

Innehåll av fytoöstrogen i rödklöver (projektnummer H1250090)

Slutrapport till Stiftelsen Lantbruksforskning

Gun Bernes, Annika Höjer, Anne-Maj Gustavsson, Inst. för norrländsk jordbruksvetenskap, SLU Umeå

Bakgrund

Fytoöstrogener (FÖ) är ett samlingsnamn på ämnen som finns i växter och som har en liknande kemisk struktur som könshormoner hos däggdjur. De kan därigenom binda till samma receptorer och blockera eller inducera en reaktion. Intresset för FÖ startade i Australien där problem med fruktsamheten hos tackor kunde relateras till bete av subklöver med hög halt FÖ (Batterham et al., 1965). Hos nötkreatur har man inte funnit samma effekt på fruktsamheten (Lundh et al., 1990). De FÖ som är vanliga i rödklöver tillhör till största delen gruppen isoflavoner, där formononetin är vanligast men även daidzein, biochanin A, prunetin och genistein förekommer. Coumestrol ingår inte i gruppen isoflavoner, men är också en aktiv östrogen substans.

När växter innehållande FÖ utfodras är det bara en liten andel av dem som tas upp med en eventuell östrogen effekt som följd. Det är i huvudsak de som har ombildats från formononetin och daidzein till equol. Equol är ännu mer lik kroppshormonerna och kan därmed ha större effekt (Pfischer et al., 2008). Biochanin A bryts ned till genistein som har lika stor bindningsförmåga till östrogenreceptorerna som equol, men som till stor del bryts ned till icke östrogena substanser. Prunetin har låg östrogen aktivitet. Coumestrol finns i lusern, men har inte ansetts vanlig i rödklöver. I en tidigare studie har vi dock uppmärksammat förekomsten (Bernes et al., 2013).

Hos tackor kan brunsten bli oregelbunden eller utebli när FÖ binder till östrogenreceptorerna (Kelly et al., 1980). Nedsatt ägglossning märktes hos tackor som fått lusern innehållande coumestrol, jämfört med tackor som fått italienskt rajgräs (Ramón et al., 1993). Andra symptom är cystor på äggstockarna och juverförändringar (Adams, 1995). Efter 4-5 månaders kontinuerlig utfodring med rödklöver kan följden bli permanent infertilitet. Det kan dock även finnas fördelar med rödklöver till får då en högre tillväxt setts hos såväl tacklamm som kastrerade bagglamm (Moorby et al., 2004). Det kan delvis bero på klöverns högre proteinhalt, men lammen på klöverbete hade också högst halt tillväxthormon i blodet. Svenska Djurhälsovården rekommenderar att man till tackor kring betäckning och lamning bör ha maximalt 20 % rödklöver i bete och ensilage och 30 % i hö. Även om man inte sett några effekter på fruktsamheten hos mjölkkor kan rödklöverns innehåll av FÖ vara av intresse även i mjölkproduktionen. En studie av Höjer et al. (2012) visade att med foderstater med ett grovfoder innehållande 40 % rödklöver av ts kan innehållet av FÖ, framförallt equol, i mjölken bli förhållandevis högt. Svensk ekologisk konsumtionsmjölk innehåller högre halter av equol, daidzein, formononetin, genistein och biochanin A än konventionell mjölk (Höjer, 2014), troligen beroende på en större användning av rödklöver på ekologiska gårdar. Equol kan hos människa ha flera positiva egenskaper, bland annat kan tillväxten av cancerceller reduceras (Nielsen et al., 2012; Lund et al., 2011).

Innehållet av olika substanser i växter kan påverkas av t ex jordmån, klimat eller dagslängd (Oloumi & Hassibi, 2011; Zheng et al., 2011). Exempelvis fann Seguin och Zheng (2006) skillnader i innehållet av FÖ i lusern mellan olika växtplatser. Resultat från Höjer et al. (manuskript) visar högre koncentration av daidzein och formononetin i rödklöver odlad i Umeå än i Skara. Då man använde olika sorter på de olika försöksplatserna är det dock inte helt klarlagt om det är en skillnad relaterad till växtplats eller sort eller en kombination av båda.

Koncentrationen av FÖ varierar mellan olika växtdelar och utvecklingsstadier (Saviranta et al., 2008). Halterna är högst under vår/försommar och avtar efter blomningen (Adams, 1995). Effekten av skördetid har bekräftats i en studie genomförd i Umeå (Höjer et al., manuskript). Vid skörd 5-6 veckor efter första skörd var koncentrationen av formononetin högre än vid skörd två veckor senare. Koncentrationen av formononetin i rödklöver var i denna studie högre än vad som redovisats av t.ex. Sarelli et al. (2003). Även konserveringsmetoden inverkar (Sivesind & Seguin 2005). Höberedning kan minska halten av FÖ medan inverkan av ensilering är mer omtvistad.

