



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Abiotische Elizitierung einer transgenen
„hairy roots“- Kultur des Edelweiß- *Leontopodium*
nivale ssp. alpinum (Cass.) Greuter

verfasst von

Stefan Krumhuber

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp für die kompetente Betreuung, die Auswahl des interessanten Diplomarbeitsthemas und die Begutachtung der Arbeit danken.

Besonders danke ich Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die kompetente Unterstützung bei kleinen und großen Problemen während meiner Diplomarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren danke ich Mag. Florian Gössnitzer für die praktischen Tipps und die nette Betreuung während meiner Arbeit.

Ein spezieller Dank geht an Mag. pharm. Dr. Stefan Schwaiger an der Universität Innsbruck für die Analyse der vielen Proben, die während dieser Arbeit anfielen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden für die ununterbrochene Unterstützung während meines Studiums.

Abkürzungen

MS Standardnährmedium nach Murashige und Skoog

½ MS Standardnährmedium nach Murashige und Skoog mit halber Konzentration an Makroelementen

MEW modifiziertes MS Medium

FG Frischgewicht

TG Trockengewicht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. „Hairy roots“	3
1.2. Elizitierung	3
1.3. Problemstellung	4
2. Material und Methoden	6
2.1. Pflanzenmaterial	6
2.2. Nährmedien	6
2.3. Keimversuche	7
2.4. Infektion mit drei <i>Agrobacterium</i> - Stämmen	8
2.5. Vermehrung von „hairy roots“	9
2.6. Elizitierung mit abiotischen Elizitoren	10
3. Ergebnisse	14
3.1. Keimversuche mit Edelweißsamen der Sorte „Helvetia“	14
3.2. Etablierung von in vitro Kulturen des Edelweiß der Sorte „Helvetia“	16
3.3. Infektionen mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	17
3.4. Biomassezuwachs der „hairy roots“-Kulturen des Edelweißklon K8A	18
3.5. Elizitierung der „hairy roots“ mit AgNO ₃	19
3.6. Elizitierung von „hairy roots“ mit erhöhtem Saccharosegehalt im Nährmedium	26
4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	45
6. Summary	47
Lebenslauf	53

1. Einleitung und Problemstellung

Das Edelweiß (*Leontopodium* sp.) ist eine mehrjährige Pflanze aus der Familie der Asteraceae (Meusel & Jäger 1992). Die Gattung umfasst 41 Arten, wobei nur zwei Arten (*L. alpinum* und *L. nivale*) in Europa heimisch sind. Den Ursprung hat das Edelweiß in den Steppen und gebirgigen Regionen Asiens, wo sich auch die überwiegende Anzahl der bekannten Arten findet (Safer et al. 2011). Das Edelweiß bevorzugt kalkhaltige, nährstoffarme Böden und findet sich vor allem in Höhen zwischen 1800-3000m (Grabley et al. 1999). Die Pflanze steht in Österreich, Deutschland und der Schweiz unter strengem Naturschutz und darf deshalb nicht wild gesammelt werden. Schon in der Volksmedizin nimmt das Edelweiß einen wichtigen Platz ein. Es findet hier seine Anwendung als Tee bei Durchfällen oder als Salbe bei rheumatischen Erkrankungen (Dobner et al. 2003). Neuen Studien zu Folge könnte das Edelweiß auch in der Behandlung von Alzheimer zur Anwendung kommen. So soll es die extrazelluläre AcetylcholinKonzentration steigern und gleichzeitig die Acetylcholinesterase hemmen (Hornick et al. 2008). Mehrere Studien thematisieren auch die entzündungshemmende bzw. leukotriensenkende Wirkung von alkoholischen/wässrigen Auszügen von *L. alpinum* (Dobner et al. 2004, Lulli et al. 2012). In *L. alpinum* bzw. *L. nivale* sind neben Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden auch Lignane enthalten (Ganzera et al. 2005). Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit dem Leoligin (siehe Abb. 1, S. 2), einem Wirkstoff aus der Gruppe der Lignane. Dieser pharmazeutisch relevante Inhaltsstoff wurde erstmals 2003 aus den Wurzeln des Edelweiß isoliert (Dobner et al. 2003). Forschungen zeigen, dass Leoligin das Arterioskleroserisiko durch Stimulation des Cholesterylester-Transfer-Proteins senken kann, und somit in Zukunft zu einer Risikominderung von koronaren Herzkrankheiten beitragen könnte (Duwensee et al. 2011). In einer Studie wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, Venenbypässe oder Stents mit Leoligin zu beschichten, um eine unkontrollierte Hyperplasie der Koronargefäße zu verhindern (Reisinger et al. 2009). Zusätzlich wurde aus dem Edelweiß auch 5-Methoxyleoligin, ein Derivat des Leoligin, isoliert.

