

## **Selektion auf Methioninreichtum bei heimischen Leguminosen (*Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius*)**

Selection of methionine rich local legumes (*Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius*)

**FKZ: 05OE024**

**Projektnehmer:**

Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI)  
Institut für Ökologischen Landbau  
Trenthorst 32, 23847 Westerau  
Tel.: +49 4539 8880-0  
Fax: +49 4539 8880-120  
E-Mail: [oel@vti.bund.de](mailto:oel@vti.bund.de)  
Internet: <http://www.vti.bund.de>

**Autoren:**

Schumacher, Henrik; Paulsen, Hans Marten

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

# **Abschlussbericht zum Projekt 05OE024**

## **Selektion auf Methioninreichtum des Samenproteins bei heimischen Leguminosen**

***(Vicia faba, Pisum sativum und Lupinus angustifolius)***

an

Referat 512

Forschungsmanagement im Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL)

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Deichmanns Aue 29

53179 Bonn

**Henrik Schumacher**

**Hans Marten Paulsen**

Institut für Ökologischen Landbau

im Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI)

Bundeforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei

Trenthorst 32

D-23847 Westerau

Laufzeit 1.4.2008-31.12.2010

Trenthorst und Hannover, Januar 2011



## Projektpartner:



Dr. Hans Marten Paulsen, Institut für  
Ökologischen Landbau, Johann Heinrich von  
Thünen-Institut (vTI) Trenthorst 32, 23847  
Westerau



PD Dr. Achim Gau, Institut für Botanik, Gottfried  
Wilhelm Leibniz Universität Hannover,  
Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover



Dr. Olaf Sass, Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans-  
Georg Lembke KG, Hohenlieth, 24363 Holtsee



Prof. Dr. Wolfgang Link, Department of Crop  
Sciences, Plant Breeding, Universität Göttingen,  
Von-Siebold-Str. 8, 37075 Göttingen



Dr. Hans Ulrich Jürgens, Institut für  
Resistenzforschung und Stresstoleranz, Julius  
Kühn-Institut (JKI), Rudolf-Schick-Platz 3, 18190  
Groß Lüsewitz



Regine Dieterich, Saatzucht Steinach GmbH,  
Wittelsbacher Str. 15, 94377 Steinach

## **Zusammenfassung**

Im Projekt wurden phänotypische Selektionskriterien zur Identifizierung von Leguminosenpflanzen (*Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius*) mit methioninreichem Samen bzw. Samenprotein eingesetzt (nach Imsande 2001). Die Selektion erfolgte an Mx-Generationen EMS behandelter Pflanzen anhand des Chlorophyllgehaltes der Blätter und der Keimwurzellänge in einer Ethioninlösung (Et-Test). Der Methioningehalt der Samen sollte anhand der Schwefelgehalte eingestuft werden. Der im Projekt alternativ entwickelte bakterielle Schnelltest zur Messung der Methioningehalte im Samenprotein erreichte noch keine ausreichende Genauigkeit.

Zwischen den Chlorophyllgehalten der Blätter und den Methionin- oder Schwefelgehalten in den Samen der Pflanzen konnte kein belastbarer Zusammenhang ermittelt werden.

Im Et-Test konnten bei *L. angustifolius* im Mittel signifikant höhere relative Methioningehalte (g/16g N) in den Samen der selektierten Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen festgestellt werden. Bei den übrigen untersuchten Pflanzenarten gelang dies nicht. Bei *P. sativum* lagen bei den im Et-Test als potentiell methioninreich selektierten Pflanzen bei hohen absoluten Methioningehalten (g/kg) gleichzeitig auch oft hohe S-Gehalte in den Samen vor. Die Methodik des Et-Tests wurde im Projekt erfolgreich entwickelt, jedoch ist die vorliegende Probenzahl für eine abschließende Bewertung der Methodik zu gering.

Bei den Untersuchungen zur regulatorischen Funktion vom freiem, zellulären Methionin auf die Protein- und Genexpression der Pflanzen konnte eine Reduktion der allgemeinen Proteinexpression in Gegenwart von 1mM Methionin festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Methioningehalt und Chlorophyllbiosynthese konnte nicht bestätigt werden.

Anhand der Aminosäurezusammensetzung in den Samen eines Leguminosensortiments (je Art 27-50 Sorten) konnte die aus der Literatur bekannte negative Korrelation zwischen Rohproteingehalt und relativem Methioningehalt bestätigt werden. Die Methioningehalte zeigten mit 12-22 % (g/16gN) bzw. 16-24 % (g/kg) positiver Abweichung vom Mittelwert eine hohe Variabilität des Merkmals.

Die Züchtung von methioninreichen Körnerleguminosen erscheint bereits auf Basis der natürlichen Variabilität der Gehalte mit dem bestehenden Sortiment durchaus erfolgversprechend. Empfehlenswert wäre dazu eine breitangelegte Selektion von Einzelpflanzen aus bestehenden Sorten und Linien nach exakt bestimmten Aminosäuregehalten (z. B. NIR) im Samen.

## Summary

Phenotypic criteria for the selection of grain legumes (*Vicia faba*, *Pisum sativum* and *Lupinus angustifolius*) with elevated methionine contents in seeds or seed protein were evaluated. After mutagenic treatment with EMS plants from Mx generations were selected according to leaf chlorophyll contents and radicle length growth in an ethionine solution (Et-test). The methionine content of the seeds should be classified according to the total sulphur content (acc. to Imsande 2001). As an alternative method to measure the methionine content in the seed protein a bioassay was developed as part of the project but it did not reach sufficient accuracy.

No resilient correlation between the chlorophyll content of leaves and the methionine or sulfur contents of seeds could be found.

In the Et-test the average relative methionine content (g/16g N) in seeds of selected *L. angustifolius* plants was significantly higher than in control plants. For the other plant species no accordant differences were found. In seeds from *P. sativum* plants, which were selected as potentially methionine-rich from the Et-test, high absolute seed-methionine (g/kg) contents were often paired with high absolute sulphur contents. The methodology of the Et-test was successfully developed in the project, but the present number of analysed samples is too small for a final evaluation of the methodology.

Regarding the regulatory function of free cellular methionine on protein and gene expression of plants, a reduction of general protein expression in the presence of 1 mM methionine was found. An assumed link between methionine and chlorophyll biosynthesis could not be confirmed.

Based on the amino acid composition in seeds of a legume sample (27-50 varieties per species) a negative correlation between the seed protein content and relative methionine content that is known from literature could be confirmed. The varieties showed a high variability in the methionine content with a positive deviation of 12-22 % (g/16gN) or 16-24 % (g/kg) from the sample mean.

The production of methionine enriched grain legumes seems already feasible on basis of the natural variability of the varieties. For this purpose a broad selection of individual plants from the existing varieties and inbredlines according to exactly determined amino acid contents (e. g. NIR) of the seeds would be recommended.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Ziele und Projektplanung</b> .....	9
1.1 Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplans .....	10
1.1.1 Zu Ziel 1: Kenntnis über die Variationsbreite der Gehalte essentieller Aminosäuren im Samenprotein verschiedener heimischer Leguminosenarten als Grundlage für eine weitere Züchtung .....	10
1.1.2 Zu Ziel 2: Ermittlung von phänotypischen Selektionskriterien für methioninreiche Linien bei <i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i> und <i>Lupinus angustifolius</i> .....	11
1.1.3 Zu Ziel 3: Etablierung eines Labortests auf Ethioninresistenz und Selektion methioninreicher Pflanzen .....	13
1.1.4 Zu Ziel 4: Gezielte Selektion methioninreicher Mutanten und Weitervermehrung im Feld bei <i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i> und <i>Lupinus angustifolius</i> als Grundlage für die ökologische Züchtung.....	13
1.1.5 Untersuchungsrahmen.....	14
1.1.6 Zeitplan.....	15
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde .....	16
1.2.1 Motivation .....	16
1.2.2 Stand der Wissenschaft und Technik.....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	19
2.1 Sortenauswahl.....	19
2.2 Chemische Methoden.....	20
2.2.1 Aminosäure-Analysen.....	20
2.2.2 S- und N-Analysen.....	20
2.3 Bakterieller Schnelltest .....	21
2.4 Ermittlung der phänotypischen Selektionskriterien.....	22
2.4.1 Pflanzenanzucht .....	23
2.4.2 Methoden zur Ermittlung der Grünfärbung der Blätter .....	24
2.5 Ethionin-Test (Et-Test) .....	26
2.6 Felduntersuchungen .....	27
2.6.1 Pflanzenmaterial aus der Mutagenese.....	27
2.6.2 Feldanbau und Selektion nach Grünfärbung .....	28
2.6.3 Vermehrung und Anbau selektierter Pflanzen aus dem Et-Test.....	30
2.7 Molekularbiologische Untersuchungen .....	32
2.7.1 Immunologischer Proteinnachweis.....	32
2.7.2 Proteomik .....	32
2.7.3 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) .....	33
2.8 Statistische Datenauswertung.....	33

<b>3 Ergebnisse</b> .....	34
3.1. Aminosäuregehalte des Sortiments zur Ermittlung der Variationsbreite bei heimischen Leguminosen .....	34
3.2 S-Gehalte der Samen und Zusammenhang mit den Gehalten an S-haltigen Aminosäuren	36
3.3 Eignung des bakteriellen Schnelltests für die Bestimmung der Methioningehalte in Legumionsensamen .....	40
3.4 Vorversuche zur Verifizierung der phänotypischen Selektionskriterien .....	44
3.4.1 Visuelle Methoden .....	44
3.4.2 Bestimmung der Blattchlorophyllgehalte.....	47
3.4.3 Fluorometrische Untersuchungen an Blattgewebe .....	50
3.4.4 Ergebnisse der SPAD-Messungen .....	53
3.5 Vorversuche zur Anwendbarkeit des Et-Tests zur Identifikation methioninreicher Pflanzen .....	<b>55</b>
3.6 Ergebnisse zur Selektion auf methioninreiche Pflanzen auf Basis von Et-Test und Chlorophyllgehalten .....	<b>60</b>
3.7 Molekularbiologische Untersuchungen .....	<b>68</b>
3.7.1 Immunologischer Proteinnachweis .....	68
3.7.2 Proteomik .....	69
3.7.3 RNA/DNA Analyse .....	73
<b>4 Diskussion</b> .....	75
4.1. Möglichkeiten der Steigerung der Methioningehalte in Leguminosen durch Pflanzenzucht .....	75
4.1.1 Steigerung der Methioningehalte nach Mutagenese .....	77
4.1.2 Bandbreite der Aminosäuregehalte des Leguminosensortiments und Bedeutung für die Landwirtschaft .....	78
4.1.3 Nutzbarkeit der erprobten phänotypischen Selektionskriterien in der Pflanzenzucht	80
4.1.4 Potentielle Anwendung der erzielten Ergebnisse der physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen in der Pflanzenzüchtung .....	82
4.2 Vereinbarkeit der im Projekt angewandten Methoden der Pflanzenzucht mit ökologischer Wirtschaftsweise.....	83
4.3 Verknüpfung von phänotypischen Kriterien mit weiterführenden Ansätzen zur Selektion auf methioninreiche Leguminosen.....	84
<b>5 Fazit und weiterführende Fragestellungen</b> .....	85
<b>6 Gegenüberstellung von den geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen</b> .....	86
<b>7 Literatur</b> .....	89
<b>8 Übersicht über Veröffentlichungen aus dem Projekt</b> .....	93
<b>Anhang</b> .....	94

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BCPIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
Cys	Cystein
ETR	Elektronentransportrate am Photosystem II
Et-Test	Ethionintest
F0	minimale Fluoreszenz des Photosystems II
Fm	maximale Fluoreszenz des Photosystems II
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LB-Medium	lysogeny broth Medium
M9-Medium	Minimal Medium mit 9 essentiellen Salzen
Met	Methionin
MgProto	S-adenosyl-L-methionine:magnesium protoporphyrin IX-O-methyltransferase
MW	Mittelwert
NBT	Nitroblau-Terazoliumchlorid
NIR	Nahinfrarotspektroskopie
NPQ	Nicht photochemisches Quenching
OD	optische Dichte
PAM	Pulsamplitudenmodulation
QTL	Quantitative trait locus
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAS	S-Aminosäure
TG	Trockengewicht
SPAD	single-photon avalanche diode

## 1 Ziele und Projektplanung

In einem zweijährigen Forschungsprojekt sollte ein bei Sojabohne (*Glycine max*) bereits erfolgreich verlaufenes Verfahren der Selektion auf Methioninreichtum des Samenproteins anhand phänotypischer Kriterien (Imsande 2001) bei heimischen Leguminosenarten (Lupine, Erbse, Ackerbohne - *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius*) angewandt und etabliert werden und eine erste gezielte Weitervermehrung aussichtsreicher Linien als Grundlage für die ökologische Züchtung durchgeführt werden. Die Variationsbreite der Aminosäurezusammensetzung des verfügbaren Liniensortiments der Arten sollte anhand von Messungen und von in der Literatur verfügbaren Daten erfasst und ausgewertet werden. Mit den Ergebnissen der Arbeiten sollten der praktischen Pflanzenzüchtung Wege aufgezeigt werden, heimische Leguminosen gezielt auf Wert gebende Inhaltsstoffe (hier Methionin im Samen) zu selektieren und den Futterwert betriebseigener Futtermittel zu steigern. Durch die Einbindung von Pflanzenzuchtunternehmen in das Projekt wurde ein direkter Praxistransfer der Erkenntnisse gewährleistet.

Das Vorhaben leistet Beiträge zu den nachstehenden Bereichen des „Programms des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer im ökologischen Landbau“: a) Entwicklung und Verbesserung neuer und alter Sorten, -mischungen und Artgemengen im Hinblick auf die Zielsetzungen und Bedingungen des ökologischen Landbaus, b) Konzepte zur Begrenzung der Gefahr der Kontamination von Betriebsmitteln und Erzeugnissen mit gentechnisch veränderten Organismen, c) Entwicklung von Züchtungszielen und -konzepten für den ökologischen Landbau und d) Verbesserung der Qualität ökologisch erzeugter Produkte.

Es entspricht damit den förderpolitischen Zielen des Programms.

Folgende Ziele wurden im Projekt angestrebt:

1. Kenntnis über die Variationsbreite der Gehalte essentieller Aminosäuren im Samenprotein verschiedener heimischer Leguminosenarten als Grundlage für eine weitere Züchtung zu erlangen.
2. Phänotypische Selektionskriterien für solche methioninreichen Linien bei *V. faba*, *P. sativum* und *L. angustifolius* definieren.
3. Einen Labortest zur Auswahl der methioninreichen Linien etablieren.
4. Gezielte Selektion methioninreicher Mutanten und Weitervermehrung im Feld bei *V. faba*, *P. sativum* und *L. angustifolius* als Grundlage für die ökologische Züchtung erproben.

## **1.1 Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplans**

Die Ziele sollten im Projekt wie folgt erreicht werden.

### **1.1.1 Zu Ziel 1: Kenntnis über die Variationsbreite der Gehalte essentieller Aminosäuren im Samenprotein verschiedener heimischer Leguminosenarten als Grundlage für eine weitere Züchtung**

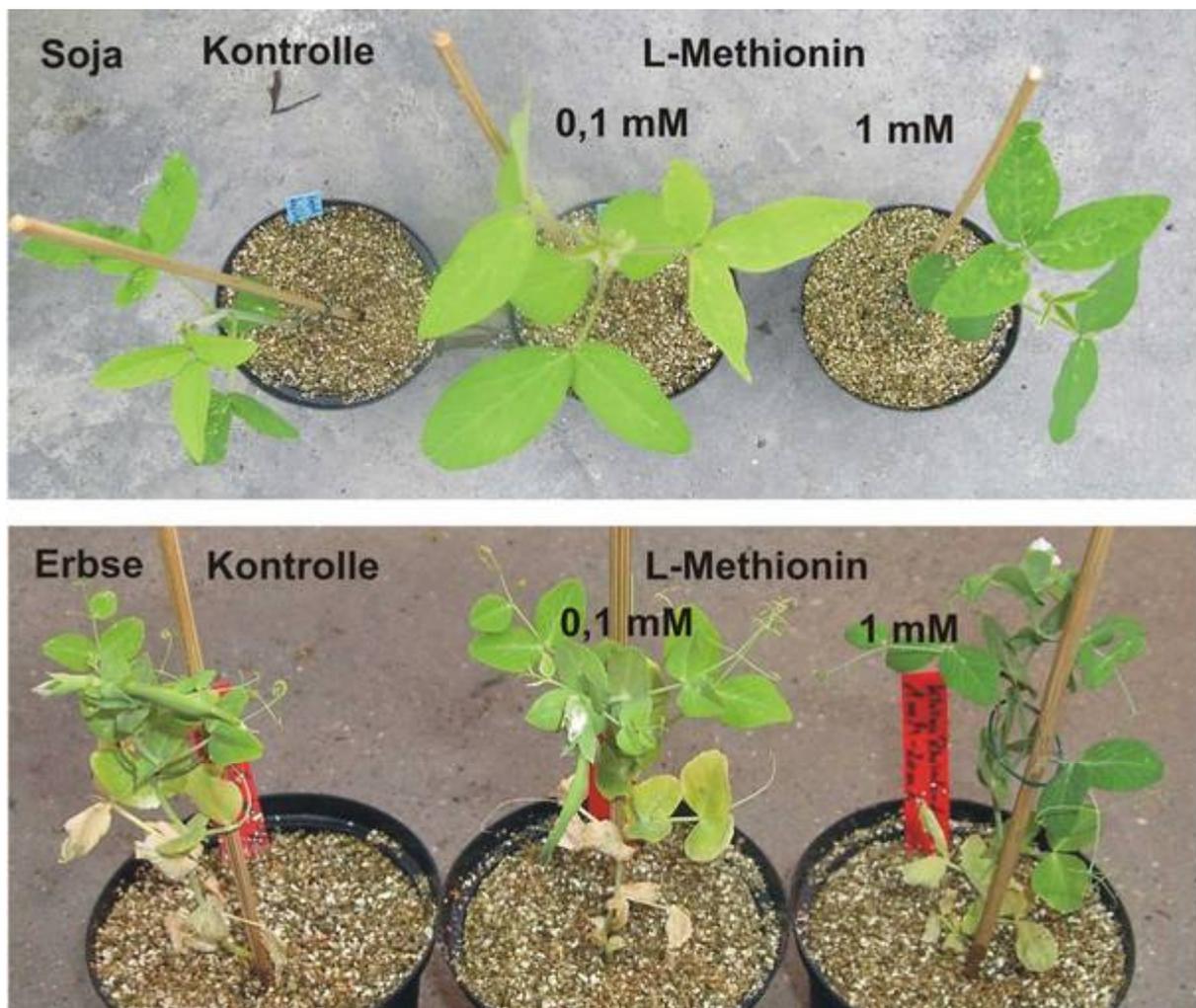
In diesem Projektabschnitt sollte am Leguminosensortiment gängiger und „exotischer“ (Wild)Genotypen der Züchterhäuser, der Universität Göttingen und anderer Quellen die Variationsbreite der Aminosäuregehalte im Samenprotein ermittelt werden. Eventuell interessante Linien für Zuchtprogramme auf Methioninreichtum sollten so identifiziert und ein Überblick über die genetische Variabilität des Merkmals geschaffen werden. Untersucht wurde das Aminosäurespektrum von 50 Genotypen je Leguminosenart mittels HPLC. Es sollte von jeder Pflanzenart Material verwendet und verglichen werden, das an einem Standort und in einem Anbaujahr angebaut wurde. Wenn verfügbar, sollte das dasselbe Material auch von einem zweiten Standort verglichen werden, um zu prüfen ob eine möglicherweise zu erkennende Reihung der Methioningehalte sich auf verschiedenen Standorten gleich ausprägt. Die Erkenntnisse zur hohen Standortabhängigkeit der Proteinqualität bei *L. angustifolius* aus dem BLE-Projekt 03OE355 „Züchterische Bearbeitung von Süßlupinen für den ökologischen Landbau - Qualitätsuntersuchungen im Hinblick auf Futtereignung“ (Jansen et al. 2006a) finden insoweit Berücksichtigung.

Die Auswahl der Genotypen war Bestandteil des Forschungsprojektes. Die Züchterhäuser identifizierten aus ihrem Sortiment ein Spektrum verschiedener Genotypen, bei denen zu erwarten war, dass ein weiter Messbereich auftrat. Dabei flossen z. B. Kenntnisse über tiefe Blattgrünfärbung, hohe und niedrige Eiweißgehalte sowie über ggf. bereits bekannte Methioningehalte ein. Zusätzlich wurden auch einzelne mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisierte Genotypen analysiert. Die Aminosäuregehalte wurden mit dem HPLC-Verfahren bestimmt.

Vorliegende Daten zu Methioningehalten in Leguminosen aus der Literatur wurden gesammelt und ausgewertet. Die Ergebnisse dieses Projektabschnittes wurden in einer wissenschaftlichen Zeitschrift und auf Tagungen veröffentlicht (Schumacher et al. 2011a, im Druck, Paulsen et al. 2010 im Druck).

### 1.1.2 Zu Ziel 2: Ermittlung von phänotypischen Selektionskriterien für methioninreiche Linien bei *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius*

Im Gewächshaus wurden Samen der verschiedenen Leguminosenarten bei Methioninüberschuss im Medium kultiviert. Diesbezügliche Voruntersuchungen zur Nutzung der Blattfärbung als Hinweis auf methioninreiche Pflanzen im Vorfeld der Projektbeantragung hatten gezeigt, dass die Applikation von 1 mM Methionin im Nährmedium auch in *P. sativum* zu einer deutlichen sichtbaren Zunahme des Blattchlorophylls führte (Abb. 1).



**Abb. 1: Anzucht von *G. max*- und *P. sativum*- Pflanzen in Gegenwart von verschiedenen L-Methionin Konzentrationen im Gießwasser (AG Gau, Uni Hannover, 2007).**

Dieses Phänomen konnte auch durch die Messung des Gesamt-Chlorophyllgehaltes bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, bezogen auf die Blattfläche eine Zunahme des Chlorophyll-Gehaltes bei der *G. max*-Samen und bei *P. sativum* fast eine Verdoppelung des Ausgangswerts bezogen auf die Kontrollpflanzen (Tab. 1).

**Tab. 1: Bestimmung des Gesamtchlorophyllwertes von *G. max* und *P. sativum* bei Anzucht in Gegenwart von verschiedenen L-Methionin-Konzentrationen. (AG Gau, Uni Hannover 2007)**

L-Methionin Konzentration	Gesamtchlorophyllgehalt ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	
	<i>Glycine max</i>	<i>Pisum sativum</i>
0 mM	51,6	64,6
0,1 mM	54,6	86,8
1 mM	65,7	107,1

Außerdem wurde mit dem Puls Amplituden Modulator Fluorimeter (PAM) die Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt, ein Maß für die effektive Photosynthese-Leistung der Pflanzen. Bei diesem aufwändigeren Versuchsansatz hatte sich gezeigt, dass der erhöhte Gesamt-Chlorophyll-Gehalt in Gegenwart von 1 mM Methionin zu einer Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz führt, was ein klarer Hinweis auf eine bessere Kopplung des photosynthetischen Elektronentransportes ist und somit auf eine effizientere Ausnutzung der Lichtenergie hindeutet.

Im Projekt wurden die im Methioninüberschuss angezogenen Pflanzen hinsichtlich phänotypischer Veränderungen bonitiert. Die phänotypischen Befunde wurden mit gemessenen Chlorophyllgehalten untermauert. Auch die Ergebnisse dieses Projektabschnittes wurden in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift und auf Tagungen publiziert (Schumacher et al. 2009a, 2009b, Paulsen et al. 2010, im Druck)

Darüber hinaus sollte mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden, wie sich der sukkulente grüne Phänotyp Methionin-reicher Leguminosen erklären lässt. Die Biosynthese der Aminosäure Methionin ist bis auf die letzten beiden Schritte in den Chloroplasten der Pflanzen lokalisiert (Hesse and Hoefgen 2003). Aus diesem Grund sollte das Transkriptprofil des Methionin-Biosyntheseweges mit dem Transkriptprofil des Chlorophyll-Biosyntheseweges verglichen werden, um zu klären, ob eine regulative Vernetzung bei der Biosynthese besteht.

Weiterhin sollten anhand eines vergleichenden Transkriptprofils zwischen dem Wildtyp und ausgewählten methioninreichen Pflanzen die herauf- bzw. herunterregulierten Transkripte identifiziert werden. Diese Aspekte sollten im Rahmen einer Promotionsarbeit im Fach Botanik an der Universität Hannover untersucht werden. Dabei gewonnene Erkenntnisse über methioninspezifische Veränderungen in den Gen- und Proteinexpressionsmustern der Pflanzen könnten in Zukunft zur Entwicklung von spezifischen Selektionsmarkern herangezogen werden. Denkbar wäre ein marker assisted screening (MAS) auf erhöhte Genexpression be-

dingt durch hohe Konzentrationen von ungebundenem, cytoplasmatischem Methionin. Zur Anwendung von derartigen Techniken sind profunde Kenntnisse zu möglichen regulatorischen Eigenschaften des Methionins erforderlich, welche bei den verschiedenen Versuchspflanzen überprüft und verifiziert werden sollen.

### **1.1.3 Zu Ziel 3: Etablierung eines Labortests auf Ethioninresistenz und Selektion methioninreicher Pflanzen**

Im Labor wurde ein weiterer Test, der aufgrund des Wurzelwachstums auf methioninreiche Pflanzen hinweist mit den drei Leguminosenarten durchgeführt. Dazu wurde die Länge der Keimwurzeln in ethioninhaltigem Filterpapier bestimmt (Et-Test) (Imsande 2001). Hintergrund des Tests ist, dass Ethionin das Pflanzenwachstum hemmt, die Toxizität des Ethionins aber für methioninreiche Pflanzen geringer ist, so dass diese längere Wurzeln ausbilden. Die so selektierten Pflanzen wurden im Nährmedium weitergezogen und im weiteren Wachstum nach dem unter Ziel 2 ermittelten Phänotyp auf Methioninreichtum selektiert.

Die aus diesen Pflanzen gewonnene Saat wurde auf S- und N-Gehalte untersucht und die S-reichen Linien im Feld weitervermehrt (siehe Ziel 4). Der Gesamt-S-Gehalt sollte dabei als Hinweis auf höhere Gehalte an S-haltigen Aminosäuren dienen.

In der Projektlaufzeit sollte darüber hinaus ein bakteriologischer Schnelltest auf Methioninreichtum entwickelt werden, der als weiteres Selektionskriterium eingeführt werden kann. Hierzu sollten Bakterien in Gegenwart von pulverisiertem Samen angezogen werden. Der für das bakterielle Wachstum benötigte S muss dann aus dem Samen der Pflanzen rekrutiert werden. Aus dem Wachstum der Bakterien sollte direkt auf die verfügbare L-Methionin Menge geschlossen werden.

### **1.1.4 Zu Ziel 4: Gezielte Selektion methioninreicher Mutanten und Weitervermehrung im Feld bei *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lupinus angustifolius* als Grundlage für die ökologische Züchtung.**

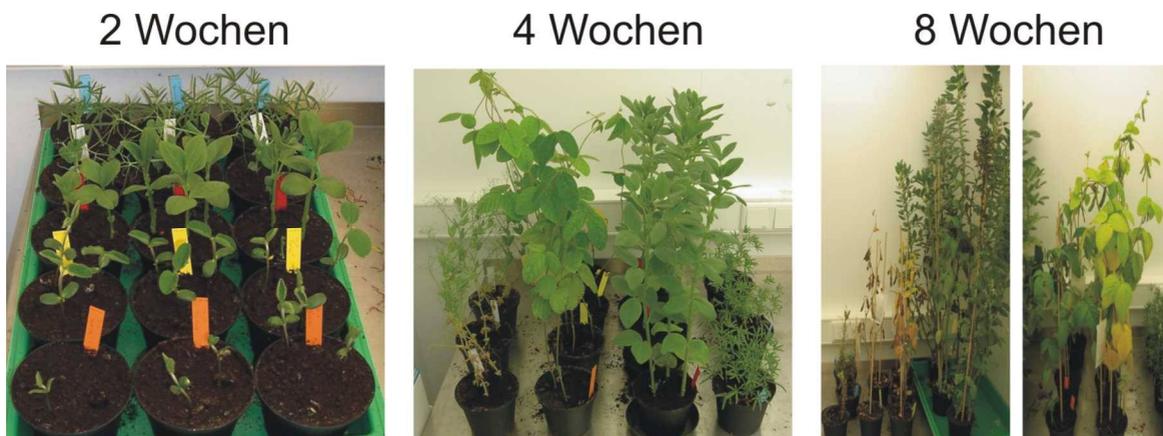
Im Feld sollten Samen aus jeweils einer chemisch mit EMS mutagenisierten Inzuchtlinie bzw. Sorte ausgesät und kultiviert werden. Anhand des Phänotyps sollten die methioninreichen Pflanzen ausgewählt und markiert, die Einzelpflanzen beerntet und weitervermehrt werden. Die Samen sollten auf S- und N-Gehalte untersucht werden und die Methioningehalte und die Aminosäurezusammensetzung der Linien mit den höchsten S-Gehalten bestimmt werden (150 Analysen). Die Saat der verschiedenen Folgegenerationen kann für Kreuzungen bei den Zuchtunternehmen verwendet werden. Die Ergebnisse dieses Projektabschnittes sollten als

Bericht in das Internetportal des BÖL eingespeist und auch wissenschaftlich publiziert werden.

### 1.1.5 Untersuchungsrahmen

Für die Selektion von methioninreichen Leguminosen stellt der Zeitfaktor ein wesentliches Problem dar. Die normale Selektion findet unter Feldbedingungen im Freiland statt. Im Inland kann daher nur eine Ernte im Jahr erzielt werden. Im Vorfeld der Antragstellung wurde untersucht, ob Hülsenfrüchte wie *P. sativum*, *G. max*, *L. angustifolius* und *V. faba* unter Gewächshaus- bzw. unter kontrollierten Klimakammerbedingungen zur Blüte und nachfolgend zur Samenproduktion gebracht werden können. Die Vorversuche dazu haben deutlich gezeigt, dass die Anzucht von *P. sativum*, *G. max*, *L. angustifolius* und *V. faba* in den Sommermonaten (ab Mai) problematisch ist, da es aufgrund der erhöhten Temperaturen im Gewächshaus zum Verlust der Blüte und somit nicht zur Samenbildung kommt und viele Pflanzen vorzeitig absterben.

Anders verhält es sich bei der Kultivierung von *P. sativum*, *G. max*, *L. angustifolius* und *V. faba* unter kontrollierten Klimakammerbedingungen. Bei einer Anzuchttemperatur von 24°C tagsüber und 16°C nachts und einer täglichen Belichtungszeit von 12 h mit einer Strahlungsintensität von 100 µE erfolgte die Blütenbildung in der Regel nach 4 Wochen und die Ausbildung des Samens war nach weiteren 4 Wochen abgeschlossen (Abb. 2).



**Abb. 2: Anzucht und Reifung von *G. max*-, *P. sativum*-, *L. angustifolius*- und *V. faba*-Pflanzen unter kontrollierten Klimakammerbedingungen (AG Gau, Uni Hannover 2007)**

Die Aufzucht der Pflanzen in Klimakammern sollte im Projekt für die Erhöhung der Generationenzahl genutzt werden.



## **1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde**

### **1.2.1 Motivation**

In der ökologischen Tierhaltung ist der Zusatz von synthetischen Aminosäuren zu Futtermitteln nicht gestattet (EG-VO 834/2007). Daher ist ein adäquates Angebot an den Aminosäuren Methionin und Lysin in ökologischen Futtermitteln z. B. für Geflügel oder Schweine mit hofeigenen Futtermitteln meist nur mit einem Eiweißüberschuss in der Ration zu erreichen (Zollitsch et al. 2000 und 2004). Das bedeutet eine ineffiziente Ausnutzung von Futtermitteln und die Gefahr vermehrter N-Verluste durch eine unangepasste Eiweißversorgung von Tieren (Jeroch et al. 1999). Mit dem Forschungsprojekt sollten daher erste Schritte unternommen werden, die Methioningehalte heimischer Leguminosen zu verbessern.

### **1.2.2 Stand der Wissenschaft und Technik**

Leguminosensamen haben einen relativ geringen Gehalt an den S-haltigen Aminosäuren Methionin und Cystein (Abel et al. 2002, Roth-Maier et al. 2004, Bellof et al. 2005, Schuster et al. 1998). In Mischfuttermitteln kann dies zum Teil durch Getreide ausgeglichen werden, dessen Eiweiß im Vergleich zu den Leguminosen höhere Methionin- und Cysteingehalte aufweist. Im konventionellen Landbau können für Fütterungszwecke zusätzlich synthetische Aminosäuren supplementiert werden. Diese Option fällt für die ökologische Futtermittelherzeugung weg, so dass hier verstärkt nach Komponenten mit wertvollen Inhaltsstoffen gesucht werden muss (Zollitsch und Baumung 2004). In Futtermitteln wird auch in ökologischen Betrieben *G. max* eingesetzt, die im Vergleich zu heimischen Leguminosen einen hohen Eiweißgehalt aufweist. Ökologisch erzeugte *G. max* wird überwiegend importiert und weist das Risiko gentechnischer Veränderungen auf (Partridge and Murphy 2004). Wenn *G. max* durch *P. sativum*, *V. faba* oder *L. angustifolius* ersetzt werden soll, führt das zu einer Verschärfung des Problems der unausgewogenen Aminosäurenversorgung vor allem in Futtermitteln von Monogastriern.

Ein gezieltes Herangehen in Richtung der Verbesserung der Eiweißqualität ist aufgrund des im Vergleich zu *G. max* geringen Marktanteils von *P. sativum*, *V. faba* und *L. angustifolius* und des relativ kleinen ökologischen Saatgutmarktes nicht Schwerpunkt der Leguminosenzüchtung. So beschränken sich Zuchtprogramme bei heimischen Leguminosen heute, trotz vielfältiger Versuche die Aminosäuregehalte gezielt zu beeinflussen (Duranti and Scarafoni 1999), auf den Ertrag, den Proteinertrag, Standfestigkeit und Resistenzen (Krishnan 2005, Wang et al. 2003, Steigenberger 2002).

Untersuchungen der Eiweißqualität verschiedener Leguminosensortimente (Boulter et al. 1976, Monti and Grillo 1983, Müntz et al. 1974, Berville et al. 2003, Hanelt et al. 1978) zeigten, dass eine hohe Variabilität innerhalb der Arten vorliegt. In Zuchtprogrammen bei Leguminosen auf high-value Proteine war die Anreicherung einzelner Aminosäuren im Protein jedoch meistens mit einem Abfall des Proteingehaltes der Samen verbunden. Der Protein-ertrag und der Ertrag der Aminosäure pro Hektar fielen dadurch. Bei S-haltigen Aminosäuren scheint diese Abhängigkeit aber nicht zwingend gegeben zu sein (Monti und Grillo 1983). In den neunziger Jahren wurden erste Zuchtversuche auf Methioninreichtum mit gentechnisch verändertem *G. max* aufgrund des Auftretens allergenen Potentials wieder eingestellt (Marquard und Durka 2005, Nordlee et al. 1996). Jedoch konnte in jüngerer Zeit eine Steigerung der Methioningehalte in Leguminosen bei der Einführung transgener Pflanzen erzielt werden (Molvig 1997, Müntz et al. 1998, Krishnan 2005). Mandal und Mandal (2000) fassen in einem Review die genetische Steuerung der Speicherproteine in den Samen zusammen. Die Akkumulation und Konzentration der Speicherproteine ist klar genetisch gesteuert jedoch ist sie, wie die Proteinzusammensetzung auch von Umweltbedingungen abhängig. Monti und Grillo (1983) geben die von verschiedenen Autoren gefundene Bandbreite der Methioningehalte in verschiedenen Leguminosen wie folgt an [g/100g Protein]: *P. sativum* und *V. faba* 0,6-1,0, *Lupinus albus* 0,5-1. Wird der gesamte Genus einer Art betrachtet wird über ähnliche Schwankungsbreiten berichtet (Baldi and Salamini 1973, Holt and Sosulski 1979).

So wurden im Rahmen des BÖL-Projekts 03OE355 „Züchterische Bearbeitung von Süßlupinen für den ökologischen Landbau – Qualitätsuntersuchungen im Hinblick auf Futtereignung“ z. B. bei verschiedenen Sorten von *L. angustifolius*, die an einem Standort angebaut wurden Unterschiede im Methioningehalt des Proteins von bis zu 25 % gefunden (Jansen et al. 2006). Studien zur Proteinzusammensetzung in *P. sativum*, belegen z. B. die genetische Variabilität der Legumin- (11S) und Vincilin-Gehalte (7S) im Protein von *P. sativum* (Tzitzikas et al. 2005). Legumin besteht wiederum aus zwei Untereinheiten von denen eine methioninhaltig ist. Vincilin enthält kein Methionin. Das Verhältnis von Legumin zu Vincilin variiert bei verschiedenen Genotypen von *V. faba* zwischen 1:2 und 1:3,7. Für die  $\alpha$ -Ketten des Legumin A wurden Regelmäßigkeiten bei der Vererbung herausgefunden, so dass diese als Marker bei einer züchterischen Bearbeitung der Proteincharakteristik genutzt werden könnten (Link et al. 2005). Bei 59 Linien von *P. sativum* und von deren Wildformen fanden Tzitzikas et al. (2005) eine Bandbreite zwischen 5,3 und 24,5 % beim Leguminanteil am gesamten Protein und damit eine hohe Variabilität. Es ist davon auszugehen, dass diese genetische Variabilität inner-

halb der Arten genutzt werden kann, methioninreiche Linien auf züchterischem Wege zu erreichen.

Die Arbeiten von Imsande (2001) zeigen nun ein Verfahren auf, *G. max* mit kostengünstigen Methoden anhand von phänotypischen Merkmalen auf Methioninreichtum zu selektieren. Im Einzelnen fand Imsande heraus, dass methioninreiche *G. max* einen dunkelgrünen, sukkulenten Habitus hatten und dass sie in methioninhaltiger Nährlösung ein besseres Wurzelwachstum zeigten als methioninarme Pflanzen. Es gelang ihm durch gezielte Selektion anhand dieser Kriterien und Kreuzung der ausgewählten Pflanzen in wenigen Jahren *G. max*-Linien mit bis zu 20 % mehr Methioninanteil im Eiweiß gegenüber den Elternpflanzen zu züchten.

Von immer größer werdender Bedeutung für die Pflanzenzüchtung ist der Einsatz von molekularbiologischen Markern, u.a. single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) (Guimares et al. 2007). Diese dienen zur marker assisted selection (MAS) und sowohl für eine Selektion auf monogenetische als auch auf polygenetische Eigenschaften. Da der überwiegende Teil der agronomisch relevanten Pflanzeigenschaften (bspw. Ertrag, Wuchsverhalten und Qualitätsparameter) polygen ausgeprägt wird, ist hierfür der Einsatz von quantitative trait locus markern (QTL) von erheblicher Bedeutung. Zur Entwicklung und Anwendung derartiger Marker ist jedoch ein fundiertes Wissen über die Ausprägung (den Phänotyp) der gewünschten Eigenschaft (bspw. Kornertrag) im Sortiment Voraussetzung. Darauf aufbauend können Marker den gewünschten Eigenschaften zugeordnet werden und zur Identifikation von Pflanzen des gewünschten Phänotyps dienen, ohne die Voraussetzung die zugrunde liegende Gen-Eigenschaft genau zu kennen (Guimares et al. 2007). Von entscheidender Bedeutung für diesen Züchtungsansatz ist jedoch, eine umfangreiche Phänotypisierung der Pflanzen, beispielsweise eine umfassende Aminosäureanalyse im Sortiment.

Das Selektionsverfahren von Imsande (2001) sollte im Forschungsprojekt an heimischen Leguminosen in Zusammenarbeit mit Pflanzenzüchtern erprobt werden. Weiterhin sollten mit molekularbiologischen Methoden Grundlagen der Regulierung der Methioninbiosynthese in Pflanzenzellen und methioninspezifische Veränderungen in den Gen- und Proteinexpressionsmustern der Pflanzen erforscht werden.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die für die Bearbeitung der oben beschriebenen Fragestellungen angewandten chemischen, physikalischen und biologischen Methoden, die Auswahl der untersuchten Pflanzen sowie die Versuchsanstellung in Feld und Labor beschrieben.

### 2.1 Sortenauswahl

#### a) Sortenauswahl für die Ermittlung der Variationsbreite der Aminosäurezusammensetzung heimischer Leguminosen

Die Aminosäurezusammensetzung von insgesamt 107 Sorten der vier Leguminosenarten (*L. angustifolius*, *L. luteus*, *P. sativum* und *V. faba*) wurde analysiert. Im Folgenden wird dieser Probensatz als „Sortiment“ bezeichnet. Die Sorten wurden von zwei deutschen Zuchtunternehmen (Norddeutsche Pflanzenzucht, Holtsee und Saatzucht Steinach, Steinach) und der Abteilung für Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen entsprechend dem verfügbaren Sortiment und auf Basis der Überlegung einen möglichst weiten Bereich möglicher Aminosäurekonzentrationen abzudecken ausgewählt. Bei *L. angustifolius* wurden z. B. bereits dunkelgrüne Typen in die Auswahl einbezogen.

Die Norddeutsche Pflanzenzucht KG (NPZ) stellte 50 Sorten von *P. sativum* zur Verfügung. Darunter waren Futtererbsen (36), Markerbsen (8), vier Zwischenfruchtsorten und zwei Sorten von Wintererbsen. Von der Saatzucht Steinach GmbH kamen 50 Samenproben der Arten *L. angustifolius* und *L. luteus*. Die darunter befindlichen 27 verschiedenen *L. angustifolius*-Sorten stammten aus Weißrussland (8), Deutschland (4), Ungarn (1), Polen (4), Australien (4), Spanien (2), Marokko (1), Russland (1), Ukraine (1) und Jugoslawien (1). Das Samenmaterial stammte dabei von Pflanzen, die an zwei verschiedenen Standorten in Deutschland, größtenteils im Jahr 2007, gewachsen waren. Zusätzlich wurden vier deutsche Sorten von *L. luteus* zur Verfügung gestellt. Die Abteilung für Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen stellte 50 Samenproben von 27 verschiedenen *V. faba* Sorten für die Analyse bereit. Von diesen Sorten, stammten 25 aus Deutschland. Die übrigen zwei stammten aus Spanien und Italien. Weiterhin waren zwei Tannin-freie Sorten unter den deutschen Sorten. Zur Überprüfung des Standorteinflusses auf die Aminosäurezusammensetzung im Samen wurden 23 Sorten von *V. faba* an zwei Standorten sowohl unter Trockenstressbedingungen als auch unter Kontrollbedingungen angezogen. Darüber hinaus wurden vier Wintersorten von *V. faba* für die Analyse zur Verfügung gestellt (vgl. Tabellen im Ax, Ay, Az im Anhang).

## **b) Sortenauswahl für die Tests für die Ermittlung der phänotypischen Selektionskriterien und die Weitervermehrung im Feld**

Als Versuchspflanzen dienten *P. sativum*, *L. angustifolius* und *V. faba*. Von der Norddeutschen Pflanzenzucht KG wurden die Sorten Hardy (*P. sativum*) und die Linie VF172 (*V. faba*: Mutagenese, Weitervermehrung) und die Sorte Espresso (*V. faba*: Vorversuche, Testentwicklung) bereitgestellt. Die Saatzucht Steinach GmbH stellte die Sorte Boruta (*L. angustifolius*) zur Verfügung.

