

SAMENVATTING

Voederleguminosen hebben twee voordelen ten opzichte van andere voedergewassen. Ze zijn rijk aan eiwitten en hebben weinig of geen stikstof nodig in de vorm van kunstmest. Er zijn nog andere voordelen die deze peulvruchten kunnen bieden. Sommigen, zoals esparsette (sainfoin) en rolklaver, bevatten 'bioactieve' bestanddelen waarmee de eiwitbenutting van herkauwers geoptimaliseerd kan worden, de uitstoot van methaangas verminderd kan worden, de druk van parasitaire maagdarmwormen verminderd kan worden en de kwaliteit van dierlijke producten van herkauwers verbeterd kan worden. Het vanuit de EU gesubsidieerde project LegumePlus heeft als doel om onderzoek te doen in deze gebieden.

Dit rapport beschrijft de voortgang van het project LegumePlus in de periode 2012 en 2013. Het is een samenvatting van de bijdragen van 14 promovendi, 10 onderzoeksinstituten, 5 partners vanuit het midden- en kleinbedrijf en gastonderzoekers uit 6 Europese landen en uit Nieuw-Zeeland.

Project doelen

LegumePlus verzorgt een trainingsprogramma voor 14 beginnende promovendi en 2 postdocs voor het verkrijgen van professionele vaardigheden in het uitvoeren van onderzoek naar bioactieve peulvruchten. De doelstellingen en bijdragen van LegumePlus hebben betrekking op de mechanismen van bioactieve bestanddelen in voedergewassen peulvruchten om:

- Een betere eiwit efficiëntie te bewerkstelligen (**doelstelling 1**);
- De hoeveelheid geproduceerd methaangas te verminderen (**doelstelling 2**);
- De kwaliteit van melk- en vleesproducten te verbeteren (**doelstelling 3**);
- Het terugdringen van parasitaire wormen (**doelstelling 4**);
- Het integreren en genereren van kennis om de geselecteerde Europese peulvruchten te verbeteren (**doelstelling 5**).

Dit onderzoek zal nieuwe doelen voor veredelaars ontwikkelen om betere peulvruchten-cultivars te ontwikkelen.

Beschrijving van het onderzoek en belangrijkste resultaten

Het onderzoek verloopt volgens plan. Alle proefvelden zijn met succes ingezaaid; twee velden moesten worden herplant vanwege het slechte weer. Velden met sainfoin, rolklaver en rode klaver worden nu gebruikt voor agronomische evaluaties, het ontwikkelen van genetische merkers, *in vitro* studies en voerproeven om de gunstige effecten van deze gewassen op de gezondheid en voeding van dieren en emissies naar het milieu te beoordelen.

Binnen **Werkveld 1** zijn velden beplant met drie voedergewassen, te weten sainfoin, rolklaver en rode klaver. Dit heeft gewasmateriaal opgeleverd waarmee het proces van inkuilen van deze gewassen bestudeerd kon worden. Daarnaast zijn de materialen aangewend in voederproeven met als doel om melk, kaas en vlees te produceren. Deze dierlijke producten zijn beoordeeld op voedingswaarde en – kwaliteit, en daarnaast onderzocht wat hun relatie is met de uitstoot van methaan en stikstof naar het milieu. De kuilen toonden een goede fermentatie en zijn ingezet bij *in vitro* studies en voerproeven. De effecten van drogen en inkuilen op de bioactieve tannines is ook onderzocht, omdat veranderingen tijdens deze processen mogelijk leidt tot een hogere eiwitbestendigheid in de pens in het ingekuilde product in vergelijking met het verse product. Dit kan de hoeveelheid eiwit die het dier herkauwers verbeteren en milieu stikstofverliezen te beperken.

Partners in **Werkdomein 2** ontvingen een grote hoeveelheid sainfoin afkomstig van MG2Mix in Frankrijk. Dit materiaal is ingezet bij een voederproef waarin de vestiging van parasitaire maagdarmwormen onderzocht is bij jonge dieren, onder andere door het meten van de worm druk, het meten van de vruchtbaarheid van vrouwelijke nematoden en de mate van uitscheiding van fecale wormeieren. Daarnaast werden *in vitro* de effecten van contrasterende tannines (uit Werkdomein 3) getest op vier parasitaire wormsoorten: *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Haemonchus contortus* en *Trichostrongylus colubriformis* larven. Verschillende promovendi hebben samengewerkt om de factoren in kaart te brengen die bijdragen aan de tussen-laboratorium-variabiliteit van de *in vitro* anthelmintische (syn. anti-worm) assays, om een gestandaardiseerde operationele procedures te schrijven.