Neueste Forschungen weisen darauf hin, dass 5-Methoxyleoligin ein hohes Potential in der Therapie von Patienten haben könnte, die bereits einen Herzinfarkt erlitten haben. So konnte eine Neubildung von Gefäßen bei Ratten beobachtet werden, die zuvor einen Infarkt erlitten (Messner et al. 2013).

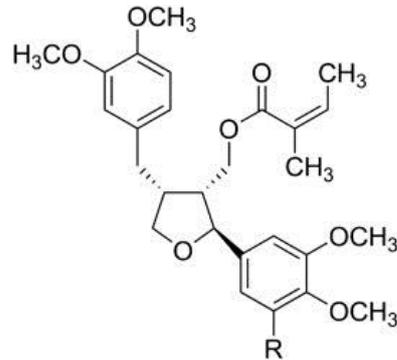


Abb. 1: Chemische Grundstruktur von Leoligin (R=H) bzw. 5-Methoxyleoligin (R=OCH₃)

Betrachtet man die Statistik der häufigsten Todesursachen in Österreich (siehe Abb. 2), wird das mögliche Potential von Leoligin und 5-Methoxyleoligin für die Therapie von koronaren Herz Kreislauf Erkrankungen ersichtlich.

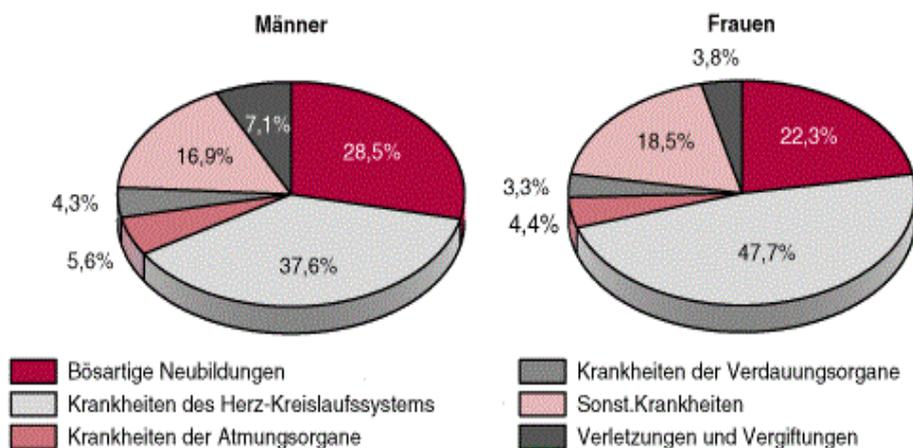


Abb. 2: Todesfälle 2013 nach Hauptgruppen der Todesursachen und Geschlecht (Quelle Statistik Austria; erstellt 03.06.2014)

1.1. „Hairy roots“

Unter „hairy roots“ versteht man eine Pflanzenkrankheit, die durch das gram negative Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* ausgelöst wird. Es kommt zu einer vermehrten Wurzelbildung an der Infektionsstelle der Pflanze. „Hairy roots“ zeichnen sich durch schnelles Wachstum aus, sind genetisch und biochemisch stabil und weisen ein ähnliches Sekundärstoffprofil zu den Wurzeln nicht transformierter Pflanzen auf (Khatodia et al. 2014). In „hairy roots“ findet man häufig höhere Konzentrationen an Sekundärmetaboliten als in den entsprechenden natürlichen Wurzeln (Zhang et al. 2011). Des Weiteren ist in „hairy roots“-Kulturen auch die Bildung von Verbindungen möglich, die in normalen Wurzeln nicht vorkommen (Kim et al. 2002).

