



# Stoffe mit östrogenen Wirkung in Rotkleearten

Franz Xaver SCHUBIGER und Josef LEHMANN, Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholz (FAP), CH-8046 Zürich

**Rotklee enthält Formononetin, ein Isoflavon, das bei Schafen und Rindern Fruchtbarkeitsstörungen verursachen kann. Je nach Sorte und Umwelt kommen in den Pflanzen unterschiedliche Mengen vor. Formica, eine neue Rotkleeart der FAP, enthält im Vergleich mit anderen Sorten weniger von diesem Pflanzenöstrogen. Im Sommer war der mittlere Gehalt an Formononetin rund 35 % tiefer als zur Zeit des ersten Schnittes.**

Einige Futterpflanzen enthalten Substanzen, die beim Vieh wie tierische Östrogene<sup>1</sup> wirken. Solche Pflanzenöstrogene kommen in vielen Leguminosen oft in hoher Konzentration vor und wurden verschiedentlich mit Fortpflanzungsstörungen bei Schafen und Rindern in Zusammenhang gebracht.

Der schädliche Einfluss von Pflanzenöstrogenen auf die Fortpflanzung wurde erstmals 1946 von Bennetts *et al.* erwähnt. Sie beobachteten bei Schafen, die auf bodenfrüchtigen Klee (*Trifolium subterraneum* L.) weideten, eine ständige Abnahme der Anzahl geworfener Lämmer. Die Ursache für die Unfruchtbarkeit war eine Empfängnischwäche, die von einem cystischen Zustand der Fortpflanzungsorgane begleitet wurde. Nicht trächtige Schafe und Hammel, denen bodenfrüchtiger Klee gefüttert wurde, bildeten sogar Milch. Aufgrund dieser Beobachtungen vermuteten die oben erwähnten Autoren, dass ein Pflanzenöstrogen die Unfruchtbarkeit der Zuchtschafe verursachte.

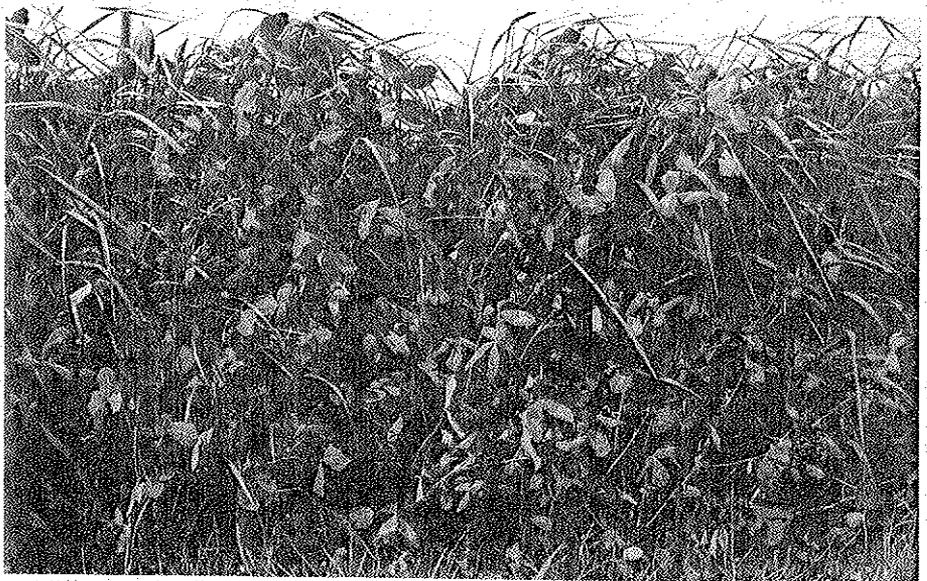
Einige Jahre später fanden Bradbury und White (1954) im bodenfrüchtigen Klee zwei Isoflavone mit östrogenen Wirkung: Genistein und Formononetin. Auch aus anderen Leguminosenarten wurden in der Folge weitere Pflanzenöstrogene isoliert: zum Beispiel Cumöstrol und die beiden Isoflavone Biochanin A und Daidzein. Bei der Prüfung der Aktivität der Pflanzenöstrogene an Mäusen (Bickoff *et al.* 1962) erwies sich das Cumöstrol als 35 mal aktiver als Genistein. Dieses wiederum war wirksamer als Daidzein und Biochanin A; Formononetin war das am wenigsten wirksame Isoflavon. Trotz seiner hohen

