

Innehåll av fytoöstrogen i olika rödklöversorter

Content of phytoestrogens in red clover varieties



Foto: Annika Höjer

Gun Bernes, Annika Höjer, Anne-Maj Gustavsson

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
Abstract	3
Bakgrund	3
Vad är fytoöstrogen?	3
Effekter på idisslare	4
Faktorer som påverkar innehållet	4
Sortskillnader	5
Material och metoder	5
Sorter	5
Provtagning och sortering	6
Analyser	7
Skördedata	8
Klimatdata	8
Statistik	8
Resultat	8
Avkastning och rödklöverhalt	8
Utvecklingsstadier	9
Växtfraktioner	11
Näringsinnehåll	12
Innehåll av fytoöstrogener	14
Årsmånens inverkan	16
Samband mellan olika parametrar	18
Diskussion	22
Utvecklingsstadier och växtfraktioner	22
Fytoöstrogener	22
Hur mycket fytoöstrogen kan man utfodra?	23
Slutsatser	24
Tack	24
Referenser	25

Sammanfattning

Fytoöstrogener (FÖ) är hormonliknande ämnen som kan finnas i växter. Rödklöver är den svenska vallväxt som innehåller högst koncentration av östrogena substanser. Växtöstrogener kan bland annat störa olika funktioner i reproduktionen hos får. Formononetin och coumestrol är bland de mer potenta ämnena. Syftet med vår studie var att se om det finns någon skillnad mellan olika rödklöversorter i deras innehåll av växtöstrogener. Två försök gjordes; Exp 1 med åtta rödklöversorter skördade vid knoppning samt blomning och Exp 2 med tolv sorter skördade i tidig blomning. Två sorter, Ilte och SW Torun, ingick i båda försöken. All provtagning gjordes i återväxten. Vid skörden bestämdes andelen plantor i olika utvecklingsstadiet och andelen blad och andra växtdelar. Fytoöstrogenerkoncentrationen bestämdes genom HPLC. Det fanns betydande skillnader mellan sorter för de flesta FÖ. Vid samtidig skörd i Exp 1 hade Peggy, Ilte och SW Torun högre genomsnittlig koncentration av formononetin, jämfört med SWÅ RK95097. När man beaktar skillnader i utvecklingsstadium verkade Peggy, Ilte och LÖ RK9735 ha en högre halt än t ex SW Ares. I Exp 2 hade Fregata hög koncentration av totala FÖ men det lägsta innehållet av formononetin. SW Betty och Ilte hade höga halter av både formononetin och coumestrol. Senare skörd (Exp 1) gav minskad koncentration av de flesta av de observerade FÖ. De halter av coumestrol som registrerats i dennas studie har inte tidigare rapporterats.

Abstract

Phytoestrogens (PE) are hormone-like plant substances that, when fed, may cause fertility problems, especially noticed in sheep. The aim of the study was to evaluate differences in PE concentration in red clover varieties. Two experiments were performed; Exp 1 with regrowth of 8 red clover varieties harvested at budding and at flowering and Exp 2 with regrowth of 12 varieties harvested at early flowering. There were significant differences between varieties for most PE. In Exp 1, when harvested on the same dates, Peggy, Ilte and SW Torun had higher mean concentration of formononetin, a potent PE, compared to SWÅ RK95097. When considering differences in maturity, Peggy, Ilte and LÖ RK9735 seemed to have a higher concentration than e.g. SW Ares. In Exp 2, Fregata had high concentration of total PE but the lowest concentration of formononetin. SW Betty and Ilte had high concentrations of both formononetin and coumestrol. Later harvest (Exp 1) gave decreased concentrations of most of the observed PE. The significant content of coumestrol that was found has not been previously reported for red clover.

Bakgrund

Vad är fytoöstrogener?

Fytoöstrogener (FÖ) är ett samlingsnamn på ämnen som finns i växter och som kan fungera som hormoner eftersom de 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). 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 är inte en isoflavon, men är också en aktiv östrogen substans.

När växter som innehåller 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 (Pfätscher 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.

Effekter på idisslare

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 till 5 månaders kontinuerlig utfodring med rödklöver kan följderna bli permanent infertilitet. Livmoderhalsen förändras morfologiskt och en ökad slemsekretion hämmar spermietransport vilket gör att befruktning inte kan ske. Tackan kan också riskera att drabbas av livmoderframfall (Marshall, 1973; Mustonen et al., 2014). Svenska Djurhälsovården har brukat rekommendera att man till tackor kring betäckning och lamning bör ha maximalt 20 % rödklöver i bete och ensilage och 30 % i hö.

I och med att klöver kan ge fruktsamhetsstörningar vore det en fördel att på gårdar med lammproduktion periodvis kunna välja rödklöversorter med låga halter FÖ. Att ha klöver i vallarna även på dessa gårdar är viktigt. Förutom att den utgör en kvävefixerande komponent i växtföljden är klöver också en smaklig proteinkälla i foderstaten. Det är framförallt växande lamm och högdräktiga och digivande tackor som har ett högt proteinbehov. Marley et al. (2007) fann i en studie att lamm hade signifikant högre foderkonsumtion, proteinintag och tillväxt med rödklöverensilage än med ensilage av hybridrajgräs. Motsvarande iakttagelser kunde vi göra i en studie där lamm utfodrades med ensilage med olika klöverhalt (Bernes et al., 2006). Moorby et al. (2004) såg en högre tillväxt hos lamm som betade rödklöver med ”högt” innehåll av formononetin (4,4 g formononetin/kg ts; HF), jämfört med lamm som betade rödklöver med lägre innehåll (3,3 g/kg ts) eller som betade engelskt rajgräs. Man såg också att HF-lammen hade högst koncentration av tillväxthormon i blodet.

Hos nötkreatur är effekterna på fruktsamheten tvetydiga; vissa studier visar på avsaknad av effekt (Lundh et al., 1990) medan andra rapporterar fruktsamhetsstörningar (Kallela et al., 1984; Adams 1995; Wocławek-Potocka et al., 2013). Rödklövers innehåll av FÖ kan dock vara av intresse även i mjölkproduktionen. En studie av Höjer et al. (2012) visade att med en foderstat med ett grovfoder innehållande 40 % rödklöver av ts blev innehållet av FÖ, framförallt equol, i mjölken förhållandevis högt, betydligt högre än i flertalet tidigare publicerade studier. 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).

Faktorer som påverkar innehållet

Innehållet av olika substanser i växter kan påverkas av t ex jordmån, klimat eller dagslängd (Oloumi & Hassibi, 2011; Zheng et al., 2011). Exempelvis fann Carrera et al. (2011) att det totala innehållet av isoflavonoider i sojaböna var högre i de kallare delarna av Argentina. Seguin och Zheng (2006) fann 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). Förtorkning och höberedning kan minska halten av FÖ (Sarelli et al., 2003), medan inverkan av ensilering är mer oklar, enligt en litteraturgenomgång av Kalač (2013). Sarelli et al. (2003) såg en ökning i halten formononetin på ca 20 % från färsk rödklöver till förtorkad och ensilerad. Sivesind och Seguin (2005) såg i stället en minskning på 20 % och i en studie med ensilering i laboratorieskala såg man en minskning i halten med mer än 70 % (Daems et al., 2016).

Sortskillnader

Halten 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. En brittisk firma anger i sin sortlista vilka rödklöversorter som har hög respektive låg halt av FÖ för att producenterna ska kunna välja olika sorter till sina djur 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.

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

Concentration of phytoestrogens in red clover according to different studies, g/kg DM. Observe that it can be different analyzing methods.

Sort	Formononetin	Daidzein	Coumestrol	Referens
AberRuby (låg FÖ)	1,7	0,05	id ^a	Hoerger et al., 2011
Larus	8,5	0,84	id	- ” -
Tedi	12,5	0,16	id	- ” -
Formica	3,3	ia ^b	ia	Moorby et al, 2004
Astra	4,7	ia	ia	- ” -
Ej angivet	6,8	0,63	0	Mustonen et al., 2006
SW Betty (skörd 1)	8,6	0,13	ia	Höjer et al.(manuskript)
SW Betty (tidig skörd 2)	8,6	0,05	ia	- ” -
SW Betty (sen skörd 2)	6,3	0,04	ia	- ” -
SW Betty (skörd 3)	7,3	0,04	ia	- ” -
Ej angivet	13,2	0,53	id	Lundh & Madej, 2003
Formica (skörd 1)	ca 5,2	ia	ia	Schubiger och Lehmann, 1994
Formica (skörd 3)	ca 3,0	ia	ia	- ” -
Titus (skörd 1)	ca 8,5	ia	ia	- ” -
Titus (skörd 3)	ca 5,5	ia	ia	- ” -

^a id = inte detekterad, *not detected*, ^b ia = inte analyserad, *not analysed*

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 på samma breddgrad för att göra resultaten jämförbara. Umeå (forskningsstationen Röbbäcksdalen, lat 63°N, long °63E) valdes som växtort eftersom vi tidigare har funnit höga FÖ-värden här. Resultaten kommer från två olika försök med något skiftande upplägg, se nedan.

Material och metoder

Sorter

Studierna av rödklöversorter gjordes under två säsonger. År 2012 togs prov av sorter som ingick i den ordinarie sortprovningen på SLU Röbbäcksdalen. Ambitionen var att ta alla prov från samma vallålder, men för att få med så många sorter som möjligt inom budgetens ram togs prover från både Vall I och Vall II. För att också få en jämförelse över vallålderna provtogs SW Torun i både Vall I och Vall II. De sorter som slutligen ingick framgår av Tabell 2. Sortmaterialet har en spridning beträffande ursprung och tidighet. SW Ares är en sydsvensk medelsen typ, Ilte härstammar från Baltikum, LÖ RK9735 är en norsk sort och övriga är sena sorter från växtförädlingsstationen i Lännäs, Västernorrland. Klövern var sådd i renbestånd.

