Farmacie 1-06 18.1.2006 13:47 Str. 44
proLékaře.cz | 10.1.2026

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LV – Číslo 1 – LEDEN 2006

# EXPLANTÁTOVÁ KULTURA *TRIFOLIUM PRATENSE* L.

KAŠPAROVÁ M., SIATKA T., SPILKOVÁ J., DUŠEK J.

Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, Katedra farmakognozie

SOUHRN

**Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.**

Perspektivním zdrojem flavonoidů a isoflavonoidů s fytoestrogenní aktivitou se jeví jetel luční. Z klíční rostliny čtyř různých odrůd *Trifolium pratense* L. byla odvozena kalusová a suspenzní kultura. Pro kultivaci je optimální živné médium podle Gamborga s přídavkem 2 mg.l$^{-1}$ 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l$^{-1}$ 6-benzylaminopurinu. Na základě růstové a produkční charakteristiky byl stanoven u kalusové kultury subkultivační interval 29 až 43 dní, u suspenzní kultury subkultivační interval 16 až 23 dní. Pomocí TLC a HPLC bylo zjištěno, že explantátová kultura *Trifolium pratense* L. obsahuje isoflavonoid formononetin.

K l í č o v á s l o v a: *Trifolium pratense* L. – odvození kalusové a suspenzní kultury – růstová a produkční charakteristika – flavonoidy a isoflavonoidy

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 44–47**

SUMMARY

**Explant Culture of *Trifolium pratense* L.**

The red cloverl seems to be a prospective source of flavonoids and isoflavonoids with phytoestrogenic activity. Young seedlings of four different varieties of *Trifolium pratense* L. were employed to derive callus and suspension cultures. The optimal medium for cultivation is Gamborg's cultivating medium with an addition of 2 mg.l$^{-1}$ of 2,4-dichlorphenoxyacetic acid and 2 mg.l$^{-1}$ of 6-benzylaminopurine. On the basis of growth and production characteristics, subcultivating intervals of 29 to 43 days in callus culture and 16 to 23 days in suspension culture were determined. TLC and HPLC revealed that the explant culture of *Trifolium pratense* L. contains the isoflavonoid formononetin.

K e y w o r d s: *Trifolium pratense* L. – derivation of callus and suspension cultures – growth and production characteristics – flavonoids and isoflavonoids

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 44–47** *Má*

Kultivaci rostlinných tkání a buněk v podmínkách *in vitro* je věnována v posledních letech stále větší pozornost. Využití explantátových kultur jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů nejen pro farmacii, ale i pro potravinářství, kosmetiku a zemědělství se jeví jako velmi perspektivní. Zřejmý je stoupající zájem také o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů [1–6].

Velmi nadějným zdrojem flavonoidů a isoflavonoidů je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*), k jehož dalším obsahovým látkám patří např. třísloviny, kumariny, saponiny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy. Z hlediska potenciálního využití jako léčiv se jeví nejzajímavější skupinou látek isoflavonoidy s fytoestrogenní aktivitou (formononetin, biochanin A, daidzein a genistein) [7].

Cílem práce bylo odvodit kalusovou a suspenzní kulturu z klíční rostliny různých odrůd *Trifolium pratense* L., optimalizovat živné médium a na základě růstové a produkční charakteristiky stanovit vhodný subkultivační interval.

## POKUSNÁ ČÁST

### *Přístroje*

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen; autokláv PS 20A, Chirana, Brno; horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno; box s laminárním prouděním Fatran LF, Žili-

proLékaře.cz | 10.1.2026

na; roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha; třepačka Unimax 2010, Heidolph; UV-lampa CAMAG, Muttenz; spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge; kapalinový chromatograf Unicam Crystal, Cambridge; kolona LiChrosper RP-18 s předkolonkou, Merck, Darmstadt.

***Rostlinný materiál***

K odvození kalusové kultury byla použita semena různých odrůd (DO-8, DO-9, Tempus a Sprint) jetele lučního (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*), získaná ze Šlechtitelské stanice Domoradice.

Semena byla chemicky sterilizována nejprve ponořením na 3 minuty do 70% lihu, dále ponořením na 2 minuty do 10% vodného roztoku chloraminu a nakonec vložením na 10 minut do 2% roztoku chloraminu. Mezi každou lázní byla semena důkladně opláchnuta sterilní vodou. Vysterilizovaná semena byla vysévána na můstky z filtračního papíru do Erlenmeyerových baněk obsahujících 30,0 ml sterilního živného média podle Murashigeho a Skooga (MS) [8] nebo podle Gamborga (B5) [9] (podmínky sterilizace: 15 minut při 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa). Po týdnu kultivace při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma byly získány sterilní klíční rostliny.

