

Indirekte Selektionsmethoden auf Methioninreichtum des Samenproteins bei heimischen Leguminosen

Schumacher, H.², Paulsen, H. M.¹, Gau, A. E.², Link, W.³, Jürgens, H. U.⁴, Sass, O.⁵, Dieterich, R.⁶

Keywords: legumes, on-farm livestock diets, plant breeding, protein quality, methionine

Abstract

*While grain legumes can be regarded as highly valuable protein sources for animal nutrition, certain drawbacks inhibit their use as sole foodstuff for livestock. The nutrient quality is reduced by low concentrations of tryptophan and sulfur amino acids. In the past, substantial breeding effort has been invested in the reduction of antinutritional components and the improvement of disease resistance, while the protein quality has not been a focal point. To improve the protein quality, the elevation of the low sulfur amino acid content is of prominent importance especially for organic production, where high methionine feed components are rare. The present work tries to establish a method to select methionine enriched grain legumes for further breeding steps. Agronomically important European grain legume species were investigated (*Lupinus angustifolius* L., *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L.). Plants grown from chemically mutagenized seeds were screened according to leaf chlorophyll content, radicle growth in a phytotoxic ethionine solution and seed S-contents. Results indicate usefulness of the screening procedure for *L. angustifolius* (increase of methionine content by up to 20%) and partly for *P. sativum*, while not for *V. faba*.*

Einleitung und Zielsetzung

Körnerleguminosen stellen ein für die Tierernährung qualitativ hochwertiges Futtermittel dar. Wesentliche Nachteile und limitierende Faktoren in der Fütterung sind antinutritive Inhaltsstoffe und der vergleichsweise geringe Gehalt an Schwefelaminosäuren und Tryptophan im Samenprotein (Gallardo et al. 2008). Insbesondere geringe Gehalte der essentiellen Aminosäure Methionin wirken hierbei limitierend. Erbsenkörner enthalten beispielsweise im Mittel 0,8 % Methionin und 1 % Cystein; in der optimalen Proteinration für Schweine ist jedoch einen Anteil von 3,5 % Schwefelaminosäuren mit mindestens 1,6 % Methionin erforderlich (Tabe und Higgins, 1998). Das vorliegende Projekt hat die Züchtung methioninreicher Sorten von heimischen, agronomisch bedeutsamen Körnerleguminosen (Blaue Lupine (*Lupinus angustifolius*), Erbse (*Pisum sativum*) und Ackerbohne (*Vicia faba*)) zum Ziel. Grundlage der Vorgehensweise ist eine Arbeit mit Sojabohnen (*Glycine max* L.) (Im-sande 2001), in der es gelang, Mutanten mit signifikant erhöhtem Schwefelgehalt im Samen zu erzeugen. Als Selektionskriterien für potentiell methioninreiche Pflanzen dienten dabei die Grünfärbung der Blätter und das Wurzellängenwachstum in phytotoxischen Nährlösungen, sowie die Schwefelgehalte der Samen. Durch die Übertragung dieser Methodik auf europäische Körnerleguminosen wird für die Züchtung eine Steigerung des sameneigenen Methioningehaltes angestrebt. Dies würde die Eignung dieser Körnerleguminosen als Futtermittelalternative zu Sojamehl, Mais-Gluten und Ölkuchen erhöhen und eine bedarfsgerechte Fütterung von Monogastrern im ökologischen Landbau mit hofeigenen Produkten erleichtern (Zollitsch et al. 2004).

Methoden

Samenmaterial der Versuchspflanzen wurde von den Saatgutunternehmen Norddeutsche Pflanzenzüchtung und Saatgut Steinach GmbH sowie der Abteilung Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Es wurden die Sorten „Boruta“ (*L. angustifolius*) und „Hardy“ (*P. sativum*) sowie die Linie „VF172“ (*V. faba*) eingesetzt. Die Samen wurden mit Ethylmethansulfonat (0,2%) behandelt um Mutationen auszulösen. Nach einer Vitalitätsprüfung wurde Saatgut der M2-Generation für 7 Tage in einer 0,75mM Ethionin(Et)-Lösung inkubiert und zur Keimung gebracht (Et-Test) (n=2000; pro Versuchspflanzenart). Je 100 Kontrollpflanzen mit durchschnittlichen Keimwurzellängen und 100 potentiell methioninreiche Keimlingspflanzen mit den höchsten Keimwurzellängen wurden selektiert und anschließend im Gewächshaus bis zur Samenreife angezogen. Vor Eintritt der Blütenbildung wurde der Gesamtchlorophyllgehalt am jeweils jüngsten, voll entwickelten Blatt bestimmt (Lichtenthaler, 2001). Nach Abschluss der Samenreife wurden die Aminosäuregehalte der Samen per HPLC-Verfahren und die S- und N-Gehalte elementaranalytisch ermittelt. Die Daten wurden mittels ANOVA (SPSS) ausgewertet.