In **Werkdomein 3** hebben een aantal promovendi zich toegelegd om contrasterende tannines in ruime hoeveelheden (grammen) te isoleren om te gebruiken voor hun eigen onderzoek en die van collega promovendi binnen het LegumePlus netwerk. Zij hebben de effecten onderzocht van verschillende bewaarcondities op de stabiliteit van deze geïsoleerde bioactieve plantaardige stoffen. De promovendi zijn er in geslaagd om de thiolytische degradatie en massaspectrometrische methoden verder te ontwikkelen en te optimaliseren voor gevriesdroogde en bewerkte monsters, met als doel om de detectie en kwantificering van tannines in verschillende vlinderbloemigen en plantendelen te verbeteren. Van deze werkzaamheden zijn inmiddels drie manuscripten ingediend bij wetenschappelijk gerefereerde tijdschriften. De agronomische veldproeven (Werkdomein 4) hebben meer dan 800 sainfoin monsters gegenereerd voor screening op polyfenolen met behulp van de nieuw vastgestelde methoden. Tannines bleken sterk te variëren binnen en tussen plantensoorten en bladeren hadden meer tannines en prodelphinidins dan stengeldelen. Daarnaast zijn de effecten van pelletteren en inkuilen op de extraheerbaarheid van tannines bepaald omdat dit mogelijk een verklarende factor vormt met betrekking tot hun anthelmintische activiteit.

Binnen **Werkdomein 4** zijn verschillende sainfoin soorten (cultivars) gebruikt voor agronomische evaluaties, fenotypering, genotypering en voor merkerontwikkeling en omvat een segregerende mapping populatie. De meeste sainfoin planten (86 %) overleefden de strenge winter van 2012. Promovendi hebben mengsels van 3 sainfoin cultivars met 6 partner soorten getest om de ontwikkeling en vestiging van sainfoin in het veld en de onkruidonderdrukking te optimaliseren. Interessante bevinding was dat met sommige mengsels een hogere sainfoin opbrengst gerealiseerd werd dan wanneer sainfoin in monocultuur gezaaid werd. Voorlopige gegevens vanuit het eerste jaar lieten zien dat ontwikkeling van onkruiden met succes onderdrukt worden door alle soortenmengsels. Een paar herbiciden gaven goede perspectieven voor het inzetten bij onkruidbestrijding in een vroeg stadium.

De promovendi zijn erin geslaagd om RNA en DNA van hoge kwaliteit te extraheren uit verschillende sainfoin cultivars. Van het verkregen cDNA is vervolgens de sequentie bepaald met behulp van Llumina sequentie technologie. Hierbij zijn meer dan 3000 microsatellieten verkregen uit de transcriptoom sequenties, en primerparen zijn ontworpen voor het amplificeren van eenvoudige volgordeherhalingen, de zogenaamde putative simple sequence repeats (SSR). Deze zullen worden gescreend en getest op polymorfisme om de genetische diversiteit in onze sainfoin genenbank te karakteriseren.

Verwachte eindresultaat, de potentiële impact en het gebruik

LegumePlus zal inzicht geven over de vraag of sainfoin, rolklaver en rode klaver cultivars kunnen worden gebruikt voor het verbeteren van melk-, kaas- en vleeskwiteit en het verlagen van de uitstoot naar het milieu door herkauwers. Het levert analytische meetmethoden en instrumenten, geschikt voor een snelle screening van bioactieve stoffen ten bate van plantaardige veredelingsprogramma's. Het zal ook inzicht geven in de structuur-activiteit relaties tussen bioactieve tannines en de anthelmintische effecten. Moleculaire markers worden ontwikkeld, die geschikt zijn voor het kweken van nieuwe Europese sainfoin cultivars met hoogwaardige nutritionele en anthelmintische eigenschappen.

LegumePlus zal teeltbeschrijvingen publiceren voor de teelt van sainfoin in Europa ten behoeve van de agrarische sector.

Socio-economische impact en de bredere maatschappelijke implicaties van het project tot heden

Binnen LegumePlus worden inmiddels 14 jonge onderzoekers opgeleid, die graag een bijdrage willen leveren aan de voedselproductie en voedselzekerheid, waarbij tegelijkertijd de ecologische voetafdruk verlaagd wordt.



Contact: Prof I. Mueller-Harvey (i.mueller-harvey@reading.ac.uk)

Project website: <http://legumeplus.eu>