Aktivität konnte das Cumöstrol nicht der Verursacher der Fruchtbarkeitsstörungen von grasenden Tieren sein, da es im Klee nicht in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Aber auch Genistein konnte nicht verantwortlich gemacht werden für die Unfruchtbarkeit der Schafe. Millington *et al.* (1964) legten nämlich Beweise vor, dass die Zunahme der Zitzenlänge von Hammeln (ein Mass für die östrogenen Wirkung) mit dem Gehalt an Formononetin der Kleepflanzen und nicht mit dem Genisteingehalt korreliert war. Andere Forscher bestätigten diese bedeutende Entdeckung.

Diese Erkenntnisse führten zu einer Untersuchung der Umwandlung und Aufnahme von Pflanzenöstrogenen bei verschiedenen Tieren (Batterham *et al.* 1965; Braden *et al.* 1971). Bei Schafen und Kühen konnte gezeigt werden, dass Biocha-

nin A im Pansen über Genistein zu p-Äthylphenol und einer Phenolsäure abgebaut wird (Abb. 2); beide Verbindungen zeigten keine östrogenen Wirkung. Formononetin wird zunächst zu Daidzein demethyliert und dann durch einen Reduktionsschritt in eine östrogenen, Equol genannte, Verbindung umgewandelt. Die Aktivität des Equol entspricht zwar nur der  $10^{-3}$ - bis  $10^{-5}$ -fachen östrogenen Wirkung von Östradiol (einem Säugetier-Östrogen), trotzdem kann Equol in hohen Konzentrationen eine bedeutende hormonale Gleichgewichtsstörung erzeugen. Grössere Mengen Formononetin können in den Pflanzen durchaus vorkommen, enthalten doch verschiedene Kleearten, zum Beispiel Rotklee (*Trifolium pratense* L.) (Sachse 1974), sehr hohe Gehalte an Formononetin (Vorstufe zum Equol). Im Gegensatz dazu kommt Formononetin im Weissklee nur in unbedeutenden Mengen vor.

Kühe scheinen auf die östrogenen Wirkungen der Klee-Isoflavone weniger zu reagieren als Schafe (Lundh *et al.* 1990). Für diese Beobachtung konnte allerdings bisher keine befriedigende Erklärung ge-



**Abb. 1.** In einer Mattenklee-Gras-Mischung ist bis zu 50 % Rotklee erwünscht. Sorten mit einem tiefen Gehalt an Formononetin sind hier gefragt, um Fruchtbarkeitsstörungen bei den Tieren zu vermeiden.

<sup>1</sup> Östrogene sind weibliche Sexualhormone, die Geschlechtsfunktionen steuern.

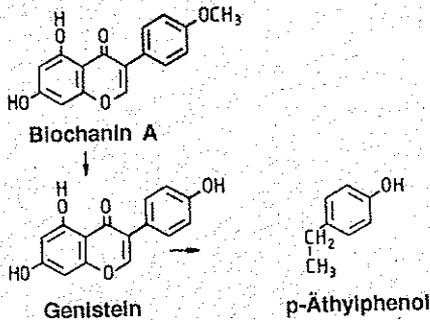
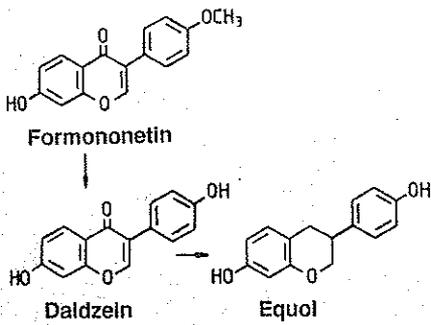


Abb. 2. Formononetin wird von den Mikroorganismen im Pansen zum östrogen wirksamen Equol reduziert. Biochanin A und Genistein werden zu p-Athyphenol abgebaut. Dieses zeigt keine östrogene Aktivität (aus Lundh *et al.* 1990).

funden werden. Trotzdem gibt es Berichte, die Fruchtbarkeitsstörungen bei Kühen auf die Aufnahme von Pflanzenöstrogenen zurückführen (Kellala *et al.* 1984). Allerdings gibt es auch Arbeiten, die dies nicht bestätigen konnten (Austin *et al.* 1982).

