



## Züchtungsforschung für umweltstabile niedrige Alkaloidgehalte in der Schmalblättrigen Lupine

Florian Haase, Lucas Erdmann, Helge Fließ, Anne Zaar, Brigitte Ruge-Wehling

# Von der Bitter- zur Süßlupine



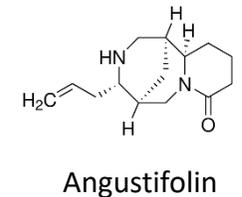
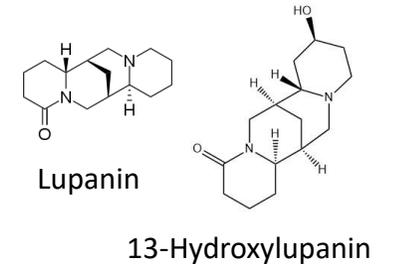
- Ursprüngliche Nutzung von Lupinen als Gründüngung
- Entwicklung von Alkaloidnachweismethodik durch v. Sengbusch (1927)
- Alkaloiduntersuchungen an Millionen Einzelpflanzen (1928/29)
- Selektion von wenigen Süßmutanten in *L.angustifolius*, *L.luteus* und *L.albus*
- Genetische Analysen dreier unabhängiger rezessiv vererbten Gene (*iucundus*, *esculentus*, *depressus*) in *L. angustifolius* (Hackbarth & v. Sengbusch,1934)
- Aktuelle Sorten der Schmalblättrigen Lupine enthalten den *iucundus*-Locus
- Molekulare Selektionswerkzeuge für *iucundus* stehen zur Verfügung (Kroc et. al, 2019)



