

Karakterisering af rødkløverlinjer: Proteinindhold og polyfenoloxidase-aktivitet

Forfatter(e): Simone Andrea Gierlich¹, Marcin Nadzieja¹, Niels Roulund², Stig Uggerhøj Andersen¹

¹ Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet, Universitetsbyen 81, 8000 Aarhus C

² DLF Seeds A/S, Højerupvej 31, 4660 Store Heddinge

Promilleafgiftsfonden for landbrug



Indledning / sammendrag

Projektet "Klimaprotein" undersøger muligheden for at reducere landbrugets klimaaftryk ved at dyrke lokale proteinafgrøder, herunder rødkløver, som er mere modstandsdygtig over for tørke end andre proteinafgrøder som hestebønner og hvidkløver. Formålet er at opnå en stabil og høj produktion af protein med lav miljøpåvirkning. I undersøgelsen blev proteinindholdet og polyfenoloxidase (PPO)-aktiviteten i 100 rødkløvergenotyper analyseret for at identificere linjer med høj proteinkvalitet og lav PPO-aktivitet, hvilket er ønskværdigt for dyrefoder. Resultaterne viste stor variation i både PPO-aktivitet og proteinindhold, og det konkluderes, at det er muligt at forædle rødkløver med både høj proteinkvalitet og lav PPO-aktivitet.

Introduktion

Denne rapport er en del af projektet » Dyrkning af proteinafgrøder med lavt miljø- og klimaafttryk til fremtidens klima (klimaprotein)«, som fokuserer på landbrugets klimapåvirkning, og hvordan den kan reduceres ved at udvikle lokale proteinkilder. Dyrkning af proteinafgrøder i Danmark er begrænset af tørre perioder, og hestebønner og hvidkløver er særligt følsomme over for tørke. Rødkløver, som denne undersøgelse fokuserer på, er en anden vigtig proteinafgrøde til foderbrug.

Formålet med dette projekt er at reducere landbrugets CO₂-aftryk ved at opnå en høj og stabil produktion af protein i Danmark med afgrøder, der har en høj proteinkvalitet, en lav miljøpåvirkning og er velegnede til et klima med tørkeperioder. I dette studie undersøges proteinindholdet og aktiviteten af polyfenoloxidase (PPO) proteinkvaliteten i 100 forskellige rødkløvergenotyper for at undersøge, om der er tilstrækkelig variation til at understøtte forædling af disse egenskaber.

Metoder

FORSØGSOPSTILLING OG PLANTEVÆKST

Som en del af det ovenfor beskrevne »Klimaprotein«-projekt fokuserede dette arbejde på karakterisering af 100 rødkløverlinjer. Til dette formål blev 20 rødkløverpopulationer, der blev dyrket på DLF's marker på Sjælland (Højerupvej 31, 4660 Store Heddinge), indsamlet i maj 2023. På prøvetagnings-tidspunktet var planterne 12 uger gamle. Desuden modtog projektet 80 rødkløver populationer fra Libor Jaluvka (DLF Seeds, Hladké Životice, Tjekkiet), som blev dyrket i drivhusene på Aarhus Universitet i Skejby i perioden fra august til november 2023. Drivhuset var indstillet til en måltemperatur på 18 °C ± 5 °C i dagtimerne og 12 °C ± 2 °C om natten med en luftfugtighed på 60-80 % og en lysintensitet på 100 W/m². For bedst muligt at matche vækstbetingelserne fra DLF's marker blev jordprøver taget der på høstdagen brugt til at inokulere den jord, der blev brugt i drivhuset. Det viste sig, at det var tilstrækkeligt at drysse 60 g podningsjord på 0,3 m² overfladeareal. Vandingen blev udelukkende udført med vand og gødning uden ekstra kvælstof, som det var tilfældet på DLF's forsøgsarealer. På den måde blev vækstbetingelserne på DLF's marker matchet så godt som muligt.

Analysen af kvælstofindholdet, som det samlede proteinindhold skulle beregnes ud fra, blev udført af Agrolab. På grund af de store mængder tørret plantevæv, som Agrolab skulle bruge til analysen, blev fem tilfældigt udvalgte rødkløverpopulationer dyrket i et forforsøg for at vurdere, hvor mange pletter der skulle bruges pr. population for at opfylde kravene til tørvægt. Efter 12 ugers vækst blev disse planter høstet, og friskvægten blev bestemt, før plantematerialet blev pakket i papirposer og tørret i tørreskabet i drivhuset ved 30 °C i 10 dage. I denne periode blev vægten af poserne målt gentagne gange, og så snart den stabiliserede sig og holdt op med at falde, blev plantevævet anset for at være helt tørret. Derefter blev det gennemsnitlige vægttab i procent beregnet for derefter at drage konklusioner om, hvor mange pletter pr. linje der var nødvendige for at høste nok væv til en vellykket analyse.