Mit der vorliegenden Arbeit wollten wir zeigen, wieviel Formononetin verschiedene Rotkleearten enthalten können. Anstoss zu diesen Untersuchungen war der Umstand, dass während der Jahre 1990 bis 1992 die eidgenössischen Forschungsanstalten Zürich-Reckenholz und Nyon-Changins eine Sortenprüfung für Rotklee durchführten. Erstmals wurde dabei auch eine Rotkleeart mitgeprüft, die auf einen tiefen Gehalt an Formononetin gezüchtet wurde.

## Hoher Gehalt im Frühjahr

Zur Zeit des ersten Schnittes war der Gehalt an Formononetin bei allen Sorten höher als beim dritten Schnitt: im Mittel 7,7 g/kg Trockensubstanz (TS) gegenüber 4,9 g/kg TS. Die Unterschiede waren 1991 grösser als 1992 (Abb. 3).

Unterschiedlich hohe Formononetin Gehalte während der Vegetation wurden bereits früher festgestellt. Nach Dedio und

## Bestimmung von Formononetin

Das untersuchte Probenmaterial stammte aus einem Versuch in Zürich-Reckenholz, der im Rahmen der offiziellen Sortenprüfung angelegt wurde. Während der Jahre 1991 und 1992 entnahmen wir zum Zeitpunkt des ersten (21.5.91 und 21.5.92) und des dritten Schnittes (26.8.91 und 13.8.92) aus drei Feldwiederholungen je eine Probe. Der Sommeraufwuchs war sieben beziehungsweise sechs Wochen alt. Die Rotkleepflanzen waren zur Zeit der Ernten im Stadium «Beginn Blüte». Die Pflanzenproben wurden gefriergetrocknet und anschliessend auf den Gehalt an Formononetin untersucht. Die Bestimmung erfolgte nach der Extraktion des Formononetins mit Hilfe der Fluorimetrie (Gosden und Jones 1978).

Clark (1968) haben Rotkleeblätter vor der Blüte den höchsten Gehalt an Isoflavonen (Formononetin und Biochanin A). Nach der Blüte nimmt die Konzentration ab. McMurray *et al.* (1986) zeigten, dass Rotklee im Frühjahr mehr Formononetin enthält als im Sommer. Ab dem zweiten Aufwuchs fiel zudem der Formononetin Gehalt umso tiefer aus, je älter die Pflanzen waren. Tiefe Temperaturen während des Wachstums bewirkten einen höheren Gehalt an Formononetin. Dies dürfte auch unsere Gehaltsunterschiede im Frühjahr zwischen den beiden Untersuchungsjahren erklären. Im Mai 1991 lag die durchschnittliche Temperatur deutlich unter und im Mai 1992 deutlich über dem Mittel der Jahre 1961 - 92.

Auch die Tatsache, dass sich der weitaus grösste Teil des Formononetins in den Blättern befindet (Dedio und Clark 1968), dürfte wesentlich zu den saisonalen Schwankungen beitragen. Die Rotkleepflanzen enthalten nämlich je nach Alter der Pflanzen ganz unterschiedliche Anteile an Stengeln und Blättern.

## Grosse Sortenunterschiede

Je nach Sorte lag der Formononetin Gehalt während des 1. Schnittes zwischen 5,3 und 9,3 g/kg TS und während des 3. Schnittes zwischen 3,1 und 6,3 g/kg TS. Die Gehalte der zum Anbau in der Schweiz empfohlenen Rotkleearten werden in der Abbildung 4 präsentiert. Sorten, die im ersten Aufwuchs einen hohen Gehalt an Formononetin aufwiesen, enthielten auch im dritten Aufwuchs am meisten. Das gleiche galt für Rotkleearten mit tiefem Gehalt. Auffallend war auch, dass diploide (2n) Sorten weniger Formononetin enthielten als tetraploide (4n). Der mittlere Unterschied betrug 1 g/kg TS.