# Herausforderung Alkaloidgehalt für die Körnernutzung

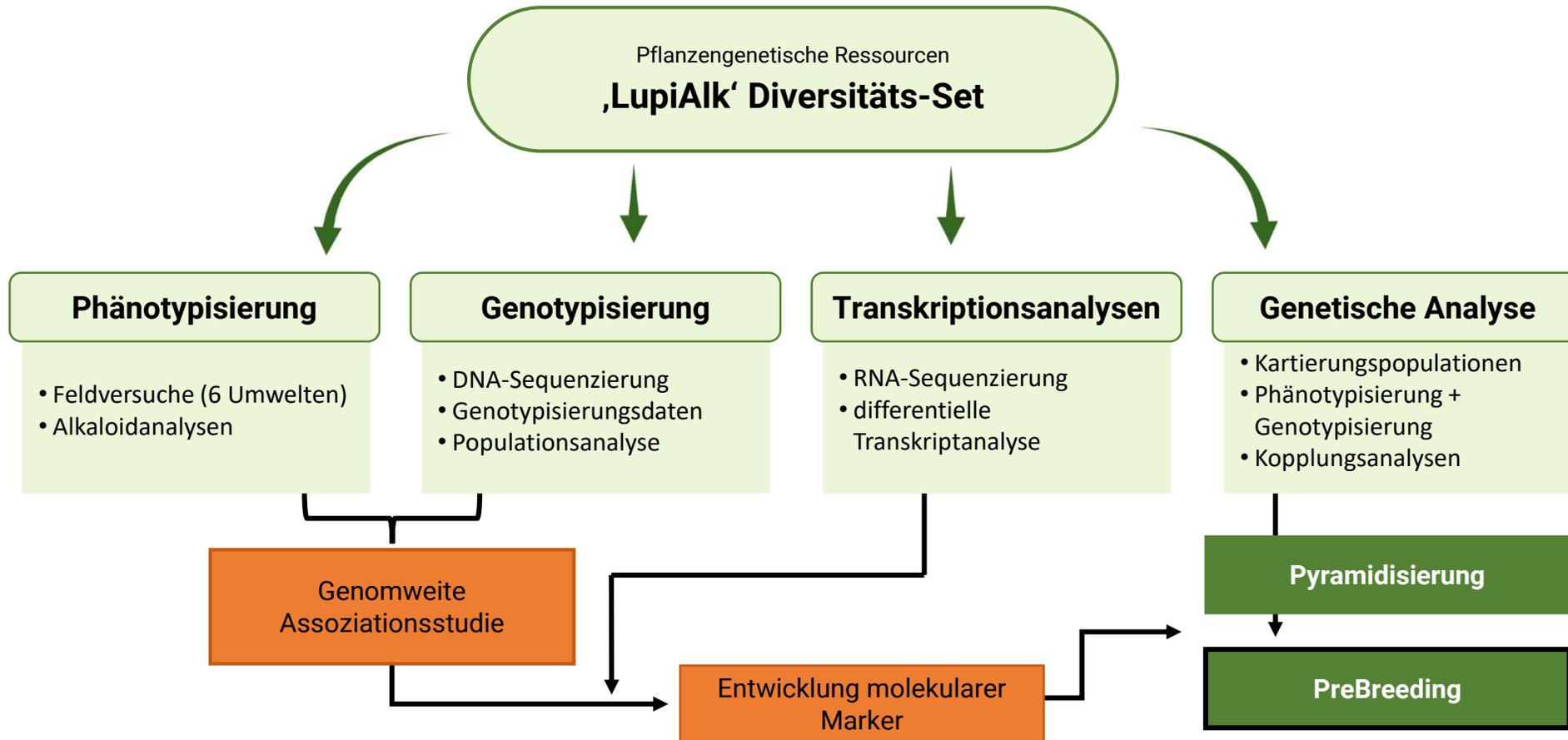


- Chinolizidinalkaloide sind toxische sekundäre Stoffwechselprodukte
- Richtwerte für die Verwertung in Fütterung (0,05%), Humanernährung (0,02%)
- Alkaloidgehalt ist genetisch verankert, ist jedoch umweltabhängig
- In der Züchtung bisher nur das rezessiv vererbte ‚*iucundus*‘-Gen genutzt (umwelt-instabil)
- Alkaloidgehalte in Futtermitteln können zu „carry-over“ führen
  - Alkaloid-Transferrate in Milcherzeugnissen bei 2-4% (Stellungnahme BfR, 2017)



## Züchtungsforschung:

- Identifikation neuer Loci für Alkaloidarmut, die eine Umweltstabilität vermitteln
- Molekulare und genetische Charakterisierung von *alk<sup>-</sup>* Genen
- Entwicklung von Selektionswerkzeugen für den Einsatz im Züchtungsprozess



Gefördert durch



Projekträger



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# Material: ‚LupiAlk‘ Diversitäts-Set



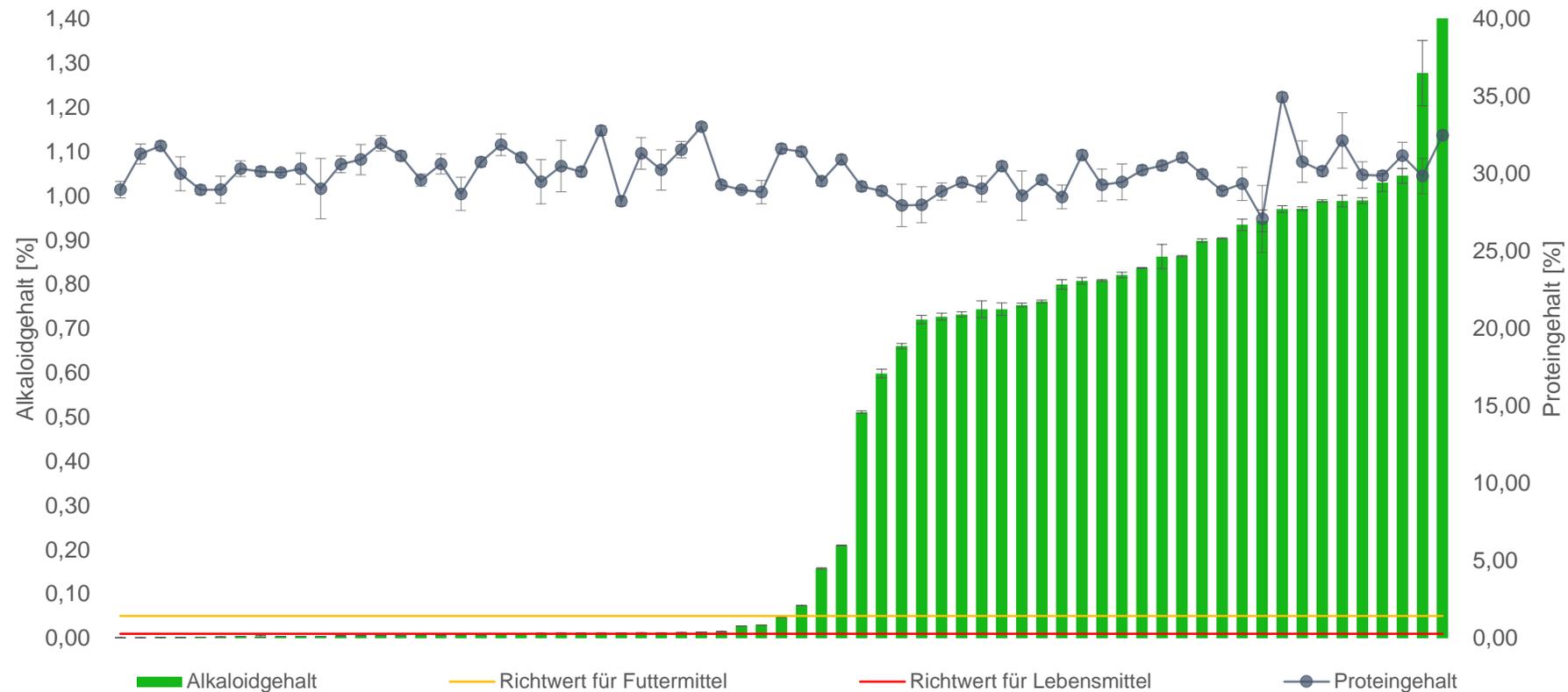
- 363 Akzessionen unterschiedlicher Herkünfte
  - Hohe Variabilität für:
    - Blüh- und Reifezeitpunkt
    - Wuchstyp und –höhe
    - Blüten- und Samenfarbe
    - Ertrag
    - Proteingehalt
    - Alkaloidgehalt
- darunter Akzessionen für definierte „Süß“-Mutation (*iucundus*, *esculentus*, *depressus*)