År 2014 användes de rödklöversorter som ingick i ett projekt vars syfte var att studera rödklövers morfologi. Dessa sorter (Tabell 2) hade valts för att ha stora skillnader i blomningstid men de skulle vara möjliga att odla i ett nordligt klimat. De olika rödklöversorterna (utsädesmängd 5 kg/ha) odlades i en blandvall med rörsvingelhybriden Hykor (20 kg/ha). Bland de provade sorterna 2014 fanns SW Torun och Ilte som även var med 2012 och SW Betty som använts i tidigare fält- och produktionsförsök vid institutionen (Höjer et al., 2012, Höjer et al., manuskript).

Tabell 2. Sorter i försöken 2012 och 2014; typ, ursprung och datum för klippning.
Varieties in the studies, 2012 and 2014; type, ploidity, ley age, originating country, breeder and sampling date.

Sort	Typ	Ploiditet	Vall- ålder	Ursprungs- land	Förädlare	Datum för provtagning
2012						
Amanda		Tetraploid	Vall II	Sverige	SW	23 juli + 14 aug.
Ilte	Sen	Tetraploid	Vall II	Estland	Jögeva	23 juli + 14 aug
LÖ RK9735		Tetraploid	Vall II	Norge	Graminor	23 juli + 14 aug
Peggy	Sen	Tetraploid	Vall I	Sverige	SW	23 juli + 14 aug
SW Ares	Medelsen	Diploid	Vall I	Sverige	SW	23 juli + 14 aug
SW Torun	Sen	Tetraploid	Vall I + II	Sverige	SW	23 juli + 14 aug
SW Yngve	Sen	Diploid	Vall II	Sverige	SW	23 juli + 14 aug
SWÅRK95097	Sen	Diploid	Vall II	Sverige	SW	23 juli + 14 aug
2014						
Atlantis	Tidig	Tetraploid	Vall I	Tyskland	NPZ	15 juli
Callisto	Tidig	Diploid	Vall I		DLF-Trifolium	15 juli
Dafila	Tidig	Diploid	Vall I	Schweiz	Agroscope	15 juli
Fregata	Tidig	Tetraploid	Vall I	Schweiz	Agroscope	17 juli
Harmonie	Tidig	Diploid	Vall I	Tyskland	NPZ	15 juli
Ilte	Sen	Tetraploid	Vall I	Estland	Jögeva	23 juli
Larus	Tidig	Tetraploid	Vall I	Schweiz	Agroscope	15 juli
Lasang	Sen	Tetraploid	Vall I	Norge	Graminor	23 juli
Lea	Sen	Diploid	Vall I	Norge	Graminor	21 juli
SW Betty	Sen	Tetraploid	Vall I	Sverige	SW	21 juli
SW Torun	Sen	Tetraploid	Vall I	Sverige	SW	23 juli
Vesna	Tidig	Tetraploid	Vall I		DLF-Trifolium	15 juli

Provtagning och sortering

Båda åren gjordes all provtagning i återväxten. Detta eftersom det oftast är då som rödklöverhalten i praktiken är som högst och klövers innehåll alltså har störst inverkan.

Av varje sort klipptes två provytor à 0,25 m² i odlingsrutor som var 1,5 x 7,2 m. Proverna klipptes på förmiddagen efter att daggen torkat upp. Klipphöjden var 3-5 cm. Grödan lades i plastpåsar som förvarades i frigolitlådor med kylklampar tills allt var färdigklippt.



År 2012 togs en första skörd i försöken den 21 juni. Provtagningen för vår studie gjordes i återväxten vid två olika utvecklingsstadium. Vid varje tillfälle klipptes alla sorter under en och samma dag, den 23 juli (ungefärlig tid för knoppning) respektive den 14 augusti (beräknad tid för blomning).

År 2014 togs första skörd den 17 juni. En okulär gradering av rödklöverns 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 röda blommor. Provtagningsstidpunkten bestämdes således individuellt för varje sort och framgår av Tabell 2. Klippyrtorna valdes ut i en del av rutan där gräset inte var så dominerande och så att åtminstone någon blomma skulle finnas med i det klippta provet.

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 rödklöver, sått gräs (bara 2014), ogräs samt dött växtmaterial och de olika fraktionerna vägdes. Rödklövern packades därefter i plastpåsar och frystes (-20 °C) för senare analys av FÖ. Gräs, ogräs och dött material torkades och vägdes.

Den resterande halvan av varje prov delades i ytterligare två delar:

Den ena sorterades i rödklöver/ gräs/ övrigt och vägdes. Sedan sorterades rödklöverplantorna efter utvecklingsstadium. De olika fraktionerna torkades och vägdes på nytt.

I den andra delen delades rödklöverplantorna upp i blad, petiol (bladskaft), stam 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.

Analys

Proverna för näringsanalys maldes på en knivkvarn (Retsch SM 300, Retsch GmbH, Haan, Tyskland) med 1 mm såll och sändes till AgriLab, Uppsala (år 2012) respektive DairyOne, USA (år 2014), för analys av bl.a. råprotein, råfett, NDF och smältbarhet (in vitro true digestibility, IVTD 48 timmar). År 2012 analyserades råproteinet med Dumas-metoden (SS-ISO 13878). I övrigt analyserades allting med NIRS.

De frysta proverna skickades för analys av FÖ 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.

Skördedata

Uppgifter om skördad mängd av respektive sort hämtades 2012 från den ordinarie sortprovningen i intelligande försöksrutor. Dessa skördades den 31 juli, dvs mellan våra provtagningar.

År 2014 hämtades uppgifter om skördad mängd från ordinarie skörd av försöket, vilken gjordes 24 juli, dagen efter att vi hade provtagit de senast utvecklade sorterna. Den mängd vi hade klippt bort adderades till totalmängden för respektive ruta.

Klimatdata

Siffror på temperatur och solstrålning har hämtats från SMHI (Umeå Flygplats). Nederbördssiffrorna är från Röbbäcksdalens forskningsstation, där försöken var placerade.

Statistik

Data analyserades med SAS mixed model och Microsoft Excel. År 2012 användes de fixa faktorerna provtagningsdatum, sort och interaktionen mellan dessa. Block inom sort och tid togs med som slumpfaktor men utslöts i den slutliga bearbetningen då det inte hade någon signifikant inverkan. År 2014 var sort enda fixa faktor. De variabler som undersöktes var andel olika växtfraktioner, utvecklingsstadium (inte statistiskt 2012), näringsinnehåll samt koncentrationen av FÖ. Dessutom undersöktes år 2012 korrelationen mellan olika variabler med Pearsons korrelation i statistikprogrammet NCCS 2000. Båda provtagningstidpunkterna togs då med i samma analys för att öka antalet data.

Resultat

Avkastning och rödklöverhalt

År 2012 var andelen rödklöver hög eftersom den var sådd i renbestånd. Vid första provtagnings-tillfället var det ungefär 10 % som sorterades bort och vid nästa provtagning var det ca 5 %. Det var i huvudsak ogräs men även helt vissnade delar av klöverplantor. Resultaten från den officiella sortprovningen anger en rödklöverandel på 97-100 % i de olika sorterna och en variation i rödklöver-skörd i återväxten från knappt 2 400 kg ts (Peggy) till drygt 2 800 kg ts (Amanda). För övriga resultat från sortprovningen hänvisas till Dryler (2014).

År 2014 var andelen rödklöver i blandvallen med rörsvingelhybriden Hykor i medeltal 47 % i de klippta provytorna (Tabell 3). Det bortsorterade materialet var i huvudsak gräs, men även en liten andel ogräs samt helt vissnade rödklöverdelar.

Tabell 3. Andel rödklöver i % och beräknad avkastning (gräs + klöver) i kg ts/ha utifrån mängden i de klippta ytorna år 2014. Dessutom den totala rutskörden (första, andra och tredje skörd) omräknad till avkastning per hektar.

Proportion of red clover (%) and calculated production (kg DM per hectare) in second cut in 2014. Also included is the total amount of the three harvests of the year.

Sort (4n)=tetraploid (2n)=diploid	Andra skörd ^a			Första + andra + tredje skörd ^b
	Datum för klippning	Rödklöver-halt %	Beräknad avkastning kg ts/ha	kg ts/ha
Atlantis (4n)	15 juli	53	2300	8800
Callisto (2n)	15 juli	47	2600	10300
Dafila (2n)	15 juli	44	2600	8000
Fregata (4n)	17 juli	44	3000	8100
Harmonie (2n)	15 juli	51	2600	8600
Ilte (4n)	23 juli	46	2400	9500
Larus (4n)	15 juli	53	2100	8000
Lasang (4n)	23 juli	50	3300	9000
Lea (2n)	21 juli	53	2500	8300
SW Betty (4n)	21 juli	42	2800	8800
SW Torun (4n)	23 juli	45	3000	8200
Vesna (4n)	15 juli	38	2700	9500

^a Medeltal av klippning av två ytor à 0,25 m² den 15-23 juli. *Average yield from two cutting plots 15-23 July*

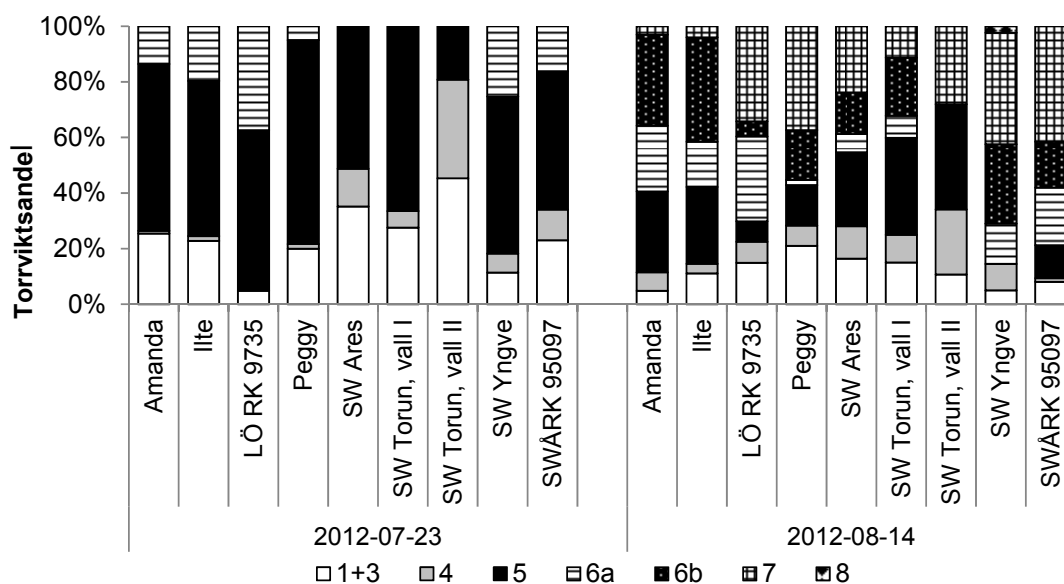
^b Enligt skörd av hela rutan, 10,8 m² den 17 juni + 24 juli + 2 september. *Yield from three cuts from the whole plot, 10.8 m² (17 June+24 July+2 September.)*