Im Vorfeld des Projekts wurden zur Sortenauswahl auch Bedenken diskutiert, bei einer freien Selektion von Pflanzen auf Methioninreichtum würden ggf. vorhandene Zuchterfolge auf antinutritive Inhaltsstoffe nicht ausreichend berücksichtigt. Seitens der Zuchtunternehmen wurde darauf verwiesen, dass es zunächst wichtiger sei, die grundsätzliche Machbarkeit einer Selektion auf Methioninreichtum mit den Methoden des Projekts zu überprüfen. Jedoch müssen die antinutritiven Inhaltsstoffe bei Leguminosenzuchtprogrammen nach wie vor wichtige Zuchtziele sein. Es wurden für die Versuche neben der Linie VF 172, daher Sorten aus dem bestehenden Zuchtprogramm der Firmen verwendet. Die Bedeutung der antinutritiven Inhaltsstoffe der im Projekt verwendeten Leguminosensorten Hardy, Espresso und Boruta für die standardisierten praecaecalen Rohprotein- und Aminosäurenverdaulichkeiten bei Schweinen wurde von in 2007 von Mosenthin et al. beschrieben.

## **2.2 Chemische Methoden**

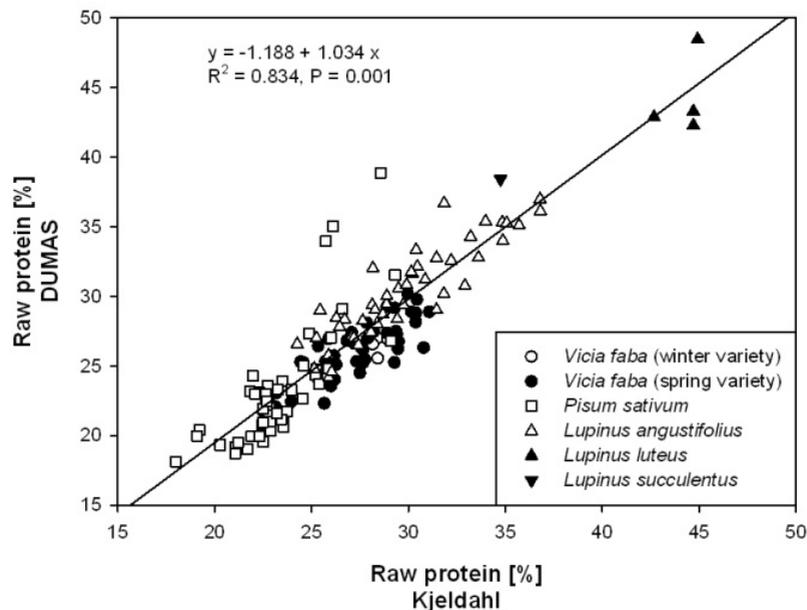
### **2.2.1 Aminosäure-Analysen**

Die Aminosäuren wurden entsprechend der Richtlinie 98/64/EG (1998) der Europäischen Union für Messungen von Aminosäuren, Rohfett und Olaquinox in Futtermitteln analysiert. Die Messungen wurden mittels HPLC durchgeführt und die Ergebnisse als g/16g N (relative Gehalte) oder g/kg Trockenmasse (absolute Gehalte) dargestellt. Alle essentiellen Aminosäuren mit Ausnahme von Tryptophan wurden bestimmt.

### **2.2.2 S- und N-Analysen**

Die chemische Analyse wurde mit vermahlenem Samenmaterial durchgeführt. N- und S-Analysen wurden nach den Methoden von Kjeldal und Dumas durchgeführt (AOAC Official Method 990.03, Marco et al. 2002, Kowalenko und van Laerhoven 1997). Für die direkte Elementbestimmung nach trockener Veraschung nach Dumas wurde ein Elementaranalysegerät Euro EA 3000 verwendet. Der Rohproteingehalt der Samen wurde aus den ermittelten

N-Gehalten berechnet ( $\% \text{ N} \times 6,25$ ). Abbildung 3 zeigt die gute Korrelation der Messwerte zum Rohproteingehalt in Leguminosen bei den beiden verschiedenen Verfahren der N-Bestimmung. Die in der Arbeit angegebenen Protein-Gehalte bei den Arbeiten zur Bestimmung der Bandbreite der Aminosäuregehalte (vgl. Abschnitt 2.1a) basieren auf den N-Gehalten nach Kjeldahl. Im Folgenden wurde nur noch die elementaranalytische N-Bestimmung durchgeführt.



**Abb. 3: Korrelation des gemessenen Rohproteingehaltes nach dem Kjeldahl bzw. Dumas Verfahren in Samen von fünf verschiedenen Leguminosen Arten (n=150).**

### 2.3 Bakterieller Schnelltest

Es wurde ein Methionin auxotropher *E. coli* (DSM 9525) Stamm aus dem Bestand der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen und in Kultur gebracht. Zur Integration der Plasmide pRL1406 und pRL1419 (Abb. 4) wurde eine Transformation mittels Elektroporation durchgeführt.

Die durch diese Plasmide vermittelten Transposons (TnRL1406 bzw. TnRL1419) führten zu einer konstitutiven Lumineszenz der Bakterien. Des Weiteren vermittelte das Plasmid Kanamycinresistenz. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation und Selektion transformierter Bakterien wurde Bakteriensuspension auf Kanamycin-haltigem Agar ausplattiert.

Sowohl vom Wildtyp als auch von den transformierten Genotypen wurden Wachstumskurven in M9-Minimalmedium und LB (lysogeny broth)-Medium (pH=6,8-6,9) erstellt. Dazu wurden



schen Phänotyp mit Blättern dunklerer Farbe und von sukkulentem Habitus zu erzeugen. Außerdem wurden im Projektverlauf auch Pflanzen mit Cystein anstelle von Methionin ernährt um die Spezifität des Methionineffektes zu prüfen.

Zusätzlich wurden, neben der von Imsande ausschließlich visuell durchgeführten Bonitur der Grünfärbung der Pflanzen, Veränderungen der Grünfärbung der Blätter mit verschiedenen Analyseverfahren erfasst und exakt quantifiziert (vgl. Kap. 2.4.2)

Als weiteres Kriterium nach Imsande (2001) wurde die Wurzellänge von Keimpflanzen in Ethionin, einem chemischen Analog zu Methionin bestimmt (Et-Test) (vgl. 2.5).

### 2.4.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzenanzucht (Abb. 5) erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und 12 h Belichtungsdauer mit einer Lichtintensität von 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Es wurden je 3 Samen in einen 11er Topf mit Vermiculit gesetzt. Die Bewässerung erfolgte mit Leitungswasser, später mit Hoagland Nährlösung. Die Ionenzusammensetzung des Gießwassers ist in Tabelle 3 für ausgewählte Ionen aufgeführt.

**Tab. 3: Inhaltsstoffe des Leitungswassers und des Hoagland Nährmediums.**

Leitungswasser		Hoagland Nährmedium	
Verbindung	mg/L	Verbindung	mM/L
Ca	75	MgSO <sub>4</sub>	0,5
Mg	5	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,15
Na	25	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25
K	2,6	KNO <sub>3</sub>	1,25
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0,04	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,16E <sup>-02</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,8	MnCl <sub>2</sub>	2,30E <sup>-03</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,1	ZnSO <sub>4</sub>	1,92E <sup>-04</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	94	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	9,30E <sup>-05</sup>
		CuSO <sub>4</sub>	9,00E <sup>-05</sup>
		FeCl <sub>3</sub>	1,80E <sup>-02</sup>
		EDTA	0,05

Um methionin- bzw. cysteinreiche Pflanzen zu erzeugen, wurden dem Wasser definierte Mengen an Methionin und alternativ Cystein hinzugefügt. Als Versuchsansätze wurden 1 mM Cystein bzw. Methionin, 0,1 mM Cystein bzw. Methionin und als Kontrolle reine Hoaglandlösung gewählt.



**Abb. 5: Anzucht der Versuchspflanzen in Klimakammern bei konstanten Bedingungen. (Temperatur: 23°C, Belichtungsdauer: 12h, Lichtintensität:120-130 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>)**

#### **2.4.2 Methoden zur Ermittlung der Grünfärbung der Blätter**

Die Arbeiten von Imsande (2001) an *G. max* beruhen nur auf visuellen Einschätzungen der Blattfarbe per Auge. Zur Erweiterung des Interpretationsrahmens wurden im Projekt mit den nachfolgend beschriebenen Methoden zusätzlich Messwerte zum Blattgrün ermittelt.

##### **a) Chlorophyllmessungen**

Der Aufschluss des Blattmaterials und die Extraktion der Chlorophylle erfolgte nach geringfügig abgewandeltem Protokoll von Lichtenthaler und Buschmann (2001). Es wurden jeweils die jüngsten vollständig entwickelten Blätter abgeerntet, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -70°C gelagert.

Das Blattmaterial (zwischen 100 und 300 mg) wurde in 100 % Aceton aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und 1:10 in Aceton (100 %) verdünnt. Die Messung der Extinktion erfolgte am Photometer bei 661,6 und 644,8 nm. Die Gesamtchlorophyllkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

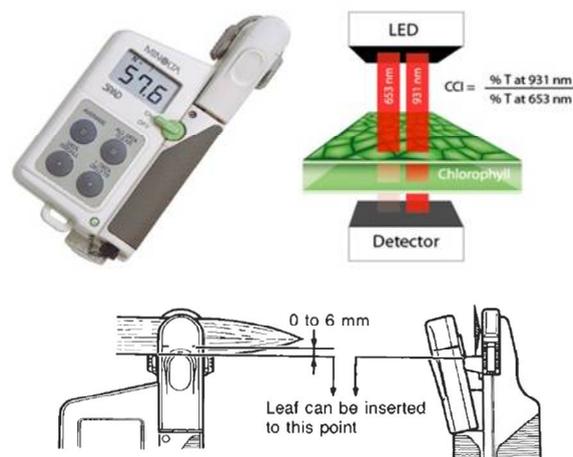
$$c_a + c_b (\mu\text{g} / \text{ml}) = 7,05_{A661,6} + 18,09_{A644,8}$$

Die Extinktion bei 661,6 nm lag im Bereich von 0,3 bis 0,85, um eine ausreichende Messgenauigkeit zu gewährleisten (Lichtenthaler und Buschmann 2001).

### b) SPAD Messungen

Mit einem tragbaren Chlorophyllmessgerät wurden Messungen des Gesamtchlorophyllgehaltes im Blattgewebe durchgeführt. Es wurden sowohl Pflanzen der Vorversuche (Klimakammeranzucht) als auch in Isolierhäusern angezogene EMS-Mutanten von *V. faba* (VF172) einer SPAD-Messung unterzogen.

Dabei kam das SPAD-Meter-502 der Firma Minolta zum Einsatz (SPAD=Single-Photon Avalanche Diode). Die Messdaten wurden als relative SPAD-Werte ausgegeben. Der dabei ermittelte SPAD-Wert basiert auf der Signallöschung eines 653 nm Strahls. Es wurde pro Blatt ein Mittelwert (aus 8 Einzelmessungen) aufgenommen. Durch den am Gerät befindlichen Abstandshalter konnte die gleichmäßige Messung in vergleichbaren Blattregionen gewährleistet werden (Abb. 6)



**Abb. 6: Funktionsweise des SPAD-502 und Anwendung bei der Messung.**

### c) Visuelle Methoden

Zur visuellen Auswertung der Blattgrünfärbung wurden Einzelblätter abgeerntet und eingescannt. Die Bilder wurden mit einer Bildbearbeitungssoftware (Gimp, Version 2.6.6) nachbearbeitet, um die Bildqualität zu verbessern und Unterschiede zwischen den Behandlungen besser sichtbar zu machen (bspw. den Bildhintergrund reduzieren).

### d) Fluorometrische Messungen

Mit fluorometrischen Messungen ist es möglich, in vivo die Photosyntheseaktivität von Pflanzen zu messen. Verschiedene Fluoreszenzparameter können dabei Aufschluss über die Elek-

tronentransportrate (ETR) am Photosystem II der Elektronentransportkette oder auch über die CO<sub>2</sub>-Assimilation geben. Mit dieser Messtechnik sollten mögliche positive Einflüsse hoher Methioningehalte auf die photochemischen Reaktionswege der Pflanzen überprüft werden.

Für die Messungen wurde das Junior PAM (Pulsamplitudenmodulation) Gerät der Firma Heinz Waltz eingesetzt. Die Versuchspflanzen wurden vor der Fluoreszenzmessung für 20 Minuten dunkel-adaptiert. Somit konnten Fluoreszenzparameter für licht- und dunkel adaptierte Pflanzen ermittelt werden. Zur Messung wurde eine 4 minütige Induktionskurve aufgenommen.

Mit dem ersten Sättigungsimpuls wurden die minimale (F<sub>0</sub>) und maximale (F<sub>m</sub>) Fluoreszenz der Chlorophyll *a* Moleküle ermittelt.

Für die Auswertungen wurden selektierte Messparameter herangezogen (Tab. 4).

**Tab. 4: Angewandte Fluoreszenzparameter mit ihrer jeweiligen Funktion**

Parameter	Formel	Funktion
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	(F <sub>m</sub> -F <sub>0</sub> )/F <sub>m</sub>	Indikator für Pflanzenstress (<0,8)
ETR	Y (PSII) x PFDa x (0,5)	Elektronentransportrate am PSII
NPQ	(F°m-F´m)/F´m	Lineare Korrelation zur Wärmeabgabe (0-8 )

## 2.5 Ethionin-Test (Et-Test)

Die Samen wurden zunächst mit Natriumhypochlorid (6 %) oberflächensterilisiert. Anschließend erfolgten 5 Waschschrte mit ddH<sub>2</sub>O. Zur Simulation erhöhter Methioningehalte im Saatgut wurden zur Methodenentwicklung die Samen über Nacht in einer 1 mM Methioninlösung vorgequollen. Die Kontrolle wurde mit ddH<sub>2</sub>O vorgequollen. Es folgte eine gründliche Reinigung der Samen mit ddH<sub>2</sub>O.

Filterpapierbögen (Whatmann) wurden auf 15,3 cm x 28 cm zugeschnitten, mit ddH<sub>2</sub>O von eventuellen Rückständen gereinigt und autoklaviert (121°C, 20 Min.).

Die Samen wurden zwischen zwei Filterpapierbögen eingerollt und mit einem Gummiband fixiert. 7 dieser Rollen wurden senkrecht in ein Becherglas mit 10 cm Durchmesser gestellt (Abb. 7). Jeweils die Hälfte der vorbehandelten Samen wurden mit 0,75 mM DL-Ethionin bzw. Wasser als Nährmedium versorgt. Daraufhin wurde eine luftundurchlässige Plastiktüte über die Bechergläser gestülpt, um die Evaporation zu minimieren. Das Versuchssaatgut wuchs anschließend in einer Klimakammer für 7 Tage bei konstanten Bedingungen (23°C, 12 h/12 h, 130 µmol/m<sup>2</sup>s).



**Abb. 7: Anzucht von Keimlingspflanzen in Ethionin-Lösung unter sterilen Bedingungen. Keimlingspflanzen wurden für 7 Tage in den Gefäßen angezogen. Verfahren nach Imsande (2001)**

## **2.6 Felduntersuchungen**

In Feldversuchen wurde die Identifikation und Selektion methioninreicher Einzelpflanzen aus mutagenisiertem Saatmaterial angestrebt. Die Mutagenese, Vitalitätsprüfung der M0-Generation und die anschließende Weitervermehrung zu M1-Samen bzw. zu Samen weiterer Folgegenerationen erfolgten auf Standorten der beteiligten Saatzuchtunternehmen und der Universität Göttingen.

### **2.6.1 Pflanzenmaterial aus der Mutagenese**

Bei *L. angustifolius* wurde die Mutagenese mit einer 0,2 % EMS-Lösung durchgeführt (2 h Inkubationsdauer). Das Saatgut der daraus erzeugten M2-Generation wurde für die Selektionsversuche eingesetzt.

Bei *V. faba* wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Pflanzen der Linie VF172 gelegt. Weiter differenziert wurde nach Varianten mit einmaliger (M4) sowie zweimaliger (M4\*) Mutagenese des Samenmaterials. Je Linie und Generation wurden Pflanzen aller drei Mutagenese-Behandlungen gemessen (Beh1, Beh2 und Beh3).

Behandlung 1 = 4 h 0,2 % EMS

Behandlung 2 = 4 h 0,4 % EMS

Behandlung 3 = 4 h 0,2 % EMS + 2 h 0,2 % NaNO<sub>3</sub>

Die NPZ ließ zu Projektbeginn in 2008 Saatgut von *P. sativum* (Sorte Hardy) als Auftragsarbeit auf eigene Kosten bei der Universität Kiel mit EMS behandeln und hat diese in Eigenregie weitervermehrt.

Bei der Universität Göttingen und bei der Saatzucht Steinach lagen bereits vor Projektbeginn Nachkommen von den beschriebenen mit EMS mutagen behandelten Samen vor. Diese wurden im Projekt verwendet. Die EMS Behandlungen an der Universität Göttingen wurde im eigenen Labor der Universität durchgeführt. Die EMS Behandlung von *L. angustifolius* für die Saatzucht Steinach wurde 2004 an der damaligen Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Groß Lüsewitz (heute Julius-Kühn-Institut) durchgeführt.

Im Projekt wurde Saatgut der jeweiligen M2 Generationen von der NPZ und der Saatzucht Steinach im Feld parzelliert bzw. in Einzelreihen angebaut.

In Göttingen wurden EMS-Mutanten (Generationen M2-M4) sowohl in Isolierhäusern als auch auf dem Feld angebaut. Eine Selektion und Beerntung von Einzelpflanzen erfolgte anhand phänotypischer Merkmale nach den weiter oben beschriebenen Selektionsverfahren.

Weiterhin wurden Samenkörner als Nachkommen von Pflanzen aus EMS behandelter Saat für den Et-Test eingesetzt (*L. angustifolius* und *P. sativum*: M2-Generation, *V. faba*: M2 und M4-Generationen). Von jeweils 2000 Samen wurden 10 % der Pflanzen in den Gewächshäusern der beteiligten Projektpartner bis zur Samenreife gebracht und beerntet (s.u.).

### **2.6.2 Feldanbau und Selektion nach Grünfärbung**

Mutagenisiertes Saatgut der drei Versuchspflanzenarten wurde im Feld ausgebracht und bis zur Samenreife gezogen. Es wurden hierzu Versuchspflanzenfelder der Saatgutunternehmen in Hohenlieth (Schleswig-Holstein) und Bocksee/Ankershagen (Mecklenburg-Vorpommern) als auch der Universität Göttingen (Reinshof, Niedersachsen) genutzt (Abb. 8).

Eine optische Selektion anhand der Blattgrünfärbung erwies sich in dem relativ homogenen Pflanzenmaterial unter Feldbedingungen als unmöglich und wurde daher nicht weiter verfolgt.



**Abb. 8: Feldanbau der mutagenisierten Versuchspflanzen auf Feldflächen der Saatzuchtunternehmen und der Universität Göttingen, 2009** Oben: *L. angustifolius* (Bocksee); Unten: *V.faba* (Reinshof; Göttingen); Rechts: *P. sativum* (Hohenlieth)

Vielmehr wurden die verfügbaren Analysekapazitäten dafür genutzt, an Pflanzen aus verfügbaren vorangegangenen Selektionsprozessen der Züchter, genauere Analysen der Färbung sowie der Chlorophyllgehalte der Blätter und der S-Gehalte der Leguminosensamen durchzuführen.

Bei *L. angustifolius* standen dazu Mx-Pflanzen verschiedener Herkunft zur Verfügung. Die Mx-1 Generation dieser heterogeneren Pflanzen war von Seiten der Saatzucht Steinach visuell auf Unterschiede in der Blattfärbung vorselektiert worden und die Samen der Einzelpflanzen in 2009 in einzelnen Reihen ausgesät worden. Hier wurden an Einzelpflanzen SPAD-Messungen durchgeführt und nach der Ernte die S-Gehalte der Samen der Pflanzen bestimmt.

Von *V. faba* wurde EMS-mutagenisiertes Samenmaterial der M1-Generation und späterer Generationen beerntet und in Isolierhäusern wurden von Mutterpflanzen jeweils 10 Tochterpflanzen in Reihen gepflanzt (Abb. 9). Hierbei wurde Samenmaterial der Inzuchtlinien VF172

und Mars/2 benutzt. Diese Pflanzen wurden im Folgenden einem Screening nach Chlorophyllgehalt unterzogen. Die Messungen erfolgten mit dem SPAD-502 Gerät.



**Abb. 9: Anzucht von *V. faba* im Isolierhaus am Reinshof (Universität Göttingen). 10 Tochterpflanzen von jeweils einer Mutterpflanze wurden in Einzelreihe ausgebracht. Es handelte sich hierbei um Mx2-Pflanzen der EMS-mutagenisierten Inzuchtlinien VF172 und Mars/2.**

### **2.6.3 Vermehrung und Anbau selektierter Pflanzen aus dem Et-Test**

Der Ethionintest wurde in 2009 mit jeweils 2000 Samen - Nachkommen chemisch mutagen behandelter Sorten - durchgeführt und die Keimlinge mit den 100 längsten bzw. 100 Keimlinge mit mittlerer Wurzellänge ausgepflanzt.

Die Pflanzen wurden im Frühjahr/Sommer 2009 in Gewächshäusern der beteiligten Pflanzenzüchter bis zur Reife gebracht (Abb. 10)

An diesen Pflanzen wurde vor der Blüte auch die Grünfärbung der Blätter als weiteres Selektionsmerkmal ermittelt. Zusätzlich zu den im Projekt ursprünglich geplanten Analysen wurden auch direkte nasschemische Bestimmungen der Chlorophyllgehalte (nach Lichtenthaler) und SPAD-Messungen an den Blättern vorgenommen.



**Abb. 10: Gewächshaus- bzw, Isolierhausanzucht der Et-Test Pflanzen. Kurz vor Beginn der Samenreife wurde das jeweils jüngste, voll entwickelte Blatt entfernt und einer Chlorophyllgehaltsbestimmung unterzogen. Oben: *L. angustifolius* (Bocksee); unten: *V. faba* (Göttingen); rechts: *P. sativum* (Hohenlieth)**

Für jeweils 25 Pflanzen von *P. sativum* und *L. angustifolius* der Kontrolle (durchschnittliche Wurzellänge) und der Methioninkandidaten (überdurchschnittliche Wurzellänge) aus dem Et-Test wurden die Aminosäuregehalte der beernteten Samen bestimmt. Die S-Gehalte der Samen wurden jeweils in allen 200 Proben bestimmt.

Bei *V. faba* wurden zwei Et-Tests durchgeführt und ausgewertet. Im ersten Et-Test wurden Pflanzen an der Universität Hannover bis zur Samenreife gebracht und eine Selektion nach SPAD-Werten der Blätter durchgeführt. An 12 dieser Pflanzen wurden die Aminosäuregehalte in den Samen ermittelt. Aus dem Et-Test am Standort Reinshof an *V. faba* wurden aufgrund des verfügbaren Budgets nur 38 Pflanzen ausgewählt und die Saat auf ihre Aminosäurezusammensetzung analysiert.

## **2.7 Molekularbiologische Untersuchungen**

Es sollte auf molekularbiologischer Ebene der Zusammenhang zwischen Methioninreichtum und dem veränderten Pflanzenphänotyp untersucht werden. Dazu wurden sowohl auf Proteom- als auch auf Transkriptomebene Methionin bedingte Veränderungen in den Expressionsmustern vermutet.

### **2.7.1 Immunologischer Proteinnachweis**

Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden Polyacrylamid-Minigele (8,5x11cm) verwendet. Diese setzten sich aus einem 14 %-igen Trenngel und einem 6 %-igen Sammelgel zusammen. Pro Spur wurden 5 µg Proteinextrakt aufgetragen. Bis zum Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Stromstärke von 10 mA angelegt, danach wurde die Stromstärke für 40-60 Minuten auf 20 mA erhöht.

Anschließend wurden die Gele entweder gefärbt (Coomassie- / Silberfärbung) oder zum immunologischen Proteinnachweis benutzt.

Im Tank-Blot-Verfahren (Towbin et al. 1979) wurden dazu die Proteinbanden von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Elektroblo-Kammer über 1,5 Stunden bei 10 °C und 400 mA Stromstärke. Es wurden Antikörper gewählt, die an verschiedene Proteine der Photosystems II binden (u. a. an das early light inducible protein (D1)) um Methionin-bedingte Veränderungen in der Expression dieser Proteine zu untersuchen.

Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend über Nacht in einem Blockierungspuffer mit dem primären Antikörper (bspw. für D1: Ziegen-anti-D1) inkubiert. Mit einem sekundären Antikörper (für D1: Kaninchen-Anti-Ziege IgG alkalische Phosphatase gekoppelt) wurde die Membran nachfolgend 2 Stunden lang inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde daraufhin eine Färbungsreaktion an den spezifischen Bindungsstellen der Antikörper auf der Nitrocellulosemembran ausgelöst. Dazu wurde die Membran in einer NBT/BCIP-Lösung geschwenkt. Die alkalische Phosphatase bewirkte hierbei eine enzymatische Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Terazoliumchlorid (NBT) in einen violetten Farbstoff. Die Färbungsreaktion wurde durch wiederholtes Spülen mit Wasser abgebrochen, sobald die Banden auf der Membran sichtbar wurden.

### **2.7.2 Proteomik**

Die lösliche Proteinfraktion wurde mit 50 mM Tris-Puffer (pH 7.5) extrahiert. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Lowry (1951) bestimmt, nachdem eine Fällung mit

Trichloressigsäure (TCA) (10 %) durchgeführt wurde. Die Trennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte mit Immobilized pH gradient (IPG)-Strips von Biorad (ReadyStrip, 11 cm; pH 4-7) in der Biorad Protean Cell. Die Trennung in der zweiten Dimension wurde mit der Protean II xi Cell und 12 % Tris-/Tricine Gelen durchgeführt.

Um den Rubisco-Gehalt (Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase oxygenase) und Rubisco-Intermediate zu eliminieren, erfolgte eine Phytat-Fällung der Proben nach Krishnan and Natarajan (2009). Proteingele wurden mit Coomassie G250 gefärbt und eingescannt.

Unterschiede im Proteinmuster aus den Proteinextrakten Methionin behandelter Pflanzen zu Proteinextrakten der Kontrollpflanzen wurden dabei protokolliert. Unterschiedlich exprimierte Proteine wurden im Folgenden ausgewählt und sequenziert.

Die Massenspektroskopische Analysen (MS) zur Identifizierung der ausgewählten Proteine erfolgten am Institut für Pflanzengenetik der Universität Hannover.

### **2.7.3 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)**

Die Gesamt RNA aus Blattmaterial wurde mit einem Kit von Takara/Clontech isoliert und anschließend in cDNA umgewandelt. Für die Experimente erforderliche Primer wurden mit dem Program „PRIMER“ (Version 2.2; *Scientific & Education Software* (Durham, USA) entworfen. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Eppendorf. Die DNA-Produkte wurden in 1 % Agarose Gelen mit TAE-Puffer und Ethidiumbromid aufgetrennt. Gelbilder wurden mit dem Geldoc-System erstellt.

Die Gelbildanalyse erfolgte mit der ImageJ-Software (Version 1.43u).

### **2.8 Statistische Datenauswertung**

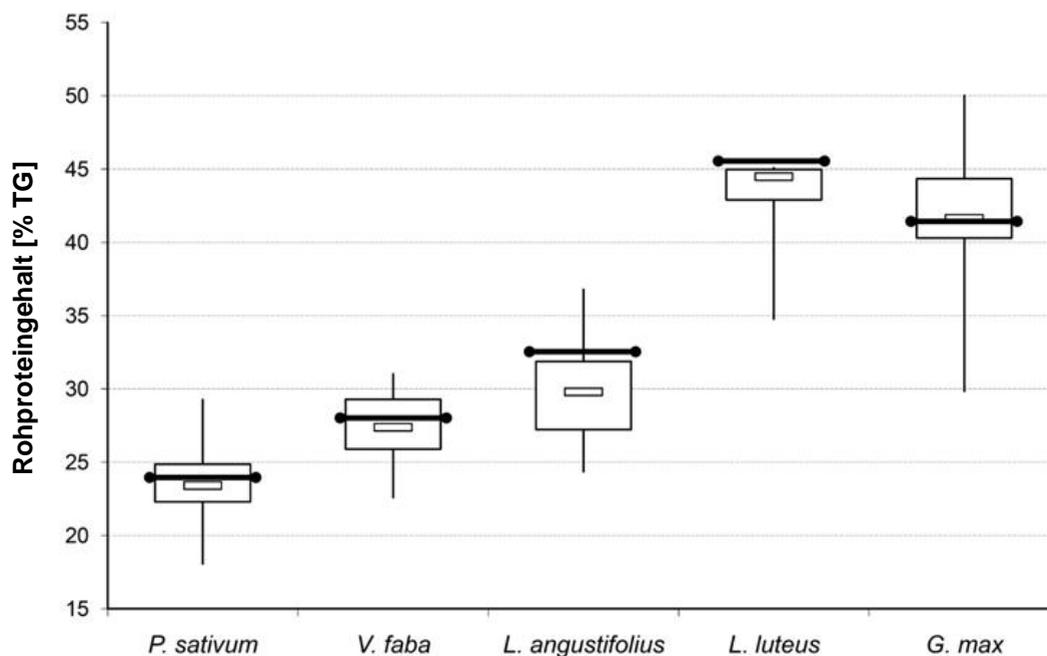
Zur statistischen Datenanalyse wurde die Software SPSS 14.0 (student version) benutzt. Zunächst wurde geprüft, ob bei dem jeweiligen Datensatz eine Normalverteilung vorlag. Waren die Daten normalverteilt, wurde zum Vergleich von mehr als 2 Stichproben eine Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiede durchgeführt. Für den Mittelwertvergleich kam der Tukey-Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau lag bei  $\alpha=0,05$ . Waren die Daten nicht normalverteilt wurde ein nicht-parametrischer Test benutzt. Beim Vergleich zweier Stichproben wurde mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede hin getestet. Lag der Datenumfang über zwei Stichproben wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Das Signifikanzniveau bei den nicht parametrischen Tests lag ebenfalls bei  $\alpha=0,05$ . Für die Untersuchung von Korrelationen von Messparametern wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt ( $\alpha=0,05$ ).

### 3 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt des Projektes wurde eine Übersicht der Aminosäuregehalte in den Samen der drei Leguminosenarten erstellt. Dazu erfolgte eine Charakterisierung von jeweils 50 Sorten/Linien, des von den Saatzuchtunternehmen zur Verfügung gestellten Sortiments, anhand einer HPLC-Analyse.

#### 3.1. Aminosäuregehalte des Sortiments zur Ermittlung der Variationsbreite bei heimischen Leguminosen

Der Schwankungsbereich der Gesamtproteingehalte in den Samen des analysierten Leguminosensortiments ist in Abbildung 11 dargestellt. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse wurden aus der Literatur bekannte Mittelwerte in die Abbildung eingefügt. Vergleichswerte zu *G. max* wurden aus der Literatur (Zarkadas et al. 2007) entnommen und im Diagramm mit aufgeführt.



**Abb. 11: Proteingehalte im Samen der untersuchten Körnerleguminosen in Prozent des Trockengewichts. Schwarze Querbalken symbolisieren aus der Literatur bekannte Mittelwerte (n=4-50) (Schumacher et al. 2011a, im Druck)**

In Tabelle 5 ist die Bandbreite der relativen Aminosäuregehalte (g/16gN) des Leguminosensortiments dargestellt.

**Tab. 5: Mittelwert (MW) ± Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwerte der Aminosäurekonzentrationen [g/16g N] in Samen verschiedener Körnerleguminosen. In Klammern positive Abweichung vom Mittelwert der Stichprobe [%]. *G. max* Werte nach Zarkadas et al. (2007).**

Aminosäure	<i>P. sativum</i> n=50	<i>V. faba</i> n=46	<i>V. faba</i> (Winter) n=4	<i>L. angustifolius</i> n=46	<i>L. luteus</i> n=4	<i>G. max</i> n=14
Ala (MW) (Min-Max)	4,4 ± 0,2 4,1-4,9 (11%)	3,9 ± 0,1 3,6-4,1 (5%)	3,8 ± 0,1 3,7-3,9 (3%)	3,4 ± 0,2 2,9-3,8 (12%)	3,2 ± 0 3,1-3,2 (1%)	3,6 ± 0,2 3,2 – 3,8 (9%)
Asp (MW) (Min-Max)	11,1 ± 0,4 10-11,8 (6%)	10,1 ± 0,3 9,6-10,8 (7%)	10 ± 0,2 9,7-10,2 (2%)	9,5 ± 0,3 8,8-10,1 (6%)	9,2 ± 0,1 9,1-9,2 (1%)	10,3 ± 0,5 9,6-11 (8%)
Cys (MW) (Min-Max)	1,4 ± 0,1 1-1,6 (19%)	1,1 ± 0,1 0,9-1,2 (14%)	1,1 ± 0,1 1-1,2 (12%)	1,5 ± 0,2 1,1-1,8 (25%)	1,8 ± 0,1 1,7-1,9 (5%)	1,8 ± 0,1 1,5-2,1 (12%)
Glu (MW) (Min-Max)	16,6 ± 0,5 15,2-17,9 (8%)	16 ± 0,4 15-16,9 (5%)	15,7 ± 0,4 15,2-16 (1%)	21,1 ± 0,6 19,6-22,4 (7%)	21,6 ± 0,1 21,5-21,8 (1%)	16,2 ± 1,5 15,7-16,9 (15%)
Gly (MW) (Min-Max)	4,4 ± 0,2 4-4,7 (8%)	4,2 ± 0,1 3,8-4,4 (5%)	4,1 ± 0 4-4,1 (1%)	4,2 ± 0,2 3,7-4,6 (9%)	3,9 ± 0,1 3,8-3,9 (1%)	3,4 ± 0,2 3,1-3,5 (7%)
Pro (MW) (Min-Max)	3,5 ± 0,1 3,3-4,2 (20%)	3,5 ± 0,1 3,2-3,7 (5%)	3,5 ± 0,1 3,4-3,6 (2%)	3,7 ± 0,2 3,4-4,2 (14%)	3,5 ± 0,1 3,5-3,7 (5%)	4,6 ± 0,8 4,1-4,6 (58%)
Ser (MW) (Min-Max)	4,3 ± 0,2 3,9-4,6 (7%)	4,3 ± 0,1 4-4,4 (4%)	4,2 ± 0,1 4,1-4,3 (3%)	4,5 ± 0,1 4,3-4,8 (6%)	4,4 ± 0 4,3-4,4 (1%)	5,1 ± 0,2 5-5,8 (14%)
Tyr (MW) (Min-Max)	3,6 ± 0,2 3,2-4 (10%)	3,5 ± 0,2 3,3-4,2 (20%)	3,4 ± 0 3,4-3,4 (1%)	3,8 ± 0,2 3,5-4,1 (9%)	3,4 ± 0,1 3,3-3,5 (2%)	3,6 ± 0,1 3,5-3,8 (5%)
Arg (MW) (Min-Max)	8,5 ± 0,9 7-11,7 (36%)	8,8 ± 0,6 7,7-10,1 (15%)	8,8 ± 0,4 8,4-9,2 (5%)	10,1 ± 0,5 9,2-11,3 (12%)	10,4 ± 0,2 10,2-10,7 (3%)	6,9 ± 0,2 6,5-7,1 (3%)
His (MW) (Min-Max)	2,4 ± 0,1 2,2-2,5 (5%)	2,4 ± 0,1 2,3-2,6 (5%)	2,4 ± 0 2,4-2,5 (1%)	2,7 ± 0,1 2,4-2,9 (7%)	2,7 ± 0 2,6-2,7 (1%)	2,5 ± 0,1 2,3-2,6 (4%)
Ile (MW) (Min-Max)	4,4 ± 0,2 3,9-4,7 (8%)	4,2 ± 0,1 3,9-4,3 (4%)	4,1 ± 0,1 4-4,2 (2%)	4,3 ± 0,1 4-4,6 (7%)	4 ± 0,1 3,9-4,1 (2%)	4,3 ± 0,2 4-4,6 (5%)
Leu (MW) (Min-Max)	7,2 ± 0,2 6,6-7,7 (8%)	7,1 ± 0,2 6,7-7,5 (5%)	7,1 ± 0,2 6,9-7,3 (2%)	7 ± 0,2 6,3-7,4 (7%)	7,2 ± 0,1 7,2-7,3 (1%)	6,9 ± 0,2 6,6-7,1 (3%)
Lys (MW) (Min-Max)	7,3 ± 0,3 6,3-7,9 (9%)	6,3 ± 0,3 5,7-6,9 (9%)	6,1 ± 0,1 6-6,3 (3%)	4,8 ± 0,2 4,2-5,4 (11%)	4,9 ± 0,1 4,8-4,9 (1%)	5,7 ± 0,2 5,5-6 (4%)
Met (MW) (Min-Max)	1 ± 0,1 0,8-1,1 (14%)	0,7 ± 0 0,6-0,8 (12%)	0,7 ± 0 0,7-0,8 (8%)	0,7 ± 0,1 0,5-0,8 (22%)	0,7 ± 0 0,6-0,7 (6%)	1,8 ± 0,1 1,5-2,1 (13%)
Phe (MW) (Min-Max)	4,9 ± 0,2 4,2-5,3 (8%)	4,2 ± 0,1 3,9-4,4 (6%)	4,1 ± 0,1 4,1-4,3 (4%)	4 ± 0,1 3,8-4,3 (8%)	3,9 ± 0 3,9-4 (1%)	4,8 ± 0,2 4,5 – 5,3 (11%)
Thr (MW) (Min-Max)	3,8 ± 0,2 3,4-4,2 (10%)	3,4 ± 0,1 3,1-3,6 (6%)	3,3 ± 0,1 3,2-3,4 (4%)	3,5 ± 0,2 3-3,9 (12%)	3,3 ± 0 3,2-3,3 (1%)	4,7 ± 0,4 4,5-5,9 (26%)
Val (MW) (Min-Max)	4,9 ± 0,2 4,5-5,3 (8%)	4,6 ± 0,1 4,4-4,8 (4%)	4,6 ± 0,1 4,4-4,6 (2%)	4,2 ± 0,2 3,7-4,6 (9%)	3,7 ± 0,1 3,7-3,8 (2%)	4,8 ± 0,2 4,5-5,2 (8%)

Die Analyseergebnisse zum Einfluss von Standort und Trockenstress auf die Aminosäurezusammensetzung bei *V. faba* Sorten sind in Tabelle 6 dargestellt. Es war dabei deutlich zu erkennen, dass bedingt durch den Trockenstress sowohl die N- und S-Gehalte als auch die absoluten Gehalte (g/kg Trockenmasse) sämtlicher Aminosäuren in der Saat zunehmen. Betrachtet man jedoch die relativen Aminosäuregehalte (g/16gN) wird deutlich, dass sich das Aminosäureprofil der Proteinfraction auf dem Standort mit Trockenstress negativ verändert hatte. Essentielle Aminosäuren wie Lysin, Isoleucin und Methionin waren dort sig-

nifikant geringer, während der Anteil der nicht essentiellen Aminosäuren Prolin und Arginin signifikant höher war als auf dem anderen Standort.

**Tabelle 6: Einfluss von Trockenstress und Standort auf die Aminosäurezusammensetzung von *V. faba*-Saat und prozentuale Abweichung (Abw.) der Gehalte bei Trockenstress im Vergleich zu den Gehalten der Saat auf dem Normalstandort (n = 18 Sorten pro Standort)**

	Kontrolle	Trockenstandort	Abw. [%]	Normalstandort	Trockenstandort	Abw. [%]
N (%)	3,88	4,38	12,9 ***			
S (%)	0,15	0,17	18,9 ***			
XP (g/kg)	254 ± 18	286 ± 14	12,6 ***			
<b>Aminosäuren (g/ kg Trockenmasse)</b>				<b>(g/16g N)</b>		
Cys	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,2	14,8 ***	1,08 ± 0,09	1,1 ± 0,07	1,3 n,s,
Asp	25,8 ± 1,9	28,7 ± 1,4	11,2 ***	10,16 ± 0,22	10,05 ± 0,25	-1 n,s,
Glu	40,7 ± 3,3	45,6 ± 2,1	12 ***	16,05 ± 0,37	15,98 ± 0,39	-0,5 n,s,
Ser	10,8 ± 0,8	12,1 ± 0,6	12 ***	4,27 ± 0,09	4,23 ± 0,12	-0,9 n,s,
His	6,2 ± 0,4	7 ± 0,3	12,9 ***	2,45 ± 0,06	2,44 ± 0,06	-0,2 n,s,
Gly	10,7 ± 0,6	12,1 ± 0,5	13,1 ***	4,21 ± 0,08	4,22 ± 0,09	0,3 n,s,
Arg	21,2 ± 2,5	26,1 ± 2,3	23,1 ***	8,33 ± 0,45	9,13 ± 0,43	9,5 ***
Thr	8,7 ± 0,6	9,6 ± 0,4	10,3 ***	3,45 ± 0,09	3,38 ± 0,07	-2,2 *
Ala	10 ± 0,6	11,1 ± 0,4	11 ***	3,96 ± 0,1	3,89 ± 0,09	-1,7 n,s,
Met	1,8 ± 0,1	2 ± 0,1	11,1 ***	0,72 ± 0,04	0,7 ± 0,03	-2,8 *
Pro	8,8 ± 0,8	10,1 ± 0,6	14,8 ***	3,46 ± 0,1	3,55 ± 0,08	2,7 *
Tyr	9 ± 0,8	10 ± 0,6	11,1 ***	3,57 ± 0,16	3,5 ± 0,21	-1,9 n,s,
Val	11,8 ± 0,8	13,1 ± 0,6	11 ***	4,66 ± 0,08	4,58 ± 0,11	-1,8 *
Lys	16,4 ± 0,9	17,7 ± 0,5	7,9 ***	6,48 ± 0,23	6,19 ± 0,28	-4,4 **
Ile	10,6 ± 0,8	11,8 ± 0,6	11,3 ***	4,2 ± 0,09	4,12 ± 0,13	-1,8 *
Leu	18,2 ± 1,5	20,3 ± 1	11,5 ***	7,16 ± 0,18	7,09 ± 0,22	-1 n,s,
Phe	10,7 ± 0,7	11,8 ± 0,5	10,3 ***	4,21 ± 0,11	4,12 ± 0,14	-2,1 *

XP: Rohprotein, n.a.= nicht analysiert; n.s.= nicht signifikant; \*= p<0.05; \*\*= p<0.01; \*\*\*= p<0.001, Tukey-Test bzw. Mann-Whitney-U Test.

### 3.2 S-Gehalte der Samen und Zusammenhang mit den Gehalten an S-haltigen Aminosäuren

Die durchgeführten S-Analysen an Leguminosen-Samen an denen zuvor auch die Aminosäuregehalte bestimmt wurden zeigten, dass die Korrelation der S-Gehalte mit den Gehalten beider S-haltigen Aminosäuren Methionin und Cystein deutlicher ausgeprägt war als die zu den Gehalten an Methionin allein. Für die einzelnen Kulturen sind die Zusammenhänge für die absoluten Gehalte an Aminosäuren in Tabelle 7 dargestellt.