Ergebnisse

Die Aminosäureanalyse der selektierten Mutanten zeigte ein heterogenes Ergebnis mit erheblichen Unterschieden zwischen den Versuchspflanzenarten. So konnte für *L. angustifolius* eine signifikante Zunahme des mittleren relativen Methioningehaltes (g/16g N) ermittelt werden (Abb. 1).

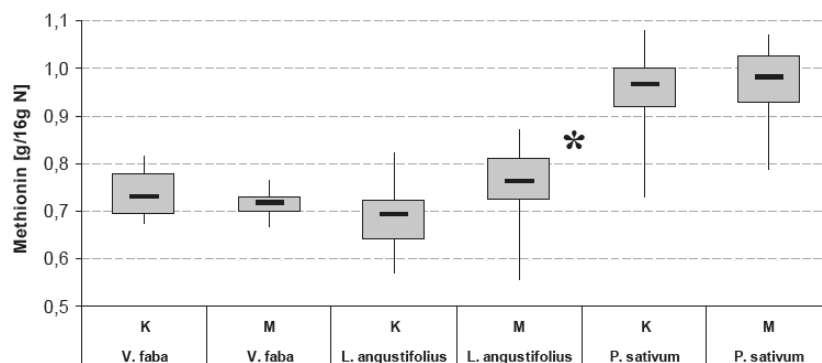


Abbildung 1: Relativer Methioninegehalt (g/16g N) analysierter Leguminosen aus dem Et Test. * = Signifikanter Unterschied im Mittelwert zwischen Kontroll- (K) und Selektionspflanzen (M) ($p < 0,05$; Tukeys Test) (n=25).

Für *L. angustifolius* konnten weiterhin Einzelpflanzen mit deutlich erhöhtem Methioninegehalt (+20%) identifiziert werden. Die selektierten *P. sativum* und *V. faba* Pflanzen zeigten hingegen keine gesteigerten Methioninegehalte. Für den Cysteinegehalt wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht (Abb. 2).

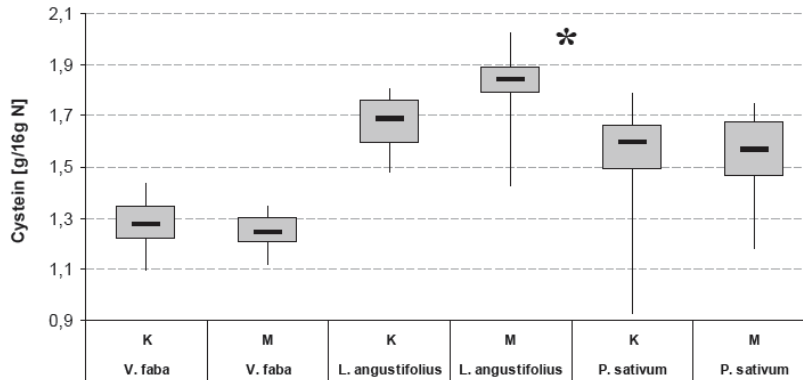


Abbildung 2: Relativer Cysteingehalt (g/16g N) analysierter Leguminosen aus dem Et Test. * = Signifikanter Unterschied im Mittelwert zwischen Kontroll- (K) und Selektionspflanzen (M) ($p < 0,05$; Tukeys Test) ($n = 25$).

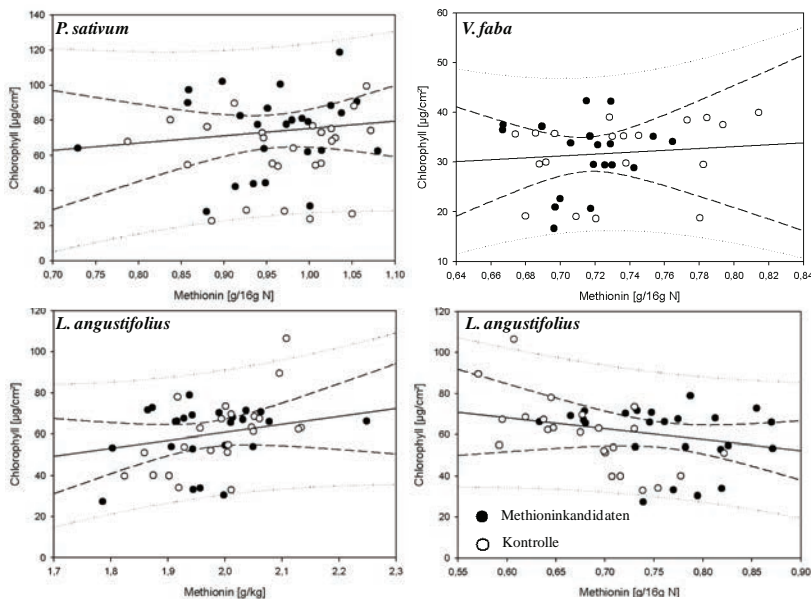


Abbildung 3: Zusammenhang von Chlorophyllgehalten in den jüngsten Blättern zum relativen und absoluten Methioningehalt der Samen. *P. sativum* ($R^2 = 0,02$); *V. faba* ($R^2 = 0,08$) und *L. angustifolius* ($R^2 = 0,44^*$ bzw. $0,36^*$), * = signifikant für $P < 0,05$ ($n = 25$).

