

# SELVGØDENDE PLANTER: Udbredelse og effektivitet af sainfoins nitrogenfiksering i dansk jord

Projekt Forskerspirer 2024 // NAT // FN145

Forskerspirer 2024	
Titel	SELVGØDENDE PLANTER: Udbredelse og effektivitet af sainfoins nitrogenfiksering i dansk jord
Identifikationskode	FN145
Navn	Freja Weiss Nielsen
Gymnasium	Fredericia Gymnasium
Fagområde	Naturvidenskab



## Indholdsfortegnelse

Indledning .....	3
Problemformulering og formål .....	3
Afgrænsning .....	4
Teori .....	4
Forskningsdesign .....	6
Hypotese .....	6
Forsøgsdesign .....	7
Budget og tid .....	8
Konklusion og perspektivering .....	9
Anerkendelse .....	9
Litteraturliste .....	9
Bilag .....	11
1: Journal for pilotforsøg .....	11
2: Datasæt ark 1 (behandling af pilotforsøg) .....	16
3: Datasæt ark 2 (behandling af pilotforsøg) .....	19
4: Analyse af jordprøver .....	20
5: Forsøgsvejledning .....	20

## Indledning

Hver dag er der nyheder om utilfredse landmænd og iltsvind forårsaget af overgødning & udvaskning. Samtidig er der en stigende interesse for økologisk og 'regenerativt' landbrug - et populærvidenskabeligt begreb, der dækker over alternative metoder og tilgange til landbrug med fokus på naturlige processer og biodiversitet (Newton, et al., 2020). Jeg er særligt interesseret i bælgplanters nitrogenfiksering; en kemisk proces, som er resultat af en mutualistisk symbiose mellem bakterier og planter. Resultatet bliver såkaldte 'selvgødende planter', der er optimale for landbruget, fordi de får deres næring fra en endosymbiose<sup>1</sup> med rhizobiumbakterier.

Produktionen af dyrefodder optager ca. 80% af det danske landbrugsareal (Miljø- og fødevarerudvalget, 2017). Den nitrogenfikserende bælgplante sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) dyrkes til dyrefodder i udlandet. Herhjemme forskes der i om sainfoinfrø kan blive en proteinholdig fødevarer på niveau med sojabønnen (Craine, et al. 2023). Sainfoin har et stort potentiale i det nuværende landbrug, men også hvis Danmark skifter til en landbrugsmodel, der fokuserer på plantebaseret fødevarerproduktion. Desuden har nitrogenfiksering en positiv indflydelse på jordkvalitet og mikrobiel diversitet (Sakhraoui, et al. 2023). Sainfoin er en flerårig plante, der udover at være nitrogenfikserende har dybe rødder, som binder CO<sub>2</sub> fra atmosfæren i dybe jordlag. Jeg vil derfor undersøge Sainfoins dyrkningskriterier med henblik på at erstatte gødningsinput og forbedre sundheden i dansk landbrugsjord.

## Problemformulering og formål

Når der forskes i nitrogenfiksering og selvgødende planter med henblik på dansk anvendelse, er der typisk fokus på kortlægning af processerne mht. manipulation af kornarter (e.g., Rübsam, et al. 2023). Flere studier undersøger dog sainfoins anvendelse i andre lande, især som dyrefoder (e.g., Kapp-Bitter, et al. 2021) eller funktionen af tanniner i plantens blade (e.g., Wang, et al. 2015). Der er dog mangel på undersøgelser om, hvilke nitrogenfikserende bakterier, der indgår i symbiose med planten og om disse bakterier findes i danske jorde. Projektet tager derfor udgangspunkt i denne manglende forståelse, og jeg vil undersøge følgende problemstilling:

***Hvilke kriterier sikrer, at dyrkningsjord indeholder rhizobiumbakterier, der vil danne effektive rodknolde på sainfoin?***

Formålet med projektet er derfor at:

- Undersøge om sainfoin kan danne nitrogenfikserende rodknolde i danske jorde med henblik på at optimere jordkvaliteten og mindske brug af gødning i landbruget.
- Bestemme udbredelsen af nitrogenfikserende bakterier, der indgår i symbiose med sainfoin, i dansk jord, bl.a. ved brug af 16s gensekvensering.
- Vurdere forskellen mellem effektiviteten af sainfoins nitrogenfiksering i dansk og udenlandsk jord ved hjælp af acetylenreduktionsanalyse.
- Få indsigt i, hvilke jordforhold der er nødvendige for at dyrke nitrogenfikserende sainfoin ved kvantitativ sammenligning af jordprøveanalyseresultater.

---

<sup>1</sup> Endosymbiose = en symbiose, hvor en celle optages og eksisterer inde i en anden celle. I dette tilfælde er det en bakteriecelle, der eksisterer inde i en plantecelle.

Landmænd vil kunne bruge denne viden til at optimere markernes jordkvalitet og bæredygtighed<sup>2</sup> ved at dyrke sainfoin til human konsum eller dyrefoder og dermed opretholde udbyttet (Brøndum, et al. 2006). Selvgødende afgrøder ville mindske iltsvind ved at reducere nitrogenudvaskning. Derudover bidrager projektet til forskningsfeltet med en grundlæggende forståelse for sainfoins symbiose med nitrogenfikserende bakterier.

## Afgrænsning

Jeg forholder mig kun til de nuværende jordforhold<sup>3</sup> og undersøger ikke effekten af kunstig tilførsel af Rhizobiumbakterier<sup>4</sup>. Denne afgrænsning understøtter formålet om en let overgang til at dyrke sainfoin under eksisterende forhold. Jeg udelader at undersøge om det kan betale sig for en landmand at skifte fra korn til sainfoin. Dermed undlader jeg at undersøge nitrogenfikseringens indflydelse på plantens udbytte<sup>5</sup> og rentabilitet ift. korn.

Jeg har som en del af dette projekt allerede udført et pilotforsøg, der undersøgte følgende:

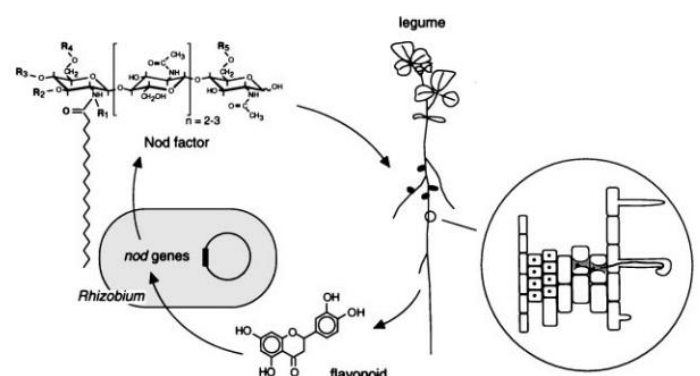
- Vigtigheden af at fjerne skallen på sainfoinfrøene
- Forskellen i effektivitet v. podning af jord vs. bakterieopløsning
- Hvor lang tid det tager, før sainfoin indleder nitrogenfiksering
- Sainfoins kompatibilitet med magentaforsøg
- Forekomst af både inficerede og uinficerede rodknolde på sainfoinplanten
- Vigtigheden af frøskallen for steriliseringen og dannelse af rodknolde
- Symbiosens effektivitet i gødet vs. ugødet jord samt i forskellige europæiske jordprøver