Det førte til en forsøgsopstilling til dyrkning af de 80 forskellige linjer med fem pletter pr. linje. På grund af den store mængde planter blev det besluttet at dyrke populationerne i tre forskellige partier med 10 dages mellemrum. For at sikre ensartethed i resultaterne og opdage potentielle batch-effekter, inkluderede vi fem kontrol-populationer i alle partier. Planterne blev dyrket, indtil de var 12 uger gamle, hvilket svarer til alderen på de planter, der blev udtaget prøver af på DLF's marker.

INDSAMLING AF PRØVER

Efter at vækstfasen var afsluttet, blev der udtaget prøver, som blev nedfrosset i biologiske replikater til analyse af PPO-aktiviteten. Til disse analyser var der kun brug for små mængder væv, så der blev indsamlet ca. 1-2 g plantemateriale per prøve.

Resten af planterne blev høstet helt. Derfor blev alt plantevæv ca. 1-2 cm over jorden klippet med en saks, lagt i individuelle papirposer, vejret og derefter tørret i tørreskabe ved 30 °C til analyse af kvælstofindholdet i 10 dage.

ANALYSE - PPO-AKTIVITET

PPO-aktiviteten blev målt ved hjælp af et kommercielt tilgængeligt kit fra Elabscience, med biologiske duplikater analyseret for hver linje. Til analysen blev instruktionerne fra kittet fulgt. PPO-aktiviteten blev målt i enheder pr. mg totalprotein. Der blev taget et gennemsnit af resultaterne, og standardfejlen blev beregnet for hver linje.

ANALYSE - PROTEININDHOLD

Analysen af proteinindholdet blev udført af Agrolab på tørret plantevæv. Derfor blev kvælstofindholdet i prøverne målt, og ud fra disse resultater blev proteinindholdet beregnet ved hjælp af omregningsfaktoren 5,6. For proteinindholdet blev der også taget et gennemsnit af resultaterne, og standardfejlen blev beregnet for hver linje.

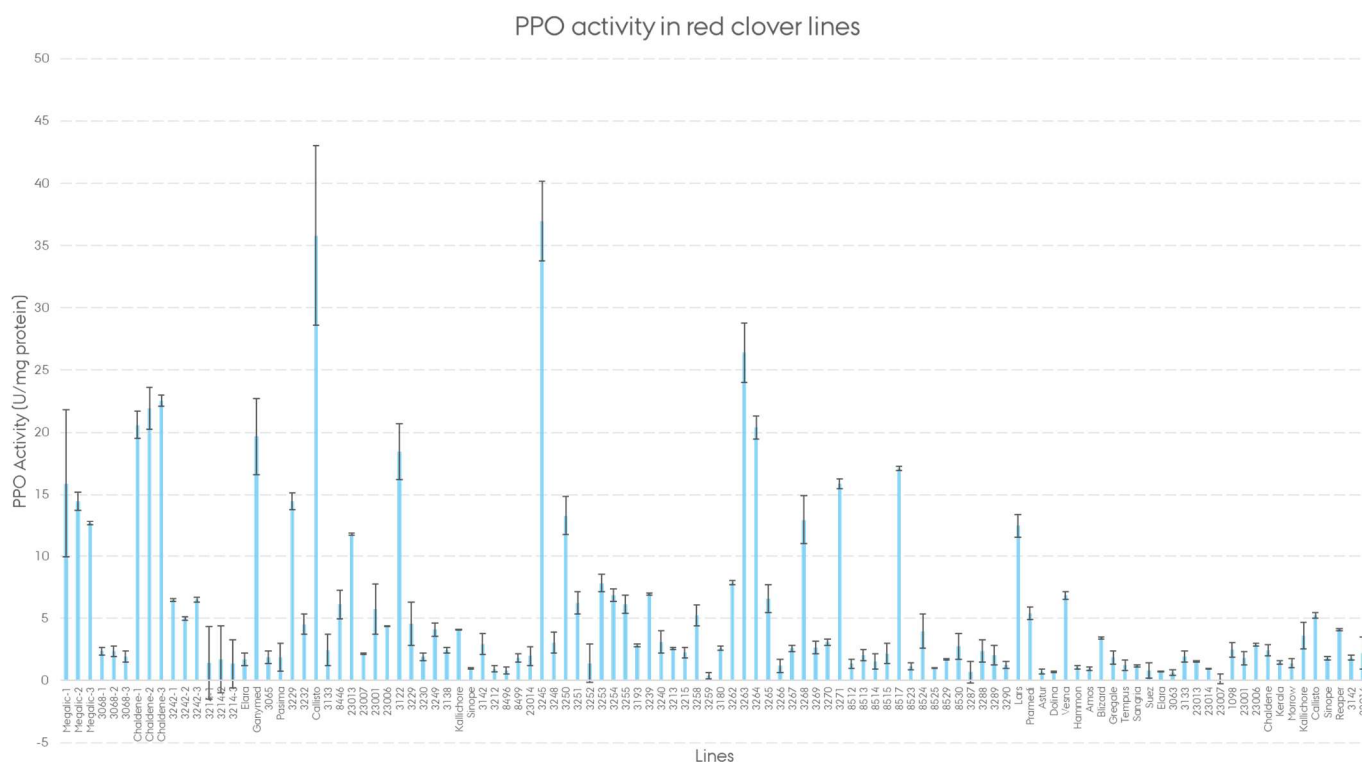
På baggrund af disse resultater blev der udført statistiske analyser og korrelationsanalyser.