Origin	Quantity
Genbank Akzessionen	273
Sorten	70
Forschungslinien	9
Zuchtlinien	11
<b>Total</b>	<b>363</b>



# Alkaloidanalysen an Teilsortiment

NIRS (Protein), GC- FID (Alkaloid)

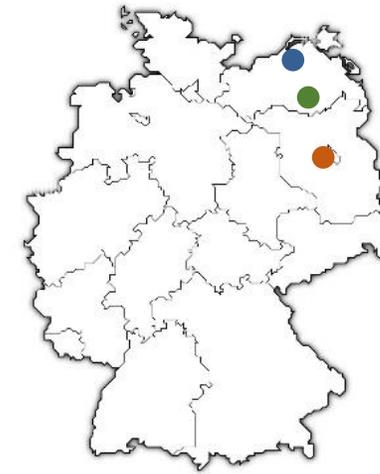


Protein- und Alkaloidgehalt im Samen von N= 60 Akzessionen über 3 Jahre

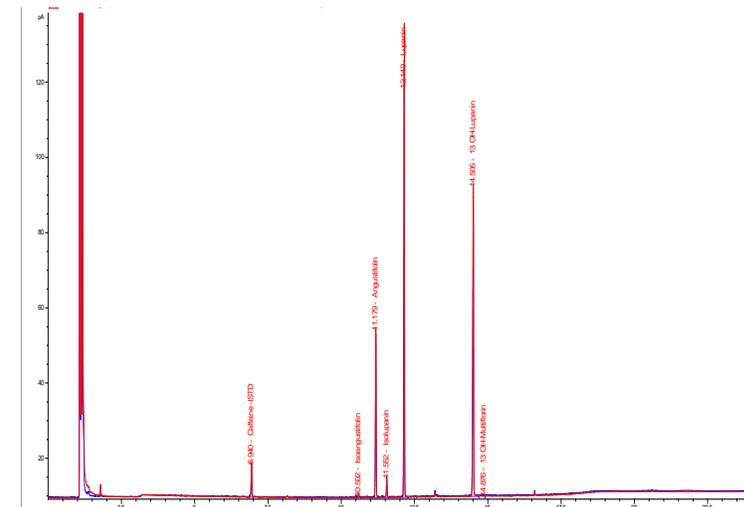
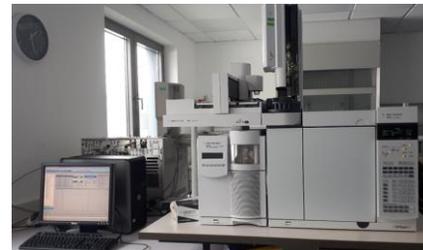
# Phänotypisierung



- **Multi-Umwelt-Feldversuch (2 Jahre, 3 Standorte)**
  - LupiAlk Diversitäts-Set
  - Mikroparzellen (Doppelreihen) in 3 Wiederholungen
  - Erfassung phänotypischer Daten
  - Samenernte für Alkaloiduntersuchungen
- **Biochemische Phänotypisierung**
  - Chinolizidin Alkaloidanalysen (qualitativ & quantitativ)
  - Gaschromatographie gekoppelt mit FID
  - Auswertung über externe Kalibrierung