Forsøgsjournalen og databehandlingen kan findes i bilag 1, 2 og 3. Resultaterne fra mit pilotforsøg tyder på, at der dannes uinficerede knolde på sainfoin. Jeg undersøger ikke dette nærmere, da de uinficerede knolde sandsynligvis skyldes, at bakterierne endnu ikke er optaget. Den tyske jordprøve var den eneste, der havde udviklet rodknolde. Det kan der være flere årsager til, se bilag 1, s. 10 - 12 for gennemgang af disse. Derfor sammenligner jeg kun dansk og tysk jord, og jeg forholder mig primært til danske jorde trods pilotforsøgets resultater, fordi det er essentielt for min problemformulering og mit formål.

Endelig afgrænser jeg mig fra at undersøge landbrugstekniske metoder, såsom jordbearbejdning, gødningsmetoder og andre praksisser, der kan påvirke nitrogenfikseringen.

## Teori

Planter får typisk alle deres næringsstoffer fra jorden. De får nitrogen fra ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) og nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), der begge to er letopløselige ioner, som findes i jordvandet. Stofferne er nødvendige for dannelsen af proteiner, DNA, RNA og ATP. Der



Figur 1 illustrerer processen, der igangsætter symbiosen mellem bælgplanter og Rhizobium. Kondorosi, A. & Schultze, M. 1998.

<sup>2</sup> Markernes bæredygtighed refererer her til brug af gødning ift. udvaskning, samt jordens mikrobielle biodiversitet.

<sup>3</sup> Nuværende jordforhold = jord som det kan findes på markerne uden modifikationer.

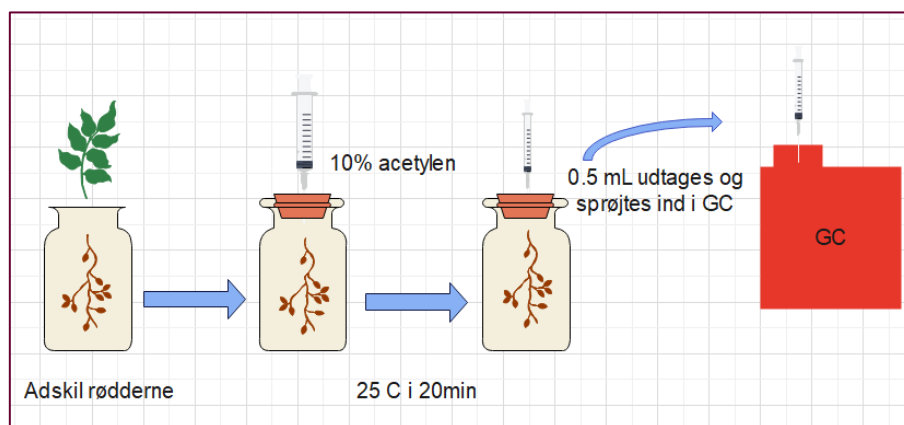
<sup>4</sup> Fx Arktiske rhizobiumstammer, (Jain & Bordeleau, 1990)

<sup>5</sup> E.g., (Hardy, 1982)

er ikke altid nok nitrogen i jorden, hvilket begrænser planters vækst. Til gengæld findes bakterier, som indeholder enzymet nitrogenase, der kan fikserer  $N_2$  fra luften. Bælgplanter har udviklet sig til at kunne indgå i symbiose med disse bakterier.

Nitrogenfikserende symbiose indledes ved, at planten udsender flavonoider, som inducerer nod-gener hos rhizobiumbakterier (Figur 1). Dette leder til produktionen af nod-faktorer (lipochitooligosakkarider, også kaldt LCO'er), der opfanges af NFR1- og NFR5-receptorer på bælgplanten. Det fører til en deformation af rodhårene, der optager bakteriecellerne gennem infection threads (IF), produceret af bakterierne (Choudhury, et al. 2019). Samtidig fører receptorsignalerne til en vækst af planteceller ved de inficerede rodhår. Dermed danner planten rodkolde om bakterierne, og begge parter indgår i en endosymbiose.

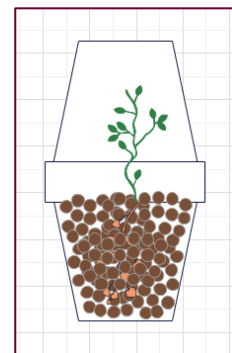
Man kan måle effektiviteten af nitrogenfiksering med acetylenreduktionsanalyse. Princippet er, at det enzym, der fikserer nitrogen (nitrogenase), også kan omdanne acetylen til ethylen, hvis mængde kan måles præcist med gaskromatografi. Det foregår ved, at afskårne rodknolde eller et noduleret rodsystem<sup>6</sup> udsættes for acetylen på gasform i en lufttæt beholder, se figur 2. Deri vil nitrogenasen i de inficerede rodknolde omdanne acetylen til ethylen. Det er mest optimalt at anvende et helt rodsystem til denne metode, fordi de afskårne rodknolde let tørrer ud.



Figur 2 illustrerer acetylenreduktionsanalyse simpelt. Egen tilvirkning via Wondershare EdrawMax.

En af de metoder jeg benytter, hedder et 'magentaforsøg', hvor man dyrker en plante i en lukket beholder og måler dens vækst. Magenta er navnet på den beholder, som frøene plantes i og er omkring 20 cm høj. Beholderen består af to identiske dele med et lufttæt sejl imellem, se figur 3. De to identiske dele er hver ca. 10 cm høje. Ved et magentaforsøg fyldes magentabeholderen med leca, medie og podemateriale, hvorefter de sterile frø plantes. Magentaforsøg benyttes ofte med små og/eller spirende planter (se evt. billeder i bilag 1).

Jeg benytter også åbne pottforsøg. Pottestørrelsen kan variere, men i dette tilfælde anvendes 2 liters pottes med leca, medie og podemateriale. Beholderen er, i modsætning til magentaforsøget, ikke lufttæt. Dermed er der ikke fugtbevarelse på samme måde, men i stedet tilføres vand fra store 2m x 1m bakker. Åbne pottforsøg benyttes ofte med store planter, f.eks. sainfoin.



Figur 3 illustrerer en magentabeholder med en plante i leca. Egen tilvirkning via Wondershare EdrawMax.

<sup>6</sup> Et rodsystem med rodknolde. Rodknolde kaldes også for noder efter det engelske 'nodules'.

