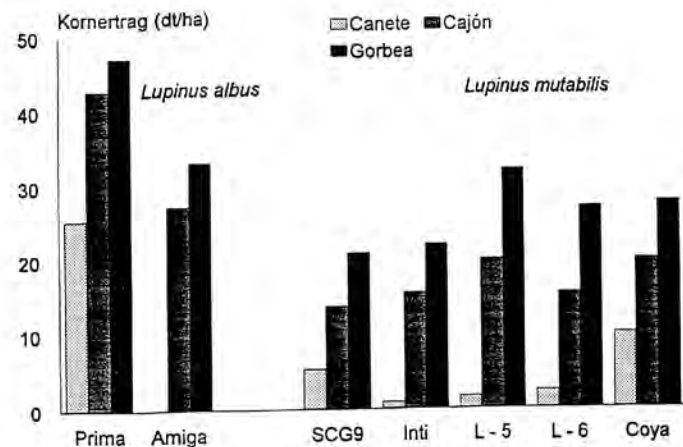


Abb. 2: Kornträge [dt/ha] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* an drei Standorten im Versuchsjahr 1990/91

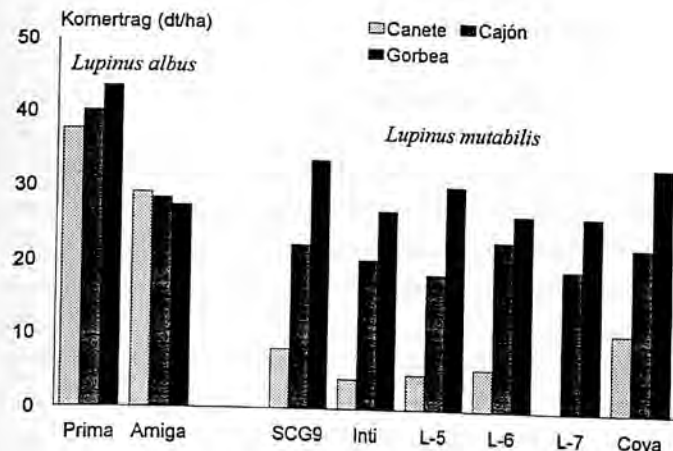


Abb. 3: Kornträge [dt/ha] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* an drei Standorten im Versuchsjahr 1991/92

Ertragsschwankungen der einzelnen Herkünfte. Die Weißlupinen erreichten das beste Ergebnis. Dabei schnitt Prima mit 47,1 dt/ha in Gorbea besonders gut ab und stand auch an den anderen zwei Versuchsorten an erster Stelle, gefolgt von Amiga, die durch einen Fehler bei der Saatgutbeizung, in Cañete nicht ausgewertet werden konnte. Sie wies in Cajón einen um 15,5 dt/ha und in Gorbea einen um 13,9 dt/ha geringeren Ertrag als Prima auf.

Im Gegensatz zum Vorjahr zeigte sich bei den süßen und bitteren *L. mutabilis* an allen drei Standorten die gleiche Tendenz. Die süße, spätreife Inti konnte in Cajón und Gorbea sogar geringfügig höhere Erträge aufweisen als die bittere SCG9, die im Jahr zuvor als beste *L. mutabilis* in Cañete und Gorbea abschnitt. Inti erreichte jedoch an keinem der geprüften Standorte die Kornträge der bitteren, frühreifen Coya. In Cajón und Gorbea betragen die Kornträge der süßen Auslese L - 5 19,8 und 31,9 dt/ha und übertrafen somit die Erträge ihrer Elternlinien Inti und SCG9 an diesen Standorten. In Gorbea wies L - 5 4,4 dt/ha mehr als Coya auf, während in Cajón kein Unterschied zwischen beiden Linien bestand. Ihre halbsüße Schwesterlinie L - 6 konnte in Gorbea ein um 10,4 dt/ha bzw. um 5,1 dt/ha besseres Ergebnis als Inti und SCG9 erzielen. Auf dem trockenen Standort Cañete waren die alkaloidärmeren Genotypen weit unterlegen, was auf schwere Schäden durch Insektenfraß (*Epicauta pilme*) zurückzuführen war.

1991/92 wurden die höchsten Erträge bei allen Genotypen, ausgenommen Amiga, wieder auf dem Standort Gorbea erzielt, gefolgt von Cajón und Cañete, wo die Weißlupinen auch in diesem Jahr die höchsten Kornträge erreichten (Abb. 3). Prima war mit 43,4 dt/ha in Gorbea, 40,0 dt/ha in Cajón und 37,6 dt/ha in Cañete beste Sorte. In Gorbea konnten alle *L. mutabilis*-Genotypen mit Amiga konkurrieren; SCG9, L - 5 und Coya erzielten sogar höhere Erträge. Die Ertragsdifferenzen von SCG9 und Coya gegenüber den spätreiferen Herkünften der Andenlupine erwiesen sich in Gorbea als hochsignifikant. Die Unterschiede waren bei *L. mutabilis* zwischen den Standorten sehr viel stärker ausgeprägt, während der umweltbedingte Einfluß bei *L. albus* nicht so ausgeprägt war. So lag der durchschnittliche Ertragsunterschied bei den *mutabilis*-Herkünften zwischen Cañete und Cajón bei 14,4 dt/ha und zwischen Cajón und Gorbea bei 8,5 dt/ha, während diese Differenzen nur 0,9 dt/ha und 1,2 dt/ha bei *L. albus* betragen.

L. albus ist an die unterschiedlichen Boden- und Klimaverhältnisse der drei Versuchsorte am besten angepaßt und aufgrund der wesentlich geringeren Schwankungsbreiten als ertragssicherer einzustufen. Variationen im Korntragsniveau waren bei dieser Art zum größten Teil genetisch bedingt ($p < 0,001$) während der Standort nur schwach signifikante Bedeutung ($p < 0,05$) hatte. Die frühreifere Sorte Amiga brachte auch den geringsten Ertrag hervor und es bestätigte sich die Faustregel, daß das Ertragspotential i.d.R. mit der Vegetationsdauer zunimmt (HARTMANN 1992), da bei den frühreifen Typen generell weniger Verzweigungen und hülsentragende Nebentriebe gebildet werden. Also nimmt auch die Hülsenzahl pro Pflanze ab, was die bedeutendste Ertragskomponente ist (KURZ 1988, ROMER 1990). So wies Prima grundsätzlich mehr Hülsen an den Haupt- und Seitentrieben auf als Amiga und hatte deshalb das größere Potential, den Ertrag zu maximieren.

Die Ertragsunterschiede zwischen den einzelnen Linien der Andenlupine waren im Gegensatz zur Weißen Lupine in gleichem Maße von Genotyp, Standort und Jahr ($p < 0,001$) abhängig. Die frühreifen, bitteren Genotypen SCG9 und Coya waren bezüglich ihres Ertragsniveaus bedeutend stabiler als die spätreifen, alkaloidarmen Linien Inti, L - 5 und L-6. Verschiedene Autoren stellten erhebliche Ertragsunterschiede zwischen alkaloidreichen und -armen Genotypen fest (HACKBARTH & TROLL 1959, KURZ 1988), jedoch brachten die alkaloidarmen Genotypen im Versuchsjahr 1990/91 vergleichbare oder höhere Erträge. Hier sind v.a. die Linien L - 5 und L - 6 zu nennen, die aus Kreuzungen der süßen, kleinkörnigen Inti und der bitteren, grobkörnigen SCG9 hervorgegangen sind. Die Vererbung der Korngröße erfolgt intermediär und Leistungssteigerungen sind teilweise auf die Erhöhung des

Samengewichtes zurückzuführen, das zwischen denen der Eltern liegt und sich signifikant von ihnen unterscheidet.

Auffallend ist, daß in Jahren mit durchschnittlich höherem Ertragsniveau die Unterschiede zwischen Bitter- und Süßlupinen kaum vorhanden waren, während die Unterschiede unter "ungünstigeren" Bedingungen, wie sie beispielsweise auf dem trockeneren Standort Cañete gegeben waren, deutlicher hervortraten. Man kann davon ausgehen, daß Süßlupinen grundsätzlich höhere Ansprüche an die Wasserversorgung stellen. Nach BRUMMUND (1992) ist der Leistungsnachteil in trockenen Jahren besonders deutlich und GÄDE (1962) stellte fest, daß bittere Gelbe Lupinen den süßen auf flachgründigen Böden überlegen waren. Dies sei eine Folge der einseitigen Züchtung und Prüfung alkaloidarmer Formen auf günstigen Standorten, was zu besonders anspruchsvollen Sorten führte. Daß Süßlupinen unter trockenen Standortbedingungen in ihrer Ertragsleistung hinter den Bitterlupinen zurückbleiben, könnte die Folge eingeschränkter Vitalität infolge der Alkaloidarmut bzw. der Anreicherung rezessiver Gene sein (NOWACKI & KAZIMERSKY 1971).

L. mutabilis ist an die trockenen Verhältnisse in Cañete schlecht angepaßt, und Kornträge über 20 dt/ha konnten dort nur 1989/90 erzielt werden, als noch ausreichende Niederschläge während der gesamten Blüte fielen. Nach GROSS (1983) benötigt die Andenlupine in ihrer Herkunftsregion je nach Frühreife 350 - 700 mm Regen; allerdings liegen dort die durchschnittlichen Kornträge nur bei 12 dt/ha. 1990/91 war es in Cañete sehr trocken; während der gesamten Vegetation fielen nur 275 mm Regen. Die Trockenheit setzte schon im November ein und dauerte bis zum Vegetationsende an. In der Literatur wird immer wieder auf die besondere Trockenverträglichkeit von Lupinen hingewiesen, da die Wasseraufnahme durch ein normalerweise tiefgehendes Wurzelsystem gewährleistet wird (HAMBLIN & TERNANT 1987). Im Gegensatz zu den speicherfähigen, tiefgründigen Trumaos in Cajón und Gorbea ist der Boden in Cañete jedoch aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften nicht in der Lage die Wasserversorgung bei trockener Witterung sicherzustellen und der Vorteil des effizienten, tiefgehenden Wurzelsystems, wie es besonders der Andenlupine eigen ist, wurde auf diesem flachgründigen Boden bedeutungslos. In Abb. 4 sind die Durchwurzelungstiefen der einzelnen Herkünfte an den drei Standorten dargestellt. In Cañete wurden stets die kürzesten Wurzeln gemessen. 1989/90 (Abb. 4 a) unterschied sich die Wurzeltiefe beider Lupinenarten an diesem Standort nur wenig; in den zwei folgenden Jahren (Abb. 4 b,c) dagegen hatten die Genotypen der Weißen Lupine mit 30 - 35 cm tiefer reichende Wurzeln als die Andenlupinen mit nur 15 - 20 cm. Die längsten Wurzeln wurden von fast allen Genotypen in Gorbea gebildet. Die Weiße Lupine Prima wies hier 40 - 50 cm und die

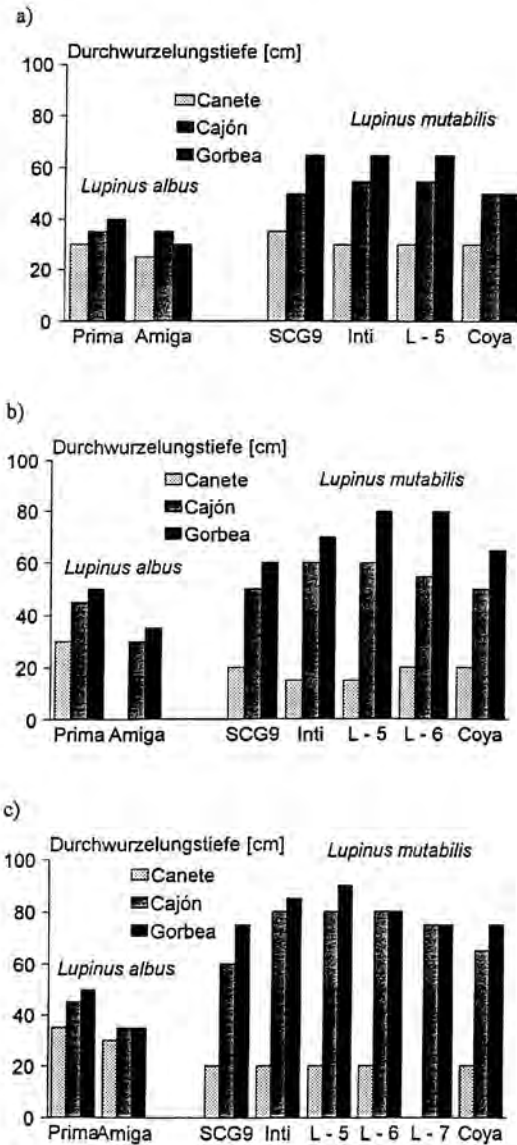


Abb. 4: Durchwurzelungstiefe verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* an drei Standorten a) 1989/90 b) 1990/91 c) 1991/92

Andenlupine L - 5 bis zu 90 cm Wurzeltiefe auf. Die hochwüchsigen Genotypen Inti, L - 5 und L - 6 (*L. mutabilis*) hatten in Cajón und Gorbea ausnahmslos die längsten Wurzeln, was auf eine positive Korrelation zwischen Pflanzenhöhe und Wurzellänge deutet. Es besteht außerdem eine enge Beziehung zwischen dem Verhältnis Durchwurzelungstiefe/Pflanzenhöhe und Kornertrag bei *L. mutabilis* ($r = 0,78$).

Die Vegetationsdauer, insbesondere die Blühphase, war 1990/91 und 1991/92 aufgrund der Trockenheit verkürzt (ohne Abb.) und bei allen Genotypen wurden bedeutend weniger Nebentriebe und Hülsen entwickelt. Auch die Länge der Blühdauer steht nach den vorliegenden Ergebnissen in positiver Beziehung zum Kornertrag ($r = 0,4$ bei *L. albus* und $r = 0,6$ bei *L. mutabilis*). WITHERS (1973) und PORTER (1982) stellten eine verkürzte Blühphase durch Wasserstress fest, was wiederum die Ausbildung der Ertragskomponenten und damit den Kornertrag negativ beeinflusste.

Das Ertragsniveau der Andenlupine ist nach den vorliegenden Ergebnissen von ihrer Frühreife und ihrem Wuchstyp abhängig. Die Überlegenheit im Kornertrag der frühreifen SCG9 und Coya gegenüber den spätreiferen Linien zeigte sich besonders unter sehr feuchten Bedingungen mit relativ hohen Niederschlägen, die bis in die Entwicklungsabschnitte Blüte, Kornfüllung und -reife (Dezember bis März) hineinreichten. Unter diesen Voraussetzungen verzweigten sich Inti, L - 5 und L - 6 wesentlich stärker und wuchsen höher. Dies traf im Versuchsjahr 1989/90 für alle Standorte und 1991/92 für Cajón und Gorbea zu. Obwohl GROSS (1983) bei der Andenlupine im allgemeinen eine negative Korrelation zwischen Frühreife und Kornertrag feststellte, zeigte sich unter diesen Bedingungen die erfolgreiche Kombination dieser zwei Merkmale. Das ist bei der Andenlupine besonders wichtig, da die Hauptprobleme für die Nutzung auf Standorten mit ausreichenden Niederschlägen, wie es ja für angemessene Erträge wünschenswert ist, ihre Spätreife und indeterminiertes Wachstum sind. Ausgeprägtes vegetatives Wachstum nach dem Aufblühen des dritten Blühkranzes bis in die Reifephase könnten die geringeren Erträge von Inti, L - 5 und L - 6 gegenüber den Kurzformen SCG9 und Coya, wie sie 1989/90 und 1991/92 beobachtet wurden, erklären. Sie bildeten unter den gegebenen Klimabedingungen eine enorme vegetative Masse und "verschwendeten" somit Wasser und einen Teil der assimilierten Energie, die sie besser zur Kornmasseproduktion verwendet hätten, an die Produktion von Grünmasse. RAHMAN & GLADSTONES (1974) begründeten dies mit der Konkurrenz zwischen noch wachsenden Nebentrieben und Blüten einerseits und den Ertragskomponenten andererseits um Assimilate. 1990/91 hingegen erreichten die indeterminierten Wuchstypen in Cajón und Gorbea vergleichbare oder höhere Kornertragsleistungen. Es handelte sich zwar ebenfalls um ein

relativ niederschlagsreiches Jahr, doch unterschied sich die Verteilung ganz erheblich von den zwei anderen. Es regnete gleichmäßig während der gesamten Vegetation und die Niederschläge nahmen keine außergewöhnlich hohen Werte an. Dagegen fielen 1989/90 auf allen Standorten starke Regenfälle bis in die Entwicklungsabschnitte der Kornfüllung und Reife (Dezember - März). Das war ebenso der Fall 1991/92 in Cajón und Gorbea, als es noch im Februar und März stark regnete und trotz des trockenen Januars das Wassernachlieferungsvermögen aufgrund starker Regenfälle im Dezember höher war. Das kommt auch in der wesentlich längeren Vegetationsdauer aller Genotypen 1989/90 und 1991/92 auf diesen Standorten zum Ausdruck (ohne Abb.).

12.3.2 Grünmasseerträge

Die 1991/92 an den drei Standorten durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung des Grünmasseertrages (Abb. 5) ergaben die besten Trockensubstanzerträge bei *L. mutabilis* auf dem Standort Gorbea mit bis zu 17,6 t TS/ha. *L. albus* erzielte die beste Leistung in Cajón mit 12,3 t TS/ha. Die statistische Auswertung der Daten aller drei Standorte ergab für beide Lupinenarten einen hoch signifikanten Einfluß des Standortes auf den Grünmasseertrag. Zwischen den Herkunftslinien der Andenlupine bestanden hochsignifikante, denen der Weißen Lupine schwach signifikante Unterschiede.

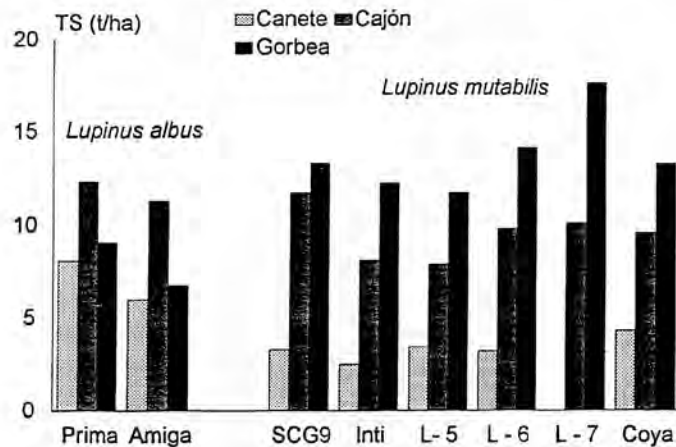


Abb.5. Grünmasse-Erträge (t/ha) bei verschiedenen Genotypen von *Lupinus albus* und *L. mutabilis* an drei Standorten 1991/1992; Schnitt Ende der Blüte

Die vegetative Entwicklung ist in Übereinstimmung mit WILLIAMS (1979) besonders gut auf solchen Standorten ausgeprägt, die sich durch eine gute Wasserversorgung und nährstoffreiche Böden auszeichnen. Wasserstress bewirkt nach WITHERS (1979) ein begrenztes Wachstum von Stengeln und Blättern, was sich in verminderten Grünmasseleistungen niederschlägt. In Gorbea bewirkten höhere Temperaturen in Kombination mit guter Wasserverfügbarkeit hohe Grünmasseerträge bei der Andenlupine, da sie ein stärkeres Potential zur Nebentriebsbildung und zum Höhenwachstum als *L. albus* besitzt. Nach RICHTER (1971) sind Sorten mit einer langen vegetativen Wachstumsperiode zur Grünmasseproduktion besser geeignet. Die geringeren Erträge in Cajón erklären sich aus der schlechteren Wasserversorgung auf diesem Standort und der daraus folgenden verkürzten Vegetation. *L. mutabilis* reagierte stärker auf diesen Trockenstress als *L. albus*, wuchs niedriger und verzweigte sich kaum.

Tabelle 4 zeigt die Alkaloidgehalte in den grünen Pflanzenteilen von Prima (*L. albus*) und Inti (*L. mutabilis*). Beide reichern in der Grünmasse weniger als 0,05 % Gesamtalkaloide an und sind als Futtermittel geeignet. Besonders die alkaloidarmen Linien der Andenlupine können auf entsprechenden Standorten die Aufgabe einer leistungsstarken Futterpflanze mit hohem Eiweißgehalt erfüllen. Ihre im Vergleich zur Weißen Lupine kleinere Samen verursachen außerdem geringere Aussaatkosten.

Tabelle 4: Gesamtalkaloidgehalt [% TS] in den Blättern von *L. albus* (Prima) und *L. mutabilis* (Inti) in Abhängigkeit vom Standort im Versuchsjahr 1991/92 (Schnittzeitpunkt: Ende der Blüte)

Species	Cajón		Gorbea	
	<i>L. albus</i>	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. mutabilis</i>
Genotyp	Prima	Inti	Prima	Inti
Alkaloide [%]	0,01	< 0,01	0,03	< 0,01

12.3.3 Korninhaltsstoffe

Rohproteingehalt

Die höchsten Rohproteingehalte bis zu 51,4 % wurden von den alkaloidarmen *mutabilis* - Linien Inti, L - 5 und L - 6 erreicht (Abb. 6). Die Andenlupine mit der geringsten

Proteinanreicherung im Korn war Coya; sie unterschied sich nur wenig von Prima und Amiga (*L. albus*), die 31,3 % - 41,5 % Rohprotein synthetisierten.