**Tab. 7: Korrelationskoeffizienten des Zusammenhangs von Methionin- und Cysteingehalten (g/kg) mit den S-Gehalten (%) in Samen von *V. faba*, *L. angustifolius* und *P. sativum* verschiedener Herkünfte**

	n	Methionin	Cystein	Cystein + Methionin
<b>Unterschiedliche Standorte und Sorten<sup>1</sup></b>				
S-Gehalte ( <i>V. faba</i> )	46	0.71***	0.76***	0.77***
( <i>L. angustifolius</i> )	46	n.s.	0.71***	0.66***
( <i>P. sativum</i> )	49	0.53***	0.64***	0.68***
<b>Gleiche Standorte und Sorten<sup>2</sup></b>				
S-Gehalte ( <i>V. faba</i> )	<sup>3</sup> 38/50	n.s.	n.s.	n.s.
( <i>L. angustifolius</i> )	50	0.40**	0.65***	0.62***
( <i>P. sativum</i> )	50	0.69***	0.84***	0.80***

n.s.: p>0,05, \* p=0,05-0,01, \*\* p=0,01-0,001, \*\*\* p<0,001

<sup>1</sup>Pflanzen aus dem Sortiment zur Ermittlung der Bandbreite der Aminosäuregehalte

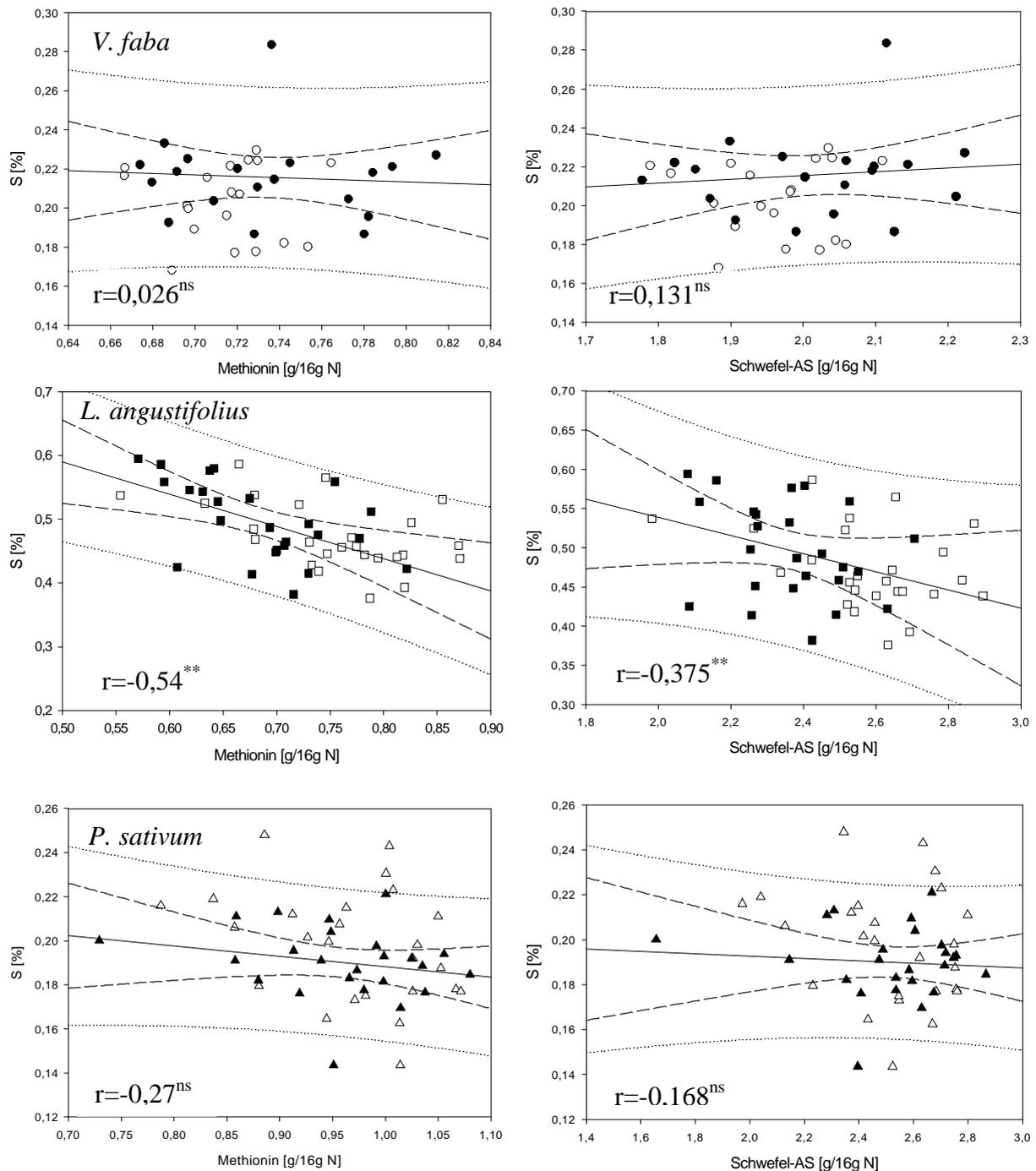
<sup>2</sup>Pflanzen aus Et-Test <sup>3</sup> n=50 unter Hinzunahme der Pflanzen aus erstem Et-Test (vgl. Kap. 2.6.3)

Im Sortiment zur Bestimmung der Bandbreite der Aminosäuregehalte (vgl. Kap. 2.1a) von Leguminosen unterschiedlicher Sorten und z. T. auch von unterschiedlichen Standorten korrelierten die S-Gehalte nahezu durchgängig positiv mit den absoluten Gehalten der S-haltigen Aminosäuren (Tab. 7: Unterschiedliche Standorte und Sorten).

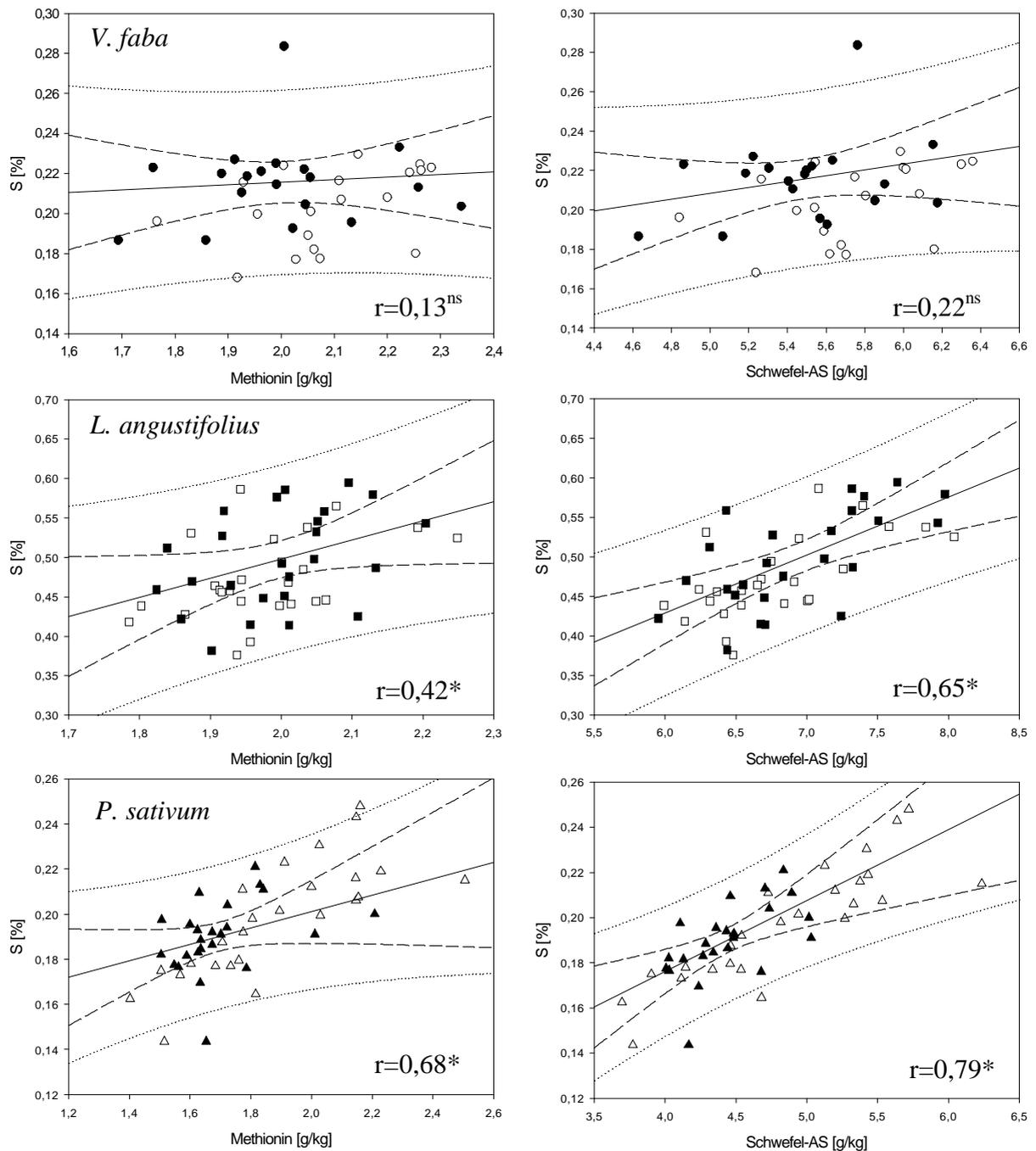
Bei den Proben aus dem Et-Test waren nur die Methionin- und Cystein-Gehalte der Samen von *L. angustifolius* und *P. sativum* signifikant mit dem S-Gehalt korreliert. Für *V. faba* wurde auch unter Einbeziehung der Werte des Vorversuchs keine signifikante Korrelation der Gehalte nachgewiesen (r=0,13 und 0,22) (Tab. 7: Gleiche Standorte und Sorten).

Die relativen Methioningehalte der Samen (g/16gN) wurden in Abbildung 12 mit dem S-Gehalt in Beziehung gesetzt. Hier wurde nur bei *L. angustifolius* ein signifikanter aber negativer Zusammenhang zwischen den Parametern gefunden.

Bei den S %-Gehalten der Samen und ihren absoluten Gehalten an Methionin bzw. Methionin und Cystein (g/kg) war für *P. sativum* ein positiver Zusammenhang sichtbar (Abb. 13). Hier hatten die als Methioninkandidaten im Et-Test selektierten Pflanzen mit den höchsten S-Gehalten auch die höchsten Gehalte an S-haltigen Aminosäuren. Bei *V. faba* und *L. angustifolius* war dieser Trend nicht erkennbar.



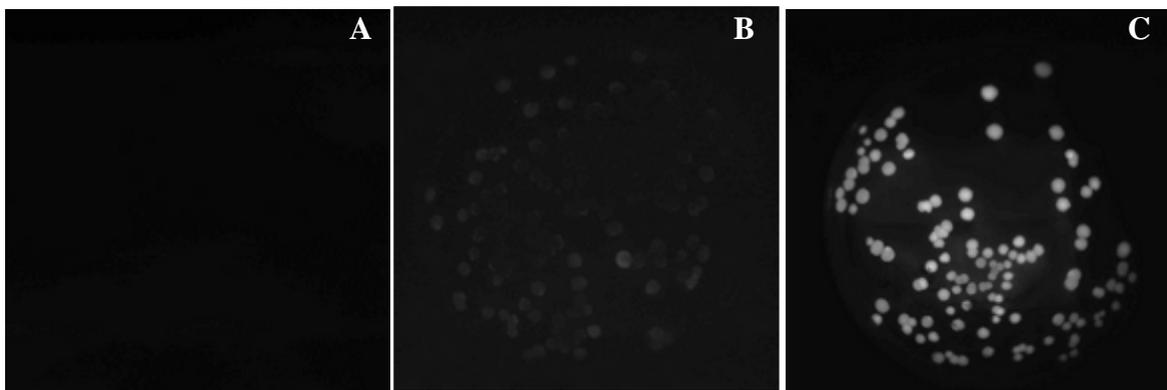
**Abb. 12: Zusammenhang des S-Gehaltes mit dem relativen Methionin- bzw. S-Aminosäuregehalt (Schwefel-AS) im Samen von Leguminosen. Schwarze Symbole=Kontrollpflanzen; weiße Symbole=Methioninkandidaten aus dem Et-Test.  $r$ =Pearson Korrelationskoeffizient. (*L. angustifolius*, *P. sativum*  $n=50$ , *V. faba*  $n=38$ )**



**Abb. 13: Zusammenhang des S-Gehaltes mit dem absoluten Methionin- bzw. S-Aminosäuregehalt im Samen von Leguminosen (Schwefel-AS). Schwarze Symbole=Kontrollpflanzen; weiße Symbole=Methioninkandidaten aus dem Et-Test. Pearson Korrelationskoeffizient als r-Wert im Diagramm. (*L. angustifolius*, *P. sativum* n=50, *V. faba* n=38)**

### 3.3 Eignung des bakteriellen Schnelltests für die Bestimmung der Methioningehalte in Legumionsensamen

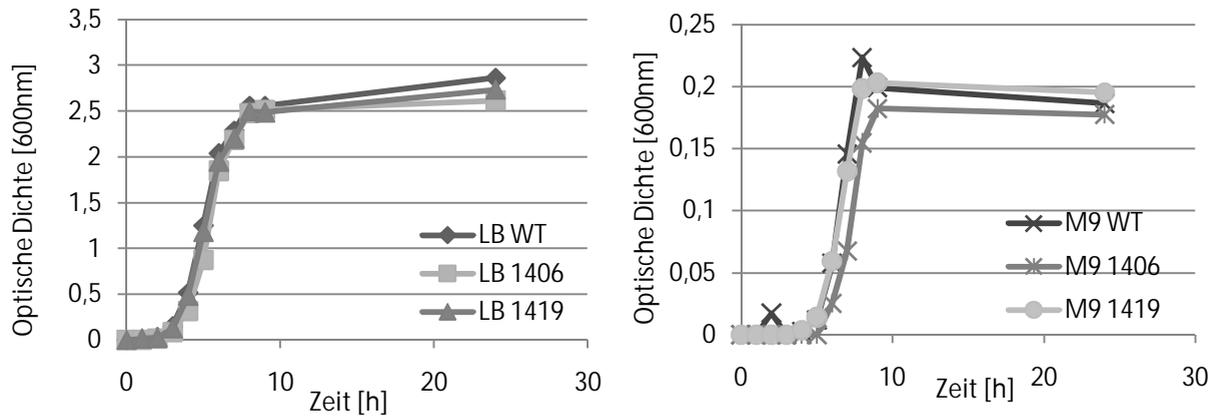
Nach erfolgter Elektroporation von *E. coli* (9525) wurde die erfolgreiche Integration des Transposons (lumineszenzvermittelnde Genkassette) ins Bakteriengenom überprüft. Dazu wurden Lumineszenzbilder mit einer CCD (Charge-coupled Device)-Kamera von auf Agarplatten gewachsenen Kolonien der transformierten Bakterien gemacht. Die Intensität der Lumineszenz unterschied sich deutlich zwischen den mit den Plasmiden pRL1406 und pRL1419 transformierten Stämmen (Abb. 14).



**Abb. 14: CCD-Kamera Aufnahmen von *E. coli* Kolonien auf Agarplatten nach 20h Inkubation bei 37°C. Die Aufnahmezeit betrug 10s. A: Kontrollbild ohne Bakterienkulturen, B: *E. coli* 9525::TnRL1406; C: *E. coli* 9525::TnRL1419**

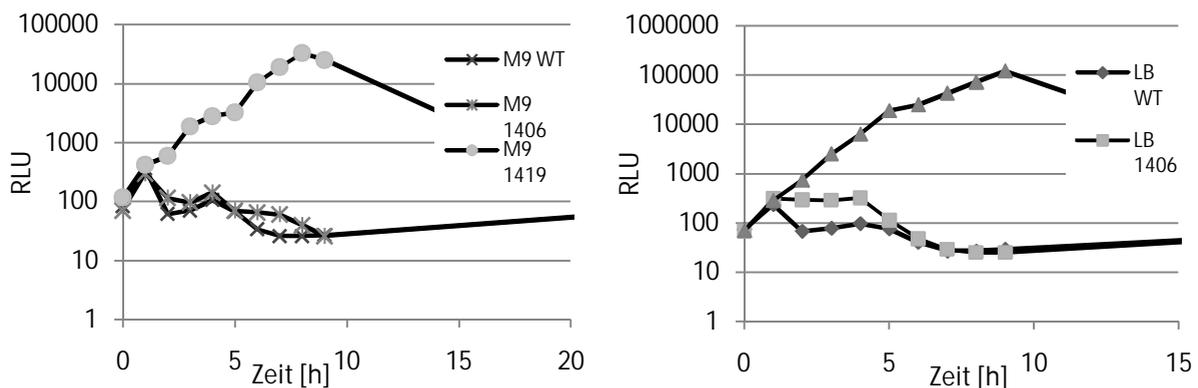
Um mögliche negative Auswirkungen der Transformation auf die Wachstumseigenschaften auszuschließen, wurden im folgenden Wachstumskurven für die transformierten *E. coli* Stämme gemessen. Die Wachstumskurven der transformierten *E. coli* Stämme wiesen einen im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Kurvenverlauf mit einander entsprechenden optischen Dichten auf (Abb. 15).

Dies traf sowohl auf die Kulturen in LB als auch in M9 Medium zu. Im LB Medium gingen die Bakterien nach ungefähr 4 Stunden von der lag- in die exponentielle Wachstumsphase über. Im M9 Medium begann die exponentielle Phase hingegen nach ungefähr 5 Stunden. Die Bakterien traten in beiden Medien nach ca. 10 Stunden in die stationäre Phase ein (Abb. 15).



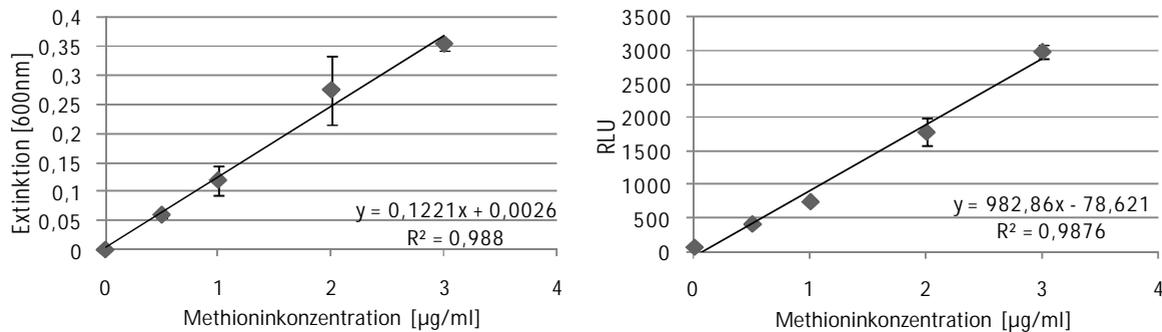
**Abbildung 15: Wachstumskurven des *E. coli* Wildtyps 9525 (WT) und der transgenen Stämme 9525:RL1406 und 9525::RL1419. Die optische Dichte wurde stündlich innerhalb eines Zeitraums von 10 Stunden ermittelt. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Links: Wachstumskurven in LB Medium Rechts: Wachstumskurven in M9-Medium mit 1 µg/ml Methionin**

Parallel zur Ermittlung der optischen Dichte (OD) wurden Lumineszenzmessungen durchgeführt (Abb. 16). Lumineszenz trat nur bei den transformierten *E. coli* Bakterien auf. Beim Transformanten *E. coli* 9525::Tn1406 war die gemessene Lumineszenz sehr gering (bis 300 RLU, Relative Luminescence Units) und trat lediglich innerhalb der ersten 4 Stunden auf. *E. coli* 9525::Tn1419 lumineszierte sehr viel stärker und es war in beiden Kulturmedien ein exponentieller Anstieg der Lumineszenz im Messzeitraum von 10 h (für LB-Medium  $R^2=0,96$ ) bzw. 9 h (für M9-Medium  $R^2=0,98$ ) zu verzeichnen.



**Abbildung 16: Wachstumskurven des *E. coli* Wildtyps 9525 (WT) und der transgenen Stämme 9525 (1406) und 9525 (1419). Die Lumineszenz wurde stündlich innerhalb eines Zeitraums von 10 Stunden ermittelt. Die Messzeit am Luminometer betrug 10s. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Links: Lumineszenzentwicklung in LB Medium. Rechts: Lumineszenzentwicklung in M9-Medium mit 1 µg/ml Methionin.**

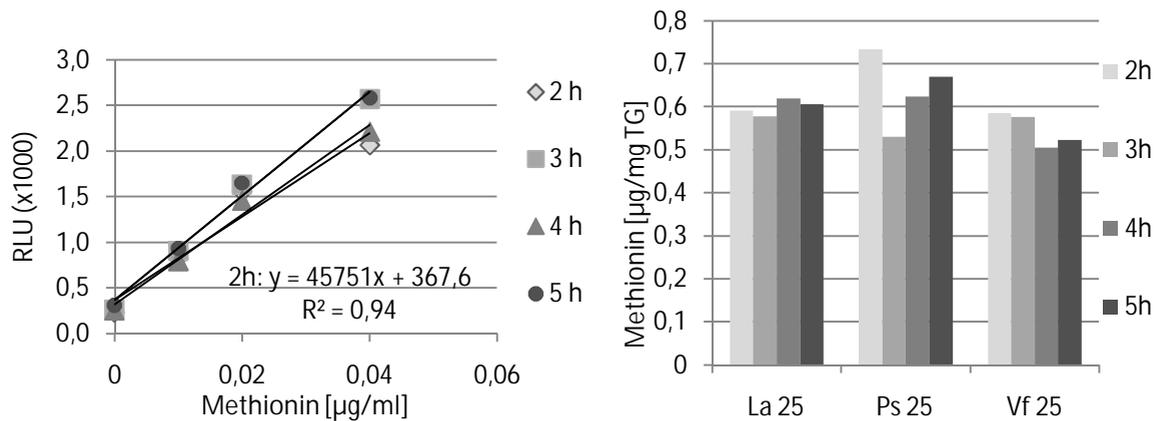
Nachfolgend wurde das Wachstum des Transformanten *E. coli* 9525::TnRL1419 in M9-Medien mit unterschiedlich hohen Methioninkonzentrationen (Zusatz unterschiedlich konzentrierter Methioninlösungen) ermittelt (Abb. 17). Es wurde erneut sowohl die OD als auch die Lumineszenz gemessen.



**Abb. 17: Bestimmung des Wachstums von *E. coli* 9525::TnRL1419 bei unterschiedlichen L-Methionin Konzentrationen. Die Messung erfolgte nach 23 Stunden Inkubation bei 37°C. Links: Messung der optischen Dichte Rechts: Erfassung der bakteriellen Lumineszenz bei einer Messzeit von 10 s (n=2)**

Nach 6 h Inkubationsdauer (Ergebnisse hier nicht gezeigt) waren die OD-Werte noch nicht messbar und die Lumineszenz war bei allen Methioninkonzentrationen gleichartig (475 +/- 65 RLU). Eine zweite Messung erfolgte nach 23 h. Hierbei konnte eine lineare Beziehung zwischen Methioninkonzentration im Medium zur Optischen Dichte als auch zur Lumineszenz festgestellt werden (Abb. 17).

Anschließend wurde die Lumineszenzmessung an Bakterienkulturen, denen als Methioninquelle Saatgutlysate zugegeben wurde, vorgenommen (Abb. 18). Parallel dazu wurden weitere Kalibrierkurven für Methioninkonzentrationen zwischen von 0 - 0,06 µg/ml aufgenommen (Abb. 18 links). Die Messung der optischen Dichte ergab nur ein sehr geringes Bakterienwachstum für alle Versuchsvarianten (Ergebnisse nicht präsentiert). Die bakterielle Lumineszenz nahm mit ansteigenden Methioninkonzentrationen linear zu (Abb. 18 links). In M9-Medium, dem das Saatgutlysate der drei Versuchspflanzenarten im Verhältnis 1:200 zugefügt wurde, erfolgten die Messungen in identischen Zeitabständen.



**Abb. 18: Bakterienlumineszenz von *E. coli* 9525::TnRL1419 als Indikator für Methioninkonzentration im Saatgutlysat. Die Messungen erfolgten nach 2, 3, 4 und 5 Stunden Inkubation bei 28°C in M9-Medium. Die Messzeit betrug 10 s. Links: Bestimmung des Wachstums in Gegenwart von definierten L-Methionin Konzentrationen im Bereich von 0,02 bis 0,06 µg/ml. Rechts: Anhand der Lumineszenz kalkulierte Methioningehalte in 25 µl Saatgutlysat (1:200) verschiedener Leguminosen (La: *L. angustifolius*, Ps: *P. sativum*, Vf: *V. faba*)**

Über diese Kalibrierkurven wurden die äquivalenten Methioningehalte im Saatgutlysat berechnet. Es wurde dabei die zum jeweils gleichen Messzeitpunkt ermittelte Kalibrierkurve benutzt um Faktoren die Einfluss auf die Signalintensität nehmen (bspw. eine veränderte Zellzahl) auszuschließen. Die Werte wurden aus den absoluten Lumineszenzwerten mit Hilfe von Kalibrierkurven für die drei Inkubationszeiten berechnet.

Diese errechneten Methioningehalte sind in Tab. 8 dargestellt. Die ersten kalkulierten Methioningehalte wichen dabei deutlich von den aus der HPLC-Analyse bekannten Methioningehalten ab (Tab. 8; Erste Methode verglichen mit mit HPLC-Messung).

Die Messmethodik wurde daraufhin in zweierlei Hinsicht modifiziert. Zum einen wurde der Messzeitraum auf 4 h Inkubationszeit beschränkt. Die Messintervalle wurden ebenfalls modifiziert, so dass die erste Messung bereits nach einer Stunde erfolgte.

Weiterhin wurde die Hydrolyse mit einer geringeren Einwaage an Mehl durchgeführt (1 mg/ml anstelle von 10 mg/ml) um zu gewährleisten, dass das Saatgutlysat eine geringere, jedoch homogenere Methioninkonzentration aufwies.

**Tabelle 8: Aus den Luminenszenzwerten errechnete Methioningehalte im Saatgut der Versuchspflanzenarten im Vergleich zu den wahren Gehalten in (g/kg TG). Messung bei 28 °C in M9-Medium; 1:200 Verdünnung des Saatgutlysats.**

Inkubationszeit	<i>n</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>
1h	6	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,5
2h	6	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,7	1 ± 0,3
3h	4	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,9	1,1 ± 0,3
4h	4	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,8	1 ± 0,3
Mittelwert	-	1,2	1,5	1,1
Bandbreite der Einzelwerte	20	0,8 - 2,1	0,5 - 3,2	0,5 - 2
HPLC-Messung	-	2,1 ± 0,13	2,2	1,9 <sup>1</sup>
Erste Methode	3	0,6 ± 0,02	0,64 ± 0,09	0,55 ± 0,04

<sup>1</sup>=Mittelwert von 23 *V. faba* Sorten

Verglichen mit den zuvor erzielten Werten konnte dadurch eine deutliche Steigerung der Messgenauigkeit erzielt werden (Tab. 8, Zeilen 2-8). Die errechneten Werte lagen zwar nach wie vor deutlich unter den Ist-Werten (HPLC), jedoch waren die Relationen ähnlich (z. B. *P. sativum* mit höchstem Gehalt). Der Einsatz geringerer Mengen Mehl in der Hydrolyse erhöhte offensichtlich die Messgenauigkeit (1mg/ml HCl). Bei den vorherigen Hydrolysedurchläufen mit größeren Einwaagen (10 mg/ml HCl) war deshalb von einer unvollständigen Hydrolyse auszugehen.

Als problematisch sind dabei die Oxidationsereignisse während der Hydrolyse anzusehen, wodurch Methionin in Methioninsulfone umgewandelt wird. Es ist von einem Verlust von 5 bis zu 50 % auszugehen (Rutherford et al. 2007, Pickering und Newton 1983). Zwar wurde durch Entgasung der Salzsäure der Sauerstoffgehalt reduziert, eine weitergehende Reduktion des Sauerstoffgehaltes wäre jedoch erstrebenswert (z. B. mittels N<sub>2</sub>-Begasung).

### 3.4 Vorversuche zur Verifizierung der phänotypischen Selektionskriterien

Die mit Projektbeginn begonnenen Vorversuche zu den von Imsande (2001) verwendeten Selektionsparamametern „Blattgrün“ und „Keimwurzellänge in Ethionin“ hatten die nachfolgenden Ergebnisse.

#### 3.4.1 Visuelle Methoden

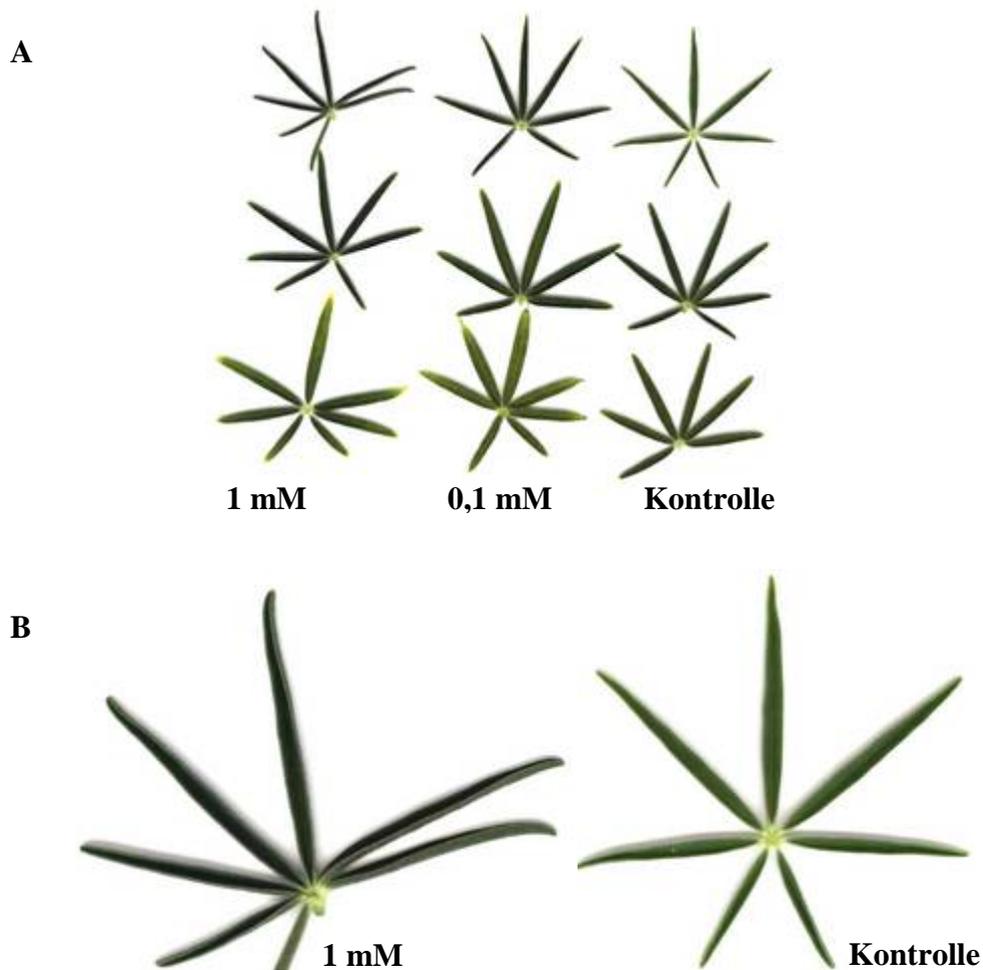
Zur Identifikation methioninreicher Individuen wurde die Blattgrünfärbung als Indikator herangezogen.

Die Blätter von 38 Tage alten *P. sativum* Pflanzen zeigten eine erkennbar dunklere Grünfärbung der mit Methionin versorgten Pflanzen (Abb. 19). Die intensivste Grünfärbung war beim 0,1 mM Ansatz erkennbar.



**Abb. 19: Aufnahme der 5 jüngsten Blätter von *P.sativum* im Alter von 38 Tagen. Das Blattalter nimmt von unten nach oben ab. Die Bilder wurden eingescannt und anschließend eine Farbkorrektur des Gesamtbildes vorgenommen, um Unterschiede in der Grünfärbung zu verdeutlichen.**

Bei *L. angustifolius* konnte nach 38 Tagen beim jüngsten Blatt eine leichte Abweichung der Grünfärbung beobachtet werden (Abb. 20 A und B). Die Blätter der 1 mM Variante waren hier gegenüber der Kontrolle intensiver gefärbt.



**Abbildung 20 A: Aufnahme der 3 jüngsten Blätter von *L. angustifolius* im Alter von 38 Tagen. Das Blattalter nimmt von unten nach oben ab. Die Blätter wurden eingescannt und anschließend eine Farbkorrektur des Gesamtbildes vorgenommen, um Unterschiede in der Grünfärbung zu verdeutlichen. B: Vergrößerte Aufnahme des jüngsten Blattes.**

Auch bei *V. faba* waren geringfügige Abweichungen in der Grünfärbung der jüngsten Blätter sichtbar (Abb. 21). Wiederum war beim Blatt des 1 mM Ansatzes eine dunklere Färbung im Vergleich zum Kontrollblatt zu erkennen.



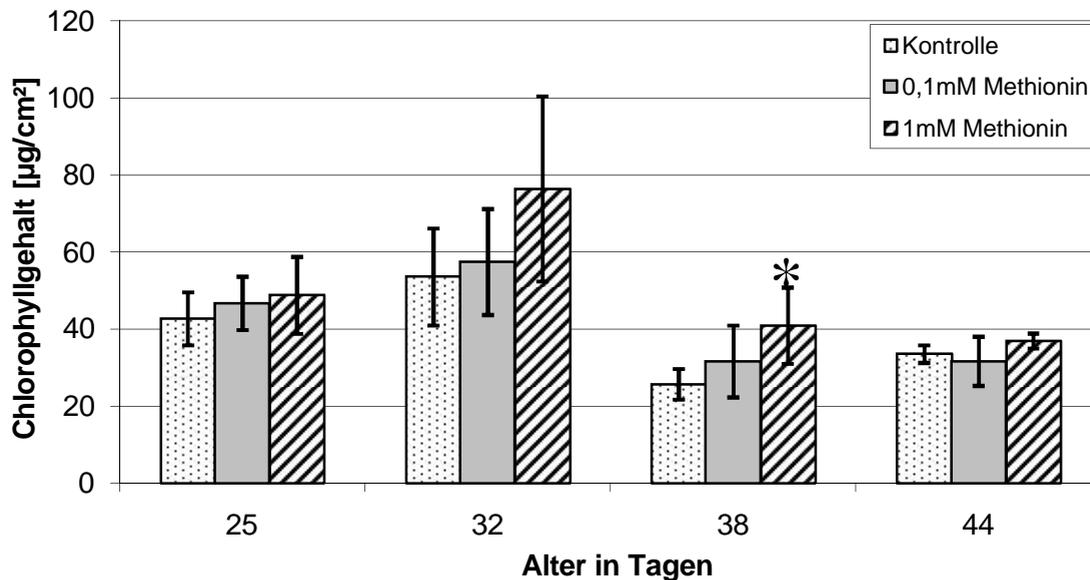
**Abbildung 21: Aufnahme der 3 jüngsten Blätter von *V. faba* im Alter von 38 Tagen. Das Blattalter nimmt von unten nach oben ab. Die Blätter wurden eingescannt und anschließend eine Farbkorrektur des Gesamtbildes vorgenommen, um Unterschiede in der Grünfärbung zu verdeutlichen.**

### **3.4.2 Bestimmung der Blattchlorophyllgehalte**

Bei allen drei Pflanzenarten zeigte die Konzentration der Chlorophylle im Blattgewebe eine altersabhängige Beziehung. Bei fünf Wochen alten Pflanzen konnte eine Abnahme in der Gesamtchlorophyllkonzentration beobachtet werden. Der Einfluss der Methioninernährung auf die Chlorophyllkonzentrationen im Blattgewebe war je nach Versuchspflanzenart unterschiedlich.

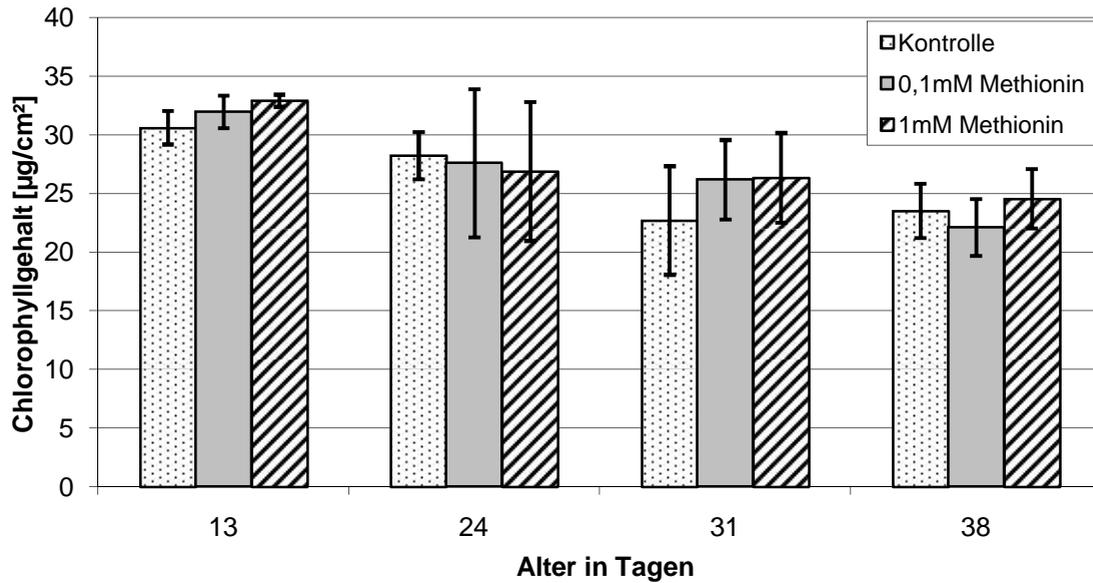
Bei *L. angustifolius* wiesen die mit hohen Methioninkonzentrationen behandelten Pflanzen (1 mM) in jeder Altersstufe eine erhöhte mittlere Chlorophyllkonzentration auf (Abb. 22). Ein signifikanter Unterschied bestand aber nur bei den 38 Tage alten Pflanzen, wobei der Mittelwert um 59 % höher lag als bei den unbehandelten Pflanzen. Die mit 0,1 mM Methionin be-

handelten *L. angustifolius* zeigten, bis auf die 44 Tage alten Pflanzen, ebenfalls gegenüber den Kontrollpflanzen erhöhte Chlorophyllkonzentrationen (um 23 % gesteigert nach 38 Tagen). Jedoch waren diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant.



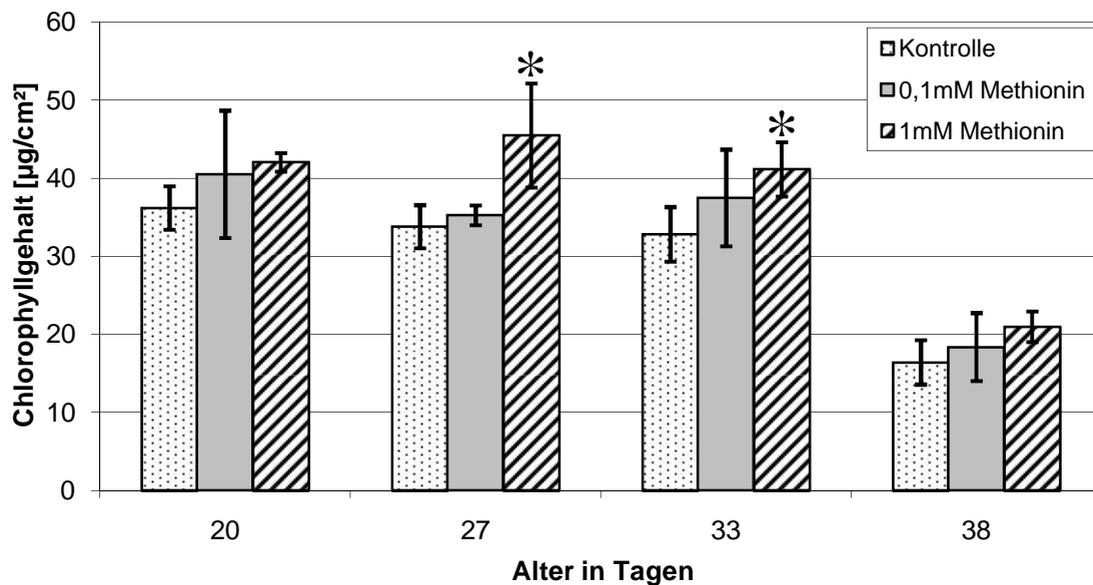
**Abbildung 22: Chlorophyllkonzentration des jüngsten voll entwickelten Blattes von *L. angustifolius*. Die Pflanzen wurden ab einem Alter von 25 Tagen wöchentlich beerntet. Ein Sternsymbol gibt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle derselben Altersstufe an. Tukey-Test ( $p < 0,05$ );  $n=6$**

Bei *P. sativum* zeigte sich kein ausgeprägter Unterschied zwischen den Versuchsansätzen (Abb. 23). Die mittleren Chlorophyllgehalte der mit 1 mM Methionin ernährten Pflanzen waren gegenüber der Kontrolle an drei von vier Messzeitpunkten leicht erhöht. Ein signifikanter Unterschied lag jedoch nicht vor. Die größte prozentuale Abweichung der Methioninansätze von der Kontrolle trat nach 31 Tagen auf. Dort lagen die Chlorophyllgehalte um 16 % (1 mM) bzw. um 15 % (0,1 mM) über der Kontrolle. Die übrigen Abweichungen lagen unter 10 % vom Kontrollwert. Mit 0,1 mM Met versorgte *P. sativum* Pflanzen wiesen geringere Unterschiede zu den Kontrollpflanzen auf.



**Abbildung 23:** Chlorophyllkonzentration des jüngsten voll entwickelten Blattes von *P. sativum*. Die Pflanzen wurden ab einem Alter von 13 Tagen wöchentlich beerntet. Ein Sternsymbol gibt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle derselben Altersstufe an. Tukey-Test ( $p < 0,05$ );  $n=6$

Im Gegensatz zu *P. sativum* traten bei *V. faba* zum Teil deutlich erhöhte Chlorophyllgehalte beim 1 mM Met Ansatz auf (Abb. 24).