Utvecklingsstadier

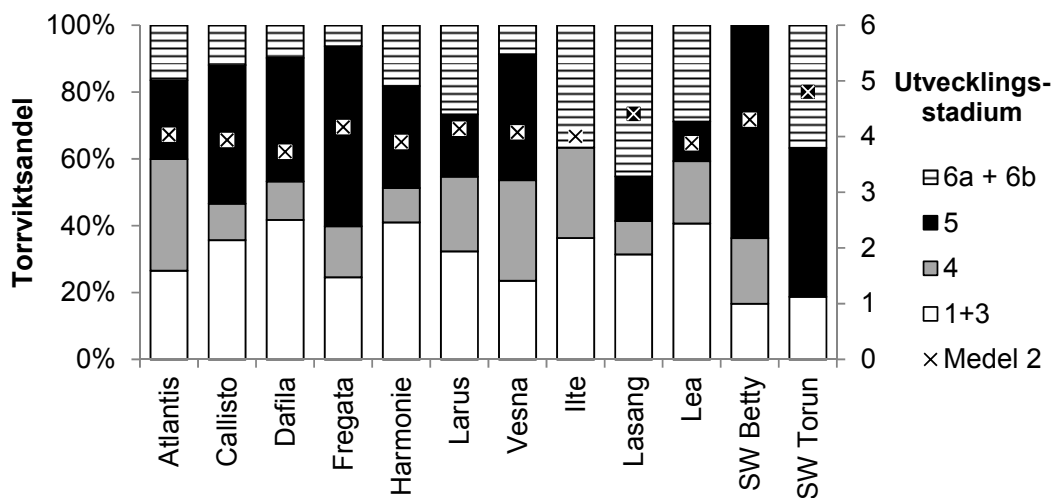
År 2012 visade sorteringen i olika utvecklingsstadier att vid det första provtagningstillfället, den 23 juli, var 37 % av torrvikten av skotten i den mest utvecklade sorten (LÖ RK9735) i blomning och 58 % i knoppsträckning (Figur 1). I den minst utvecklade sorten (SW Torun Vall II) var 20 % av skotten (torrvikt) i knoppsträckning. Resten var i knoppansvällning, stjälksträckning eller bladstadium.

Vid det senare provtagningstillfället 2012, den 14 augusti, hade den mest utvecklade sorten (SW Yngve) börjat få skott i fröbildningsstadium. De minst utvecklade (SW Torun Vall I + Vall II samt SW Ares) hade fortfarande en stor andel av skotten i knoppsträckning eller mindre utveckling och en mindre andel skott i blomning.

År 2014 skulle sorterna enligt planen klippas i samma utvecklingsstadium. För att jämföra sorterna beräknades dock även ett viktat medelutvecklingsstadium. Stadium 1+3 viktades med faktor 2, 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 3,7 för Dafila till 4,8 för SW Torun (Figur 2). Skillnaden var inte statistiskt signifikant.



Figur 1. Utvecklingsstadium (i torrviktsandel) av olika sorter av rödklöver provtagna vid två tidpunkter i återväxten år 2012. Stadium 1+3 är bladstadium + stjälksträckning, 4 knoppansvällning, 5 knoppsträckning, 6a blomning, 6b sen blomning, 7 mycket sen blomning och 8 fröbildning. *Developmental stage (in % of DM) of different red clover varieties sampled at two time points in the regrowth in 2012. 1+3 is leaf stage+node stage, 4 bud swelling, 5 bud stretching, 6a flowering, 6b late flowering, 7 very late blooming and 8 seed formation.*

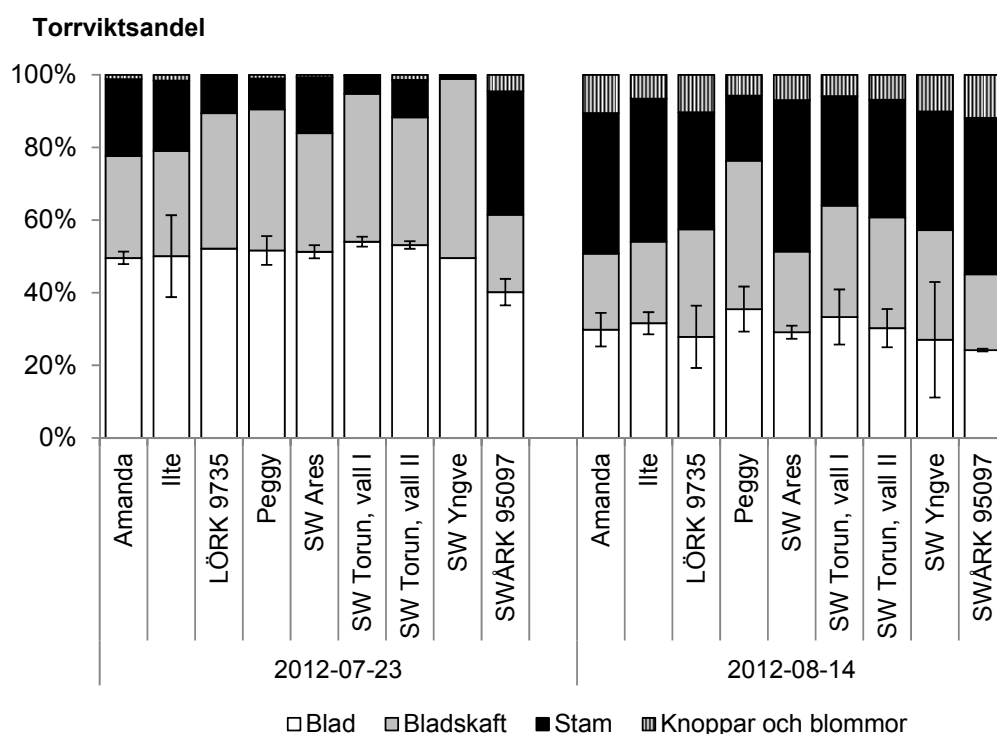


Figur 2. Utvecklingsstadium (torrviktsandel, hela skott) av olika sorter av rödklöver provtagna i andra skörd år 2014. Stadium 1+3 är bladstadium + stjälksträckning, 4 knoppansvällning, 5 knoppsträckning, 6 blomning (6a + 6b). Skalan på den högra y-axeln relaterar till ett viktat medelvärde för utvecklingsstadiet för varje sort, markerat med x.

Developmental stage (in % of DM, whole shoots of different red clover varieties sampled in the summer growth in 2014. 1+3 is leaf stage+node stage, 4 bud swelling, 5 bud stretching, 6 flowering (6a+6b). The scale on the right y-axis relates to a weighted average of development stage for each variety (x).

Växtfraktioner

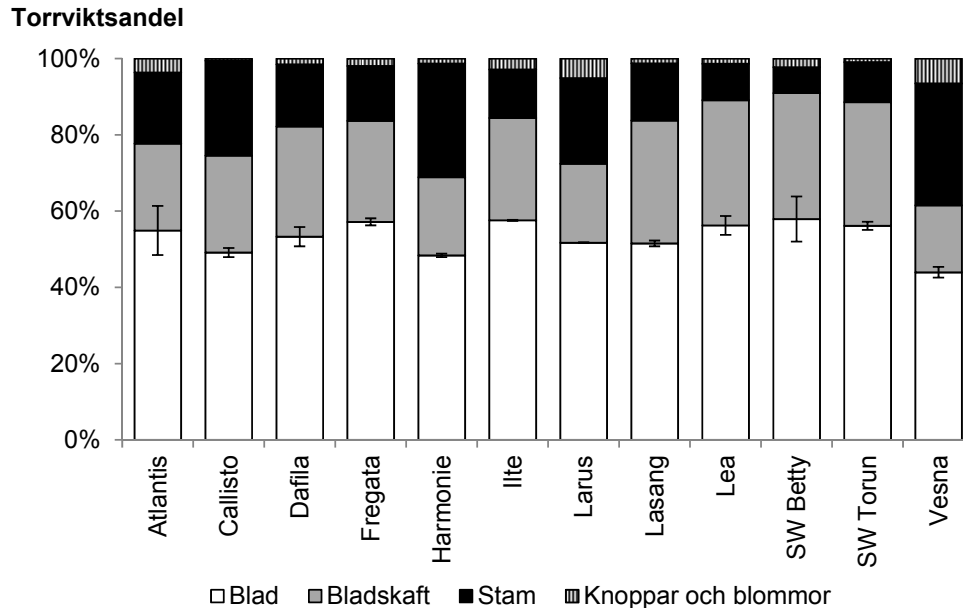
Försöksåret 2012 hade alla sorter betydligt högre andel blad vid det tidigare, jämfört med det senare provtagningstillfället, men det fanns inga signifikanta skillnader mellan sorterna vid någon av tidpunkterna (Figur 3). Däremot var det en tendens till skillnader i andel stam, bladskaft samt andel blad + bladskaft vid den första provtagningen ($P = 0,052$; $P = 0,058$ och $P = 0,059$ för respektive), med större andel stam men lägre andel bladskaft samt blad + bladskaft i SWÅ RK95097 än i SW Yngve. Vid den andra provtagningen var det inga skillnader. Frånvaron av signifikanta skillnader mellan sorterna kan delvis bero på det begränsade antalet prover per sort och provtillfälle.



Figur 3. Torrviktsandel av olika växtfraktioner hos rödklöversorter provtagna vid två tidpunkter i andra skörd år 2012. Varje värde är ett medeltal av två prover per sort och tillfälle (utom för LÖ RK9735 och SW Yngve där värdena vid första skördetillfället baseras på bara ett prov). Felstaplar anger standardavvikelsen i bladandel mellan de två proven av varje sort.