## Forskningsdesign

I begyndelsen af min proces var min tilgang meget induktiv: Efter at have læst den litteratur, der var relevant for mit forskningsspørgsmål, opstillede jeg et pilotforsøg (bilag 1). Det forsøg havde til formål at indsamle empiri om sainfoins kompatibilitet med den anvendte metode ift. etablering af en effektiv symbiose, da denne empiri mangler i den internationale litteratur. Efter behandling af pilotforsøgets data, der opbyggede et stærkere vidensfundament, skiftede jeg tilgang. Resten af mit forskningsdesign er deduktivt: Ud fra mit nye vidensfundament har jeg opstillet den hypotese, som mit forsøg undersøger. Dette forskningsdesign opstod bl.a. ud af nødvendighed, fordi der ikke var nok relevant empiri til at opstille en velbegrunderet hypotese. Jeg fik lov til at udføre mit eksperimentelle arbejde på Aarhus Universitets institut for Molekylærbiologi og Genteknologi.

I dette projekt vil jeg først redegøre for min hypotese med afsæt i den empiri, der kommer fra pilotforsøget. I det deduktive forsøg, der afprøver denne hypotese, vil jeg indsamle data om prøvernes sundhedsmarkører<sup>7</sup> og behandle dem kvantitativt. Så vil jeg indsamle data om nitrogenfikseringens effektivitet ved hver prøve, samt hvilke bakterier, der har inficeret knoldene. Derefter vil jeg undersøge, om de isolerede bakterier kan gentage succesen. Endelig vil jeg konkludere på baggrund af alle indsamlede data og analyser.

## Hypotese

Jordprøvernes tidligere historik med bælgplanter påvirker deres mulighed for at have de relevante bakterier og dermed at kunne facilitere den nitrogenfikserende symbiose (Frame, 2005). Det skyldes, at bakterierne frigives til jorden, når plantens rødder er nedbrudt. Bakterierne lever dog ikke lige godt i de forskellige jordtyper, hvilket skyldes fugtbevaringen (Persina, et al., 2018). Lerede jorde har større vandkapacitet og højere næringsindhold end sandede jorde, hvorfor bakterierne kan overleve der i længere tid (Yang, et al. 2022). Samtidig tyder resultaterne fra pilotforsøget på, at den sandede jordtype er mindst effektiv. Min hypotese går derfor på, at jordprøver med en rig bælgplantehistorik og en leret jordtype fungerer bedst. Dermed forventer jeg også, at konventionel markjord ikke er optimalt til at dyrke nitrogenfikserende sainfoin, eftersom monokulturel dyrkning og gødning mindsker den mikrobielle biodiversitet (Hartmann, et al. 2015).

I det kommende forsøg sammenligner jeg de to lande, hvis resultater var mest forskellige i pilotforsøget (tysk NPZ-jord og begge danske jordprøver), men jeg forventer at forskellen mellem landene er mindre i dette forsøg. Det skyldes, at forsøget inkluderer flere jordprøver fra samme land, både dyrket og ikke-dyrket jord, og dermed en større varians i jordtyper fra begge lande. Min hypotese er understøttet af Persina, et al. (2018) der viser, at der er en større sammenhæng mellem mikrobiomen i samme jordtype end i samme geografiske lokation.

Eftersom det kun var den tyske NPZ-jordprøve, hvor sainfoin dannede rodknolde under mit pilotforsøg, forventer jeg, at denne jord havde mest optimale betingelser for etableringen af den nitrogenfikserende symbiose. Derfor går min hypotese også på, at nitrogenfikseringen er mest effektiv ved de prøver, der indeholder meget lidt nitrogen og ellers har høje fosfor-, kalium- og magnesiumniveauer, samt en pH-værdi mellem 6 og 6,5. Dermed følger det, at jeg forventer en mere

---

<sup>7</sup> Fysiske tegn på næringsstofmangel og vækst.

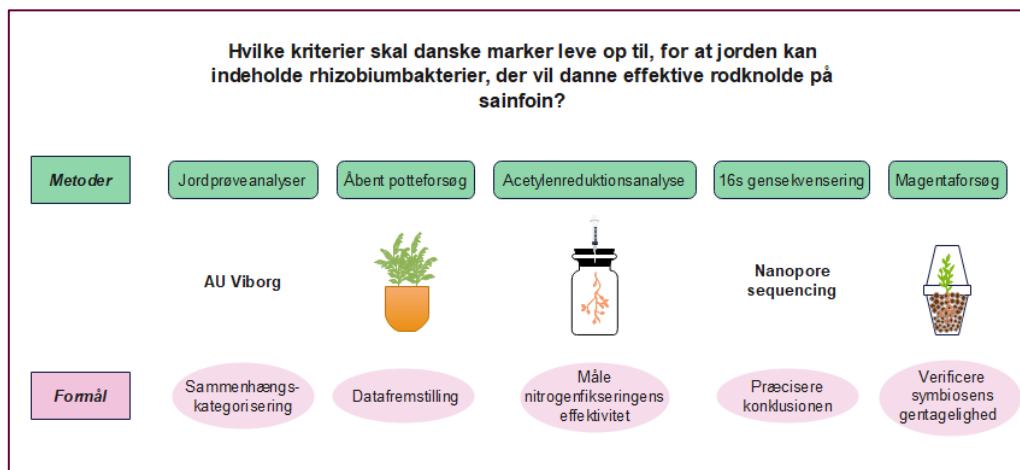


effektiv nitrogenfiksering fra de prøver, der er podet med ikke-dyrket jord, fordi dyrket jord antages at have færre tilgængelige næringsstoffer<sup>8</sup>.

Ifølge Dr. Ewald Sieverding (Personlig kommunikation, 1. september 2024) er der delte meninger om, hvor vidt sainfoin kun nitrogenfikserer med specifikke rhizobiumstammer eller ej (e.g. Ashrafi, et al., 2022). På baggrund af dette og pilotforsøget forventer jeg, at 16s gensekvenseringen viser op til 5 forskellige bakteriearter isoleret fra sainfoins rodknolde i alt<sup>9</sup>. Baseret på mit pilotforsøg forventer jeg, at der højest er 3 forskellige slags bakterier pr rodknold.

## Forsøgsdesign

Først analyseres jordprøverne hos Jim Rasmussen (AU Viborg) for centrale parametre, som bruges i efterbehandlingen af forsøget til at finde forskelle og ligheder mellem prøverne og drage konklusioner om optimale jordkriterier. Dernæst udføres et åbent potteforsøg hos Jens Stougaard (AU Aarhus), der undersøger udbredelsen af relevante bakterier i dansk og tysk jord. Efter det undersøges effektiviteten af hver prøves nitrogenfiksering med acetylenreduktionsanalyse. Acetylenreduktionsanalysen udføres på dette tidspunkt, fordi rodknoldene er intakte i denne proces. Så vil jeg isolere bakterierne fra rodknoldene og opdyrke dem, hvorefter de sendes til 16s gensekvensering hos Nanopore Sequencing. Til sidst kvalitetstjekker jeg resultaterne med et magenta forsøg, der undersøger om bakterierne kan inducere rodknolde igen.