Resultater

PPO-AKTIVITET PÅ TVÆRS AF RØDKLØVERLINJER

PPO-aktiviteten blandt de forskellige linjer viste betydelig variation. Den laveste målte aktivitet var tæt på 0 U/mg protein, helt præcist 0,121 U/mg protein i linje 23007, mens den højeste nåede op på næsten 37 U/mg protein, helt præcist 36,959 U/mg protein i linje 3245. Dette indikerer stor variation af enzymatisk aktivitet på tværs af rødkløverpopulationerne.

Den store variation i PPO-aktivitet tyder på potentielle genetiske eller miljømæssige faktorer, der påvirker enzymets aktivitet. Der blev ikke fundet nogen signifikante forskelle i PPO-aktivitet for de fem populationer, der blev dyrket i alle tre partier. Derfor kan det antages, at vækstbetingelserne for de tre forskellige partier var ensartede. På grund af de kontrollerede vækstbetingelser i forsøget kan det konkluderes, at en betydelig del af variationerne skyldes rødkløverpopulationernes forskellige genetiske baggrunde.

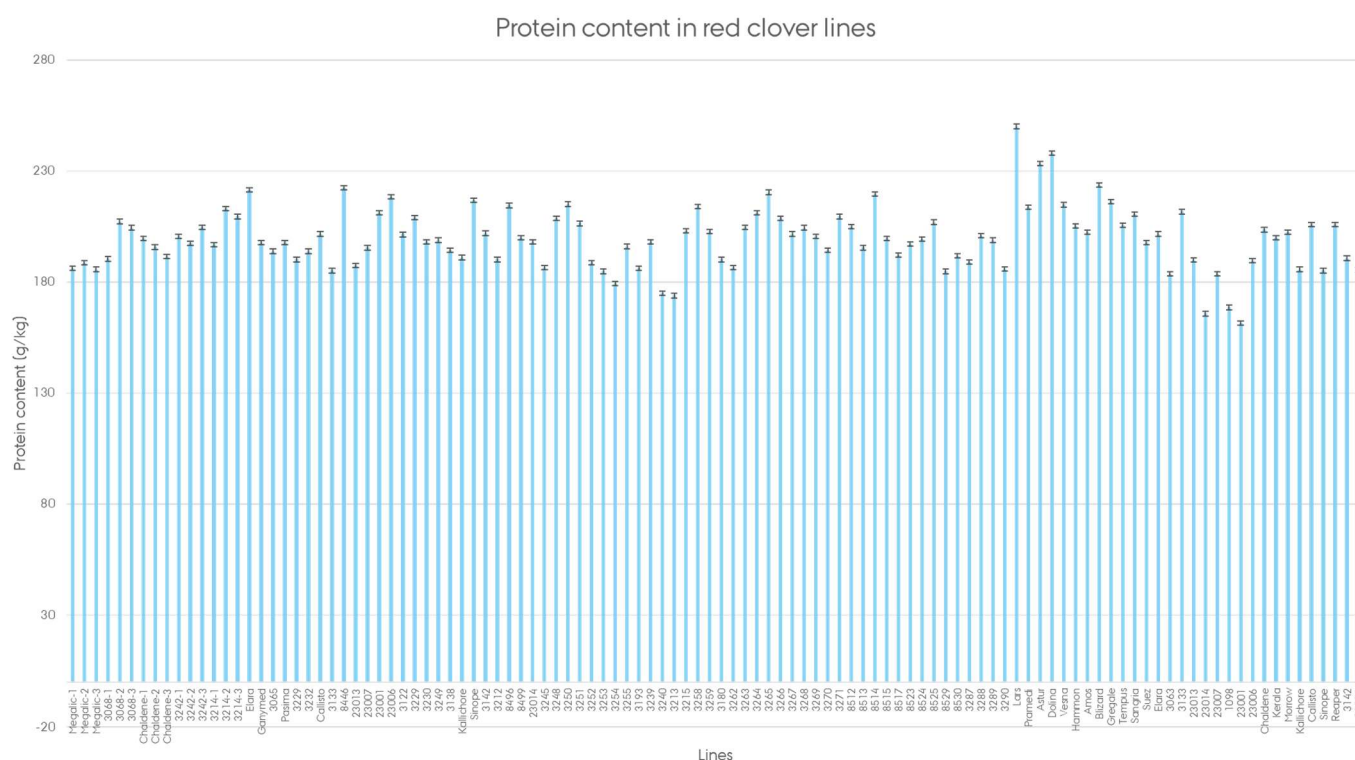


Figur 1: PPO-aktivitet på tværs af rødkløverlinjer i U/mg.

PROTEININDHOLD PÅ TVÆRS AF RØDKLØVERLINJER

Proteinindholdet blev også målt på tværs af de 100 linjer som beskrevet tidligere. Omregningsfaktoren 5,6 til at beregne det samlede proteinindhold ud fra kvælstofindholdet, som blev målt af Agrolab, blev valgt ud fra litteraturen (Mariotti, F. et al., 2008). For proteinindholdet kunne der påvises betydelige forskelle mellem de undersøgte linjer. Den observerede variation ligger mellem 165,76 g/kg i linje 23014 og 233,23 g/kg i Astur.

For de fem populationer, der blev dyrket i alle tre partier, kunne der ikke påvises nogen signifikante forskelle i det målte proteinindhold. Det viser, at vækstbetingelserne har været ensartede nok til ikke at påvirke proteinindholdet i planterne. Som allerede nævnt for variationen i PPO-aktiviteten i rødkløver er det derfor sandsynligt, at den observerede variation i proteinindholdet hovedsageligt skyldes populationernes forskellige genetiske baggrunde.