1.2. Elizitierung

Viele Inhaltsstoffe (Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel) werden von der Pflanze zur Verteidigung bzw. als Reaktion auf Stress produziert. Eine Möglichkeit, die Konzentration an Inhaltsstoffen in pflanzlichen in vitro-Kulturen zu steigern, ist die Elizitierung: Man setzt den Kulturen Stressfaktoren zu, die Abwehrmechanismen hervorrufen können, wodurch die Kultur zu einer verstärkten Bildung von Inhaltsstoffen angeregt wird, welche in der Natur zum Beispiel der Abwehr von Fressfeinden oder Mikroorganismen dienen (Gorelick et al. 2014). Unterschieden werden hier biotische und abiotische Elizitoren. Unter biotischen Elizitoren versteht man Stoffe bzw. Stoffgemische biogenen Ursprungs. Diese Elizitoren können von Bakterien und Pilzen oder der Pflanze selbst stammen. Abiotische Elizitoren werden in physikalische sowie chemische Elizitoren klassifiziert.

Unter physikalischer Elizitierung versteht man, dass die Pflanze zum Beispiel einem erhöhten osmotischen Stress ausgesetzt wird (Yamaner et al 2013). In vielen wissenschaftlichen Studien wurde schon der positive Effekt von osmotischem Stress auf die Wirkstoffproduktion erwiesen. So wurden zum

Beispiel „hairy roots“- Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* Bunge einem steigenden osmotischen Stress mit Hilfe von Sorbit (30-100 g/l) ausgesetzt. Des Weiteren fügte man auch Hefeextrakt (ein biotischer Elizitor) in steigenden Konzentrationen hinzu. Das Ziel war es, einen möglichst hohen Gehalt des Diterpens Tanshinon zu realisieren. Die beiden Elizitoren erzielten einen synergistischen Effekt, wobei die Kombination von 50 g/l Sorbitol und 100 mg/l Hefeextrakt den größten Nutzen brachte. Damit konnte eine Produktionssteigerung des Tanshinon um das 4,5 fache gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden (Shi et al. 2007).

Ein Beispiel für einen chemischen Elizitor ist Silbernitrat, eine Schwermetallverbindung, die bereits in einigen Studien sein Potential als Elizitor zeigte (Kubes et al. 2014, Tumova et al. 2006). So wurde nach einer Elizitierung mit 60 μM AgNO_3 eine doppelt so hohe Salidroside-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe in *Rhodiola sachalinensis* A. Bor gemessen (Ai et al. 2009). In einer weiteren Arbeit konnte mit Hilfe von AgNO_3 die Flavonoidproduktion in *Ononis arvensis* um bis zu 934 % gesteigert werden (Tumova et al. 2006). In der Studie von Khalili et al. (2010) wurde beschrieben, dass durch eine Elizitierung mit 2 mM AgNO_3 der Gehalt an Silymarin in „hairy roots“- Kulturen von *Silybum marianum* gegenüber einer unelizitierten Kontrollkultur verdoppelt werden konnte.

Nicht nur die Auswahl des Elizitors ist für eine Pflanze essentiell, auch der Zeitpunkt des Elizitorzusatzes scheint von großer Wichtigkeit zu sein: So wurde in der bereits zuvor erwähnten Salidroside-Studie der Kultur Silbernitrat (50mg/l) zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugefügt. Es zeigte sich, dass der optimale Zeitpunkt in der log-Phase des Kulturwachstums lag (Ai et al. 2009).

1.3. Problemstellung

Neben den vielen Anwendungen des Edelweiß in der Volksmedizin konnte 2003 an der Universität Innsbruck ein neues Anwendungsgebiet für das Edelweiß erschlossen werden. Erstmals wurde die Bedeutung der Naturstoffe Leoligin und später des 5-Methoxyleoligin für die mögliche

Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen erkannt (Reisinger et al. 2009, Messner et al. 2013).