***Odvození kalusové kultury***

Kalusová kultura byla odvozena ze sterilní klíční rostliny na MS a B5 médiu při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma (subkultivační interval 21 dní).

K těmto médiím byly přidávány růstové stimulátory kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), kyselina α-naftyloctová (NAA); 6-benzylaminopurin (BA) a kinetin v koncentracích 0,05–10 mg.l$^{-1}$ (stimulátory byly zkoušeny samostatně i vzájemně zkombinované).

***Odvození suspenzní kultury***

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru za stejných podmínek jako kultura kalusová (subkultivační interval 14 dní).

***Stanovení růstové a produkční charakteristiky***

Byla použita kalusová a suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (odrůda DO-8) kultivovaná na B5 médiu s přídavkem 2,4-D (2 mg.l$^{-1}$) a BA (2 mg.l$^{-1}$) při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Dynamika růstu vyjádřená hmotností čerstvých buněk a produkce flavonoidů stanovená metodou dle ČL 2002 [10] byla sledována u kalusové kultury v 20. pasáži (odběry v sedmidenním intervalu po dobu 50 dní) a u suspenzní kultury v 7. pasáži (odběry střídavě ve tří- a čtyřdenním intervalu po dobu 30 dní).

***Tenkovrstvá a kapalinová chromatografie***

Methanolové extrakty explantátových kultur odvozených ze všech sledovaných odrůd *Trifolium pratense* L. byly pomocí TLC a HPLC zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů [11].

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Růst rostlinných kultur *in vitro* a produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami jsou ovlivňovány celou řadou faktorů. Proto je nutné nejprve experimentálně určit u každé konkrétní kultury optimální podmínky kultivace, zejména stanovit růstovou a produkční charakteristiku s ohledem na vhodnou délku kultivace. Nezbytné je také najít vhodné živné médium, které by současně zaručovalo dobrou produkci žádaných sekundárních metabolitů a rychlý kontinuální růst kalusu, který by byl schopný převedení na homogenní suspenzi.

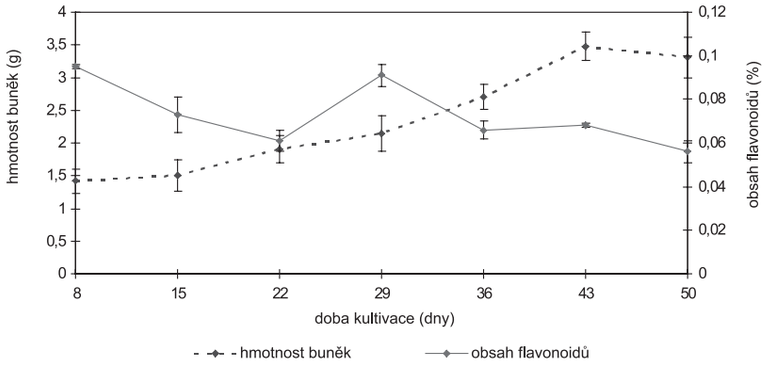
Jednu z významných složek živného média u rostlinných explantátových kultur představují růstové regulátory. Proto byla nejprve vyzkoušena řada stimulátorů v rozmezí koncentrací obvykle používaných při kultivaci explantátových kultur a v koncentracích, které vycházely z publikovaných údajů [12–18], s cílem najít optimální růstový stimulátor. Tvorbu kalusu iniciovaly především následující množství auxinů a cytokininů přidávané na 1 litr základního média: 10 mg NAA; 10 mg NAA+1 mg BA; 2 mg NAA+2 mg 2,4-D+2 mg kinetin; 0,5 mg NAA+1,25 mg 2,4-D+0,5 mg kinetin; 0,05 mg NAA+0,5 mg kinetin; 5 mg 2,4-D+1 mg NAA; 3 mg 2,4 D; 2 mg 2,4-D+2 mg BA; 5 mg 2,4-D+ 2 mg BA.

Na základě všech pozorování je možné uvést, že pro kultivaci explantátové kultury *Trifolium pratense* L. je optimální živné médium podle Gamborga s přídavkem 2 mg.l$^{-1}$ 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l$^{-1}$ 6-benzylaminopurinu. K tvorbě kalusu došlo po pěti až sedmi dnech kultivace klíční rostliny. Kalusy byly většinou světle žluté, křehké, vykazovaly uspokojivý růst bez tendence k morfogenezi. Stabilní a homogenní rostlinný materiál byl získán až po jednom roce pravidelného pasážování při dodržování konstantních podmínek kultivace (teplota, osvětlení, složení živné půdy, frekvence pasážování). Mezi jednotlivými kalusovými kulturami odvozenými od různých odrůd *Trifolium pratense* L. (DO-8, DO-9, Tempus a Sprint) nebyly zjištěny patrné rozdíly v charakteru kalusů.