Halten av FÖ kan skilja mellan olika rödklöversorter (Saviranta et al., 2008; Sivesind & Seguin, 2005). I tabell 1 anges halterna av några östrogen aktiva ämnen enligt olika undersökningar, som jämförelse till de resultat som redovisas i denna rapport. Sortvariationer redovisas i vissa länder, exempelvis anger ett brittiskt växtförädlingsföretag i sin sortlista vilka rödklöversorter som har hög respektive låg halt av FÖ för att producenterna ska kunna välja olika sorter till sina får vid olika tillfällen i produktionen. Det vore en fördel om man även på svenska gårdar skulle kunna välja rödklöversort utifrån dess innehåll av FÖ, men här finns inga motsvarande uppgifter.

Syftet med detta projekt har varit att undersöka skillnaderna i förekomst av FÖ i olika rödklöversorter odlade under svenska förhållanden. För att se om eventuella sortskillnader beror på typen av rödklöver valdes såväl tidiga som sena typer från olika länder, och även av olika ploiditet (di- eller tetraploid). Sorterna skulle skördas i samma utvecklingsstadium och på samma breddgrad för att göra resultaten jämförbara. Umeå valdes som växtort eftersom vi tidigare har funnit höga FÖ-värden här. Att några av de provade sorterna använts i tidigare studier på orten gjorde det möjligt att till viss del utvärdera effekterna av årsmån på halten av FÖ.

Tabell 1. Koncentration av fytoöstrogen i rödklöver enligt några olika studier, g/kg ts. Observera att analysmetoderna kan skilja en del.

Sort	Formononetin	Daidzein	Coumestrol	Referens
AberRuby (låg fyto, UK)	1,7	0,050	id ^a	Hoerger et al., 2011
Larus	8,5	0,084	id	- ” -
Tedi	12,5	0,016	id	- ” -
Formica	3,3	ia ^b	ia	Moorby et al, 2004
Astra	4,7	ia	ia	- ” -
Ej angivet	6,8	0,630	0	Mustonen et al., 2006
SW Betty (skörd 1)	8,6	0,131	ia	Höjer et al.(manuskript)
SW Betty (tidig skörd 2)	8,6	0,047	ia	- ” -
SW Betty (sen skörd 2)	6,3	0,040	ia	- ” -
CRS 15 ^c	13,3	0,210	ia	Tsao et al. 2006
Amos ^d	7,3	0,260	ia	- “ -
SW Peggy	9,4	0,100	0,055-0,164	Bernes et al., 2013
SW Ares	6,9	0,072	0,053-0,121	- ” -

^a id = inte detekterad, ^b ia = inte analyserad, ^c blad från plantor i sen blomning, ^d stam från plantor i sen blomning

Material och metoder

I försöket användes rödklöversorter som valts för att representera stora skillnader i blomningstid men som samtidigt skulle vara möjliga att odla i ett nordligt klimat. Odlingen av sorterna ingår i ett doktorandprojekt där Elin Halvorsen Sikkeland studerar rödklövernens morfologi under hand-

ledning av Anne-Maj Gustavsson. Bland sorterna i vår studie var SW Torun och Ilte med i en tidigare studie (Bernes et al., 2013) och SW Betty har använts i tidigare fält- och produktionsförsök vid institutionen (Höjer et al., 2012, Höjer et al., manuskript).

Rödklävern såddes i blandning med rörsvingelhybriden Hykor (5 kg rödkläverfrö per ha) år 2013 och var vall I år 2014. Försöket bestod av tolv rödkläversorter i ett block (Tabell 2). Varje ruta var 1,5 x 7,2 m. Då rutorna även användes i det tidigare nämnda doktorandprojektet har vi tillgång till vissa av de registreringar av avkastning mm som har gjorts där.

Klippning

Provtagningen gjordes i återväxten. Första skörd hade tagits den 17 juni. En okulär gradering av rödkläverns utvecklingsstadium gjordes knappt fyra veckor därefter och sedan två gånger per vecka. Målet var att skörda alla sorter vid begynnande blomning. I realiteten innebar detta att vi klippte i rutor där man började se enstaka blommor. Provtagningsstidpunkten bestämdes således individuellt för varje sort och framgår av Tabell 2. Av varje sort klipptes två prov à 0,5 m², A och B. Klippytorna valdes ut i en del av varje ruta där gräset inte var så dominerande och så att åtminstone någon blomma skulle finnas med i det totala provet. Proverna klipptes på förmiddagen efter att daggen torkat upp, och lades i frigolitlådor med kylklampar. Kliphöjden var ca 5 cm från markytan.

Tabell 2. Sorterna i försöket, typ, ursprung och datum för klippning i försöket.