Proportion of DM of different plant fractions (flower / stem / petiol / leaf) in red clover varieties sampled at two time points in summer growth 2012. All results are mean values of two samples per variety and time. Error bars show the standard deviation between two samples for leaf proportion

År 2014 var skillnaden mellan sorterna i fördelningen av olika växtfraktioner (Figur 4) synbarligen mindre än vad den var i utvecklingsstadier. 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).



Figur 4. Torrviktsandel av växtfraktioner hos olika sorter av rödklöver provtagna i andra skörd år 2014. Värdena är medeltal av två prover av varje sort. Felstaplar anger standardavvikelsen mellan de två proverna rörande bladandel.
Proportion of dry matter in different red clover varieties sampled in summer growth 2014. All results are mean values of two samples. Error bars show the standard deviation between two samples for leaf proportion.

Näringsinnehåll

Det fanns inga signifikanta skillnader i näringsinnehåll mellan sorterna 2012, men för samtliga variabler skilde det mellan provtagningstillfällena, se Tabell 4. I samma tabell ses också analysresultaten från 2014. Detta år fanns signifikanta skillnader mellan sorterna beträffande NDF, råfett och smältbarhet (IVTD).

Tabell 4. Innehåll av omsättbar energi (OE), *in vitro*-smältbarhet (IVTD), råprotein (RP), NDF samt råfett i prover av de olika rödklöversorterna 2012 och 2014. Värdena är medeltal av två prover av varje sort och tillfälle.

Concentration of metabolisable energy (OE)(MJ/kg DM), in vitro digestibility (IVTD), crude protein (RP), NDF and crude fat (Råfett) (g/kg DM) in red clover varieties in 2012 and in 2014. All results are mean values of two samples.

Datum 2012	Sort	OE, MJ/kg ts	RP, g/kg ts	NDF, g/kg ts	
23 juli	Amanda	11,0	204	287	
	Ilte	10,9	224	301	
	LÖ RK9735	10,8	202	302	
	Peggy	11,1	216	272	
	SW Ares	11,1	229	286	
	SW Torun	11,3	223	260	
	SW Torun	11,1	223	271	
	SW Yngve	11,2	218	275	
	SWÅ RK95097	11,1	207	309	
14 augusti	Amanda	10,6	164	370	
	Ilte	10,6	171	378	
	LÖ RK9735	10,6	164	389	
	Peggy	10,7	196	322	
	SW Ares	10,7	177	369	
	SW Torun	10,8	194	335	
	SW Torun	10,5	185	348	
	SW Yngve	10,2	177	384	
	SWÅ RK95097	10,4	162	395	
Datum 2014	Sort	IVTD, g/kg ts	RP, g/kg ts	NDF, g/kg ts	Råfett, g/kg ts
15 juli	Atlantis	845 ^{ab}	232	356 ^{bc}	40,0 ^{ab}
15 juli	Callisto	855 ^{abc}	247	362 ^{bc}	39,5 ^{ab}
15 juli	Dafila	840 ^{ab}	224	360 ^{bc}	37,5 ^a
17 juli	Fregata	845 ^{ab}	237	363 ^{bc}	38,0 ^{ab}
15 juli	Harmonie	850 ^{abc}	245	371 ^c	42,0 ^{ab}
23 juli	Ilte	865 ^{bc}	257	346 ^{abc}	40,0 ^{ab}
15 juli	Larus	840 ^{ab}	234	365 ^{bc}	38,5 ^{ab}
23 juli	Lasang	850 ^{abc}	241	325 ^{abc}	42,5 ^{ab}
21 juli	Lea	855 ^{abc}	246	307 ^a	41,5 ^{ab}
21 juli	SW Betty	875 ^c	253	348 ^{abc}	42,5 ^{ab}
23 juli	SW Torun	850 ^{abc}	255	322 ^{ab}	45,0 ^b
15 juli	Vesna	835 ^a	234	344 ^{abc}	42,0 ^{ab}

Innehåll av 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 båda åren under detektionsgränsen. De FÖ som förekom i högst koncentration var formononetin och biochanin A. Resultaten redovisas här årsvis. En sammanställning ses i Tabell 5.

År 2012:

Det var inga signifikanta skillnader mellan Vall I och Vall II för SW Torun, dvs vallåldern påverkade inte innehållet av någon av de undersökta FÖ. Däremot påverkade provtagningstidpunkten koncentrationerna av genistein, formononetin, biochanin A, prunetin och coumestrol. Det var högre värden vid det tidigare skördetillfället än vid det senare. Det gällde framför allt formononetin (se Figur 5) där medelvärdet för alla sorter vid den första tidpunkten var 11,0 g/kg ts och vid den andra 4,7 g/kg ts, samt biochanin A där motsvarande värden var 9,7 respektive 3,5 g/kg ts. Koncentrationen av daidzein påverkades inte av skördetidpunkten.

Koncentrationen av formononetin var högre i Peggy, SW Torun Vall I och Ilte än vad den var i SWÅ RK95097. Koncentrationen av biochanin A var högre i LÖ RK9735 än i Peggy, SW Torun, SWÅ RK95097 och SW Yngve. Även SW Ares hade högre innehåll än SW Yngve. Koncentrationen av prunetin var högst i LÖ RK9735. Lägst var värdena i SW Ares. Koncentrationerna av daidzein och genistein skilde inte mellan sorterna.

Halten av coumestrol påverkades av interaktioner mellan tid och sort. Därför analyserades den inom varje provtagningstidpunkt för sig. Resultaten visade att vid det första tillfället var det högre koncentration i Peggy och Ilte än vad det var i Amanda och SW Yngve men inga skillnader i övrigt. Vid det senare tillfället var det högre koncentration i SW Torun Vall I än i SWÅ RK95097 men inga andra skillnader.

Den totala FÖ-koncentrationen i genomsnitt över de båda provtagningstillfällena var högre i LÖ RK9735 än i SW Yngve och SWÅ RK95097. Koncentrationen i Ilte var även den högre än i SWÅ RK95097 men skilde sig inte från de andra sorterna.

År 2014:

Det var statistiskt signifikanta skillnader mellan de provade sorterna för alla substanser. Skillnaderna i halterna av formononetin, coumestrol, prunetin och biochanin A var relativt stora, vilket påverkade mängden totala FÖ. Skillnaden i totalmängden jämnades dock ut en del då sorter som hade hög andel formononetin ofta hade lägre halt av biochanin A och tvärtom. Beträffande formononetin var halten högst i SW Betty och Ilte och lägst i Fregata. Fregata hade dock högst halt totala FÖ. Innehållet skilde en del mellan de två prov som tagits av varje sort, särskilt för Fregata men även för Atlantis, SW Betty och Ilte.

Båda år:

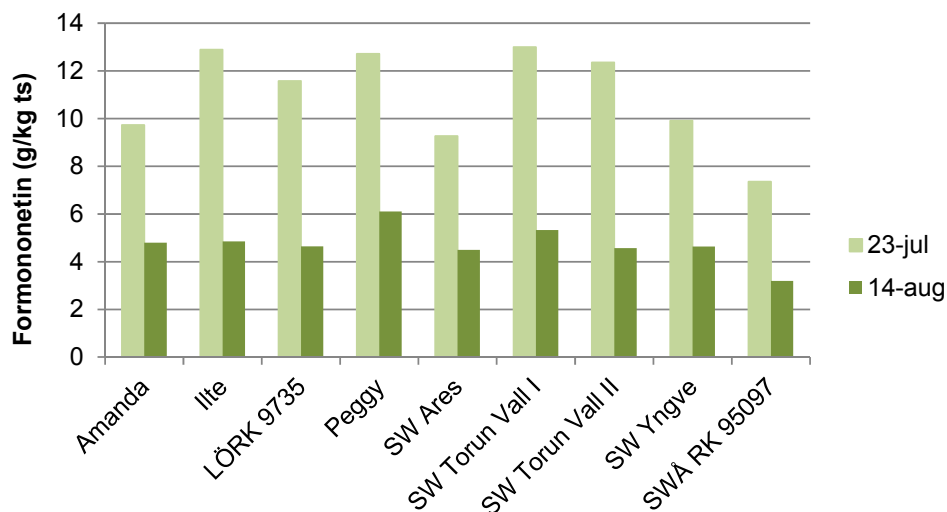
De analyserade halterna av formononetin och biochanin A var betydligt högre 2014 jämfört med medeltalet för de två provtagningarna 2012. Därmed blev också den totala mängden FÖ högre. Innehållet av FÖ i de två sorter som fanns med i försöken både 2012 och 2014 finns redovisat i Tabell 6.