- JKI Gross Lüsewitz
- SZS Bocksee
- JKI Berlin-Dahlem



# Vorauswahl des genetischen Sets – Feldversuch 2023



## Standort:

- Julius Kühn Institut - Gross Lüsewitz

## Versuchsaufbau:

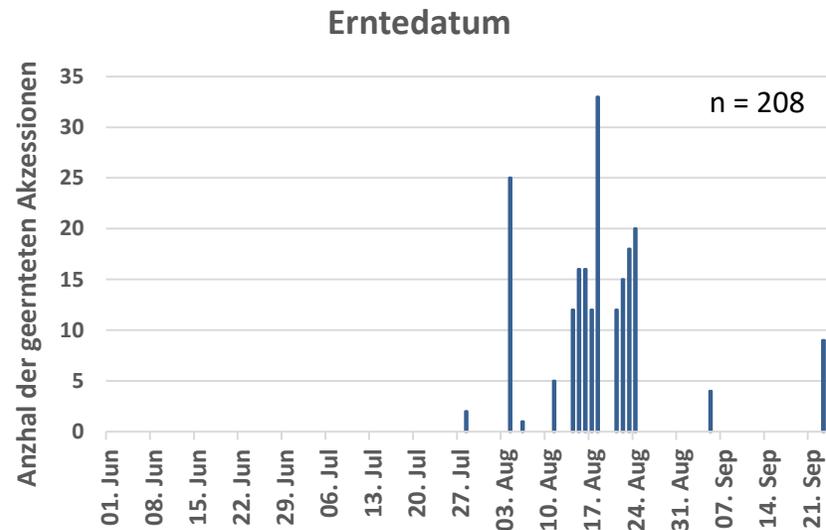
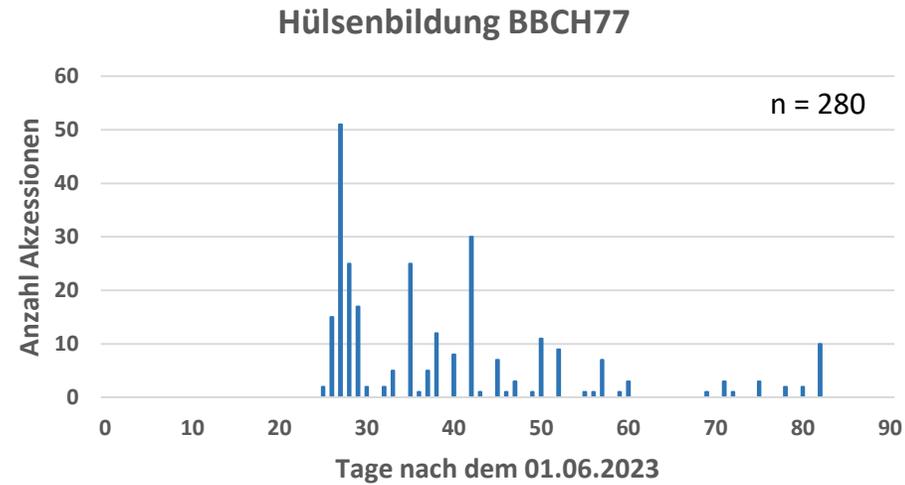
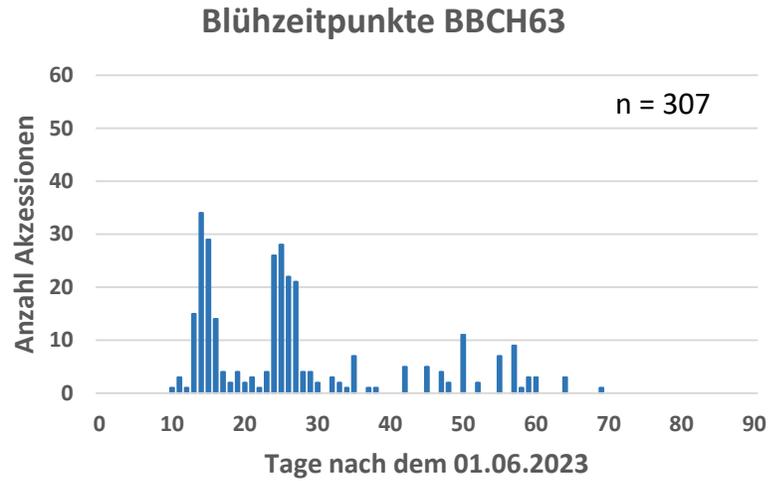
- 336 Prüfglieder in 3 Wiederholungen
- Aussaat in Mikroparzelle (Doppelreihe 20 Korn/Reihe)

## Ziel:

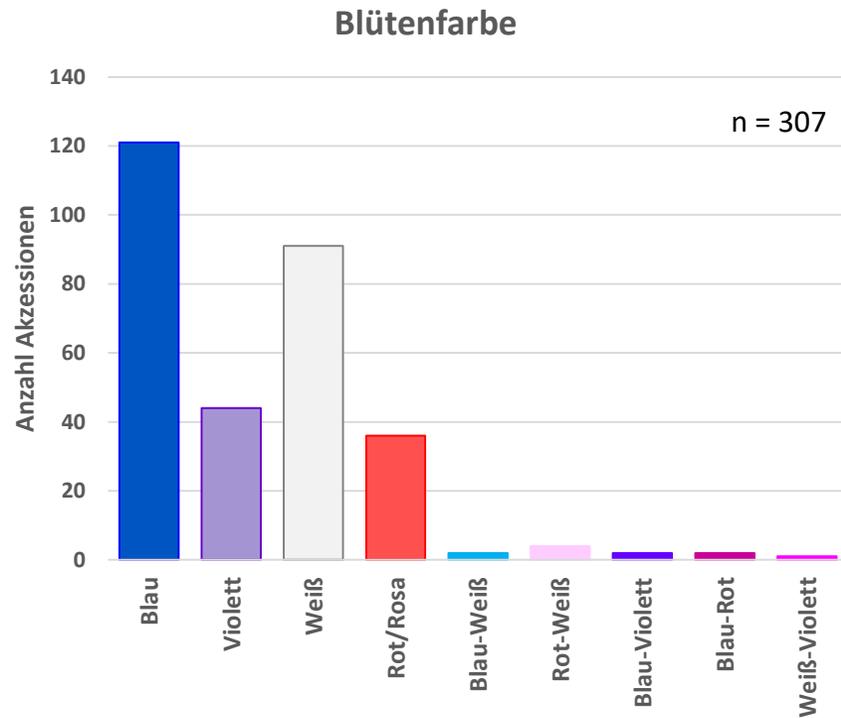
- Auswahl der Prüfglieder des LupiAlk Diversitäts-Sets
- Erfassung der phänotypischen und genetischen Variabilität