Das Edelweiß darf jedoch nicht wild gesammelt werden, da es in Österreich und anderen europäischen Ländern unter strengem Naturschutz steht. In der Schweiz gibt es bereits Feldkulturen des Edelweiß, doch ist dies keine finale Lösung, um an die benötigten Mengen an Edelweißwurzeln zu gelangen: Die Lignane sind nur in sehr geringen Mengen enthalten. Die Grundstruktur des Leoligins (siehe Abb. 1, S. 2) weist drei Chiralitätszentren auf. Deshalb ist eine chemische Synthese sehr zeit- und kostenaufwendig. Die Isolierung von Leoligin aus den „hairy roots“ des Edelweiß stellt eine gute Möglichkeit dar, an den Naturstoff zu gelangen, da „hairy roots“ viele Vorteile gegenüber einer Feldkultur bieten. Erstens würde man vom schnelleren Wachstum der „hairy roots“ Kulturen gegenüber einer Feldkultur profitieren und zweitens ist man nicht von klimatischen und geographischen Faktoren, Jahreszeiten und einem variablen Nährstoffangebot auf einem Feld abhängig. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, den Wirkstoffgehalt in „hairy roots“-Klon K8A des Edelweiß mit Hilfe der Elizitierung zu steigern.

Im Zuge dieser Arbeit sollten ausschließlich abiotische Elizitoren verwendet werden, und zwar Silbernitrat in drei verschiedenen Konzentrationen (15 μM , 30 μM und 60 μM AgNO_3). Des Weiteren wollten wir in dieser Arbeit durch Anhebung der Saccharosekonzentration im Nährmedium (5 %, 6 % und 7 %) auch den Einfluss von osmotischem Stress untersuchen. Die gewählten Konzentrationen der Elizitoren sowie die Probenaufarbeitung beruhen auf Erkenntnissen aus vorangegangenen Arbeiten. So arbeiteten Prisching (2012) und Schmidbauer (2013) mit dem „hairy roots“-Klon K30, dessen Leoliginegehalt durch Elizitierung gesteigert werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Die „hairy roots“-Kulturen des Edelweißklons K8A wurden von Ondratschek übernommen, die diese im Rahmen ihrer Diplomarbeit etabliert hatte (Ondratschek 2012). Die dazu verwendeten Samen stammten von der Firma Austrosaat AG, Österreich.

Die Samen der Sorte „Helvetia“ sowie die Topfpflanzen des Edelweißklon C9 wurden von dem Schweizer Forschungsinstitut Mediplant Swiss Research Centre for Medicinal and Aromatic Plants in Conthey bereitgestellt.

2.2. Nährmedien

In der Arbeit von Ondratschek (2012) wurde gezeigt, dass „hairy roots“ auf einem $\frac{1}{2}$ MS-Medium besonders gut wachsen. Das $\frac{1}{2}$ MS-Medium nach Murashige und Skoog (Murashige und Skoog 1962) ist ein konventionelles MS-Medium, dem aber nur die halbe Konzentration an Makroelementen zugesetzt wurde.

Für das MEW Medium wurde ein MS-Medium hergestellt und mit folgenden Wuchsstoffen versehen:

- 0,55 μ M NAA (alpha-Naphtylelessigsäure)
- 0,25 μ M KIN (6-Furfurylaminopurin)

Herstellung der Nährmedien

Zuerst wurde ein Drittel des Endvolumens an destilliertem Wasser im Erlenmeyerkolben vorgelegt und die Makroelemente, Vitamine und Spurenelemente als Stammlösungen zugefügt. Feststoffe wogen wir ein und setzten sie der Lösung zu. Der Kolben wurde mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und zuletzt der pH-Wert mit KOH bzw. HCl auf $5,7 \pm 0,1$ eingestellt. Nach Abfüllen des Nährmediums in Erlenmeyerkolben

(Verschluss: Zellstoff-Stopfen) erfolgte die Sterilisation im Autoklav bei 121C° für 20 min.