## Formica enthält wenig Formononetin

Die neue schweizerische Rotkleezüchtung Formica enthielt zur Zeit der beiden Ernten am wenigsten Formononetin. Verglichen mit dem Mittel aller geprüften Sorten war der Gehalt an Formononetin während des ersten Schnittes um 32 % und während des dritten Schnittes um 38 % tiefer.

Dies ist kein Zufall, sondern das Resultat einer gezielten Züchtungsarbeit. An unserer Forschungsanstalt wurde seit 1983 Rotklee auf reduzierten Formononetin Gehalt gezüchtet. Ausgehend von vielversprechenden alten Hofsorten des Mattenklee wurden in mehreren Generationen Pflanzen mit tiefem Gehalt ausgelesen. Diese Arbeiten führten zur Schaffung der diploiden Mattenkleeorte **Formica**. Aufgrund ihrer Anbaueignung, die sie in der Sortenprüfung 1990 - 92 bewiesen hat (Mosimann *et al.* 1993), wird sie seit 1993 für den Anbau in der Schweiz empfohlen. Eine Beschreibung der Sorte Formica wird in dieser Zeitschrift erscheinen, sobald das erste Saatgut in den Handel kommt (etwa 1996).

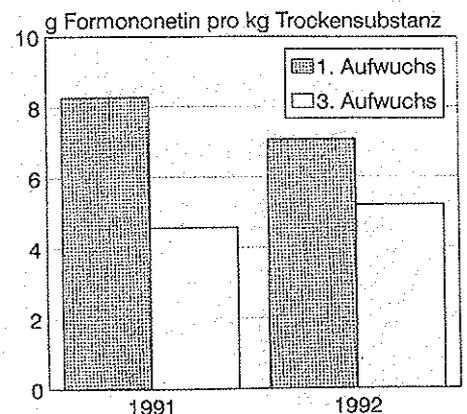


Abb. 3. Durchschnittlicher Formononetin Gehalt von 32 Rotkleearten während des ersten und des dritten Aufwuchses.

## Fruchtbarkeitsstörungen vermeiden

Rotklee wird in der Schweiz ausschliesslich zusammen mit Gräsern angebaut. Er kann allerdings einen grossen Anteil im Bestand einnehmen. In Mattenklee-Gras-Mischungen (Standardmischung 300) und in Italienisch-Raigras-Klee-Mischungen strebt man sogar einen 50 % Anteil an Rotklee an (Abb. 1). Neil *et al.* berichteten 1969, dass bei einem Gehalt des Futters von 3 g Formononetin pro kg TS oder tiefer nur eine geringe östrogene Wirkung bei Schafen beobachtet werden kann. Die Verwendung der neuen Rotkleezüchtung Formica in den Klee-Gras-Mischungen bietet Gewähr, dass der Schwellenwert für östrogene Wirkung im Futter zu keiner Zeit überschritten wird, auch wenn der Rotkleeanteil 50 % beträgt.

Die anderen empfohlenen Rotkleearten können dies nicht immer garantieren.

## DANK

Wir danken Frau Dr. Jutta Sachse, Thalwil, für die fachliche Unterstützung bei der Bestimmung des Formononetin Gehaltes.

## RÉSUMÉ

### Teneur en formononetine des variétés de trèfle violet

Le trèfle violet contient de la formononetine, dont l'action est oestrogène. La teneur moyenne de toutes les variétés testées est plus élevée durant la première pousse (7,7 g par kg MS) que durant la troisième pousse (4,9 g par kg MS). Des différences significatives dans la teneur en formononetine ont pu être mises en évidence entre les variétés. La variété Formica se caractérise par une très faible teneur en formononetine.

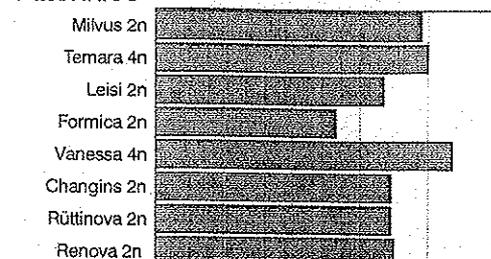
## SUMMARY

### Varietal variation in the formononetin content of red clover

Formononetin is believed to be the isoflavone mainly responsible for the oestrogenic effect of red clover. Mean formononetin concentration of 32 varieties decreased from 7.7 g kg<sup>-1</sup> DM when harvested in the spring to 4.9 g kg<sup>-1</sup> DM when harvested in the summer. The formononetin content varied greatly between varieties. Lowest content was found in Formica, a variety selected for low formononetin level.