Figur 4 illustrerer mit forskningsspørgsmål og de metoder jeg har valgt at benytte i mit forsøg, samt deres formål. Egen tilvirkning via Wondershare EdrawMax.

I forsøget har jeg valgt at sammenligne dansk og tysk jord, eftersom det var de to jordprøver, der havde mest forskellige resultater under pilotforsøget. Fra hvert land vil jeg indsamle 2 jordprøver fra 2 forskellige marker: én økologisk og én konventionel, som tilegnes via min forskerkontakt Jim Rasmussen (De Notaris, et al., 2021). Fra hvert land vil jeg også indsamle 2 prøver jord fra et ikke-dyrket areal<sup>10</sup>, der vil blive brugt som en naturlig reference. De to jordprøver vil have forskellig jordtype, men vil være konsekvente på tværs af landene.

<sup>8</sup> Næringsstoffer, der ikke er på den form planten kan optage. Kan skyldes pH-værdi, mængde af organisk materiale og mikrobiel aktivitet.

<sup>9</sup> Under litteraturlæsning fandt jeg 3 artikler med kendte rhizobiumstammer, der kunne nitrogenfikserer med sainfoin, (Jain & Bordeleau, 1990), (Prevost, Bordeleau, & Antoun, 1987), (Ashrafi, et al., 2022).

<sup>10</sup> I dette tilfælde defineres ikke-dyrket som mindst 10 år uden landbrugsdrift.

I forsøget benytter jeg både åbne potter og magentabeholdere. De åbne potter benyttes for at give planterne plads og tid til at vokse. Magentabeholderne benyttes i den sidste del af forsøget for at undersøge om bakterierne kan inficere rodknolde igen. Her anvender jeg magentabeholdere, fordi den nødvendige plantevækst<sup>11</sup> er mindre.

Jeg benytter acetylenreduktionsanalyse, fordi det er en analysemetode, der måler nitrogenfikseringens effektivitet, hvilket er afgørende for sainfoins anvendelighed som selvgødende plante i dansk landbrug. Acetylenreduktionsanalyse måler dog ikke mængden af fikseret N<sub>2</sub>.

Jeg har valgt at benytte 16s gensekvensering, fordi det gør det muligt at drage en præcis konklusion om, hvilke bakterier, der både kan findes i jordene og indgår i nitrogenfikserende symbiose med sainfoin.

Den fulde forsøgsvejledning kan læses som bilag 5.

## Budget og tid

Produkt	Udbyder	Pris Oprindeligt	Pris Sat af i alt (kr)	Formål
Jordprøveanalyse	AU Viborg	1000 kr pr. prøve	8.000 kr.	Analyse og konklusion
Acetylenreduktionsanalyse	AU Aarhus		500 kr.	Analyse og konklusion
16s gensekvensering	Nanopore sequencing		5.000 kr.	Analyse og konklusion
Tysk inokulum	RHIZO-MIC GmbH	100£ + forsendelse	2.000 kr.	Positiv kontrol
Transport (5 besøg)	DSB	90 kr pr togtur	900 kr.	
<b>I alt:</b>			16.400 kr.	

Tabel 1: Ovenstående illustrerer forsøgets udgifter. Bemærk at nogle tal er rundet op. Egen tilvirkning.

Resten af det nødvendige udstyr og kemikalier låner jeg af Aarhus Universitet uden betaling.

Metode	Tid Opstart	Tid Ventetid	Tid I alt
Jordprøveanalyse			
Åbent pottforsøg	Under en dag	2-3 måneder	2-3 måneder
Acetylenreduktionsanalyse	1 dag	0 dage	1 dag
Isolering og opdyrkning af bakterier		1 uge	1 uge
16s gensekvensering	1 dag	<41 dage	Ubetydelig
Magentaforsøg		40 dage	41 dage
<b>I alt:</b>			4 måneder og 18 dage

Tabel 2: Ovenstående viser, hvor lang tid forsøget kommer til at tage. Tabellen forklarer at det fulde forsøg tager 4 måneder og 18 dage. Derudover vil der gå tid med databehandling og afrapportering. Bemærk at det ikke vides, hvor lang tid der går, før jeg får gensekvenseringens resultater. Egen tilvirkning.

<sup>11</sup> Den plantevækst, der forekommer inden dannelsen af inficerede rodknolde.



## Konklusion og perspektivering

Projektet undersøger Sainfoins evne til at nitrogenfikserer i danske jorde sammenlignet med tyske jorde. I undersøgelsen er der fokus på udbredelsen af de bakterier, der kan indgå i symbiosen, samt nitrogenfikseringens effektivitet. Jeg forventer, at forsøgets resultater bekræfter, at økologiske marker og ikke-dyrkede arealer med leret jord er optimale for induceringen af sainfoins nitrogenfiksering. Derudover skulle resultaterne gerne skabe ny viden, der taler for implementeringen af sainfoin i dansk landbrug.

Hvis jeg havde mulighed for at undersøge denne problemstilling over flere år, ville det bl.a. være interessant at opskalere til et markforsøg. Jeg ville også undersøge forskellige variabelers indflydelse på effektiviteten, f.eks. CO<sub>2</sub>-tilgængeligheden, brug af tiophanatmethyl eller sammenplantning med en ikke-aggressiv græsart.

## Anerkendelse

Dette projekt er lavet i samarbejde med mine tre forskerkontakter: Professor Jens Stougaard hos Aarhus Universitets Institut for Molekylærbiologi og Genteknologi, Seniorforsker Jim Rasmussen hos Aarhus Universitets Institut for Agroøkologi, samt Professor Kristian Thorup-Kristensen hos København Universitets Institut for Plante- og Miljøvidenskab. Jeg vil gerne uddele tak til alle tre, især for behjælpeligheden med mit eksperimentelle arbejde. I den forbindelse vil jeg også uddele tak til Huijun Liu og Caitlan Smart - begge er Postdoc hos Aarhus Universitet - for at hjælpe mig, da jeg var i laboratoriet. Også en stor tak til alle andre i forskergruppen, der gjorde det rart at udføre forsøg hos dem.

En særlig tak til min familie, min vejleder Sofija Frandsen og alle de andre spirer.