Für die Kultivierung der *Agrobacterium*-Stämme kam das YMB Medium (Wright et al., 1930) zum Einsatz. Es bestand aus:

- 0,5 g K₂HPO₄
- 0,2 g MgSO₄
- 0,1 g NaCl
- 0,4 g Hefeextrakt
- 10 g Mannitol
- 800 ml H₂O

2.3. Keimversuche

Keimung auf Filterpapier

Für die Keimversuche auf Filterpapier wurden Edelweißsamen des Kultivars „Helvetia“ eingesetzt, die vom Mediplant Research Center for Medicinal and Aromatic Plants, Conthey, Schweiz zur Verfügung gestellt wurden. Die Samen waren in zwei Petrischalen jeweils in einem 5x5 Raster angeordnet, und wurden mit einer 0,1proz. Chinosollösung befeuchtet. Die Verwendung einer Chinosollösung entstand aus der Überlegung, dass damit die Keimbelastung der Samen im Vorhinein gesenkt werden könnte. Somit würde man später bei einer Überführung in vitro von einer möglicherweise geringeren mikrobiellen Belastung profitieren. Die Samen verblieben 2 Wochen lang in einem Klimaschrank bei 15 C°, einer Luftfeuchtigkeit von 80 % und einer 12 h Lichtperiode.

Alle 2 Tage wurden die Petrischalen aus dem Heraeus® Schrank genommen, eine mögliche Keimung dokumentiert, auf ein mögliches Auftreten von Schimmel untersucht, und gegebenenfalls mit 0,1proz. Chinosollösung nachbefeuchtet.

Keimung in Erde und anschließende in vitro-Etablierung

Zusätzlich zu dem Keimversuch auf Filterpapier wurden die Edelweißsamen der Sorte „Helvetia“ auch in Erde angebaut. Dazu brachten wir ca. 100 Edelweißsamen auf Aufzuchterde auf, die Bewässerung erfolgte wie oben beschrieben mit 0,1proz. Chinosollösung. Nach genau vier Wochen wurde die Anzahl der Keimlinge bestimmt. Um die Keimlinge in vitro zu überführen, musste eine geeignete Sterilisationsmethode gefunden werden. Der Sterilisationsvorgang erfolgte nach der Methode, die Gössnitzer in seiner Arbeit beschrieben hatte (Gössnitzer 2012): Die Pflänzchen wurden mit Leitungswasser von der grob anhaftenden Erde befreit, mit einer 10proz. Ethanollösung gespült, 12 min lange in einer 10proz. NaOCl-Lösung belassen und zuletzt 3 mal mit zuvor autoklaviertem Wasser nachgespült.

Im Laminar Airflow überimpften wir die Hälfte der Pflänzchen mit Wurzeln und die zweite Hälfte ohne Wurzeln, wobei wiederum jeweils die Hälfte auf wuchsstofffreies Medium und die andere Hälfte auf wuchsstoffhaltiges Medium transferiert wurde. Als Wuchsstoffe verwendeten wir 0,55 μM NAA und 0,25 μM Kinetin, wobei als Basis ein MEW-Medium (Hook 1993) diente. Die überimpften Pflänzchen wurden unter kontrollierten Kulturbedingungen in einem Klimaschrank bei 15 C°, 80 % Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 12 h gehalten.

2.4. Infektion mit drei *Agrobacterium*- Stämmen

Für die spätere „hairy roots“-Induktion mussten Bakteriensuspensionen der Agrobakterienstämme TR 105, ATCC 15831 und LBA 9402 hergestellt werden. Aus den jeweiligen Dauerkulturen wurde mittels einer Impföse Bakterienmaterial in ein YMB-Medium passagiert. Alle drei Tage wurde ein neues YMB-Medium mit jeweils einem der Bakterienstämme beimpft.

Nach vier Vermehrungszyklen konnte mit der Infektion des Blattmaterials und der Keimlinge begonnen werden. Für die Etablierung von „hairy roots“-Kulturen des Klons C9 (Mediplant, Conthey, Schweiz) schnitten wir mit einem Skalpell Blätter von der Topfpflanze ab. Am Anfang des Sterilisationsvorgangs wurde das Pflanzenmaterial mit einer 10proz.

Ethanollösung gespült und daraufhin 15 min in einer 12proz. NaOCl-Lösung belassen. Nach Abgießen der NaOCl-Lösung und dreimaligem Waschen mit autoklaviertem Wasser wurden im Laminar Airflow 3 mal 10 Blattstücke mit jeweils einem der drei Bakterienstämme infiziert und auf ein festes $\frac{1}{2}$ MS-Nährmedium transferiert. Die Infektionen erfolgten durch Anritzen des Blattnerfs der in drei etwa gleich große Stücke geschnitten sterilen Blätter mit einem zuvor in eine der Bakterienlösungen getauchten Skalpell. Danach wurde das infizierte Blattstück auf das Nährmedium aufgebracht und bei 15 C°, 80 % Luftfeuchtigkeit und einer 12 h Lichtperiode kultiviert.