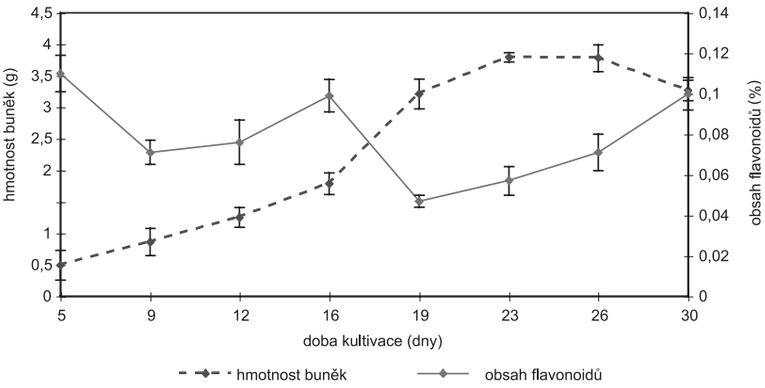
Od jednoleté kalusové kultury *Trifolium pratense* L. odrůdy DO-8 (20. pasáž), která vykazovala nejlepší životaschopnost a tak poskytla dostatek homogenního materiálu, byla odvozena suspenzní kultura. U této kalusové a suspenzní kultury byly stanoveny růstové a produkční charakteristiky.

Z charakteru růstové křivky kalusové kultury (obr. 1) vyplývá, že po lag fázi (tj. asi do 15. dne kultivace) následuje dlouhá exponenciální fáze, přičemž maxima růstu je dosaženo až ve 43. dni kultivace, po kterém dochází pravděpodobně v důsledku postupného vyčerpání živin a hromadění metabolických produktů k poklesu rychlosti růstu. Obsah flavonoidů až do 22. dne kultivace nejprve klesal, což lze vysvětlit tím, že v počáteční růstové fázi kultury se v buňkách neuskutečňuje syntéza nových metabolitů a růstem biomasy kultury dochází v rostoucím kalusu zřejmě k ředění obsahových látek. Maximální obsah flavonoidů byl zjištěn v 29. dni kultivace (0,091 %). V následujících dnech kultivace došlo k poklesu produkce, pravděpodobně v důsledku intenzivnějšího růstu kultury mezi 29. a 43. dnem kultivace. Na základě těchto výsledků je možné doporučit pro kalusovou kulturu *Trifolium pratense* L. subkultivační interval 29 až 43 dní.

proLékaře.cz | 10.1.2026




*Obr. 1. Růstová a produkční křivka kalusové kultury Trifolium pratense L.*




*Obr. 2. Růstová a produkční křivka suspenzní kultury Trifolium pratense L.*

Obsah flavonoidů ve 29. dni kultivace, tedy ve dni, kdy byla zjištěna maximální produkce u kalusové kultury odvozené z odrůdy DO-8, byl sledován také v kalusových kulturách odvozených z dalších odrůd *Trifolium pratense* L. Obsahy v jednotlivých kulturách byly následující: odrůda DO-9 0,075 %, Tempus 0,079 % a odrůda Sprint 0,122 %. Z uvedeného vyplývá, že kalusová kultura odvozená z odrůdy Sprint vykazovala, podobně jako u intaktní rostliny odrůdy Sprint [11], nejvyšší produkci flavonoidů, a proto z ní bude odvozena suspenzní kultura.

Z charakteru růstové a produkční křivky suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (obr. 2.) je zřejmé, že buněčná suspenze roste rychleji než kalusy. Exponenciální fáze probíhá do 23. dne kultivace, kdy bylo dosaženo maximálního růstu kultury, poté následuje krátká fáze stacionární a k poklesu růstu dochází od 26. dne kultivace. Větší rychlost růstu lze vysvětlit přímým kontaktem buněk s živným médiem, což zaručuje snadnější přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Z toho důvodu bývají buněčné suspenzní kultury také fyziologicky jednotnější a jsou nejvíce využívány ke studiu produkce sekundárních metabolitů, indukce enzymů atd. [19]. Pokud jde o produkci flavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L., potvrdilo se, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů. Podobně jako u kalusové kultury obsah flavonoidů v počáteční fázi kultivace nejprve klesl. První maximum produkce bylo zjištěno v 16. dni kultivace (0,099 %), kdy růst suspenzní kultury nebyl ještě intenzivní, v následujících dnech kultivace v důsledku intenzivního růstu kultury došlo k poklesu produkce a druhé maximum bylo zaznamenáno v 30. dni kultivace (0,100 %), kdy kultura již přestala růst, a proto byla suspenze přepasážována do čerstvého média. Na základě zjištěných výsledků je možné doporučit pro suspenzní kulturu *Trifolium pratense* L. subkultivační interval 16 až 23 dní.