## Litteraturliste

- Ashrafi, S., Kuzmanovic, N., Patz, S., Lohwasser, U., Bunk, B., Spröer, C., . . . Thünen, T. (August 2022). Two New Rhizobiales Species Isolated from Root Nodules of Common Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Show Different Plant Colonization Strategies. *American society for Microbiology - Microbiology Spectrum*.
- Blesh, J. (Juli 2019). Feedbacks between nitrogen fixation and soil organic matter increase ecosystem functions in diversified agroecosystems. *ESA - Ecological Society of America*.
- Brøndum, P., Jensen, E., Sestoft, A. I., & Strømgaard, P. (2006). Fra natur til kultur: økosystemer og bæredygtige landbrugsudvikling. I T. Andersen, H. Brande-Lavridsen, P. Brøndum, K.-E. Christensen, K. Habicht, H. S. Hansen, . . . P. Strømgaard, *Geografihåndbogen* (s. 284-285). Systime.
- Choudhury, S. R., Johns, S. M., & Pandey, S. (5. April 2019). A convenient, soil-free method for the production of root nodules in soybean to study the effects of exogenous additives. *Plant direct*.
- Craine, E. B., Şakiroglu, M., Peters, T. E., Barriball, S., & Schlautman, B. (27. Januar 2023). Nutritional quality of *Onobrychis viciifolia* (Scop.) seeds: A. *Wiley - Legume Science*, s. 2-7, 10-11.

- De Notaris, C., Jensen, J. L., Olesen, J. E., da Silva, T. S., Rasmussen, J., Panagea, I., & Rubæk, G. H. (2021). Long-term soil quality effects of soil and crop management in organic and. *Geoderma*.
- Frame, J. (2005). *Forage Legumes for Temperate Grasslands*. CRC Press.
- Hardy, R. W. (1982). Nitrogen Fixation and Crop Productivity. I *Handbook of Agricultural Productivity* (s. 14). CRC Press.
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., & Wimer, F. (Maj 2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISMO Journal*.
- Jain, D. K., & Bordeleau, L. M. (1990). Enhanced N<sub>2</sub>-fixing ability of a deletion mutant of arctic rhizobia. *TAG - Theoretical and Applied Genetics*, s. 1.
- Kapp-Bitter, A. N., Dickhoefer, U., Kaptijn, G., Pedan, V., Perler, E., Kreuzer, M., & Leiber, F. (Juni 2021). On-farm examination of sainfoin supplementation effects in dairy cows in a roughage-based feeding system: Indicators of protein utilisation. *Livestock Science*.
- Miljø- og fødevarerudvalget. (2017). *Sådan ligger landet - tal om landbruget 2017*.
- Newton, P., Civita, N., Frankel-Goldwater, L., Bartel, K., & Johns, C. (Oktober 2020). What Is Regenerative Agriculture? A Review of Scholar and Practitioner Definitions Based on Processes and Outcomes. *frontiers*.
- Pershina, E. V., Ivanova, E. A., Korvigo, I. O., Chirak, E. L., Sergaliev, N. H., Abakumov, E. V., . . . Andronov, E. E. (1. August 2018). Investigation of the core microbiome in main soil types from the East European plain. *Science of The total Environment*, s. 631-632.
- Prevost, D., Bordeleau, L., & Antoun, H. (1987). Symbiotic effectiveness of indigenous arctic rhizobia on a temperate forage. *Plant and soil*, Martinus Nijhoff Publishers, .
- Rübsam, H., Krönauer, C., Abel, N. B., Ji, H., Lironi, D., Hansen, S. B., . . . Andersen, K. R. (Januar 2023). Nanobody-driven signaling reveals the core receptor. *Plant Science*.
- Sakhraoui, A., Ltaeif, H. B., Sakhraoui, A., Rouz, S., & Castillo, J. M. (20. August 2023). Potential use of wild *Onobrychis* species for climate change. *Crop Science*.
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Reviews*, s. 34-38.
- Sieverding, E. (September 2024). (P. kommunikation, Interviewer)
- Wang, Y., McAllister, T. A., & Acharya, S. (Januar 2015). Condensed Tannins in Sainfoin: Composition, Concentration, and Effects on Nutritive and Feeding Value of Sainfoin Forage. *Crop science* , s. 13-22.
- Yang, Z., Chen, X., Hou, J., Liu, H., & Tan, W. (October 2022). Soil texture and pH exhibit important effects on biological nitrogen fixation in paddy soil. *Applied Soil Ecology*.

## Bilag

### 1: Journal for pilotforsøg

26-08-24 og 30-09-24

#### FORMÅL

Formålet med dette forsøg er at indsamle viden og forståelse for esparsetteplantens egenskaber i relevante forsøg. De undersøgte emner er følgende:

- Esparsetteplantens kompatibilitet med magentaforsøg
- Om der forekommer både inficerede og uinficerede rodknolde på esparsetteplanten
- Vigtigheden af frøenes skal for steriliseringen og dannelse af rodknolde
- Symbiosens effektivitet ved podning m. jord versus bakterieopløsning
- Symbiosens effektivitet i gødet vs. ikke-gødet jord
- Symbiosens effektivitet i forskellige europæiske jordprøver.

#### METODER

Sterilisering af frø:

Frøene steriliseres for at kontrollere variabler. Frøene slibes først for at fremskynde spiringsprocessen. Derudover fjerner det skallen på esparsettefrøene, der ellers ikke er arbejdet med frø. De frø, der stadig har skallen på, er muligvis ikke sterile indeni.

Podning og plantning:

Der plantes 10 frø pr. jordprøve eller bakterieopløsning for at mindske usikkerheders betydning. Bakterierprøverne er isoleret fra rodknolde på en esparsetteplante. Jordprøverne fra Spanien og Frankrig havde hårdere jord, hvorfor den var mindre ligeligt fordelt i lecaen.

Der tilføjes ekstra fugt til prøverne, der er podet med jord for at vedligeholde fugtniveauet.

#### MATERIALER

26-08-24:

- 22 sterile Magenta-beholdere
- N<sub>2</sub>-fattigt leca (lerkugler)
- B&D medie (indeholder ikke nitrogen)
- Ca. 160 esparsettefrø
- 1% Sodium hypochlorite
- Demineraliseret vand
- 3 ukendte bakterier isoleret fra en esparsetteplantens rodknolde
- 5 europæiske (ikke danske) jordprøver
  - o IFAPA (Spanien, 03/07/24)
  - o IFAPA (Spanien, 2019)
  - o RAGT (Frankrig, 2019)
  - o SEVILLA (Spanien, 2019)
  - o NPZ (Tyskland, 2024)
- 2 danske jordprøver
  - o NPK (Askov, gødet siden 1800-tallet)
  - o UF (Askov, ugødet i over 100 år)
- Mikropipetter
- Engangsskeer, der måler 2g
- 10 mL målekolbe
- Handsker
- Ethanol til flambering
- Bunsenbrænder

30-09-24:

- Magenta prøver
- 10 firkantede plader u. agar (1 pr jord- /bakterieprøve)
- Kasse til leca
- Vand
- 70% ethanol
- 3% NaClO<sub>2</sub> (sodium hypochlorite)
- Sterilt demivand
- 50 mL falcon tubes
- 96-well plate
- 8 små YMB agar plader
- Drigelski spatel og ethanol til flambering
- Bunsenbrænder
- Skalpel
- Handsker
- Mikroskop

### SIKKERHED/STERILT MILJØ

Forsøget er udført på Aarhus Universitets institut for molekylærbiologi og genetik med adgang til både sterilskebe, autoklaverede materialer og hjælpsomme personer.