Die zuvor in vitro genommenen Keimlinge wurden durch Anritzen der Blattnerfen mit einem der Bakterienstämme infiziert und unter den oben erwähnten Kulturbedingungen inkubiert.

2.5. Vermehrung von „hairy roots“

In dieser Diplomarbeit wurden jene „hairy roots“ des Edelweißklons K8A, der von Ondratschek (2012) etabliert worden war, weitervermehrt. Hierzu wurden die „hairy roots“- Kulturen unter dem Laminar Airflow auf 0,5 g große Portionen aufgeteilt (siehe Abb. 3 links, S.10) und in 50 ml $\frac{1}{2}$ MS-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Nach genau drei Wochen in Kultur wurden die „hairy roots“ (siehe Abb. 3 rechts, S.10) wie oben erwähnt wieder aufgeteilt. Kleinere Kallusaggregate wurden abgetrennt und verworfen, Kulturen, die zum überwiegenden Teil aus Kallusgewebe bestanden, wurden nicht für eine Weitervermehrung berücksichtigt. Die Kultivierung erfolgte auf einem Rundschüttler bei 85 Umdrehungen/ min und 25 C° im Dunklen. Insgesamt konnten im Zuge dieser Diplomarbeit die „hairy roots“-Kulturen dreimal überimpft werden, wodurch genügend Probenmaterial für die Elizitierung zur Verfügung stand.

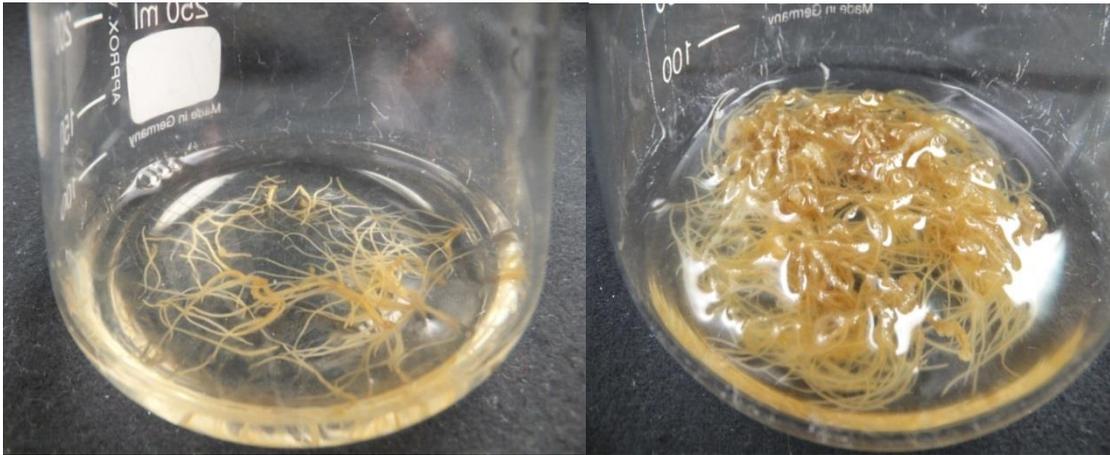


Abb. 3: „Hairy roots“ zu verschiedenen Zeiten in einem $\frac{1}{2}$ MS Medium; links: „hairy roots“ nach dem Überimpfen; rechts: „hairy roots“ nach 3 Wochen in Kultur

2.6. Elizitierung mit abiotischen Elizitoren

In dieser Diplomarbeit fanden ausschließlich abiotische Elizitoren ihre Anwendung, wobei AgNO_3 und eine erhöhte Saccharosekonzentration im Nährmedium als Elizitor ausgewählt wurden. .

Elizitierung mit AgNO_3

Es wurden jeweils fünf 3 Wochen alte „hairy roots“-Kulturen mit 200 μl von drei verschiedenen AgNO_3 -Lösungen versetzt, sodass sich im Erlenmeyerkolben schlussendlich eine Endkonzentration von 15 μM , 30 μM bzw. 60 μM an AgNO_3 ergab. Zugesezte Lösungen wurden durch einen Sterilfilter (Porenweite 0,22 μm) filtriert.