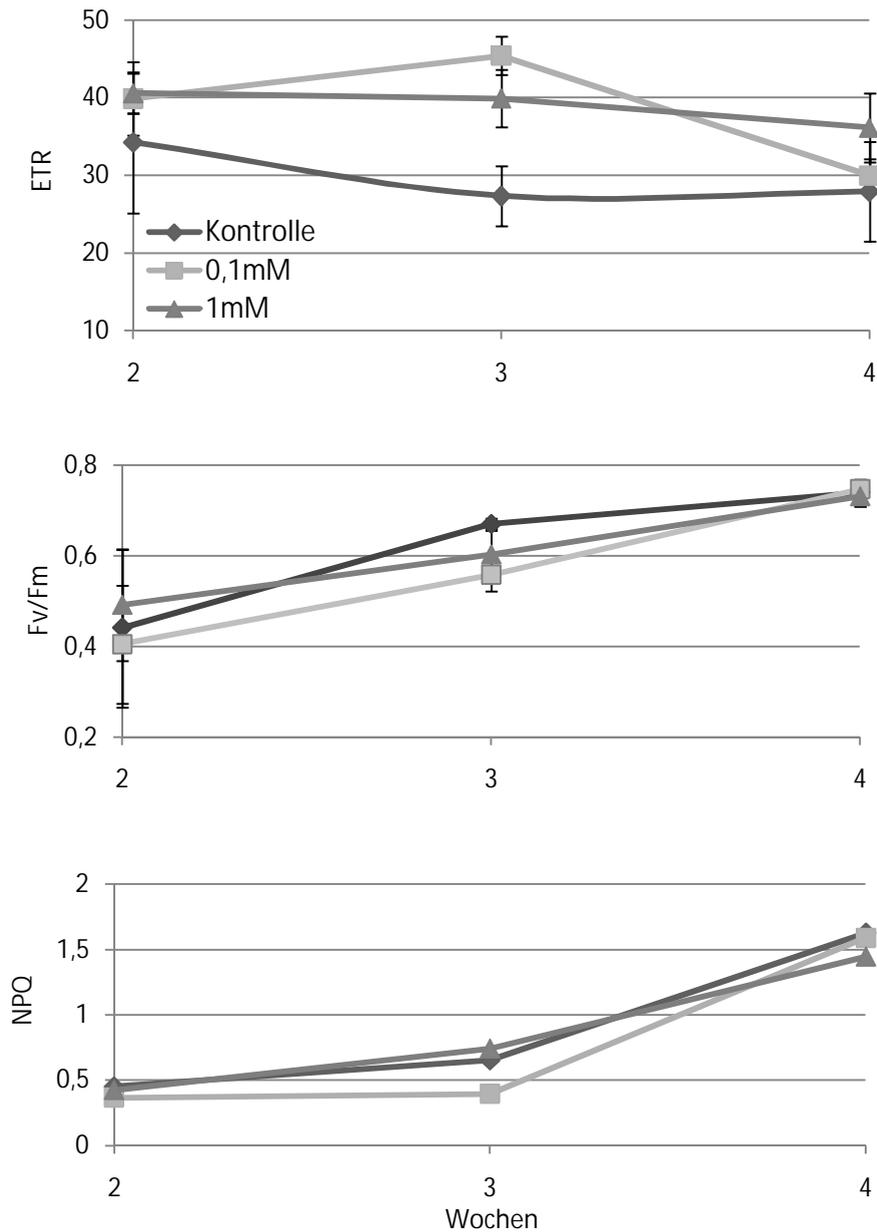
**Abb. 24:** Chlorophyllkonzentration des jüngsten voll entwickelten Blattes von *V. faba*. Die Pflanzen wurden ab einem Alter von 20 Tagen wöchentlich beerntet. Ein Sternsymbol gibt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle derselben Altersstufe an. Tukey-Test ( $p < 0,05$ );  $n=6$

So waren signifikante Steigerungen um 34 % bei 27 Tagen und um 25 % bei 33 Tage alten Pflanzen zu beobachten. Der 0,1 mM Ansatz zeigt zwar auch um bis zu 14 % erhöhte Chlorophyllgehalte (33 Tage), ohne dabei aber signifikant von dem der Kontrolle abzuweichen.

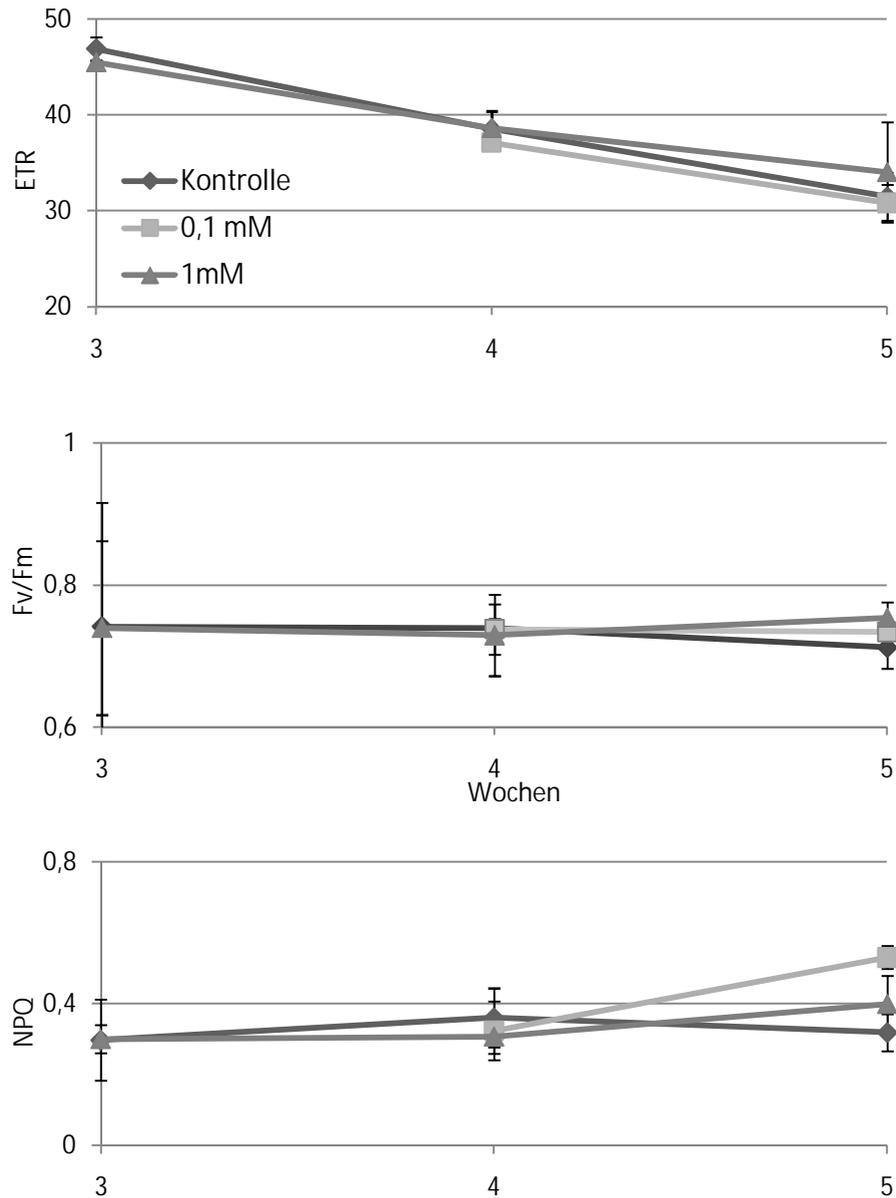
### 3.4.3 Fluorometrische Untersuchungen an Blattgewebe

Die Chlorophyll *a* Fluoreszenz Messung erfolgte erst, sobald die Pflanzen eine ausreichend große Blattfläche entwickelt hatten. Aus diesem Grund weisen die Zeitachsen der einzelnen Versuchspflanzenarten Unterschiede auf. Auffällig war zunächst, dass bei allen drei Pflanzenarten der  $F_v/F_m$ -Quotient zum Teil deutlich unter 0,8 lag (Abb. 25-27). Insbesondere bei *P. sativum* lag der Wert bei 2 und 3 Wochen alten Pflanzen aller drei Ansätze erheblich niedriger (0,4-0,65; Abb. 25-27). Ein Unterschied im  $F_v/F_m$ -Quotient zwischen den Behandlungen ließ sich bei keiner der Versuchspflanzenarten feststellen.

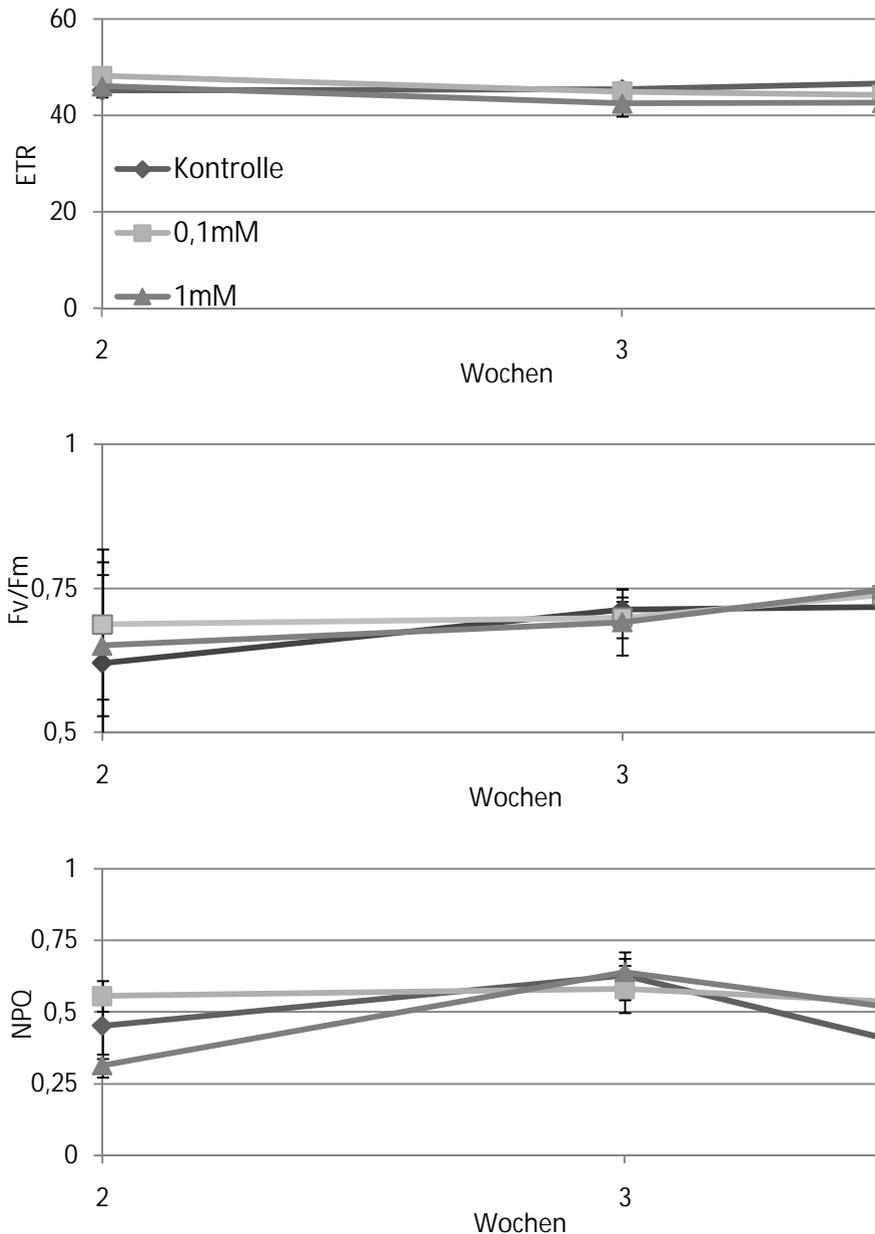
Die nicht photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) war zwischen den Behandlungen aller drei Arten ebenfalls weitgehend homogen (Abb. 25-27). Im Zeitverlauf konnte eine Zunahme des NPQ-Werts bei *P. sativum* und *V. faba* verzeichnet werden, wohingegen der Wert bei *L. angustifolius* im Zeitraum zwischen 3 und 3,5 Wochen abnahm (Abb. 27). In der Elektronentransportrate (ETR) am PSII konnte für *P. sativum* ein Unterschied zwischen den Ansätzen beobachtet werden (Abb. 25). Die mit Methionin behandelten Pflanzen wiesen hierbei zu allen Messzeitpunkten erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpflanzen auf. Bei 3 Wochen alten Pflanzen war der Unterschied maximal und für die 0,1 und 1mM Behandlung signifikant (Tukey-Test;  $p < 0,05$ ). Für *L. angustifolius* und *V. faba* waren die der ETR Werte der Ansätze gleichartig, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen festgestellt werden konnten.



**Abb. 25: Fluoreszenzmessungen an Blättern von *P. sativum*. Die Messung erfolgte am jeweils jüngsten, vollständig entwickelten Blatt. Die Pflanzen wurden vor der Messung für 20 min dunkel adaptiert und es wurde eine Induktionskurve gemessen (4 min Messzeit). (n=3)**



**Abb. 26: Fluoreszenzmessungen an Blättern von *V. faba*. Die Messung erfolgte am jeweils jüngsten, vollständig entwickelten Blatt. Die Pflanzen wurden vor der Messung für 20 min dunkel adaptiert und es wurde eine Induktionskurve gemessen (4 min Messzeit). (n=3)**

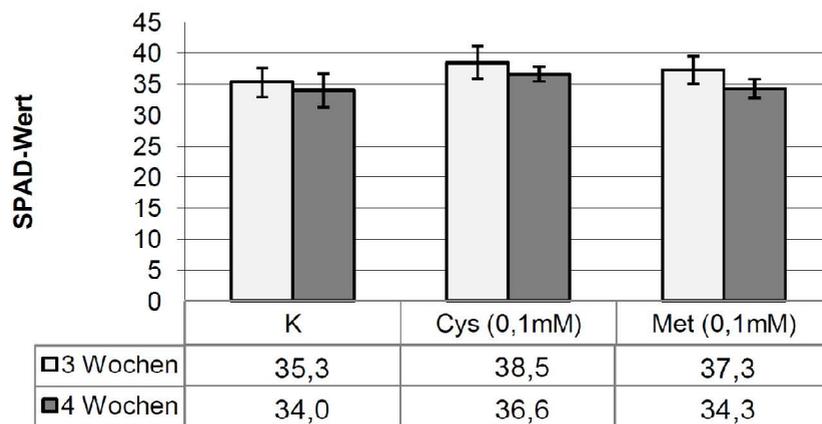


**Abb. 27: Fluoreszenzmessungen an Blättern von *L. angustifolius*. Die Messung erfolgte am jeweils jüngsten, vollständig entwickelten Blatt. Die Pflanzen wurden vor der Messung für 20 min dunkel adaptiert und es wurde eine Induktionskurve gemessen (4 min Messzeit). (n=3)**

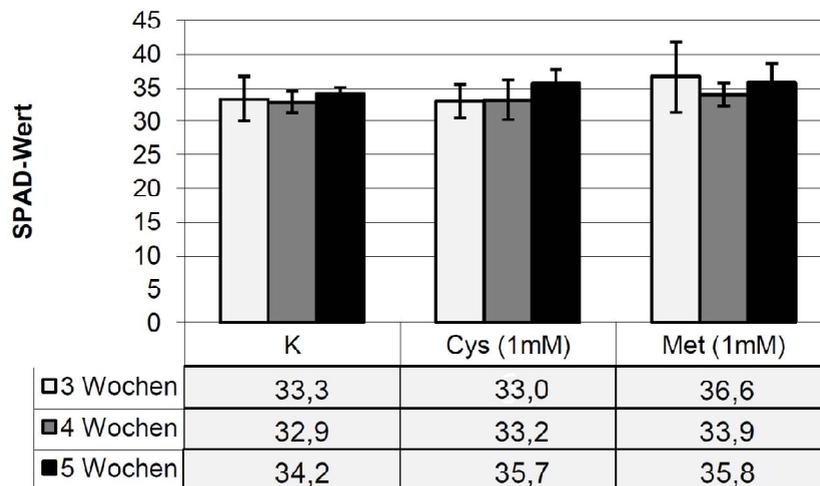
### 3.4.4 Ergebnisse der SPAD-Messungen

In Folge der Klimakammeranzucht in den Vorversuchen entwickelten die Pflanzen von *L. angustifolius* und *P. sativum* vergleichsweise geringe Blattflächen. Die SPAD Messungen wurden daher nur an *V. faba* vorgenommen.

Sie erfolgten am jeweils jüngsten, vollständig entwickelten Blatt der mit und ohne Methionin- bzw. Cysteinzugabe angezogenen *V. faba* Pflanzen (Abb. 21). Es konnte eine geringfügige Zunahme des SPAD-Wertes sowohl bei Applikation von 0,1 mM Methionin als auch von Cystein festgestellt werden (Abb. 28). Cystein bewirkte hierbei eine geringfügig stärkere Zunahme des SPAD-Wertes. Bei Applikation der um den Faktor 10 erhöhten Aminosäuremenge, konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden (Abb. 29).



**Abb. 28.** SPAD-Werte des jeweils jüngsten, voll entwickelten Blattes von *V. faba*. Die Pflanzen wurden mit 0,1 mM Cystein bzw. 0,1 mM Methionin behandelt und die Messungen erfolgten bei 3 bzw. 4 Wochen alten Pflanzen. (n=8, K= Kontrolle)



**Abb. 29.** SPAD-Werte des jüngsten voll entwickelten Blattes von *V. faba*. Die Pflanzen wurden mit 1 mM Cystein bzw. Methionin behandelt und die Messungen erfolgten bei 3, 4 sowie 5 Wochen alten Pflanzen. (n=8, K= Kontrolle).

### 3.5 Vorversuche zur Anwendbarkeit des Et-Tests zur Identifikation methioninreicher Pflanzen

*L. angustifolius* wies ein für den Versuchsaufbau ungünstiges Wachstumsverhalten auf (Abb. 30). Zum einen lag eine undeutliche Trennung zwischen Hypokotyl und Keimwurzel vor. Zum anderen war das positiv gravitropes Wurzelwachstum nur schwach ausgeprägt, was sich in zum Teil lateralem Wurzelwachstum äußerte. Dadurch wurde die Messung der Wurzellänge erschwert. Demgegenüber konnte das Wurzellängenwachstum bei *P. sativum* und *V. faba* problemlos ermittelt werden (Abb. 31 exemplarisch für *P. sativum*).



Abb. 30: Kontroll- (links) und mit Ethionin behandelte Pflanzen (rechts) von *L. angustifolius* aus dem Et-Test. Die Pflanzen wurden aus Samen für 7 Tage unter kontrollierten Umweltbedingungen angezogen.



Abb. 31: Kontroll- und mit Ethionin behandelte Pflanzen von *P. sativum* aus dem Et-Test. Pflanzen wurden aus Samen für 7 Tage unter kontrollierten Umweltbedingungen angezogen.

Im ersten Teil des Versuchsaufbaus wurden die Vorversuche mit L- und DL-Ethionin durchgeführt. In den Vorversuchen konnte bei *L. angustifolius* für L-Ethionin ein signifikant hemmender Effekt auf das Längenwachstum der Keimwurzel ermittelt werden (Abb. 32 A). Im

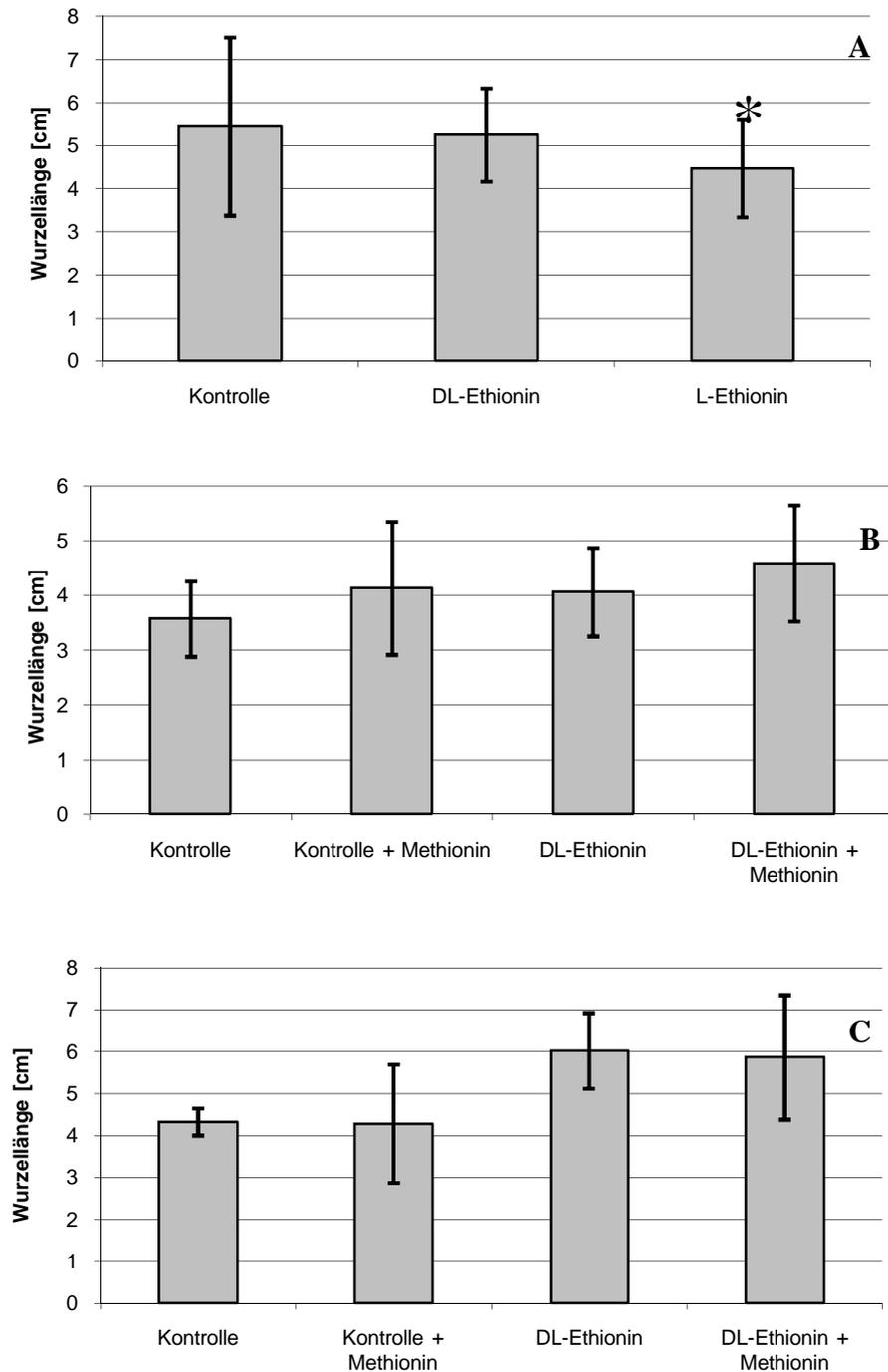
DL-Ethionin war die mittlere Wurzellänge nur geringfügig kleiner als die in der Kontrolle. Im darauf aufbauenden Versuch wurde ein Teil der Pflanzen für 2 Tage in Methioninlösung bzw. Wasser und anschließend für 5 Tage in DL-Ethioninlösung angezogen (Abb. 32 B). Hier trat kein hemmender Effekt durch DL-Ethionin mehr auf. Es war sogar in den Ethionin Ansätzen ein stärkeres Wurzelwachstum zu beobachten. Demgegenüber war die mittlere Wurzellänge bei der Kontrolle am geringsten. Eine signifikante Abweichung zwischen den Ansätzen liegt jedoch nicht vor. Im dritten Versuch (Abb. 32 C) verstärkte sich das in Versuch B eingetretene Ergebnis. Hier lag die Wurzellänge der mit DL-Ethionin behandelten Pflanzen noch deutlicher über dem Kontrollansatz (DL-Ethionin: +39 %; DL-Ethionin+Met: +35 %). Dennoch waren die Unterschiede in keinem Fall signifikant.

Die Versuche mit *P. sativum* lieferten deutlich von *L. angustifolius* abweichende Resultate. Der Wurzelphänotyp war bei fast allen Individuen stark positiv gravitrop entwickelt. Im Vorversuch konnte die hemmende phytotoxische Ethionin Wirkung sowohl für reines L-Ethionin als auch für DL-Ethionin festgestellt werden (Abb. 33 A). Die beiden Ethioninansätze unterschieden sich dabei nicht voneinander. DL-Ethionin bewirkte eine ebenso starke Reduktion der Wurzellänge wie L-Ethionin. Daher wurden die folgenden Versuche mit DL-Ethionin durchgeführt.

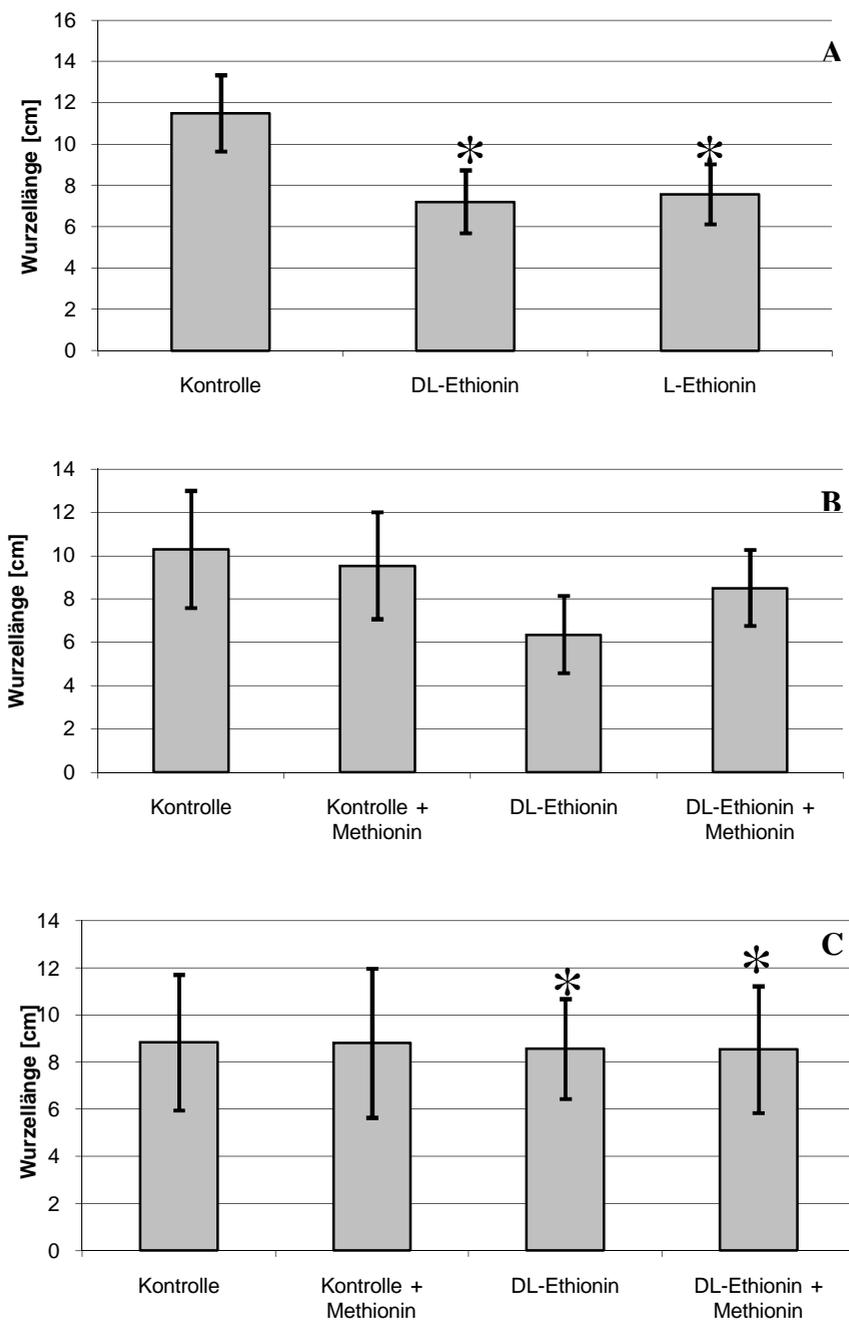
Im zweiten Versuch waren dagegen keine Abweichungen zwischen den Ansätzen feststellbar (Abb. 33 B). Weder trat ein positiver Effekt der Methioninbehandlung auf, noch war eine phytotoxische Wirkung des DL-Ethionin festzustellen.

Im dritten Versuch mit *P. sativum* traten wiederum deutliche Unterschiede zwischen den Ansätzen auf (Abb. 33 C). Zudem führte DL-Ethionin zu einer signifikanten Wurzellängenreduktion von 38 %. Beim DL-Ethioninansatz mit zuvor erfolgter Methioninbehandlung lag die Reduktion der Wurzellänge dagegen nur bei 18 %. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen konnte festgestellt werden (Tukey-Test,  $p < 0,05$ ).

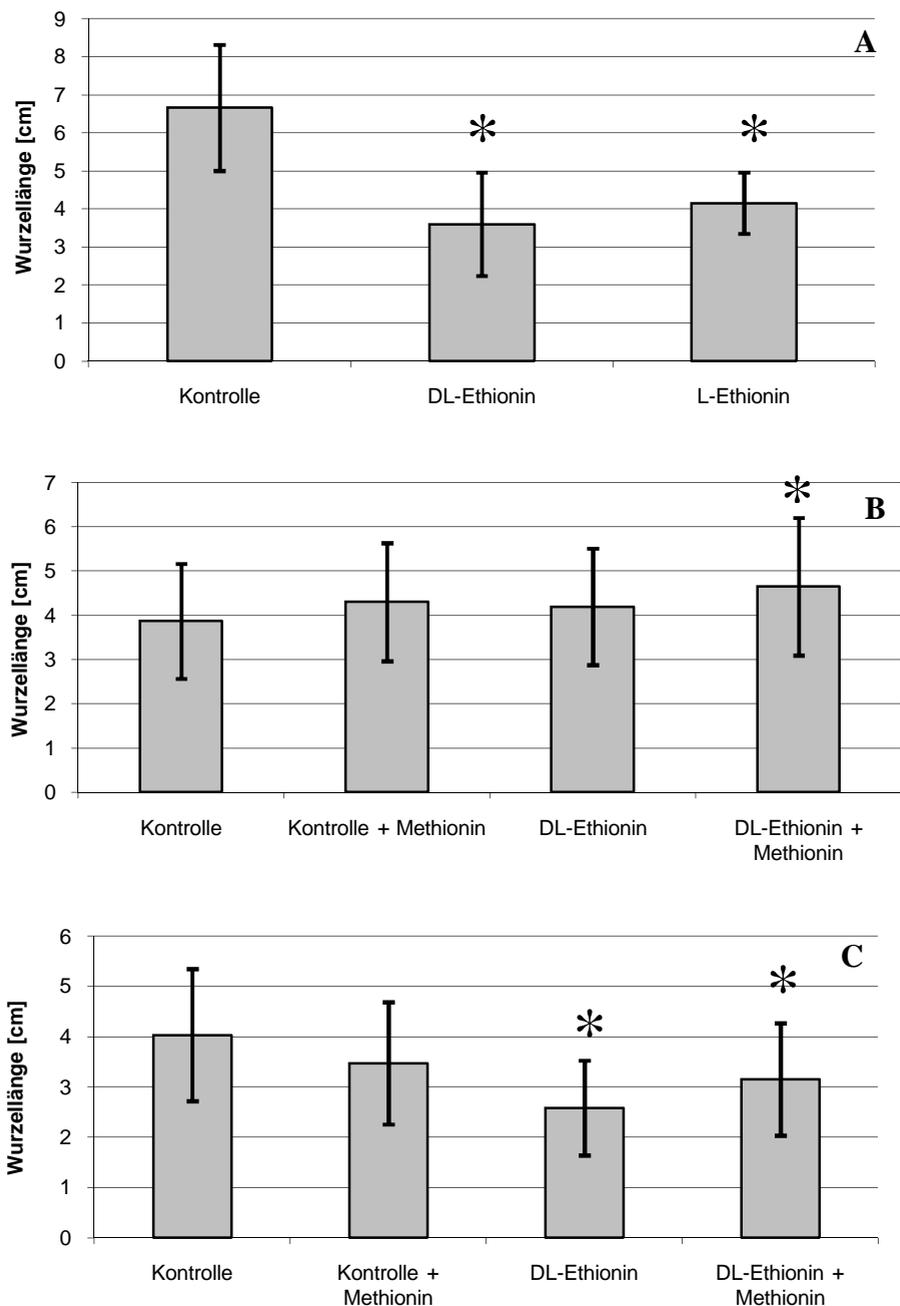
Die Versuchsergebnisse mit *V. faba* deckten sich zum Großteil mit denen der Versuche mit *P. sativum* (Abb. 34). Im Vorversuch bewirkten DL- und L-Ethionin eine ausgeprägte Hemmung des Wurzelwachstums (Abb. 34 A). Hierbei war die Reduktion durch DL-Ethionin aber signifikant größer (Mann Whitney Test ( $p < 0,05$ )). Im zweiten Versuch, stellte sich wiederum kein Hemmungseffekt durch DL-Ethionin ein (Abb. 34 B). Im dritten Versuchsaufbau zeigten die Ethioninansätze erneut ein signifikant vermindertes Wurzellängenwachstum (Abb. 34 C). Auch lag der Mittelwert des Methionin/Ethioninansatzes um 20 % über dem Ethioninansatz. In diesem Fall war der Unterschied jedoch nicht signifikant (Tukey-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abb. 32: Wurzellänge von *L. angustifolius* Keimlingen nach einwöchigem Wachstum in unterschiedlichen Nährmedien. A: Samen für 7 Tage in Wasser (Kontrolle), 0,75 mM DL-Ethioninlösung oder L-Ethioninlösung; B: Samen für 2 Tage in Wasser bzw. 1 mM Methioninlösung, anschließend Keimlinge in Wasser bzw. 0,75 mM DL-Ethioninlösung; C: Saatgut wurde 1 Tag in Wasser bzw. 1 mM Met-Lösung vorgequollen. Im Anschluss daran wurden die Samen in Wasser oder 0,75 mM DL-Ethioninlösung inkubiert. Sternsymbole geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle wieder. A: Mann Whitney Test ( $p < 0,05$ ); B: Kruskal-Wallis Test ( $p < 0,05$ ); C: Tukey-Test; ( $n=10$ )**



**Abb. 33: Wurzellänge von *P. sativum* Keimlingen nach einwöchigem Wachstum in unterschiedlichen Nährmedien. A: Samen für 7 Tage in Wasser (Kontrolle), 0,75 mM DL-Ethioninlösung oder L-Ethioninlösung; B: Samen für 2 Tage in Wasser bzw. 1 mM Methioninlösung, anschließend Keimlinge in Wasser bzw. 0,75 mM DL-Ethioninlösung; C: Saatgut wurde 1Tag in Wasser bzw. 1mM Met-Lösung vorgequollen. Im Anschluss daran wurden die Samen in Wasser oder 0,75 mM DL-Ethioninlösung inkubiert. Sternsymbole geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle wieder. A, B: Kruskal-Wallis Test ( $p < 0,05$ ); C: Tukey-Test ( $p < 0,05$ ); ( $n = 20$ )**

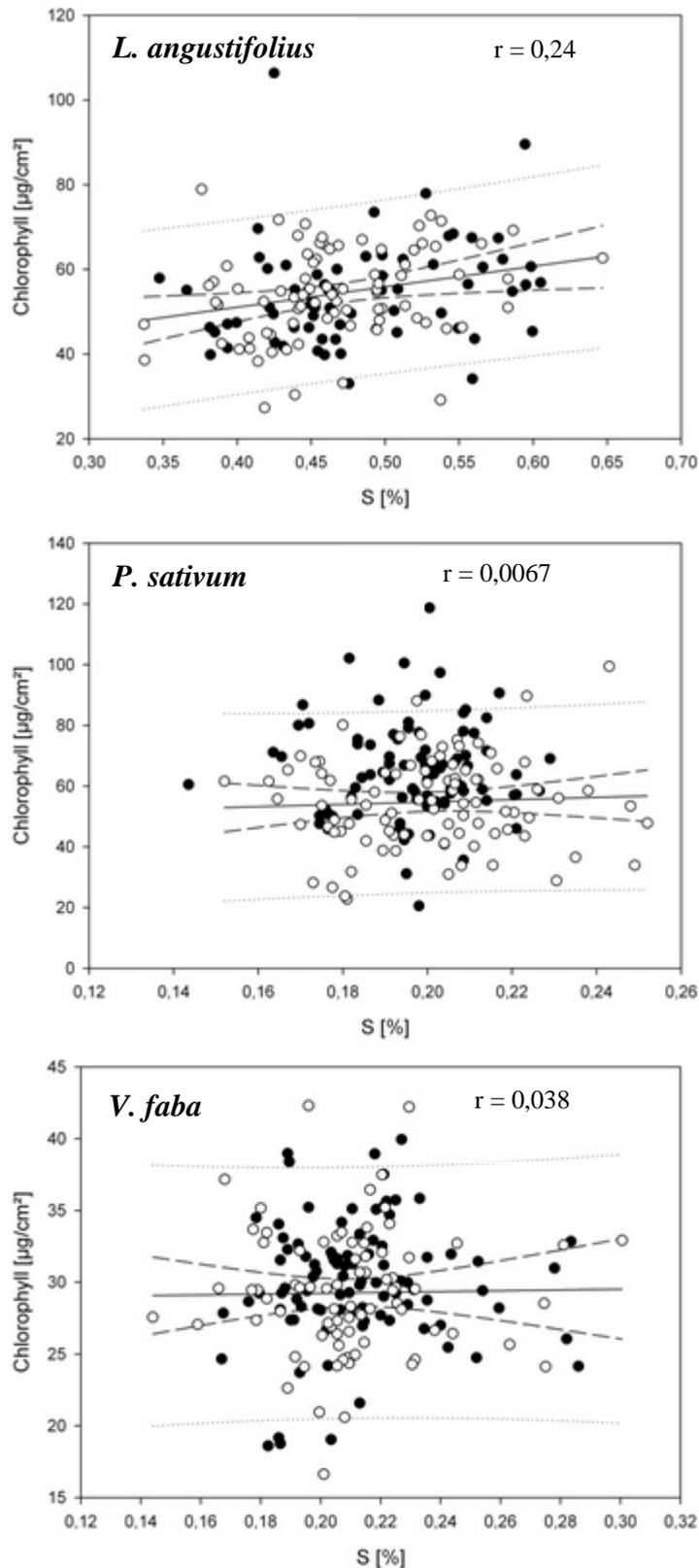


**Abb. 34: Wurzellänge von *V. faba* Keimlingen nach einwöchigem Wachstum in unterschiedlichen Nährmedien. A: Samen für 7 Tage in Wasser (Kontrolle), 0,75 mM DL-Ethioninlösung oder L-Ethioninlösung; B: Samen für 2 Tage in Wasser bzw. 1 mM Methioninlösung, anschließend Keimlinge in Wasser bzw. 0,75 mM DL-Ethioninlösung; C: Saatgut wurde einen Tag in Wasser bzw. 1 mM Met-Lösung vorgequollen. Im Anschluss daran wurden die Samen in Wasser oder 0,75 mM DL-Ethioninlösung inkubiert. Sternsymbole geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle wieder. Tukey-Test ( $p < 0,05$ ); (n=10)**

### **3.6 Ergebnisse zur Selektion auf methioninreiche Pflanzen auf Basis von Et-Test und Chlorophyllgehalten**

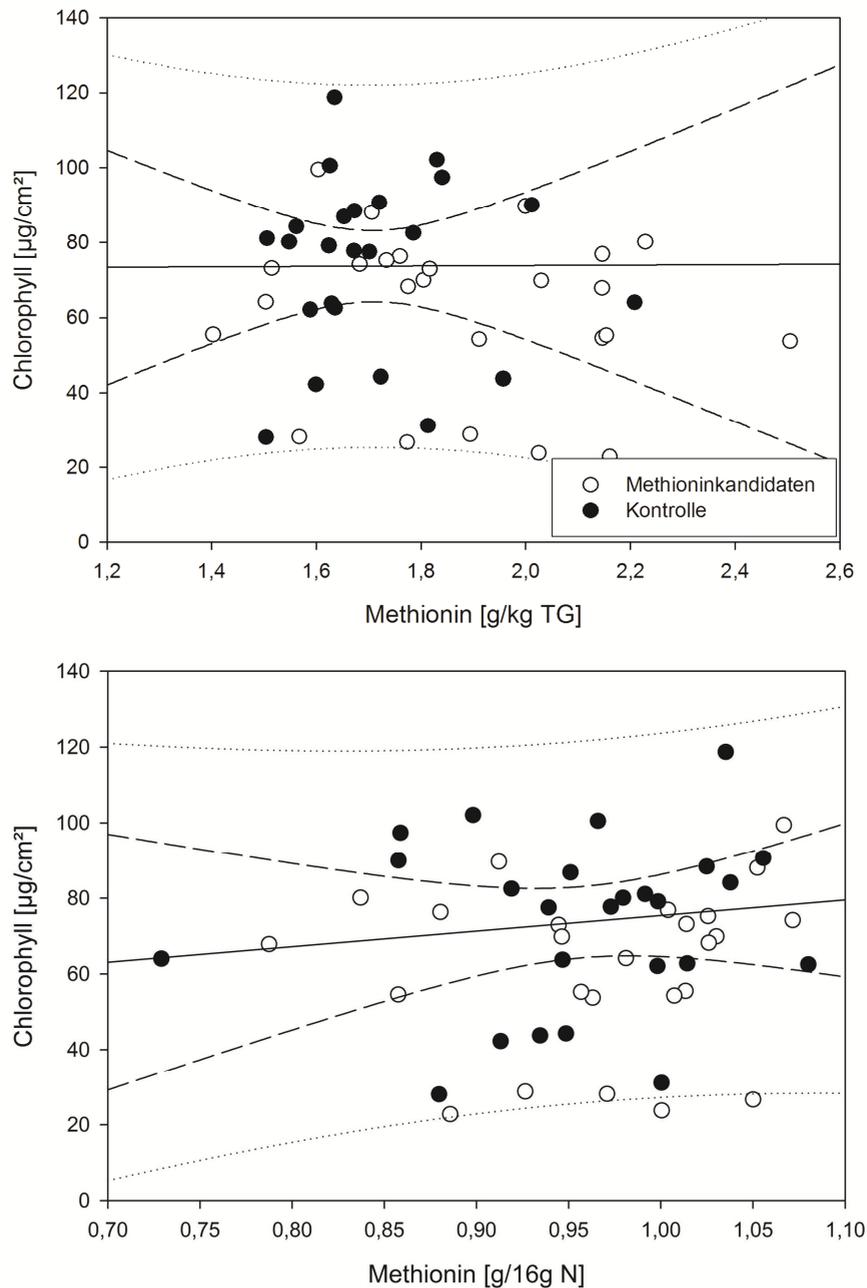
Aus jeweils 2000 Pflanzen pro Art wurden 200 Pflanzen im Et-Test heraus selektiert. Davon hatten je 100 Pflanzen lange (Methioninkandidaten) und 100 Pflanzen mittellange oder kurze Wurzeln (Kontrolle). Im Erntegut aller 200 Pflanzen aus dem Et-Test wurden die N- und S-Gehalte bestimmt. Aus den 200 Pflanzen wurden wiederum jeweils 50 Pflanzen über den Chlorophyllgehalt der Blätter ausgewählt und deren Saat einer Aminosäureanalyse unterzogen. Mit den daraus gewonnenen Messdaten wurde die Korrelation des Selektionsparameters Chlorophyllgehalt der Blätter mit den Aminosäure- und S- bzw. N-Gehalten der Samen untersucht.

In Abbildung 35 wurden für alle Leguminosen Regressionen für den Zusammenhang zwischen Chlorophyll- und S-Gehalt erstellt. Die beiden Parameter zeigten bei *L. angustifolius* eine schwache Korrelation, während die Parameter bei *P. sativum* und *V. faba* nicht miteinander korreliert waren.