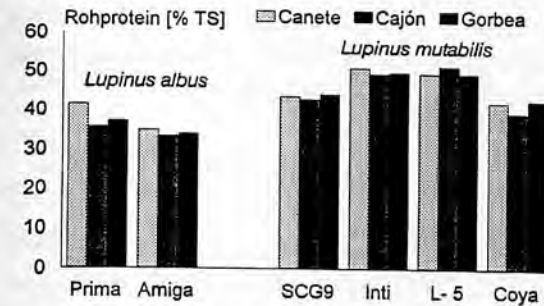
1989/90 (Abb. 6 a) ließen sich auf dieses Merkmal kaum Standorteinflüsse nachweisen. Lediglich die Sorte Prima (*L. albus*) zeigte eine stärkere Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen. Sie wies in Cañete 41,5 % und in Cajón nur 35,6 % Rohprotein im Korn auf. Dagegen wurden in den folgenden zwei Jahren ausgeprägtere Schwankungen zwischen den Standorten festgestellt.

In Cañete enthielten Prima und Amiga 1990/91 nur etwas mehr als 30 % Rohprotein und auch die *mutabilis*-Herkünfte wiesen geringere Gehalte als in Cajón und Gorbea auf (Abb. 6 b). Sie beliefen sich bei den bitteren Herkünften (SCG9, Coya) auf durchschnittlich 36,5 % und bei den süßen auf 43 %, während die entsprechenden Linien in Cajón und Gorbea um ca. 5 % höhere Werte aufwiesen.

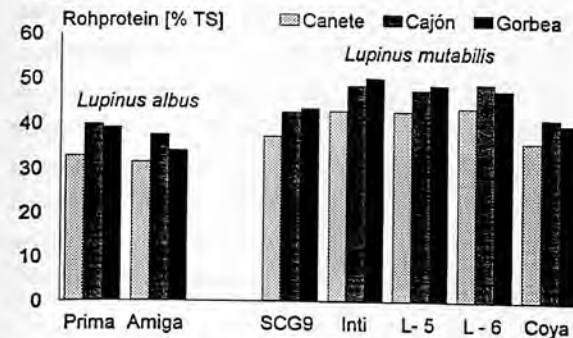
1991/92 (Abb. 6 c) zeigte sich ein ähnliches Bild, allerdings waren die Variationsbreiten geringer. Wie im Vorjahr war Cañete der Standort mit der geringsten Proteineinlagerung in den Samen. In Gorbea wurden die höchsten Gehalte festgestellt. Sie betragen bei Prima (*L. albus*) 38,3 % und bei Inti (*L. mutabilis*) 48,1 %.

Die 1990/91 und 1991/92 aufgetretenen geringeren Proteingehalte in Cañete lassen sich ebenfalls auf den ungünstigen Witterungsverlauf zurückführen. Neben der allgemeinen schlechteren Entwicklung der Pflanzen, die durch Trockenheit und Insektenschäden bedingt war, wurde eine schlechte Nodulation bei allen Herkünften beobachtet. GATAULINA (1990) fand, daß mangelnde Bodenfeuchte (ebenso wie K- und P-Mangel) im Vorblüten- bis Nachblütenstadium das Gewicht der Knöllchen stark vermindert und sich negativ auf den Kornertrag und Proteingehalt auswirkt. Auch die für den Bodentyp in Cañete angegebene schlechte Durchlüftung dürfte nach HARTMANN (1992) den Proteingehalt negativ beeinflusst haben. In einer Untersuchung von WITHERS (1979) wurde der Stickstoffgehalt im Samen durch Trockenstress während der Blüte verringert. Für die Anreicherung hoher Eiweißmengen in den Samen ist die Stickstoffbereitstellung aus dem Boden und aus der Symbiose mit Rhizobien nicht ausreichend; die Pflanze ist auf die Umlagerung von Reservestoffen hauptsächlich aus den Blättern angewiesen (WITHERS & FORDE 1979). Durch den beachtlichen Rückgang des vegetativen Wachstums infolge Trockenstress mit daraus resultierenden geringeren Reserven in der Pflanze wurde also auch die Höhe der Stickstoffeinlagerung und damit die Qualität des Lupinenkorns beeinträchtigt.

a) 1989/90



b) 1990/91



c) 1991/92

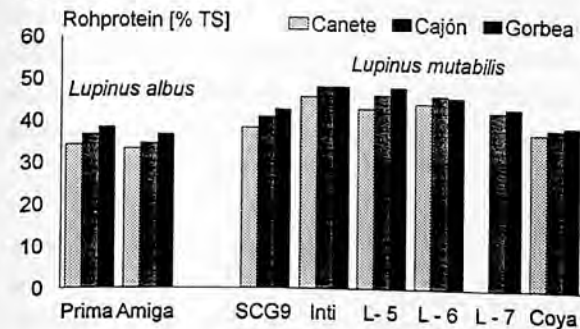


Abb. 6: Rohproteingehalt [% TS] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* in Abhängigkeit vom Standort in drei Anbaujahren

Die höheren Proteingehalte in den alkaloidarmen und die geringeren in den alkaloidreichen Herkünften der Andenlupine lassen auf eine negative Korrelation zwischen Protein- und Alkaloidgehalt schließen, es fehlen jedoch Hinweise aus der Literatur, die dies bestätigen könnten. Dies müßte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Rohfettgehalt

Im allgemeinen wurden die höchsten Fettgehalte im Korn mit durchschnittlich 17,8 % (Variationsbreite: 16,0 % - 19,8 %) bei den bitteren, frühreifen Genotypen der Andenlupine, SCG9 und Coya, festgestellt. (Abb. 7). Es folgten die alkaloidarmen, spätreifen Genotypen mit Gehalten von 14,8 - 19 %, danach die Weißlupinen mit 11,3 - 14,4 % Rohfett. Vergleicht man die Resultate an den einzelnen Standorten, so zeichnet sich eine klare Einflußnahme der Umwelt auf die Fettsynthese im Lupinensamen ab, die in allen drei Versuchsjahren bei *L. mutabilis* hoch signifikant war. Der Fettgehalt aller untersuchten Genotypen war im niederschlagsarmen, wärmeren Cañete höher. Unterschiede bezüglich der Frühreife der Sorten und Linien wurden hier, wo eine sichere, vollständige Abreife aller Genotypen gewährleistet war, unbedeutend. Demzufolge waren die Ölgehalte der spätreifen Linien auf diesem Standort durchaus mit denen der frühreifen vergleichbar. Der Ölgehalt ist also vom Ausreifegrad abhängig, was sich auch in der negativen Beziehung zwischen Ölgehalt und Kornfeuchte ($r = -0,44$) äußert.

Verschiedene Autoren wiesen auf die Bedeutung ausreichender Niederschläge während der Hauptwachstumsphase und trockener, warmer Witterungsverhältnisse während der Kornreife auf die Ölbildung hin (HACKBARTH & TROLL 1959, GROSS 1983). Ebenso fördernd für die Öleinlagerung waren die Temperaturunterschiede zwischen Tag und Nacht auf den geprüften Standorten. Dadurch wird das Verhältnis zwischen der Reservestoffbildung durch Assimilation und Reservestoffabbau durch Veratmung verbessert und somit die positive Stoffbilanz vergrößert (WILLIAMS & MCGIBBON 1980a,b; GROSS 1983).

Zwischen den beiden Inhaltsstoffen Öl und Protein besteht eine negative Korrelation. Sie beträgt bei *L. albus* $r = -0,41$ und bei *L. mutabilis* $r = -0,45$. Im Falle von *L. albus* liegt aufgrund der geringen Anzahl von Wertepaaren keine Signifikanz vor, während die Abhängigkeit beider Merkmale bei der Andenlupine signifikant ist.

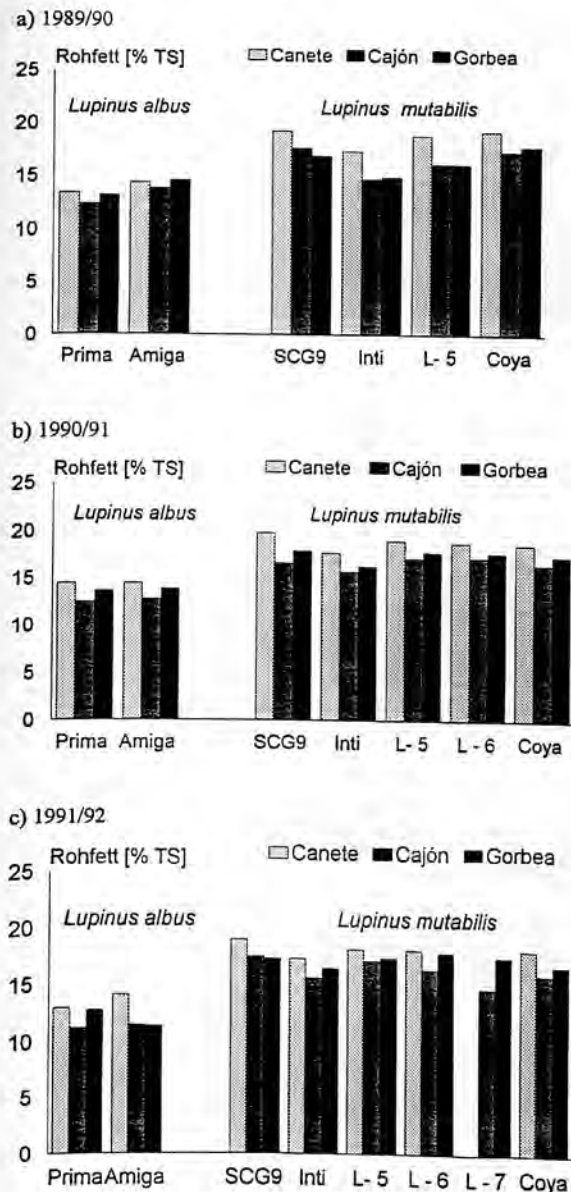


Abb. 7: Rohfettgehalt [% TS] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* in Abhängigkeit vom Standort in drei Anbaujahren

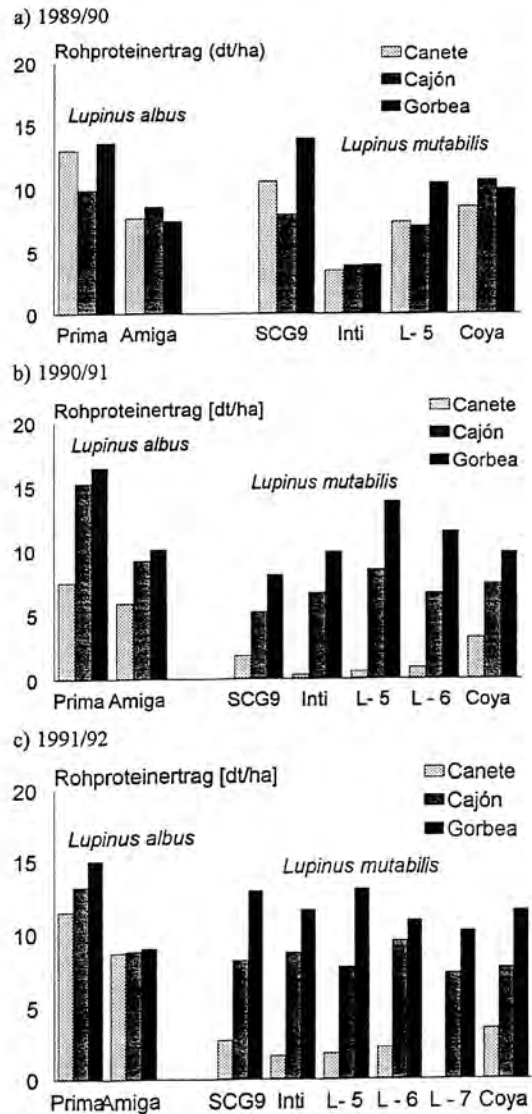


Abb. 8: Rohproteintrag [dt/ha] verschiedener Genotypen von *L. albus* und *L. mutabilis* in Abhängigkeit vom Standort in drei Anbaujahren

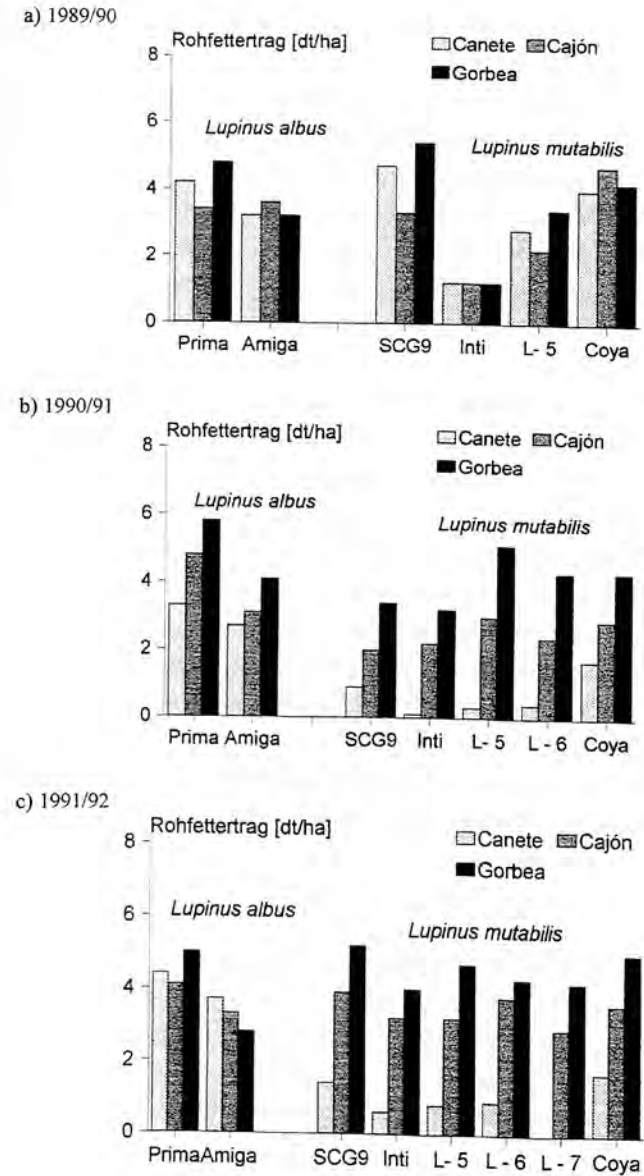


Abb. 9: Rohfettertrag [dt/ha] verschiedener Genotypen von *Lupinus albus* und *Lupinus mutabilis* in Abhängigkeit vom Standort in drei Anbaujahren

Rohprotein - und Rohfettertrag

Wie bereits dargestellt, wurde besitzt *L. albus* gegenüber *L. mutabilis* in der Regel einen höheren Gehalt an Protein und Öl im Korn und kann mit durchschnittlich 44,3 % Protein und 17,3 % Öl als eine eiweißreiche Ölfrucht angesehen werden. Jedoch wird die Ertragsleistung beider Komponenten außer durch den Gehalt im Samen durch den Körnertrag bestimmt.

Die alkaloidarme Inti wies 1989/90 aufgrund ihrer sehr geringen Körnerträge den geringsten Ertrag beider Inhaltsstoffe auf, während die bittere SCG9 in Gorbea den besten Rohproteintrag mit 14 dt/ha (Abb. 8 a) und in Cañete und Gorbea den besten Rohfettertrag mit 4,7 bis 5,4 dt/ha erzielte (Abb. 9 a). In Cajón erreichte Coya für beide Inhaltsstoffe die höchsten Erträge. 1990/91 war Prima (*L. albus*) an allen Standorten hinsichtlich beider Inhaltsstoffe am ertragreichsten (Abb. 8 b, 9 b). Das hohe Ertragsniveau einiger Linien von *L. mutabilis* (L - 5, L - 6, Coya) war jedoch zumindest in Gorbea ausreichend, um günstigere Protein - und Ölgehalte im Korn auch in hohe Flächenerträge umzusetzen, so daß sie ohne weiteres mit den Weißlupinen konkurrieren konnten. Dies war 1991/92 noch deutlicher. Die Rohfetterträge der Andenlupine waren der Weißen Lupine in Cajón und Gorbea ebenbürtig (Abb. 9 c). Ebenso war der in Gorbea von *L. mutabilis* erzielte Rohproteintrag von 10 - 13 dt/ha dem Ertragspotential von *L. albus* (9 - 15 dt/ha) vergleichbar (Abb. 8 c).

L. albus wies trotz geringerer Gehalte im Korn flächenbezogen eine sehr gute Protein - und Ölertragsleistung auf. Wo die Umweltbedingungen für einen ausreichenden Körnertrag allerdings günstig waren, machte sich die vorteilhaftere Kornzusammensetzung der Andenlupine in entsprechend höherer Leistung je Flächeneinheit bemerkbar.

12.4 Dank

Diese Arbeit wurde durch folgende Projekte gefördert: FONDECYT 89/0734 und AID - PSTC 513 - 5542 - G - SS - 9066 - 00. Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. D. von Baer, Universidad de Concepción, Chile und Prof. Dr. G. Kahnt, Institut für Pflanzenbau, Hohenheim, für ihre Unterstützung und Hilfe bei dieser Arbeit danken. Weiterer Dank gilt Campex Semillas Baer für die Bereitstellung der Versuchsflächen und des Kornmaterials.

12.5 Literatur

BAER, D. von (1991): Normas de calidad en lupino. *Informe Final Fondo de Desarrollo Productivo - CORFO (FDP N° 11066)*

- BRUMMUND, M. (1992): Zur Realisierung der Alkaloidarmut und weiterer Zuchtziele bei *L. luteus*, *L. angustifolius* und *L. albus*. In: *Lupinen 1991 - Forschung, Anbau und Verwertung* (M. WINK, ed.), 219 - 234
- GÄDE, H. (1962): Über die Anbaueignung alkaloidhaltiger und alkaloidarmer Gelblupinen auf leichten Böden. *Albrecht - Thaer - Archiv*, 6, 68 - 88
- GATAULINA, G. (1990): Symbiotic and mineral nitrogen in lupin nutrition. *Proc. 6th Int. Lupine Conference, Temuco - Pucón, Chile*, 180 - 191
- GROSS, R. (1983): Untersuchungen über den Einfluß von Genotyp und Umwelt auf die Korninhaltsstoffe von Tarwi (*L. mutabilis*) aus peruanischem Anbau. *Dissertation, Universität Gießen*
- HACKBARTH, J. & H.-J. TROLL (1959): Lupinen als Körnerleguminosen und Futterpflanzen. In: *Kappert - Rudorf, Handbuch der Pflanzenzüchtg., 2. Auflage, Bd. IV, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg*, 1 - 51
- HAMBLIN, A. & D. TERNANT (1987): Root length density and water uptake in cereals and grain legumes: how well are they correlated? *Austr. J. Agric. Res.*, 38, 513-527
- HARTMANN, CH. (1992): Ein Prognosemodell für die N - Fixierung und Ertragsbildung der Weißen Lupine (*L. albus* L.). In: *Lupinen 1991 - Forschung, Anbau und Verwertung* (M. WINK, ed.), 200 - 209
- KURZ, C. (1988): Einfluß von Saatzeit, Bestandesdichte und Wasserangebot auf Körnertrag und Ertragsstruktur von Lupinen (*L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. albus* und *L. mutabilis*). *Dissertation, Hohenheim*
- MADSEN, E. (1976): Nuclear magnetic resonance spectrometry as a quick method of determination of oil content in rapeseed. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 53, 467 - 469
- NOWACKI, E. and T. KAZIMERSKY (1971): The selective disadvantage of some biochemical mutations in the genus *Lupinus*. *Z. Pflanzzüchtg.* 66, 249 - 259
- PORTER, N. G. (1982): Interaction between lateral branch growth and pod set in primary inflorescences of lupin. *Aust. J. Agric. Res.*, 33, 957 - 965
- RAHMAN, M. S. & J. S. GLADSTONES (1974): Effects of temperature and photoperiod on flowering and yield components of lupin genotypes in the field. *Aust. J. Agric. Anim. Husb.*, 14, 205 - 213
- RICHTER, E. (1971): Die Qualität des Grünfutters neuer spätreifer alkaloidfreier Stämme von *L. albus*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 65, 255-264
- RÖMER, P. (1990): Genetische und physiologische Untersuchungen an *L. mutabilis* SWEET. *Dissertation, Gießen*

- TROLL, H.-J. (1956): Über Vitalitätsverhältnisse bei alkaloidhaltigen und alkaloidarmen Lupinen sowie bei deren Bastarden. *Abhdlg. Dtsch.Akad. Wiss., Berlin, Klasse für Chemie, Geol und Biol.*, 7, 65 - 78
- WILLIAMS, W. (1979): Studies on the development of *L.* for oil and protein. *Euphytica* 28, 481-488
- WILLIAMS, W. & R. MCGIBBON (1980a): Environmental effects on seed oil percentage and fatty acid composition in white lupin (*L. albus*). *J. Agric. Sci.*, 95, 597-602
- WILLIAMS, W. & R. MCGIBBON (1980b): Genetic control of seed weight and seed oil in *L. albus* and *L. mutabilis*. *Z. Pflanzengchtg.*, 84, 329 - 334
- WITHERS, N. J. (1973): Sweet lupins for seed production. *Proc. Agron. Soc. N. Z.*, 3, 63 - 68.
- WITHERS, N. J. (1979): Effects of water stress on *L. albus*. I. Response of vegetative growth to water stress during a single growth stage at two humidity levels. *N. Z. J. Agric. Res.*, 22, 445 - 454
- WITHERS, N. J. & B. J. FORDE (1979): Effects of water stress on *L. albus*. III. Response of seed yield and vegetative growth to water stress imposed during two or three growth stages. *N. Z. J. Agric. Res.*, 22, 463 - 474

13 Neue Möglichkeiten zur Züchtung frühreifer Andenlupinen (*Lupinus mutabilis*)

Peter Römer

Südwestdeutsche Saatzucht
Im Rheinfeld 1 - 13
D-76437 Rastatt

Zusammenfassung

Seit 1983 arbeitet der Autor an der Adaptationszüchtung von *Lupinus mutabilis* für mitteleuropäische Klimabedingungen. Während die hohen Protein- und Ölgehalte sehr für diese Lupinenart sprechen, ist ihr Haupt-Nachteil die späte Reife. Versuche, durch Auslesezüchtung das Problem zu beheben, scheiterten bisher, weil das Reifemerkmal nicht genetisch fixiert ist. Nach mutagener Behandlung mit EMS wurde eine voll determinierte Mutante ("KW 1") gefunden. In Kreuzungsnachkommenschaften spalteten in der F₂ Pflanzen mit einem determinierten basalen Seitentrieb heraus. Die Vererbung des Merkmals scheint monogen rezessiv zu erfolgen. Seit 1994 ist die Südwestdeutsche Saatzucht an einem EU-Forschungsprojekt beteiligt. Über einige Ergebnisse wird hier berichtet: Artkreuzungen mit *Lupinus polyphyllus* brachten zwar keine Samen hervor, jedoch zeigte sich, daß sowohl gekühlter als auch tiefgefrorener Pollen gute Hülsenansätze bringt. Ein Fremdbestäubungsversuch mit anthocyanarmen und anthocyanreichen Linien wurde angelegt. In früheren Versuchen betrug die Fremdbestäubungsrate von *L. mutabilis* 13 %, die determinierte Linie KW 1 hatte sogar 40 %. Ein Ertragsversuch bestätigte die späte Reife von *L. mutabilis*. Die niedrigen Kornträge (8,1 dt/ha im Mittel von 16 Herkünften) sind in erster Linie auf den zu hohen pH-Wert des Prüfungsstandortes zurückzuführen.