Sort	Typ	Ploiditet	Ursprungsland	Förädlare	Datum för klippning
Atlantis	Tidig	Tetraploid	Tyskland	NPZ	15 juli
Callisto	Tidig	Diploid		DLF-Trifolium	15 juli
Dafila	Tidig	Diploid	Schweiz	Agroscope	15 juli
Fregata	Tidig	Tetraploid	Schweiz	Agroscope	17 juli
Harmonie	Tidig	Diploid	Tyskland	NPZ	15 juli
Larus	Tidig	Tetraploid	Schweiz	Agroscope	15 juli
Vesna	Tidig	Tetraploid		DLF-Trifolium	15 juli
Ilte	Sen	Tetraploid	Estland	Jögeva	23 juli
Lasang	Sen	Tetraploid	Norge	Graminor	23 juli
Lea	Sen	Diploid	Norge	Graminor	21 juli
SW Betty	Sen	Tetraploid	Sverige	SW	21 juli
SW Torun	Sen	Tetraploid	Sverige	SW	23 juli

Sortering

Efter att proverna kommit in på laboratoriet förvarades de i kylrum (+4°C) varifrån ett prov i taget togs fram för vidare behandling. Det klippta materialet vägdes färskt för att få totalvikten. Därefter delades varje prov i två delar. Den ena halvan sorterades i rödkläver, sått gräs, övriga levande växter och dött växtmaterial och de olika fraktionerna vägdes. Klöverpackades därefter i plastpåsar och frystes (-20 °C) för senare analys av FÖ. Gräs och övrigt torkades och vägdes. Den resterande halvan av varje prov delades i ytterligare två delar: Den ena sorterades i rödkläver/ gräs/övrigt vilka vägdes. Sedan sorterades rödkläverskotten in i olika utvecklingsstadium. Fraktionerna (samt gräs och övrigt) torkades och vägdes på nytt. I den andra delen delades rödkläverplantorna upp i blad, petiol (bladstjälk), stjälk och blomma/blomknopp.

Fraktionerna torkades och vägdes. All torkning gjordes i 60 °C under minst 48 timmar. Rödklövern från de båda sorteringarna slogs sedan ihop för senare malning och näringsanalys.

Analyser

Proverna för näringsanalys maldes på en knivkvarn (Retsch SM 300, Retsch GmbH, Haan, Tyskland) med 1 mm såll och sändes till DairyOne, USA, för analys av bl.a. råprotein, råfett, NDF och smältbarhet (in vitro true digestibility, IVTD 48 tim). Allting analyserades med NIRS. De frysta proverna skickades för analys av fytoöstrogener till Århus universitet, Foulum, Danmark. Där frystorkades proverna och analyserades med vätskekromatografi (HPLC) och detekterades med tandemkopplad mass-spektrometri (MS/MS) (Steinshamn et al., 2008). De analyserades för innehåll av formononetin, daidzein, biochanin A, genistein, prunetin, equol, enterolakton, enterodiol, coumestrol, secoisolariciresinol och matairesinol.

Statistik

Data analyserades med SAS mixed model med sort som fix faktor. De variabler som undersöktes var andel olika växtfraktioner, utvecklingsstadium, näringsinnehåll samt koncentrationen av FÖ.

Resultat

Avkastning och klöverhalt

Andelen rödklöver i de klippta provytorna var i medeltal 47 % (Tabell 3). Det bortsorterade materialet var i huvudsak gräs, men även en liten andel ogräs samt helt vissnade klöverdelar. Siffror på skördad mängd har hämtats från ordinarie skörd av försöksrutorna, vilken gjordes 24 juli. Den mängd vi klippt bort adderades till totalmängden för respektive ruta. Skillnaden i beräknad hektaravkastning skiljer en del mellan de klippta proverna och hela rutan, dels beroende på att rutskörden togs senare, men också på varierande rödklöverhalt inom rutan (Tabell 3).

Tabell 3. Andel klöver i % och beräknad avkastning i kg ts/ha utifrån mängd i skördad yta.

Sort (4n)=tetraploid (2n)=diploid	Datum för klippning	Andraskörd		Totalt skörd1-3	
		Klöverhalt i den klippta ytan ^a	Avkastning i den klippta ytan ^a	Avkastning enligt rutskörd ^b	Avkastning enligt rutskörd ^c
Atlantis (4n)	15 juli	53	2300	3300	8800
Callisto (2n)	15 juli	47	2600	3600	10300
Dafila (2n)	15 juli	44	2600	2900	8000
Fregata (4n)	17 juli	44	3000	2800	8100
Harmonie (2n)	15 juli	51	2600	3000	8600
Larus (4n)	15 juli	53	2100	2600	8000
Vesna (4n)	15 juli	38	2700	3400	9500
Ilte (4n)	23 juli	46	2400	3000	9500
Lasang (4n)	23 juli	50	3300	2500	9000
Lea (2n)	21 juli	53	2500	2200	8300
SW Betty (4n)	21 juli	42	2800	2200	8800
SW Torun (4n)	23 juli	45	3000	2200	8200