### FREMGANGSMÅDE

26-08-24:

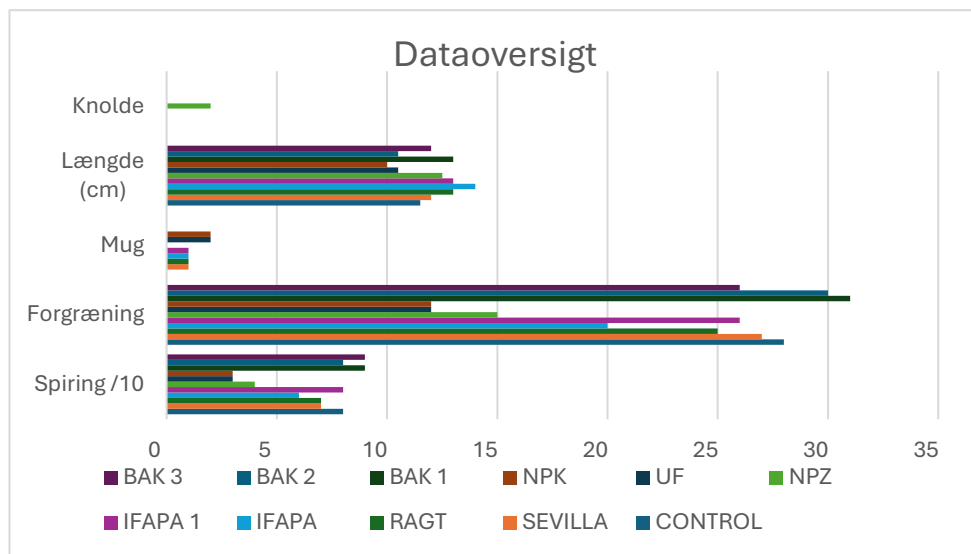
1. Frøene slibes m. sandpapir (i hånden) indtil de yderste skaller falder af. Nogen af frøene beholdes m. skal på for at undersøge om denne procedure er nødvendig.
2. Alle frø steriliseres v. omrystning i 1% NaClO<sub>2</sub> i 20 min.
3. Efter omrystning skylles frøene med demivand ad 6 omgange. Herefter er frøene sterile.
4. En magentabeholder podes med en 2g fra en jordprøve - disse er forberedt på forhånd med leca, medie og mærkater. Jordet fordeles ligeligt i det øverste lag leca.
5. 5 frø plantes ca. 1 cm fra overfladen: ét frø med skal plantes i midten, fire uden skal plantes i hjørnerne med en i hvert hjørne.
6. Der tilføres 5 mL ekstra B&D medie som fugt til magentabeholderen.
7. Step 5-7 gentages med 15 andre magentabeholdere. Der er to magentabeholdere pr. jordprøve for at mindske potentielle usikkerheders betydning.
8. En magentabeholder podes med 2 mL bakterieopløsning. Bakterieopløsningen fordeles ligeligt i det øverste lag leca.
9. 5 frø plantes ca. 1 cm fra overfladen: ét frø med skal plantes i midten, fire uden skal plantes i hjørnerne med en i hvert hjørne.
10. Step 9 og 10 gentages med 5 andre magentabeholdere. Der er to magentabeholdere per bakterieopløsning.
11. Alle magentabeholderne er lukkede og lufttætte. De placeres i et planterum i 35 dage.

30-09-24:

- Data om antal spirede frø, branching og mug indsamles. Det noteres, at kontrollen ikke virker til at mangle næring.
- 10 firkantede agarplader forberedes med vand i bunden.
- Magenta-beholderne tømmes én for én og rødderne tjekkes grundigt for knolde. Planter, der er podet med samme prøve lægges i samme firkantede agarplade.
- Det højeste skud per plante måles og noteres.
- Plante(r) med rodknolde placeres på separat plade. Knoldene fjernes forsigtigt fra stilken med en skalpel og placeres i hver sin falcon tube. Det er vigtigt, at der ikke kommer for meget rod med og/eller går hul på knolden.

- Knoldene overfladesteriliseres i 70% ethanol ved 1 minuts rystning. Ethanol fjernes.
- Knoldene overfladesteriliseres med 3% NaClO<sub>2</sub> ved 90 sekunders rystning.
- Sodium hypochlorite fjernes og knoldene vaskes 5 gange i sterilt demivand.
- Knoldene overføres til en 96-well plate, hvor de knuses i 100µL sterilt demivand i hver deres brønd.
- Ud fra hver af opløsningerne dannes en 10-foldsfortyndingsrække op til 10<sup>-3</sup>. Opløsningerne er altid adskilte.
- 50 µL af fortyndingerne og stamopløsningerne spredes på hver sin lille YMB-agarplade.
- Agarpladerne inkuberes ved 28°C i 6-7 dage, hvorefter resultaterne vurderes.

## RESULTATER



Det observeres, at der kun dannes knolde ved NPZ jordprøven. Den udmærker sig ikke synderligt ved alle de fysiske tegn på en sund plante, men har dannet 2 rodknolde. (Markeret med ringe på s. 4)

Det observeres, at de to danske jordprøver, UF og NPK scorer lavest på alle de fysiske tegn for en sund plante og havde mest mug (målt i antal tilfælde i de to magentaer).

Planternes længder er generelt flotte og var nærmest ikke begyndt at visne og blive gullige (tegn på N<sub>2</sub>-mangel - se billeder). Det antages derfor, at der har været tilstrækkelig N<sub>2</sub> i frøene til at planterne kunne vokse sig så store.

Det observeres, at der ikke var nogen betydelig forskel på plantens vækst ift. om frøene havde skal eller ej.



Figur 5: Ovenstående to billeder illustrerer de danske prøver i magentaen. UF er ugødet jord og NPK er gødet jord. Egen tilvirkning.