Summary

In 1983 the author has started breeding *Lupinus mutabilis* under Central European conditions. It turned out that the main problem with that species is its late maturity whereas its seed quality makes it a very promising crop. Selection for early maturity did not result in maturing genotypes since the character was not genetically fixed. After inducing mutations with EMS a fully determined mutant ("KW 1") was found. First crosses with this line gave some new plant types with one fully determined basic primary branch in F₂. The heredity of the character seems to be monogenic and recessive. Since 1994 Südwestdeutsche Saatzucht is

participating in a EU research project. Some of the results are given in this paper: interspecific crosses with *Lupinus polyphyllus* were carried out, showing that cooled or frozen pollen gives good podsetting (on *L. mutabilis*) but without producing seeds. An outcrossing experiment with high and low anthocyanine containing lines was initiated. Earlier results showed an outcrossing rate of *L. mutabilis* of 13 %, the determined KW 1 showed about 40 % outcrossing. A yield trial verified the late maturity of *L. mutabilis*. The low yield (8,1 dt/ha, mean of 16 lines) was the consequence of a high pH-value in the soil.

Key words

Lupinus mutabilis, determined mutation line, interspecific crosses, outcrossing rate, yield trial

13.1 Einleitung

Im Jahr 1983 begann ich, ausgehend von einer Idee von Professor Jahn-Deesbach, an der Universität Gießen mit der züchterischen Bearbeitung der Andenlupine (*Lupinus mutabilis* SWEET). Die Frage, welche Berechtigung es hat, eine aus dem Andenhochland Südamerikas stammende Kulturpflanze an unser Klimagebiet zu adaptieren, soll anhand der Tabelle 1 beantwortet werden.

Tabelle 1: Protein- und Fettgehalte von *Lupinus mutabilis* im Vergleich zu anderen Lupinenarten und zu anderen Körnerleguminosen (% der Korn-Trockenmasse)

	Rohprotein	Rohfett	Quelle
<i>L. mutabilis</i>	34,6 - 50,2	14,3 - 23,6	ROEMER, 1990
<i>L. albus</i>	34 - 45	10 - 15	WILLIAMS, 1984
<i>L. luteus</i>	36 - 48	4 - 7	WILLIAMS, 1984
<i>L. angustifolius</i>	28 - 38	5 - 7	WILLIAMS, 1984
Sojabohne	38,9	21,6	PLANK, 1989
Ackerbohne	30,0	1,6	PLANK, 1989
Körnererbse	26,0	1,5	PLANK, 1989

Man kann erkennen, daß *Lupinus mutabilis* in ihrer Kornzusammensetzung (Eiweiß + Öl) allen anderen Lupinenarten überlegen und der Sojabohne vergleichbar ist. Ausgehend von einer Sammlung verschiedenster Herkünfte und deren Beobachtung im Jahr 1983 wurden die

vorrangigsten Zuchtziele für Deutschland definiert. Da zunächst keine alkaloidarmen Genotypen bekannt waren, wurde die Alkaloidarmut als wichtigstes Ziel für die direkte Nutzung der Pflanzen in der Ernährung formuliert. Da die meisten Herkünfte sehr spätreif waren, wurde das Merkmal "Frühreife" als zweitwichtigstes für die Verwendung der Andenlupine als Körnerleguminose in Deutschland angesehen. Die gefundene große Variabilität in allen morphologischen Merkmalen und in den Inhaltsstoffen nährte die Hoffnung, gewünschte Zuchtziele schnell zu erreichen.

Das Zuchtziel "Alkaloidarmut", welches zunächst an der Spitze stand, stellte sich als relativ leicht erreichbar heraus. Vorarbeiten von E. von BAER konnten hier genutzt werden (BAER und GROSS, 1977). Das ursprünglich als "leichter" erreichbar angesehene Ziel "Frühreife", erwies sich dagegen als wesentlich schwieriger. Nach anfänglichen Erfolgen in 1985 und 1986 erfolgte 1987 der Rückschlag (ROEMER, 1990).

Tabelle 2 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Spätsommerwitterung des betreffenden Jahres und der jeweiligen Anzahl als "reif" ausgelesener Pflanzen. Ursache für das "Nicht-Reifwerden" ist der sympodiale Verzweigungstyp von *L. mutabilis* und das nicht terminierte Wachstum. Nachdem sich dieser wechselnde Erfolg in den folgenden Jahren immer wiederholt hatte, ohne daß wirklich frühreife, das heißt determinierte Formen gefunden wurden, war klar, daß es auf dem Weg der reinen Auslesezüchtung keinen Fortschritt geben würde. Seit 1988 wurde daher versucht, mit Hilfe eines Mutationsprogrammes neue Variabilität zu schaffen.

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen Reife und Spätsommerwitterung bei *Lupinus mutabilis*

Jahr	als "reif" ausgelesene Pflanzen	Spätsommerwitterung
1985	45	trocken
1986	206	trocken
1987	0	sehr feucht

13.2 Ergebnisse des Mutationsprogrammes

Nach mutagener Behandlung mit EMS (5 Stunden in 0,2 % Ethyl-Methan-Sulfonat eingequollene Samen, Aussaat direkt in gequollenem Zustand) wurden 1991 in einer M₂ zwei voll terminierte Pflanzen selektiert (ROEMER, 1993). Diese Pflanzen zeichnen sich dadurch

aus, daß in den Blattachseln des Haupttriebes keine Nebentriebe, sondern endständige Blüten und später Hülsen gebildet werden. Die Pflanzen sind also gänzlich unverzweigt und werden auch als "Blattachselblüher" bezeichnet. Wir gaben den Linien die Bezeichnung "KW 1". Obwohl es sich um neues, sehr interessantes Zuchtmaterial handelt, wird dieser Wuchstyp in seiner jetzigen Form kaum als Sorte brauchbar sein.

Die Pflanzen werden relativ lang und sind von der Stabilität her nicht sehr gut, worunter die Standfestigkeit leidet. Außerdem ist es fraglich, ob eine unverzweigte Wuchsform in der Lage ist, Stresssituationen - z. B. Trockenheit - zur Zeit der Blüte des Haupttriebes derart zu verkraften, daß ein guter Korntrag erzielt werden kann. Die Vermutung liegt nahe, daß ein verzweigter Typ eher durch einen verstärkten Hülsenansatz an den Seitentrieben eine Kompensation solcher Stresssituationen herbeiführen kann.

1992 wurden die ersten Kreuzungen zwischen normal verzweigten und KW 1-Pflanzen gemacht. Die Hoffnung war, das Merkmal "Blattachselblüte" eine Etage höher, also auf die Seitentriebe erster Ordnung zu verlagern. Wir machten in der F₂ die Beobachtung, daß einige Pflanzen dabei waren, die basale Seitentriebe mit Blattachselblüten bildeten. Es waren aber immer nur sehr kleine und einzeln auftretende Seitentriebe.

Erste Hinweise auf die Vererbung gab das Verhältnis normalverzweigter zu determinierten Pflanzen (mit und ohne basale Seitentriebe). Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, könnte es sich um einen monogen rezessiven Erbgang handeln. Da es sich aber erst um zwei Nachkommenschaften handelt, ist die Datenbasis für eine abschließende Aussage noch zu gering. Weitere Ergebnisse aus den Nachkommenschaften des Jahre 1995 können sicherlich zur Klärung der Frage führen.

Tabelle 3: Aufspaltung in normal verzweigte und determinierte Pflanzen in 2 F₂-Nachkommenschaften von Kreuzungen mit KW 1 (Rastatt, 1994)

	Anzahl normal verzweigter Pfl.	Anzahl determinierter Pfl.	% determinierter Pfl.
Kreuzung 71/1	116	28	19,4
Kreuzung 71/2	82	16	16,3
Beide Kreuzungen	200	44	18,0

13.3 EU-Projekt: "Anpassung von *Lupinus mutabilis* an Europäische Boden- und Klimabedingungen"

Seit November 1993 ist die Südwestdeutsche Saatzucht an einem EU-Forschungsprojekt mit dem Ziel, *L. mutabilis* in Europa zu adaptieren, beteiligt. Die Kooperationspartner sind: Universität Reading (England), INRA Lusignan (Frankreich), Universität Lissabon (Portugal) und die Universität Wroclaw (Polen). Das Gesamtprojekt beinhaltet verschiedene Teilprojekte, unter anderem einen Saatzeitenversuch mit genauen Erhebungen zur Ermittlung der optimalen Pflanzenarchitektur, einen Ertragsversuch, verschiedene Kreuzungs- und Mutationsprogramme. Einige Ergebnisse des von der Südwestdeutschen Saatzucht durchgeführten Teils sollen im folgenden beschrieben werden.

13.3.1 Artkreuzung

Es wurde der Versuch unternommen, durch Kreuzungen mit der Dauerlupine (*Lupinus polyphyllus*) Frühreife und Fröhsaarverträglichkeit einzukreuzen. Dabei besteht jedoch das Problem, die Blühterminen von beiden Arten zu koordinieren (*L. polyphyllus* blüht ab 20. Mai, *L. mutabilis* erst Mitte Juni). In der Vergangenheit durchgeführte Versuche, *L. mutabilis* durch Fröhsaat im Gewächshaus zu früherer Blüte zu bewegen, waren nicht besonders erfolgreich, weil die Pflanzen im Gewächshaus schlecht wuchsen und nur wenige Blüten bildeten. Es wurde deshalb versucht, durch Konservierung des Pollen der Dauerlupine den zeitlichen Abstand zu überbrücken. Als Mutter wurde die *L. mutabilis*-Herkunft "POTOSI" verwendet, als Bestäuber verschieden konservierter Pollen einer alkaloidarmen Herkunft von *L. polyphyllus*. Der Pollen war

- "frisch" (= das, was an *L. polyphyllus* am 09.06.94 noch zu finden war)
- gekühlt (im Kühlschrank bei + 5°C)
- tiefgefroren (in der Tiefkühltruhe, bei -25°C).

Der Pollen wurde - mit Ausnahme von Variante a) am 24.05.1994 gesammelt und in verschlossenen Petrischalen aufbewahrt. Die *L. mutabilis*-Mutterpflanzen wurden am 07.06.1994 katriert und am 09.06.1994 bestäubt.

Zu unserer großen Überraschung war der Hülsenansatz in den zwei Konservierungsvarianten sehr gut (Tabelle 4), in der "frischen" Variante dagegen eher mäßig. Dies mag daran gelegen haben, daß der Pollen, der zum Bestäubungstermin gesammelt worden war, nicht mehr voll vital war. Leider bildete sich in keiner der Hülsen ein Korn. Der Versuch soll nächstes Jahr mit

möglichst vielen *L. mutabilis*-Herkünften und zwei *L. polyphyllus*-Bestäubern wiederholt werden.

Tabelle 4: Hülsenansatz in Kreuzungen *Lupinus mutabilis* x *Lupinus polyphyllus* unter Verwendung von frischem, gekühltem und tiefgefrorenem Pollen (Rastatt, 1994)

	frischer	gekühlter	tiefgefr. Pollen
Anzahl Pflanzen mit Hülsen	9	17	16
Anzahl Pflanzen ohne Hülsen	12	5	6
% Pflanzen mit Hülsenansatz	42,9	77,3	72,7

13.3.2 Fremdbestäubungsrate

Die Kenntnis der Fremdbestäubungsrate ist für die Wahl der richtigen Zuchtmethode von großer Bedeutung. Erste Beobachtungen an der Universität Gießen vermittelten den Eindruck, daß bei *L. mutabilis* ein großer Fremdbestäubungsprozentsatz zu finden sei. Deshalb wurden entsprechende systematische Versuche angelegt: abwechselnd wurde jeweils eine Reihe anthocyanarmer und anthocyanreicher Pflanzen nebeneinander angebaut. Da der hohe Anthocyangehalt dominant vererbt wird, läßt sich durch Auszählen der anthocyanreichen Pflanzen in den Nachkommenschaften der anthocyanarmen Pflanzen der Anteil der Fremdbestäubung schätzen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Danach ist mit mindestens 6 %, im Durchschnitt sogar mit 13 % Fremdbestäubung zu rechnen.

Im Rahmen des EU-Projektes wurde dieser Versuch noch einmal angelegt, diesmal jedoch in der Weise, daß jede anthocyanarme Mutterpflanze von 8 anthocyanreichen Vaterpflanzen umgeben war (Tabelle 6). Der Versuch war in 4 Gruppen verschiedener genetischer Herkünfte angelegt und wird 1995 anhand der Nachkommenschaften der anthocyanarmen Pflanzen ausgewertet.

Einen Anhaltspunkt über den Anteil der Fremdbestäubungsrate der determinierten Linie KW 1 erhielten wir durch Vermehrungen, die wir über Winter in Chile hatten machen lassen. Da dort keine Isolierung der determinierten Pflanzen stattgefunden hatte, wurden sie teilweise mit normalverzweigten Pflanzen fremdbestäubt. Die 1994 in den Isolationskäfigen in Rastatt

beobachtete Aufspaltung in determinierte und normal verzweigte Pflanzen entspricht der Rate, mit der eine Fremdbestäubung stattgefunden hat (Tabelle 7). Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Fremdbestäubungsrate bei diesen Genotypen bis zu 45 % betragen kann.

Tabelle 5: Pflanzen mit hohem Anthocyangehalt (A+) in Nachkommenschaften von Pflanzen mit niedrigem Anthocyangehalt (A-) nach natürlicher Fremdbestäubung mit hoch-anthocyanhaltigen Pollenspenderpflanzen zur Schätzung der Fremdbestäubungsrate in *Lupinus mutabilis* (Ergebnisse von 1986/87, Gießen)

Linie	271	272	273	274	275	276	Σ
Pflanzen A-	116	324	273	145	172	191	1221
Pflanzen A+	22	45	49	27	33	13	189
% Pflanzen A+	15,9	12,0	15,0	15,7	16,1	6,4	13,4

Tabelle 6: Schema der Anordnung von Pflanzen mit hohem und mit niedrigem Anthocyangehalt zur Bestimmung der Fremdbestäubungsrate bei *Lupinus mutabilis* (Rastatt, 1994)

X X X X X X X X X	X = Anthocyan-reiche Vaterlinie
X ● X X ● X X ● X	● = Anthocyan-arme Mutterlinie
X X X X X X X X X	
X X X X X X X X X	
X ● X X ● X X ● X	
X X X X X X X X X	
1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Reihe Nummer		

Tabelle 7: Fremdbestäubungsrate der determinierten Linie KW 1 (Rastatt, 1994)

Nachkommenschaft Nr.	1	2	3	Σ
Zahl determinierter Pfl.	112	56	95	263
Zahl verzweigter Pfl.	94	37	43	174
% verzweigter Pflanzen	45,6	39,8	31,2	39,8

13.3.3 Ertragsversuch

Herkünfte aus allen 5 beteiligten Instituten wurden in einem Ertragsversuch an allen 5 Orten geprüft. Das Ergebnis des Standortes Rastatt ist in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Ertragsversuch mit *Lupinus mutabilis* in Rastatt 1994 ("MTP")

- 16 Herkünfte aus 5 Ländern; 4x4-Gitter mit 3 Wiederholungen
- Parzellengröße: 5 m²

Parzellenergebnisse (Mittel aller Genotypen):

	Mittel	Minimum	Maximum
Ertrag (dt/ha)	8,1	1,3	11,9
Blühbeginn	25.06.	20.06.	11.07.

Zum Vergleich: Blühbeginn <i>L. albus</i> , Versuchsmittel = 16.06.			

Ergebnisse von je 10 Pflanzen einer Parzelle; getrennte Erfassung von Haupt- und Nebentrieben, Mittel aller Pflanzen:

	Haupttrieb	Nebentriebe
Korngewicht (g)	3,0	3,2
Kornzahl	20,3	22,5
Tausendkorngewicht (g)	153,0	143,2

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

1. Der durchschnittliche Ertrag von 8,1 dt/ha ist im Vergleich zu etwa 35 dt/ha von *Lupinus albus* am gleichen Standort sehr gering; Ursache ist der relativ hohe pH-Wert des Bodens (6,8), der die Pflanzen stark schwächte. Bereits nach dem Auflaufen waren starke Symptome von Eisenchlorose zu erkennen (Vergilbung der Pflanzen).
2. Der vergleichsweise zu *L. albus* späte Blühbeginn resultierte auch in einem entsprechenden Unterschied im Reifetermin, allerdings derart, daß alle *L. mutabilis*-Herkünfte bis Ende September noch blühten und deshalb die Parzellen von Hand geerntet werden mußten.
3. Aus den Ergebnissen der Einzelpflanzen-Ernte läßt sich der Schluß ziehen, daß Haupt- und Seitentriebe im gleichen Verhältnis zur Bildung des Gesamtpflanzen-Kornertrages beitragen.

13.3.4 Schlußfolgerung

Die geschilderten Arbeiten mit *L. mutabilis* lieferten vielversprechende neue Ansätze, die es gilt, konsequent weiterzuentwickeln. Die Züchtung frühreifer *L. mutabilis* ist aber weiterhin ein Langzeitprojekt, dessen Verwirklichung nur mit Hilfe öffentlicher Mittel möglich ist. In diesem Zusammenhang danken wir der Kommission der Europäischen Union für die finanzielle Unterstützung.

13.4 Literatur

- BAER, E. von und GROSS, R. (1977): Auslese bitterstoffarmer Formen von *Lupinus mutabilis*; Z. Pflanzenzüchtg. 79, 52 - 58
- ROEMER, P. (1990): Genetische und physiologische Untersuchungen an *Lupinus mutabilis* SWEET; Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- ROEMER, P. (1993): A determined mutant of *Lupinus mutabilis* as a possible source of early maturity. Abstracts 7th Int. Lupin Conf., Evora, Portugal, theme 1 - n°. 13

14 Die Bedeutung der *Fusarium*-Resistenz und der Reifezeit für den erfolgreichen Anbau der Gelblupine

Wilfried Möller und Ulrich Schmiechen

Saatzucht Steinach, Station Bornhof
Klockowerstr. 11
D-17219 Bocksee

Zusammenfassung

In historisch kurzer Zeit wurde die Gelbe Lupine zu einer wertvollen Kulturpflanze entwickelt. Trotz technologischer Anpassung von Gelblupinensorten an moderne Produktionsverfahren ist das im praktischen Lupinenanbau erreichte Ertragsniveau jedoch noch nicht ausreichend. Von besonderer Bedeutung zur Sicherung des Ertrages ist die Bereitstellung von fusariumresistenten Sorten vor allem in den traditionellen Lupinenanbaugebieten. Neuzüchtungen mit einem hohen Resistenzgrad werden vorgestellt. Die Sicherung hoher Kornerträge ist maßgeblich auch vom Reife- bzw. Druschtermin abhängig. Möglichkeiten zur technischen Reifebeschleunigung durch sachgemäße und zeitlich richtig eingeordnete Defoliation werden aufgezeigt. Als wesentlicher Beitrag zur Erhöhung der Ertragssicherheit im Gelblupinenanbau ist die Bereitstellung von frühreifenden bzw. wuchsterminierten Sorten zu werten. Auf Besonderheiten beim Anbau entsprechender Sorten wird verwiesen. Die Gelbe Süßlupine hat durch ihre spezifische Ertragsfähigkeit auf leichten Böden eine besondere Bedeutung für alle Böden bis zu 35 Bodenpunkten. Ihre Nutzung ist in dreifacher Hinsicht von Bedeutung: 1. als eiweißreiche Körnerhülsenfrucht, 2. als eiweißreiche Pflanze im Grünfütterbau (insbesondere auch als Stoppelfrucht), 3. als stickstoffsammelnder Tiefwurzler zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit.

14.1 Einleitung

SENGBUSCH und anderen Züchtern gelang es, die Gelblupine in der historisch kurzen Zeit von 15 Jahren von einer Pflanze mit vielen Wildeigenschaften zu einer wertvollen Kulturpflanze zu entwickeln. Durch das Auffinden von alkaloidarmen Pflanzen legten sie die Grundlage für die Nutzung als Futterpflanze und für die menschliche Ernährung. Mit der

Züchtung von fusariumresistenten Sorten durch WUTTKE und TROLL konnte die Anbauwürdigkeit noch wesentlich erhöht werden.

In den 60er und 70er Jahren erfolgte durch die Entwicklung von wirksamen Verfahren der Unkrautbekämpfung und Defoliation in Bornhof eine erfolgreiche technologische Anpassung der Lupinen an moderne Produktionsverfahren, die zu einer Erhöhung des Anbauumfangs und auch zur Erhöhung der Erträge führten. Trotz der angeführten Erfolge ist die Differenz zwischen dem Ertragspotential unserer Sorten und dem tatsächlich im praktischen Lupinenanbau erreichten Ertragsniveau noch immer groß. Das konnte im praktischen Anbau bisher immer wieder beobachtet werden und ist leicht durch Stichproben aus Vermehrungsschlägen zu belegen (s. Tab.1).