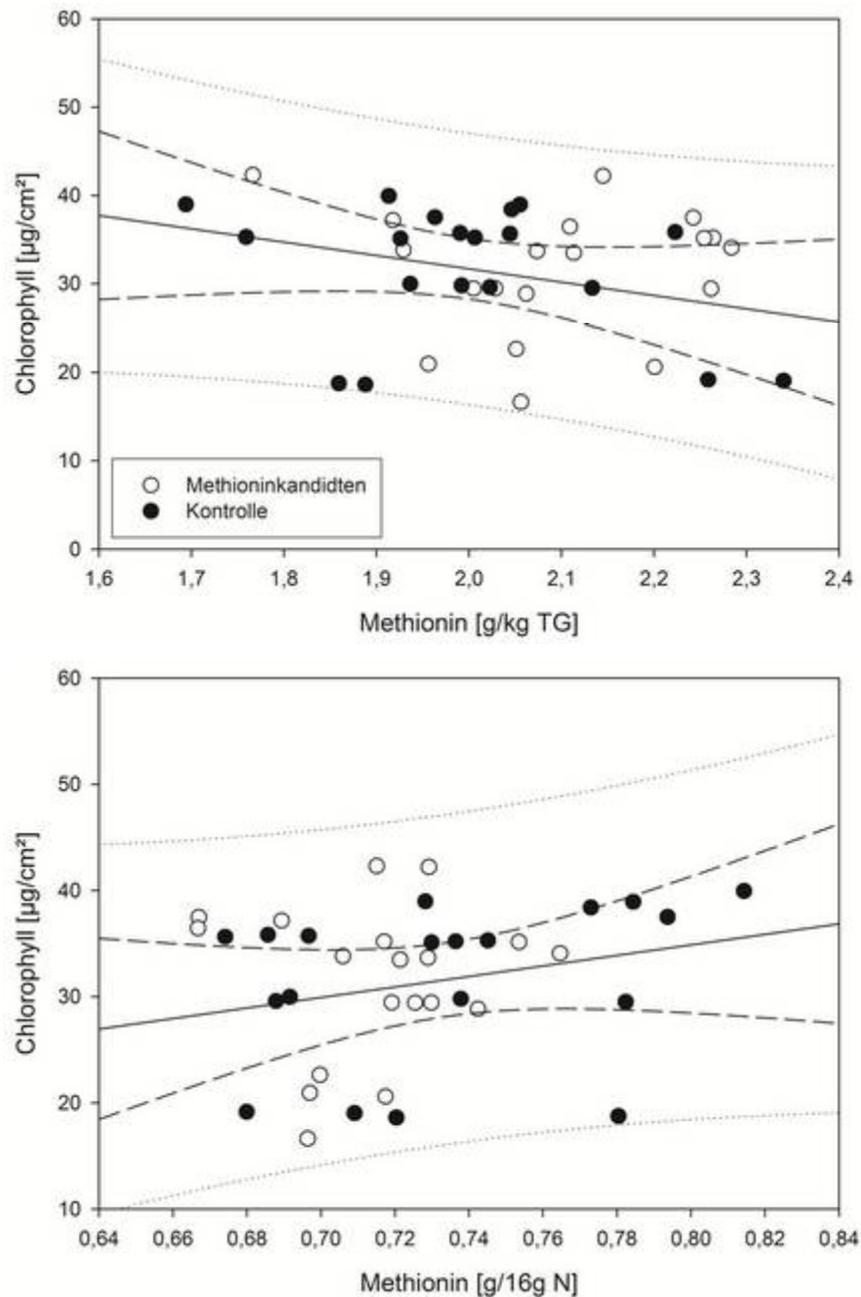
**Abb. 35: Zusammenhang des Chlorophyllgehaltes der jüngsten, vollständig entwickelten Blätter mit dem S-Gehalt der Samen für alle Versuchspflanzenarten. Pflanzen mit kurzen Wurzeln (schwarz, Kontrolle) und Pflanzen mit langen Wurzeln (weiß, Methioninkandidaten) wurden im Et-Test selektiert (n=200).**

Weiterhin war der Chlorophyllgehalt im Blattmaterial von *P. sativum* nicht mit dem absoluten (g/kg) bzw. relativen (g/16g N) Methioningehalt im Samen von korreliert (Abb. 36). Hierbei spielte es keine Rolle, ob man als Datengrundlage lediglich Kontroll- oder Methionkandidatenpflanzen heranzog.

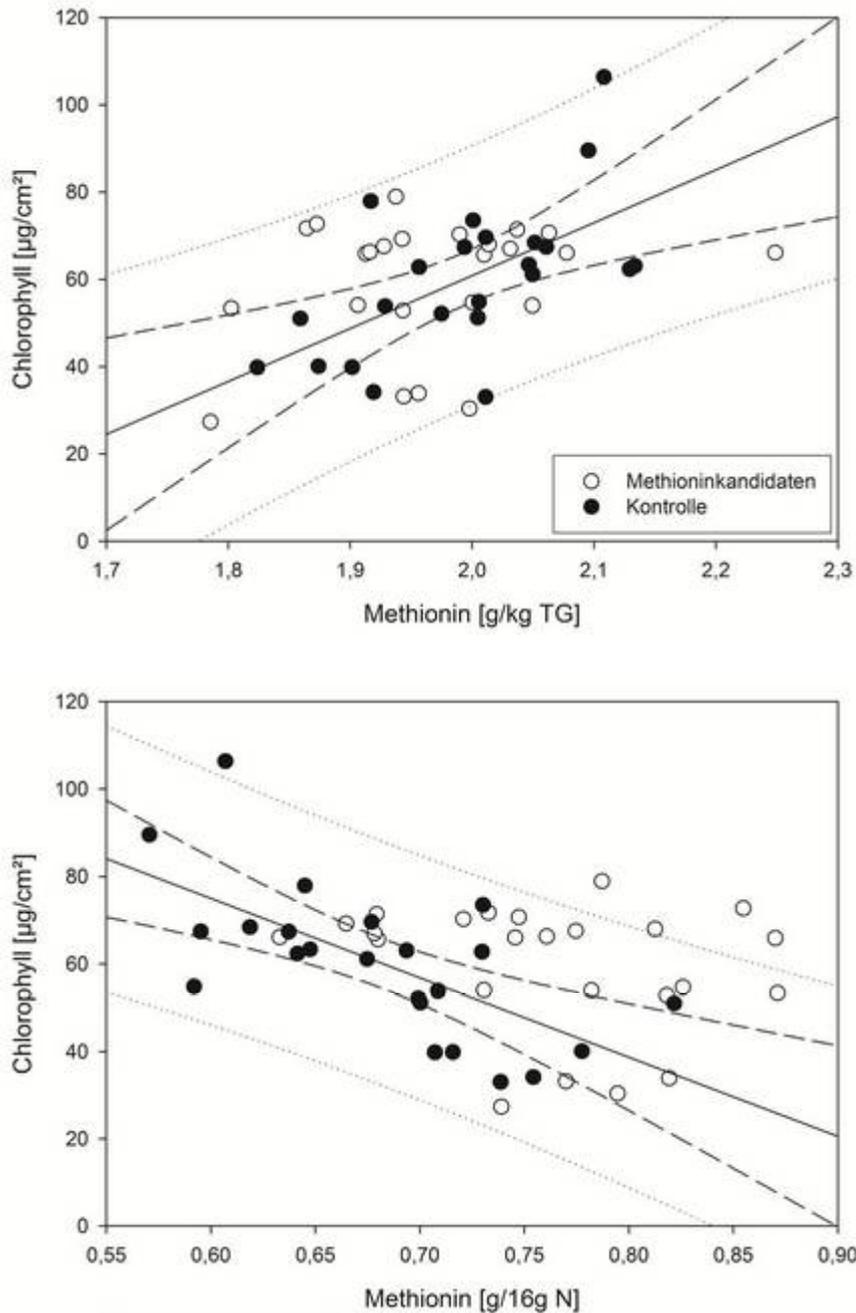


**Abb. 36: Zusammenhang des relativen (g/16g N) und absoluten Methioningehalts (g/kg) im Samen zum Chlorophyllgehalt der Blätter bei *P. sativum*. Pearson Korrelationskoeffizienten:  $r = -0,17$  (g/kg) bzw.  $0,095$  (g/16g N).**

Auch bei *V. faba* lagt keine Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt und den Methioningehalten vor (Abb. 37). Für *L. angustifolius* waren der Chlorophyllgehalt der Blätter und der Methioningehalt im Samenprotein schwach negativ korreliert. Der absolute Methioningehalt der Samen war schwach positiv mit dem Blattchlorophyllgehalt korreliert (Abb. 38).



**Abb. 37: Zusammenhang des relativen (g/16g N) und absoluten Methioningehalts (g/kg) im Samen zum Chlorophyllgehalt der Blätter bei *V. faba*. Pearson Korrelationkoeffizienten:  $r = -0,18$  (g/kg) bzw.  $0,196$  (g/16g N).**



**Abb. 38: Zusammenhang des relativen (g/16g N) und absoluten Methioningehalts (g/kg) im Samen zum Chlorophyllgehalt der Blätter bei *L. angustifolius*. Pearson Korrelationkoeffizienten:  $r = 0,42^*$  (g/kg) bzw.  $-0,39^*$  (g/16g N).**

Insgesamt konnten aber keine belastbaren Zusammenhänge gefunden werden.

In Tabelle 9 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen S-Aminosäuren, S und N-Gehalten der Leguminosensamen sowie dem Chlorophyllgehalt der Blätter aufgeführt. Es wurde deutlich, dass bei allen Arten die Cystein- und Methioningehalte der Samen streng miteinander

korreliert waren. Ebenfalls streng zusammenhängend waren N- und Methionin- bzw. Cysteingehalt, wobei die relativen Gehalte (g/16gN) jeweils negativ korrelierten. Bei hohen Proteingehalten ist daher der Anteil S-haltiger Aminosäuren geringer. Unterschiede zwischen den Arten lagen unter anderem bei der Beziehung zwischen S-Gehalt und den absoluten S-Aminosäuregehalten vor. Während diese bei *P. sativum* und *L. angustifolius* korreliert waren, war dies für *V. faba* nicht der Fall.

**Tab. 9: Korrelation von Methionin (Met), Cystein (Cys), N- und S-Gehalten der Samen sowie dem Chlorophyllgehalt der Blätter bei den verschiedenen Leguminosenarten im Et-Test. Pearson Korrelationskoeffizienten \*=p<0,05, \*\*=p<0,01**

Korrelierte Parameter			<i>P.sativum</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>V. faba</i>
Cys [g/16gN]	zu	Met [g/16gN]	0,91**	0,95**	0,8**
Cys [g/kg TG]	zu	Met [g/kg TG]	0,89**	0,85**	0,87**
Cys [g/16g N]	zu	Chlorophyll	-0,04 <sup>ns</sup>	-0,31*	0,21 <sup>ns</sup>
Cys [g/kg]	zu	Chlorophyll	-0,29*	0,44**	-0,12 <sup>ns</sup>
Met [g/16g N]	zu	Chlorophyll	0,1 <sup>ns</sup>	-0,39**	0,2 <sup>ns</sup>
Met [g/kg]	zu	Chlorophyll	-0,17 <sup>ns</sup>	0,42**	-0,18 <sup>ns</sup>
S-Aminosäuren [g/16g N]	zu	Chlorophyll	0,004 <sup>ns</sup>	-0,35*	0,21 <sup>ns</sup>
Cys [g/16g N]	zu	S-Gehalt	-0,12 <sup>ns</sup>	-0,27 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>
Met [g/16g N]	zu	S-Gehalt	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,54**	0,03 <sup>ns</sup>
S-Aminosäuren [g/16g N]	zu	S-Gehalt	-0,17 <sup>ns</sup>	-0,38**	0,13 <sup>ns</sup>
Cys [g/kg]	zu	S-Gehalt	0,84**	0,68**	0,26 <sup>ns</sup>
Met [g/kg]	zu	S-Gehalt	0,69**	0,42**	0,13 <sup>ns</sup>
S-Aminosäuren [g/kg]	zu	S-Gehalt	0,79**	0,65**	0,22 <sup>ns</sup>
Cys [g/16g N]	zu	N-Gehalt	-0,83**	-0,85**	-0,65**
Cys [g/kg]	zu	N-Gehalt	0,73**	0,88**	0,74**
Met [g/16g N]	zu	N-Gehalt	-0,8**	-0,95**	-0,64**
Met [g/kg]	zu	N-Gehalt	0,91**	0,81**	0,87**

Die mittleren S-Gehalte der Leguminosensamen aus dem Et-Test sind in Tabelle 10 aufgeführt. Es lag in keinem Fall eine signifikante Zunahme der S-Gehalte der Samen bei den Methioninkandidaten im Vergleich zu denen der Kontrollpflanzen vor.

**Tab. 10: Mittlere S-Gehalte [%] in der Trockenmasse von Leguminosensamen aus den verschiedenen Et-Tests**

	n	Kontroll- pflanzen	Methionin- kandidaten	t-Test U-Test
<b><i>Vicia faba</i></b>				
1. Et-Test Hannover	6/6	0,27 ± 0,098	0,23 ± 0,053	n.s.
Et-Test Auswahl <sup>a</sup>	19/19	0,22 ± 0,021	0,22 ± 0,054	n.s.
Et-Test Alle <sup>b</sup>	96/91	0,21 ± 0,025	0,21 ± 0,034	n.s.
<b><i>Lupinus angustifolius</i></b>				
Et-Test Auswahl <sup>a</sup>	25/25	0,5 ± 0,062	0,47 ± 0,063	n.s.
Et-Test Alle <sup>b</sup>	74/96	0,48 ± 0,066	0,47 ± 0,069	n.s.
<b><i>Pisum sativum</i></b>				
Et-Test Auswahl <sup>a</sup>	25/25	0,19 ± 0,017	0,2 ± 0,026	n.s.
Et-Test Alle <sup>b</sup>	91/95	0,2 ± 0,015	0,2 ± 0,021	n.s.

n.s.= nicht signifikant, n.s.:  $p > 0,05$ , \*:  $0,05 > p < 0,01$ , \*\*:  $0,01 > p < 0,001$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

<sup>a</sup>Samen an denen auch Aminosäureanalysen durchgeführt <sup>b</sup>Samen aller Pflanzen die aus dem Et-Test für die Weitervermehrung ausgewählt wurden

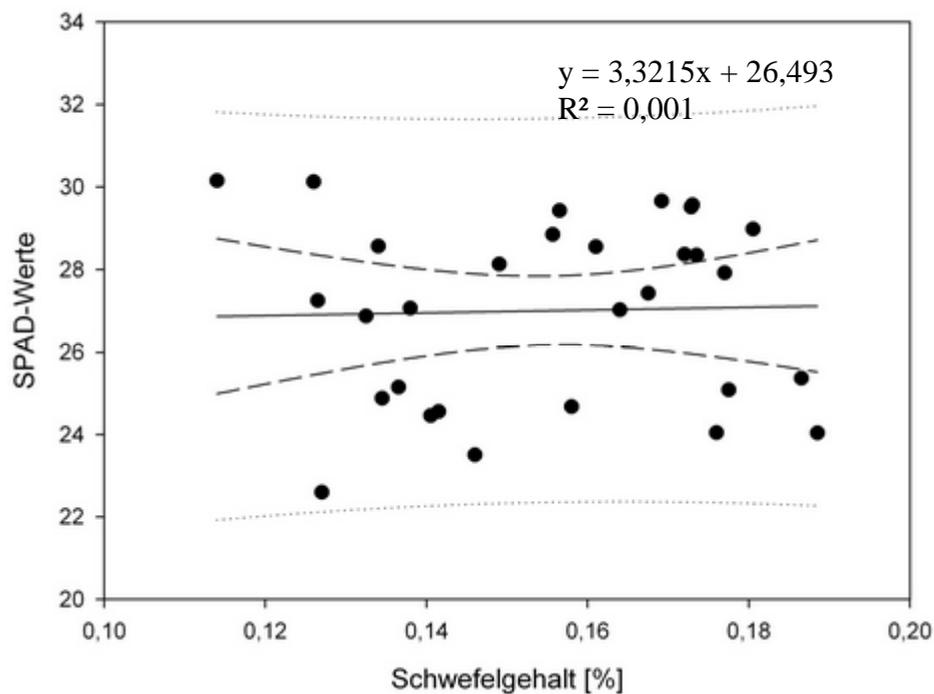
In Tabelle 11 sind Mittelwerte und Spannweiten der S-Aminosäuregehalte der aus dem Et-Test selektierten Pflanzen aufgeführt. Es konnte hierbei lediglich eine signifikante Zunahme des mittleren relativen Methionin- und Cysteingehaltes bei Methioninkandidaten von *L. angustifolius* im Vergleich zu den Kontrollpflanzen festgestellt werden. Bei *P. sativum* und *V. faba* waren gar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden.

**Tab. 11: Unterschiede der mittleren relativen Cystein- und Methioningehalte in den Samen der aus dem Et Test selektierten Pflanzen**

		Methionin (g /16 g N)	Cystein (g /16 g N)
<i>L. angustifolius</i> K: n= 25, M: n=25	<b>K:</b> MW	0,68 ± 0,07	1,68 ± 0,11
	Min - Max	0,57 - 0,82	1,48 - 1,92
	<b>M:</b> MW	0,75 ± 0,08***	1,83 ± 0,13**
	Min - Max	0,55 - 0,87	1,43 - 2,02
<i>V. faba</i> K: n= 19, M: n=19	<b>K:</b> MW	0,73 ± 0,04	1,28 ± 0,1
	Min - Max	0,67 - 0,81	1,1 - 1,44
	<b>M:</b> MW	0,72 ± 0,03	1,25 ± 0,06
	Min - Max	0,67 - 0,76	1,12 - 1,35
<i>P. sativum</i> K: n= 25, M: n=25	<b>K:</b> MW	1 ± 0,08	1,6 ± 0,18
	Min - Max	0,7 - 1,1	0,9 - 1,8
	<b>M:</b> MW	1 ± 0,08	1,5 ± 0,16
	Min - Max	0,8 - 1,1	1,2 - 1,7

K: Kontrolle, M: Methioninkandidaten, MW: Mittelwert; \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$

An *V. faba* Mutanten (VF172) aus Isolierhäusern am Standort Reinshof (Göttingen) wurde eine Selektion nach SPAD-Werten durchgeführt. Auf Basis hoher SPAD-Werte erfolgte eine Selektion von Einzelpflanzen. Das geerntete Saatgut wurde einer CNS-Analyse unterzogen. Der Zusammenhang zwischen SPAD-Werten und dem ermittelten Schwefel-Gehalt der Samen wurde anschließend überprüft (Abb. 40). Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass der Schwefelgehalt im Samen nicht mit dem SPAD-Werten der jüngsten, vollständig entwickelten Blätter korreliert ist.



**Abb. 40: Zusammenhang des S-Gehalts der Samen mit SPAD-Werten der Blätter der EMS-Mutanten von VF172. Je 10 Pflanzen der M2-Generation wurden in Isolierhäusern nach Mutterpflanze sortiert angezogen. SPAD Werte sind Mittelwerte aus Messungen an jeweils 6 Einzelpflanzen (gemessen wurde am jüngsten, vollständig entwickelten Blatt).**

### **3.7 Molekularbiologische Untersuchungen**

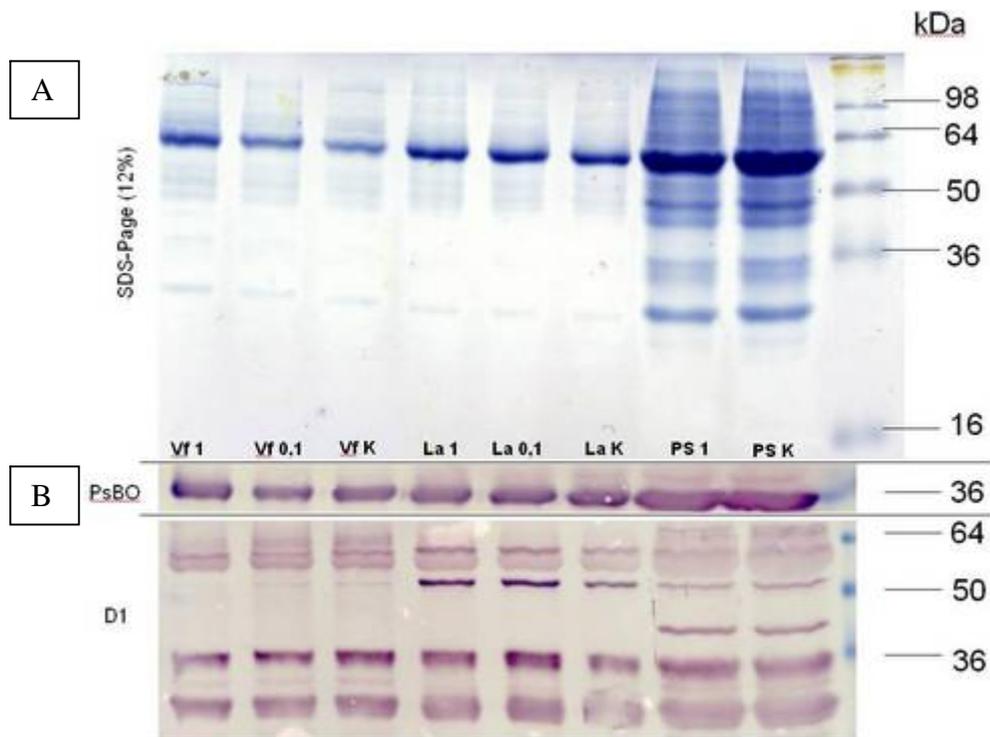
Die molekularbiologischen Experimente wurden angestellt, um einen möglichen regulatorischen Effekt von hohen Methioningehalten auf die Protein- und mRNA-Expression im Blattgewebe der Versuchspflanzen zu untersuchen. Die Untersuchungen erfolgten hierbei als Vergleichsanalyse von Kontrollpflanzen mit Pflanzen, die bei hohen Methionin- bzw. Cysteingehalten im Wachstumsmedium angezogen wurden (1 mM). Da in den Vorversuchen (vgl. Kap. 3.4.2) lediglich für *L. angustifolius* und *V. faba* eine methioninbedingte quantitative Veränderung eines phänotypischen Merkmals (Chlorophyllgehalt) festgestellt werden konnte, wurden die molekularbiologischen Arbeiten mit diesen beiden Arten durchgeführt.

Dabei sollten in erster Linie Erkenntnisse zu regulatorischen Funktionen von Methionin auf den biochemischen Stoffwechsel gesammelt werden. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob es möglich ist spezifische Expressionsmuster methioninreichen Pflanzen zuzuordnen. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Techniken durchgeführt (vgl. Kap. 2.7). Zum einen wurden Proteomuntersuchungen mit der löslichen Proteinfraction durchgeführt, um generelle Veränderungen im Expressionsmuster aufzufinden. Zum anderen wurden einzelne Proteine, bei denen eine methioninbedingte Veränderung in der Expression angenommen wurde, mittels immunologischer Detektionsverfahren semiquantitativ nachgewiesen. Weiterhin wurde das Transkript von Genen semiquantitativ überprüft, bei denen eine Induktion durch hohe Methioningehalte angenommen wurde.

Ausgewählte Proteine, deren Expression sich durch die erhöhte Methioninkonzentration veränderte, wurden mittels MS-Analyse sequenziert.

#### **3.7.1 Immunologischer Proteinnachweis**

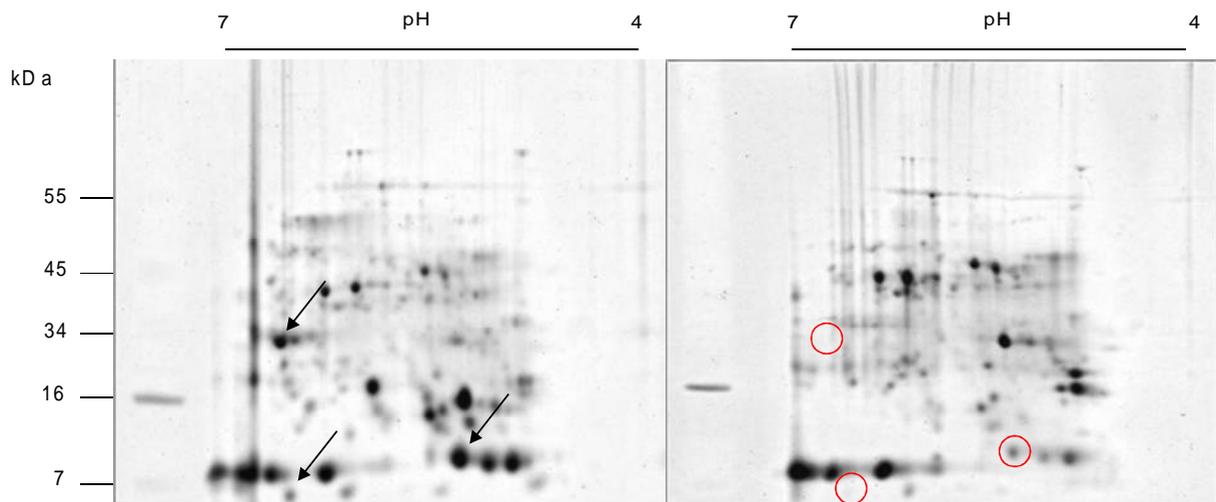
Mittels Western Blot wurden die Expression von Proteinen (D1- und PsBO Protein) des Photosystems II(PSII) untersucht. Diese Proteine haben entscheidende Funktionen im Reaktionszentrum (D1) und wasserspaltenden Enzymkomplex (PsBO) des PSII (Zhang et al. 2000 und De Las Rivas et al. 2007). Es konnten in den Versuchen keine Unterschiede in der Expression der Proteine zwischen Kontrollpflanzen und Pflanzen mit Methioninüberschussbehandlung festgestellt werden (Abb. 41).



**Abb. 41: A: Gesamtprotein aufgetrennt in SDS-Page (12 % Laemmli Gel). B: Immunologischer Proteinnachweis für die PSII assoziierten Proteine D1 und PrBO aus Blattmaterial bei unterschiedlicher Methioninüberschussversorgung der Pflanzen. Pro Spur wurden 5 µg Protein (Ps 15 µg) aufgetragen. La= *Lupinus angustifolius*, Ps= *Pisum sativum* und Vf= *Vicia faba*; K= unbehandelt, 0,1=0,1 mM Methionin; 1=1 mM Methionin. Auf der rechten Spur wurde Seebblue2 Marker (5 µl) aufgetragen.**

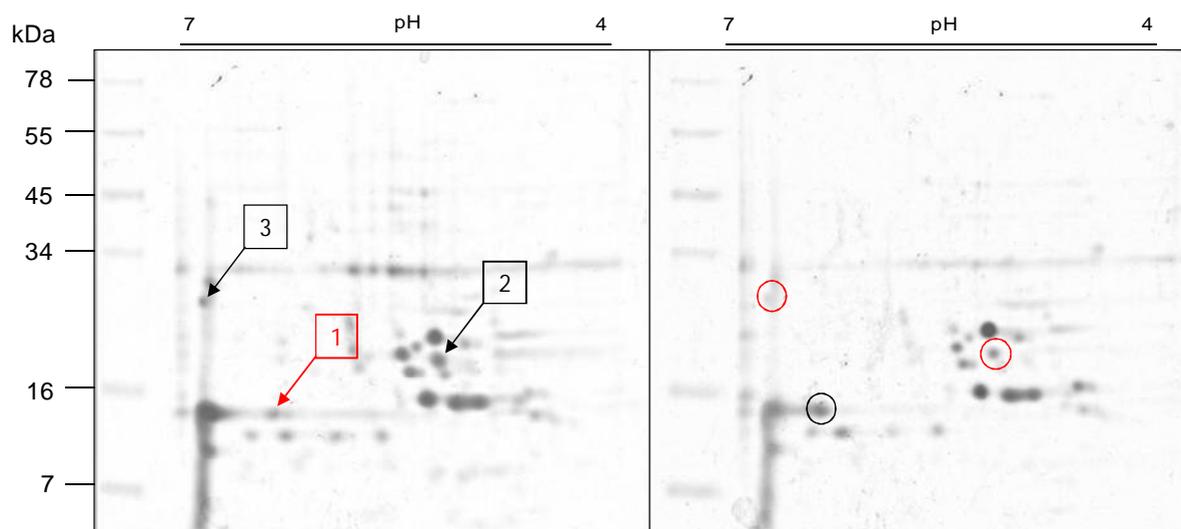
### 3.7.2 Proteomik

Die zweidimensionale Auftrennung des löslichen Proteins ergab eine unterschiedliche Expression der Proteine aus Blattmaterial zwischen den Behandlungen von *V. faba* (Abb. 42). Es konnte eine durch Methionin Behandlung bedingte Herunterregulierung von mehreren Proteinen beobachtet werden. Das Protein-Muster war deckungsgleich.



**Abb. 42:** Lösliche Proteinfraction (200 µg) aus Blättern von *V. faba* Kontrollpflanzen (links) und mit 1 mM Methionin behandelten Pflanzen (rechts). Die Pfeile und Kreis-symbole zeigen ausgewählte, herunterregulierte Proteine.

2D-Gele mit löslichem Protein von *L. angustifolius* wiesen einen vergleichbaren Effekt der Methioninbehandlung auf die Protein-Expression auf (Abb. 43). Eine generelle Abnahme der Spot-Intensität war dabei sichtbar. Jedoch wurden einige Proteinspots auch verstärkt exprimiert. Diese Spots mit erheblich abweichender Expressionsintensivität wurden für die MS-Analyse ausgewählt (Tab. 12). Die Analyse ergab, dass es sich dabei um Rubisco Unter-einheiten und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase handelte.



**Abb. 43:** Lösliche Proteinfraction (ca. 200 µg) aus Blättern von *L. angustifolius* aus Kontrollpflanzen (links) und Methionin behandelten Pflanzen (rechts). Pfeile kenn-zeichnen ausgewählte, herunter-(2 und 3) oder hochregulierte (1) Proteine.

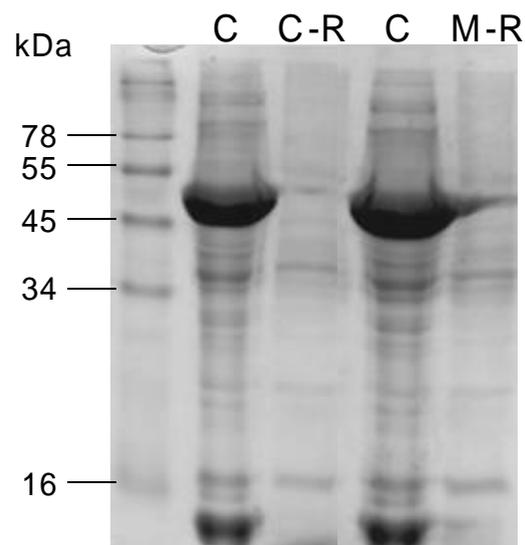
Weiterhin wurde bei der MS-Analyse festgestellt, dass Rubisco Proteine im Gesamtproteinextrakt äußerst abundant waren. Um eine spezifische Analyse der Auswirkungen von Methionin auf andere Proteinspezies zu ermöglichen, wurde der Rubisco Gehalt in der Probe über eine Phytatausfällung reduziert.

**Tab. 12: Massenspektroskopische Analyse ausgewählter, verändert exprimierter Proteine aus der Gesamtproteinfraktion von *L. angustifolius***

No	Accession	Name	Mascot Score	MW [kDa]	SC [%]
1	RBS2_PEA	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3C	221	20.23	24
2	RBL_ALIPL	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	220	43.94	11
3	G3PB_PEA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, Chloroplastidäre Vorstufe	215	48.07	14

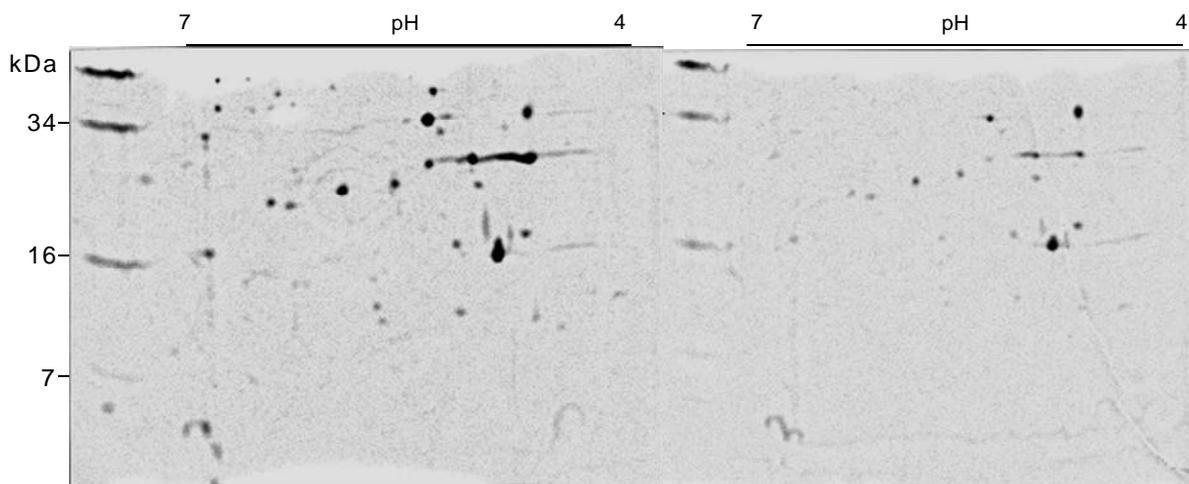
MW=Molekulargewicht; SC=sequence coverage

In Abbildung 44 ist das Ergebnis der Phytatausfällung dargestellt. In den Spuren 2 und 4 wurde dabei die Konzentration der großen und kleinen Untereinheit von Rubisco deutlich sichtbar reduziert (Bande bei 51kDa). Die Protein-Konzentrationen weiterer Proteine wurden durch die Behandlung ebenfalls reduziert. Dabei kam es jedoch zu keiner sichtbaren Veränderung des Proteinmusters.

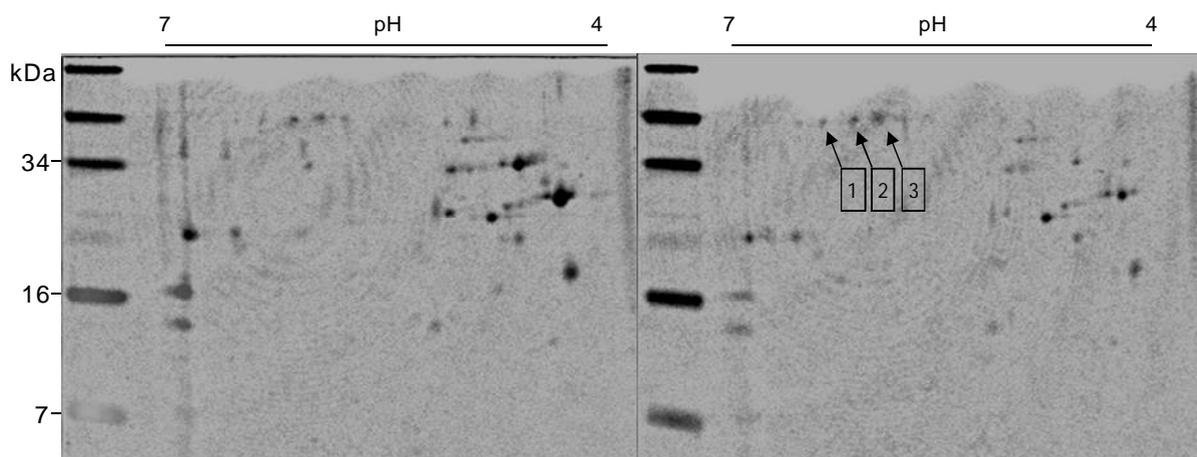


**Abb. 44: SDS-Page (12 %) des löslichen Gesamtproteingehalts (*L. angustifolius*) vor und nach der Fällung von Rubisco Untereinheiten (C=Kontrolle; M=Met behandelte Pflanzen; -R=nach Rubiscoausfällung); linke Spur: Seebblue2 Protein Marker**

Das aus der Fällung resultierende Proteingemisch (C-R, M-R; Abb. 44) wurde für weitere 2D-Gelanalysen genutzt. Abbildung 45 zeigt dazu Gele von Proteinproben von *L. angustifolius*. Das Protein-Muster zwischen den Behandlungen war übereinstimmend. Die Spotintensität bei Methionin behandelten Pflanzen war jedoch deutlich reduziert. Nahezu alle sichtbaren Proteinspots auf den Kontrollgelen waren intensiver ausgeprägt als die äquivalenten Spots der mit Methionin behandelten Pflanzen. Ein vergleichbares Ergebnis wurde mit Proben von *V. faba* erzielt (Abb. 46). Das Muster der Proteinspots wies ebenfalls eine gleichartige Verteilung bei den Behandlungen auf. Es konnten jedoch keine neu exprimierten Proteine, die durch die Methionin-Behandlung induziert wurden, nachgewiesen werden.



**Abb. 45: Lösliche Proteinfraction (150 µg) von *L. angustifolius* Kontrollpflanzen (links) und von Methionin behandelten Pflanzen (rechts) nach dem Entfernen von Rubisco. Die Gelbilder wurden mit einer Geldoc Kamera aufgezeichnet.**



**Abb. 46: Lösliche Proteinfraction (150 µg) von *V. faba* Kontrollpflanzen (links) und Methionin behandelten Pflanzen (rechts) nach dem Entfernen von Rubisco. Die Gelbilder wurden mit einer Geldoc Kamera aufgezeichnet. Für die MS-Analyse ausgewählte Spots wurden mit Ziffern markiert.**

Es konnten für die Methioninbehandlung von *V. faba* Proteinspots mit vergleichsweise erhöhter Intensität identifiziert werden (Abb. 46 rechts). Diese wurden einer MS-Analyse unterzogen und als Phenoloxidasen identifiziert (Tab. 13).

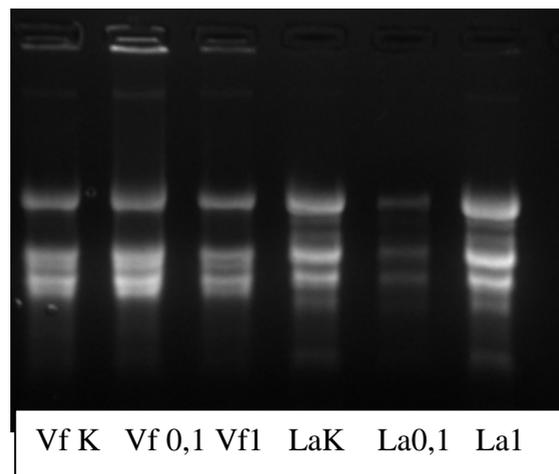
**Tab. 13: Massenspektroskopische Analyse ausgewählter, verändert exprimierter Proteine aus der Gesamtproteinfraktion von *V. faba* nach Ausfällung von Rubisco Untereinheiten**

No	Accession	Name	Mascot Score	MW [kDa]	SC [%]
1	PPO_VICFA	Polyphenol oxidase A1	179	68,50	7,59 %
2	PPO_VICFA	Polyphenol oxidase A1	352	43,94	9,74 %
3	PPO_VICFA	Polyphenol oxidase A1	184	68,50	6,27 %

MW=Molekulargewicht; SC=sequence coverage

### 3.7.3 RNA/DNA Analyse

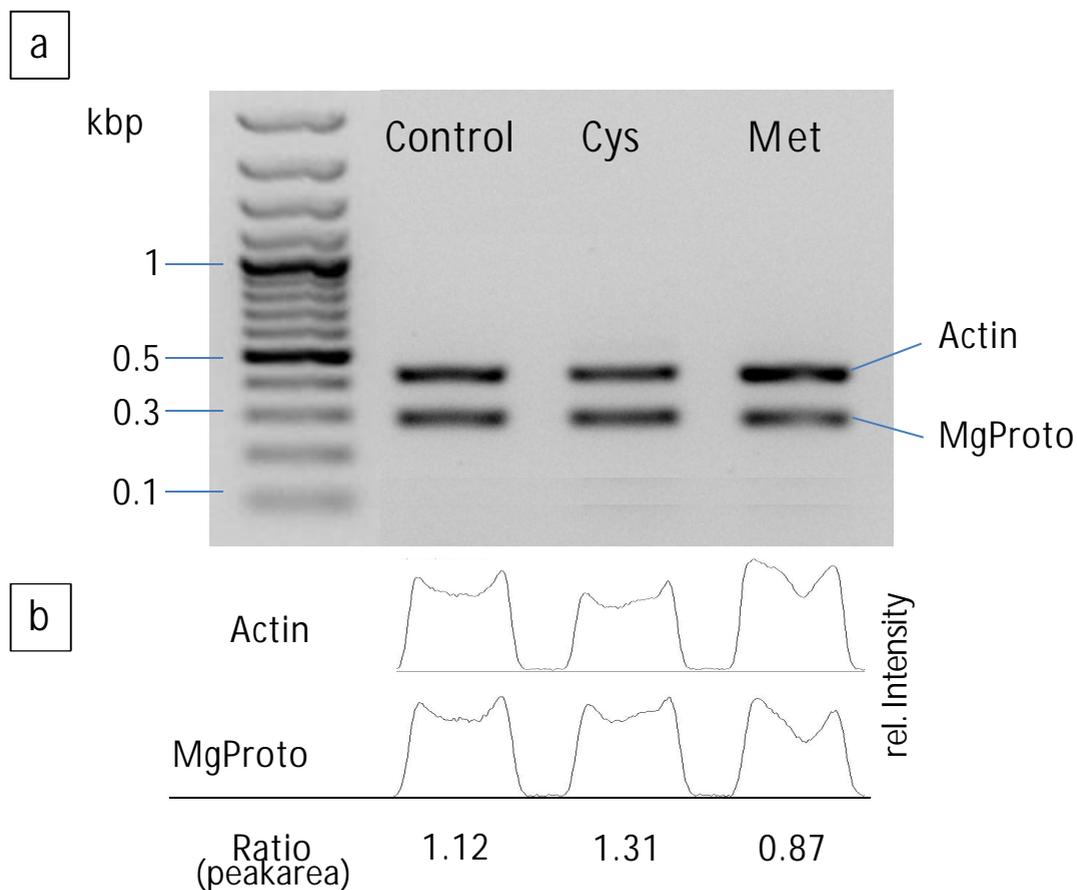
Ein anderer Schwerpunkt der molekularbiologischen Untersuchungen lag auf der semiquantitativen Untersuchung von Gentranskripten für die ein regulatorischer Einfluss erhöhter Methioninkonzentrationen angenommen wurde. Für diese Untersuchungen wurde zunächst die Gesamt-mRNA aus Blattmaterial isoliert (Abb. 47).



**Abb. 47: RNA Extrakte aus Blattmaterial der drei Versuchspflanzenarten. Die ribosomale RNA ist an den 5 Banden erkennbar. Vf=*V. faba*; La= *L. angustifolius*, 0,1; 1=Methioninkonzentration in mM; K=Kontrolle**

Die Expression des methioninabhängigen *S*-adenosyl-L-methionine:magnesium protoporphyrin IX-*O*-methyltransferase (MgProto) (Willows 2003) von *V. faba* wurde mittels semi-quantitativer PCR untersucht (Abb. 48). Ein auf Basis der eingesetzten Primer kalkuliertes Produkt für das Housekeeping-Gen Aktin (421bp) konnte ebenso, wie das für MgProto kalkulierte Produkt (284bp) nachgewiesen werden. Mit Met behandelte Pflanzen wiesen eine geringere Expression von MgProto-Transkripten auf als die Kontrollpflanzen. In diesem Experiment wurde weiterhin der Einfluss einer Cystein-Behandlung der Pflanzen (1 mM) auf die MgProto Expression untersucht. Mit Cystein behandelte Pflanzen wiesen eine höhere Expression von MgProto auf als Kontroll- und mit Methionin behandelte Pflanzen.

Die Durchführung des Versuches mit cDNA aus *L. angustifolius* scheiterte, da kein Genprodukt mit den eingesetzten Primern erzeugt werden konnte.