Tabell 5. Koncentration av fytoöstrogener¹, (g/kg ts) i olika sorter av rödklöver provtagna 2012 (medeltal av två provtagningstidpunkter) samt 2014. Koncentrationen av coumestrol är angiven för båda tidpunkterna 2012. *Phytoestrogen¹ concentration, (g/kg DM) in red clover varieties in 2012 (average of the two sampling times) and in 2014. The concentration of coumesterol is given for both sampling times 2012.*

Sort	Daidzein	Genistein	Formononetin	Prunetin	Biochanin A	Coumestrol		Summa FÖ
2012								
						<i>23 juli</i>	<i>14 augusti</i>	
Amanda	0,10	0,36	7,3 ^{ab}	0,80 ^{ef}	7,1 ^{abc}	0,08 ^a	0,04 ^{ab}	15,6 ^{abc}
Ilte	0,14	0,38	8,9 ^b	0,37 ^{abcd}	7,5 ^{abc}	0,16 ^b	0,04 ^{ab}	17,4 ^{bc}
LÖ RK9735	0,10	0,45	8,1 ^{ab}	0,96 ^f	10,1 ^c	0,14 ^{ab}	0,04 ^{ab}	19,7 ^c
Peggy	0,10	0,26	9,4 ^b	0,75 ^{bcdef}	6,3 ^{ab}	0,16 ^b	0,05 ^{ab}	16,9 ^{abc}
SW Ares	0,07	0,36	6,9 ^{ab}	0,30 ^a	8,5 ^{bc}	0,12 ^{ab}	0,05 ^{ab}	16,3 ^{abc}
SW Torun Vall I	0,13	0,37	9,2 ^b	0,36 ^{abc}	5,8 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,06 ^b	15,9 ^{abc}
SW Torun Vall II	0,12	0,32	8,5 ^{ab}	0,36 ^{abc}	5,3 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,04 ^{ab}	14,6 ^{abc}
SW Yngve	0,11	0,29	7,3 ^{ab}	0,59 ^{abcdef}	3,9 ^a	0,08 ^a	0,04 ^{ab}	12,3 ^{ab}
SWÅ RK95097	0,09	0,33	5,3 ^a	0,47 ^{abcde}	5,0 ^{ab}	0,10 ^{ab}	0,03 ^a	11,3 ^a
2014								
Atlantis	0,06 ^{ab}	0,48 ^{abc}	14,8 ^{de}	0,48 ^a	19,2 ^{bc}		0,19 ^{def}	35,3 ^{bcd}
Callisto	0,06 ^{ab}	0,40 ^{abc}	11,9 ^b	0,30 ^a	15,2 ^{ab}		0,15 ^b	28,0 ^{ab}
Dafila	0,07 ^{ab}	0,52 ^{bc}	12,6 ^{bcd}	0,54 ^{ab}	23,8 ^c		0,16 ^{bcd}	37,7 ^{cd}
Fregata	0,05 ^{ab}	0,59 ^c	8,7 ^a	0,76 ^{abc}	32,7 ^d		0,11 ^a	42,9 ^d
Harmonie	0,05 ^{ab}	0,40 ^{abc}	12,5 ^{bcd}	0,33 ^a	15,8 ^{ab}		0,16 ^{bcd}	29,3 ^{abc}
Ilte	0,04 ^{ab}	0,32 ^{ab}	16,1 ^e	0,56 ^{abc}	16,6 ^{abc}		0,20 ^f	33,8 ^{abcd}
Larus	0,08 ^b	0,39 ^{abc}	14,7 ^{de}	0,45 ^a	18,6 ^{bc}		0,18 ^{cdef}	34,3 ^{abcd}
Lasang	0,05 ^{ab}	0,33 ^{ab}	14,2 ^{bcd}	1,11 ^{bc}	12,1 ^{ab}		0,18 ^{bcd}	28,0 ^{ab}
Lea	0,03 ^a	0,27 ^a	11,9 ^{bc}	0,33 ^a	13,2 ^{ab}		0,15 ^b	25,8 ^a
SW Betty	0,03 ^a	0,32 ^{ab}	15,7 ^e	1,26 ^c	9,9 ^a		0,20 ^f	27,4 ^{ab}
SW Torun	0,04 ^{ab}	0,25 ^a	14,5 ^{cde}	0,38 ^a	12,1 ^{ab}		0,19 ^{ef}	27,5 ^{ab}
Vesna	0,07 ^{ab}	0,34 ^{ab}	12,4 ^{bc}	0,40 ^a	14,4 ^{ab}		0,16 ^{bcd}	27,8 ^{ab}

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

Also secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol, enterolactone and equol were analysed, but the concentrations were below the detection limit for each of these phytoestrogens.



Figur 5. Koncentration av formononetin i rödklöversorter provtagna i knoppning samt blomning (5 respektive 8 veckor efter första skörd) i försöket 2012. Varje stapel är ett medeltal av två prov.
Concentration of formononetin (g/kg DM) in red clover varieties sampled at budding and flowering (5 and 8 weeks after first cut) in the study in 2012. All results are mean values of two samples.

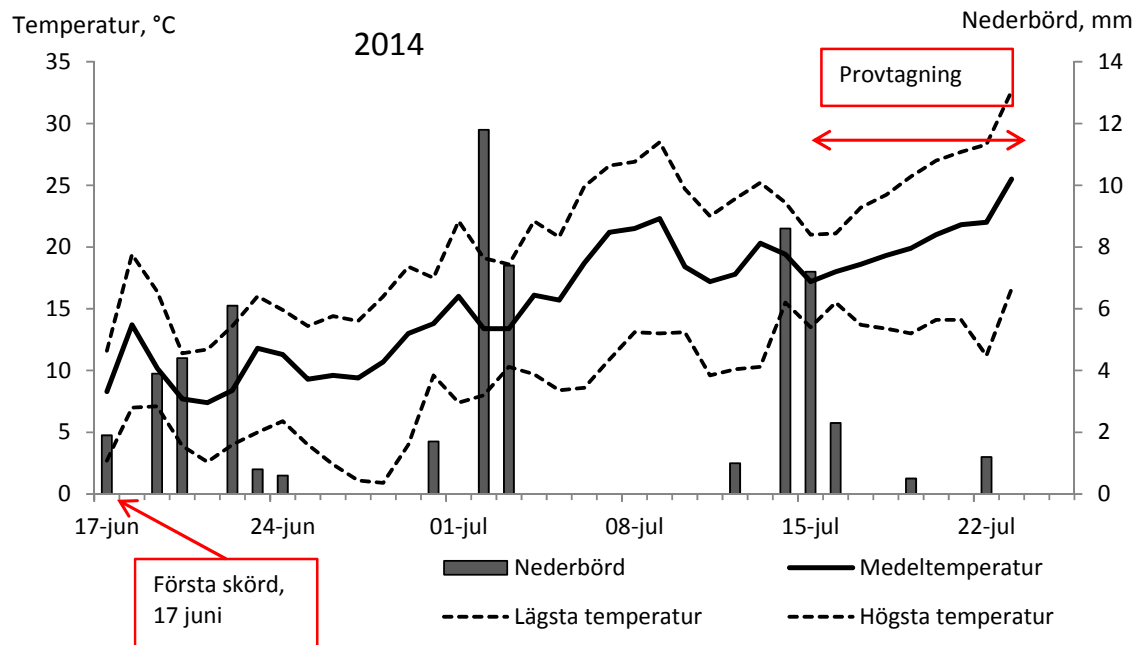
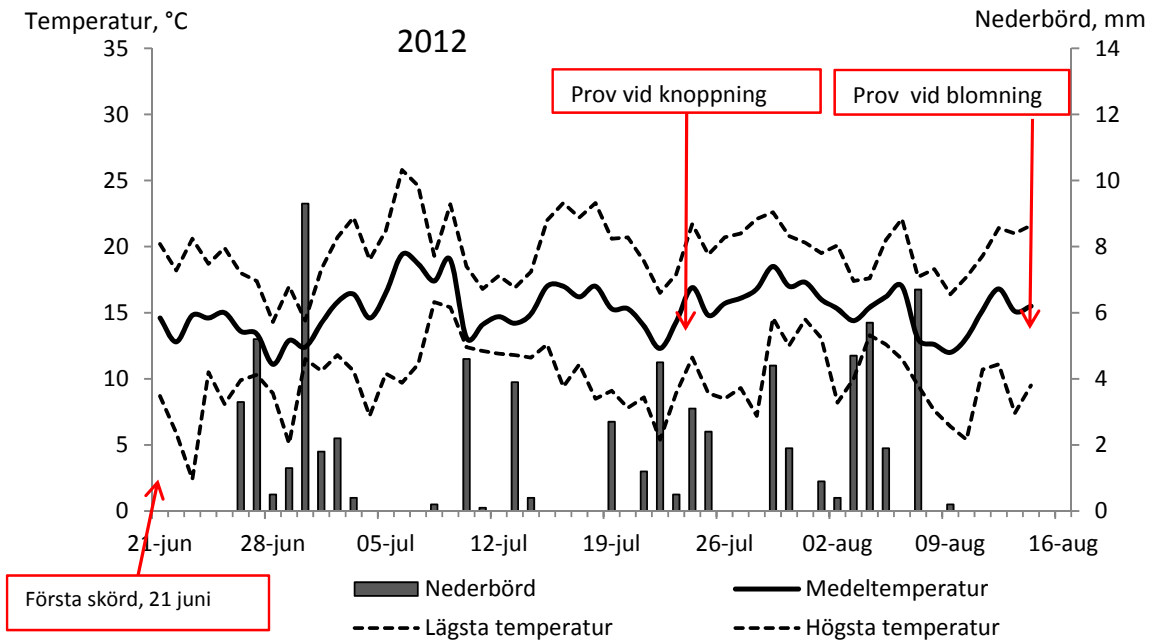
Tabell 6. Jämförelse av innehåll av fytoöstrogen (FÖ) mellan åren för de två sorter som var gemensamma för försöken 2012 och 2014.
Phytoestrogen concentration (g/kg DM) of varieties that were sampled both in 2012 and in 2014.

FÖ (g/kg ts)	SW Torun		Ilte	
	2012 ¹	2014	2012 ¹	2014
Formononetin	8,8	14,5	8,9	16,2
Daidzein	0,1	0,04	0,1	0,04
Coumestrol	0,1	0,2	0,1	0,2
Biochanin A	5,5	12,1	7,5	16,6
Genistein	0,4	0,3	0,4	0,3
Prunetin	0,4	0,4	0,4	0,6
Summa FÖ	15,3	27,5	17,4	33,8

¹ Medelvärde av de två provtidpunkterna 2012.
Average of the two sampling times in 2012.

Årsmånens inverkan

Som framgår av Figur 6 var det relativt stor skillnad i såväl nederbörd som temperaturutveckling mellan åren. År 2012 var en sommar med jämn temperatur och nederbörd medan 2014 var mer extrem med stigande temperatur, särskilt i samband med skörden.



Figur 6. Nederbörd och temperatur (medel, lägsta och högsta) mellan första och andra skörd åren 2012 och 2014.

Precipitation and temperature (average, lowest and highest) between first and second cut 2012 and 2014.

Samband mellan olika parametrar

År 2012 beräknades korrelationer mellan innehållet av FÖ och ett antal andra parametrar. I Tabell 7 redovisas de korrelationer som var signifikanta ($P < 0,001$) och hade ett värde på minst 0,6.