# Phänologische Variabilität (Feldversuch 2023)

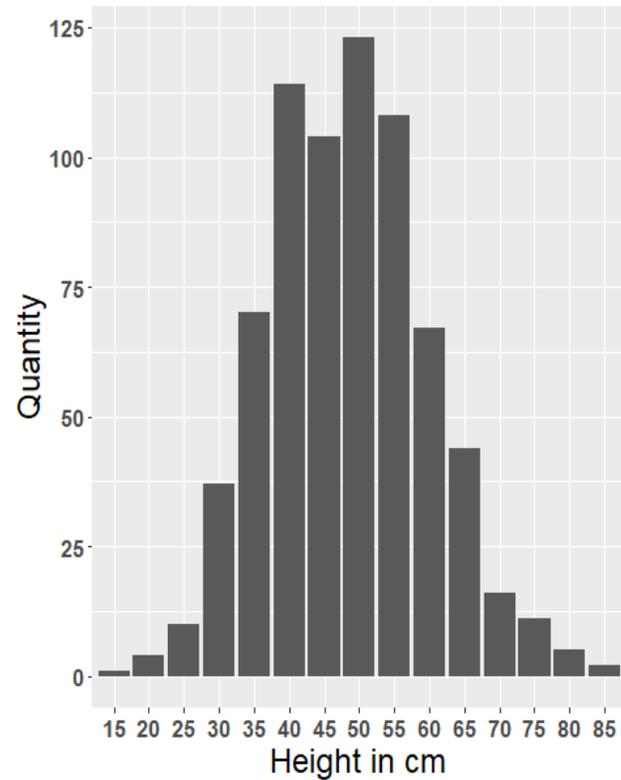


# Variabilität der Blütenfarbe (Feldversuch 2023)



Bilder: Saatzeit Steinach GmbH ©

# Variabilität der Wuchshöhe (Feldversuch 2023)



# Quantitative Bestimmung des Alkaloidgehaltes

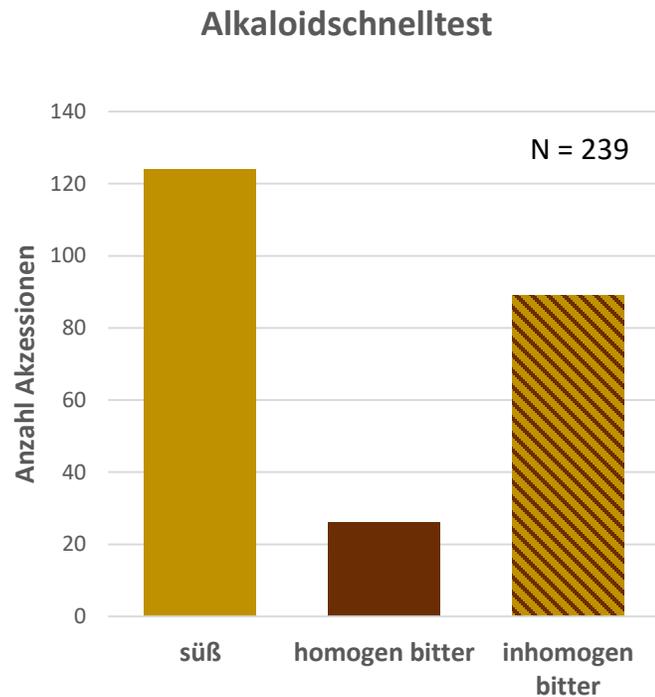


## Alkaloid Schnelltest nach v. Sengbusch (modifiziert durch JKJi)

- Schnelltest an 10 Samen je Akzession
- Vorquellen der Samenproben (18-24h)
- Zugabe der Nachweislösung (Iod-Kaliumiodid Lösung) / Nachweisgrenze 0,05 %
- Fällungsreaktion (Farbumschlag) in alkaloidhaltigen Proben