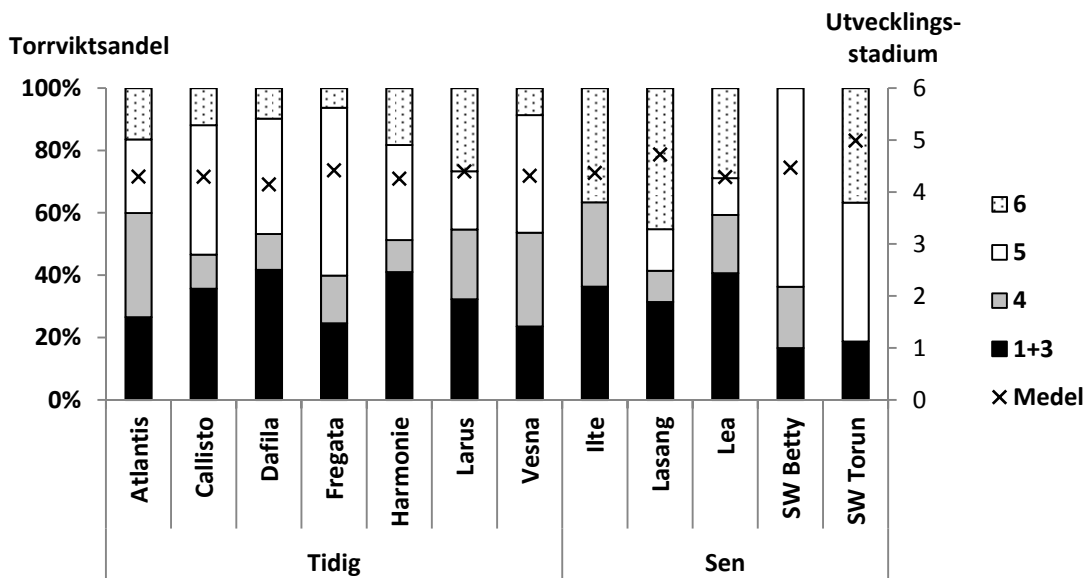
^a Medeltal av klippning av två ytor à 0,5 m² den 15-23 juli. ^b Enligt skörd av hela rutan, 10,8 m² den 24 juli.

^c Enligt skörd av hela rutan, 10,8 m² den 17 juni + 24 juli + 2 september.

Utvecklingsstadier

Enligt planen skulle sorterna klippas i samma utvecklingsstadium. Av den klippta rödklövermängden var 37 % av skotten i den mest utvecklade sorten, SW Torun, i blomning och 45 % i knoppsträckning (Figur 1). I den minst utvecklade sorten, Dafila, var 10 % av skotten i blomning. De signifikanta sortskillnader som framkom rörande enskilda utvecklingsstadier berodde på att stadium 4 knoppansvällning respektive 5 knoppsträckning helt saknades för enstaka sorter.

För att jämföra utvecklingsstadium mellan sorterna beräknades även ett viktat medelvärde. Stadium 1+3 viktades med faktor 3, stadium 4 med faktor 4, stadium 5 med faktor 5 och stadium 6 med faktor 6. Torrviktsandelen multiplicerades med respektive faktor. Det viktade medelvärdet varierade mellan 4,1 för Dafila till 5,0 för SW Torun, dock utan statistiskt signifikant skillnad.



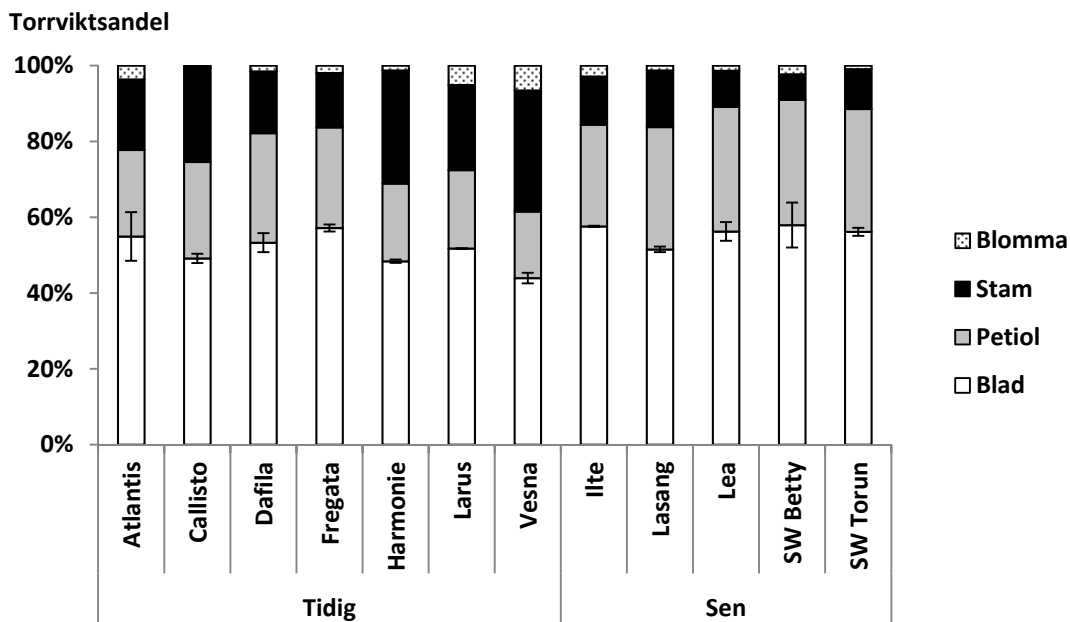
Figur 1. Utvecklingsstadium (torrviktsandel, hela skott) av olika sorter av rödklöver provtagna i återväxten. Stadium 1+3 är bladstadium + stjälksträckning, 4 knoppansvällning, 5 knoppsträckning, 6 blomning. x markerar ett viktat medelvärde för utvecklingsstadiet för varje sort.