Elizitierung mit erhöhter Saccharosekonzentration

Es wurde frisches $\frac{1}{2}$ MS-Medium verwendet, wobei die Saccharosekonzentration auf 5 %, 6 % bzw. 7 % eingestellt wurde. In diese modifizierten Medien überführten wir jeweils fünf 3 Wochen alte „hairy roots“-Kulturen.

Ernte der elizitierten „hairy roots“

Eine Woche nach Elizitierung wurden die „hairy roots“-Kulturen aus dem Medium entnommen, mit Papier abgetupft, das Frischgewicht bestimmt und an der Luft getrocknet. Nach einer Trocknungszeit von zwei Tagen konnte das Trockengewicht bestimmt werden. Als Referenzmaterial wurden 5 Kulturen von unelizitierten „hairy roots“ verwendet, die zuvor 4 Wochen in einem $\frac{1}{2}$ MS-Medium kultiviert worden waren. Auch von diesen „hairy roots“ wurde wie zuvor beschrieben das Trockengewicht bestimmt. Die getrockneten Kulturen wurden an das Institut für Pharmazie/Pharmakognosie der Universität Innsbruck (Vorstand: Univ.- Prof. Hermann Stuppner) geschickt und dort dankenswerterweise von Mag. pharm. Dr. Stefan Schwaiger analysiert.

Analyse

Die Aufarbeitung und Quantifizierung mittels HPLC wurde wie folgt durchgeführt: Es wurde ein HP 1050 HPLC System (Agilent Waldbronn, Deutschland) mit Autosampler, DAD und Säulenthmostat verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer Phenomenex Kinetex 2.6 μ C18 100 A (100 mm x 2,1 mm) Säule (Partikelgröße 2,6 μ m). Die mobile Phase bestand aus einem Wasser/ Acetonitril Gemisch, das zeitabhängig variiert wurde (Minute 0: 65 % Wasser/35 % Acetonitril; Minute 20: 50 % Wasser/50 % Acetonitril; Minute 25: 1 % Wasser/99 % Acetonitril); Stopp bei Minute 35; Posttime 15 Minuten).

Die weiteren Parameter wurden wie folgt gewählt:

Temperatur: 40 C°

Durchflussrate: 0,25 ml/min

Detektion: 205 nm

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurden Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin (siehe Abb. 4 bzw. Abb. 5, S. 12) als Standard in jeweils 1ml Ethanol gelöst, daraus fünf verschiedene Konzentrationen hergestellt (73,1 μ g/ml bis

4,6 µg/ml bzw. 54,4 bis 3,4 µg/ml) und diese Referenzlösungen anschließend vermessen.