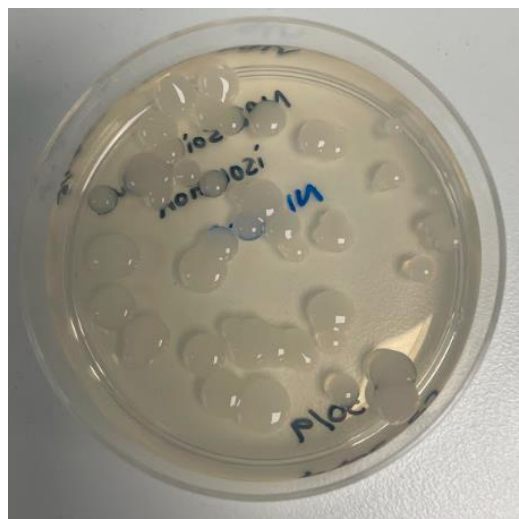
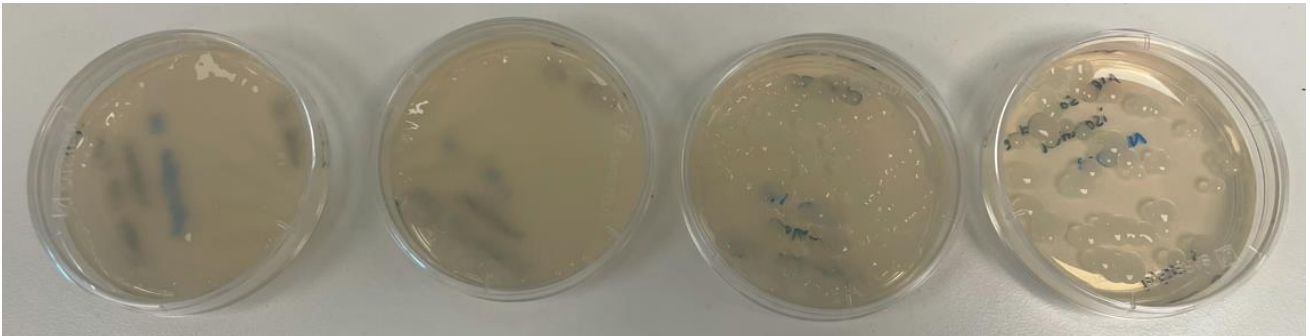
Figur 6: Ovenstående billeder sammenligner de danske prøver (venstre) med de andre prøver (højre) udenfor magentabeholderen. Egen tilvirkning.



Figur 7: Ovenstående billeder illustrerer de to fundne rodknolde (venstre) og kontrollen (højre). Egen tilvirkning.



Ved sammenligning af rødderne podet m. dansk jord (midterste billede i venstre kolonne) og de andre rødder observeres der, at planterne har tap roots. Dette betyder at der er en primær rod som forgrener sig til resten af rodsystemet. Dette medfører, at der går længere tid inden dannelsen af rodknolde.



Der er kun vokset bakterier på pladespredningerne fra den ene rodknold (den store). Bakterievæksten fra rodknoldene ser ud til kun at indeholde en slags bakterie. Symbiosen har derfor været succesfuld i dette ene tilfælde.

Det observeres, at det var den store rodknold der havde en succesfuld symbiose. Den lille rodknold var uinficeret, hvilket enten kan tyde på, at den ikke var lige så gammel som den store rodknold eller at der forekommer uinficerede rodknolde hos esparsette. Dermed stilles spørgsmålet: Afhænger esparsettes nitrogenfiksering kun af de faktorer vi har undersøgt indtil videre eller er der en andel af de oprettede knolde, der ikke inficeres?



## 2: Datasæt ark 1 (behandling af pilotforsøg)

CONTROL	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	3	Nej	11,5 cm	0
Frø 2	ja	3			
Frø 3	ja	3,00			
Frø 4	ja	4,00			
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	4			
Frø 8	ja	4			
Frø 9	ja	3			
Frø 10					
<b>I alt:</b>	8/10	28			

IFAPA	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Ja	14 cm	0
Frø 2	ja	3			
Frø 3	ja	4,00			
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	3			
Frø 8	ja	2			
Frø 9					
Frø 10					
<b>I alt:</b>	6/10	20			

IFAPA 1	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	3	Ja	13 cm	0
Frø 2	ja	3			
Frø 3	ja	3,00			
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	3			
Frø 8	ja	3			
Frø 9	ja	3			
Frø 10	ja	4			
<b>I alt:</b>	8/10	26			

Skitse af forsøgsdesign m. opklarende spørgsmål

SEVILLA	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Ja	12 cm	0
Frø 2	ja	3			
Frø 3	ja	4,00			
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	5			
Frø 8	ja	3			
Frø 9	ja	4			
Frø 10					
<b>I alt:</b>	7/10	27			

RAGT	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Ja	13 cm	0
Frø 2	ja	4			
Frø 3	ja	4,00			
Frø 4	ja	3,00			
Frø 5					
Frø 6	ja	3,00	Nej		
Frø 7	ja	3			
Frø 8	ja	4			
Frø 9					
Frø 10					
<b>I alt:</b>	7/10	25			

NPZ	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Nej	12,5 cm	2
Frø 2	ja	4			
Frø 3					
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	3,00	Nej		
Frø 7	ja	4			
Frø 8					
Frø 9					
Frø 10					
<b>I alt:</b>	4/10	15			

Skitse af forsøgsdesign m. opklarende spørgsmål

UF	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Ja	10,5 cm	0
Frø 2	ja	4			
Frø 3					
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Ja		
Frø 7					
Frø 8					
Frø 9					
Frø 10					
<b>I alt:</b>	3/10	12			

NPK	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Ja	10 cm	0
Frø 2	ja	4			
Frø 3					
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Ja		
Frø 7					
Frø 8					
Frø 9					
Frø 10					
<b>I alt:</b>	3/10	12			

BAK 1	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	4	Nej	13 cm	0
Frø 2	ja	4			
Frø 3	ja	3,00			
Frø 4	ja	3,00			
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	4			
Frø 8	ja	3			
Frø 9	ja	5			
Frø 10	ja	1			
<b>I alt:</b>	9/10	31			

BAK 2	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	3	Nej	10,5 cm	0
Frø 2	ja	3			
Frø 3	ja	4,00			
Frø 4					
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	5			
Frø 8	ja	4			
Frø 9	ja	4			
Frø 10	ja	3			
<b>I alt:</b>	8/10	30			

BAK 3	Spiret	Forgrening	Mug	Længde (cm)	Knolde
Frø 1	ja	2	Nej	12 cm	0
Frø 2	ja	5			
Frø 3	ja	3,00			
Frø 4	ja	4,00			
Frø 5					
Frø 6	ja	4,00	Nej		
Frø 7	ja	2			
Frø 8	ja	2			
Frø 9	ja	3			
Frø 10	ja	1			
<b>I alt:</b>	9/10	26			

Tabel 3: Ovenstående tabeller har til formål at fremstille de indsamlede data fra pilotforsøget præcist. Egen tilvirkning.

### 3: Datasæt ark 2 (behandling af pilotforsøg)

	Spiring /10	Forgrening	Mug	Længde [cm]	Knolde
CONTROL	8	28	0	11,5	0
SEVILLA	7	27	1	12,0	0
RAGT	7	25	1	13,0	0
IFAPA	6	20	1	14,0	0
IFAPA 1	8	26	1	13,0	0
NPZ	4	15	0	12,5	2
UF	3	12	2	10,5	0
NPK	3	12	2	10,0	0
BAK 1	9	31	0	13,0	0
BAK 2	8	30	0	10,5	0
BAK 3	9	26	0	12,0	0

Tabel 4: Ovenstående tabel har til formål at sammenligne data fra alle prøverne. Egen tilvirkning.