Växtfraktioner

Skillnaden mellan sorterna i fördelningen av olika växtfraktioner var synbarligen mindre än vad den var i utvecklingsstadier (Figur 2). Ändå var skillnaderna statistiskt signifikanta för alla fraktioner. Andelen blad varierade från 44 % i Vesna till 58 % i SW Betty. Andelen blomma varierade från 0,5 % (Callisto) till 7,0 % (Vesna).

Näringsinnehåll

Tabell 4 visar näringsinnehållet. Det fanns signifikanta skillnader mellan sorterna beträffande NDF, råfett och IVTD.



Figur 2. Torrviktsandel av växtfraktioner hos olika sorter av rödklöver provtagna i återväxten. Värdena är medeltal av två prover av varje sort. Felstaplar anger standardavvikelsen mellan prov A och B rörande bladandelen.

Fytoöstrogener

De FÖ som hittades i detekterbar mängd var daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, coumestrol och prunetin. Koncentrationen av secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol, enterolakton och equol var under detektionsgränsen.

I Tabell 4 visas resultaten av FÖ-analyserna. Det var statistiskt signifikanta skillnader mellan sorterna för alla substanser. Skillnaderna i halterna av formononetin, coumestrol, prunetin och biochanin A var relativt stora, vilket påverkade mängden totala FÖ. Skillnaden i total-mängden jämnades dock ut en del då sorter som hade hög andel formononetin ofta hade lägre halt av biochanin A och tvärtom, och det är dessa båda substanser som utgör de största mängderna. A- och B-prover av de olika sorterna analyserades i dubletter. Det var liten variation mellan dessa upprepningar. Det var dock större skillnader mellan vissa av A- och B-proven, särskilt för sorten Fregata men även för Atlantis, SW Betty och Ilte.

Diskussion

Av de provade sorterna finns idag endast SW Betty och Ilte som rena sorter på den svenska marknaden. SW Torun finns bara i specialblandningar. Lea går att beställa via norska Graminor och Callisto finns till salu hos DLF-Trifolium. Atlantis och Harmonie finns i NPZs aktuella sortiment. Hos Agroscope finns sorterna Fregata, Dafila och Larus i sortimentet.

Eftersom försöksrutorna även ingick i ett annat försök blev mängden provmaterial i minsta laget. Detta kan göra att inte hela populationen av varje sort speglats och kan till viss del också förklara den variation som sågs mellan en del dubbelprover.

Avkastning

Enligt skörderesultatet för de hela försöksrutorna och årets alla tre skördar (Tabell 3) avkastade de danska sorterna Callisto och Vesna oväntat bra, jämfört med våra svenska sorter. Beträffande Callisto är det kanske särskilt förvånande, då det är en diploid sort. Man får dock ha i minnet att detta är en förstaårsvall; rangordningen kan ändras efter fler övervintringar. Även Ilte har gett hög skörd i jämförelse med SW Torun, men enligt den officiella sortprovningen hade Ilte och SW Torun lika hög avkastning i medeltal för två skördar och tre vallåldrar åren 2010-2014 (Barrlund, 2015).

Utvecklingsstadier och växtfraktioner

Målet var att provtagningen i denna studie skulle ske vid samma utvecklingsstadium för alla sorter. Det var inte heller några signifikanta skillnader mellan sorternas ”medelutvecklingsstadium” även om andelen enskilda stadier varierade mellan sorterna. Enligt Figur 2 fanns signifikanta, men numeriskt små, skillnader mellan sorternas andel av blad, stam och petiol. Enligt bland annat Tsao et al. (2004), Seguin et al. (2004) och Saviranta et al. (2008) varierar såväl innehåll som sammansättning av FÖ mellan olika växtfraktioner.

Fytoöstrogener

Bland de sorter som ingick i undersökningen var det främst Fregata som avvek, med hög total koncentration av FÖ men lägst formononetinhalten av alla. Den totala koncentrationen orsakades främst av mycket hög koncentration av biochanin A. Låg formononetinkoncentration är en fördel med tanke på risken för påverkan av equol och detta i kombination med låg halt av coumestrol gör att denna sort kanske ändå kan ses som en sort med låg FÖ-effekt. Bland övriga sorter kan nämnas att både SW Betty och Ilte hade hög koncentration av coumestrol och formononetin.

De diploida sorterna verkar ofta ligga något lägre i sitt innehåll av coumestrol och även formononetin, vilket vi även såg i vår förra studie (Bernes et al., 2013). Fregata avviker dock, som tidigare nämnts, då det är en tetraploid sort med låg halt coumestrol och formononetin. Någon skillnad beroende på ploiditet sågs inte av Tsao et al. (2006).