Die selektierten Pflanzen von *L. angustifolius* wiesen als einzige unter den Versuchspflanzen signifikant gesteigerte Cysteingehalte auf. Alle weiteren analysierten essentiellen Aminosäuren wiesen nur geringfügige Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten

auf (<10% Abweichung). Demzufolge konnte kein negativer Effekt (Abnahme essentieller Aminosäuren) des Selektionsverfahrens auf die Proteinqualität festgestellt werden. Die aus der Literatur bekannte negative Korrelation von Methioninkonzentration und Proteingehalt bestätigte sich jedoch (Ergebnisse nicht präsentiert). Der Chlorophyllgehalt zeigte für keine der Versuchspflanzenarten eine Korrelation mit dem relativen Methioningehalt (g/16g N) (Abb. 3). Im Unterschied dazu lag eine positive Korrelation vom Chlorophyllgehalt zum absolutem Methioningehalt (g/kg Trockenmasse) für *L. angustifolius* vor. Weiterhin waren die Schwefel-Gehalte der Samen wie folgt mit den Methioningehalten (g/16g N) korreliert: *L. angustifolius* ($r = -0,532^{**}$), *P. sativum* ($r = -0,276^{ns}$) und *V. faba* ($r = 0,026^{ns}$). Folglich lag für *L. angustifolius* eine negative Korrelation vor. Die absoluten Methioningehalte (g/kg TM) waren bei *L. angustifolius* ($r = 0,403^{**}$) und *P. sativum* ($r = 0,681^{**}$) positiv mit dem Gesamtproteingehalt korreliert. Bei *V. faba* zeigte sich hingegen keine Korrelation ($r = 0,129^{ns}$).

Diskussion

Mit dem Verfahren der Selektion auf Keimwurzellänge wurden bei *L. angustifolius* Pflanzen mit erhöhtem Methioningehalt im Samen identifiziert. Der Chlorophyllgehalt der Blätter erwies sich als Selektionskriterium für hohe Methioninkonzentrationen im Samen als nur bedingt geeignet. Der vergleichsweise geringe Probenumfang erschwert eine abschließende Beurteilung des Selektionsverfahrens. Die Schwefelgehalte waren für *L. angustifolius* sowohl mit dem relativen als auch dem absoluten Methioningehalt korreliert. Somit wären Schwefelanalysen als Bestandteil des Selektionsverfahrens für *L. angustifolius* und eingeschränkt auch für *P. sativum* dazu geeignet, methioninreiche Pflanzen zu identifizieren. Die Anwendbarkeit der Methodik ist nach den vorliegenden Ergebnissen von der Versuchspflanzenart abhängig. Insbesondere für *L. angustifolius* wären umfangreichere Folgeversuche sinnvoll. Dabei wäre eine Kombination der nachweislich geeigneten Verfahren für Folgeversuche erstrebenswert. Während sich der Chlorophyllgehalt als ungeeignetes Selektionskriterium erwiesen hat, stellen Et-Test und Schwefelanalysen sinnvollere Selektionsverfahren dar. Eine Steigerung des Methioningehaltes um bis zu 20% erscheint möglich und würde den Futtermittelwert heimischer Leguminosen erheblich verbessern.

Literatur

- Gallardo, K., R. Thompson, und J. Burstin, (2008): Reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus Biologies* 331: 755-762.
- Imsande, J., (2001): Selection of soybean mutants with increased concentrations of seed methionine and cysteine. *Crop Science* 41: 510-515.
- Lichtenthaler, H., und C. Buschmann, (2001): Chlorophylls and carotenoids : measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy . *Curr Protoc Food Analyt Chem* F4.3.1-F4.3.8
- Tabe, L. und T. J. V. Higgins, (1998). Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science* 3: 282-286.
- Zollitsch, W., T. Kristensen, C. Krutzinna, F. MacNaeihde, and D. Younie, (2004): Feeding for Health and Welfare: the Challenge of Formulating Well-balanced Rations in Organic Livestock Production. In: Vaarst. M.. S. Roderick. V. Lund and W. Lockeretz (eds.). *Animal Health and Welfare in Organic Agriculture*. CAB International. 329-356.