Tab. 1 Gelbe Süßlupinen (Sorte Bornova)

Gewachsener Ertrag nach 4 von Hand geernteten Ernteproben (je 1 m²) aus einem Vermehrungsschlag der LPG Kemnitz (Bez. Rostock) Schlaggröße: 165 ha 1983

Probe	Hülsenzahl /1 m ²	Kornzahl /Hülse	TKM g	Samenertrag (g) / 1 m ²
1	603	3,6	140	305
2	720	3,6	135	351
3	808	4,2	106	359
4	752	3,7	121	336
x	721	3,8	125	338

Nach Samenproben gewachsener Samenertrag: 33,8 dt/ha; tatsächlicher Samenertrag nach Mähdrusch: 12,9 dt/ha

Im folgenden sollen deshalb vor allem neue Züchtungsarbeiten und Arbeiten zur Verbesserung des Anbauverfahrens erläutert werden, von denen wir eine wesentliche Stabilisierung der Erträge im praktischen Anbau erwarten können.

14.2 Die Bedeutung fusariumresistenter Sorten

Von allen Pilzkrankheiten, die die Gelben Süßlupinen befallen, hat bisher nur die Lupinenwelke, hervorgerufen durch *Fusarium oxysporum*, zu wirtschaftlichen Schäden geführt. Das Krankheitsbild ist wie folgt gekennzeichnet: Der bodenbürtige Pilz dringt in die Pflanze ein und verstopft ihre Leitgefäße. Zunächst erkranken nur einzelne Pflanzen. Bei wiederholtem Anbau und zunehmender Verseuchung kommt es zu nesterweisen Ausfällen und bei langjährig in die Fruchtfolge eingegliedertem Gelblupinenanbau sind Totalausfälle die Regel.

Durch die hohe Anbauausdehnung des Gelblupinenanbaus auf typischen Sandböden in der ehemaligen DDR, die Anbaufläche umfaßte immerhin jährlich ca. 20000 ha zur Saatgut- und Körnerproduktion und ca. 100000 ha zur Grünnutzung, nahmen die mit *Fusarium oxysporum* verseuchten Flächen stark zu, so daß der Anbau von Gelben Lupinen um 1950 sogar teilweise insbesondere in Betrieben des heutigen Landes Brandenburg, eingestellt werden mußte. Heute ist der Anbau von nicht resistenten Sorten in den traditionellen Anbaugebieten Mecklenburg/Vorpommern, Brandenburg und Sachsen-Anhalt nicht mehr möglich. Die Züchtung von fusariumresistenten Sorten ist wegen der hohen wirtschaftlichen Bedeutung als ein Meilenstein in der Geschichte des Lupinenanbaus anzusehen.

Seitdem 1971 die erste fusariumresistente Sorte zugelassen werden konnte, wurde das Sortiment fusariumresistenter Sorten aus Bornhof laufend ergänzt. Alle bis 1990 zugelassenen Sorten aus Bornhof sind fusariumresistent. 1993 bzw. 1994 erfolgte die Zulassung der Sorten "Bornal" und "Borena", die mit einem besonders hohen Resistenzgrad ausgestattet sind.

Starke, durch *Fusarium* verursachte Ertragsausfälle traten bisher bei Gelblupinen immer dann auf, wenn der Anbau auf mit *Fusarium oxysporum* angereicherten Böden erfolgte, wie wir sie in den traditionellen Lupinenanbaugebieten in der Regel vorfinden. Erwartungsgemäß waren am Standort Bornhof die durch *Fusarium oxysporum* verursachten Schäden bei Sorten ohne Fusariumresistenz bzw. nicht ausreichender Resistenz unter den Witterungsbedingungen des Jahres 1994 besonders gravierend.

Tab. 2 Bornhof Sortenversuche: Gelbe Lupinen 1994

Sorten	Blüh- Pflanzenzahl		Reife*		Samenertrag		Differenz dt/ha	Signif.
	beginn	St./1 m ²	Bon. 1-9		dt/ha	rel.		
	30.5.	27.6.	26.7.					
1. Borselfa	15.6.	78	72	8,8	10,5	96	-0,4	
2. Borsaja	9.6.	80	76	8,8	10,9	100	0,0	
3. Bornal	15.6.	79	79	7,3	13,6	124	-2,7	
4. Borena	10.6.	75	74	8,5	13,8	127	2,9	
5. A (süß)	11.6.	74	46	9,0	6,0	55	-4,9	*
6. Gülzower	15.6.	70	0	7,0	0,3	3	-10,6	*
7. B (bitter)	17.6.	73	4	7,0	0,9	8	-10,0	*

*Reife

1 = Pflanzen noch grün; 9 = Pflanzen völlig ausgereift

14.2.1 Die Bedeutung der Reifezeit bzw. des Druschtermins für die Ertragsstabilität Gelber Lupinen.

Unsere heutigen Gelblupinensorten sind platzfest und insofern an die Mähdruschernte gut angepaßt. Nach eigenen Untersuchungen und Ergebnissen von Produktionsanalysen (erfaßt wurden von 1979 - 1987 jeweils - 20.000 ha Vermehrungsfläche, diese wurden in die Auswertung einbezogen) ist ein verlustarmer Drusch jedoch nur bei einem Kornfeuchtebereich von 12% - 18% gewährleistet. Werden 12% Kornfeuchte unterschritten, steigen die Mähdruschverluste durch Hülsenabbruch stark an und Beschädigungen des Lupinenkornes, die zur Verminderung der Keimfähigkeit führen, sind nicht auszuschließen. Häufiger und schwerwiegender sind jedoch Mähdruschverluste, die bei einem Überschreiten des optimalen Feuchtebereiches eintreten, wie anhand von Produktionsanalysen eindeutig nachgewiesen werden kann. (s. Tab. 3)

Tab. 3 Ergebnisse der Produktionsanalyse 1979....1987

	Feuchtebereich der Rohware nach Drusch	Saatwareertrag	
		dt/ha	relativ
bis	15 %	9,3	88
16	- 17 %	10,6	100
18	- 19 %	10,0	94
20	- 23 %	9,1	86
24	- 29 %	7,9	75
30	- 35 %	6,8	64

In den traditionellen Lupinenanbaugebieten Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg und Sachsen-Anhalt muß deshalb angestrebt werden, die Mähdruscherte so früh wie möglich, spätestens jedoch bis Ende September durchzuführen. In der Regel kann nur bis zu diesem Zeitpunkt mit Witterungsbedingungen gerechnet werden, unter denen ein Drusch im optimalen Feuchtebereich möglich ist. Wie sehr der Samenertrag vom Defoliations- bzw. Erntetermin abhängt, kann u.a. mit Hilfe von Produktionsanalysen belegt werden. (s. Tab. 4 u. 5)

Tab. 4: Ergebnisse der Produktionsanalyse 1979....1978; Ergebnisse aus den Defoliationsversuchen

Defoliationstermin	Saatwareertrag	
	dt/ha	relativ
10.08.-16.08.	10,5	100
17.08.-23.08.	10,1	96
24.08.-30.08.	9,5	90
31.08.-06.09.	8,6	82
07.09.-13.09.	7,6	72

Tab. 5: Ergebnisse der Produktionsanalyse 1979....1978

Ernteabschluß	Saatwareertrag		täglicher Ertrags- abfall nach linearer Regression(kg/ha) ab 16.09.
	dt/ha	%	
01.09. - 15.09.	11,3	100	+ 3,2
16.09. - 30.09.	10,3	91	- 9,9
01.10. - 15.10.	8,6	76	- 6,4
16.10. - 31.10.	8,3	73	- 10,6

Innerhalb des Anbauverfahrens Gelber Lupinen kommt deshalb der sachgemäßen und zeitlich richtig eingeordneten Defoliation eine entscheidende Bedeutung zu. Durch den Anbau wuchsdeterminierter und frühreifender Sorten wird die Ertragssicherheit im Lupinenanbau wesentlich erhöht. Allerdings kann auch hier für die Abreife unter ungünstigen Bedingungen in Ausnahmefällen die Defoliation erforderlich werden. Bei normalwüchsigen Sorten ist die Defoliation als eine Standardmaßnahme im Anbauverfahren mit aufzunehmen.

Aufgrund von Bornhofer Versuchsergebnissen wurde 1980 in der ehemaligen DDR das Defoliationsverfahren bei Gelben Süßlupinen mit 1 l/ha Reglone staatlich zugelassen und die Kriterien für die Anwendung des Verfahrens wie folgt festgelegt:

- Defoliation nach Eintritt der physiologischen Reife (Samenschale noch dunkelgrün, Keimlingsspitzen mit beginnender Gelbfärbung, Samen zwischen zwei Fingern druckfest)
Anwendungszeitpunkt: bis spätestens 5. September

Die Begrenzung auf 1 l/ha Reglone war notwendig geworden, nachdem höhere Aufwandmengen häufig zur Beeinträchtigung der Kornqualität geführt hatten. Mit 1 l/ha Reglone wird eine selektive Wirkung erzielt, d.h. die Blätter werden abgetötet, ohne die Hülsen zu schädigen. Mit Hilfe der Defoliation kann der Abreifeprozess so gesteuert werden, daß die Mähdruschreife auch bei ungünstiger Witterung in der Regel bis Ende September erreicht wird und noch bei einem günstigen Kornfeuchtebereich von 12-18% gedroschen werden kann. Sind die Lupinen erst im Oktober druschreif, kann nur noch selten bei einem günstigen Kornfeuchtebereich gedroschen werden. Die Mähdruschverluste steigen dann sehr schnell an, Kornqualität und Keimfähigkeit leiden erheblich.

Die Defoliation mit 1 l/ha Reglone zum Zeitpunkt der physiologischen Reife ist mit keinerlei Risiken verbunden. Die Keimfähigkeit wird nicht beeinträchtigt und offensichtlich ist auch die Kornfüllungsphase zu diesem Zeitpunkt weitestgehend abgeschlossen, wie den Versuchsergebnissen in Tabelle 6 und 7 zu entnehmen ist. Bei für die Abreife der Lupinen ungünstigen Witterungsbedingungen bzw. verspäteter Defoliation muß mit langen Nachreifezeiten und Keimschädigungen gerechnet werden. (siehe Tab. 7, Versuchsergebnisse Bornhof, 1980)

Tab. 6: Einfluß des Defoliationstermins auf den Defoliationseffekt, das TKG und die Keimfähigkeit des Saatgutes Gelber Süßlupinen (Sorte "Bornova", Bornhof 1979)

Defoliationstermin	MD-Reife am:*	Nachreife-zeit**Tage	TKG g	KF%
17.7.	10.8.	24	125	89
21.7.	16.8.	26	141	94
25.7.	16.8.	22	145	92
29.7.	16.8.	18	150	94
02.8.	19.8.	17	163	97
06.8.	21.8.	15	171	94
10.8.***	21.8.	11	174	96
14.8.	23.8.	9	177	93
18.8.	02.9.	15	180	91
22.8.	01.9.	10	180	92
26.8.	14.9.	19	180	98
30.8.	17.9.	18	184	94
03.9.	21.9.	18	179	96

*MD-Reife = Mähdruschreife, Blätter völlig abgestorben, Stengel braun gefärbt, Hülsen zu 95% braun gefärbt; **Nachreifezeit = Zeitraum zwischen der Defoliation und dem Erreichen der MD-Reife; ***physiol. Reife = Samenschale noch dunkelgrün, Keimwurzel beginnt sich gelb zu färben, Samen zwischen 2 Fingern druckfest

Tab. 7: Einfluß des Defoliationstermins auf den Defoliationseffekt, das TKG und die Keimfähigkeit des Saatgutes Gelber Süßlupinen (Sorte "Bornova", Bornhof 1980)

Defoliationstermin	MD-Reife am:*	Nachreife-zeit**Tage	TKG g	KF%
28.7.	16.9.	49	101	88
03.8.	22.9.	50	97	87
06.8.	25.9.	50	94	85
09.8.	25.9.	47	101	89
15.8.	25.9.	41	104	88
18.8.	26.9.	39	96	80
21.8.	26.9.	36	98	83
24.8.	26.9.	33	105	84
27.8.	26.9.	30	99	89
30.8.***	02.10.	33	108	81
02.9.	02.10.	30	117	86
05.9.	05.10.	30	111	72
08.9.	12.10.	34	112	78
11.9.	11.10.	31	117	74
14.9.	13.10.	29	120	78
17.9.	17.10.	30	121	76
20.9.	14.10.	24	126	70
23.9.	16.10.	23	120	72
26.9.	19.10.	23	122	68

* MD-Reife = Mähdruschreife, Blätter völlig abgestorben, Stengel braun gefärbt, Hülsen zu 95% braun gefärbt; ** Nachreifezeit = Zeitraum zwischen der Defoliation und dem Erreichen der MD-Reife; *** physiol. Reife = Samenschale noch dunkelgrün, Keimwurzel beginnt sich gelb zu färben, Samen zwischen 2 Fingern druckfest

Auf die Defoliation als Maßnahme zur Reifebeschleunigung kann bei herkömmlichen Gelblupinensorten in Nord- und Mitteldeutschland in der Regel nicht verzichtet werden. Wegen der besonderen Bedeutung der Reife für die Ausschöpfung des Ertragspotentials wurde

in der Gelblupinenzüchtung in den vergangenen 2 Jahrzehnten deshalb in Bornhof verstärkt an den Zuchtzielen determinierter Wuchs und Frühreife gearbeitet. Diese Zuchtziele gewinnen gerade in neuerer Zeit noch an Bedeutung, weil unter Berücksichtigung ökologischer Gesichtspunkte Defoliationmittel abzulehnen sind.

14.3 Sorten mit determiniertem Wuchs

Die Gelbe Lupine gehört wie die meisten Leguminosen zu den Pflanzen, die mit Beginn der reproduktiven Phase ihr Wachstum fortsetzen. Insbesondere bei hohen Niederschlägen im Zeitraum Juli-August werden die Haupttriebe von den Nebentrieben verschiedener Ordnungen überwachsen. Das Abreifen der Hülsen wird sehr erschwert, weil sie unter den Blättern kaum trocknen. Unter diesen Bedingungen neigen die Körner wegen ihres hohen Eiweißgehaltes leicht zum Verschimmeln, wodurch wiederum Keimfähigkeit bzw. Futterqualität stark herabgesetzt werden.

Das sind Mängel, die trotz sachgemäß durchgeführter technischer Defoliation in besonders niederschlagsreichen Jahren nicht immer verhindert werden können. Von großer praktischer Bedeutung sind deshalb wuchsdeterminierte Sorten, bei denen mit beginnender Hülsenreife das Trieb- und Blattwachstum beendet wird.

Nach intensiver züchterischer Arbeit konnte 1990 die Bornhofer Sorte "Borselfa" zugelassen werden, eine Sorte mit determiniertem Wuchs bei der die Hülsen im wesentlichen aus endständigen Blütenknospen gebildet werden und die basale Verzweigung auf Nebentriebe 1. Ordnung beschränkt bleibt. Bei für die Abreife der Lupinen ungünstiger Niederschlagsverteilung werden ihre Ertragsvorteile gegenüber anderen Sorten besonders deutlich.

14.4 Frühreifende Gelblupinensorten

Neben den Ackerbohnen gehören die Gelblupinen zu den am spätesten reifenden großkörnigen Leguminosen. Wegen ihrer mediterranen Herkunft ist darüber hinaus die Entwicklung der herkömmlichen Gelblupinensorten noch mehr oder weniger stark an ein bestimmtes Vernalisationsbedürfnis und ein Verharren im Rosettenstadium gebunden, was bei Wildformen ganz besonders stark ausgeprägt ist.

Nach umfangreichen Kreuzungs- und Selektionsarbeiten wurden in Bornhof Formen mit ausreichender Variabilität hinsichtlich Frühreife und Ertragsleistung gefunden und für die Züchtung nutzbar gemacht. Die Frühreife, bei vielen Kulturpflanzen durch Verkürzung der

Vegetationsdauer mit verminderter Ertragsleistung erkauft, konnte bei den Sorten "Borsaja" und "Borena" ohne Ertragsabfall realisiert werden.

Das war möglich durch die Selektion von Pflanzen mit fast völlig eingeschränktem Vernalisationsbedürfnis und dem Wegfall der relativ unproduktiven Phase, dem Verharren im Rosettenstadium. Während mittelfrühe Sorten, wie "Bornova" und "Bornal", möglichst noch in der 2. Märzhälfte ausgesät werden müssen, um ihr Ertragspotential ausschöpfen zu können, sind die frühreifen Sorten "Borsaja" und "Borena" spätsaatverträglich. Sie brachten 1993 sogar höhere Samenerträge bei der Aussaatzeit 8.4. gegenüber der Märzsaat (s.Tab.8).

Tab. 8: Ertragsleistungen von Gelblupinensorten (dt/ha), Bornhof 1993 in Abhängigkeit vom Aussaattermin

Sorten:	Borsaja	Bornova	Borena	Bornal	Sorte A
<hr/>					
1.Saatzeit					
24.03.1993	13,6	17,6	15,8	19,4	8,8
<hr/>					
2.Saatzeit					
08.04.1993	17,6	11,6	19,2	13,7	10
<hr/>					

Wegen ihrer Spätsaatverträglichkeit und Frühreife sind die Sorten "Borsaja" und "Borena" für Betriebe mit ökologischer Wirtschaftsweise von besonderem Interesse. Die Unkrautbekämpfung kann beim Anbau dieser Sorten vor der Aussaat bis zum 15. April mechanisch erfolgen. Bei diesem Aussaattermin werden außerdem ein zügiger Aufgang und eine schnelle Jugendentwicklung der Pflanzen erreicht, die Voraussetzung für unkrautfreie Bestände ohne Herbizideinsatz. Die Aussaatmenge kann wegen der günstigeren Auflaufbedingungen im April gegenüber Märzsaat um 20 % reduziert werden. Mineralische N-Düngung, Fungizid- und Insektizideinsatz sind generell beim Gelblupinenanbau nicht erforderlich, was dem ökologischen Landbau sehr entgegen kommt. Durch die frühere Reife wird auch der Einsatz von Defoliationmitteln in der Regel überflüssig.

Wir sind davon überzeugt, daß insbesondere mit der Züchtung fusariumresistenter, wuchsdeterminierter und frühreifender Sorten ein bedeutender Schritt hinsichtlich der Erhöhung der Ertragsstabilität im Gelblupinenanbau getan wurde. Angesichts einer

Überschußproduktion landwirtschaftlicher Produkte, vor allem bei Getreide, sind Produktionsalternativen gefragt. Die Gelbe Süßlupine mit einem hohen Anteil an wertvollem Protein, die auch weitestgehend ökologischen Anforderungen im Anbau gerecht wird, kann hierzu einen wertvollen Beitrag leisten.

15 Neue Erkenntnisse in der Produktionstechnik bei gelben und weissen Süßlupinen

Johann Brunner

Aschach, Zum Weinberg 7

92272 Freudenberg

Zusammenfassung

In den Jahren 1993 und 1994 wurde versucht, die Reaktion der gelben und weissen Süßlupine auf Herbizidmaßnahmen, auf den Einsatz von Nährstoffen als Einzelelement und als Mischung und auf den Einsatz von Fungiziden festzustellen. Beim Einsatz von Herbiziden stellten sich einige Varianten im Voraufbau (kvD = kurz vor dem Durchstoßen) als für die Praxis empfehlenswert heraus. Mit Ausnahme eines Mittels für gelbe Lupinen kann für den Einsatz im Nachaufbau derzeit noch kein Mittel als verträglich angesehen werden. Die Anwendung von Blattdüngern erwies sich zumindest zum Zeitpunkt des Blühbeginns als ertraglich negativ, außer die Düngung wurde exakt auf den in einer Pflanzenanalyse ermittelten Bedarf abgestimmt. Krankheitsbekämpfung in Lupinen scheint nur bei starkem Befall mit dann spezifisch abgestimmtem Fungizideinsatz zu lohnen. Anthraknose ist derzeit nur über Verwendung von unbelastetem Saatgut sicher zu vermeiden oder zu bekämpfen.

15.1 Einleitung

Mit der Wiedereinführung des Lupinenbaus in die Praxis stellt sich sehr schnell die Frage, ob durch gezielte produktionstechnische Maßnahmen die Erträge gesichert oder erhöht werden können. Da sehr wenig aktuelles Wissen über den Einsatz von Herbiziden, Blattdüngern und Fungiziden verfügbar ist, sollte in bisher zweijährigen Exaktversuchen die Reaktion der beiden Süßlupinenarten auf o.g. produktionstechnische Maßnahmen untersucht werden.

15.2 Material und Methoden

Die Versuche wurden in den Jahren 1993 und 1994 auf Schlägen der Gutsverwaltung Ebermannsdorf bei Amberg/Opf. angelegt. Bei der gelben Lupine stand die Sorte Juno auf IS-Böden (35 BP; pH 5,8; Bodenversorgung bei P, K, Mg in Gehaltsklasse C). Die Saatstärke betrug 60 Kö/qm. Bei der weissen Lupine war die Sorte Amiga gewählt und wurde auf sL-

Böden (45 BP; pH 6,5; Bodenversorgung mit P, K und Mg ebenfalls in Stufe C) mit einer Aussaatstärke von 50 Kö/qm angebaut. Die randomisierten Versuche waren 4-fach wiederholt; die Parzellengröße betrug 3x15m, es erfolgte ein Kerndrusch von 1,25m Breite.

Bezeichnend für die Witterung war in beiden Jahren ein feuchtes Frühjahr mit nachfolgend großer Trockenheit und Hitze zur Abreife, wobei im Jahr 94 die Extreme noch größer waren.