I flertalet tidigare studier av rödklöver har man inte analyserat eller kunnat detektera coumestrol (se tabell 1). Det kan dock bero på att många studier fokuserat på isoflavoner och därmed har innehållet av coumestrol inte analyserats. Förekomsten av coumestrol var högre i denna studie än i en tidigare gjord vid institutionen (Bernes et al., 2013). Den var också högre jämfört med det som rapporterats för lusern av Seguin et al. (2004), men i samma nivå som angetts för lusern av Seguin & Zheng (2006). Coumestrol är en viktig FÖ på grund av dess starka bindning till östrogenreceptorn och det är därför viktigt att vara medveten om dess förekomst även i rödklöver.

Allmänt kan sägas att i jämförelse med andra studier var halterna av formononetin betydligt högre i den här studien. De flesta andra studier med rödklöver rapporterar innehåll av formononetin på 3,3–9,0 g/kg ts (Kallela et al., 1987; Moorby et al., 2004; Sarelli et al. 2003) när hela växten analyserats, jämfört med våra resultat som i medeltal var drygt 13,0 g/kg ts. Orsakerna till detta kan vara flera, t ex variationer i årsmån, växtplats osv. I en tidigare studie vid institutionen har setts att koncentrationen av FÖ var högre i rödklöver odlad i Umeå än i Skara. I den studien användes dock olika sorters rödklöver på orterna så skillnader beroende på ort kan inte skiljas från sortskillnader.

Tabell 5 visar en betydande skillnad i halter mellan åren för samma sort. Exempelvis ligger Ilte högre än SW Torun i innehållet av biochanin A och i total mängd FÖ både 2012 och 2014, vilket stödjer hypotesen att rangeringen mellan sorter är densamma olika år, även om nivåerna skiljer. Medeltemperaturen var ungefär densamma mellan första och andra skörd 2012 som den var 2014 (15,2 respektive 15,7 °C), men sommaren 2014 var till en början kall men med en temperatur som ökade stadigt för att vara som högst i mitten av juli. Medeltemperaturen under perioden då sorterna skördades var 20,4°C. Detta kan troligen till viss del förklara de skillnader som ses i nivåer av FÖ mellan åren. En ytterligare skillnad mellan studierna var att år 2012 studerades rödklöver i renbestånd medan 2014 års vallar var blandvallar. Högre koncentrationer har rapporterats från blandvallar än från renbestånd (Kallela et al., 1987).

Man kan göra en enkel beräkning av dessa rödklöversorters eventuella inverkan på en tacka. Enligt Adams (1996) behövs det 0,040 g formononetin eller 0,001 g coumestrol per kg levande vikt och dag för att påverka fruktsamheten. En tacka på 70 kg kan äta minst 2 kg ts ensilage (3 % ts av levande vikt). Det skulle då räcka med en rödklöverhalt på 16 % med en sort som innehåller 9 g formononetin per kg ts för att riskera en negativ påverkan. Om formononetinhalten i stället är 15 g, som den var i flera sorter i denna studie, blir den ”tillåtna” rödklöverandelen så låg som 9 %. Motsvarande uträkning för coumestrol vid ett innehåll på 0,1 eller 0,2 g per kg ts i rödklövern ger en maximal rödklöverandel på 35 % respektive 17 %. I en foderstat som även innehåller kraftfoder kan man ha högre rödklöverhalt i ensilaget eftersom fytoöstrogenerna då blir mer utspädda. Om å andra sidan ensilagekonsumtionen är högre än ovan antagna 2 kg ts, borde rödklöverandelen vara lägre för att minska riskerna för påverkan av FÖ.

Om man på liknande sätt för mjölkkor jämför sorter med högt eller lågt innehåll av FÖ skulle utfodring av ensilage med 50 % rödklöver av en sort med högt innehåll av formononetin ge 4,3 mg equol per kg mjölk, medan utfodring av en sort med lägre innehåll skulle ge 2,3 mg equol per kg mjölk om samma utbyte som i studierna av Höjer et al. (2012) antas. Konsekvenserna av denna skillnad är svårare att uppskatta än vid utfodring till får då kunskapen om effekterna på människan av equol från mjölkprodukter är mycket begränsad.

Publikationer / Resultatförmedling till näringen

Resultaten har ännu inte publicerats. Planen är att göra en mer fullständig institutionsrapport med resultaten från både denna och en föregående studie. Rapporten ska under våren publiceras på institutionens hemsida samt på Fåravelsförbundets webbplats Kunskapsbasen. En artikel ska skrivas till tidningen Fårskötsel. Ett inlägg passande för en internationell konferens ska skrivas.

Slutsatser

Det finns betydande skillnader i koncentrationen av fytoöstrogen hos rödklöversorter odlade under svenska förhållanden. Samtliga sorter i denna studie visade höga halter av flera av fytoöstrogenerna och ingen sort kunde anses som en låg sort. Resultaten ger indikation på stor årsmånsvariation. Sortskillnaderna är så stora att vi anser att det vore bra om man kunde införa analys av fytoöstrogeninnehållet i sortförsök av rödklöver samt vid utveckling /införande /marknadsföring av olika sorter.