# Alkaloidbestimmung – Ergebnisse Schnelltest



Kontrolle: bitter

QA = 1,375 % TM

Kontrolle: süß

QA = 0,044 % TM



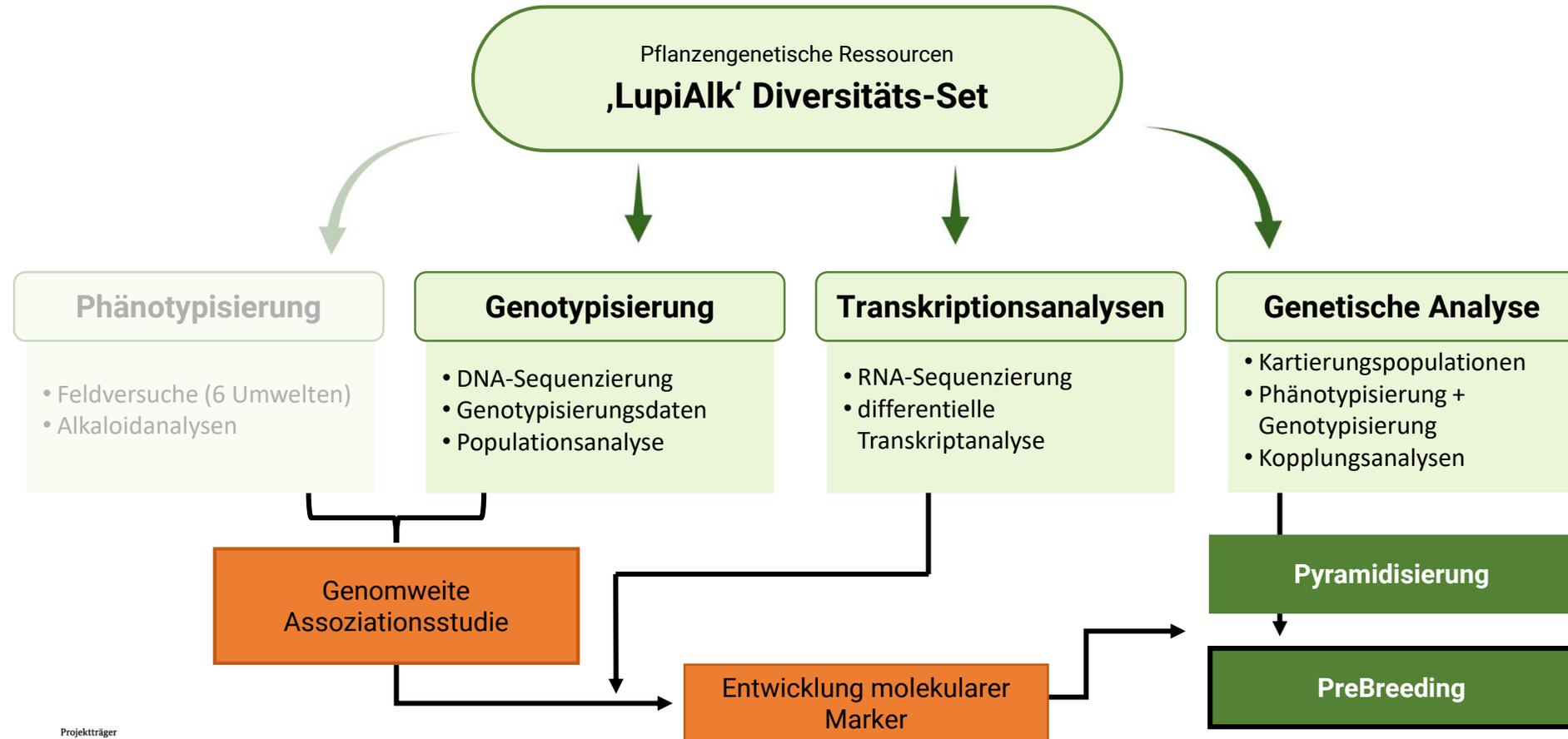
# Auswahl des genetischen Sets

- ✓ Hohe Variabilität im Set pflanzengenetischer Ressourcen
- ✓ Variabilität für das Merkmal Alkaloidarmut
- ✓ Auswahl der Prüfglieder des Diversitäts-Set (n=288)
- ✓ Saatgutvermehrung (Isolationstüten) für Feldversuche über 6 Umwelten erfolgreich



# Projekt LupiAlk

Projektlaufzeit: 01.02.2023 – 31.01.2026



Gefördert durch



Projekträger

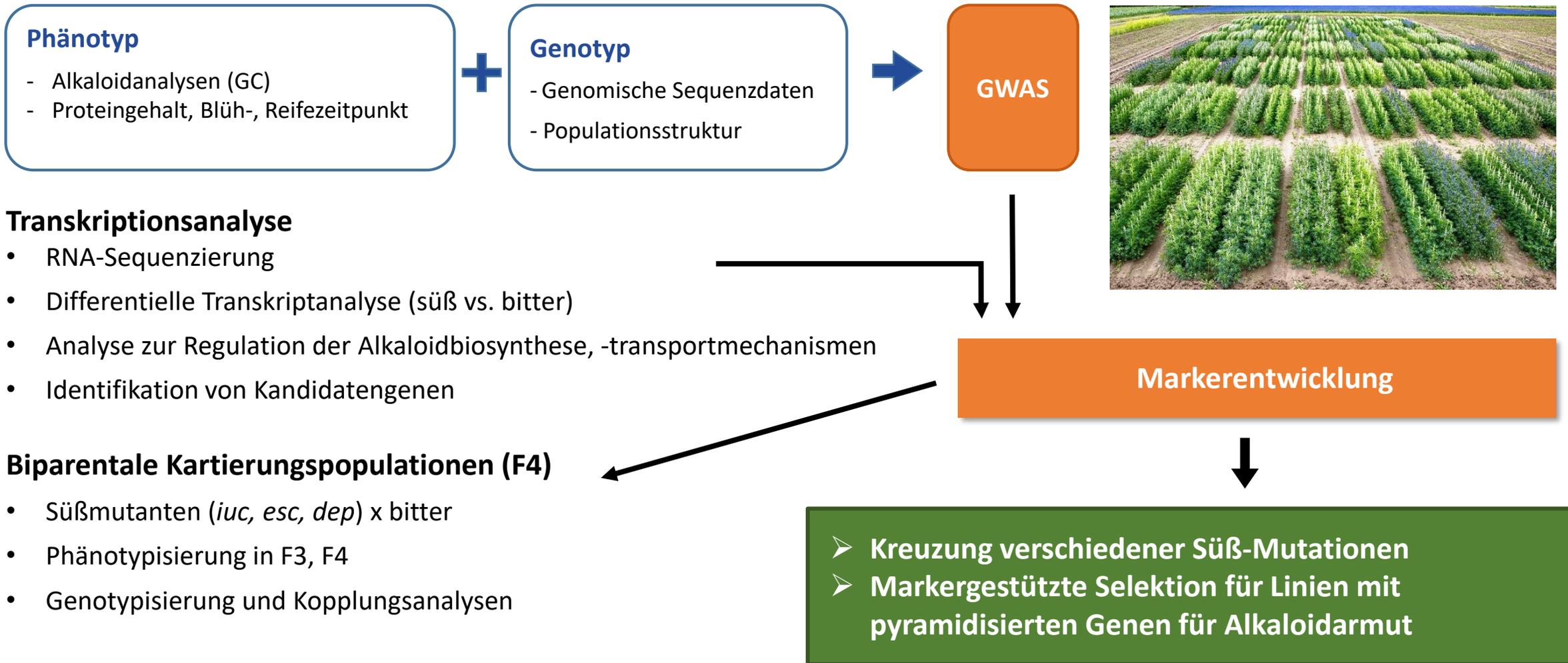


aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# Genetische und Molekulare Analysen