Im Jahr 94 wurden teilweise andere Varianten untersucht, da sich zwischenzeitlich weitere Gesichtspunkte ergaben bzw. eingesetzte Mittel nicht mehr zugelassen waren. Bei der Auswahl der Mittel wurde auf Erfahrungen aus anderen Früchten zurückgegriffen, wo sich Mischungen, zu einem für die Pflanze unempfindlichen Stadium eingesetzt, in reduzierter Aufwandmenge als sehr wirksam und verträglich erwiesen haben.

15.3 Ergebnisse und Diskussion

Da zur Zeit wenig Herbizide in Lupinen für den Einsatz im NA geeignet zu sein scheinen, konzentrierte sich die Versuchstätigkeit auf VA-Anwendungen. In der gelben Lupine (s. Tab. 1) hat sich als Standard der Einsatz von Stomp SC + Gardo- prim plus (kvD) mit sehr guter Verträglichkeit und Breitenwirkung erwiesen. Auch die Kombination von Stomp SC mit Pradone Kombi ist ähnlich zu sehen, mit Ausnahme der Wirkungslücke gegen Ausfallraps. Die Verträglichkeit von Boxer ist alleinig von nachfolgenden Niederschlägen abhängig; fallen unmittelbar nach der Anwendung höhere Niederschläge, ist mit Ertragseinbußen zu rechnen (1993!). Bei Gesatop kommt es ebenfalls zu Ertragsminderungen; dieses Mittel ist jetzt nicht mehr zugelassen. Beim Einsatz des Striegels ist exakt auf den Einsatzzeitpunkt zu achten (entweder deutlich vor dem Auflaufen oder erst wieder ab dem 4. Blatt!). Der Einsatz von Rübenerbiziden ist mit einem guten Wirkungsgrad und guter Verträglichkeit aber hohen Kosten verbunden. Als "Feuerwehr- maßnahme" eignet sich Lentagran im NA, allerdings ohne Zusatz von Bodenherbiziden (Gardoprim plus!). Sulfonylharnstoffe, wie Harmony, die zwar als kleeverträglich gelten, führen in Lupinen zu Totalschaden.

Die weiße Lupine reagiert auf den Einsatz von Herbiziden (s. Tab.2) ähnlich wie die gelbe Lupine. Bei den meisten Kombinationen ergeben sich analoge Wirkungs- und Verträglichkeitsergebnisse. Der Einsatz von Logran im NA ist mit sehr hohem Risiko verbunden und damit nicht zu empfehlen. Als mögliche Mittel mit guter Wirkung und Verträglichkeit zeigten sich Kombinationen von stomp SC mit Sencor oder Tribunal.

Tab. 1:

REAKTION DER GELBEN SÜSSLUPINE (Sorte:Juno) AUF HERBIZIDMASSNAHMEN					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 30,2 rel. 100,0	dt/ha 12,2 rel. 100,0
2		mechanisch Striegeln 3 x		93,7	—
3	kvD	Stomp SC l/ha Gesatop l/ha	0,8 0,3	78,5	—
4	NAK1	Stomp SC l/ha Gesatop l/ha	0,8 0,3	84,4	—
5	kvD	Stomp SC l/ha Boxer l/ha	0,8 0,5	94,6	116,5
6	kvD	Stomp SC l/ha Pradone Kombi kg/h	0,8 0,3	117,2	—
7	kvD	Stomp SC l/ha Basagran l/ha	0,8 0,5	96,8	—
8	kvD	Stomp SC l/ha Gardoprim plus l/ha	0,8 1,5	117,6	103,5
9	NAK	Boxer l/ha Harmony g/ha	2,0 10,0	0,0	—
10	NAK	Boxer l/ha Pradone Kombi kg/h	2,0 1,0	98,7	—
11	TS 90 Gr. TS 140 Gr.	Goltix kg/ha Pyramin kg/ha Öl l/ha Goltix kg/ha Pyramin kg/ha Bet. Tandem l/ha	0,5 0,5 1,0 1,0 1,0 0,5	103,1	—
12	NAK	Lentagran kg/ha	2,0	—	98,9
13	kvD	Goltix kg/ha Pradone Kombi kg/h	1,0 1,0	—	118,7
14	NAK	Lentagran kg/ha Gardoprim plus l/ha	1,0 1,5	—	62,1

Tab. 2:

REAKTION DER WEISSEN SÜSSLUPINE (Sorte:Amiga) AUF HERBIZIDMAßNAHMEN					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 44,1 rel. 100,0	dt/ha 28,8 rel. 100,0
2		mechanisch Striegeln 3 x		65,7	—
3	kvD	Stomp SC l/ha Gesatop l/ha	0,8 0,3	86,1	—
4	NAK1	Stomp SC l/ha Gesatop l/ha	0,8 0,3	82,4	—
5	kvD	Stomp SC l/ha Boxer l/ha	0,8 0,5	89,4	137,5
6	kvD	Stomp SC l/ha Pradone Kmbi kg/ha	0,8 0,3	78,6	—
7	kvD	Stomp SC l/ha Basagran l/ha	0,8 0,5	92	—
8	kvD	Stomp SC l/ha Gardoprim plus l/ha	0,8 1,5	91,3	127,6
9	NAK	Boxer l/ha Harmony g/ha	2,0 10,0	0,0	—
10	NAK	Boxer l/ha Pradone Kombi kg/h	2,0 1,0	84,7	—
11	sp. NA	Logran g/ha	20,0	—	75,7
12	kvD	Stomp SC l/ha Sencor kg/ha	0,8 0,3	—	138,1
13	kvD	Stomp SC l/ha Tribunil kg/ha	0,8 1,0	—	131,9

Tab. 3:

REAKTION DER GELBEN SÜSSLUPINE (Sorte:Juno) AUF SPURENELEMENTDÜNGUNG					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 23,7 rel. 100,0	dt/ha 15,8 rel. 100,0
2	VA Boden	Bittersalz kg/ha Mangansulfat kg/ha Cupravit kg/ha Zinksulfat kg/ha Solubor kg/ha Na-Molybdat kg/ha	20,0 5,0 1,0 1,0 5,0 0,5	130,1	104,4
3	Beg.Bl. nach PA	Bittersalz kg/ha Solubor kg/ha Cupravit kg/ha	5,0 4,0 0,4	111,2	—
4	Beg.Bl.	Bittersalz kg/ha Mangansulfat kg/ha Cupravit kg/ha Zinksulfat kg/ha Solubor kg/ha Na-Molybdat g/ha	5,0 1,0 0,2 0,2 1,0 100,0	119,1	89,8
5	Vollbl.	Na-Molybdat g/ha	100,0	114,5	88,0
6	Vollbl.	SSA kg/ha	10,0	132,6	—
7	Beg.Bl.	Bittersalz kg/ha	5,0	81,9	66,8
8	Beg.Bl.	Mangansulfat kg/ha	1,0	74,4	77,2
9	Beg.Bl.	Cupravit kg/ha	0,3	76,1	76,2
10	Beg.Bl.	Zinkchelate l/ha	0,3	82,1	77,2
11	Beg.Bl.	Solubor kg/ha	1,0	93,0	71,3
12	Beg.Bl.	Netzschwefel kg/ha	10,0	—	85,4

Tab. 4:

REAKTION DER WEISSEN SÜSSLUPINE (Sorte: Amiga) AUF SPURENELEMENTDÜNGUNG					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 40,3 rel. 100,0	dt/ha 32,2 rel. 100,0
2	VA Boden	Bittersalz kg/ha Mangansulfat kg/ha Cupravit kg/ha Zinksulfat kg/ha Solubor kg/ha Na-Molybdat kg/ha	20,0 5,0 1,0 1,0 5,0 0,5	120,1	148,6 inkl. Thiovit
3	Beg. Bl. nach PA	Bittersalz kg/ha Solubor kg/ha Cupravit kg/ha	5,0 4,0 0,4	87,9	---
4	Beg. Bl.	Bittersalz kg/ha Mangansulfat kg/ha Cupravit kg/ha Zinksulfat kg/ha Solubor kg/ha Na-Molybdat g/ha	5,0 1,0 0,2 0,2 1,0 100,0	84,8	96,4
5	Vollbl.	Na-Molybdat g/ha	100,0	131,7	93,3
6	Vollbl.	SSA kg/ha	10,0	74,7	---
7	Beg. Bl.	Bittersalz kg/ha	5,0	110,8	89,1
8	Beg. Bl.	Mangansulfat kg/ha	1,0	83,8	---
9	Beg. Bl.	Cupravit kg/ha	0,3	104,1	85
10	Beg. Bl.	Zinkchelat l/ha	0,3	102,2	93,5
11	Beg. Bl.	Solubor kg/ha	1,0	78,8	95,7
12	Beg. Bl.	Netzschwefel kg/ha	10,0	---	93,6

Tab. 5:

EINSATZ VON FUNGIZIDEN IN DER WEISSEN SÜSSLUPINE (Sorte: Amiga)					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 40,3 rel. 100,0	dt/ha 32,2 rel. 100,0
2	Vollbl.	Derosal l/ha Verisan l/ha Radam 60 l/ha	0,5 0,5 0,2	94,6	91,2
3	Vollbl.	Tiptor l/ha Verisan l/ha	0,3 0,5	81,8	---
4	Vollbl.	Derosal l/ha Bravo l/ha	0,5 0,5	---	92,4

Tab. 6:

EINSATZ VON FUNGIZIDEN IN DER GELBEN SÜSSLUPINE (Sorte: Juno)					
Var.	Stadium	Mittel	Menge	1993	1994
1		unbehandelt		dt/ha 23,7 rel. 100,0	dt/ha 15,8 rel. 100,0
2	Vollbl.	Derosal l/ha Verisan l/ha Radam 60 l/ha	0,5 0,5 0,2	134,6	77,9
3	Vollbl.	Tiptor l/ha Verisan l/ha	0,3 0,5	101,3	---
4	Vollbl.	Derosal l/ha Bravo l/ha	0,5 0,5	---	89,8

Der Einsatz von Nährstoffen (s. Tab.3), die für Leguminosen eine spezielle Bedeutung haben (S, Mg, Mn, B, Cu, Zn, Mo), erwies sich bei Anwendung als Blattdünger sowohl als Einzelelement als auch in Mischung als problematisch und hatte i.d.R. Mindererträge zur Folge. Der Mehrertrag von SSA könnte auf eine N-Wirkung zurückzuführen sein. Nur die Anwendung von Nährstoffen, die in der Pflanzanalyse (PA) deutlich im Mangel waren, brachte gesicherte Ertragszuwächse. Die Applikation von Nährstoffmischungen im VA auf den Boden führte ebenfalls zu deutlichen Ertragssteigerungen.

Die weiße Lupine reagiert auf den Einsatz von Blattdüngern analog zur gelben. Leichte Ertragszuwächse bei Cu und Zn in 1993 sind nicht absicherbar. Die Düngung mit Mo brachte in 93 gesicherte Mehrerträge, in 94 aber nicht. Selbst die Düngung nach PA hatte bei der weißen Lupine Ertragsverluste zur Folge. Bezeichnend aber ist wiederum der Erfolg bei der Bodendüngung im VA.

Die o.g. Ertragsreaktionen der gelben und weißen Lupine auf Blattdünger sind vielleicht damit zu erklären, daß die Anwendung im Versuch (i.d.R. zu Blühbeginn) deutlich zu spät erfolgte und den Nährstoffhaushalt der Pflanze "durcheinander" brachte. Es wäre daher in Zukunft zu untersuchen, wie die einzelnen Lupinenarten bei Anwendung von Blattdüngern im frühen Jugendstadium reagieren.

Beim Einsatz von Fungiziden zur Krankheitsbekämpfung ist natürlich auf das vorhandene Erregerspektrum Rücksicht zu nehmen. In der gelben Lupine (s. Tab. 5) waren nur in 1993 stärkere Fusariuminfektionen festzustellen, während in 1994 durch die starke Hitze zur Abreife die Krankheiten nicht zu Ertragsbegrenzungen führen konnte. So ist auch die enorme Erhöhung des Ertrages durch die Kombination aus Derosal, Verisan und Radam 60 zu erklären, der man auch in anderen Früchten gute Fusariumwirkung zuschreibt.

Bei der weißen Lupine war in beiden Jahren äußerst wenig Erregerpotential festzustellen, was die leichten Ertragsminderungen im Versuch erklären kann. Die enormen Mindererträge der Mischung Tiptor und Verisan könnte durch die Azolwirkung (Tiptor = Sportak + Alto) erklärt werden; in diesen Parzellen war ein deutlich längeres "grün erhalten" und eine stark verzögerte Abreife zu beobachten.

Ein 1-jähriger Versuch zur Bekämpfung der Anthraknose in weißer Lupine, in dem deutlich belastetes Saatgut verwendet wurde, ergab, daß sowohl Beizen als auch Fungizideinsatz äußerst begrenzte Wirkungsmöglichkeiten haben. In der Praxis ist deshalb unbedingt auf die Verwendung einwandfreien Saatgutes zu achten!

16 Untersuchungen zur Ertragsstruktur neuerer Sorten der Gelben und Weißen Süßlupine

Eva-Maria Ruhl

Parkweg 1

96178 Pommersfelden

Zusammenfassung

Verschiedene Sorten von *L. albus* und *L. luteus* wurden 1993 in zwei Feldversuchen auf ihre Ertragsstruktur hin untersucht. Die verschiedenen Wuchstypen der einzelnen Sorten konnten aufgrund der feucht-kühlen Juli-Witterung gut beobachtet werden. So zeichneten sich 'Vladimir', 'Ámiga' (*L. albus*) und 'Juno' (*L. luteus*) durch determinierten Wuchstyp aus während 'Nelly', 'Streng Ga 3b3' (*L. albus*) und 'Topaz' (*L. luteus*) ein starkes vegetatives Wachstum zeigten. Als ertragsbestimmend erwiesen sich bei *L. luteus* der Haupttrieb, bei *L. albus* die Verzweigungen 1. Ordnung. Nach dem Bestandesdichtenvergleich sind Saatstärken von 45 Körnern/ m² sowohl bei *L. albus* als auch bei *L. luteus* als zu gering anzusehen. Berücksichtigt man pflanzenbauliche und ökonomische Aspekte, so ist bei den Weißlupinen eine Saatstärke von 55 - 60 Körnern/ m², bei den Gelblupinen von 70 - 80 Körnern/ m² anzustreben.

Abstract

The yield structure of different varieties of *L. albus* and *L. luteus* were investigated by two field trials in 1993. The different architectures of the single varieties could be well recognized because of the dank weather in July. So 'Vladimir', 'Ámiga' (*L. albus*) and 'Juno' (*L. luteus*) stand out for a determinate architecture while 'Nelly', 'Streng Ga 3b3' (*L. albus*) and 'Topaz' (*L. luteus*) showed a strong vegetative growth. Yield was determined in *L. luteus* by the mainstem, in *L. albus* by the first-order branches. Comparing the plant densities, seed rates of 45 seeds/ m² as well in *L. albus* as in *L. luteus* are too low. Considering aspects of plant cultivation and economy in the White Lupins a seed rate of 55 - 60 seeds/ m² and in the Yellow Lupins of 70 - 80 seeds/ m² appear optimal.

Key words

L. albus, *L. luteus*, plant structure, yield structure, plant density, variety characterization

16.1 Einleitung

Der Anbau von Körnerleguminosen hat, gefördert durch die Agrarpolitik der EU, in den letzten Jahren zunehmend an Attraktivität gewonnen. Somit rückt auch die Süßlupine als dritte heimische Eiweißfrucht neben Ackerbohnen und Körnererbsen wieder mehr ins Bewußtsein von Landwirtschaft und Beratung. In der folgenden Arbeit wurden am Markt befindliche Sorten von *L. albus* und *L. luteus* in Feldversuchen auf ihre Ertragsstruktur hin untersucht und in ihrer Tauglichkeit für den praktischen landwirtschaftlichen Anbau beurteilt.

16.2 Material und Methoden

Beide Versuche wurden im Sommer 1993 am Standort Triesdorf durchgeführt.

16.2.1 Versuch 1 (Wannenmühle)

Versuch 1 sollte die Frage des Einflusses verschiedener Be-standesdichten auf die Höhe des Kornertrages klären. Angelegt wurde er auf dem Versuchsfeld der Fachhochschule an der Wannenmühle. Ursprünglich nur zu visuellem Sortenvergleich gedacht, waren je 4 Parzellen der Weißen Süßlupinen 'Vladimir' und 'Amiga' in Streifen hintereinander mit einheitlich 60 Körnern/ m² angesät worden. Zur Untersuchung verschiedener Bestandesdichten wurden jeweils zwei Parzellen auf doppelten Reihenabstand vereinzelt. Je Parzelle wurden 5 Einzelpflanzen zur Beobachtung markiert.

16.2.2 Versuch 2 (Saatzucht)

Versuch 2 wurde von der Saatzeit Triesdorf angelegt. Hier sollte die Höhe des Kornertrages neben unterschiedlichen Bestandesdichten auch in Abhängigkeit von einer Rhizobium-Impfung ermittelt werden. Zum Anbau kamen je zwei Sorten der Arten *L. albus* und *L. luteus*. Bei den Weißen Süßlupinen waren dies 'Nelly' und der Stamm 'Streng Ga 3b3' (in Folge nur noch kurz mit 'Streng' bezeichnet), bei den Gelben 'Juno' und 'Topaz'. Die Anlage erfolgte für beide Arten nach dem gleichen Schema einer zweifaktoriellen Blockanlage mit sechs Wiederholungen. Jeder Block enthielt beide Sorten mit Saatstärken von 40/ 60/ 80 Körnern/ m² in je einer ungeimpften und einer geimpften Variante. Zur Einzelpflanzenbeobachtung wurden je Sorte 18 Pflanzen markiert.

16.3 Ergebnisse

16.3.1 Klima (Abb. 1 + 2)

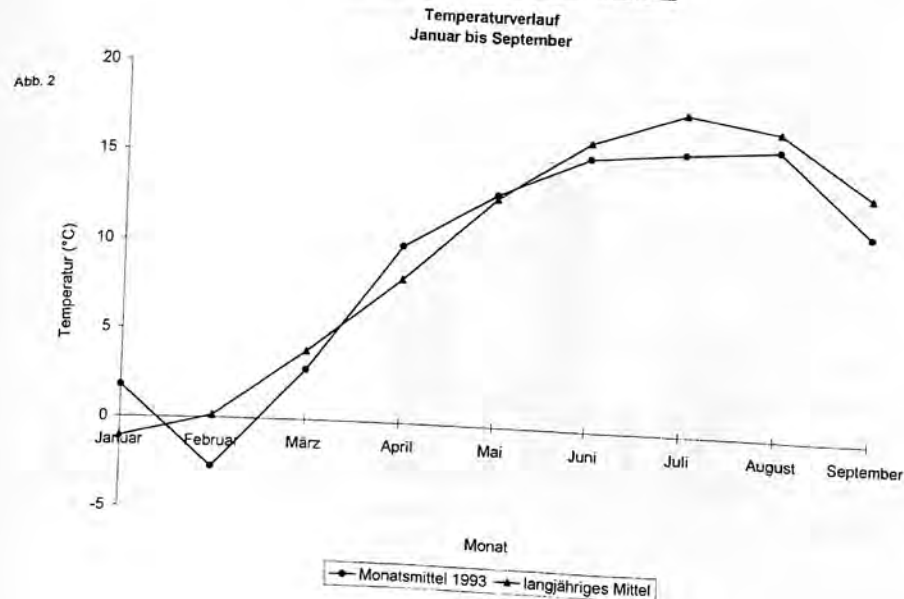
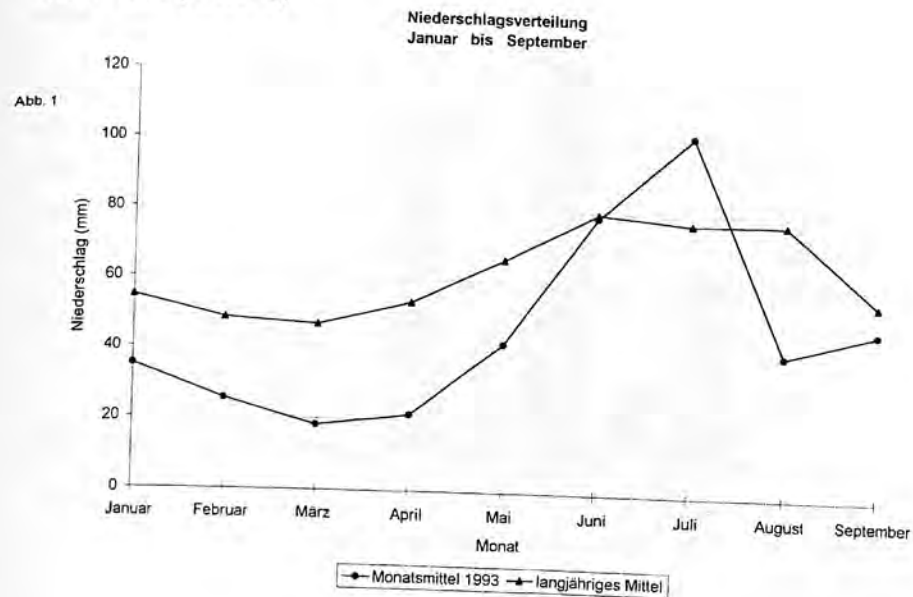


Abb 3

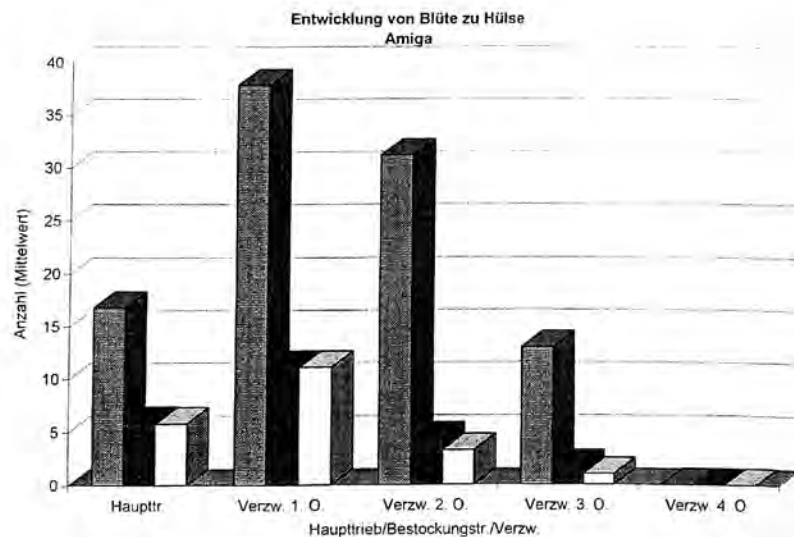
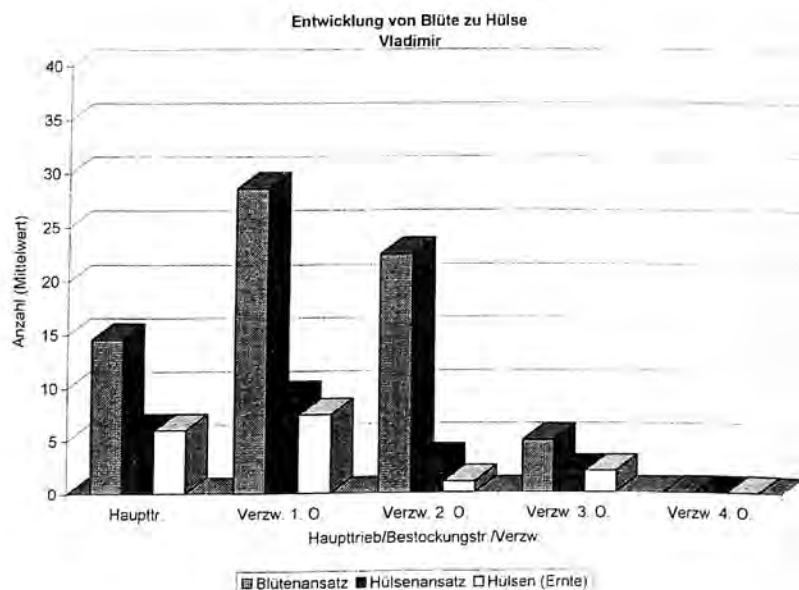


Abb 4



Triesdorf liegt in Mittelfranken ca. 12 km südlich von Ansbach auf 443 m Höhe. Der durchschnittliche Jahresniederschlag beträgt 679 mm, die Jahresdurchschnittstemperatur 7,7 °C. Der Standort Triesdorf ist durch häufige Trockenperioden, eine raue ungeschützte Lage und tätige, wechselnde lehmige Sandböden gekennzeichnet.