**Abb. 48: Veränderung der Expression von MgProto bei Methionin- und Cysteinzugabe. Reverse-Transkriptase PCR mit cDNA aus Gesamt-RNA der Blätter von *V. faba* Proben von unbehandelten Pflanzen (Control), mit 1 mM Cystein (Cys) und 1 mM Methionin (Met) behandelten Pflanzen. a: Pro Spur wurde 1 µg PCR-Produkt aufgetragen. b: Quantifizierung der relativen Bandenintensität mittels ImageJ Software.**

## 4 Diskussion

Mit den Forschungsarbeiten sollten Ansätze für die Pflanzenzüchtung erarbeitet werden, mit denen eine Selektion auf Methioninreichtum des Samenproteins bei heimischen Leguminosen (*V. faba*, *P. sativum* und *L. angustifolius*) ermöglicht werden kann. Dazu sollten die Variationsbreite der Gehalte essentieller Aminosäuren im Samenprotein der verschiedenen heimischen Leguminosenarten analysiert, die Eignung der von Imsande (2001) für *G. max* beschriebenen phänotypischen und chemischen Selektionskriterien für die Identifikation methioninreicher Linien auch für genannten Leguminosen geprüft, der Et-Test im Labor zur Auswahl der methioninreichen Linien etabliert werden und darauf aufbauend eine gezielte Selektion methioninreicher Mutanten und Weitervermehrung im Feld bei *V. faba*, *P. sativum* und *L. angustifolius* als Grundlage für die ökologische Vermehrung und Züchtung vorgenommen werden.

Diese Punkte wurden im Forschungsprojekt alle bearbeitet und der wissenschaftliche Stand zur Züchtung auf verbesserte Methioningehalte, die im Projekt verwandten Methoden und die erzielten Ergebnisse in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben.

Im Folgenden wird die Nutzbarkeit der Ergebnisse für die Pflanzenzüchtung und die Bedeutung potentieller Zuchterfolge für die (ökologische) Landwirtschaft diskutiert.

### 4.1. Möglichkeiten der Steigerung der Methioningehalte in Leguminosen durch Pflanzenzucht

Versuche zur Züchtung methioninreicher Leguminosen sind bisher nicht erfolgreich verlaufen bzw. waren nicht Schwerpunkt der Zuchtbemühungen (vgl. Kap. 1.2).

Für den ökologischen Landbau sind hofeigene Futtermittel mit guter Eiweißqualität jedoch unabdingbar. Auch eine Verminderung des Bedarfs an Futtermitteln aus dem Ausland, die möglicherweise mit hohen negativen Umweltfolgen dort produziert wurden (Steinfeld 2006), kann für gezielte Zuchtprogramme auf z. B. verbesserte Eiweißqualität heimischer Futterpflanzen eine wichtige Motivation sein.

Als wesentliches Hindernis für eine erhebliche Aufwertung des S-Aminosäuregehaltes wird in der Literatur die relativ geringe Variationsbreite bei Körnerleguminosen dargestellt. Weiterhin ist ein hoher Methioningehalt in der Regel mit einem geringen Rohproteingehalt korreliert (Monti und Grillo 1983). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Korrelation bestätigt werden (vgl. 3.6).

Die ermittelte Variationsbreite der Methioningehalte des im Projekt seitens der Züchterhäuser bereitgestellten Körnerleguminosensortiments war jedoch hoch. Bei *L. angustifolius* lag die

Sorte mit den höchsten Methioningehalten im Protein 22 % über dem Mittelwert der Gehalte des Sortiments. Auch bei den anderen Kulturen wurden z. T. deutlich überdurchschnittlich hohe Gehalte ermittelt (vgl. 3.1 und Tab. 14). Somit scheint eine erhebliche Verbesserung des Methioningehaltes allein durch die Auswahl vorhandener Genotypen und durch Stabilisierung des Merkmals durch konventionelle Methoden der Pflanzenzüchtung denkbar. Wichtig wäre es in diesem Zusammenhang, eine zuverlässige und günstige Methode zum Screening der Methioningehalte, wie z. B. die NIR-Technologie zu etablieren (vgl. BÖL Vorhaben 2008 – 2010, Fkz: 06OE110: Schwankungen der Inhaltsstoffe in Öko-Futtermitteln: schnelle Bestimmung der Inhaltsstoffe zum sicheren Umgang mit dem Problem, <http://www.bundesprogramm.de/fkz=06OE110>).

**Tab 14: Mittelwert (MW) ± Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwerte der Methioninkonzentrationen in Samen verschiedener Körnerleguminosen. In Klammern positive Abweichung vom Mittelwert der Stichprobe [%].**

	<i>P. sativum</i> n=50	<i>V. faba</i> n=46	<i>L. angustifolius</i> n=46
MW [g/16gN]	1 ± 0,1	0,7 ± 0	0,7 ± 0,1
Min-Max	0,8 - 1,1 (14%)	0,6 - 0,8 (12%)	0,5 - 0,8 (22%)
MW [g/kg i. TM]	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2 ± 0,1
Min-Max	1,9 - 2,8 (24%)	1,9 - 2,3 (17%)	1,8 - 2,4 (16%)

Es ist bekannt, dass die Gehalte S-haltiger Aminosäuren einem erheblichen Standorteinfluss unterliegen und zudem von der S-Versorgung beeinflusst werden (Jansen et al. 2006a, Hawkesford und De Kok 2006, Randall et al. 1979). Der Standorteinfluss auf die Aminosäuregehalte konnte in dieser Studie an *V. faba* ermittelt werden (vgl. Tab. 6). Wobei am Standort mit Trockenstress die Gehalte von Methionin und Cystein im Protein konstant blieben. Die absoluten Gehalte stiegen unter Trockenstressbedingungen an, was jedoch durch die ebenfalls erhöhten Eiweißgehalte erklärt werden kann.

Insgesamt scheinen die Methioningehalte im Protein relativ stabil. Ein Abbau der Methioningehalte wird in der Literatur erst bei akutem S-Mangel beschrieben (Hawkesford und De Kok 2006). Insofern ist anzunehmen, dass die Bandbreiten der Methioningehalte des analysierten Sortiments trotz der Herkunft von zum Teil unterschiedlichen Standorten (vgl. Kap. 2.1) die vorhandene genetische Bandbreite der verschiedenen Pflanzenarten realistisch widerspiegeln.

In den im Folgenden besprochen Ergebnissen zur Eignung der Testmethoden wurden solche potentiellen Standorteffekte jedoch bei der Versuchsanstellung ausgeschlossen.

#### 4.1.1 Steigerung der Methioningehalte nach Mutagenese

Die Methioningehalte sollten durch die Verwendung mutagen behandelter Linien zusätzlich variiert werden. In Tabelle 15 ist zu erkennen, dass nach mutagener Behandlung der Sorten die Variabilität der Methioningehalte gegenüber der des Sortiments bis auf die absoluten Methioningehalte bei *L. angustifolius* und die relativen Gehalte bei *V. faba* leicht erhöht war.

**Tab. 15: Mittelwerte, Standardabweichung (jeweils oben), Bandbreite und Variationskoeffizienten (jeweils unten) der Gehalte an Methionin und Cystein in Samen von Leguminosen als Nachkommen EMS-behandelter Saaten im Vergleich zu den Werten des analysierten Sortiments**

Art/Auswahl	n	Methionin [g/kg]	Cystein [g/kg]	Methionin [g/16gN]	Cystein [g/16gN]
<b><i>V. faba</i></b>					
Sortiment	46	1,9 ± 0,1 1,7 - 2,3 (6,7%)	3 ± 0,3 2,3 - 3,5 (10%)	0,7 ± 0 0,6 - 0,8 (6,1%)	1,1 ± 0,1 0,9 - 1,2 (7,9%)
VF172 (Sortiment) <sup>a</sup>	1	2,3	3,7	0,7	1,2
VF172 (Et-Test)	38	2 ± 0,16 1,7 - 2,3 (7,6%)	3,6 ± 0,27 2,9 - 4,1 (7,4%)	0,7 ± 0,04 0,7 - 0,8 (5%)	1,3 ± 0,08 1,1 - 1,4 (6,4%)
<b><i>L. angustifolius</i></b>					
Sortiment	46	2 ± 0,1 1,8 - 2,4 (6,2%)	4,3 ± 0,4 3,5 - 5,4 (10,4%)	0,7 ± 0,1 0,6 - 0,9 (10,2%)	1,5 ± 0,2 1,2 - 1,9 (11,3%)
Boruta (Sortiment)	10	2,1 ± 0,1 2 - 2,3 (5%)	4,4 ± 0,3 4,1 - 4,8 (5,9%)	0,8 ± 0,1 0,6 - 0,8 (7,1%)	1,6 ± 0,1 1,3 - 1,8 (9,1%)
Boruta (Et-Test)	50	2 ± 0,1 1,8 - 2,2 (5,1%)	4,9 ± 0,4 4,1 - 5,8 (9%)	0,7 ± 0,1 0,6 - 0,9 (10,9%)	1,8 ± 0,1 1,4 - 2 (8,5%)
<b><i>P. sativum</i></b>					
Sortiment	50	2,3 ± 0,2 1,9 - 2,8 (9,9%)	3,2 ± 0,2 2,3 - 3,7 (7,9%)	1 ± 0,1 0,8 - 1,1 (6,9%)	1,4 ± 0,1 1 - 1,6 (10,4%)
Hardy (Sortiment)	1	2,24	3,19	1,02	1,45
Hardy (Et-Test)	50	1,8 ± 0,24 1,4 - 2,5 (13,2%)	2,9 ± 0,33 2,3 - 3,7 (11,6%)	1 ± 0,07 0,7 - 1,1 (7,7%)	1,6 ± 0,17 0,9 - 1,8 (10,7%)

<sup>a</sup>=Probe aus Nachmessung, nicht bei der Bandbreite des Sortiments berücksichtigt

Beim Cysteingehalt der Leguminosensamen konnte nach mutagener Behandlung eine leicht gesteigerte Variabilität des Merkmals gegenüber dem Sortiment nur bei *P. sativum* beobachtet werden. *V. faba* der Inzuchtlinie VF172 wies nach EMS-Behandlung verglichen mit dem Sortiment geringere Variationskoeffizienten beim Cysteingehalt im Samen auf. Bei *L. angustifolius* waren im Sortiment bereits Nachkommen EMS behandelte Pflanzen der Sorte Boruta vorhanden. Hier wiesen die Samen der mutagenisierten Linien, die im Et-Test verwendet wurden höhere Variationskoeffizienten für die Gehalte der Schwefelaminosäuren auf.

Insgesamt betrachtet hatte die Mutagenesebehandlung eine Erhöhung der Bandbreite von Cysteingehalten jedoch weniger der Methioningehalte zur Folge.

Für einen Zuchtfortschritt sind zunächst die Pflanzen mit Maximalwerten für die Selektion besonders interessant. Hier wurden bei den relativen oder absoluten Gehalten beider S-haltigen Aminosäuren in den Samen der mit EMS-behandelten Sorten die Werte des Sortiments meist erreicht oder übertroffen. Unklar bleibt dabei, ob die Schwankungen durch Mutation oder natürliche Unterschiede der Pflanzen zustande kamen. Und es wird deutlich, wie gering die Trefferchance für das Erfassen einer Mutation im Bereich der Aminosäuren in den mit begrenzter Pflanzenzahl durchgeführten Untersuchungen war.

Die Notwendigkeit der Entwicklung von effektiven Screening-Methoden wird durch diese Zusammenstellung noch einmal deutlich.

#### 4.1.2 Bandbreite der Aminosäuregehalte des Leguminosensortiments und Bedeutung für die Landwirtschaft

Die Daten der vorliegenden Studie zur Bandbreite der Aminosäuregehalte von Leguminosen eignen sich insbesondere als Hintergrundwissen zur Entwicklung von Pflanzenzuchtstrategien für die Verbesserung des Futterwertes. Es konnte eine vielversprechende Variation in den Konzentrationen einzelner Aminosäuren in den ausgewählten Leguminosen-Sorten festgestellt werden. Allein durch die Ausschöpfung dieser Bandbreite sind erhebliche Verbesserungen in der Futterqualität für Monogastrier zu erzielen (Abb. 49, Tab. 16).

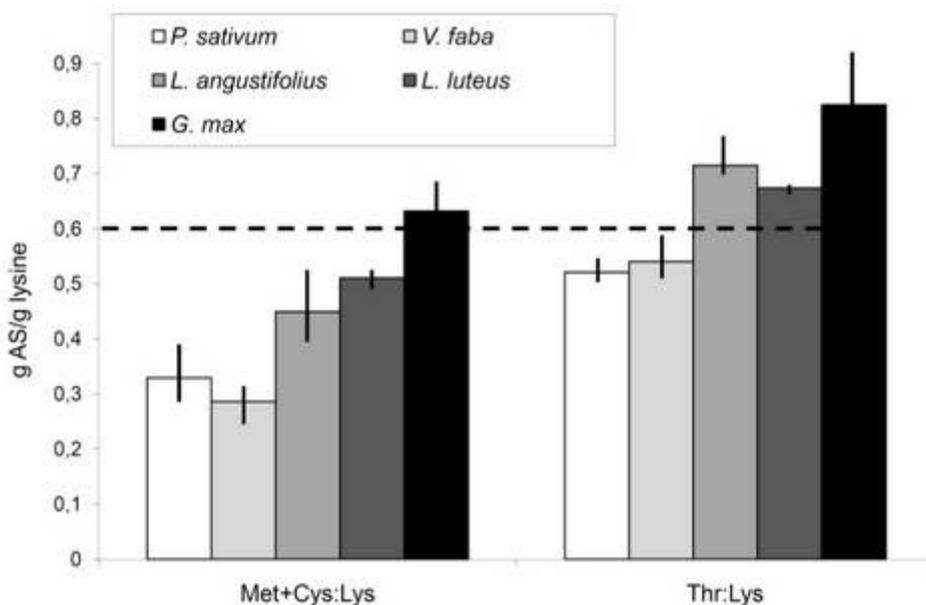
**Tab. 16: Kalkulierte Aminosäurequalität im Samenprotein der drei Versuchspflanzenarten im Bezug zur Zusammensetzung eines idealen Proteins für heranwachsende Schweine (nach Boisen, 1997), 100 = optimaler Gehalt**

Aminosäure		<i>P. sativum</i>	<i>V. faba</i>	<i>L. angustifolius</i>
Lysin	MW	103,7	90,5	69,1
	Min-Max	89,4 - 112,9	82 - 98,8	59,5 - 76,8
Cystein+Methionin	MW	64,9	49,9	59,7
	Min-Max	52,9 - 74,1	40 - 56,6	44,9 - 72,7
Threonin	MW	83,8	75,6	77,4
	Min-Max	75,4 - 92,3	69,3 - 79,8	67,3 - 86,4
Isoleucin	MW	109,1	104,2	106,5
	Min-Max	97,9 - 117,9	96,6 - 108,4	100,2 - 113,8
Leucin	MW	89,7	89,3	87,2
	Min-Max	82 - 96,9	83,2 - 93,4	78,4 - 93,1
Valin	MW	94,6	88,9	80,0
	Min-Max	85,9 - 101,7	84,1 - 92	71,2 - 87,6
Phenylalanin+Tyrosin	MW	105,9	96,2	97,0
	Min-Max	92,5 - 113,6	91,4 - 105,2	91,7 - 104,9

Aus Tabelle 16 wird weiterhin deutlich, dass bei einer entsprechenden Ausschöpfung der im Sortiment vorhandenen Maximalwerte auch erhebliche Qualitätsverbesserungen hinsichtlich des Gehalts anderer essentieller Aminosäuren möglich wären.

In der Tierfütterung kommt es auf ausgewogene Aminosäureverhältnisse in der ganzen Ration an und durch Mischungen von Komponenten mit verschiedenen Qualitäten können Unzulänglichkeiten in gewissen Maße ausgeglichen werden. Die untersuchten Leguminosen wiesen, als Einzelkomponente für die Fütterung betrachtet, hinsichtlich der Verhältnisse von S-Aminosäuren bzw. von Threonin zu Lysin einen deutlichen Lysinüberschuss auf. Das S-Aminosäuren/Lysin Verhältnis lag im Sortiment bei allen Arten deutlich unter dem idealen Quotienten z. B. für die Schweinernährung (Losand 2003, Abb. 49). Wollte man z. B. *P. sativum* als Alleinfuttermittel in der Tierernährung verwenden, wäre nach dem S-Aminosäuren/Lysin-Verhältnis eine Erhöhung des S-Aminosäuregehaltes von bis zu 100 % notwendig (Tabe und Higgins, 1998).

Dagegen wurde im analysierten Sortiment von *V. faba* und *L. angustifolius* innerhalb der vorhandenen Variabilität durchaus das ideale Verhältnis von Threonin zu Lysin von 0,6 erreicht (Abb. 49).



**Abb. 49: Quotient von essentiellen Aminosäuren (S-Aminosäuren und Threonin) und Lysin für verschiedene Leguminosenarten. Die Spannweite des Sortiments wird durch vertikale Linien wiedergegeben. Die gestrichelte Linie gibt ein optimales Verhältnis für heranwachsende Schweine wieder (nach Losand et al. 2003). Werte für *G. max* aus der Literatur entnommen (Zarkadas et al. 2007).**

Eine Steigerung von Methionin und Cystein im Hülsenfruchtanteil um 20 %, ist nach den Ergebnissen des Projekts durch Selektion möglich. Würden diese Werte züchterisch manifestiert werden können, würde dies die Notwendigkeit andere Futterkomponenten zu importieren oder im konventionellen Bereich auch chemisch-synthetisch gewonnene Aminosäuren der Ration beizufügen reduzieren und somit Kosten sparen (Imsande 2001).

Insbesondere für den ökologischen Landbau wäre dies ein wichtiger Schritt, die unzureichende Versorgung mit essentiellen Aminosäuren in der Tierfütterung zu vermindern (Bellof et al. 2005, Zollitsch et al. 2004, Hovi et al. 2003, Sundrum et al. 2000).

#### **4.1.3 Nutzbarkeit der erprobten phänotypischen Selektionskriterien in der Pflanzenzucht**

Die Überprüfung der Selektionskriterien Blattfarbe, Keimwurzellänge in Ethionin und S-Gehalt im Samen zur Identifikation methioninreicher Pflanzen stand im Vordergrund des ersten Projektabschnitts.

In den Vorversuchen konnte ein stimulierender Effekt von induziert erhöhten Methioningehalten auf den Chlorophyllgehalt der Blätter während der vegetativen Wachstumsphase der Pflanzen ermittelt werden. Jedoch konnte ein vergleichbarer Effekt bei *V. faba* auch durch die Applikation von Cystein anstelle von Methionin erzeugt werden (vgl. 3.4.4). In diesen Versuchen wurden zwar ausschließlich SPAD-Messungen durchgeführt, jedoch ist von einer mit der Methode von Lichtenthaler und Buschmann (2001) vergleichbaren Genauigkeit in der Erfassung des Gesamtchlorophyllgehaltes auszugehen (Samsone 2007).

Unter Laborbedingungen und nach Bildbearbeitung waren die Grüntonunterschiede der mit Methionin behandelten Pflanzen auch optisch sichtbar (Abb. 19-21).

In den im Rahmen des Projekts angestellten Feld- und Gewächshausversuchen war es den Projektmitarbeitern an den Standorten der Saatzuchtunternehmen im Feld nicht möglich visuell nach Grünfärbung zu selektieren, da nur marginale Unterschiede zwischen den Einzelpflanzen vorlagen (vgl. 3.4.1).

Der Chlorophyllgehalt der Blätter als exakt ermittelter Messwert erwies sich ebenfalls nicht als ausreichend zuverlässig für die Prognose des Methioningehaltes der Samen. Nur für *L. angustifolius* konnte eine schwach positive Korrelation mit dem absoluten Methioningehalt (g/kg), dagegen eine schwach negative Korrelation mit dem relativen Methioningehalt (g/16g N) ermittelt werden. Für *V. faba* und *P. sativum* lagen hingegen keinerlei Korrelationen zwischen Chlorophyllgehalt und Methioningehalt der Samen vor (vgl. Kap. 3.6).

Als ebenfalls nicht zuverlässig erwies sich in diesem Zusammenhang die Selektion nach SPAD-Werten der Blätter von *V. faba* (vgl. Kap. 3.6, Abb. 40). Es lag keine Korrelation mit dem S-Gehalt in den Samen vor.

Die Selektion nach Grünfärbung- bzw. Chlorophyllkonzentration der Blätter kann daher anhand der vorliegenden Daten und Erfahrungen nicht als geeignet eingestuft werden, um Einzelpflanzen von *L. angustifolius*, *P. sativum* und *V. faba* mit methioninreichen Samen zu identifizieren.

Im Unterschied dazu erwies sich der Et-Test am ehesten als weiterzuverfolgende Selektionsmethode. Zunächst erwies der Test sich als praktikabel in der Umsetzung (vgl. 3.5) und die Methodik wurde im Labor erfolgreich etabliert und dokumentiert. Es konnte dabei mit Ausnahme von *L. angustifolius* für alle Arten ein erhöhtes Wurzellängenwachstum in Ethionin durch induktive Konzentrationserhöhung von Methionin im Samen beobachtet werden.

Bei der praktischen Anwendung des Et-Tests mit mutagenisiertem Samenmaterial im Projekt konnten anhand der Wurzellänge und der Chlorophyllgehalte ausgewählte potentiell methionin- und cysteinreiche Pflanzen aber gerade für *L. angustifolius* identifiziert werden. Für *P. sativum* und *V. faba* gelang dies nicht (vgl. 3.6). Gesteigerte Methioningehalte der Methioninkandidaten im Vergleich zu Kontrollpflanzen (vgl. 3.6) lassen sich vor dem Hintergrund der oben dargestellten fehlenden Zusammenhänge zum Blattgrün vermutlich in erster Linie auf die Selektion im Et-Test zurückführen.

Bei *P. sativum* und *V. faba* war die Selektion nach Wurzellänge problemlos möglich. Bei *L. angustifolius* war eine exakte Längenbestimmung nicht möglich, dennoch war die dann ersatzweise getroffene Auswahl der Pflanzen nach qualitativen Merkmalen (Längenwachstum in Richtung des Ethioninmediums, Krümmung der Wurzelspitze) offensichtlich in gewissem Maße zielführend.

Die S-Analytik stellte ebenfalls ein geeigneteres Selektionskriterium für erhöhte Methioningehalte dar (vgl. Kap. 3.2). So waren die absoluten S-Gehalte (mit Ausnahme von *V. faba*) mit den absoluten Methionin- und S-Aminosäuregehalten korreliert (Tab. 9). Bei *P. sativum* fanden sich hohe absolute S-Gehalte im Korn bei gleichzeitig hohen Methioningehalten verstärkt in der Gruppe der im Et-Test selektierten Pflanzen. Bei *L. angustifolius* und *V. faba* war dies nicht zu beobachten (Abb. 13).

Jedoch waren die relativen Methioningehalte (g/16gN) bei *L. angustifolius* mit dem S-Gehalt negativ korreliert. Bei *P. sativum* und bei *V. faba* fanden sich keine Zusammenhänge (Tab. 9, Abb. 12).

Eine Kombination von Et-Test mit den S-Gehalten der Samen scheint zur Identifikation von Pflanzen mit methioninreichen Samen nach den erzielten Ergebnissen zu *P. sativum* (Abb. 13) derzeit am ehesten aussichtsreich. Für eine Verifizierung würde aber eine erheblich Ausweitung der Probenzahl erforderlich sein.

#### **4.1.4 Potentielle Anwendung der erzielten Ergebnisse der physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen in der Pflanzenzüchtung**

Die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz dienen zur Überprüfung des Einflusses von erhöhten Methioningehalten auf die Photosyntheseleistung der Versuchspflanzen. Dabei konnte kein positiver Einfluss der Methioninbehandlung ermittelt werden. Sämtliche Versuchspflanzen zeigten Stresssymptome ( $F_v/F_m$ -Quotienten  $< 0,8$ ), die vermutlich in erster Linie auf die Anzuchtbedingungen zurückzuführen sind. Auf Basis dieser Erkenntnisse ist eine Identifizierung von potentiell methioninreichen Pflanzen über Messungen der Chlorophyllfluoreszenz nicht möglich.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zu methioninbedingten Veränderungen von Gen- und Proteinexpression im Pflanzenmaterial führten zu keinem eindeutigen Hinweis auf methioninspezifische Expressionsmuster bei den untersuchten Leguminosen. Bei *L. angustifolius* und *V. faba* konnte zwar sowohl in den Proteomikversuchen als auch in Versuchen zur Genexpression ein Effekt der Methioninüberschussbehandlung auf die Expressionsmuster festgestellt werden, ob diese Effekte auf eine regulatorische Funktion des Methionins zurückzuführen sind, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nicht eindeutig beantwortet werden.

Ebenfalls kann über die Ursache der in den Proteomikversuchen beobachteten Verminderung der Konzentration der löslichen Proteinfraction in *L. angustifolius* und *V. faba* in Gegenwart von 1 mM Methionin nur spekuliert werden. Arshad et al. (1992) beobachteten einen leichten Rückgang der Spross- und Wurzel-Biomasse in *Albizia lebbeck* (L.) nach Applikation von hohen Methionindosen (1 g/kg Boden), nicht aber für geringere Konzentrationen. Amir (2010) erwähnt die mögliche toxische Wirkung von hohen Methioninkonzentrationen auf Pflanzen, die als Erklärung für vermindertes Pflanzenwachstum dienen könnte. Um zu beurteilen, ob die beobachtete verminderte Expression von Proteinen (vgl. Kap 3.7) tatsächlich methioninspezifisch ist, sind weitere Experimente erforderlich.

In den Versuchen konnte kein molekularer Zusammenhang zwischen, hohen Methioningehalten (nach Methioninapplikation) und dem Chlorophyllgehalt festgestellt werden. Als wahrscheinlicher Verknüpfungspunkt zwischen dem Methioninstoffwechsel und dem Chlorophyllgehalt wurde hierbei die *S*-adenosyl-L-methionine:magnesium protoporphyrin IX-*O*-methyltransferase untersucht, ein Enzym, das an der Chlorophyllbiosynthese beteiligt ist und *S*-adenosyl-L-methionin als Substrat benötigt (Willows 2003).

Es konnte in den vorliegenden Experimenten jedoch kein stimulierender Effekt erhöhter Methioninkonzentrationen auf die Expression dieses Enzyms festgestellt werden. Hohe Methioninkonzentrationen führten im Gegenteil sogar zu einer Herunterregulation der Gentranskripte (vgl. Kap. 3.7).

Betrachtet man dieses Ergebnis im Zusammenhang mit den Versuchen zum Einfluss von Cystein auf den Blattchlorophyllgehalt (vgl. Kap. 3.4.4) und den Ergebnissen zu den Zusammenhängen zwischen Blattchlorophyllgehalt und Methioningehalt im Samen (vgl. Kap. 3.6), so ist davon auszugehen, dass hohe Methioningehalte keinen spezifischen Einfluss auf die Chlorophyllgehalte der Blätter haben. Vermutlich ist die Zunahme des Blattchlorophyllgehalts in Folge der Methioninzugabe (vgl. 3.4.2) in erster Linie auf eine verbesserte N-Versorgung der Pflanzen zurückzuführen.

Ein verbessertes Verständnis zu regulatorischen Funktionen des Methionin und möglichen phänotypischen Ausprägungen hoher Methioningehalte ist nach wie vor für die Züchtung von Körnerleguminosen von besonderem Interesse. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass sich die von Imsande (2001) postulierten Phänotypen für methioninreiche *G. max* Pflanzen im Verlauf des Projektes als kaum übertragbar auf heimische Körnerleguminosen erwiesen haben, besteht hierbei nach wie vor Forschungsbedarf.

#### **4.2 Vereinbarkeit der im Projekt angewandten Methoden der Pflanzenzucht mit ökologischer Wirtschaftsweise**

Im Forschungsprojekt wurde konventionell erzeugtes Saatgut verwendet, das zum Teil chemisch mutagenisiert wurde. Die im Projekt verwandte Mutationsauslösung mit EMS ist eine der sogenannten „klassischen Pflanzenzüchtungsmethoden“. Bestrahlte oder gentechnisch veränderte Saaten wurden nicht eingesetzt. Auch fanden die Weitervermehrung und der Linien-erhalt im Projekt unter konventioneller Bewirtschaftung statt. Diese Punkte entsprechen nicht dem vom European Consortium for Organic Plant Breeding (ECO-PB, <http://www.eco-pb.com/>) formulierten Ideal ökologischer Pflanzenzüchtung, sind jedoch gängige Praxis. Denn die heute in der ökologischen Landwirtschaft eingesetzten Sorten entstammen zu einem

großen Teil konventionellen Zuchtprogrammen. Auch die Vermehrung und Selektion der Pflanzen in frühen Phasen einer Sortenentwicklung auf ausschließlich ökologischen Flächen entspricht nicht der heute verbreiteten Praxis der Saatzüchter bei der Sortenentwicklung für den ökologischen Landbau. Angesichts der Zielsetzung des Projektes, die Machbarkeit der Selektion auf Methioninreichtum mit Verfahren zu demonstrieren, die für die Sortenentwicklung im ökologischen Landbau akzeptiert werden, war es nicht Ziel führend eine ökologische Bewirtschaftung vorauszusetzen. Die Weitervermehrung der potentiell methioninreichen Pflanzen der EMS-Mutanten im Feld und aus dem Et-Test im Gewächshaus erfolgte im Projekt daher unter konventioneller Bewirtschaftung in Regie der beiden beteiligten Saatzuchtfirmen NPZ und Saatzucht Steinach sowie der Universität Göttingen.

Eine Verschärfung der Regularien für die ökologische Sortenentwicklung ist nach Angaben des ECO-PB (Klaus Peter Wilbois, Fibl, mündl. Mitteilung 2008) aber zunächst nicht zu erwarten, da die Handlungsfähigkeit und Weiterentwicklung der ökologischen Landwirtschaft hinsichtlich der Sortenentwicklung nicht weiter erschwert werden soll. Dies rechtfertigte den Einsatz von EMS mutierten Linien für das Forschungsprojekt.

Jedoch wurde im Projekt gezeigt, dass auch die natürliche Variabilität vermutlich genügend Spielraum bietet, einzelne Aminosäuregehalte gezielt durch Kreuzung zu verbessern (vgl. Tab. 14 und 15). Eine konsequent ökologische Züchtung ohne Anwendung umstrittener Methoden der Mutationsauslösung ist vor diesem Hintergrund erfolgversprechend.

### **4.3 Verknüpfung von phänotypischen Kriterien mit weiterführenden Ansätzen zur Selektion auf methioninreiche Leguminosen**

Es ist anzunehmen, dass phänotypische Unterschiede zwischen methioninreichen und methioninärmeren Pflanzen multifaktoriell begründet sind. Durch einen verbesserten Kenntnisstand über die genetischen Zusammenhänge der Methioninbiosynthese, bzw. die regulatorischen Funktionen von Methionin auf phänotypische Merkmalsausprägungen können solche Unterschiede besser erklärt werden. Die Anwendung zukünftiger markergestützter Selektionsverfahren für methioninreiche heimische Leguminosen ist noch nicht abzusehen. Die in dieser Arbeit anhand des vorliegenden Pflanzenmaterials erarbeiteten ersten grundsätzlichen Zusammenhänge zur Genexpression von Proteinen bei Methioninernährung (vgl. Kap. 3.7) weisen darauf hin, dass ein hoher Gehalt freien, zellulären Methionins über spezifische Genexpressionsmuster identifiziert werden kann.

## 5 Fazit und weiterführende Fragestellungen

Das Ziel der Studie war es herauszufinden, ob Pflanzen mit methioninreichen Samen durch einfache phänotypische und chemische Indikatoren identifiziert werden können. Der S-Gehalt im Samen, der Blattchlorophyllgehalt und die Keimwurzel-Länge in Ethionin von wachsenden Pflanzen wurden als Auswahlkriterien evaluiert.

1. Im Hinblick auf die Heterogenität der S-Aminosäure Gehalte in verschiedenen Körnerleguminosen wurden relative und absolute Methioningehalte von 12-24 % über dem Stichprobenmittelwert gefunden - eine einfache Auswahl von methioninreichen Genotypen könnte zu einer erheblichen Verbesserung der Proteinqualität in ökologischen Futterrationen führen. Die Variabilität des Methioningehalts des Sortiments war im Projekt meist ähnlich wie die einer Sorte nach Mutagenese mit EMS. Somit ist schon bei verfügbaren Sorten/Linien der untersuchten Leguminosen ein beträchtliches Potential für die Selektion auf Methioninreichtum im Samenprotein und die Anwendung klassischer Zuchtmethoden zur Verbesserung des Merkmals vorhanden.
2. Die Merkmale visuelle Blattgrünfärbung oder auch gemessene Chlorophyllgehalte erwiesen sich nicht als geeignet um Leguminosen mit erhöhten Methioningehalten im Samen zu identifizieren.
3. Bei den untersuchten Leguminosen konnte eine positive Korrelation der absoluten S-Aminosäuren mit dem S-Gehalt im Samen festgestellt werden; der Zusammenhang zwischen Methioningehalt und S-Gehalten war vergleichbar, jedoch weniger streng korreliert. Erst die Kombination der Kriterien Wurzellänge im Et-Test und S-Gehalt der Samen könnte als hinreichend genaues Selektionsverfahren dienen, um Pflanzen konsequent für die Züchtung auszuwählen.
4. Die molekularbiologischen Untersuchungen ergaben eine Veränderung der Protein- und Genexpression der Leguminosen als Folge der induziert erhöhten Methioninkonzentrationen in den Pflanzen. Es gelang dabei jedoch nicht methioninspezifische Expressionsveränderungen an einzelnen Genen nachzuweisen. Auch konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Methionin und der Induktion der Chlorophyllbiosynthese gefunden werden. Es konnten somit keine spezifischen Expressionsmuster identifiziert werden, die eindeutig auf hohe Methioningehalte zurückzuführen wären. Als Alternativansatz für zukünftige Züchtungsansätze auf molekularer Ebene wäre der Einsatz von QTL-Markern denkbar. Hierzu wäre jedoch die Phänotypisierung (S-

Aminosäuren-Analyse) eines erweiterten Sortiments von genetisch homogenen Inzuchtlinien notwendig (>50 Linien pro Art).

5. In Anbetracht der gefundenen Heterogenität der indirekten Selektionskriterien (z.B. Wurzellänge in Et-Test, S-Gehalte der Samen) sollten kostengünstige Analyseverfahren für die direkte Analyse von Aminosäuren (bspw. NIR) für das effektive und sichere Screening auf methioninreiche Körnerleguminosen etabliert werden.
6. Bei der Entwicklung eines Bioassays zur Bestimmung der Methioninkonzentration im Samenprotein konnte mit einem methioninauxotrophen *E. coli* Stamm eine positive Korrelation zwischen Methioningehalt im Medium und Bakterienwachstum ermittelt werden. Durch die Transformation der Bakterien mit einer Lumineszenz-vermittelnden Genkassette gelang es die Sensibilität des Verfahrens erheblich zu steigern. Bei der Anwendung des Bioassays am Saatgutlysat konnte die Methioninkonzentration im Samen jedoch nicht hinreichend genau ermittelt werden. Es erscheint dennoch aussichtsreich durch Modifikationen im Versuchsaufbau eine exakte und kostengünstige Quantifizierung der Methioningehalte zu erreichen.
7. Die Identifizierung methioninreicher Pflanzen (ca. 20% erhöhte Met-Gehalte) auf Basis der natürlichen Schwankungsbreite im vorhandenen Sortiment erscheint mit einem kombinierten Selektionsverfahren am ehesten möglich. Als vielversprechend kann hierbei eine Kombination des Et-Tests mit chemischen Analyseverfahren (NIR) betrachtet werden. Voraussetzung für eine erfolgversprechende Selektion ist jedoch ein möglichst umfangreiches Sample. Stückzahlen vergleichbarer Arbeiten wären dabei anzustreben (Imsande 2001: ca. 50000 Pflanzen pro Art). Eine Mutagenese ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht erforderlich, da die damit erzeugte Variabilität des Merkmals Methioninreichtum nicht wesentlich von der vorhandenen Variabilität im Sortiment abweicht.

## **6 Gegenüberstellung von den geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**

In Tabelle 2 sind die geplanten Arbeitsschritte im Projekt aufgeführt. Die Zielerreichung des Projekts wird im Folgenden anhand der durchgeführten Arbeitsschritte eingeordnet. Die Nutzbarkeit und Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse wurden im vorangegangenen Text diskutiert.

**Ziel 1:** *Kenntnis über die Variationsbreite der Gehalte essentieller Aminosäuren im Samenprotein verschiedener heimischer Leguminosenarten als Grundlage für eine weitere Züchtung zu erlangen.*

Ein Saatgutsortiment von jeweils 50 Proben jeder Art wurde seitens der Züchter identifiziert und für die Analysen zur Verfügung gestellt. Die Bandbreite der Aminosäuregehalte Leguminosensortiments wurde im Projekt ermittelt (Tab. 2, Schritt 1.1) und eine Publikation zum Thema eingereicht, zusätzlich wurde am Beispiel von *V. faba* der Standorteinfluss diskutiert (Schumacher et al. 2011a, im Druck).

**Ziel 2:** *Phänotypische Selektionskriterien für methioninreichen Linien bei *V. faba*, *P. sativum* und *L. angustifolius* definieren.*

In den Vorversuchen wurde der Phänotyp bei Methioninüberschuss der Leguminosenarten zu Projektbeginn wie geplant ermittelt (Tab. 2, Schritt 2.1). Zusätzlich wurden direkte Analyseverfahren zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Blätter eingeführt. In Feld und Gewächshaus fand eine Selektion der Pflanzen nach diesen Kriterien statt (Tab. 2, Schritt 2.2 und 4.1). Zwei Publikationen zum Thema wurden erstellt (Schumacher et al. 2009a und 2009b).

Begleitend wurden molekularbiologische Untersuchungen zur Proteinexpression bei Methioninüberschuss durchgeführt (Tab. 2, Schritt 2.3). Diese und andere Projektergebnisse fließen in ein Promotionsvorhaben an der Universität Hannover ein. Zu den molekularbiologischen Arbeiten ist eine weitere Veröffentlichung im Druck (Schumacher et al. 2010).

**Ziel 3:** *Einen Labortest zur Auswahl der methioninreichen Linien etablieren.*

Die Methodik des Et-Tests wurde im Labor erfolgreich etabliert (Tab. 2, Schritt 3.1) und in 2009 an einer größeren Anzahl von Pflanzen in der praktischen Anwendung erprobt (Tab. 2, Schritt 3.2 und 4.2).

Weiterhin wurde die Eignung des S-Gehalts als kostengünstiger Parameter zur Abschätzung des Methioningehaltes von Leguminosensamen anhand des Sortiments und des gewonnenen Ernteguts aus dem Et-Test überprüft (Tab. 2, Schritt 1.2, 1.3). Dazu ist eine erste Veröffentlichung im Druck (Paulsen et al. 2010).

Zudem wurde im Projekt die Entwicklung eines bakteriellen Schnelltests auf methioninreiche Saat als weitere kostengünstige Analysemethode begonnen. Die Messungen lieferten bei den

im Projekt durchgeführten Versuchsdurchgängen noch nicht die erforderliche Genauigkeit. Jedoch ist die Methodik für eine eventuelle Weiterentwicklung des Verfahrens dokumentiert.

**Ziel 4:** *Gezielte Selektion methioninreicher Mutanten und Weitervermehrung im Feld bei V. faba, P. sativum und L. angustifolius als Grundlage für die ökologische Züchtung erproben.*

Die ursprünglich geplante visuelle Bonitur nach Blattgrün erwies sich im Feld nicht als durchführbar. Auch die fehlenden Zusammenhänge zwischen den Messwerten zum Chlorophyllgehalt der Blätter und den Methioningehalten bzw. S-Gehalten der Samen aus dem Projekt wiesen nicht darauf hin, dass Selektionsverfahren zur Grünfärbung sinnvoll anzuwenden seien.

Daher wurde der Schwerpunkt der Arbeiten zu Ziel 4 auf die Möglichkeit der Selektion durch den Et-Test gelegt. Auch hierzu sind erste Ergebnisse als Publikation eingereicht und akzeptiert (Schumacher et al. 2011b).

## 7 Literatur

- AOAC Official Method 990.03. in Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th edition. Volume I Chapter 4. Protein (Crude) in Animal Feed, 18-19.
- Abel H, Sommer W, Weiß J (2002) Inhaltsstoffe, Futterwert und Einsatz von Ackerbohnen in der Nutztierfütterung. UFOP Praxisinfo. [www.ufop.de](http://www.ufop.de).
- Amir R (2010) Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acids*, 39, 4, 917-931.
- Baldi G, Salamini F (1973) Variability of essential aminoacid content in seeds of 22 Phaseolus species. *Theoret Appl Genetics* 43, 75-78.
- Arshad M, Hussain A, Javed M, Frankenberger WT (1993) Effect of soil applied l-methionine on growth, nodulation and chemical-composition of albizia-lebbeck l. *Plant and Soil* 148,1, 129-135.
- Bellof G, Spann B, Weiß J (2004) Inhaltsstoffe, Futterwert und Einsatz von Erbsen in der Nutztierfütterung. UFOP Praxisinfo. [www.ufop.de](http://www.ufop.de).
- Berville A, Kurlovich BS, Heinanen J, Karttuzova, Berantskaya ML, Chmeleva ZV (2003) Plant Genetic Resources Newsletter 134, June 2003, 42-57.
- Boulter D, Evans IM, Thompson A (1976) Screening for protein quality in legumes. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 26, 1, 107-119.
- Boisen, S (1997) Ideal protein - And its suitability to characterize protein quality in pig feeds. A review. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* 47, 31-38.
- De Las Rivas J, Heredia P, Roman A (2007) Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): Bioinformatic and functional analysis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767, 6, 575-582.
- Duranti M, Scarafoni A (1999) Modification of storage protein content and quality in legume seeds. *J. New Seeds* 1, 17-35.
- EG VO 834/2007 Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91
- Gimp 2.6.6; <http://www.gimp.org/> ; zuletzt aufgerufen am 20.10.2010.
- Guimarães E, Ruane J, Scherf B, Sonnino A, Dargie J, Eds. (2007) Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Hawkesford MJ, De Kok LJ (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment* 29, 382-95.
- Hanelt P, Rudolph A, Hammer K, Jank HW, Müntz K, Scholz F (1978) Eiweißuntersuchungen am Getreide- und Leguminosen-Sortiment Gatersleben. *Genetic Resources and Crop Evolution* 26, 2, 183-212. <http://www.springerlink.com/content/tp223627204x65w6>
- Holt NW, Sosulski FW (1979) Amino-acid composition and protein-quality of field peas. *Can J Plant Sci* 59, 653-660.
- Hovi M, Sundrum A, Thamsborg SM (2003) Animal health and welfare in organic livestock production in Europe: current state and future challenges. *Livestock Production Science* 80 (2003) 41-53.
- ImageJ Software (Version 1.43u); <http://rsbweb.nih.gov/ij/>; zuletzt aufgerufen am 10.11.2010.