## Assoziationsstudie des Diversitäts-Set



# Genotypisierung des diversen Sets



- Extraktion genomischer DNA von 317 Akzessionen
- Molekulare Analyse auf *iucundus* Marker (*iuc\_RAP2-7*) (Kroc et al. 2019)

## Markeranalysen für agronomische Merkmale

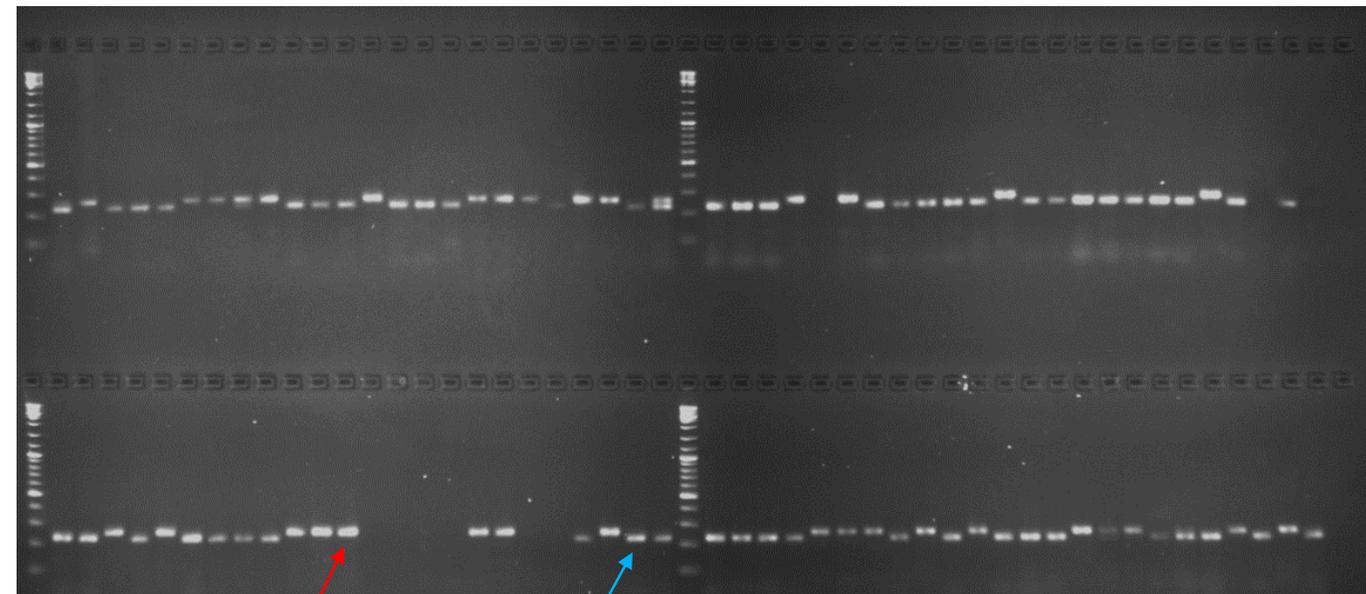
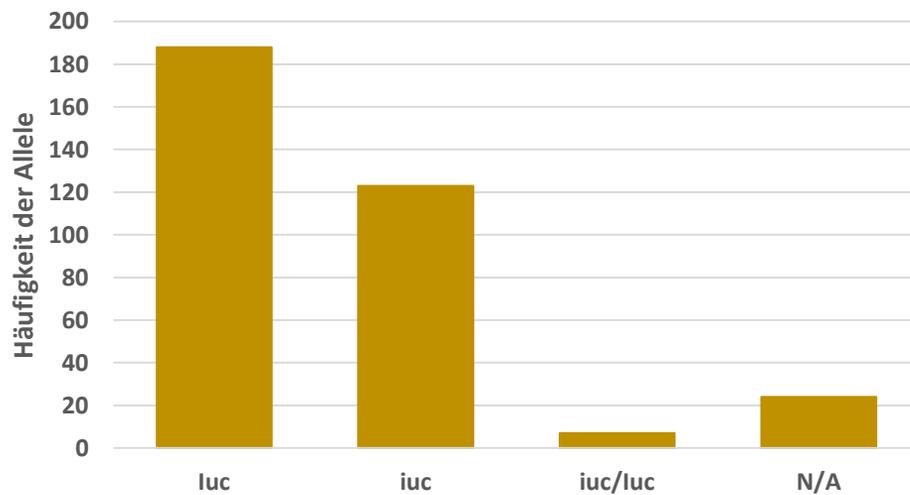
- Platzfestigkeit: *tardus* (TaLi) (Li et al. 2010), *lentus* (LeLi) (Li et al. 2012)
- Hartschaligkeit: *mollis* (MoLi) (Li et al. 2012)
- Blütenfarbe (weiß): *leucospermus* (Plewinski et al., 2019)
- Frühzeitigkeit: *Julius, Ku* (Stefanova & Buirchell, 2010; Kubok, 1988)
- Vernalisationsbedarf: *efl* (Gladstone, 1977; Taylor et al. 2018)