Die Niederschlagsmenge von Januar - Mai 1993 lag monatlich um durchschnittl. 25 mm unter dem langjährigen Mittel, der Boden trocknete frühzeitig ab und ermöglichte eine problemlose Aus-saat (31.03. bzw. 01.04.). Fast tägliche geringe Niederschläge in den ersten beiden Aprildekaden und durchweg hohe Temperaturen führten zu einem raschen Feldaufgang. Erst im Juni erreichte die Niederschlagsmenge wieder das Niveau des langjährigen Mittels. Bei kühler Witterung, die auch den sehr nassen Juli prägte, setzte bei einigen Sorten ein starkes vegetatives Wachstum ein. Einem trockenem August folgte eine feuchte erste Septemberhälfte, wodurch die Ernte von *L. albus* um 1 - 2 Wochen verzögert wurde. Insgesamt fielen in dieser Vegetationsperiode 148,50 mm weniger Niederschlag als im langjährigen Mittel.

16.3.2 Entwicklung von Blüten zu Hülsen bei *L. albus* (Abb. 3 - 6)

Bei den Weißlupinen fand sich der höchste Blütenansatz des Haupttriebes bei 'Streng' mit durchschn. 18,2 Blüten. Es folgten 'Amiga' mit 16,8, 'Nelly' mit 15,4 und 'Vladimir' mit 14,5 Blüten. Der Hülsenansatz bewegte sich bei allen um die 6, lediglich 'Nelly' lag mit 5,3 Hülsen etwas niedriger. Es traten kaum Hülsenverluste bis zur Ernte auf.

Der Blütenansatz der Verzweigungen 1. Ordnung lag bei 'Amiga' mit 37,8 mit Abstand am höchsten. Es folgten 'Nelly' mit 30,2 und 'Vladimir' und 'Streng' mit 28,6 bzw. 28,1 Blüten. 'Amiga' setzte hier 11,1 Hülsen an, 'Vladimir' 9,1, 'Nelly' 8,6 und 'Streng' nur 3,9. Zur Ernte waren bei 'Amiga' noch alle 11,1 Hülsen vorhanden während die anderen Sorten leichte Verluste verzeichneten.

Auch an den Verzweigungen 2. Ordnung wies 'Amiga' mit 31,2 den höchsten Blütenansatz auf. Es folgten 'Streng' mit 29,4, 'Nelly' mit 27,1 und 'Vladimir' mit 22,5 Blüten. 'Nelly' entwickelte hier 6,3 Hülsen, 'Amiga' 4,4, 'Vladimir' 3,1 und 'Streng' 2,6 Hülsen. Auch hier zeichnete sich 'Amiga' mit den geringsten Hülsenverlusten zur Ernte aus.

An den Verzweigungen 3. Ordnung zeigten sich bei 'Streng' 15,5 Blüten, bei 'Amiga' 12,9, 'Nelly' und 'Vladimir' wiesen 6,3 bzw. 4,9 Blüten auf. Den höchsten Hülsenansatz finden wir hier bei 'Vladimir' mit 2 Hülsen, 'Amiga' entwickelte 1,8, 'Nelly' und 'Streng' beide 1,3 Hülsen. Diese verblieben zur Ernte bei 'Vladimir' und 'Nelly' ohne Verluste, 'Amiga' zeigte noch eine Hülse und 'Streng' konnte zur Ernte keine mehr vorweisen. An den Verzweigungen 4. Ordnung zeigte lediglich 'Streng' einen geringen Blütenansatz von 1,5 woraus sich jedoch keine Hülsen entwickelten.

Abb. 5

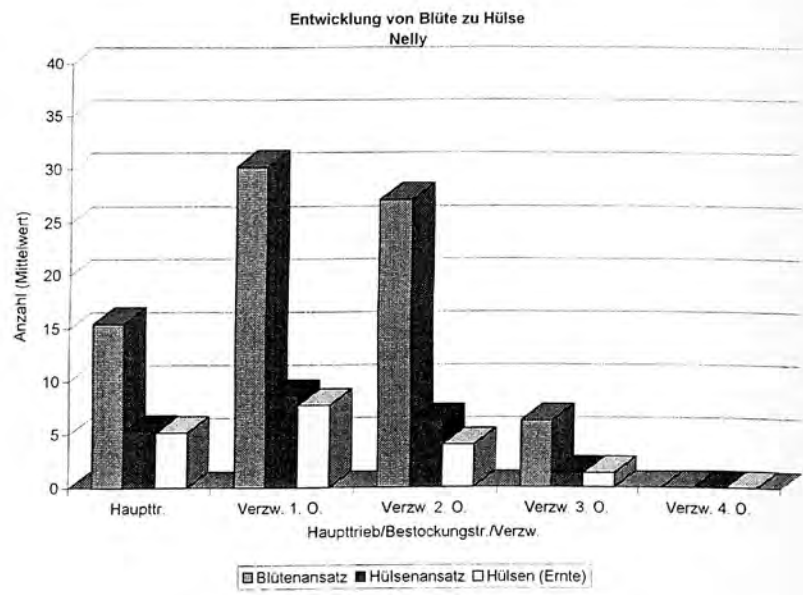


Abb. 6

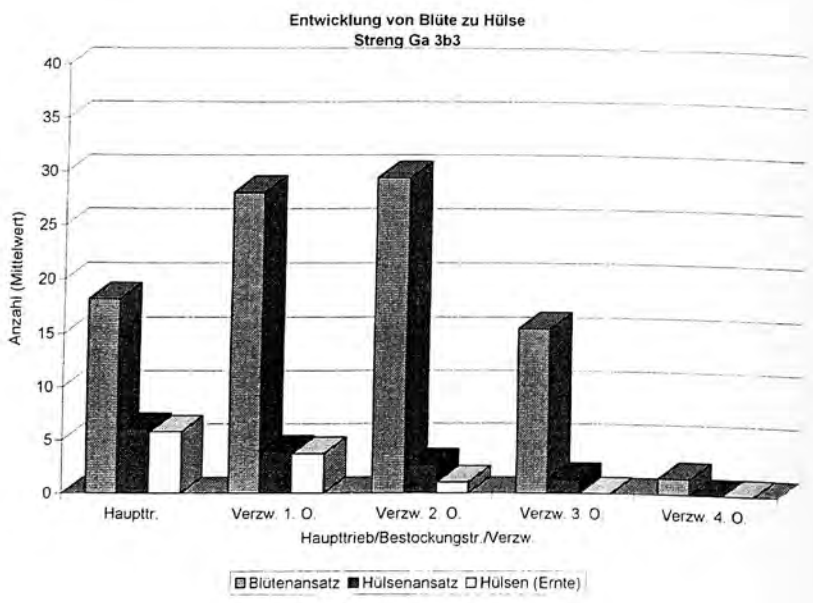


Abb. 7

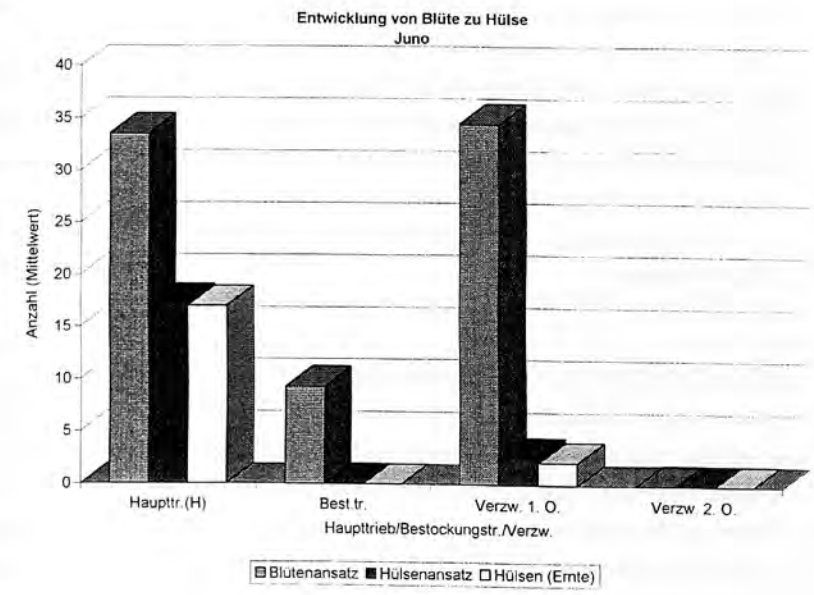
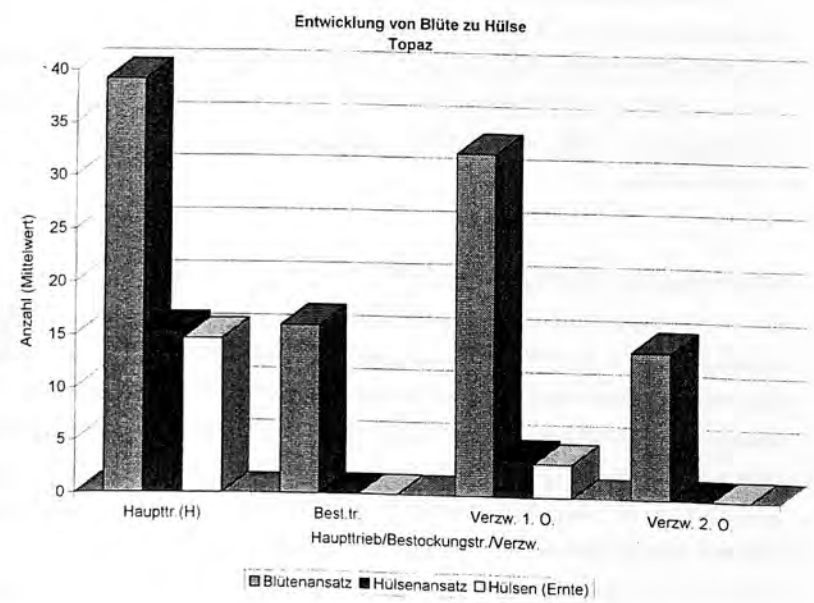


Abb. 8



Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Blütenumwandlungsrate bei allen Sorten am Haupttrieb am höchsten war und mit steigen-der Ordnung der Verzweigungen abnahm. Ebenso sank i.a. der Blü-tenansatz mit Höhe der Verzweigungen (Ausnahme: 'Streng', Verz. 2. O.). Die höchste Kontinuität im Erhalt angesetzter Hülsen war bei 'Amiga' zu finden. 'Amiga' deckte einen hohen Anteil ihres Ertrages über die Ver-zweigungen 1. Ordnung und wies hier im Hülsenansatz die größte Differenz zum Haupttrieb auf. 'Nelly' deckte mit 4 von insgesamt 12,9 entwickelten Hülsen noch fast 1/3 ihres Ertrages über die Verzweigungen 2. Ordnung.

Die Verzweigungen 3. Ordnung hatten bei allen Sorten einen ver-schwindend geringen Anteil am Gesamtertrag.

16.3.3 Entwicklung von Blüten zu Hülsen bei *L. luteus* (Abb. 7 + 8)

Bei den Gelblupinen wird hier zusätzlich der Blütenansatz z. T. vorhandener Bestockungstriebe angegeben. Von je 18 untersuchten Pflanzen wiesen bei 'Juno' 10, bei 'Topaz' 13 Pflanzen Bestockungstriebe auf. Der Blütenansatz des Haupttriebes betrug bei 'Juno' 33,5, bei 'Topaz' 39,2 Blüten. Davon wurde bei 'Juno' etwa die Hälfte (17,2) in Hülsen umgewandelt, bei 'Topaz' entwickelten sich 15,3 Hülsen. Beide wiesen mit 17 bzw. 14,7 Hülsen zur Ernte sehr ge-ringe Verluste auf.

An den Verzweigungen 1. Ordnung setzte 'Juno' 34,5 Blüten an, bei 'Topaz' waren es 32,3. Diese wurden jedoch nur zu einem ge-ringen Teil zu Hülsen weiterentwickelt ('Juno' 2,6, 'Topaz' 3,5), die dann aber mit nur geringen Verlusten bis zu Ernte erhalten blieben. Während sich 'Juno' nur bis zur 1. Ordnung verzweigte, wies 'Topaz' auch an Nebentrieben 2. Ordnung noch 14 Blüten auf, die sich jedoch, ebenso wie die Blüten an den Bestockungstrieben, nicht zu Hülsen weiterentwickelten.

16.3.4 Blütenumwandlungsrate (Abb. 9)

Die Gesamtblütenumwandlungsrate an Haupt- und Nebentrieben ergab folgende Sortenunterschiede: Den höchsten Hülsenansatz verzeichnete 'Vladimir', gefolgt von 'Nelly' und 'Juno'. 'Streng' setzte mit nur rd. 15 % nur halb so viele Hülsen an wie 'Vladimir'. Die gelben Sorten 'Juno' und 'Topaz' wiesen die geringsten Differenzen zwischen Hülsenansatz und den bei der Ernte noch verbliebenen Hülsen auf, was v.a. auf den hohen Hülsenanteil des Haupttriebes zurückzuführen ist. 'Amiga' folgte mit einem Hülsenverlust zur Ernte von knapp 2% vor 'Streng' (-3,6%), 'Nelly' (-4,1 %) und 'Vladimir' (-5,3 %).

16.3.5 Körner/ Hülse (Abb. 10)

'Amiga' enthielt mit 4,41 die höchste Anzahl Körner/ Hülse. Es folgten 'Juno' (4,38) und 'Topaz' (4,28). Die übrigen weißen Sorten lagen bei etwa 4 Körnern. Der Anteil tauber Körner je Hülse war bei 'Streng' mit 9,7 % am niedrigsten während 'Juno' mit 22,8 % vor 'Nelly' (21,4 %) und 'Topaz' (20,4 %) den höchsten Anteil aufwies. 'Amiga' und 'Vladimir' lagen mit 16,3 % bzw. 15,3 % im Mittelfeld.

16.3.6 Kornerträge der Einzelpflanzen (Tab. 1)

Vergleicht man die Kornerträge der Weißen Lupinen miteinander, so sind starke Differenzen festzustellen. Die niedrigen Erträge von 'Nelly' und 'Streng' sind z.T. auf Krankheitsbefall zurück-zuführen. Dennoch bringt 'Amiga' den mit Abstand höchsten Er-trag, weist aber auch die größte Schwankungsbreite auf. Den aus-geglichensten Eindruck macht hier 'Vladimir' bei einem Korner-trag von knapp 18 g. Bei den Gelblupinen lag 'Juno' um rd. 1,4 g im Kornertrag höher als 'Topaz'. Die Gelblupinen wiesen geringere Ertragsschwankung-en auf als die Sorten der Weißlupine.

Tab. 1 Kornerträge

		Vladimir	Amiga	Nelly	Streng	Juno	Topaz
FM um	MW	17,95	29,08	15,11	11,35	8,99	7,55
TM korr. (g)	s	± 5,58	± 10,89	± 9,59	± 7,70	± 2,85	± 2,90

16.3.7 Parzellenkornerträge (Tab. 2 + 3)

Am Versuchsfeld Wannemühle (Tab. 2) konnte aufgrund des ungleichmäßigen Pflanzenbestandes durch Wildverbiß und Feldaufgang nur ein Sortenvergleich durchgeführt werden. Die Klärung des Einflusses unterschiedlicher Bestandesdichten auf den Kornertrag mußte entfallen. Die durchschnittliche Bestandesdichte betrug bei 'Vladimir' 30 Pfl./ qm, bei 'Amiga' dagegen 34 Pfl./ qm. Angeglichen an die Bestandesdichte 'Vladimir's' erbrachte 'Amiga' mit 32,8 dt/ ha einen Mehrertrag von 6,66 dt/ ha ('Vladimir': 26,14 dt/ ha). Dieser Mehrertrag konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden.

Im Versuchsfeld der Saatzucht (Tab. 3) mußte die Prüfung auf signifikante Differenzen zwischen den Impfvarianten entfallen, da durch bereits im Boden vorhandene Knöllchenbakterien

(Lupinenanbau bereits 3 Jahre vorher) kein eindeutiger Rückschluß auf einen ertragssteigernden Einfluß der Impfung gezogen werden konnte.

Es wurden folgende Aspekte statistisch überprüft:

- Einfluß der Bestandesdichte auf den Kornertrag
- Vergleich der Sorten untereinander
- Vergleich der Bestandesdichten
-

Tab. 2: Parzellenkornerrträge

Parzellenkornerrträge Feld Wannenmühle

Sorte	Best.dichte Pfl./ m ²	TM (dt/ ha)	
		MW	s
Vladimir	30	26,14	± 2.75
Amiga	30	32,80	± 4.43

Tab. 3: Saatstärke und Erträge

Sorte	Saatstärke Körner/ m ²	TM (dt/ ha)	
		MW	s
Nelly	45	31,36	± 7.27
	60	39,01	± 5.98
	80	38,34	± 6.26
Streng Ga 3b3	45	35,08	± 7.72
	60	38,72	± 5.94
	80	41,92	± 7.79
Juno	45	24,15	± 2.63
	60	23,76	± 1.37
	80	27,50	± 2.45
Topaz	45	23,89	± 2.89
	60	25,60	± 2.63
	80	25,95	± 1.63

Abb. 9

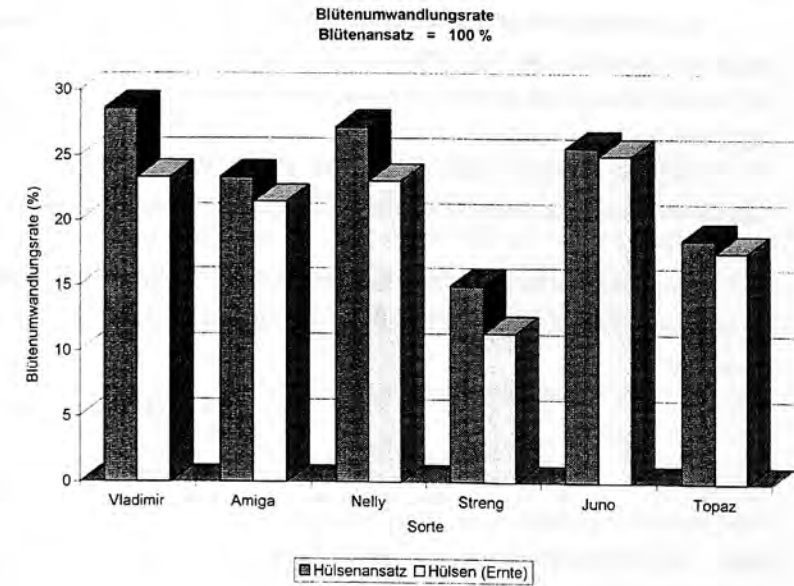
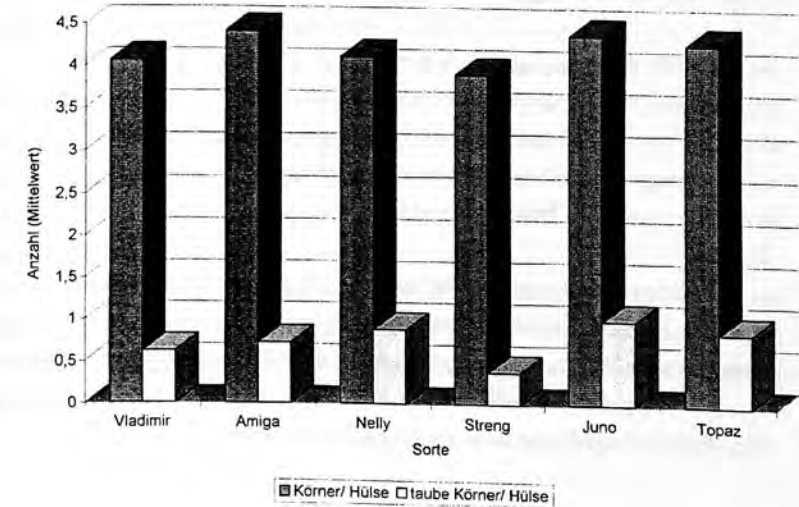


Abb. 10

Körner / Hülse



L. albus

Die Weißlupinen 'Nelly' und 'Streng' zeigten laut Varianzanalyse hoch signifikante bzw. signifikante Unterschiede. Bei 'Nelly' differiert nach dem Duncan-Waller-Test die Variante 1 (45 K/m²) von den beiden anderen, bei 'Streng' unterscheiden sich lediglich die Varianten 1 und 3 (80 K/m²) auf dem 5%-Niveau signifikant.