Det fanns en positiv korrelation mellan andelen blad och flera av fytoöstrogenerna, framförallt formononetin. Troligen är det kopplingen till andel blad som ligger bakom många av de övriga starka samband som finns. Fytoöstrogeninnehållet var även korrelerat till innehållet av NDF och råprotein; ju mer NDF och mindre råprotein desto mindre formononetin, biochanin A och coumestrol.

Halterna av biochanin A, formononetin och coumestrol var starkt positivt korrelerade till den totala fytoöstrogenhalten, vilket är naturligt för de båda förstnämnda då de utgör en stor del av totalen.

Tabell 7. Korrelationer mellan halter av olika fytoöstrogener och näringsvärde, utvecklingsstadium samt andel växtdelar i motsvarande provrutor i studien 2012. Alla fytoöstrogener testades mot varandra samt mot alla växtdelar och alla utvecklingsstadier men bara signifikanta samband med en korrelation på minst $\pm 0,6$ redovisas. För utvecklingsstadierna är stadium 6b sen blomning och stadium 7 mycket sen blomning. *Correlations between phytoestrogen concentrations and nutrient content, development stage (6b=late flowering, 7=very late flowering) and percentage of plant parts in the sampled plots in 2012. Only correlations of more than ± 0.6 are presented.*

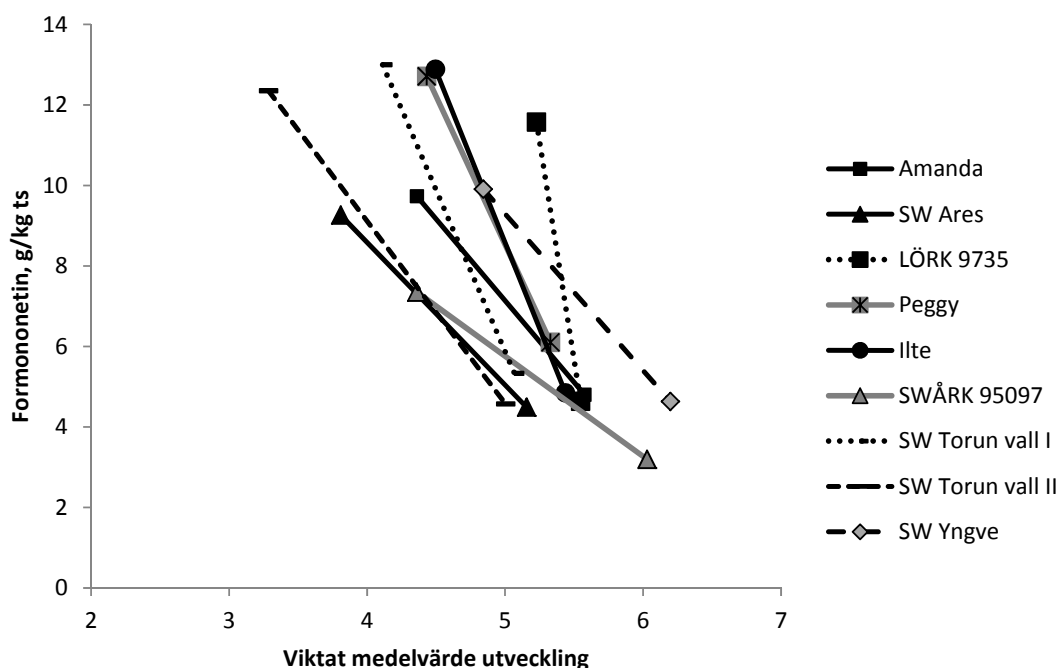
	Formononetin	Biochanin A	Coumestrol
Formononetin		0,79	0,91
Biochanin A	0,79		0,82
Coumestrol	0,91	0,82	
Fytoöstrogener, totalt	0,94	0,95	0,91
Energi (MJ/kg ts)	0,63		0,61
Råprotein(g/kg ts)	0,80	0,61	0,78
NDF (g/kg ts)	-0,84	-0,67	-0,77
Utvecklingsstadium 6b	-0,60		
Utvecklingsstadium 7	-0,61		
Andel blad	0,89	0,77	0,81
Andel stam	-0,74		-0,64
Andel blommor	-0,74	-0,68	-0,67

Skillnaden i fytoöstrogenhalt mellan provtagningstidpunkterna 2012 var betydande. Det kan förklaras av förändringar både i graden av utveckling och i andelen blad. Denna skillnad var ofta större än skillnaden mellan sorter, men det fanns viktiga signifikanta sortskillnader, bl a i den totala koncentrationen av FÖ. Att LÖ RK9735 hade högst total koncentration beror till stor del på dess höga innehåll av biochanin A (Tabell 5). Bland sorterna med lägre total fytoöstrogenkoncentration fanns främst SWÅ RK95097 men även SW Yngve, båda diploida sorter.

En av de mer betydelsefulla FÖ är formononetin pga dess höga halt och östrogena aktivitet vid omvandling till equol. I studien 2012 utmärkte sig SWÅ RK95097 med lågt innehåll, medan SW Torun, Ilte och Peggy hade de högsta halterna. Vid dessa jämförelser har dock ingen hänsyn tagits till skillnader i sorternas utveckling. Därför beräknades ett viktat medelvärde för varje sorts utvecklingsstadium, där stadium 1+3 (bladstadium + stjälksträckning) gavs värdet 2, knoppansvällning fick värdet 4, knoppsträckning fick värdet 5, blomning värdet 6, sen blomning värdet 6,5, mycket sen blomning värdet 7 och slutligen fröbildning fick värdet 8. Sedan multiplicerades andelen av ts i varje

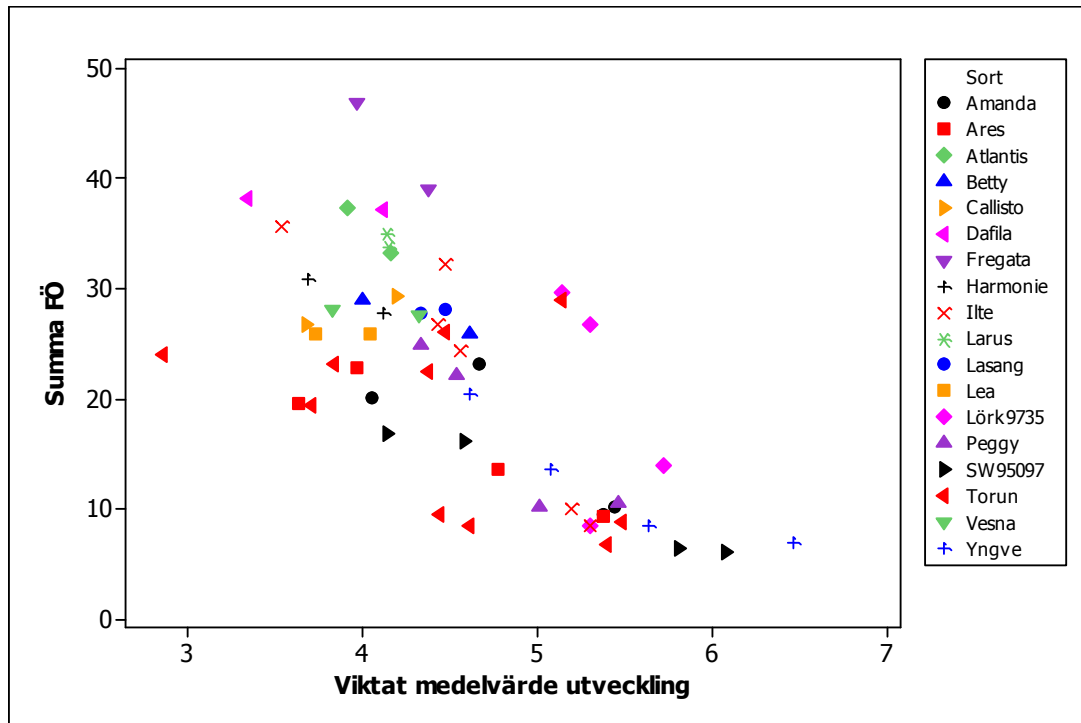
stadium med värdet för stadiet. Detta nya medelvärde för varje sorts utveckling vid varje provtillfälle kunde sedan relateras till formononetinhalten vid samma tillfälle (Figur 7). De högre värdena motsvarar det första provtagningsstillfallet och de lägre det andra. En interpolering mellan de två värdena representeras av en linje för varje sort. Detta gjordes för att grovt skildra utvecklingen mellan provtagningsstillfällena och underlätta sortjämförelser vid en tänkt gemensam utvecklingstidpunkt.

Figur 7 visar att de höga halterna i SW Torun 2012 (särskilt vid det första provtagningsstillfallet) troligen är orsakade av att SW Torun är en sen sort. Om vallen skördas baserat på grässets (timotejens) utvecklingsstadium kommer SW Torun att vara mindre utvecklad än vissa av de andra sorterna i studien och på grund av detta innehålla mer FÖ (särskilt formononetin). Sorterna Peggy och LÖ RK9735 utmärker sig dock fortfarande som sorter med lite högre koncentration av formononetin, tillsammans med Ilte. SWÅ RK95097 framstår även här som en sort med lågt innehåll av formononetin, tillsammans med SW Ares.



Figur 7. Formononetinkoncentration ställd mot ett viktat medelvärde för plantornas utvecklingsstadium vid de båda provtagningsstillfällena 2012. Vid beräkningen av det viktade medelvärdet fick stadium 1+3 (bladstadium + stjälksträckning) värdet 2, stadium 4 knoppansvällning fick värdet 4, stadium 5 knoppsträckning fick värdet 5, stadium 6a blomning fick värdet 6, stadium 6b sen blomning fick värdet 6,5, stadium 7 mycket sen blomning fick värdet 7 och stadium 8 fröbildning fick värdet 8.
Concentration of formononetin as correlated to a weighted average of development stage at the two samplings in 2012.