# Markeranalyse für ‚iucundus‘ Locus



- Mit dem *iucundus* Locus assoziierter dCAPS Marker: iuc\_RAP2-7 (Kroc et al. 2019)
- RAP2-7: APETALA2/Ethylene response Transkriptionsfaktor identifiziert als potentiell Kandidatengen für *iucundus*-Locus

Allelverteilung für *iucundus* im LupiAlk Set



Mirabor  
(258 bp)

Oskar  
(226 bp)

luc: 226 bp → bitter (oder süß)  
iuc: 258 bp → süß

# Vergleichende Auswertung phänotypischer und genotypischer Daten



## Korrelation des Alkaloid-Schnelltest und Markeranalyse mit *iuc\_RAP2-7*

- 124 süße Linien im Schnelltest
- 102 der süßen Linien tragen das Markerallel für *iucundus*

- **22 alkaloidarme Akzessionen tragen nicht das Markerallel für *iucundus***
- **Neue Markerallele sind die Grundlage für Assoziationsstudien, molekulare Charakterisierungen und Markerentwicklung im ‚LupiAlk‘ Projekt**
- **Neue Erbfaktoren bilden die Basis für Alkaloidarmut und Umweltstabilität auf dem Feld**

# Auswahl Genotypen für Transkriptionsanalyse



## Transkriptionsanalyse

- RNA-Sequenzierung
- Differentielle Transkriptanalyse (süß vs. bitter)
- Analyse zur Regulation der Alkaloidbiosynthese, -transportmechanismen
- Identifikation von Kandidatengen

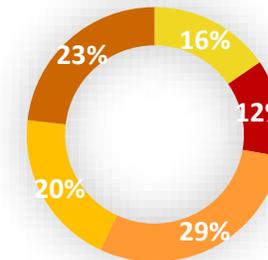
## Auswahl und Verifizierung der Genotypen

- Feldversuch mit Subset (n=72) an zwei Standorten (GL, Bo)
- Alkaloiduntersuchungen (GC-MS, GC-FID) in Blatt und Samenproben

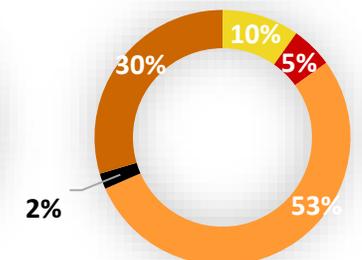
### Materialauswahl für Transkriptomanalyse

- alk<sup>-</sup>** alk<sup>-</sup> Mutanten (*iuc*, *esc*, *dep*)
- alk<sup>-</sup>** Genbankakzessionen mit niedrigem Alkaloidgehalt (~~*iuc*~~)
- alk<sup>-</sup>** Referenzsorten (Boregine, Lunabor, etc.)
- alk<sup>-</sup>** Linien mit divergierendem Alk.-gehalt in Blatt vs. Samen
- alk<sup>+</sup>** Bittere Sorten & Genbankakzessionen

Sorte Probor Blatt 23  
QA = 0,044 % TM



Sorte Probor Korn 22  
QA = 0,068 % TM



■ Angustifolin ■ Isolupanin ■ Lupanin ■ Multiflorin ■ 13 OH-Lupanin

Darstellung der prozentualen Anteile der individuellen Chinolizidinalkaloide in den Blättern (links) und Samen (rechts).

# Zusammenfassung



- Einbeziehung einer breiten genetischen Variabilität zur Erschließung neuer Erbfaktoren für umweltstabile niedrige Alkaloidgehalte in *L. angustifolius*
- Molekulare Charakterisierung neuer genetischer Faktoren mithilfe von umfangreichen Phänotypisierungen, genomweiten Assoziationsstudien und Transkriptomanalysen zur Entwicklung molekularer Selektionswerkzeuge
- ✓ Auswahl eines Diversitäts-Set (n=288) mit großer phänotypischer und genetischer Variabilität
- ✓ Saatgutressourcen für Feldversuche und Phänotypisierung an 6 Umwelten vorhanden
- ✓ Identifikation von 22 Akzessionen mit putativen neuartigen Allelvariationen für Alkaloidarmut
- ✓ Auswahl und Verifizierung von Genotypen zur Charakterisierung der Transkriptionsaktivitäten (süß vs. bitter)
- ✓ Entwicklung biparentaler Kartierungspopulationen zur genetischen Analysen von *iuc*, *esc*, *dep*

# Vielen Dank für die Aufmerksamkeit

Gefördert durch



Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft

Projekträger



Bundesanstalt für  
Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



Julian Bentin  
Carmen Leesch  
Danny Franz  
Peter Sahr



Regine Dieterich  
Sabine Schulze