Vergleicht man beide Sorten untereinander, so sind nach der Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede feststellbar, der Mittelwertvergleich ergibt dagegen signifikante Unterschiede.

Ein Vergleich der Bestandesdichten läßt lt. Varianzanalyse keine signifikanten Differenzen erkennen während sich nach Duncan-Waller die Variante 1 von den Varianten 2 und 3 signifikant unterscheidet.

Tab. 4: Tausendkorngewicht

Sorte	TKG (g)		(%)
	MW	s	v
Vladimir	411,50	± 40,93	9,95
Amiga	421,25	± 58,90	13,98
Nelly	382,17	± 29,05	7,60
Streng Ga 3b3	413,00	± 27,68	6,70
Juno	131,33	± 10,86	8,27
Topaz	148,17	± 7,73	5,22

L. luteus

Hier unterscheiden sich bei 'Juno' und 'Topaz' die Bestandesdichten lt. Varianzanalyse hoch signifikant. Nach Duncan-Waller sind bei 'Juno' zwischen den Varianten 1 und 2 und Variante 3, bei 'Topaz' zwischen Variante 1 und den beiden anderen signifikante Unterschiede nachzuweisen.

Ein Vergleich beider Sorten ergibt, wie bei den Weißlupinen, lt. Varianzanalyse keine, nach dem Mittelwertvergleich aber durchaus signifikante Unterschiede.

Vergleicht man hier die Bestandesdichten untereinander, so lassen sich lt. Varianzanalyse keine, lt. Duncan-Waller zwischen Variante 1 und 3 signifikante Differenzen feststellen.

16.3.8 Tausendkorngewicht

Das mit Abstand höchste TKG von 421,25 g, aber auch der höchste Varianzkoeffizient von 13,98 % war bei 'Amiga' zu beobachten. 'Streng' und 'Vladimir' lagen mit 413 g bzw. 411 g sehr nahe beieinander während 'Nelly' mit nur 382,17 das geringste TKG aufwies. Die Schwankungen im TKG waren bei 'Nelly' und 'Streng' wesentlich geringer als bei 'Amiga' und 'Vladimir'. 'Topaz' zeigte mit einem Varianzkoeffizienten von 5,22 % die höchste Ausgeglichenheit im TKG.

16.4 Diskussion und Abschluß

16.4.1 Versuchsanlage

Ich übernahm die Versuche erst zu einem Zeitpunkt, an dem Planung und Aussaat bereits stattgefunden hatten. So konnten nun aufgrund der verschiedenen Versuchsfelder und -anlagen allenfalls grobe Sortenvergleiche durchgeführt werden. Der Versuch, am Feld Wannemühle je Sorte zwei Parzellen auf doppelten Reihenabstand zu vereinzeln, scheiterte am ungleichmäßigen Feldaufgang und dem unterschiedlichen Wildverbiß der einzelnen Parzellen. Zudem waren durch die Anlage der Parzellen in Streifen hintereinander die Bodenunterschiede zwischen den Varianten zu wenig ausgeglichen. Die Anzahl der Wiederholungen wäre für einen Ertragsvergleich unterschiedlicher Reihenweiten zu gering gewesen.

Der Versuch der Saatzucht wurde mit je drei Bestandesdichten und zwei Impfvarianten pro Sorte angelegt. Da durch früheren Lupinenanbau bereits Knöllchenbakterien der entsprechenden Rhizobiumart im Boden waren, konnten keine direkten Rückschlüsse auf eventuelle Kornertragssteigerungen durch Impfung gezogen werden. Zur exakteren Einhaltung der Sollsaatzstärken und zur Vermeidung von Doppelstellen hätte sich bei *L. albus* besser eine Einzelkornsaat empfohlen.

An beiden Feldern wäre es interessant gewesen, die verbissenen Pflanzen zu bonitieren und ihre Weiterentwicklung genauer zu verfolgen, um die dadurch verursachten Ertragseinbußen exakter bestimmen zu können. Ebenso wäre eine Bonitur der aufgetretenen Krankheiten am Feld der Saatzucht angebracht gewesen.

16.4.2 Sortencharakteristik

'Vladimir' zeichnete sich durch die, im Vergleich zu den anderen untersuchten Sorten der Art *L. albus*, höchste Blütenumwandlungsrate aus. Die Anzahl der Körner/ Hülse entsprach etwa den Vergleichswerten von 'Nelly' und 'Streng'. Bei niedrigem Wuchs begann bereits ab Mitte August die Abreife. 'Vladimir' erbrachte einen gleichmäßig hohen Kornertrag.

'Amiga' kann als die Spitzensorte der Weißen Lupinen überhaupt angesehen werden. Sie wies an den Verzweigungen 1. Ordnung den höchsten Hülsenansatz aller Vergleichssorten auf und ist daher zur Erzielung eines hohen Ertrages nicht auf starke Verzweigung angewiesen. Die Blütenumwandlungsrate lag unter der von 'Vladimir' und 'Nelly', sie zeigte jedoch die höchste Kontinuität in der Erhaltung der angesetzten Hülsen bis zur Ernte und die höchste Kornzahl/ Hülse. Die Abreife erfolgte zügig und gleichmäßig. Der Kornertrag lag weit über dem der Vergleichssorten.

'Nelly' bot mit ihren langen, stark verzweigten Nebentrieben das wirrste Wuchs- und Reifebild. Der zweithöchsten Blütenumwandlungsrate stand jedoch die größte Differenz zwischen Hülsenansatz und bei der Ernte verbleibenden Hülsen gegenüber. Sie deckte noch fast 1/3 ihres Ertrages über die Verzweigungen 2. Ordnung. Mit der Anzahl Körner/ Hülse lag sie im Schnitt der Vergleichssorten, hatte hier allerdings die meisten tauben Körner/ Hülse zu verzeichnen. Sie erbrachte beim geringsten TKG den niedrigsten Kornertrag. Das Abreifeverhalten war als absolut ungenügend zu bezeichnen.

'Streng's Blütenumwandlungsrate betrug nur etwa die Hälfte der 'Vladimir's und lag wesentlich unter den Werten von 'Amiga' und 'Nelly'. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von knapp 4 Körnern pro Hülse konnte 'Streng' den geringsten Anteil tauber Körner/ Hülse aufweisen. Die Abreife erfolgte ungleichmäßig aber zügiger als bei 'Nelly'. Hier ist bis zur Sortenankennung noch einige Züchtungsarbeit zu leisten.

'Juno' wies eine wesentlich höhere Blütenumwandlungsrate auf als 'Topaz', fast alle angesetzten Blüten blieben bis zur Ernte erhalten. Sowohl die Anzahl Körner/ Hülse als auch der Anteil tauber Körner/ Hülse lagen leicht über den Vergleichswerten von 'Topaz'. 'Juno' verzweigte sich nur bis zur 1. Ordnung, setzte alle Hülsen im oberen Drittel an und reifte früh und sehr gleichmäßig ab. Sie brachte hohe Kornerträge.

'Topaz' hatte eine um einiges geringere Blütenumwandlungsrate als 'Juno'. Anzahl Körner/ Hülse und der Taubkomanteil lagen nur unwesentlich unter den Vergleichswerten von 'Juno'. 'Topaz' verzweigte sich bis zur 2. Ordnung und setzte hier auch Blüten an. Es fanden sich einige hohe indeterminierte Typen im Bestand. Die Abreife erfolgte etwas später und ungleichmäßiger als bei 'Juno'. Im Kornertrag konnten keine signifikanten Unterschiede zu 'Juno' festgestellt werden.

16.4.3 Einfluß der Bestandesdichte auf den Kornertrag

'Nelly' wies bereits ab einer Saatstärke von 60 Körnern/ qm einen signifikanten Mehrertrag gegenüber der Aussaat von 45 Körnern/ qm auf während 'Streng' erst ab 80 K/ qm eine signifikante Ertragssteigerung zeigte. Eine Verrechnung der Varianten über beide Sorten brachte ab 60 K/ qm einen signifikanten Mehrertrag, dagegen wurden zwischen den Saatstärken von 60 K/ qm und 80 K/ qm keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt.

Bei den Gelblupinen zeigten sich bei 'Topaz' bereits ab 60 K/ qm, bei 'Juno' erst ab 80 K/ qm signifikante Mehrerträge gegenüber einer Saatstärke von 45 Körnern. Eine Verrechnung über beide Sorten ergab ab einer Saatstärke von 80 Körnern/ qm einen signifikanten Mehrertrag.

Allgemein kann festgestellt werden, daß eine Saatstärke von 45 K/ qm sowohl bei *L. albus* als auch *L. luteus* auf jeden Fall zu niedrig angesetzt ist. Aufgrund dieser Versuche empfiehlt sich bei *L. albus* eine Aussaatstärke von 60 Körnern/ qm, bei *L. luteus* von 80 Körnern/ qm.

16.4.4 Einfluß der Rhizobium-Impfung auf den Kornertrag

Inwieweit eine Rhizobium-Impfung zu signifikanten Ertragssteigerungen führt, konnte nicht geklärt werden, da bereits entsprechende Rhizobiumstämme im Boden vorhanden waren und somit keine exakten Rückschlüsse auf eine Impfwirkung zuließen.

Abschließend ist festzustellen, daß die neuen determinierten Wuchstypen der Lupinen durchaus eine ertragreiche und ertrags-sichere Alternative zu Ackerbohnen und Körnererbsen darstellen. Durch ihre geringeren Bodenansprüche können sie auch auf schlechteren Standorten die Fruchtfolgen als heimische Körnerleguminosen auflockern und zur Verbesserung der Bodenstruktur beitragen.

16.5 Literaturverzeichnis

- Aksland, G. E. (1992): Breeding and selection of heat tolerant lupin in: Proceedings of the workshop on physiological and genetic approaches to adapting the architecture of the white lupin for successful cultivation in different regions of Europe, Lusignan, France
- Bayer, J.: Stages of Lupin Development Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur und Pflanzenbau (1993): Versuchsergebnisse Integrierter Pflanzenbau
- Bundessortenamt (Hrsg.)(1993): Beschreibende Sortenliste für Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln), Verlag A. Strothe, Frankfurt/ M.

- Hackbarth, J. & Troll, H.-J. (1959): in: Kappert, H., Rudolf, W. (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenzüchtung, Band 4, S. 1 - 48, Verlag P. Parey, Berlin und Hamburg
- Hegi, G. (1975): Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band 4, Teil 3, Verlag P. Parey, Berlin und Hamburg
- Hoffmann, W., Mudra, A., Plarre, W. (1985): Lehrbuch der Züchtung landw. Kulturpflanzen, Band 2, 2. Auflage, Verlag P. Parey, Berlin und Hamburg
- Julier, B., Huyghe, C., Papineau, J., Milford, G. F. J., Day, J. M., Billot, C., Mangin, P. (1993a): Seed yield and yield stability of determinate and indeterminate autumn-sown white lupins grown at different locations in France and the UK, *Journal of Agricultural Science* 121, S. 177 - 186
- Julier, B., Huyghe, C. (1993b): Description and model of the architecture of four genotypes of determinate autumn-sown white lupin as influenced by location, sowing date and density, *Annals of Botany* 72, S. 493 - 501
- Kruse-Saaten (1993): Schriftliche Mitteilung
- Milford, G. F. J., Day, J. M., Leach, J. E., Stevenson, H. J., Huyghe, C., Papineau, J. (1993): The effect of modifying plant structure on the yield and maturity of the white lupin, *Ann. appl. Biol.* 122, S. 113 - 122
- Pate, J. S., Sharkey, P. J., Atkins, C. A. (1977): Nutrition of developing legume fruit, *Plant Physiol.* 59, S. 506 - 510
- Pate, J. S., Williams, W., Farrington, P. (1985): Lupins in: Summerfield, R. J., Roberts, E. H.: *Grain legume Crops*, S. 699 - 746, Collins, London
- Pazy, B., Heyn, C. C., Herrenstadt, J., Plitmann, (1977): Studies in populations of the Old World Lupines, *Israel Journ. of Bot.* 26, S. 115 - 127
- Putnam, H. D., Wright, J., Field, A. L., Ayisi, K. K. (1992): Seed yield and water-use efficiency of white lupin as influenced by irrigation, row spacing and weeds, *Agronomy Journal* 84, S. 557 - 563
- Römer, P. (1994): Schriftliche Mitteilung
- Saaten-Union (Hrsg.)(1994): *Leguminosen - Neue Chancen durch Züchtungsfortschritt*
- Sengbusch, R. v. (1942): Süßlupinen und Öllupinen, *Landw. Jahrbuch* 91, S. 723 - 880
- Stützel, H., Aufhammer, W., Rautenkranz, A., Wagner, B., Falfus, J., Nalborczyk, E. (1993): Die Ertragsbildung und Ertragsstruktur eines konventionellen und eines epigonalen Genotyps der Weißen Lupine, *J. Agronomy & Crop Science* 170, S. 177 - 186

17 Round-Table-Diskussionen auf der 3. Heidelberger Lupinentagung,

17.1 "Aktuelle Probleme im praktischen Lupinenanbau: Anthracnose, Unkrautregulierung, Impfung"

Diskussionsleitung und Protokoll: Dr. Peter Römer

17.1.1 Anthracnose

Dr. RÖMER erläuterte zunächst die Bedeutung der Krankheit anhand einiger Symptombilder. Im Vorblütenstadium sind zunächst Verkrümmungen der Pflanzen erkennbar, die an einen Spritzschaden mit Wuchsstoffherbiziden erinnern. Auf der Innenseite der Verkrümmungen zeigen sich am Stengel Brennflecken mit braunem Rand und orangefarbenem Zentrum. Derartige Flecken sind später auch an den Hülsen sichtbar. Die Ertragsausfälle sind beachtlich, wichtiger aber noch ist die Tatsache, daß der Erreger (*Colletotrichum gloeosporioides*) durch das Saatgut übertragen wird. Weiterhin zeigte sich, daß ein erhebliches Erregerpotential von benachbarten Obstkulturen, vor allem von Erdbeeren, ausgeht. Es wurde die Vermutung geäußert, daß die Anthracnose ein Problem der Weißen Lupine sei. Aus den Rastatter Beobachtungen ist jedoch zu schließen, daß Gelbe Lupinen ebenso stark befallen werden, wenn ein entsprechender Befallsdruck vorhanden ist. Die Tatsache, daß bisher keine Schäden an Gelben Lupinen beobachtet worden sind, kann vor allem durch Standortfaktoren begründet sein. Zur Ausbreitung im Bestand braucht der Pilz nämlich Feuchtigkeit und Temperaturen von mindestens 20°C. Gelbe Lupinen werden aber vor allem in den trockeneren und kühleren Klimaten Norddeutschlands angebaut.

Das Problem der Anthracnose ist auch aus den Nachbarländern Frankreich und Österreich bekannt. Während man in Frankreich durch konsequente Saatguthygiene-Maßnahmen die Krankheit unter Kontrolle bekommen konnte, ist die Situation in Österreich besorgniserregend. Die zuständigen Mitarbeiter der Landwirtschaftskammern fürchten, daß der - ohnehin noch im Versuchsstadium befindliche - Lupinenanbau in Österreich durch die Anthracnose ganz zum Erliegen kommen könnte. Der Pilz wurde dort mit einer Saatgutpartie aus Südamerika eingeschleppt.

Herr BRUNNER wies darauf hin, daß bei Saatgutuntersuchungen in der Regel eine Mischinfektion von *Colletotrichum* und *Ascochyta* gefunden wurde. In der weiteren Diskussion wurden folgende Punkte angesprochen:

- Um die Ausbreitung des Pilzes mit dem Saatgut zu verhindern, müssen die Saatgutenerkennungsstellen über das Problem informiert werden. Befallene Partien müssen im Sinne der langfristigen Sicherung des Lupinenanbaus in Deutschland aberkannt werden. Außerdem sollten alle Saatgutvermehrter aufgeklärt werden, wie die Symptome aussehen und welche Bekämpfungsmöglichkeiten bestehen.
- Die Saatgutenerkennungsstellen müssen in die Lage versetzt werden, mit Hilfe einer einfachen Methode eine Prüfung des Saatgutes auf endogenen Pilzbefall vorzunehmen. Die von der Hanse Agro (Herr BRUNNER) entwickelte Methode beruht darauf, daß das Saatgut zunächst äußerlich sterilisiert wird, anschließend unter definierten sterilen Bedingungen zur Keimung gebracht und der Keimling etwa 14 Tage wachsen gelassen wird. Die entstehenden Pilzsporen werden dann mikroskopisch untersucht. Ob diese Methode für alle Anerkennungsstellen durchführbar ist, wurde bezweifelt. Ideal wäre ein Test, der zusammen mit der Keimprüfung erfolgt und der ohne zusätzlichen apparativen Aufwand auskommt. Denkbar wäre beispielsweise eine Identifizierung des Pilzes anhand von Symptomen des Keimlings. Frau U. FEILER wurde beauftragt, einen Kostenvoranschlag für die Ausarbeitung einer derartigen Methode zu machen. Wichtig ist, daß die Entwicklung des Testes so rasch wie möglich erfolgt.
- Eine längerfristig denkbare Möglichkeit, den Pilz zu identifizieren, wäre die Entwicklung einer PCR-Methode (Polymerase-Chain-Reaction). Ziel wäre die Entwicklung eines Test-Sets für die einfache praktische Anwendung, mit dem Art und Menge des Erregers festgestellt werden könnten. Dazu müßten aber erst spezifische Sonden entwickelt werden, was Zeit (etwa 2 Jahre) und Geld kostet. Für den Fall, daß es von dem Erreger mehrere Pathotypen gibt - was zu vermuten ist (!) - müßte für jeden Pathotyp eine Sonde entwickelt werden. Es wurde vorgeschlagen, den Versuch zu unternehmen, dieses in Form eines EG-Projektes anzugehen, möglicherweise auch über ein GFP-Projekt.
- Kurzfristige Bekämpfungsmöglichkeiten bestehen in der Beizung und mit Fungizidbehandlungen. In beiden Bereichen müssen Versuche mit geeigneten Präparaten gemacht werden. Hinsichtlich möglicher Beizmittel wurde Benlate genannt (= Benomyl). Weiterhin wurde die Elektronenstrahl-Beizung angesprochen, die jedoch aufwendig und für große Partien zu teuer ist.

- Eine ebenfalls als langfristig anzusehende Bekämpfungsmöglichkeit besteht in der Züchtung resistenter Sorten. Aus ökologischer Sicht ist diese den chemischen Möglichkeiten vorzuziehen, ein Erfolg wird - wenn überhaupt Resistenzen auffindbar sind - aber sicher erst in 5 oder mehr Jahren erwartet werden können.
- Ferner wurde die Überlegung geäußert, inwieweit es sich bei dem Erreger der Anthracnose um einen Schwächeparasiten handeln könnte. Wenn dem so wäre, könnten auch gezielte Maßnahmen der Pflanzenernährung vorbeugend gegen einen Befall wirken.

17.1.2 Unkrautregulierung

In Ergänzung der Untersuchungen von Herrn BRUNNER, die als eigener Beitrag in diesem Tagungsband enthalten sind, berichtete Herr SCHMIDT (Saatzucht STRENG) von Herbizidversuchen, die dieses Jahr in Zusammenarbeit mit der Firma CIBA GEIGY durchgeführt worden sind. Die genauen Ergebnisse sind im Anhang dieses Ergebnisprotokolls nachzulesen. Übereinstimmend zeigen die Untersuchungen, daß im Vorauflauf-Verfahren einige Möglichkeiten der chemischen Unkrautbekämpfung bestehen. Im Nachauflauf zeigten beide Untersuchungen übereinstimmend eine gute Kombination von Wirkung und Veträglichkeit der Mischung Stomp + Boxer.

Dr. ALBRECHT ergänzte die Ausführungen mit Ergebnissen der LUFA Dornburg. Danach schnitten die Varianten Tribunil (VA) + Lantar (NA), Lentagan (NA) und Fenican (VA) bei Weißen Lupinen am besten ab. Es wurde darauf hingewiesen, daß Tribunil aus dem Markt genommen wird.

Die im Laufe des Tages mehrfach geführte Diskussion um das Nachauflauf-Herbizid LOGRAN wurde noch einmal aufgenommen und vertieft. Übereinstimmend berichteten alle Versuchsansteller von Schäden an den Lupinen beim Einsatz im Jahr 1994. Dr. WEISSMANN hatte bei einer Tankmischung mit Sportak sogar einen Totalausfall seines Bestandes. Dr. RÖMER zeigte Ertragsergebnisse eines 1994 durchgeführten Spritzversuches, wobei die mit LOGRAN behandelten Varianten mit 20 % geringeren Erträgen reagierten (siehe Tabelle). Der Grund für diese Schäden, die in den beiden vorangegangenen Jahren nicht aufgetreten waren, liegt in erster Linie in der Jahreswitterung begründet. Der Herbizideinsatz erfolgte nach einer längeren Regenperiode, die die Wachsschicht der Pflanzen schwächte. Die nach der Behandlung einsetzende Hitzeperiode sorgte, verbunden mit Trockenheit, für einen zusätzlich auf die Pflanzen wirkenden Streßfaktor, was sich in den besagten Schäden äußerte. Nach diesen Erfahrungen kann LOGRAN für die landwirtschaftliche Praxis nicht mehr empfohlen werden.