Tack

Tack till Stiftelsen Lantbruksforskning som har finansierat detta projekt. Tack också till Lis Sidelmann och Stig Purup på laboratoriet vid Århus universitet i Foulum, Danmark.

Tabell 4. Koncentration av näringsämnen och fytoöstrogen¹ (g/kg ts) i 12 rödklöversorter, medeltal för prov A och B.

	Atlantis	Callisto	Dafila	Fre-gata	Harmo-nie	Larus	Vesna	Ilte	Lasang	Lea	SW Betty	SW Torun	P-värde
Råprotein	232	247	224	237	245	234	234	257	241	246	253	255	0,29
NDF	356 ^{bc}	362 ^{bc}	360 ^{bc}	363 ^{bc}	371 ^c	365 ^{bc}	344 ^{abc}	346 ^{abc}	325 ^{abc}	307 ^a	348 ^{abc}	322 ^{ab}	<0,01
Råfett	40,0 ^{ab}	39,5 ^{ab}	37,5 ^a	38,0 ^{ab}	42,0 ^{ab}	38,5 ^{ab}	42,0 ^{ab}	40,0 ^{ab}	42,5 ^{ab}	41,5 ^{ab}	42,5 ^{ab}	45,0 ^b	0,04
IVTD 48 tim	845 ^{ab}	855 ^{abc}	840 ^{ab}	845 ^{ab}	850 ^{abc}	840 ^{ab}	835 ^a	865 ^{bc}	850 ^{abc}	855 ^{abc}	875 ^c	850 ^{abc}	<0,01
Daidzein	0,06 ^{ab}	0,06 ^{ab}	0,07 ^{ab}	0,05 ^{ab}	0,05 ^{ab}	0,08 ^b	0,07 ^{ab}	0,04 ^{ab}	0,05 ^{ab}	0,03 ^a	0,03 ^a	0,04 ^{ab}	0,02
Genistein	0,48 ^{abc}	0,40 ^{abc}	0,52 ^{bc}	0,59 ^c	0,40 ^{abc}	0,39 ^{abc}	0,34 ^{ab}	0,32 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,27 ^a	0,32 ^{ab}	0,25 ^a	<0,01
Coumestrol	0,19 ^{def}	0,15 ^b	0,16 ^{bcd}	0,11 ^a	0,16 ^{bcd}	0,18 ^{cdef}	0,16 ^{bcd}	0,20 ^f	0,18 ^{bcd}	0,15 ^{bc}	0,20 ^f	0,19 ^{ef}	<0,01
Formononetin	14,8 ^{de}	11,9 ^b	12,6 ^{bcd}	8,7 ^a	12,5 ^{bcd}	14,7 ^{de}	12,4 ^{bc}	16,1 ^e	14,2 ^{bcd}	11,9 ^{bc}	15,7 ^e	14,5 ^{cde}	<0,01
Prunetin	0,48 ^a	0,30 ^a	0,54 ^{ab}	0,76 ^{abc}	0,33 ^a	0,45 ^a	0,40 ^a	0,56 ^{abc}	1,11 ^{bc}	0,33 ^a	1,26 ^c	0,38 ^a	<0,01
Biochanin A	19,2 ^{bc}	15,2 ^{ab}	23,8 ^c	32,7 ^d	15,8 ^{ab}	18,6 ^{bc}	14,4 ^{ab}	16,6 ^{abc}	12,1 ^{ab}	13,2 ^{ab}	9,9 ^a	12,1 ^{ab}	<0,01
Summa FÖ	35,3 ^{bcd}	28,0 ^{ab}	37,7 ^{cd}	42,9 ^d	29,3 ^{abc}	34,3 ^{abcd}	27,8 ^{ab}	33,8 ^{abcd}	28,0 ^{ab}	25,8 ^a	27,4 ^{ab}	27,5 ^{ab}	<0,01

¹ Även secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol, enterolakton och equol analyserades, men koncentrationerna var under detektionsgränsen för respektive fytoöstrogen.

Tabell 5. Jämförelse mellan sorter som varit gemensamma för försök olika år, g/kg ts.

FÖ	SW Torun		Ilte	
	2014	2012 ¹	2014	2012 ¹
Formononetin	14,54	8,81	16,15	8,88
Daidzein	0,04	0,12	0,04	0,14
Coumestrol	0,19	0,09	0,20	0,10
Biochanin A	12,09	5,53	16,58	7,50
Genistein	0,25	0,35	0,32	0,38
Prunetin	0,38	0,36	0,56	0,37
Summa FÖ	27,50	15,27	33,84	17,38

¹ År 2012 togs prover av varje sort vid två tidpunkter. Här anges medelvärdet av dessa (Bernes et al., 2013).