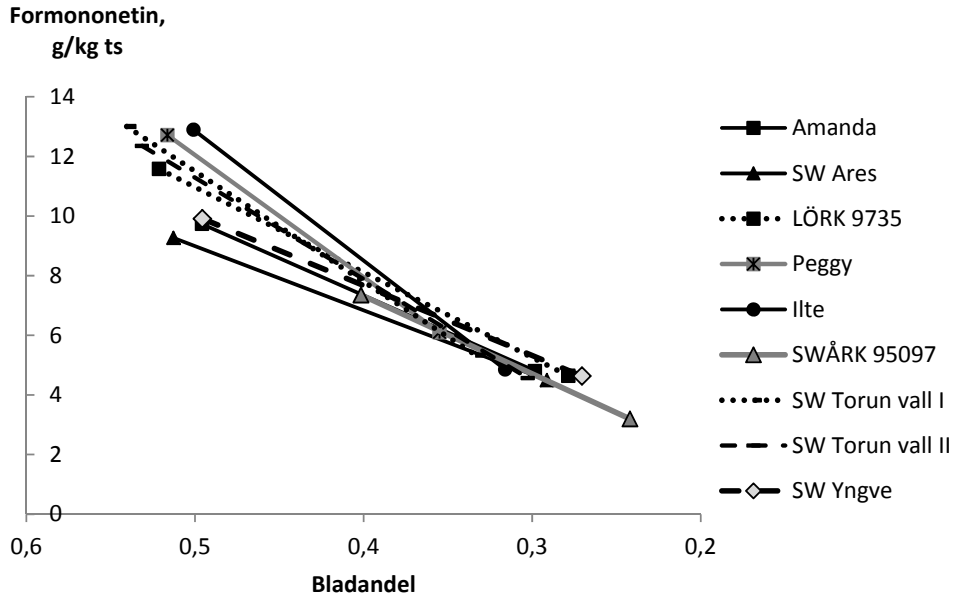
Figur 8 visar det totala innehållet av fytoöstrogener hos sorterna från båda åren, plottat mot utvecklingsstadium. Man kan se att den totala koncentrationen är exponentiellt avtagande. Det ser ut att vara störst skillnad mellan sorterna runt stadium 4,5 men det kan bero på att det var flest prover att jämföra vid den tidpunkten. SW Torun som förekom båda försöksåren ligger i den nedre delen av kurvan hela tiden (förutom två avvikande prover) vilket visar att den kan anses vara en låg sort sett till total halt fytoöstrogener.



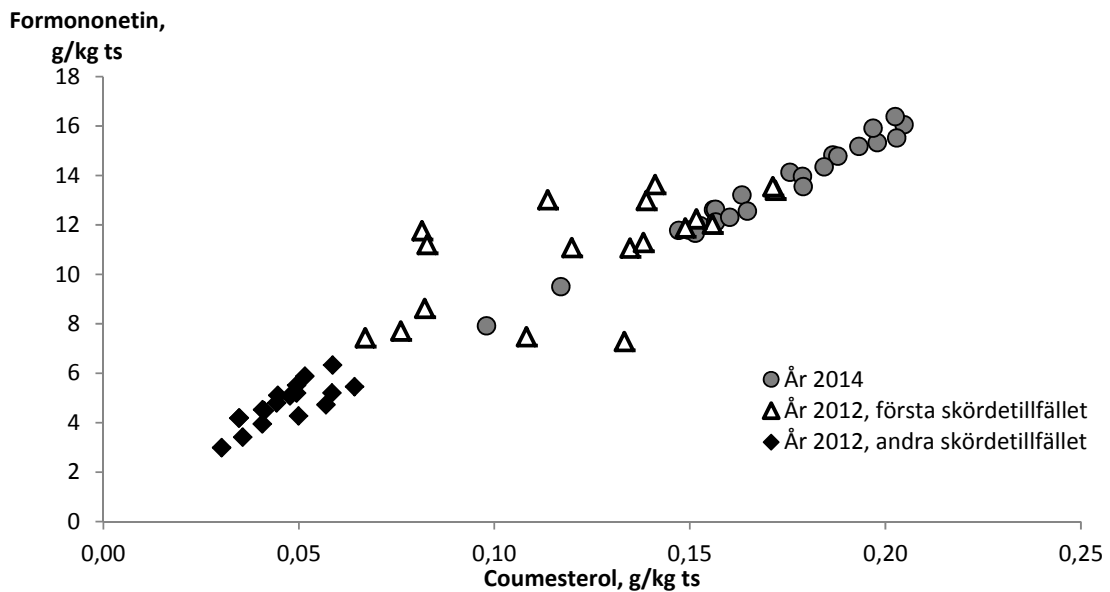
Figur 8. Totala fytoöstrogenerkoncentration i alla prover från åren 2012 och 2014 plottade mot medelutvecklingen. (Värdet 2 har använts för utvecklingsstadierna 1+3).
Total concentration of phytoestrogens in all samples from 2012 and 2014 plotted against mean development stage.

Ett annat sätt att jämföra sorterna är att relatera koncentrationen av formononetin till andelen blad hos de olika sorterna. I Figur 9 ses en sådan jämförelse från studien 2012. Resultaten från det första provtagningstillfället ses till vänster och sedan sjunker andelen blad ju äldre plantorna blir. Här ses att vid en större andel blad är det en grupp av sorter (Ilte, Peggy, LÖ RK9735 och SW Torun) som har något högre koncentration av formononetin än gruppen med SW Yngve, Amanda och SW Ares. SW Å RK95097 avviker från övriga sorter på grund av betydligt lägre bladandel men följer samma trend som SW Yngve, Amanda och SW Ares.

Sambandet mellan halterna av coumestrol och formononetin tycks vara starkt (Figur 10). Det verkar inte vara sortberoende eller påverkas av utvecklingsstadium utan ökar den ena så ökar den andra.



Figur 9. Formononetinkoncentrationen ställd mot bladandelen (torrviktsandel) i varje sort vid de två provtagningsstillfällena 2012.
Formononetin concentration as correlated to proportions of leaves in each variety at the two sampling times in 2012.



Figur 10. Formononetin plottad mot coumestrol för varje sort och provtagningsstillfälle.
Formononetin as correlated to coumestrol for each variety and sampling time (g/kg DM).

Diskussion

För praktisk användning av resultaten kan nämnas att sorten SWÅ RK95097 som provades 2012 är tillbakadragen av växtförädlaren och inte kommer att marknadsföras. Den nya sorten Peggy har visat goda odlingsegenskaper och är tänkt som marknadssort för norra Sverige. Dess relativt höga innehåll av formononetin kan dock göra att den är mindre intressant för lammproducenter. För dessa kan t ex SW Ares vara ett bättre val, dock med beaktande att det är en medelsort förädlad i första hand för Svealand och Götaland. Av de sorter som provades 2014 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. De övriga sorterna har inte visat sig vara uthålliga för odling i norra Sverige.

Utvecklingsstadier och växtfraktioner

De båda försöksåren gav lite olika utslag beträffande skillnaden mellan sorter gällande utveckling och andel av olika växtfraktioner. De resultat rörande utvecklingsstadium som framkom i våra studier är inte generella för respektive sorts tidighet, där hänvisas i stället till den officiella sortprovningsen. Däremot kan våra resultat kopplas till de övriga analyser som gjorts i samma provruta och i denna studie är det framförallt egenskapernas koppling till koncentrationen av FÖ som är i fokus.

Enligt bland annat Tsao et al. (2006), Seguin et al. (2004) och Saviranta et al. (2008) varierar såväl innehåll som sammansättning av FÖ mellan olika växtfraktioner. De korrelationer som beräknades 2012 (Tabell 7) visar exempelvis att innehållet av formononetin är positivt kopplat till andelen blad i rödklöverbeståndet. I samma tabell ses också att innehållet av FÖ minskar vid högre utvecklingsstadium, vilket också är kopplat till minskad bladandel. Även den korrelation som ses mellan exempelvis NDF och formononetin hänger samman med detta. Detta gör att en vanlig foderanalys kan användas som en vägledning till fytoöstrogeninnehållet i ett rödklöverdominerat ensilage. Lägre halt NDF tyder på tidigt utvecklingsstadium och därmed högre bladandel vilket kan innebära högre halter av FÖ.

De analyserade proverna hade en variation i utvecklingsstadium men var alla inom det spektrum då man kan tänka sig att skörd sker i praktiken. År 2012 medförde de fasta skördedatumen att det blev en viss spridning i utvecklingsstadium mellan sorterna. År 2014 var målet att provtagningen skulle ske vid samma utvecklingsstadium för alla sorter. Det blev heller inte några signifikanta skillnader mellan sorternas ”medel-utvecklingsstadium” även om andelen enskilda stadier varierade mellan sorterna.

Fytoöstrogener

I jämförelse med andra studier (Tabell 1) var fytoöstrogenhalten i denna studie i nivå med vad som tidigare setts vid försök på Röbbäcksdalen och andra platser, även om resultaten 2014 helt klart ligger i det övre spannet. I andra studier med rödklöver rapporteras ett innehåll av formononetin på 3,3–9,0 g/kg ts (Kallela et al., 1987; Moorby et al., 2004; Sarelli et al. 2003). Våra resultat 2014 var i medeltal drygt 13,0 g/kg ts. Data från olika studier kan dock variera beroende på t.ex. årsmån, växtplats och vid vilket utvecklingsstadium man skördat.

Det totala fytoöstrogeninnehållet var båda åren ca 70 % högre hos den sort som hade högst jämfört med den som hade lägst värde, vilket måste anses som en betydande variation. Dock kan våra resultat vara påverkade av att proverna togs från relativt små provytor. Detta kan göra att inte hela populationen av varje sort speglats, särskilt år 2014 då köverandelen i grödan var lägre. Det kan till viss del också förklara den variation som sågs mellan en del dubbelprover.

Det var med försöksupplägget 2012 svårt att särskilja de skillnader i fytoöstrogeninnehållet som orsakas av olika tidighet från ”riktiga” sortskillnader som är helt oberoende av mognad. Man kan dock dra slutsatsen att selektion på tidighet i rödklöverförädlingen även kan tänkas påverka innehållet av FÖ i det slutliga vallfodret.

År 2014 var upplägget ändrat så att alla sorter skulle skördas vid samma utvecklingsstadium. Bland de sorter som ingick i undersökningen detta år var det främst Fregata som avvek, med hög total koncentration av FÖ men lägst formononetinhalt av alla. Den totala koncentrationen orsakades främst av mycket högt innehåll 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 Fregata 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. 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).