- Imsande J (2001) Selection of soybean mutants with increased concentrations of seed methionine and cysteine. *Crop Sci.* 41, 415-515.
- Jansen G, Jürgens HU, Flamme W (2006a) Züchterische Bearbeitung von Süßlupinen für den ökologischen Landbau – Qualitätsuntersuchungen im Hinblick auf Futtereignung. [online]: <<http://orgprints.org/11087/1/11087%2D03OE355%2Djki%2Djansen%2D2006%2Dsuesslupinen.pdf>>
- Jansen B, Jürgens HU, Sedding S (2006b) Qualitätsuntersuchung von Süßlupinen im Hinblick auf ihre Eignung als Nahrungs- und Futtermittel. In: Tagungsband Innovationsforum Gewinnung von biofunktionellen Food Ingredients aus Lupinensaaten für die Lebensmittelindustrie, Biotechnikum Greifswald, [online]: <[http://www.produkte-aus-lupine.de/hosting/bcv/website.nsf/urlnames/lup\\_script/\\$file/04\\_Jansen.pdf](http://www.produkte-aus-lupine.de/hosting/bcv/website.nsf/urlnames/lup_script/$file/04_Jansen.pdf)>
- Krishnan HB (2005) Engineering Soybean for Enhanced Sulfur Amino Acid Content *Crop Sci.* 45, 454–461.
- Krishnan HB, Natarajan SS (2009) A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochemistry* 70, 17-18, 1958-1964.
- Kowalenko GJ, van Laerhoven CJ (1997) Total sulfur determination in plant tissue. In: Kalra YP (ed) *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. CRC Press, 93-102.
- Link W, Weber H, Duc G (2005) Genetically increasing seed protein content and quality in faba bean. *Grain Legumes* 44, 18 - 19. [online]: <<<http://www.grainlegumes.com>>>
- Losand B, Dreschel H, Martin J, Piepke A (2003) Nutzung einheimischer Eiweißpflanzen in der Fütterung. *Arch. Tierz., Dummerstorf.* 46, 107-114.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J Biol Chem.* 193, 1, 265-75.
- Mandal S, Mandal R K (2000) Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science* 79, 5, 577-589.
- Marco A, Rubio R, Compano R, Casals I (2002) Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta* 57, 5, 1019-1026.
- Marquard E, Durka W (2005) Auswirkungen des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen auf Umwelt und Gesundheit: Potentielle Schäden und Monitoring. Bericht erstellt im Auftrag des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL). UFZ Leipzig-Halle, [online]: <[http://www.umwelt.sachsen.de/umwelt/download/gentechnikAuswirkungen\\_des\\_Anbaus.pdf](http://www.umwelt.sachsen.de/umwelt/download/gentechnikAuswirkungen_des_Anbaus.pdf)>
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJV (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8393–8398.
- Monti LM, Grillo S (1983) Legume seed improvement for protein content and quality. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 32, 253-266.
- Mosenthin R, Jezierny D, Eklund M (2007) Untersuchungen zur Bestimmung der standardisierten praecaecalen Verdaulichkeit von Protein und Aminosäuren aus Körnerleguminosen. [online]: <[http://www.ufop.de/downloads/Abschlussber\\_Mosenthin.pdf](http://www.ufop.de/downloads/Abschlussber_Mosenthin.pdf)>
- beim Schwein. UFOP-Abschlußbericht. Müntz K, Rudolph A, Hanelt P, Lehmann C, Scholz F (1974) Protein-screening am Weizen- und Ackerbohnen-Sortiment in Gatersleben. *Mitteilungsblatt der Chemischen Gesellschaft der DDR* 21, 9/10, 216.
- Müntz K, Christov V, Saalbach G, Saalbach I, Waddell D, Pickardt T, Schieder O, Wüstenhagen T (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Symposium on Food Proteins: Structural and*

- Functional Aspects of Protein Modification No5, Potsdam , Allemagne (01/09/1997), 42, 3-4, 125-127, [online]: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/>>
- Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK (1996) Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *The New England Journal of Medicine*, 334, 688-692.
- Partridge M, Murphy DJ (2004) Detection of genetically modified soya in a range of organic and health food products: Implications for the accurate labeling of foodstuffs derived from potential GM crops. *British Food Journal*, 106, 3, 166-180.
- Paulsen HM, Schumacher H, Gau A, Sass O, Jürgens HU, Dieterich R (2010) Phenotypic indicators to identify methionine rich European grain legumes and the correlation of grain methionine contents with the sulphur supply. 15th World fertilizer Conference of the International Scientific Centre of Fertilizers (CIEC), Aug 29-Sept 2 2010, Conference Proceedings Bucharest Romania, Publishing House of the Romanian Academy (im Druck).
- Pickering M, Newton P (1990) Amino-acid hydrolysis - old problems – new solutions. *Lc Gc-Magazine of Separation Science* 8, 10, 778-&.
- PRIMER Software (Version 2.2) Scientific & Education Software (Durham, USA).
- Randall PJ, Thomson JA, Schroeder HE (1979) Cotyledonary Storage Proteins in *Pisum-Sativum*. Effects of Sulfur, Phosphorus, Potassium and Magnesium Deficiencies *Australian Journal of Plant Physiology* 6, 11-24.
- Richtlinie 98/64/EG der Kommission vom 3. September 1998 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Aminosäuren, Rohfetten und Olaquinox in Futtermitteln und zur Änderung der Richtlinie 71/393/EWG
- Roth-Maier D, Paulicks BR, Steinhöfel O, Weiß J (2004) Inhaltsstoffe, Futterwert und Einsatz von Lupinen in der Nutztierfütterung. *UFOP Praxisinfo*. [www.ufop.de](http://www.ufop.de).
- Rutherford SM, Schneuwly A, Moughan PJ (2007) Analyzing sulfur amino acids in selected feedstuffs using least-squares nonlinear regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 20, 8019-8024.
- Samsone I, Andersone U, Vikmane M, Ievina B, Pakarna G, Ievinsh G (2007) Nondestructive methods in plant biology: an accurate measurement of chlorophyll content by a chlorophyll meter. *Acta Universitatis Latviensis*, 2007, Vol. 723, Biology, 145–154.
- Schumacher H, Gau AE, Klodmann J, Paulsen HM (2010) Impact of methionine nutrition on the leaf proteome of *Lupinus angustifolius* L. and *Vicia faba* L.. *Landbauforsch vTI SH, Ressortforschung für den ökologischen Landbau* (im Druck).
- Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Sass O, Link W, Dieterich R, Jürgens H-U (2009a) Selection and cultivation of local legumes with methionine enriched seed protein. In: *Collected papers of the first IFOAM International Conference on Organic Animal and Plant Breeding : Breeding Diversity ; August 25-28, 200, Santa Fe, New Mexico/USA, 247-251, CD-ROM*.
- Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE (2009b) Phenotypical indicators for the selection of methionine enriched local legumes in plant breeding. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 4 (59)339-344.
- Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Link W, Jürgens HU, Sass O, Dieterich R (2011a) Seed protein amino acid composition of important local grain legumes *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus* L., *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. *Journal of Plant Breeding* (angenommen Sept. 2010) (im Druck).

- Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Link W, Jürgens HU, Sass O, Dieterich R (2011b) Selektion auf Methioninreichtum im Samen heimischer Körnerleguminosen. 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau (angenommen Nov. 2010).
- Schuster WH, Alkämper J, Marquard R, Stählin A (1998) Leguminosen zur Kornnutzung (Kornleguminosen der Welt). Giessener Beiträge zur Entwicklungsforschung, Reihe II (Monographien) Band 11, 1998. ISBN: 3-924829-31-4.
- Steinberger J (2002) Workshop: Züchtung für den Ökolandbau. Bericht, Bundessortenamt Hannover. <http://orgprints.org/1737/>
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C (2006) Livestock's long shadow. Report 978-92-5-105571-7, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Sundrum A, Butfering L, Henning M, Hoppenbrock KH (2000) Effects of on-farm diets for organic pig production on performance and carcass quality. *J. Anim. Sci.* 2000. 78:1199–1205.
- Tabe L, Higgins TJV (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science* 3: 282-286.
- Tzitzikas EN, Vincken JP, de Groot J, Gruppen H, Visser RGF (2006) Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition. *J Agric Food Chem*, 54, 2, 425-433.
- Sundrum A, Butfering L, Henning M, Hoppenbrock KH (2000) Effects of on-farm diets for organic pig production on performance and carcass quality. *J. Anim. Sci.* 78, 1199-1205.
- Tabe L, Higgins TJV (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science* 3, 282-286.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 9, 4350–4354.
- Wang TL, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA (2003) Can We Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? *Plant Physiology*. 131, 886–891, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
- Willows RD (2003) Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Natural Product Reports* 20, 3, 327-341.
- Zhang LX, Paakkari V, van Wijk KJ, Aro EM (2000) Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: Regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* 12, 9, 1769-1781.
- Zarkadas CG, Gagnon C, Gleddie S, Khanizadeh S, Cober ER, Guillemette RJD (2007) Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. *Food Research International* 40, 129-146.
- Zollitsch W, Baumung R (2004) Protein supply for organic poultry: options and shortcomings. In: Hovi M, Sundrum A, Padels S: 2nd Sustaining Animal Health and Food Safety in Organic Farming (SAFO) Workshop, 25.-27.3.2004, Witzenhausen, Germany, 153-159.
- Zollitsch W, Wlcek S, Leeb T, Baumgartner J (2000) Aspekte der Schweine- und Geflügelfütterung im biologisch wirtschaftenden Betrieb. 27. Viehwirtschaftliche Fachtagung, 6.-8. Juni 2000, Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, A-8952 Irdning.
- Zollitsch W, Kristensen T, Krutzinna C, MacNaeihde F, Younie D (2004) Feeding for Health and Welfare: the Challenge of Formulating Well-balanced Rations in Organic Livestock Production. In: Vaarst M,

Roderick S, Lund V, Lockeretz W (eds.) Animal Health and Welfare in Organic Agriculture. CAB International, 329-356.

## 8 Übersicht über Veröffentlichungen aus dem Projekt

In der Projektlaufzeit wurden folgende Veröffentlichungen verfasst:

Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Sass O, Link W, Dieterich R, Jürgens H-U (2009a) Selection and cultivation of local legumes with methionine enriched seed protein. In: Collected papers of the first IFOAM International Conference on Organic Animal and Plant Breeding : Breeding Diversity ; August 25-28, 2009 ; Santa Fe, New Mexico/USA, 247-251, CD-ROM.

Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE (2009b) Phenotypical indicators for the selection of methionine enriched local legumes in plant breeding. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 4 (59)339-344.

Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Link W, Jürgens HU, Sass O, Dieterich R (2011a) Seed protein amino acid composition of important local grain legumes *Lupinus angustifolius L.*, *Lupinus luteus L.*, *Pisum sativum L.* and *Vicia faba L.* *Journal of Plant Breeding* (angenommen Sept. 2010) (im Druck).

Schumacher H, Gau AE, Klodmann J, Paulsen HM (2010) Impact of methionine nutrition on the leaf proteome of *Lupinus angustifolius L.* and *Vicia faba L.* *Landbauforsch vTI SH, Ressortforschung für den ökologischen Landbau* (im Druck).

Schumacher H, Paulsen HM, Gau AE, Link W, Jürgens HU, Sass O, Dieterich R (2011b) Selektion auf Methioninreichtum im Samen heimischer Körnerleguminosen. 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau (angenommen Nov. 2010).

Paulsen HM, Schumacher H, Gau A, Sass O, Jürgens HU, Dieterich R (2010) Phenotypic indicators to identify methionine rich European grain legumes and the correlation of grain methionine contents with the sulphur supply. 15th World fertilizer Conference of the International Scientific Centre of Fertilizers (CIEC), Aug 29-Sept 2 2010, Conference Proceedings Bucharest Romania, Publishing House of the Romanian Academy (im Druck).

## **Anhang**

**Tabelle Axa: : C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba*.**

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot Nx6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g /16 g N	Asparaginsäure g /16 g N	Glutaminsäure g /16 g N	Serin g /16 g N
Maya/2	3,6	55,9	0,13	22,7	0,59	25,60	1,08	10,01	15,77	4,17
Maya/2	4,7	56,4	0,18	29,3	0,61	28,91	1,12	9,65	15,35	3,99
Merkur/2	3,7	56,7	0,14	23,0	0,61	23,20	1,12	10,37	16,06	4,31
Merkur/2	4,3	56,6	0,17	26,8	0,62	26,83	1,10	10,13	16,26	4,31
Scirocco 06.91742	4,2	56,9	0,14	26,1	0,55	25,36	1,12	10,04	16,24	4,25
Scirocco 06.91742	4,7	57,2	0,17	29,1	0,58	29,30	1,08	9,60	15,53	4,09
Styria_343	4,2	57,1	0,15	26,4	0,57	27,54	1,02	10,25	16,47	4,35
Styria_343	4,5	56,8	0,18	28,1	0,65	30,38	1,06	9,97	15,85	4,19
Alfred/9	4,1	57,1	0,15	25,3	0,59	27,34	1,08	10,26	16,42	4,32
Alfred/9	4,4	56,4	0,17	27,3	0,62	29,40	1,07	9,90	16,01	4,20
Gloria/5	4,2	56,4	0,14	26,1	0,55	27,67	0,91	10,11	16,12	4,32
Gloria/5	4,6	56,5	0,17	28,9	0,57	30,17	0,94	10,18	16,12	4,37
Gobo/1	3,8	56,7	0,14	23,5	0,61	26,00	1,04	10,18	15,97	4,26
Gobo/1	4,3	57,0	0,17	26,6	0,64	27,21	1,14	10,51	16,69	4,35
HerzFreya/22	3,6	56,5	0,15	22,3	0,66	25,67	1,19	10,10	15,97	4,32
HerzFreya/22	4,5	56,3	0,20	28,1	0,71	27,86	1,24	10,18	16,31	4,36
Karna/2	3,5	57,3	0,16	21,7	0,74	22,52	1,19	9,98	15,65	4,26
Karna/2	4,4	56,3	0,16	27,5	0,60	28,23	1,07	10,03	16,13	4,28
L1	3,7	56,0	0,13	23,1	0,56	22,73	1,04	10,40	16,34	4,31
L1	4,0	56,4	0,16	25,1	0,64	26,28	1,07	9,91	15,72	4,22
L2	4,0	56,5	0,13	25,2	0,51	24,59	0,95	10,29	16,49	4,31
L2	4,1	56,6	0,15	25,7	0,60	26,17	1,09	10,47	16,58	4,44
MBead/1	4,0	57,0	0,15	25,2	0,58	27,65	1,12	10,47	16,27	4,34
MBead/1	4,8	57,1	0,19	29,8	0,64	30,45	1,16	10,01	15,63	4,16
Mars/2	3,9	56,7	0,15	24,5	0,63	27,50	1,07	9,98	16,11	4,25
Mars/2	4,6	57,0	0,20	28,8	0,70	30,39	1,13	10,01	15,72	4,16

**Tabelle Axa (Forts.): : C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba*.**

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot Nx6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g /16 g N	Asparaginsäure g /16 g N	Glutaminsäure g /16 g N	Serin g /16 g N
Music/1	3,6	56,7	0,14	22,4	0,64	23,96	1,21	10,44	16,10	4,35
Music/1	4,0	56,1	0,17	25,2	0,69	29,29	1,20	10,37	16,18	4,32
Peleponnes	4,1	57,2	0,17	25,3	0,66	25,73	1,07	10,04	15,85	4,23
Peleponnes	4,2	56,7	0,16	26,2	0,61	29,46	1,05	10,09	16,13	4,27
Pistache/4	3,8	56,2	0,13	23,7	0,56	25,97	0,95	10,04	15,76	4,14
Pistache/4	4,4	56,9	0,16	27,4	0,59	27,08	0,99	10,21	16,34	4,26
Troy/1	3,5	56,6	0,15	22,0	0,69	23,16	1,17	9,56	14,99	4,00
Troy/1	4,1	56,4	0,18	25,4	0,72	27,76	1,19	9,84	15,43	4,07
Viktor/2	4,0	56,5	0,16	25,3	0,64	24,45	1,16	10,34	16,37	4,35
Viktor/2	4,4	56,4	0,18	27,5	0,67	29,36	1,08	9,88	15,63	4,08
Enantia	4,8	56,5	0,20	30,2	0,66	29,96	1,13	10,30	16,21	4,26
Enantia	4,3	56,6	0,23	27,0	0,87	27,91	1,24	10,27	16,29	4,31
ILB938/2	4,4	56,1	0,22	27,3	0,79	28,92	1,11	10,37	16,42	4,34
ILB938/2	4,3	56,8	0,22	26,7	0,82	29,50	1,10	10,02	15,85	4,21
Melodie	3,8	57,0	0,16	24,0	0,66	26,20	1,08	10,81	16,91	4,42
Melodie	4,2	56,8	0,17	26,3	0,64	30,79	0,97	10,43	16,64	4,26
Gloria/5	4,3	56,4	0,17	27,0	0,63	29,16	0,96	10,13	15,89	4,28
Gloria/5	4,6	57,4	0,18	28,9	0,63	31,09	0,86	9,96	15,78	4,20
Alameda	3,8	56,6	0,17	24,0	0,71	25,34	1,11	9,77	15,25	4,06
Alameda	4,3	57,0	0,19	26,9	0,71	25,89	1,15	10,12	15,82	4,27
VF 172	4,6	56,6	0,19	28,9	0,65	28,90	1,15	10,99	18,53	4,70
Bulldog/1	4,1	56,0	0,17	25,5	0,67	28,42	1,05	10,08	15,96	4,17
Bourdon/1	4,3	56,9	0,18	27,0	0,65	28,40	1,21	9,73	15,16	4,06
Cote d´Or/2	4,3	56,7	0,15	26,9	0,56	28,93	1,02	10,11	15,91	4,22
Hiverna/1	4,2	56,3	0,15	26,6	0,55	28,66	1,03	10,25	15,92	4,30

**Tabelle Axb: Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba* .**

<b>Sorte</b>	<b>Histidin g /16 g N</b>	<b>Glycin g /16 g N</b>	<b>Arginin g /16 g N</b>	<b>Threonin g /16 g N</b>	<b>Alanin g /16 g N</b>	<b>Methionin g /16 g N</b>	<b>Prolin g /16 g N</b>	<b>Tyrosin g /16 g N</b>	<b>Valin g /16 g N</b>	<b>Lysin g /16 g N</b>
Maya/2	2,40	4,20	8,40	3,39	3,86	0,74	3,32	3,67	4,53	6,25
Maya/2	2,37	4,17	9,24	3,26	3,73	0,72	3,38	3,66	4,37	5,90
Merkur/2	2,47	4,25	7,80	3,48	3,93	0,74	3,46	3,67	4,69	6,64
Merkur/2	2,51	4,33	8,81	3,43	3,90	0,72	3,62	4,23	4,66	6,43
Scirocco 06.91742	2,52	4,26	8,55	3,56	4,06	0,74	3,51	3,54	4,68	6,28
Scirocco 06.91742	2,40	4,05	9,46	3,29	3,81	0,69	3,49	3,45	4,40	5,74
Styria_343	2,50	4,18	8,90	3,49	3,94	0,69	3,56	3,55	4,68	6,45
Styria_343	2,44	4,10	9,25	3,35	3,83	0,69	3,53	3,30	4,49	6,00
Alfred/9	2,47	4,23	8,59	3,48	3,89	0,69	3,55	3,49	4,70	6,25
Alfred/9	2,43	4,34	9,14	3,36	3,82	0,68	3,54	3,43	4,56	6,04
Gloria/5	2,34	4,02	8,19	3,24	3,72	0,61	3,43	4,08	4,61	6,43
Gloria/5	2,37	4,21	9,53	3,32	3,82	0,62	3,62	3,45	4,65	6,13
Gobo/1	2,44	4,16	8,26	3,42	3,90	0,70	3,46	3,45	4,62	6,40
Gobo/1	2,54	4,26	9,13	3,55	4,02	0,69	3,62	3,70	4,72	6,53
HerzFreya/22	2,48	4,24	8,54	3,49	4,01	0,72	3,57	3,46	4,69	6,48
HerzFreya/22	2,51	4,29	9,06	3,48	4,01	0,71	3,70	3,50	4,69	6,30
Karna/2	2,49	4,30	7,71	3,49	4,02	0,79	3,36	3,53	4,69	6,80
Karna/2	2,49	4,29	9,27	3,39	3,92	0,71	3,57	3,41	4,64	6,34
L1	2,46	4,32	7,76	3,50	4,05	0,76	3,41	3,58	4,73	6,92
L1	2,41	4,26	8,11	3,33	3,92	0,72	3,41	3,32	4,56	6,55
L2	2,45	4,19	7,98	3,43	4,02	0,72	3,42	3,43	4,71	6,79
L2	2,50	4,39	9,02	3,41	4,02	0,75	3,55	3,46	4,77	6,74
MBead/1	2,50	4,22	9,19	3,49	4,00	0,70	3,63	3,53	4,71	6,29
MBead/1	2,44	4,15	10,15	3,35	3,85	0,69	3,60	3,49	4,53	5,92
Mars/2	2,41	4,20	8,77	3,39	3,87	0,68	3,49	3,48	4,60	6,23
Mars/2	2,38	4,12	9,27	3,32	3,83	0,68	3,53	3,43	4,48	5,83

**Tabelle Axb (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba* .**

<b>Sorte</b>	<b>Histidin g /16 g N</b>	<b>Glycin g /16 g N</b>	<b>Arginin g /16 g N</b>	<b>Threonin g /16 g N</b>	<b>Alanin g /16 g N</b>	<b>Methionin g /16 g N</b>	<b>Prolin g /16 g N</b>	<b>Tyrosin g /16 g N</b>	<b>Valin g /16 g N</b>	<b>Lysin g /16 g N</b>
Music/1	2,52	4,24	7,83	3,52	4,08	0,79	3,44	3,51	4,74	6,74
Music/1	2,56	4,29	9,52	3,46	3,99	0,73	3,63	3,53	4,66	6,34
Peleponnes	2,42	4,13	9,05	3,47	3,97	0,72	3,49	3,69	4,72	6,37
Peleponnes	2,45	4,16	9,00	3,40	3,87	0,68	3,55	3,37	4,58	6,17
Pistache/4	2,32	4,08	8,23	3,28	3,83	0,72	3,36	3,40	4,55	6,37
Pistache/4	2,41	4,22	8,93	3,37	3,97	0,73	3,55	3,48	4,66	6,44
Troy/1	2,36	4,22	8,08	3,39	3,92	0,75	3,21	3,42	4,50	6,24
Troy/1	2,39	4,24	8,64	3,36	3,88	0,71	3,53	3,35	4,51	6,02
Viktor/2	2,54	4,34	8,10	3,59	4,12	0,75	3,58	3,70	4,78	6,70
Viktor/2	2,40	4,12	8,73	3,32	3,81	0,70	3,46	3,39	4,45	6,06
Enantia	2,50	4,21	9,35	3,43	3,95	0,76	3,65	3,70	4,68	6,24
Enantia	2,56	4,33	8,85	3,56	4,08	0,79	3,69	3,62	4,77	6,50
ILB938/2	2,45	4,03	9,68	3,39	3,90	0,72	3,58	3,38	4,66	6,41
ILB938/2	2,35	3,93	9,01	3,31	3,80	0,69	3,45	3,47	4,54	6,29
Melodie	2,50	4,21	9,52	3,49	4,00	0,74	3,64	3,49	4,78	6,64
Melodie	2,43	3,99	9,91	3,34	3,81	0,68	3,59	3,44	4,61	6,22
Gloria/5	2,30	3,97	8,62	3,20	3,67	0,63	3,47	3,40	4,57	6,24
Gloria/5	2,26	3,85	8,83	3,12	3,59	0,58	3,41	3,34	4,47	6,05
Alameda	2,32	3,96	8,38	3,31	3,84	0,75	3,31	3,31	4,49	6,24
Alameda	2,45	4,09	8,91	3,46	3,99	0,75	3,52	3,51	4,67	6,40
VF 172	2,61	4,41	11,22	3,63	4,07	0,71	4,09	3,37	4,93	6,91
Bulldog/1	2,44	4,10	9,22	3,45	3,89	0,73	3,53	3,35	4,61	6,01
Bourdon/1	2,38	4,02	8,60	3,31	3,80	0,76	3,41	3,41	4,44	6,09
Cote d´Or/2	2,43	4,07	8,90	3,24	3,70	0,66	3,54	3,39	4,57	6,08
Hiverna/1	2,45	4,01	8,40	3,24	3,77	0,67	3,57	3,39	4,64	6,31

**Tabelle Axc: Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba* .**

<b>Sorte</b>	<b>Isoleucin g /16 g N</b>	<b>Leucin g /16 g N</b>	<b>Phenylalanin g /16 g N</b>	<b>Cyst(e)in g/kg i TS</b>	<b>Asparaginsäure g/kg i TS</b>	<b>Glutaminsäure g/kg i TS</b>	<b>Serin g/kg i TS</b>	<b>Histidin g/kg i TS</b>	<b>Glycin g/kg i TS</b>	<b>Arginin g/kg i TS</b>
Maya/2	4,01	6,83	4,03	2,77	25,64	40,39	10,68	6,14	10,76	21,50
Maya/2	3,87	6,66	3,94	3,24	27,90	44,37	11,55	6,85	12,06	26,71
Merkur/2	4,22	7,21	4,26	2,59	24,06	37,26	9,99	5,74	9,86	18,10
Merkur/2	4,18	7,21	4,15	2,94	27,17	43,63	11,57	6,73	11,62	23,64
Scirocco 06.91742	4,11	7,08	4,14	2,84	25,46	41,17	10,78	6,38	10,81	21,67
Scirocco 06.91742	3,87	6,75	3,90	3,16	28,13	45,50	11,97	7,02	11,87	27,72
Styria_343	4,22	7,34	4,18	2,80	28,22	45,36	11,98	6,88	11,52	24,52
Styria_343	4,06	7,11	4,01	3,21	30,29	48,13	12,73	7,42	12,46	28,10
Alfred/9	4,22	7,24	4,20	2,95	28,05	44,89	11,81	6,76	11,56	23,47
Alfred/9	4,09	7,03	4,07	3,14	29,10	47,06	12,35	7,14	12,77	26,89
Gloria/5	4,32	7,38	4,33	2,53	27,98	44,60	11,96	6,47	11,11	22,68
Gloria/5	4,30	7,41	4,26	2,83	30,72	48,64	13,19	7,15	12,69	28,75
Gobo/1	4,18	7,19	4,18	2,72	26,47	41,54	11,08	6,35	10,81	21,47
Gobo/1	4,25	7,30	4,19	3,11	28,61	45,42	11,84	6,90	11,58	24,84
HerzFreya/22	4,22	7,12	4,15	3,05	25,93	41,00	11,08	6,37	10,89	21,93
HerzFreya/22	4,23	7,20	4,11	3,44	28,37	45,43	12,16	6,99	11,94	25,23
Karna/2	4,19	7,07	4,26	2,67	22,47	35,26	9,59	5,60	9,67	17,37
Karna/2	4,17	7,18	4,15	3,02	28,32	45,53	12,09	7,03	12,11	26,17
L1	4,29	7,31	4,41	2,36	23,65	37,13	9,79	5,60	9,83	17,65
L1	4,15	7,10	4,25	2,81	26,04	41,32	11,09	6,34	11,19	21,32
L2	4,28	7,36	4,37	2,34	25,30	40,55	10,60	6,03	10,30	19,63
L2	4,32	7,44	4,44	2,84	27,40	43,39	11,61	6,54	11,50	23,59
MBead/1	4,25	7,28	4,22	3,10	28,96	45,00	11,99	6,90	11,66	25,42
MBead/1	4,09	7,04	4,05	3,52	30,47	47,58	12,67	7,43	12,63	30,89
Mars/2	4,16	7,07	4,08	2,95	27,45	44,31	11,70	6,62	11,56	24,12
Mars/2	4,03	6,92	3,92	3,43	30,42	47,77	12,63	7,25	12,51	28,17

**Tabelle Axc (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba*.**

Sorte	Isoleucin g /16 g N	Leucin g /16 g N	Phenylalanin g /16 g N	Cyst(e)in g/kg i TS	Asparaginsäure g/kg i TS	Glutaminsäure g/kg i TS	Serin g/kg i TS	Histidin g/kg i TS	Glycin g/kg i TS	Arginin g/kg i TS
Music/1	4,24	7,18	4,29	2,90	25,02	38,57	10,42	6,05	10,16	18,77
Music/1	4,19	7,14	4,19	3,51	30,36	47,37	12,66	7,49	12,56	27,89
Peleponnes	4,21	7,19	4,20	2,76	25,82	40,78	10,88	6,22	10,64	23,28
Peleponnes	4,15	7,19	4,15	3,10	29,71	47,51	12,58	7,23	12,27	26,50
Pistache/4	4,16	7,10	4,18	2,47	26,08	40,94	10,76	6,02	10,59	21,38
Pistache/4	4,25	7,30	4,32	2,68	27,63	44,24	11,54	6,54	11,43	24,18
Troy/1	3,97	6,68	4,02	2,72	22,14	34,71	9,26	5,45	9,77	18,71
Troy/1	4,02	6,85	4,09	3,29	27,32	42,83	11,31	6,63	11,78	24,00
Viktor/2	4,28	7,31	4,30	2,85	25,27	40,01	10,64	6,20	10,62	19,80
Viktor/2	3,98	6,88	3,99	3,18	29,02	45,89	11,99	7,06	12,09	25,62
Enantia	4,21	7,23	4,16	3,38	30,87	48,56	12,78	7,50	12,63	28,02
Enantia	4,26	7,27	4,28	3,47	28,66	45,46	12,04	7,15	12,08	24,69
ILB938/2	4,23	7,22	4,26	3,20	29,99	47,48	12,56	7,08	11,64	27,98
ILB938/2	4,12	7,00	4,16	3,25	29,57	46,76	12,41	6,94	11,60	26,57
Melodie	4,34	7,48	4,37	2,82	28,32	44,30	11,59	6,56	11,03	24,94
Melodie	4,19	7,32	4,20	2,97	32,11	51,25	13,13	7,47	12,29	30,52
Gloria/5	4,30	7,35	4,29	2,81	29,54	46,33	12,48	6,70	11,57	25,15
Gloria/5	4,21	7,24	4,20	2,67	30,96	49,05	13,07	7,02	11,96	27,46
Alameda	4,02	6,85	4,09	2,81	24,77	38,64	10,29	5,89	10,04	21,24
Alameda	4,17	7,17	4,26	2,98	26,20	40,96	11,05	6,33	10,58	23,07
VF 172	4,37	7,46	4,18	3,68	35,09	59,20	15,01	8,35	14,09	35,82
Bulldog/1	4,12	7,10	4,08	2,98	28,65	45,37	11,86	6,93	11,65	26,21
Bourdon/1	4,01	6,86	4,08	3,44	27,64	43,06	11,54	6,75	11,43	24,43
Cote d'Or/2	4,15	7,17	4,15	2,96	29,26	46,03	12,21	7,03	11,78	25,74
Hiverna/1	4,21	7,27	4,30	2,95	29,37	45,62	12,33	7,03	11,50	24,09

**Tabelle Axd: Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba* .**

<b>Sorte</b>	<b>Threonin g/kg i TS</b>	<b>Alanin g/kg i TS</b>	<b>Methionin g/kg i TS</b>	<b>Prolin g/kg i TS</b>	<b>Tyrosin g/kg i TS</b>	<b>Valin g/kg i TS</b>	<b>Lysin g/kg i TS</b>	<b>Isoleucin g/kg i TS</b>	<b>Leucin g/kg i TS</b>	<b>Phenylalanin g/kg i TS</b>
Maya/2	8,68	9,90	1,90	8,50	9,39	11,59	16,01	10,26	17,49	10,32
Maya/2	9,44	10,77	2,09	9,77	10,59	12,65	17,07	11,20	19,25	11,40
Merkur/2	8,07	9,11	1,72	8,02	8,52	10,87	15,40	9,80	16,72	9,88
Merkur/2	9,19	10,47	1,92	9,72	11,35	12,49	17,27	11,21	19,34	11,12
Scirocco 06.91742	9,03	10,31	1,87	8,90	8,96	11,87	15,93	10,41	17,95	10,50
Scirocco 06.91742	9,64	11,17	2,03	10,24	10,11	12,90	16,82	11,33	19,77	11,43
Styria_343	9,61	10,86	1,91	9,80	9,79	12,88	17,76	11,62	20,21	11,50
Styria_343	10,18	11,62	2,09	10,73	10,01	13,65	18,22	12,32	21,59	12,20
Alfred/9	9,53	10,63	1,88	9,71	9,54	12,84	17,08	11,53	19,79	11,49
Alfred/9	9,89	11,22	2,01	10,42	10,08	13,39	17,75	12,02	20,67	11,95
Gloria/5	8,97	10,28	1,69	9,49	11,29	12,75	17,78	11,95	20,41	11,99
Gloria/5	10,02	11,51	1,86	10,92	10,39	14,03	18,48	12,96	22,35	12,87
Gobo/1	8,90	10,15	1,81	9,00	8,97	12,02	16,63	10,88	18,70	10,87
Gobo/1	9,66	10,95	1,88	9,86	10,06	12,85	17,78	11,56	19,86	11,40
HerzFreya/22	8,95	10,29	1,85	9,17	8,88	12,03	16,64	10,83	18,29	10,66
HerzFreya/22	9,70	11,16	1,98	10,31	9,76	13,07	17,55	11,79	20,07	11,45
Karna/2	7,86	9,05	1,78	7,57	7,95	10,57	15,32	9,43	15,92	9,58
Karna/2	9,58	11,07	1,99	10,08	9,62	13,10	17,89	11,76	20,27	11,72
L1	7,96	9,21	1,72	7,75	8,14	10,76	15,72	9,75	16,61	10,02
L1	8,75	10,29	1,90	8,95	8,72	11,98	17,22	10,90	18,65	11,16
L2	8,45	9,88	1,77	8,40	8,44	11,58	16,69	10,52	18,09	10,74
L2	8,93	10,53	1,97	9,30	9,06	12,50	17,64	11,31	19,46	11,63
MBead/1	9,66	11,05	1,93	10,05	9,75	13,02	17,40	11,76	20,12	11,66
MBead/1	10,20	11,71	2,11	10,96	10,64	13,78	18,04	12,47	21,43	12,33
Mars/2	9,31	10,65	1,87	9,60	9,56	12,65	17,12	11,43	19,45	11,22
Mars/2	10,09	11,63	2,06	10,74	10,41	13,63	17,71	12,25	21,02	11,91

**Tabelle Axd (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *V. faba* .**

<b>Sorte</b>	<b>Threonin g/kg i TS</b>	<b>Alanin g/kg i TS</b>	<b>Methionin g/kg i TS</b>	<b>Prolin g/kg i TS</b>	<b>Tyrosin g/kg i TS</b>	<b>Valin g/kg i TS</b>	<b>Lysin g/kg i TS</b>	<b>Isoleucin g/kg i TS</b>	<b>Leucin g/kg i TS</b>	<b>Phenylalanin g/kg i TS</b>
Music/1	8,44	9,77	1,89	8,25	8,40	11,35	16,14	10,17	17,21	10,27
Music/1	10,12	11,68	2,13	10,63	10,33	13,64	18,56	12,26	20,91	12,28
Peleponnes	8,93	10,22	1,85	8,97	9,49	12,14	16,39	10,82	18,51	10,81
Peleponnes	10,02	11,39	2,00	10,46	9,92	13,49	18,18	12,23	21,18	12,24
Pistache/4	8,51	9,95	1,86	8,72	8,83	11,81	16,54	10,82	18,45	10,86
Pistache/4	9,12	10,75	1,98	9,61	9,41	12,63	17,44	11,51	19,76	11,70
Troy/1	7,85	9,09	1,73	7,44	7,92	10,43	14,45	9,20	15,47	9,31
Troy/1	9,32	10,79	1,98	9,80	9,30	12,53	16,71	11,15	19,02	11,35
Viktor/2	8,78	10,06	1,83	8,74	9,05	11,70	16,38	10,46	17,88	10,51
Viktor/2	9,75	11,20	2,05	10,16	9,94	13,06	17,78	11,69	20,20	11,72
Enantia	10,29	11,83	2,26	10,92	11,09	14,03	18,70	12,61	21,67	12,47
Enantia	9,92	11,39	2,21	10,29	10,10	13,33	18,13	11,88	20,28	11,95
ILB938/2	9,80	11,28	2,07	10,36	9,76	13,47	18,54	12,24	20,88	12,31
ILB938/2	9,77	11,20	2,04	10,18	10,24	13,40	18,56	12,15	20,64	12,27
Melodie	9,14	10,48	1,94	9,53	9,15	12,52	17,41	11,36	19,59	11,45
Melodie	10,28	11,74	2,09	11,06	10,59	14,20	19,15	12,90	22,54	12,94
Gloria/5	9,33	10,70	1,84	10,12	9,92	13,32	18,20	12,53	21,42	12,52
Gloria/5	9,70	11,15	1,80	10,59	10,38	13,90	18,82	13,07	22,52	13,05
Alameda	8,39	9,73	1,91	8,38	8,39	11,36	15,82	10,18	17,36	10,36
Alameda	8,95	10,34	1,93	9,12	9,10	12,10	16,56	10,79	18,56	11,02
VF 172	11,60	12,99	2,27	13,05	10,75	15,75	22,07	13,96	23,81	13,35
Bulldog/1	9,79	11,05	2,07	10,03	9,52	13,09	17,09	11,71	20,18	11,59
Bourdon/1	9,41	10,78	2,16	9,68	9,69	12,60	17,31	11,40	19,49	11,58
Cote d´Or/2	9,39	10,72	1,90	10,23	9,80	13,22	17,59	12,01	20,75	11,99
Hiverna/1	9,28	10,79	1,93	10,22	9,71	13,31	18,09	12,06	20,84	12,31

**Tabelle Aya: C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot Nx6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g /16 g N	Asparaginsäure g /16 g N	Glutaminsäure g /16 g N	Serin g /16 g N
Hardy	3,2	56,5	0,20	20,0	1,01	21,91	1,45	10,89	16,31	4,32
Gregor	3,3	56,7	0,18	20,8	0,86	22,48	1,42	11,15	16,69	4,41
Konto	3,8	57,0	0,18	23,6	0,74	22,74	1,34	10,94	17,18	4,44
Madonna	3,5	56,9	0,15	22,0	0,69	22,83	1,21	10,91	16,97	4,37
Mascara	3,8	56,7	0,20	23,9	0,83	23,49	1,39	10,99	16,84	4,40
Harnas	3,4	56,7	0,14	21,5	0,67	22,77	1,20	11,08	17,23	4,41
Santana	3,7	56,5	0,20	23,3	0,85	23,28	1,34	11,27	17,21	4,50
Macrinas	3,1	61,7	0,14	19,5	0,73	22,50	1,34	10,83	16,75	4,43
Kleopatra	3,1	56,9	0,18	19,2	0,93	21,08	1,49	11,61	17,20	4,54
Rocket	3,1	56,9	0,21	19,3	1,06	20,29	1,54	11,46	17,01	4,55
Starter	3,5	59,5	0,18	21,9	0,82	22,50	1,33	11,10	16,89	4,35
Samanga	3,0	61,1	0,20	19,0	1,03	21,71	1,48	11,37	17,28	4,46
Lumina	3,3	56,7	0,20	20,3	0,97	22,90	1,47	11,35	16,43	4,32
Jerry	3,4	57,0	0,15	21,0	0,69	22,86	1,32	11,08	17,12	4,45
Livia	3,7	57,0	0,22	23,2	0,95	21,83	1,45	11,32	16,95	4,45
Apollo	3,6	56,8	0,16	22,5	0,73	23,55	1,34	11,06	16,73	4,33
Bilbo	3,3	57,3	0,17	20,6	0,83	23,57	1,37	10,44	15,71	4,10
Princess	3,6	56,9	0,21	22,7	0,94	24,55	1,47	11,10	16,52	4,25
Kabuki	3,5	56,6	0,21	21,7	0,95	23,75	1,49	10,92	16,51	4,23
Kahuna	3,5	56,6	0,20	21,6	0,93	21,98	1,55	10,94	16,40	4,24
Zero 4	3,2	62,6	0,16	19,9	0,80	22,33	1,39	10,82	16,23	4,28
Cracker Jack	3,4	62,5	0,16	21,1	0,76	23,44	1,33	10,72	16,72	4,21
Genki	4,0	62,7	0,21	24,8	0,84	25,26	1,09	10,86	16,60	4,22
Rose	3,1	63,1	0,20	19,5	1,03	21,21	1,54	11,71	16,91	4,53

**Tabelle Aya (Forts.): : C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot Nx6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g /16 g N	Asparaginsäure g /16 g N	Glutaminsäure g /16 g N	Serin g /16 g N
Livioletta	3,7	63,9	0,13	23,1	0,57	22,30	1,01	11,46	17,09	4,26
Florida	3,4	55,9	0,20	20,9	0,93	22,49	1,51	11,15	16,74	4,42
Akoja	4,3	56,2	0,18	26,8	0,68	29,08	1,07	10,67	15,96	3,93
Dolores	3,9	56,3	0,16	24,4	0,67	25,82	1,16	11,03	16,98	4,15
Miami	2,8	56,6	0,17	17,6	0,99	19,21	1,61	11,17	16,70	4,44
Bohatyr	3,0	55,7	0,18	18,7	0,95	21,07	1,43	11,71	17,24	4,54
Solara	3,5	55,7	0,21	21,6	0,98	23,21	1,41	11,42	16,45	4,31
Arvika	4,0	56,8	0,21	24,8	0,83	25,86	1,30	11,53	16,52	4,19
Progreta	3,9	56,3	0,22	24,3	0,89	25,22	1,33	11,13	16,15	4,11
Imposant	3,6	56,9	0,22	22,8	0,98	22,63	1,46	11,26	16,75	4,26
Whero	3,7	57,0	0,20	23,3	0,85	23,96	1,23	11,60	16,37	4,19
Nitouche	3,7	57,3	0,23	23,0	1,00	22,65	1,38	11,07	16,46	4,31
Cooper	4,0	58,4	0,20	25,0	0,80	24,58	1,49	11,28	16,71	4,33
Facima	3,8	59,1	0,21	23,7	0,90	25,38	1,34	11,36	16,41	4,23
Juwel	4,7	56,9	0,25	29,1	0,88	26,60	1,28	11,57	17,87	4,59
Monamy	4,3	59,7	0,25	27,0	0,92	26,00	1,25	11,63	16,79	4,63
Kerstin	3,6	62,1	0,21	22,5	0,95	22,69	1,47	10,87	16,05	4,42
Birgit	4,4	57,4	0,20	27,3	0,73	24,87	1,37	10,89	15,96	4,36
Regina	5,0	57,9	0,20	31,5	0,64	29,31	1,05	10,03	15,25	3,89
Maxigolt	4,7	57,2	0,21	29,4	0,71	28,56	1,16	11,06	15,96	4,28
Rani	4,1	57,5	0,19	25,6	0,75	25,75	1,20	10,45	16,00	4,26
Ranka	5,6	62,8	0,21	35,1	0,58	26,11	1,27	11,15	16,18	4,43
Dagor	3,7	59,6	0,19	23,0	0,84	22,10	1,37	11,13	15,74	4,42
02 H 145 ZC	3,2	58,9	0,18	20,0	0,92	19,11	1,47	11,14	16,61	4,38
99 H 100 A	3,0	56,6	0,14	18,7	0,75	18,01	1,54	11,81	17,12	4,60