Figur 2: Proteinindhold på tværs af rødkløverlinjer i g/kg.

Konklusion

Resultaterne af analyserne understreger vigtigheden af omhyggeligt at vælge de rødskløverlinjer, der anvendes i landbruget. Da en højere PPO-aktivitet er forbundet med en lavere optagelse af protein hos dyr og mennesker (Sullivan, M.L. og Hatfield, R.D., 2006), vil det være en fordel at vælge rødskløverlinjer, der har en så lav PPO-aktivitet som muligt. De udførte analyser afslører, at der er store forskelle mellem PPO-aktiviteten i forskellige rødskløverpopulationer. Det kunne vises, at der er flere linjer med en meget lav PPO-aktivitet, der kunne bruges i foder såvel som til fremtidig forædling af nye rødskløverlinjer. Variationen i proteinindhold viser, at der også er potentiale for at forbedre dette gennem forædling. Generelt giver et højere proteinindhold en højere foderværdi, og protein er som regel det dyreste element i dyrenes kost.

Baseret på den analyse, der er udført indtil videre, ser der ikke ud til at være nogen signifikant sammenhæng mellem PPO-aktiviteten og proteinindholdet i rødskløver. Da der samtidig er tilstrækkelig variation for begge træk, burde der være potentiale for at forædle rødskløver med både højt proteinindhold og lav PPO-aktivitet.

Referencer

François Mariotti, Daniel Tomé & Philippe Patureau Mirand (2008). Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors, *Critical Reviews in Food. Science and Nutrition*, 48:2, 177-184, DOI: 10.1080/10408390701279749

Sullivan, M.L. and Hatfield, R.D. (2006) Polyphenol Oxidase and o-Diphenols Inhibit Postharvest Proteolysis in Red Clover and Alfalfa. *Crop Science*, 46, 662-670. <http://dx.doi.org/10.2135/crop-sci2005.06-0132>