Vztah mezi růstem explantátových kultur a sekundárním metabolizmem není přesně vymezen, většinou však existuje nepřímá závislost mezi rychlostí růstu a akumulací sekundárních metabolitů, podobně jako u námi sledované explantátové kultury *Trifolium pratense* L. Tento poznatek naznačuje určitý antagonizmus primárního a sekundárního metabolizmu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů [19].

Vedle sledování růstu a produkce flavonoidů bylo dále zkoušeno, zda a v jakém množství jsou nově odvozené explantátové kultury *Trifolium pratense* L. schopny produkovat isoflavonoidy. Pomocí TLC a HPLC [11] bylo zjištěno, že všechny kultury obsahují 0,01–0,02 % isoflavonoidu formononetinu. Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. je tedy schopna produkovat v malém množství isoflavonoidy a mohla by být proto dobrým experimentálním systémem pro další studie metabolizmu těchto významných přírodních látek.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 0021620822.

## LITERATURA


1. **Luczkiewicz, M., Glód, D.:** Plant Sci., 2003; 165, 1101.
2. **Thiem, B.:** Plant Sci., 2003; 165, 1123.
3. **Lozovaya, V. V. et al.:** Plant Physiol. Biochem., 2004; 42, 671.
4. **Federici, E. et al.:** Phytochemistry, 2003; 64, 717.
5. **Li, W. et al.:** Phytochemistry, 2001; 58, 595.
6. **Fedoreyev, K. et al.:** Fitoterapia, 2000; 71, 365.
7. **Wu, Q. et al.:** J. Chromatogr., 2003; 1016, 195.
8. **Murashige, T., Skoog, F.:** Physiol. Plant., 1962; 15, 475.
9. **Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.:** Exp. Cell Res., 1968; 50, 151.

Farmacie 1-06 18.1.2006 13:47 Str. 47
proLékaře.cz | 10.1.2026

10. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002. Praha, Grada, 2002, s. 2155.
11. **Pízová, R.:** Fytochemický výzkum nadzemní části *Trifolium pratense* L. (diplomová práce), Farmaceutická fakulta UK, 2004.
12. **Poerba, Y. S.:** Plant Physiol., 1997; 57, 5399.
13. **Pederson, G. A.:** Plant Sci., 1986; 45, 101.
14. **Wang, H., Holl, F. B.:** Plant Sci., 1988; 55, 159.
15. **Bond, J. E., Webb, K. J.:** Plant Sci., 1989; 61, 119.
16. **Mizuhiro, M. et al.:** Plant Sci., 2001; 160, 1221.
17. **Beach, K. H., Smith, R. R.:** Plant Sci. Lett., 1979; 16, 231.
18. **Matkowski, A.:** J. Plant Physiol., 2004; 161, 343.
19. **Kováč, J.:** Explantátové kultury rostlin, Olomouc, Univerzita Palackého, 1995, s. 50.

*Došlo 3. 8. 2005.*
*Přijato ke zveřejnění 11. 10. 2005.*

*PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.*
*Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*
*e-mail: kasparo@faf.cuni.cz*

# Z ČINNOSTI FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LV – Číslo 1 – LEDEN 2006

## 37. mezinárodní kongres z dějin farmacie

International Society for the History of Pharmacy (ISHP), jejímiž členy od loňského roku je i Sekce dějin farmacie ČFS, uspořádala 22.–25. června 2005 ve spolupráci s Britskou Společností pro historii farmacie (Britisch Society for the History of Pharmacy – BSHP) 37. mezinárodní kongres z dějin farmacie.

Tématem letošního setkání, které probíhalo na půdě univerzity ve starobylém Edinburgu, byli „Lidé a místa “. Zúčastnilo se ho 268 delegátů z 33 zemí světa (kromě jiných i z Japonska, Nového Zélandu a Austrálie).

Za naši sekci se kongresu aktivně zúčastnili PharmDr. Martina Lisá, Ph.D a Mgr. A. Nedopil velkoplošným barevným posterem o Českém farmaceutickém muzeu v Kuksu ve východních Čechách a PharmDr.Lucie Nedopilová přednáškou na téma II. mezinárodní farmaceutická výstava v Praze v roce 1896.

Celkem na kongresu zaznělo 137 přednášek a bylo představeno 13 posterů.

Díky osobním kontaktům s účastníky kongresu bude možné dále prohlubovat vzájemnou výměnu informací s dalšími historiky farmacie, lékárníky a příznivci dějin farmacie.

Další kongres je plánován na rok 2007 do Barcelony a jeho téma by mělo být „Lidé a moře“.

*M. Lisá*