## 4: Analyse af jordprøver

Country	Site	Rt (pH in aq)	Total N	P	K	Mg	Organic material	Soil type
			%	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	%	
Spain	IFAPA (2019)	7,9	0,08	1,8	19	16	0,9	Clayey
Spain	IFAPA (2024)	7,8	0,2	1,5	21	42	3,28	Clayey
Spain	SEVILL A (2019)	7,9	0,13	1,1	17	21	1,9	Heavy Clayey/ Silty
Germany	NPZ (2024)	6,7	0,14	3,7	19	11	2,18	Sandy Clayey
France	RAGT (2019)	6,8	0,11	4,1	18	12	2	Clayey
Denmark	UF	6,4	0,09	<0,4	2,3	4,7	1,92	Sandy
Denmark	NPK	6,2	0,11	1,5	11	5,1	2,34	Sandy

Tabel 5: Ovenstående tabel illustrerer de relevante og givne data for jordprøverne benyttet i pilotforsøget. Egen tilvirkning ved hjælp af kontakt til forskningscentrene.

## 5: Forsøgsvejledning

### MATERIALER

#### Podning og opstart

- Sainfoin frø (6 pr potte)
- 2L åbne potter (2 pr jordprøve + 2 kontrol)
- N<sub>2</sub>-fattigt leca (lerkugler)
- B&D medie (200 mL pr potte)
- 1% Sodium hypochlorite
- Demineraliseret vand
- 3 ukendte bakterier isoleret fra en esparsetteplantes rodknolde
- Mikropipetter
- Handsker
- Ethanol til flambering
- Bunsenbrænder
- Sterilt vand til blanding af inokulum
- Danske jordprøver
  - Ugødet dansk markjord
  - Gødet dansk markjord
  - 2-3 forskellige prøver m. forskellige jordtyper fra et ikke-dyrket areal.
- Tyske Jordprøver
  - Ugødet tysk markjord
  - Gødet tysk markjord
  - 2-3 forskellige prøver m. forskellige jordtyper fra et ikke-dyrket areal.

#### Efterbehandling

- Udstyr til acetylenreduktionsanalyse
  - GCMS
  - Beholder til rodsystemet
  - Acetylen på gasform
  - Slange med nåletilpasning
  - Målekolbe med ærmegab og passende størrelse
  - Gasopsamlingspose
  - 1000 µL pipette
  - Gastætte sprøjter med 2-vejs stophaner

- Sprøjtenåle
- 70% ethanol
- 3% NaClO<sub>2</sub> (sodium hypochlorite)
- Sterilt demivand
- 50 mL falcon tubes
- 96-well plate
- Små YMB agar plader
- Drigelski spatel og ethanol til flambering
- Bunsenbrænder
- Skalpel
- Handsker
- Mikroskop
- Udstyr til 16s gensekvensering
- Udstyr til magentaforsøg
- Ukendt antal sterile Magenta-beholdere. 2 per bakterieopløsning.
- N<sub>2</sub>-fattigt leca (lerkugler)
- B&D medie (indeholder ikke nitrogen)
- Ukendt antal sainfoinfrø. 5 per magenta.
- 1% Sodium hypochlorite
- Demineraliseret vand
- Mikropipetter
- 10 mL målekolbe
- Handsker
- Ethanol til flambering
- Bunsenbrænder
- Bakterieopløsninger af de isolerede bakterier.

#### FREMGANGSMÅDE

1. Jordprøver analyseres. pH, N-indhold, K-indhold, Mg-indhold, jordtype og mængden af organisk materiale er relevant.
2. Frø slibes
3. Alle frø steriliseres v. omrystning i 1% NaCO<sub>2</sub> i 20 min.
4. Efter omrystning skylles frøene med demivand ad 6 omgange. Herefter er frøene sterile.
5. 16 2L åbne potter forberedes med leca, medie og mærker. 2 potter pr prøve.
  - a. Potterne er autoklaveret og fyldes med tilstrækkeligt leca og 200 mL medie.
6. 1g fra en jordprøve blandes med 10 mL sterilt vand, hvilket danner et inokulum.
7. En åben potte podes med 1 mL af inokulumet, der fordeles ligeligt i det øverste lag leca.
8. 6 frø plantes ca. 1 cm fra overfladen i hver potte.
9. Step 6-8 gentages med 15 andre åbne potter. Der er to potter pr jordprøve.
10. De åbne potter placeres i et planterum i 2-3 måneder (evt fra november til januar)
11. Data om antal spirede frø, branching og mug indsamles til sammenligning.
12. Planterne "høstes" og det højeste skud per plante måles og noteres.
13. Acetylenreduktionsanalyse udføres på de planter, der har rodknolde. Data indsamles.
14. Plante(r) med rodknolde placeres på separat plade. Knoldene fjernes forsigtigt fra stilken med en skalpel og placeres i hver sin falcon tube. Det er vigtigt, at der ikke kommer for meget rod med og/eller går hul på knolden.
15. Knoldene overfladesteriliseres i 70% ethanol ved 1 minuts rystning. Ethanol fjernes.
16. Knoldene overfladesteriliseres med 3% NaClO<sub>2</sub> ved 90 sekunders rystning.
17. Sodium hypochlorite fjernes og knoldene vaskes 5 gange i sterilt demivand.
18. Knoldene overføres til en 96-well plate, hvor de knuses i 100µL sterilt demivand i hver deres brønd.
19. Ud fra hver af opløsningerne dannes en 10-foldsfortyndingsrække op til 10<sup>-3</sup>. Opløsningerne er altid adskilte.
20. 50 µL af fortyndingerne og stamopløsningerne spredes på hver sin lille YMB-agarplade.
21. Agarpladerne inkuberes ved 28°C i 6-7 dage.

22. De isolerede bakterier sendes til 16s gensekvensering med Aarhus Universitets regelmæssige forsendelser. Ukendt ventetid.
23. Magentabeholdere forberedes med autoklaveret leca, medie og mærkater.
24. En magentabeholder podes med 2 mL bakterieopløsning. Bakterieopløsningen fordeles ligeligt i det øverste lag leca.
25. 5 frø plantes ca. 1 cm fra overfladen: ét frø med skal plantes i midten, fire uden skal plantes i hjørnerne med en i hvert hjørne.
26. Step 9 og 10 gentages med de andre magentabeholdere. Der er to magentabeholdere per bakterieopløsning.
27. Alle magentabeholderne er lukkede og lufttætte. De placeres i et planterum i 35 dage.

#### **EFTERBEHANDLING**

Alle indsamlede data behandles kvantitativt for at undersøge sammenfald hos de succesfulde og fejlede prøver.