Förekomsten av coumestrol i proverna var oväntad då man i de flesta tidigare studier inte analyserat eller kunnat detektera coumestrol i rödklöver (Tabell 1). Det kan dock bero på att många studier fokuserat på isoflavoner och därmed har innehållet av coumestrol i rödklöver inte analyserats. Koncentrationen av coumestrol vid det tidigare provtagningsstillfället 2012 (123 mg/kg ts i medeltal för alla sorter) var i samma nivå eller något lägre än det som rapporterats för lusern av Seguin et al. (2004), men halterna 2014 var högre än dessa och i samma nivå som angetts för lusern av Seguin & Zheng (2006). Coumestrol har en stark bindning till östrogenreceptorn och det är därför viktigt att vara medveten om dess förekomst även i rödklöver. Enligt våra studier finns också ett starkt samband mellan halterna av formononetin och coumestrol.

Tabell 6 visar en betydande skillnad i halter mellan åren för samma sort. Man kan dock se att Ilte ligger högre än SW Torun i innehållet av biochanin A och i total mängd FÖ både 2012 och 2014, vilket indikerar att rangeringen mellan sorter är densamma olika år, även om nivåerna skiljer.

De skillnader som framkom i nivå av fytoöstrogenkoncentration mellan de båda försöksåren kan delvis förklaras av årsmånsvariation. Medeltemperaturen var ungefär densamma mellan första och andra skörd 2012 och 2014 (15,2 respektive 15,7 °C), men sommaren 2014 var till en början kall, dock med en temperatur som ökade stadigt för att vara som högst i mitten av juli (Figur 6). Medeltemperaturen då sorterna provtogs var högre 2014 än 2012. Temperaturens inverkan på FÖ verkar inte vara mycket studerad. McMurray et al. (1986) visade dock på något högre formononetinkoncentration i blad av rödklöver vid lägre temperatur.

En ytterligare skillnad mellan de båda försöksåren var att 2012 studerades rödklöver i renbestånd medan 2014 års vallar var blandvallar. Högre koncentrationer har rapporterats från blandvallar än från renbestånd (Kallela et al., 1987). En teori är att arterna i blandvallen kan utvecklas långsammare än när de är i renbestånd. En annan teori är att fytoöstrogen skulle kunna ingå i växtens försvar och att halten ökar vid ökad konkurrens och då grödan stressas. Det finns även studier som visar ökad halt FÖ med högre utsädesmängd (Yu et al., 2009).

Hur mycket fytoöstrogen kan man utfodra?

Olika vetenskapliga källor anger olika nivåer av FÖ som kan ge fruktsamhetsproblem hos tackor. Det är många faktorer som inverkar, såsom fodrets form (ensilage / bete / hö) och djurens reproduktionsstadium och ras. Några exempel utifrån föreslagna gränsvärden kan ges, men osäkerheten är stor och det skulle behövas forskning under svenska förhållanden.

Mustonen (2014) citerar äldre källor som anger att nivåer under 3 g formononetin/kg ts är säkra för tackor, medan problem kan uppstå om innehållet överstiger 8 g/kg ts. Detta bygger dock till stor del på studier gjorda på bete. Hur innehållet i ensilerat material är jämfört med färskt material är oklart då olika studier har gett mycket skiftande resultat (Kalač, 2013). En viktig faktor tycks, förutom utvecklingsstadiet, vara hur länge skörden har förtorkats (Sarelli et al., 2003). Eftersom man inte kan vara helt säker på att ensilage har lägre FÖ-innehåll än grönmassa tar man en viss risk om man utfodrar tackor med rent rödklöverensilage med de koncentrationer vi funnit. Om man har ett

gräs/klöverensilage där klöver innehåller 15 g formononetin/kg ts, vilket var fallet i flera sorter i studien 2014, och vill hålla koncentrationen i grovfodret under 3 g/kg ts innebär det att halten rödklöver bör vara högst 20 % (25 % om man räknar med 20 % lägre halt av formononetin i ensilage jämfört med färsk klöver).

En annan källa (Adams, 1996) har kommit fram till att ett intag av 0,040 g formononetin eller 0,001 g coumestrol per kg levande vikt och dag skulle riskera 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 9 % med en sort som innehåller 15 g formononetin per kg ts för att riskera en negativ påverkan. Motsvarande uträkning för coumestrol vid ett innehåll på 0,2 g per kg ts i rödklövern ger en maximal rödklöverandel på 17 %. I en foderstat som även innehåller kraftfoder kan man ha högre rödklöverhalt i ensilaget eftersom fytoöstrogenerna då blir mer utspädda. Likaså om ensilaget är väl förtorkat vilket torde innebära sänkta halter. Om å andra sidan ensilagekonsumtionen är högre än ovan antagna 2 kg ts, skulle rödklöverandelen behöva vara lägre för att minska riskerna för negativ påverkan av FÖ.

Det finns betydligt färre studier som rör påverkan av FÖ på mjölkkor än vad det finns på får, men viss effekt på fruktsamheten även hos kor rapporteras av Kallela et al. (1984), Adams (1995) samt Wocławek-Potocka et al. (2013). För humant bruk är det av intresse att veta om FÖ går över i komjölk, vilket har studerats av Höjer et al. (2012). Om man på liknande sätt som ovan 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. Konsekvensen av denna skillnad är svår att utvärdera då kunskapen om effekterna på människan av equol från mjölkprodukter är mycket begränsad.

Slutsatser

Resultaten visar att utvecklingsstadiet har stor betydelse för koncentrationen av fytoöstroger hos rödklöver och att det även finns en årsmånsvariation.

Rödklöverhalterna är ofta större i andra och tredje skörd än i första skörden. Klöver är visserligen ofta mer utvecklad vid skörden av återväxten än i första skörden och har därmed troligen lägre fytoöstrogerhalt, men man bör ändå undvika att använda rödklöverrikt ensilage eller släppa tackor på rödklöverrikt bete vid tiden för betäckning och lamning. För att vara säkra på att slippa problem beroende på fytoöstroger bör andelen rödklöver till tackor under dessa perioder vara högst 20 % i ensilage och högst 15 % i bete.

Det fanns signifikanta sortskillnader i innehåll av fytoöstroger och flertalet av de studerade rödklöversorterna hade höga halter av flera av fytoöstrogererna. Skillnaderna är såpass stora att vi anser att det vore bra om man kunde införa analys av fytoöstroger vid sortförsök av rödklöver samt vid utveckling /införande /marknadsföring av olika sorter.

Innehållet av coumestrol var anmärkningsvärt då det tidigare inte ansetts finnas i rödklöver i någon större omfattning.

Tack

Tack till Regional Jordbruksforskning för Norra Sverige som finansierade studien år 2012 och Stiftelsen Lantbruksforskning som finansierade studien 2014. Tack också till Lis Sidemann och Stig Purup på laboratoriet vid Århus universitet i Foulum, Danmark, som gjorde analyserna av fytoöstroger.

Referenser

- Adams, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 1509-1515.
- Adams, N.R. 1996. Phyto-estrogens: lessons from their effects on animals. *Proc. Of the Nutrition Society of Australia* 20, 156-162.
- Batterham, T.J., Hart, N.K., Lamberton, J.A, Braden, A.W.H. 1965. Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature* 206(4983): 509.
- Bernes, G., Hetta, M., Martinsson, K. 2006. Vallfödrets kvalitet påverkar lammens konsumtionsförmåga. *Nytt från institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap/Husdjur*, 3.
- Carrera, C., Martinez, M.J., Dardanelli, J. 2011. Environmental variation and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Science* 51 (2), 800-809.
- Daems, F., Decruyenaere, V., Agneessens, R., Lognay, G., Romnee, J. M., Froidmont, E. 2016. Changes in the isoflavone concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) during ensiling and storage in laboratory-scale silos. *Animal Feed Science and Technology* 217, 36-44.
- Dryler, K. 2014. Sortprovning av vallgräs och vallbaljväxter 2012 och 2013. *Nytt från institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap nr 4. SLU Umeå.*
- 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)*
- Kalač, P. 2013. Fresh and ensiled forages as a source of estrogenic equol in bovine milk: a review. *Czech Journal of Animal Science* 58, 296-303.
- Kallela, K., Heinonen, K., Saloniemi, H. 1984. Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows - a case report. *Nordisk Veterinær Medicin* 36 (3-4), 124-129.
- 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.
- Lundh, T., Madej, A. 2003. *Fytoöstrogener i foder och dessas effekt på husdjuren. Kungliga Skogs- och Lantbruksakademiens Tidskrift* 142:12, 37-42.
- Marley, C.L., Fychan, R., Fraser, M.D., Sanderson, R. 2007. Effects of feeding different ensiled forages on the productivity and nutrient efficiency of finishing lambs. *Grass and Forage Science* 62: 1-12.
- Marshall, T. 1973. Clover disease – what we know and what we can do. *Journal of Agriculture, Western Australia* 14, 198-206.
- McMurray, C.H., Laidlaw, A.S., McElroy, M. 1986. The effect of plant development and environment on formononetin concentration in red-clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37 (4), 333-340.
- 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
- Mustonen, E., Taponen, S., Andersson, M., Sukura, A., Katila, T., Taponen, J. 2014. Fertility and growth of nulliparous ewes after feeding red clover silage with high phyto-oestrogen concentrations. *Animal* 8:10, 1699-1705.

- 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.
- Pfritscher, 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 Ruminant research* 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.
- Schubiger, F.X., Lehmann, J. 1994. Stoffe mit östrogenen Wirkung in Rotkleearten. *Agrarforschung* 1 (8), 361-363.
- 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.
- Wocławek-Potocka, I., Mannelli, C., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T., Skarzyński, D.J. 2013. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model. *International Journal of Endocrinology*, vol. 2013, Article ID 650984, doi:10.1155/2013/650984
- Yu, L.P., Li, F.D., Cheng, W.D., Chen, X.R., Wang, W.Z. 2009. Influence of Mo, seeding rate and row spacing on yield and isoflavone content in *Trifolium pratense* in Minshan. *Chinese Journal of Grassland* 31, 52-57.
- 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.

**Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap
901 83 UMEÅ**

www.slu.se/njv