Es wurde deutlich, daß eine Zusammenfassung aller bisherigen Versuche zum Einsatz von Herbiziden notwendig und davon ausgehend die Durchführung weiterer Versuche notwendig ist.

Tab. 1 Ergebnisse zum Einsatz des Nachauflauf-Herbizides "LOGRAN" in Weißen Lupinen
(Südwestdeutsche Saatzucht, Rastatt 1994)

Vorauslauf-Behandlung der gesamten Fläche mit 4 l/ha STOMP SC; LOGRAN-Spritzung am 08.06.1994, kurz vor Blühbeginn; Sorte: WEIBIT; Teilstückgröße: 11,5 x 4 = 46 m²

Herbizidvariante	Ertrag dt/ha	Ertrag rel. zur Kontrolle
Kontrolle (nur VA)	33,2	100 %
15g LOGRAN/ha (+ VA)	26,3	79 %
30g LOGRAN/ha (+ VA)	26,0	78 %

Schließlich wurden nicht-chemische Bekämpfungsmöglichkeiten angesprochen. Dr. VON KITTLITZ wies darauf hin, daß auch mit einer vernünftigen Fruchtfolge Unkraut reguliert werden könne. So sollte generell Getreide als Vorfrucht zu Lupinen stehen und Raps in einer Leguminosenfruchtfolge nicht vorkommen (keine Bekämpfung des Rapsdurchwuchses in Leguminosen möglich).

Herr KAISER erläuterte die mechanische Unkrautbekämpfung speziell in Gelben Lupinen: Die Aussaatiefe muß 3 - 5 cm betragen, und vor dem Auflaufen der Lupinen wird dreimal gestriegelt, um keimende Unkräuter zu erfassen. Nach dem Auflaufen der Lupinen bis zu 3 cm Wuchshöhe darf nicht gestriegelt werden. Ab 3 cm Wuchshöhe kann wieder mit dem Striegel durch die Bestände gefahren werden, dies sollte aber nachmittags geschehen, wenn der Turgor der Lupinen gering ist. Striegeln ist generell nur bei klutenfreien Böden bis etwa 60 Bodenpunkte sinnvoll. Bei schwereren Böden ist der Anbau Weißer Lupinen und der Einsatz der Hackmaschine zu bevorzugen.

Dr. WEISSMANN wies darauf hin, daß mechanische Unkrautbekämpfungsmaßnahmen nur in abgetrockneten Beständen erfolgen dürfen; einerseits wegen der Gefahr des Abbrechens der Keimlinge, andererseits wegen der möglichen Verschleppung der Anthracnose im Bestand. Herr SCHMIECHEN betonte in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit, bei Gelben Lupinen spätsaatverträgliche Sorten mit rascher Jugendentwicklung anzubauen, um so im

zeitigen Frühjahr mechanische Unkrautregulierungsmaßnahmen (z. B. bei der Saattbettvorbereitung) durchführen zu können.

17.1.3 Impfung

Die Diskussionen, die im Vorfeld dieses Round-Table-Gesprächs im Laufe des Tages geführt wurden, brachten ein insgesamt widersprüchliches Bild über die Notwendigkeit einer Impfung. Während Herr KAISER in seinen Versuchen keine Ertragswirkung der Impfung bei Gelblupinen festgestellt hatte, betonte Frau Prof. HÖFLICH die positiven Wirkungen von Impfungsmaßnahmen in ihren Versuchsreihen bei Weißen und bei Gelben Lupinen. Herr KAISER äußerte die Vermutung, daß die an seinem Standort als Leitunkraut vorkommende Zweisamige Wicke eine Vermehrung der Lupinenrhizobien bewirkt haben könnte. Prof. MERBACH bestätigte zwar die assoziative Vermehrung von Rhizobien an anderen Pflanzenarten, bezweifelte aber gleichzeitig, daß dies im vorliegenden Fall die Ursache für die Unwirksamkeit der Impfungsmaßnahmen sei. Vielmehr sei es möglich, daß hohe N_{min}-Gehalte im Boden die Knöllchenbildung behindere. Außerdem sind auf vielen "traditionellen" Lupinenstandorten Knöllchenbakterien in ausreichender Zahl im Boden. Als weitere Möglichkeit wurde geäußert, daß Rhizobien auch endogen am Saatgut vorhanden sein können. Frau Prof. HÖFLICH wies darauf hin, daß die Verwendung leistungsfähiger Rhizobienstämme für die Effektivität der Impfung ganz entscheidend sei.

Hinsichtlich der Impfung gelangte man schließlich zu der Übereinstimmung, daß generell beim Erstanbau von Lupinen, und hier besonders von Weißen Lupinen, eine Saatgutimpfung mit Rhizobien durchgeführt werden sollte. Gleichzeitig wurde der Wunsch laut, Präparate mit besserer Handhabung bei der Anwendung zu entwickeln.

Abschließend wurde noch die Frage der mineralischen-Stickstoff-Ernährung angesprochen. Prof. MERBACH sagte, daß der N-Vorrat im Lupinenkorn bis zur Entwicklung des 4-Blatt-Stadiums reiche und demzufolge eine Start-Stickstoffgabe nicht notwendig sei. Dr. WEISSMANN berichtete von positiven Ertragswirkungen einer zur Blüte verabreichten N-Gabe von 50 kg/ha bei Weißlupinen. Wegen möglicher Reifeverzögerungen ist diese Maßnahme aber nur bei frühreifen Sorten und/oder in klimatisch günstigen Gebieten sinnvoll.

17.2 Herbizidversuch mit Weißlupinen (*Lupinus albus*)

Helmut Schmidt

Saatzuchtgesellschaft Streng's Erben; Aspachhof, D-97215 Uffenheim

17.2.1 Versuchsfrage

In Zusammenhang mit der Firma Ciba Geigy führte die Saatzeit Streng im Anbaujahr 1994 einen Herbizidversuch mit Weißlupinen durch. Der Versuch wurde in 10qm-Parzellen mit 2 Wiederholungen angelegt, die Saatstärke betrug 65 Körner/qm (weitere Versuchsdaten und Unkrautbesatz in den unbehandelten Parzellen s. Abb. 1).

Uns interessierten in erster Linie folgende Fragen:

- Zu welchen optisch sichtbaren Schäden führen verschiedene Vor- und Nachauflaufherbizide?
- Führen diese Schäden in der Folge auch zu Ausdünnungen des Lupinenbestandes?
- Wie hoch ist die Breitenwirksamkeit der eingesetzten Herbizide?
- Garantiert die Wirkungsdauer der Herbizide einen relativ unkrautarmen Lupinenbestand vor der Ernte?
- Welche Auswirkungen hat der Herbizideinsatz auf den Ertrag?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden verschiedene Herbizide zu 3 Spritzterminen ausgebracht:

- Voraufaufanwendung: Etwa 4-5 Tage vor dem Auflaufen der Lupinen (Abb. 2)
- Nachaufaufanwendung 1: Spätes Keimblattstadium der Lupinen; erste Unkräuter vereinzelt beim Spritzen (Abb. 3)
- Nachaufaufbehandlung 2: 4 Fiederblätter der Lupinen (Abb. 4)

17.2.2 Ergebnisse

Schäden an den Lupinen, Ausdünnung des Bestandes und die Unkrautwirkung wurden zu mehreren Zeitpunkten prozentual bonitiert. Der Unkrautbesatz vor Ernte ist eine Bonitur zwischen 1 und 9. Note 1 ist ein unkrautfreier Bestand, während ab Note 5 mit Ernteerschwernis und erhöhten Trocknungskosten zu rechnen ist.

Lupinen Herbizidversuch Ernte 94

Abb. 1

Versuchsansteller: Saatzeit Streng's Erben
Ciba Geigy

Versuchsort: Gnötzheim

Aussaat: 30.03.94

Sorte: Anuschka

Impfung: Biodoz Rhizobien

Aufgang: 17.04.94

Vorfrucht: Winterweizen

Bodenart: L

Düngung: 50 kg/ha P2O5
80 Kg/ha K2O

Unkrautdeckungsgrad ca. 2% am 05.05.94

Unkrautbesatz: Lamium (Taubnessel) 35%
Stellaria (Vogelmiere) 15%
Solanum (Nachtschatten) 15%
Sonchus (Gänsedistel) 10%
Thlaspi (Hellerkraut) 10%
Chenopodium (weißer Gänsefuß) 10%
Rest 5%

Behandlungen: VA
13.04.94

Abb. 2

	Aufwand menge	Schäden	Aus- dünnung	Unkraut- wirkung	Unkraut- besatz v.Ernte	Ertrag dt/ha
1 unbehandelt		0	0	0	9	44.35
2 Stomp SC	6 l/ha	0	0	97	2	49.12
3 Stentan fl	6 l/ha	3	0	100	1	47.07
4 Stentan fl	4 l/ha	0	0	100	1	47.16
5 Harpun	5 l/ha	0	0	96	2	46.92
6 Boxer	5 l/ha	0	0	94	4	49.13
7 Stomp+Boxer	1.5+2 l/ha	0	0	96	2	48.48
8 Econal	3 l/ha	0	0	98	1	46.71

Behandlungen: Na1
26.04.94

Abb. 3

	Aufwand menge	Schäden	Aus- dünnung	Unkaut- wirkung	Unkraut- besatz v.Ernte	Ertrag dt/ha
1 Kontrolle		0	0	0	9	44.82
2 Stentan	4 l/ha	40	10	100	2	42.67
3 Logran	25 g/ha	20	0	80	6	45.02
4 Boxer	4 l/ha	20	0	80	5	43.26
5 Betanal Progres	2 l/ha	10	0	50	7	44.61
6 Goltix	4 kg/ha	5	0	60	7	44.97

Behandlungen: Na2
05.05.94

Abb. 4

	Aufwand menge	Schäden	Aus- dünnung	Unkaut- wirkung	Unkraut- besatz v.Ernte	Ertrag dt/ha
1 Kontrolle		0	0	0	9	37.88
2 Stentan	4 l/ha	50	15	100	1	35.1
3 Logran	25 g/ha	30	5	85	8	36.06
4 Boxer	4 l/ha	10	0	70	4	37.02
5 Zintan Pack Gardop.plus + Lentagran	2.5+1 l/ha	60	25	100	2	31.66
6 Harpun	4 l/ha	5	0	95	4	39.81
7 Slomp+Boxer	1.5+2.5 l/ha	10	0	98	4	41.95
8 Econal	2.5 l/ha	50	5	100	2	37.31
9 B.Progress	2 l/ha	50	15	90	7	36.92
10 B.Prog.+Goltix	1.5+1 l/ha	40	10	95	7	37.83
11 Rebell	3 l/ha	25	10	70	8	38.15
12 Lido Pack	3.5 l/ha	80	25	100	2	31.1

Vorauflaufanwendung:

Keines der eingesetzten Herbizide führte zu nennenswerten Schäden an den Lupinen. Alle Mittel hatten eine hohe Wirksamkeit gegen die vorhandenen Unkräuter. Im Unkrautbesatz vor der Ernte war die Variante 6 mit 5l/ Boxer am schlechtesten, da *Solanum nigrum* nicht nachhaltig genug bekämpft wurde. Alle Varianten waren den unbehandelten Parzellen im Ertrag überlegen. Ein Mehrertrag von 4,4 dt/ha ist statistisch abgesichert.

Nachauflaufanwendung 1:

Bei der Herbizidanwendung im Keimblattstadium der Lupinen erreichte keine der 5 getesteten Spritzvarianten eine ausreichende Unkrautwirkung bei gleichzeitig hoher Verträglichkeit gegenüber der Lupine. Daß der Ertrag nicht stärker negativ beeinflusst wurde, liegt u.A. an den günstigen Wetter- und Bodenbedingungen und sollte nicht verallgemeinert werden.

Nachauflaufanwendung 2:

Unter allen zu diesem Zeitpunkt getesteten Herbizidvarianten sind die Behandlungen 6 und 7 (Abb. 4) hervorzuheben. Diese zeigten bei einer brauchbaren Unkrautwirkung eine unter diesen Bedingungen gerade noch ausreichende Verträglichkeit, die allerdings unter ungünstigeren Wetterbedingungen (z.B. Hitze) auch schlechter sein könnte als in diesem Versuch.

17.2.3 Fazit

Für die Unkrautbekämpfung in Weißlupinen scheinen alle im Vorauflauf getesteten Mittel in Abhängigkeit von der Basisverunkrautung und des Bodenzustandes praktikabel zu sein. Unter allen im Nachauflauf getesteten Herbiziden konnten ausschließlich Harpun und eine Mischung aus Stomp und Boxer eine akzeptable Kulturpflanzenverträglichkeit mit einer brauchbaren Unkrautwirkung kombinieren. Alle Ergebnisse beziehen sich auf einen Versuch in einem Jahr und sollten in ihrer Aussage auch unter anderen Bedingungen überprüft werden.

17.3 Round-Table, Biotechnologie 2000

Leitung: Prof. Dr. M. Wink; Protokoll: Dr. E. Weißmann

17.3.1 Grünfutter/Silage

- Grünfütterertrag bis 300-400 dt/ha, in der ehem DDR, Anbaufläche 100.000 ha.
- Kleinkörnige Arten sind billiger bei der Aussaat.
- Tierproduktion in ehem. DDR zurückgegangen, deshalb auch der Lupinenanbau zur Grundfüttererzeugung.
- Welche Lupinenart die produktivste ist, ist regional unterschiedlich
- Durch den Anbau der *L.luteus* im Zwischenfruchtanbau wurden die Krankheitsprobleme im Hauptfruchtanbau verschärft.
- Lupinen als Reinsilagen haben keinen Sinn, da die Energie (Stärke, Kohlehydrate) fehlt. Nur Mischsilagen sind sinnvoll. Hier Problem der Erntezeitpunkte.
- Fütterungsversuche mit Lupinensilage wurden in Dummersdorf gemacht. Dort gibt es auch Ergebnisse hierzu.
- Alkaloide werden in der Silage nicht abgebaut.

17.3.2 Bodensanierung

- Kann die Lupine Schwermetalle extrahieren und konzentrieren? (Wink)
Frau Höflich und Herr Merbach: Das ist sehr unwahrscheinlich. Lupinen reagieren sehr empfindlich auf die Anwesenheit von Schwermetallen im Boden. Entsorgung der Rückstände ist das Problem.
Herr Twardoski: Man findet in Lupinen ein Protein (Ferrin), das soviel Eisen (Schwermetalle) aufnehmen kann wie sein Eigengewicht. Ferrin befindet sich im Cytoplasma der Zelle.
- Lupine hat sicher eine Bedeutung bei der Rekultivierung von Böden im Hinblick auf die Verbesserung der biologischen Aktivität und der Strukturverbesserung z.B.: Braunkohletagebau, Tiefpflügen in Sandgebieten, Bodenverdichtung, Phosphataufschluß, usw.

Fruchtfolge ist wichtig. Nie Mais nach Lupinen, da dies Ertragseinbußen bringt (?wieso?). Am besten ist vor und nach Lupine Getreide. Vorher abtragendes Getreide, nachher Winterroggen oder Wintergerste.

- Lupinen zur Nematodenentseuchung in Kartoffelanbaugebieten. *L. mutabilis* kann wohl die Eier der Kartoffelnematoden zum Schlüpfen anregen.
Lupinen haben eine phytosanitäre Wirkung gegen bodenbürtige Getreidekrankheiten.

17.3.3 Tierernährung

- Brauchen wir hier mehr Untersuchungen?
- Den Mischfütterfirmen ist nicht bekannt, wie sie Lupinen einsetzen können.
- Wir benötigen die Ergebnisse der Fütterungsversuche in Frankreich herankommen. (INRA)
- Wir haben z.Z.keinen Fachmann für dieses Gebiet.
- Mischfütterindustrie optimiert Mischungen mit Software. Variablen: Aminosäuremuster, Energiegehalt, antinutritive Substanzen. Bei Wiederkäuerfutter Hohenheimer Futterwerttest.
- Die antinutritiven Substanzen der Lupine wurden in der DDR alle untersucht (Merbach kennt Quellen)
- Besonders für die ostdeutschen Marktfruchtbetriebe ist die Möglichkeit des Einsatzes in der Futtermittelindustrie sehr wichtig.
- Um Landwirte zu überzeugen, daß sie Lupinen als Eiweißquelle einsetzen können, sollten Lupinen und deren Einsatzmöglichkeiten in die Beratung der Ämter und Kammern aufgenommen werden. Auch in der lokalen Landwirtschaftspresse sollte die Lupine und ihr prozentualer Einsatz in Futtermischungen standardmäßig abgedruckt werden. Hierzu müssen wir aber erst die Fütterungsversuche (Frankreich, DDR) auswerten und dann an die Fachreferenten herantreten.

17.3.4 Humanernährung

Protein

- Aminosäuremuster ist nicht wertbestimmend
- Funktionelle Eigenschaften sind wertbestimmend (z.B.: Wasseraufnahme, Ölaufnahme, Emulgierereigenschaften)
- Alkaloidfreie bzw. alkloidarme Lupinenprodukte sind geschmacksneutral. Dies ist sehr wichtig. Die meisten der bisher eingesetzten Proteine aus Pflanzen haben einen erdigen, bohigen Geschmack.

Ballaststoffe

- Vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Humanernährung
- Die Geschmacksneutralität ist auch bei den Ballaststoffen der Lupine gegeben

Öl

- Öl ist kein Inhaltsstoff, der mit Ölen aus anderen Pflanzen konkurrieren kann. Zur Zeit ist Öl aus *L. albus* nicht wirtschaftlich zu gewinnen. Bei *L. mutabilis* ist dies anders. Hier liegen die Gehalte über 16%, d.h. eine Extraktion ist wirtschaftlich.
- Bei der Verwertung der Lupinen im landwirtschaftlichen Betrieb stört das Öl, weil dadurch die Vermahlung behindert wird und weil Schrot leicht ranzig wird.

Alkaloide

- Einsatz als biorationale Insektizid möglich
- Pharmakologische Wirkungen vorhanden und nachgewiesen

Oligosaccharide

- Erregen Flatulenz. Wenn möglich, sollten die Kohlenhydrate in anderer Form im Lupinenkorn gespeichert werden (wichtigstes Zuchtziel in Bezug auf die Inhaltsstoffe).

Lektine: Kaum vorhanden (Merbach)

Proteininhibitoren: Kaum vorhanden (Merbach)

Saponine: Kaum vorhanden (Merbach)

17.3.5 Krankheiten, Analytik

- Erkennung und Bestimmung von Krankheitserregern mit Hilfe von RFLP oder RAPD sinnvoll und notwendig, aber erst mittelfristig für uns verfügbar. Problem: Jede Rasse benötigt eigene Sonden bzw. Primer/Enzymkombinationen.
- Wir benötigen besonders eine Schnellbestimmung von Anthraknose im Keimlingsstadium.

17.3.6 Sortencharakterisierung (Fingerprinting mit RFLP, AFLP, RAPD, Mikrosatelliten)

- Bis jetzt vom Selbstbefruchterzüchter nicht gewünscht, da er zu sehr in der Erhaltungszüchtung eingeschränkt würde. Auch würde sich hierdurch die Erhaltungszüchtung beim Selbstbefruchter sehr verteuern.

17.3.7 Anwendung der Gentechnologie bei Lupinen

Voraussetzungen:

- Genomkartierung. Gene müssen bekannt sein. Derzeit noch keine Informationen.
- Transformationstechnik
- Regenerationsprotokolle

Gibt es ein Protokoll für die Anwendung der Gentechnologie bei der Lupine?

- Transformationstechniken? Ja: Particle-gun, *Agrobacterium* schwierig
- Regenerationsprotokolle? Teilweise, Sproßregeneration möglich. Bei Erbsen und Ackerbohnen die gleichen Probleme; ist hier aber gelöst durch das Aufpropfen auf Keimwurzeln. Bereits Körner aus regenerierten Pflanzen bekannt.

Tab. Denkbare Verbesserung der Lupine mit Hilfe der Gentechnologie (GenT)

+ = wichtig, +++ = sehr wichtig

	Merkmale	Zuchtziele	GenT
<i>L. luteus, L. albus</i>			
Proteine			
Humanernährung	Löslichkeit der Proteine	+++	-
Tierernährung	Aminosäuremuster	++	+
Öl	Menge	-	+
	Zusammensetzung	-	+
Oligosaccharide	Zusammensetzung (Disaccharide)	+++	+++
Alkaloide	Zusammensetzung (Nur Lupanin)	++	+++
	Transport in der Pflanze	++	+++
	Gehalt	+	+
Schalen	Schalenanteil	+	-
Frühreife		++	-
Schnelle Jugendentwicklung		++	-
N-Effizienz		++	-
Resistenzen	Anthraknose	+++	++
	Fusarium spp.	++	+
	Sclerotinia	++	+
Pflanzenarchitektur		+	+
<i>L. luteus</i>			
Hülsenabbruch		+	+
Platzfestigkeit		+	+
Ertragsstabilität durch Verringerung der Abortionsrate		+	-
Kleinkörnigkeit		+	-

18 Gesellschaft zur Förderung der Lupine /GFL)

Auf der 2. Heidelberg Lupinentagung wurde die Gesellschaft zur Förderung der Lupine gegründet.

Zweck des Vereins ist die Förderung des Lupinenanbaus und der Lupinenforschung. Er soll für alle an Lupinen interessierte Kreise ein Kommunikationsforum sein, mit dem Ziel der gegenseitigen Information, des Gedankenaustauschs und der Koordinierung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben.

1. Vorsitzender: Dr. Peter Römer

Auskünfte:

Dr. P. Römer
c/o Südwestdeutsche Saatzucht
Im Rheinfeld 1-13
D-76437 Rastatt