Referenser

- Adams, N.R, 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 1509-1515.
- Batterham, T.J., Hart, N.K., Lamberton, J.A, Braden, A.W.H. 1965. Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature* 206(4983): 509.
- Barrlund, M. 2015. Sortprovning 2014. Nytt från institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap nr 3. SLU Umeå.
- Bernes, G., Höjer, A., Gustavsson, A-M. 2013. Innehåll av fytoöstroger i olika rödklöversorter. Slutrapport till Regional Jordbruksforskning för Norra Sverige.
- Hoerger, C.C., Praplan, A.P., Becker, L., Wettstein, F.E., Hungerbühler, K., Bucheli, T.D. 2011. Quantification of five isoflavones and coumestrol in various solid agroenvironmental matrices using ¹³C₃-labeled internal standards. *J Agric. Food Chem.* 59, 847-856,
- Höjer, A. 2014. Fytoöstrogener i svensk mjölk? Slutrapport till Kungliga Skogs- och Lantbruksakademien.
- Höjer, A., Adler, S., Purup, S., Hansen-Møller, J., Martinsson, K., Steinshamn, H., Gustavsson, A-M. 2012. Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *J Dairy Sci.* 95(8), 4520-4540.
- Höjer, A., Nadeau, E., Purup, S., Hansen-Møller, J., Gustavsson, A-M. Phytoestrogens in red clover and birdsfoot trefoil as influenced by cutting time, site and year. (Manuskript.)
- Kallela, K., Saastamoinen, I., Huokuna, E. 1987. Variations in the content of plant estrogens in red clover-timothy-grass during the growing season. *Acta Vet. Scand.* 28, 255-262.
- Kelly, R.W., Shackell, G.H., Allison, A.J. 1980. Reproductive performance of ewes grazing red clover (Grasslands Pawere) or white clover-grass pasture at mating. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 8, 87-91
- Lund, T.D., Blake, C., Bu, L.H, Hamaker, A.N, Lephart, E.D. 2011 Equol and isoflavonoid: potential for improved prostate health, *in vitro* and *in vivo* evidence. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:4.
- Lundh, T.J.O., Pettersson, H.I., Martinsson, K.A. 1990. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood-plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agric. and Food Chemistry* 38(7): 1530-1534.
- Moorby, J.M., Fraser, M.D., Theobald, V.J., Wood, J.D., Haresign, W. 2004. The effect of red clover formononetin content on live-weight gain, carcass characteristics and muscle equol content of finishing lambs. *Animal Science* 79, 303-313
- Mustonen, E.A., Jokela, T., Saastamoinen, I., Taponen, J., Taponen, S., Saloniemi, H., Wähälä, K. 2006. High serum S-equol content in red clover fed ewes: the classical endocrine disruptor is a single enantiomer. *Environmental Chemistry Letters* 3, 154-159
- Nielsen, T.S., Höjer, A., Gustavsson, A-M., Hansen-Møller, J., Purup, S. 2012. Proliferative effect of whey from cow's milk varying in phyto-oestrogens in human breast and prostate cancer cells. *J. Dairy Res.*, 79(2), 143-149.
- Oloumi, H., Hassibi, N. 2011. Study of the correlation between some climate parameters and the content of phenolic compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (25), 6011-6016.
- Pfitscher, A., Reiter, E., Jungbauer, A. 2008. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 112 (1-3), 87-94.
- Ramón, J.P., Valderrábano, J., Folch, J. 1993. Reproductive performance of Rasa Aragonesa ewes mated on lucerne (*Medicago sativa* cv. Aragon) pastures. *Small Rum. Res.* 11, 323-329.
- Sarelli, L., Tuori, M., Saastamoinen, I., Syrjälä-Qvist, L., Saloniemi, H. 2003. Phytoestrogen content of birdsfoot trefoil and red clover: Effects of growth stage and ensiling method. *Acta Agric. Scand. Section A.* 53, 58-63.
- Saviranta, N.M., Anttonen M.J., von Wright, A., Karjalainen, R.O. 2008. Red clover isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *J. Sci.Food Agric.* 88(1): 125-132.
- Seguin, P., Zheng, W. 2006. Phytoestrogen content of alfalfa cultivars grown in eastern Canada. *J.Sci.Food Agric.* 86 (5), 765, 771.
- Seguin, P., Zheng, W., Souleimanov, A. 2004. Alfalfa phytoestrogen content: Impact of plant maturity and herbage components. *J. Agron. Crop Sci.* 190 (3), 211-217.
- Sivesind, E., Seguin, P. 2005. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *J. Agric.Food Chem.* 53:6397-6402.
- Steinshamn, H., Purup, S., Thuen, E., Hansen-Møller, J. 2008. Effects of clover-grass silages and concentrate supplementation on the content of phytoestrogens in dairy cow milk. *J. Dairy Sci.* 91(7), 2715-2725.
- Tsao, R., Papadopoulos, Y., Yang, R., Young, J.C., McRae, K., 2006. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J. Agric.Food Chem.* 54, 5797-5805.
- Zheng, J., Kallio, H., Linderborg, K., Yang, B.R. 2011. Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp *sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude. *Food Research International* 44 (7) SI, 2018-2026.