**KEY WORDS:** phyto-oestrogen, formononetin, red clover.

## Mattenklee



## Ackerklee

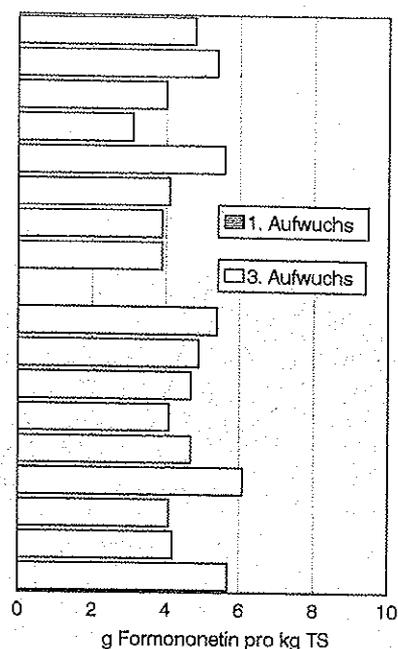
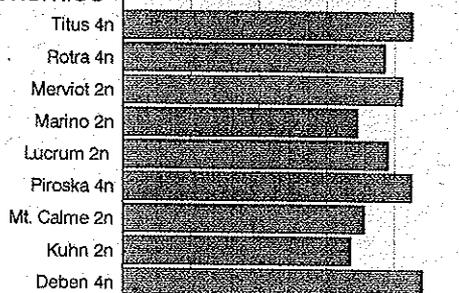


Abb. 4. Gehalt an Formononetin der für den Anbau in der Schweiz empfohlenen Rotkleearten während des ersten und des dritten Schnittes (2n = diploide Sorte, 4n = tetraploide Sorte).

## LITERATUR

Austin A.R., Aston K., Drane H.M. and Saba N., 1982. The fertility of heifers consuming red clover silage. *Grass and Forage Science* 37, 101-106.

Batterham T.J., Hart N.K., Lamberton J.A. and Braden A.W., 1965. Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature* 206, 509.

Bennets H.W., Underwood E.J., and Shier F.L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *The Australian Veterinary Journal* 22 (1), 2-12.

Bickoff E.M., Livingston A.L., Hendrickson A.P. and Booth A.N., 1962. Relative potencies of several estrogen-like compounds found in forages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10 (5), 410-412.

Bradbury R.B. and White D.E., 1954. Estrogen and related substances in plants. *Vitamins and Hormones* 12, 207-223.

Braden A.W., Thain R.I. and Shutt D.A., 1971. Comparison of plasma phyto-oestrogen levels in sheep and cattle after feeding on fresh clover. *Australian Journal of Agriculture Research* 22, 663-670.

Dedio W. and Clark K.W., 1968. Biochanin A and formononetin content in red clover Varieties at several maturity stages. *Canadian Journal of Plant Science* 48, 175-181.

Gosden A. and Jones R., 1978. A routine method for predicting the formononetin content of red clover. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 925-929.

Kellala K., Heinonen K. and Saloniemi H., 1984. Plant Oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. *Nordisk Veterinärmedicin* 36, 124-129.

Lundh T.J.O., Pettersson H.I. and Martinsson K.A., 1990. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1530-1534.

McMurray C.H., Laidlaw A.S. and 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, 333-340.

Millington A.J., Francis C.M. and McKeown N.R., 1964. Wether Bioassay of annual pasture legumes. *Australian Journal of Agriculture Research* 15, 527-536.

Mosimann E., Chalet C., Lehmann J. et Schubiger F.X., 1993. Essais de variétés de trèfle violet (*Trifolium pratense* L.) 1990-1992. *Revue Suisse Agriculture* 25 (3), 139-143.

Neil H.G., Fels H.E. and Francis C.M., 1969. Control of clover infertility in sheep. *Journal of Agriculture of Western Australia* 10, 275-277.

Sachse J., 1974. Die Bestimmung östrogenen Isoflavone und Cumöstroin in Klee (*Trifolium pratense* L. und *Trifolium repens* L.). *Journal of Chromatography* 96, 123-136.