**Tabelle Ayb: Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

<b>Sorte</b>	<b>Histidin g /16 g N</b>	<b>Glycin g /16 g N</b>	<b>Arginin g /16 g N</b>	<b>Threonin g /16 g N</b>	<b>Alanin g /16 g N</b>	<b>Methionin g /16 g N</b>	<b>Prolin g /16 g N</b>	<b>Tyrosin g /16 g N</b>	<b>Valin g /16 g N</b>	<b>Lysin g /16 g N</b>
Hardy	2,37	4,36	8,11	3,77	4,31	1,02	3,56	3,51	4,90	7,19
Gregor	2,42	4,39	8,64	3,74	4,35	1,00	3,64	3,52	4,93	7,29
Konto	2,43	4,40	8,43	3,75	4,28	0,99	3,65	3,58	4,96	7,53
Madonna	2,34	4,24	8,86	3,66	4,21	0,94	3,46	3,49	4,88	7,20
Mascara	2,42	4,35	8,77	3,71	4,36	0,98	3,64	3,51	4,94	7,40
Harnas	2,36	4,27	8,23	3,74	4,23	0,96	3,55	3,56	4,96	7,40
Santana	2,45	4,36	8,84	3,80	4,41	0,96	3,70	3,67	5,02	7,30
Macrinas	2,38	4,31	8,30	3,70	4,31	0,99	3,63	3,56	4,95	7,33
Kleopatra	2,47	4,52	8,14	3,89	4,45	1,05	3,66	3,80	5,12	7,67
Rocket	2,40	4,48	7,55	3,93	4,50	1,05	3,61	3,77	5,14	7,73
Starter	2,38	4,32	8,61	3,66	4,28	0,95	3,52	3,60	4,92	7,26
Samanga	2,50	4,55	7,99	3,93	4,50	1,06	3,61	3,71	5,07	7,58
Lumina	2,42	4,38	8,45	3,74	4,28	1,01	3,50	3,61	4,90	7,28
Jerry	2,43	4,43	8,73	3,79	4,32	0,93	3,50	3,62	4,98	7,40
Livia	2,42	4,42	8,60	3,77	4,35	0,99	3,59	3,66	4,98	7,53
Apollo	2,40	4,37	8,15	3,71	4,33	0,95	3,53	3,63	4,90	7,19
Bilbo	2,27	4,18	8,94	3,50	4,15	0,95	3,38	3,45	4,67	6,93
Princess	2,43	4,40	8,19	3,73	4,28	0,98	3,56	3,61	4,89	7,05
Kabuki	2,44	4,41	8,25	3,74	4,38	0,99	3,55	3,57	4,89	6,99
Kahuna	2,44	4,45	8,01	3,80	4,39	1,02	3,51	3,58	4,95	7,10
Zero 4	2,32	4,29	8,50	3,65	4,19	0,92	3,48	3,55	4,82	7,08
Cracker Jack	2,30	4,12	9,33	3,56	4,16	0,89	3,41	3,46	4,84	6,93
Genki	2,32	4,16	9,00	3,54	4,23	0,81	3,45	3,52	4,71	6,98
Rose	2,41	4,40	7,75	3,83	4,36	1,06	3,59	3,81	4,99	7,49

**Tabelle Ayb (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

<b>Sorte</b>	<b>Histidin g /16 g N</b>	<b>Glycin g /16 g N</b>	<b>Arginin g /16 g N</b>	<b>Threonin g /16 g N</b>	<b>Alanin g /16 g N</b>	<b>Methionin g /16 g N</b>	<b>Prolin g /16 g N</b>	<b>Tyrosin g /16 g N</b>	<b>Valin g /16 g N</b>	<b>Lysin g /16 g N</b>
Livioletta	2,35	4,23	8,92	3,77	4,29	0,91	3,31	3,57	4,87	7,07
Florida	2,51	4,46	8,35	3,84	4,40	0,99	3,66	3,75	4,99	7,20
Akoja	2,31	3,95	10,94	3,39	4,16	0,84	3,27	3,27	4,47	6,26
Dolores	2,44	4,07	9,79	3,44	4,07	0,88	3,39	3,32	4,67	6,70
Miami	2,44	4,57	7,64	3,88	4,56	1,06	3,54	3,80	5,05	7,37
Bohatyr	2,37	4,41	7,82	3,80	4,36	0,96	3,60	3,74	5,02	7,54
Solara	2,39	4,38	8,30	3,77	4,29	0,97	3,54	3,67	4,85	7,01
Arvika	2,38	4,19	9,15	3,60	4,18	0,92	3,46	3,51	4,71	6,78
Progreta	2,29	4,13	9,55	3,58	4,35	0,95	3,35	3,33	4,68	6,79
Imposant	2,46	4,45	8,52	3,88	4,51	1,03	3,52	3,60	4,95	7,10
Whero	2,30	4,13	8,95	3,55	4,21	0,88	3,39	3,50	4,68	6,86
Nitouche	2,34	4,30	8,32	3,71	4,28	0,94	3,45	3,52	4,88	7,09
Cooper	2,38	4,21	8,94	3,66	4,26	0,90	3,57	3,59	4,84	7,06
Facima	2,36	4,16	9,06	3,59	4,16	0,87	3,48	3,56	4,77	6,98
Juwel	2,48	4,65	11,67	4,01	4,88	1,07	4,24	3,82	5,29	7,56
Monamy	2,38	4,53	7,64	4,09	4,65	0,98	3,67	3,82	5,23	7,90
Kerstin	2,38	4,70	7,22	4,12	4,69	1,10	3,53	3,73	5,09	7,59
Birgit	2,36	4,56	8,04	4,07	4,78	1,09	3,50	3,73	5,07	7,53
Regina	2,16	4,05	11,10	3,56	4,54	0,97	3,27	3,19	4,56	6,66
Maxigolt	2,28	4,34	8,29	3,88	4,49	0,98	3,44	3,61	4,91	7,28
Rani	2,26	4,35	8,15	3,78	4,52	1,02	3,41	3,67	4,84	7,53
Ranka	2,34	4,53	7,81	3,97	4,61	1,04	3,53	3,80	5,02	7,77
Dagor	2,30	4,65	7,04	4,15	4,71	1,12	3,44	3,85	5,12	7,90
02 H 145 ZC	2,41	4,55	7,92	3,94	4,47	0,99	3,40	3,70	4,97	7,56
99 H 100 A	2,47	4,63	7,36	4,15	4,64	1,06	3,46	3,98	5,20	7,88

**Tabelle Ayc: Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

Sorte	Isoleucin g /16 g N	Leucin g /16 g N	Phenylalanin g /16 g N	Cyst(e)in g/kg i TS	Asparaginsäure g/kg i TS	Glutaminsäure g/kg i TS	Serin g/kg i TS	Histidin g/kg i TS	Glycin g/kg i TS	Arginin g/kg i TS
Hardy	4,36	7,08	4,90	3,19	23,86	35,73	9,47	5,20	9,55	17,76
Gregor	4,35	7,16	4,89	3,20	25,07	37,52	9,91	5,45	9,87	19,43
Konto	4,43	7,30	5,02	3,04	24,88	39,05	10,09	5,52	10,00	19,16
Madonna	4,37	7,24	4,88	2,75	24,91	38,74	9,97	5,34	9,68	20,23
Mascara	4,41	7,25	4,97	3,26	25,81	39,55	10,33	5,69	10,23	20,61
Harnas	4,45	7,39	5,01	2,73	25,23	39,23	10,05	5,37	9,73	18,74
Santana	4,47	7,38	5,00	3,12	26,24	40,07	10,47	5,71	10,16	20,59
Macrinas	4,42	7,27	5,00	3,01	24,37	37,68	9,98	5,35	9,70	18,68
Kleopatra	4,61	7,48	5,22	3,15	24,48	36,25	9,57	5,20	9,54	17,16
Rocket	4,63	7,54	5,27	3,12	23,25	34,53	9,23	4,87	9,09	15,32
Starter	4,43	7,27	4,96	2,99	24,97	38,02	9,79	5,35	9,71	19,39
Samanga	4,49	7,37	5,02	3,21	24,68	37,51	9,67	5,43	9,87	17,35
Lumina	4,30	7,03	4,84	3,36	26,00	37,62	9,88	5,54	10,04	19,36
Jerry	4,43	7,30	5,07	3,02	25,32	39,14	10,18	5,56	10,13	19,95
Livia	4,46	7,24	5,05	3,17	24,71	36,99	9,72	5,29	9,65	18,77
Apollo	4,38	7,16	4,90	3,15	26,04	39,41	10,20	5,66	10,29	19,20
Bilbo	4,13	6,75	4,65	3,23	24,60	37,03	9,65	5,35	9,84	21,07
Princess	4,31	6,98	4,80	3,61	27,26	40,55	10,45	5,97	10,80	20,11
Kabuki	4,29	6,98	4,72	3,53	25,94	39,20	10,06	5,78	10,48	19,58
Kahuna	4,30	6,98	4,74	3,41	24,05	36,04	9,31	5,36	9,77	17,60
Zero 4	4,42	7,13	4,93	3,10	24,16	36,25	9,55	5,17	9,58	19,00
Cracker Jack	4,30	7,15	4,81	3,12	25,13	39,19	9,88	5,40	9,66	21,86
Genki	4,22	7,04	4,69	2,76	27,44	41,93	10,65	5,87	10,51	22,73
Rose	4,54	7,39	5,12	3,26	24,84	35,87	9,60	5,12	9,34	16,43

**Tabelle Ayc (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

Sorte	Isoleucin g /16 g N	Leucin g /16 g N	Phenylalanin g /16 g N	Cyst(e)in g/kg i TS	Asparaginsäure g/kg i TS	Glutaminsäure g/kg i TS	Serin g/kg i TS	Histidin g/kg i TS	Glycin g/kg i TS	Arginin g/kg i TS
Livioletta	4,30	7,27	4,67	2,25	25,55	38,12	9,50	5,25	9,44	19,90
Florida	4,41	7,16	4,94	3,40	25,06	37,65	9,95	5,64	10,04	18,77
Akoja	3,91	6,61	4,24	3,11	31,03	46,41	11,44	6,72	11,50	31,81
Dolores	4,05	6,99	4,37	3,00	28,48	43,84	10,72	6,29	10,51	25,29
Miami	4,47	7,23	5,04	3,09	21,47	32,08	8,54	4,69	8,78	14,68
Bohatyr	4,62	7,59	5,24	3,01	24,68	36,31	9,56	4,98	9,30	16,47
Solara	4,27	7,03	4,84	3,27	26,51	38,17	10,01	5,54	10,16	19,27
Arvika	4,17	6,91	4,58	3,36	29,81	42,71	10,83	6,17	10,83	23,67
Progreta	4,10	6,83	4,51	3,36	28,08	40,72	10,37	5,77	10,42	24,10
Imposant	4,30	6,99	4,73	3,31	25,48	37,91	9,64	5,57	10,07	19,27
Whero	4,25	6,90	4,74	2,96	27,79	39,23	10,03	5,51	9,90	21,45
Nitouche	4,32	7,08	4,81	3,13	25,08	37,30	9,77	5,30	9,75	18,85
Cooper	4,34	7,20	4,92	3,66	27,72	41,08	10,63	5,85	10,35	21,97
Facima	4,23	7,05	4,68	3,40	28,83	41,65	10,73	5,99	10,57	23,00
Juwel	4,63	7,75	5,15	3,40	30,77	47,55	12,21	6,59	12,37	31,04
Monamy	4,71	7,73	5,27	3,24	30,25	43,65	12,04	6,18	11,78	19,87
Kerstin	4,44	7,29	4,89	3,33	24,66	36,41	10,03	5,41	10,66	16,38
Birgit	4,42	7,22	4,88	3,41	27,08	39,71	10,85	5,88	11,35	20,00
Regina	3,93	6,56	4,22	3,09	29,40	44,69	11,40	6,33	11,86	32,53
Maxigolt	4,36	7,26	4,84	3,30	31,59	45,57	12,24	6,51	12,40	23,68
Rani	4,20	6,97	4,62	3,08	26,90	41,19	10,96	5,82	11,19	20,98
Ranka	4,44	7,35	4,92	3,32	29,12	42,24	11,56	6,12	11,82	20,39
Dagor	4,50	7,36	4,96	3,02	24,61	34,79	9,77	5,08	10,28	15,55
02 H 145 ZC	4,30	7,11	4,80	2,81	21,28	31,74	8,37	4,60	8,70	15,14
99 H 100 A	4,58	7,44	5,02	2,78	21,27	30,84	8,29	4,46	8,34	13,26

**Tabelle Ayd: Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

Sorte	Threonin g/kg i TS	Alanin g/kg i TS	Methionin g/kg i TS	Prolin g/kg i TS	Tyrosin g/kg i TS	Valin g/kg i TS	Lysin g/kg i TS	Isoleucin g/kg i TS	Leucin g/kg i TS	Phenylalanin g/kg i TS
Hardy	8,26	9,45	2,24	7,79	7,69	10,73	15,76	9,54	15,52	10,74
Gregor	8,41	9,79	2,24	8,19	7,92	11,07	16,39	9,79	16,10	10,99
Konto	8,51	9,73	2,25	8,31	8,14	11,28	17,12	10,08	16,59	11,42
Madonna	8,36	9,62	2,14	7,90	7,96	11,14	16,43	9,99	16,52	11,15
Mascara	8,71	10,23	2,31	8,55	8,25	11,60	17,40	10,36	17,04	11,67
Harnas	8,51	9,64	2,18	8,08	8,11	11,28	16,85	10,14	16,84	11,40
Santana	8,86	10,27	2,23	8,62	8,55	11,69	17,00	10,40	17,18	11,63
Macrinas	8,32	9,70	2,22	8,16	8,01	11,14	16,49	9,95	16,35	11,25
Kleopatra	8,21	9,38	2,21	7,73	8,00	10,80	16,16	9,71	15,78	11,00
Rocket	7,98	9,13	2,12	7,32	7,66	10,44	15,68	9,40	15,31	10,69
Starter	8,23	9,62	2,15	7,91	8,11	11,08	16,35	9,96	16,36	11,16
Samanga	8,52	9,77	2,30	7,83	8,04	11,00	16,46	9,75	16,00	10,89
Lumina	8,57	9,81	2,32	8,02	8,27	11,22	16,66	9,85	16,11	11,07
Jerry	8,66	9,87	2,13	8,00	8,27	11,37	16,92	10,13	16,69	11,60
Livia	8,22	9,50	2,15	7,83	8,00	10,87	16,45	9,73	15,81	11,03
Apollo	8,74	10,19	2,23	8,32	8,56	11,55	16,94	10,32	16,87	11,55
Bilbo	8,24	9,78	2,25	7,96	8,12	11,01	16,33	9,73	15,90	10,97
Princess	9,15	10,50	2,40	8,75	8,87	12,01	17,31	10,57	17,14	11,79
Kabuki	8,88	10,40	2,35	8,44	8,48	11,61	16,61	10,19	16,57	11,20
Kahuna	8,35	9,64	2,23	7,71	7,87	10,88	15,60	9,44	15,34	10,41
Zero 4	8,14	9,37	2,06	7,76	7,92	10,77	15,81	9,87	15,92	11,01
Cracker Jack	8,35	9,75	2,09	7,98	8,12	11,35	16,25	10,07	16,75	11,27
Genki	8,95	10,68	2,05	8,71	8,89	11,90	17,64	10,65	17,79	11,84
Rose	8,12	9,24	2,26	7,61	8,09	10,59	15,88	9,62	15,67	10,87

**Tabelle Ayd (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *P. sativum*.**

<b>Sorte</b>	<b>Threonin g/kg i TS</b>	<b>Alanin g/kg i TS</b>	<b>Methionin g/kg i TS</b>	<b>Prolin g/kg i TS</b>	<b>Tyrosin g/kg i TS</b>	<b>Valin g/kg i TS</b>	<b>Lysin g/kg i TS</b>	<b>Isoleucin g/kg i TS</b>	<b>Leucin g/kg i TS</b>	<b>Phenylalanin g/kg i TS</b>
Livioletta	8,40	9,57	2,03	7,39	7,97	10,86	15,77	9,58	16,20	10,40
Florida	8,64	9,90	2,22	8,23	8,44	11,22	16,19	9,91	16,11	11,11
Akoja	9,86	12,09	2,44	9,50	9,50	12,99	18,19	11,38	19,23	12,33
Dolores	8,87	10,51	2,27	8,76	8,57	12,07	17,30	10,46	18,05	11,28
Miami	7,46	8,77	2,03	6,81	7,30	9,70	14,16	8,59	13,88	9,68
Bohatyr	8,01	9,18	2,02	7,59	7,87	10,58	15,89	9,73	15,99	11,03
Solara	8,74	9,96	2,25	8,23	8,52	11,26	16,27	9,91	16,33	11,24
Arvika	9,32	10,80	2,39	8,96	9,08	12,18	17,54	10,79	17,88	11,85
Progreta	9,03	10,98	2,40	8,45	8,39	11,80	17,13	10,33	17,22	11,38
Imposant	8,78	10,20	2,34	7,96	8,16	11,21	16,07	9,73	15,82	10,70
Whero	8,50	10,08	2,10	8,13	8,39	11,22	16,43	10,19	16,54	11,37
Nitouche	8,40	9,70	2,12	7,81	7,98	11,04	16,05	9,79	16,04	10,90
Cooper	9,00	10,46	2,22	8,77	8,82	11,89	17,36	10,68	17,69	12,09
Facima	9,12	10,56	2,21	8,82	9,04	12,11	17,72	10,74	17,88	11,87
Juwel	10,66	12,98	2,83	11,27	10,17	14,07	20,12	12,33	20,62	13,70
Monamy	10,65	12,08	2,56	9,55	9,92	13,59	20,54	12,26	20,11	13,71
Kerstin	9,35	10,65	2,49	8,00	8,47	11,55	17,23	10,07	16,53	11,10
Birgit	10,13	11,89	2,71	8,71	9,27	12,61	18,72	10,99	17,97	12,13
Regina	10,44	13,32	2,84	9,57	9,34	13,37	19,51	11,52	19,22	12,36
Maxigolt	11,09	12,82	2,80	9,82	10,30	14,02	20,78	12,46	20,74	13,82
Rani	9,73	11,64	2,63	8,77	9,45	12,46	19,39	10,81	17,95	11,90
Ranka	10,36	12,05	2,73	9,21	9,91	13,12	20,28	11,60	19,20	12,84
Dagor	9,18	10,41	2,47	7,60	8,51	11,32	17,45	9,94	16,26	10,96
02 H 145 ZC	7,52	8,53	1,89	6,50	7,06	9,50	14,43	8,21	13,59	9,18
99 H 100 A	7,48	8,35	1,90	6,22	7,17	9,36	14,20	8,24	13,41	9,04

Tabelle Aza: C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot N x6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g/16 g N	Asparaginsäure g/16 g N	Glutaminsäure g/16 g N	Serin g/16 g N
SUR	5,1	57,9	0,29	32,02	0,89	28,17	1,43	9,61	20,52	4,40
Chartschowj	4,9	59,5	0,27	30,56	0,88	29,49	1,31	9,70	20,97	4,52
Mirtan	4,1	58,7	0,22	25,77	0,85	25,88	1,36	10,05	21,19	4,79
Metel	4,7	58,7	0,30	29,38	1,01	28,13	1,48	9,62	20,78	4,50
SCH-DG-36	4,6	58,7	0,29	29,02	1,00	28,28	1,46	9,67	21,15	4,60
WDS	4,3	58,7	0,26	27,13	0,95	27,09	1,38	9,94	21,15	4,69
UF2-53	4,4	58,6	0,29	27,33	1,06	26,28	1,58	9,59	21,15	4,55
PRH 841/06	4,9	58,6	0,23	30,77	0,75	32,92	1,38	9,54	21,19	4,33
PRH 202/05	5,4	58,6	0,26	34,01	0,77	34,87	1,20	9,43	20,91	4,36
R 54/00	4,8	58,8	0,22	30,18	0,74	31,83	1,30	9,96	21,37	4,57
Belara	5,0	59,5	0,21	31,53	0,66	29,74	1,21	9,92	19,97	4,48
Myallie	5,7	59,0	0,24	35,33	0,67	34,85	1,16	9,81	21,06	4,52
Bo 10556 ( <i>L. luteus</i> )	6,9	58,2	0,43	43,30	1,00	44,71	1,72	9,23	21,62	4,34
Bo 10551 ( <i>L. luteus</i> )	6,9	58,2	0,44	42,89	1,02	42,68	1,90	9,09	21,63	4,37
Bo 10529 ( <i>L. luteus</i> )	7,8	62,0	0,49	48,48	1,00	44,93	1,80	9,06	21,50	4,31
Bo 32421 ( <i>L. luteus</i> )	6,8	58,1	0,40	42,30	0,95	44,71	1,80	9,24	21,75	4,41
BGE 023639	5,2	59,0	0,24	32,79	0,73	33,62	1,23	8,80	19,57	4,26
BGE 007278	4,9	58,5	0,27	30,84	0,86	29,91	1,31	9,20	20,35	4,33
LUP 154/80	4,4	58,6	0,29	27,43	1,06	28,07	1,43	9,29	21,18	4,46
27254	5,8	59,5	0,24	36,14	0,67	36,81	1,10	9,08	21,17	4,34
27054	4,6	58,8	0,25	28,70	0,89	28,68	1,36	9,95	21,55	4,72
28806	4,3	59,1	0,23	27,01	0,86	27,18	1,45	9,44	19,76	4,43
PI 255473	4,5	58,3	0,30	28,37	1,05	29,43	1,37	9,18	20,87	4,40
PI 289162	4,7	59,4	0,29	29,42	0,97	28,87	1,43	9,08	20,73	4,38
PI 476379	4,5	58,3	0,31	28,02	1,09	28,39	1,56	9,10	20,79	4,39

Tabelle Aza (Forts.): : C-,N-, S- und Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.

Sorte	Mittelwert N%	C%	S%	Rohprot Nx6,25	S g/16g N	Rohprotein [%] i TS	Cyst(e)in g /16 g N	Asparaginsäure g /16 g N	Glutaminsäure g /16 g N	Serin g /16 g N
Dianella 1	5,2	58,7	0,30	32,77	0,90	31,45	1,26	9,19	20,76	4,36
28502	4,2	58,1	0,34	26,51	1,28	27,43	1,40	9,64	20,03	4,52
Bo 7212	4,9	59,0	0,28	30,42	0,91	30,21	1,52	9,60	21,78	4,53
Bo 3542	4,3	58,6	0,31	26,57	1,16	24,26	1,70	9,55	21,04	4,62
Borweta	5,1	59,6	0,33	32,14	1,02	30,47	1,59	9,58	21,91	4,66
Borweta	4,6	58,9	0,32	29,03	1,11	31,46	1,63	9,55	22,19	4,62
Borweta	5,6	59,6	0,38	35,27	1,09	35,07	1,53	9,09	21,71	4,43
Borweta	5,7	59,1	0,31	35,39	0,87	33,99	1,30	9,28	21,44	4,65
Borweta	4,5	59,4	0,28	28,25	0,98	27,64	1,54	9,31	20,53	4,56
Borweta	5,9	59,9	0,30	36,68	0,82	31,85	1,30	9,22	21,09	4,64
Borweta	5,5	59,4	0,34	34,29	0,98	33,21	1,54	9,20	21,39	4,55
Borweta	4,8	59,4	0,30	30,03	1,00	28,89	1,50	10,11	22,40	4,77
Borweta	5,1	59,0	0,34	31,75	1,08	30,15	1,61	9,53	21,58	4,54
Borweta	5,9	59,2	0,35	36,98	0,95	36,80	1,47	9,03	21,27	4,27
Borweta	5,6	58,0	0,34	35,11	0,97	35,71	1,46	9,18	21,85	4,39
Boruta	4,5	60,0	0,29	28,34	1,01	26,72	1,54	9,69	21,09	4,64
Boruta	5,3	58,9	0,33	33,34	0,99	30,40	1,59	9,58	20,52	4,45
Boruta	5,2	60,0	0,32	32,57	0,98	32,21	1,43	9,28	20,00	4,36
Boruta	4,0	59,5	0,26	24,79	1,05	25,14	1,70	10,11	20,75	4,66
Boruta	4,3	59,4	0,29	27,00	1,09	25,26	1,66	9,83	20,39	4,60
Boruta	4,6	59,3	0,32	29,00	1,09	25,44	1,74	9,76	21,14	4,61
Boruta	3,9	59,1	0,28	24,18	1,15	25,89	1,64	9,65	20,53	4,51
Boruta	4,5	58,8	0,32	27,82	1,16	26,45	1,70	9,47	20,49	4,49
Boruta	3,9	60,8	0,27	24,57	1,09	26,04	1,82	9,75	21,08	4,58
Boruta	5,0	59,6	0,25	31,21	0,80	30,87	1,33	9,39	20,47	4,39
Lup succulentus	6,1	61,2	0,41	38,42	1,07	34,76	1,89	9,43	21,29	4,50

**Tabelle Azb: Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Histidin g /16 g N	Glycin g /16 g N	Arginin g /16 g N	Threonin g /16 g N	Alanin g /16 g N	Methionin g /16 g N	Prolin g /16 g N	Tyrosin g /16 g N	Valin g /16 g N	Lysin g /16 g N
SUR	2,79	4,40	9,76	3,79	3,67	0,76	4,06	3,71	4,42	4,99
Chartschowy	2,75	4,20	10,10	3,60	3,49	0,66	4,05	3,74	4,29	4,85
Mirtan	2,82	4,36	10,08	3,76	3,67	0,70	4,19	4,10	4,45	5,06
Metel	2,78	4,25	10,07	3,65	3,53	0,71	4,01	3,59	4,31	4,91
SCH-DG-36	2,70	4,13	9,81	3,50	3,44	0,67	4,00	3,82	4,20	4,78
WDS	2,76	4,28	10,10	3,62	3,59	0,69	4,06	3,90	4,32	4,99
UF2-53	2,75	4,26	9,89	3,61	3,58	0,72	3,87	3,80	4,23	5,11
PRH 841/06	2,77	4,28	10,36	3,60	3,51	0,68	3,93	3,74	4,20	4,94
PRH 202/05	2,54	4,00	10,51	3,31	3,24	0,61	3,83	3,62	3,95	4,68
R 54/00	2,65	4,20	10,44	3,52	3,46	0,67	4,09	3,92	4,21	4,81
Belara	2,80	4,36	9,69	3,80	3,68	0,73	4,12	3,96	4,47	5,04
Myallie	2,58	4,05	10,60	3,41	3,31	0,60	4,00	3,98	4,06	4,57
Bo 10556 ( <i>L. luteus</i> )	2,63	3,82	10,44	3,24	3,15	0,65	3,72	3,44	3,72	4,81
Bo 10551 ( <i>L. luteus</i> )	2,66	3,90	10,17	3,31	3,19	0,70	3,47	3,33	3,76	4,93
Bo 10529 ( <i>L. luteus</i> )	2,63	3,82	10,33	3,21	3,12	0,65	3,45	3,38	3,68	4,80
Bo 32421 ( <i>L. luteus</i> )	2,69	3,92	10,70	3,30	3,20	0,66	3,56	3,47	3,80	4,89
BGE 023639	2,49	3,92	9,62	3,23	3,07	0,60	3,49	3,49	3,86	4,32
BGE 007278	2,54	4,02	9,64	3,33	3,28	0,65	3,50	3,63	3,99	4,62
LUP 154/80	2,62	4,07	9,79	3,37	3,32	0,68	3,54	3,69	4,08	4,75
27254	2,44	3,74	10,82	3,03	2,92	0,51	3,59	3,56	3,70	4,17
27054	2,75	4,29	10,39	3,56	3,49	0,68	3,76	3,95	4,29	4,95
28806	2,81	4,30	9,48	3,67	3,58	0,75	3,59	3,77	4,38	5,06
PI 255473	2,58	4,03	9,90	3,31	3,24	0,66	3,50	3,66	3,99	4,71
PI 289162	2,55	3,96	9,65	3,27	3,20	0,66	3,48	3,58	3,94	4,58
PI 476379	2,56	4,01	9,40	3,32	3,25	0,70	3,44	3,65	3,97	4,68

**Tabelle Azb (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Histidin g /16 g N	Glycin g /16 g N	Arginin g /16 g N	Threonin g /16 g N	Alanin g /16 g N	Methionin g /16 g N	Prolin g /16 g N	Tyrosin g /16 g N	Valin g /16 g N	Lysin g /16 g N
Dianella 1	2,50	4,03	9,98	3,28	3,19	0,62	3,55	3,55	3,92	4,55
28502	2,67	4,26	9,75	3,60	3,52	0,77	3,60	4,02	4,32	5,01
Bo 7212	2,79	4,41	10,85	3,65	3,55	0,74	3,74	3,87	4,35	5,00
Bo 3542	2,76	4,34	9,39	3,64	3,65	0,78	3,59	4,07	4,37	5,12
Borweta	2,70	4,13	10,19	3,42	3,38	0,67	3,63	3,86	4,14	4,81
Borweta	2,71	4,08	10,49	3,31	3,28	0,65	3,55	3,82	4,01	4,77
Borweta	2,57	3,94	10,76	3,17	3,09	0,60	3,46	3,58	3,83	4,59
Borweta	2,66	4,13	10,98	3,37	3,25	0,62	3,66	3,79	4,04	4,62
Borweta	2,67	4,13	9,62	3,49	3,44	0,73	3,49	3,82	4,17	4,90
Borweta	2,67	4,10	10,68	3,37	3,19	0,57	3,60	3,79	4,06	4,47
Borweta	2,63	4,00	10,58	3,24	3,14	0,63	3,49	3,69	3,90	4,51
Borweta	2,77	4,27	10,70	3,54	3,51	0,69	3,71	4,05	4,28	5,01
Borweta	2,68	4,11	10,28	3,37	3,36	0,70	3,51	3,73	4,08	4,80
Borweta	2,61	4,01	10,93	3,28	3,20	0,64	3,53	3,58	3,93	4,56
Borweta	2,64	3,99	11,29	3,22	3,15	0,61	3,48	3,58	3,85	4,57
Boruta	2,67	4,16	10,01	3,52	3,48	0,76	3,52	4,04	4,24	5,02
Boruta	2,66	4,16	10,08	3,47	3,42	0,74	3,48	3,66	4,10	4,86
Boruta	2,68	4,19	10,45	3,50	3,45	0,72	3,69	3,60	4,17	4,91
Boruta	2,88	4,55	9,19	3,89	3,84	0,85	3,63	3,83	4,55	5,38
Boruta	2,79	4,34	9,90	3,71	3,69	0,82	3,46	3,74	4,41	5,32
Boruta	2,80	4,33	10,00	3,65	3,62	0,80	3,51	3,80	4,36	5,17
Boruta	2,73	4,27	9,65	3,60	3,59	0,78	3,43	3,74	4,31	5,16
Boruta	2,75	4,28	9,67	3,61	3,57	0,78	3,44	3,68	4,31	5,08
Boruta	2,78	4,32	9,73	3,63	3,61	0,79	3,51	3,75	4,34	5,09
Boruta	2,62	4,06	10,10	3,38	3,30	0,65	3,53	3,77	4,08	4,66
Lup succulentus	2,47	3,92	7,83	3,74	3,71	0,92	3,53	3,74	4,24	6,12

**Tabelle Azc: Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Isoleucin g /16 g N	Leucin g /16 g N	Phenylalanin g /16 g N	Cyst(e)in g/kg i TS	Asparaginsäure g/kg i TS	Glutaminsäure g/kg i TS	Serin g/kg i TS	Histidin g/kg i TS	Glycin g/kg i TS	Arginin g/kg i TS
SUR	4,27	7,13	4,06	4,02	27,07	57,82	12,39	7,86	12,41	27,50
Chartschow	4,34	7,09	4,09	3,85	28,61	61,83	13,34	8,12	12,40	29,79
Mirtan	4,55	7,37	4,29	3,52	26,01	54,85	12,41	7,29	11,28	26,08
Metel	4,31	7,12	4,02	4,16	27,05	58,45	12,67	7,83	11,95	28,33
SCH-DG-36	4,34	7,10	4,06	4,14	27,34	59,81	13,02	7,62	11,68	27,74
WDS	4,40	7,15	4,15	3,75	26,93	57,30	12,69	7,47	11,60	27,37
UF2-53	4,28	7,14	3,96	4,14	25,19	55,58	11,95	7,22	11,20	25,99
PRH 841/06	4,20	6,90	3,93	4,54	31,41	69,76	14,26	9,12	14,08	34,12
PRH 202/05	4,20	6,62	3,86	4,20	32,87	72,91	15,21	8,87	13,95	36,67
R 54/00	4,39	7,00	4,11	4,13	31,69	68,01	14,54	8,45	13,36	33,23
Belara	4,35	7,12	4,19	3,60	29,49	59,38	13,32	8,32	12,97	28,83
Myallie	4,30	6,80	4,07	4,04	34,18	73,39	15,76	9,01	14,12	36,94
Bo 10556 ( <i>L. luteus</i> )	4,02	7,16	3,89	7,71	41,25	96,66	19,40	11,75	17,09	46,69
Bo 10551 ( <i>L. luteus</i> )	3,99	7,31	3,91	8,12	38,81	92,33	18,67	11,34	16,64	43,41
Bo 10529 ( <i>L. luteus</i> )	3,95	7,15	3,85	8,08	40,71	96,61	19,36	11,82	17,16	46,39
Bo 32421 ( <i>L. luteus</i> )	4,07	7,28	3,96	8,06	41,29	97,26	19,72	12,02	17,54	47,84
BGE 023639	4,01	6,41	3,86	4,13	29,58	65,78	14,32	8,37	13,16	32,33
BGE 007278	4,06	6,57	3,87	3,92	27,51	60,87	12,94	7,59	12,04	28,82
LUP 154/80	4,21	6,83	3,93	4,02	26,06	59,43	12,51	7,37	11,41	27,48
27254	4,01	6,27	3,77	4,07	33,42	77,91	15,98	8,98	13,78	39,82
27054	4,42	7,17	4,17	3,91	28,54	61,81	13,53	7,89	12,29	29,78
28806	4,23	7,07	4,04	3,95	25,66	53,70	12,05	7,63	11,68	25,78
PI 255473	4,13	6,66	3,87	4,04	27,01	61,43	12,95	7,60	11,87	29,14
PI 289162	4,10	6,65	3,83	4,14	26,21	59,85	12,65	7,37	11,44	27,87
PI 476379	4,08	6,67	3,81	4,43	25,83	59,02	12,46	7,26	11,38	26,68

**Tabelle Azc (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Isoleucin g /16 g N	Leucin g /16 g N	Phenylalanin g /16 g N	Cyst(e)in g/kg i TS	Asparaginsäure g/kg i TS	Glutaminsäure g/kg i TS	Serin g/kg i TS	Histidin g/kg i TS	Glycin g/kg i TS	Arginin g/kg i TS
Dianella 1	4,10	6,53	3,87	3,97	28,92	65,29	13,70	7,85	12,69	31,38
28502	4,33	6,99	4,09	3,83	26,43	54,95	12,41	7,33	11,67	26,75
Bo 7212	4,33	7,22	4,07	4,59	28,99	65,79	13,67	8,43	13,34	32,78
Bo 3542	4,40	7,28	4,05	4,12	23,16	51,05	11,21	6,70	10,53	22,78
Borweta	4,36	7,18	4,05	4,86	29,19	66,76	14,20	8,24	12,58	31,03
Borweta	4,27	7,03	3,95	5,13	30,04	69,79	14,54	8,54	12,83	32,99
Borweta	4,15	6,80	3,82	5,37	31,89	76,15	15,55	9,03	13,80	37,75
Borweta	4,22	6,81	3,96	4,42	31,55	72,87	15,80	9,06	14,05	37,30
Borweta	4,26	7,03	4,00	4,24	25,75	56,74	12,61	7,39	11,43	26,60
Borweta	4,31	6,98	4,07	4,14	29,35	67,15	14,76	8,50	13,05	34,02
Borweta	4,19	6,88	3,92	5,12	30,57	71,04	15,09	8,75	13,28	35,13
Borweta	4,48	7,35	4,21	4,33	29,19	64,70	13,77	8,01	12,33	30,92
Borweta	4,25	7,03	3,96	4,85	28,73	65,07	13,70	8,08	12,39	30,98
Borweta	4,08	6,75	3,81	5,43	33,22	78,25	15,70	9,60	14,75	40,22
Borweta	4,09	6,73	3,79	5,23	32,77	78,02	15,66	9,43	14,24	40,33
Boruta	4,33	7,10	4,09	4,11	25,89	56,37	12,40	7,15	11,12	26,74
Boruta	4,17	6,91	3,89	4,83	29,11	62,37	13,52	8,10	12,65	30,64
Boruta	4,21	6,97	3,91	4,62	29,90	64,43	14,03	8,65	13,48	33,67
Boruta	4,41	7,45	4,16	4,29	25,41	52,15	11,71	7,24	11,44	23,10
Boruta	4,32	7,25	4,07	4,19	24,82	51,50	11,61	7,04	10,96	25,01
Boruta	4,35	7,33	4,04	4,42	24,83	53,78	11,73	7,13	11,01	25,44
Boruta	4,29	7,19	3,99	4,24	24,98	53,16	11,67	7,07	11,05	24,98
Boruta	4,27	7,19	3,99	4,48	25,06	54,20	11,89	7,28	11,33	25,59
Boruta	4,34	7,30	4,04	4,75	25,39	54,91	11,92	7,25	11,25	25,34
Boruta	4,20	6,81	3,96	4,10	29,01	63,21	13,56	8,09	12,52	31,18
Lup succulentus	4,55	7,32	3,82	6,56	32,77	74,01	15,63	8,60	13,63	27,23

**Tabelle Azd: Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Threonin g/kg i TS	Alanin g/kg i TS	Methionin g/kg i TS	Prolin g/kg i TS	Tyrosin g/kg i TS	Valin g/kg i TS	Lysin g/kg i TS	Isoleucin g/kg i TS	Leucin g/kg i TS	Phenylalanin g/kg i TS
SUR	10,66	10,33	2,15	11,43	10,46	12,46	14,06	12,02	20,08	11,44
Chartschow	10,63	10,30	1,96	11,95	11,04	12,64	14,31	12,80	20,92	12,07
Mirtan	9,74	9,49	1,81	10,84	10,61	11,52	13,09	11,78	19,07	11,11
Metel	10,26	9,93	2,01	11,29	10,09	12,14	13,80	12,12	20,04	11,31
SCH-DG-36	9,89	9,72	1,89	11,31	10,81	11,88	13,51	12,28	20,08	11,48
WDS	9,81	9,71	1,86	11,01	10,56	11,70	13,50	11,92	19,38	11,23
UF2-53	9,50	9,42	1,90	10,17	9,99	11,12	13,43	11,25	18,77	10,42
PRH 841/06	11,85	11,54	2,25	12,94	12,32	13,84	16,25	13,83	22,72	12,93
PRH 202/05	11,56	11,31	2,14	13,35	12,62	13,76	16,33	14,66	23,08	13,48
R 54/00	11,20	11,00	2,14	13,01	12,49	13,40	15,32	13,99	22,29	13,07
Belara	11,30	10,94	2,17	12,26	11,79	13,31	14,97	12,94	21,18	12,45
Myallie	11,89	11,54	2,10	13,95	13,88	14,16	15,93	14,98	23,70	14,18
Bo 10556 ( <i>L. luteus</i> )	14,47	14,10	2,89	16,62	15,39	16,61	21,49	17,96	32,00	17,40
Bo 10551 ( <i>L. luteus</i> )	14,11	13,60	3,00	14,80	14,20	16,06	21,03	17,04	31,20	16,69
Bo 10529 ( <i>L. luteus</i> )	14,42	14,03	2,93	15,51	15,17	16,52	21,59	17,73	32,15	17,30
Bo 32421 ( <i>L. luteus</i> )	14,77	14,33	2,96	15,91	15,51	16,97	21,87	18,20	32,53	17,69
BGE 023639	10,86	10,32	2,01	11,73	11,72	12,97	14,52	13,49	21,56	12,98
BGE 007278	9,96	9,82	1,94	10,46	10,85	11,95	13,81	12,16	19,66	11,56
LUP 154/80	9,46	9,31	1,90	9,92	10,35	11,45	13,33	11,81	19,18	11,02
27254	11,14	10,76	1,88	13,23	13,10	13,62	15,34	14,75	23,08	13,89
27054	10,21	10,02	1,96	10,79	11,34	12,31	14,18	12,67	20,56	11,94
28806	9,96	9,74	2,04	9,75	10,24	11,90	13,75	11,50	19,21	10,99
PI 255473	9,75	9,55	1,95	10,31	10,77	11,74	13,85	12,16	19,61	11,39
PI 289162	9,45	9,23	1,90	10,04	10,34	11,38	13,24	11,83	19,20	11,07
PI 476379	9,42	9,22	2,00	9,76	10,36	11,27	13,27	11,58	18,93	10,81

**Tabelle Azd (Forts.): Aminosäuregehalte des Sortiments von *L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. succulentus*.**

Sorte	Threonin g/kg i TS	Alanin g/kg i TS	Methionin g/kg i TS	Prolin g/kg i TS	Tyrosin g/kg i TS	Valin g/kg i TS	Lysin g/kg i TS	Isoleucin g/kg i TS	Leucin g/kg i TS	Phenylalanin g/kg i TS
Dianella 1	10,31	10,03	1,95	11,18	11,16	12,32	14,30	12,90	20,54	12,18
28502	9,87	9,66	2,11	9,88	11,03	11,85	13,75	11,87	19,18	11,23
Bo 7212	11,03	10,73	2,22	11,30	11,69	13,14	15,10	13,08	21,82	12,29
Bo 3542	8,84	8,86	1,89	8,70	9,88	10,60	12,42	10,66	17,65	9,82
Borweta	10,41	10,31	2,04	11,06	11,75	12,63	14,64	13,30	21,89	12,33
Borweta	10,40	10,31	2,04	11,18	12,00	12,61	15,02	13,44	22,12	12,42
Borweta	11,10	10,84	2,09	12,15	12,56	13,44	16,09	14,56	23,86	13,41
Borweta	11,46	11,04	2,11	12,42	12,89	13,73	15,70	14,36	23,16	13,46
Borweta	9,65	9,51	2,01	9,66	10,56	11,52	13,55	11,77	19,45	11,05
Borweta	10,73	10,17	1,80	11,48	12,06	12,93	14,22	13,73	22,23	12,95
Borweta	10,75	10,43	2,10	11,59	12,27	12,95	14,97	13,90	22,86	13,01
Borweta	10,23	10,15	2,00	10,71	11,69	12,37	14,47	12,95	21,22	12,15
Borweta	10,17	10,12	2,12	10,57	11,24	12,30	14,48	12,83	21,21	11,94
Borweta	12,05	11,76	2,36	12,98	13,18	14,48	16,79	15,01	24,82	14,02
Borweta	11,51	11,23	2,17	12,43	12,80	13,74	16,33	14,62	24,02	13,55
Boruta	9,39	9,31	2,04	9,41	10,80	11,32	13,41	11,57	18,97	10,93
Boruta	10,55	10,40	2,24	10,59	11,12	12,47	14,77	12,68	20,99	11,84
Boruta	11,28	11,10	2,33	11,90	11,58	13,44	15,83	13,57	22,45	12,60
Boruta	9,78	9,65	2,13	9,13	9,62	11,45	13,52	11,07	18,72	10,47
Boruta	9,36	9,33	2,06	8,74	9,44	11,13	13,45	10,91	18,32	10,28
Boruta	9,29	9,21	2,02	8,93	9,68	11,09	13,16	11,06	18,65	10,28
Boruta	9,31	9,31	2,02	8,87	9,69	11,16	13,35	11,12	18,61	10,33
Boruta	9,55	9,44	2,07	9,09	9,73	11,39	13,44	11,29	19,03	10,55
Boruta	9,45	9,41	2,06	9,14	9,78	11,32	13,25	11,30	19,02	10,52
Boruta	10,45	10,18	2,01	10,90	11,65	12,59	14,38	12,98	21,03	12,21
Lup succulentus	13,01	12,90	3,19	12,27	13,01	14,73	21,27	15,80	25,45	13,27