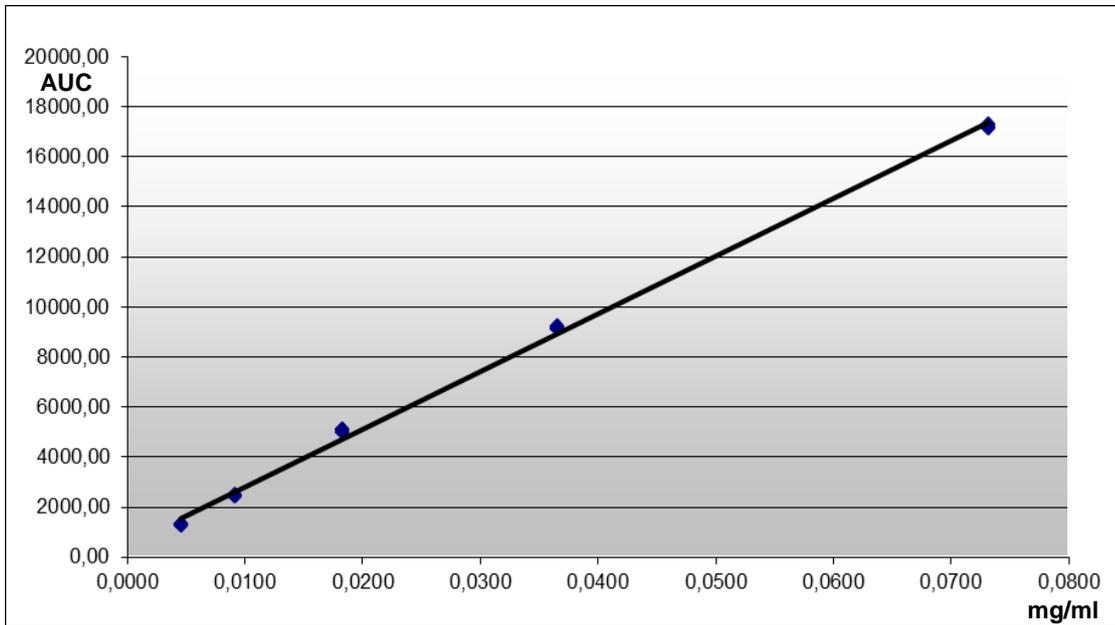


Abb. 4: Kalibriergerade zur HPLC Bestimmung von Leoligin (AUC: Area Under the Curves; Quelle: Dr. Stefan Schwaiger, Univ. Innsbruck)

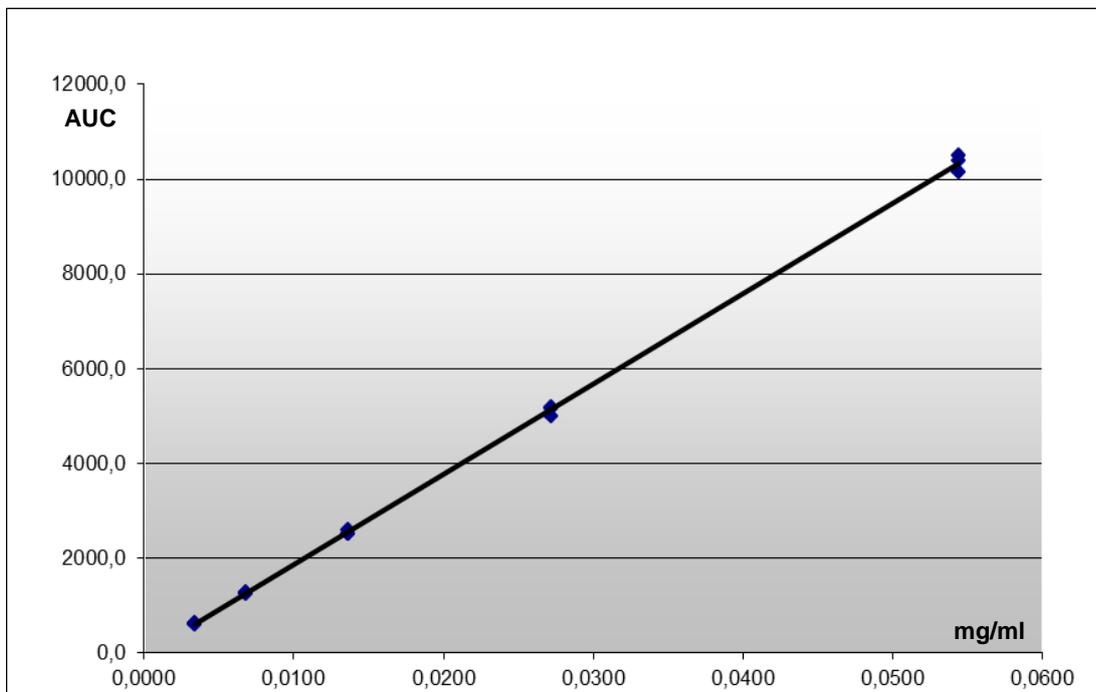


Abb. 5: Kalibriergerade zur HPLC Bestimmung von Methoxyleoligin (AUC: Area Under the Curves; Quelle: Dr. Stefan Schwaiger, Univ. Innsbruck)

Zur Herstellung der Analysenlösung für die HPLC wurden 100,0 mg im Mörser fein zerriebenes „hairy roots“- Material 10 min lang mit 20 ml Dichlormethan im Ultraschall extrahiert. Der Rückstand wurde noch zwei Mal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert und nach Vereinen der Filtrate das Lösungsmittel am Rotavapor abgedampft. Der Rückstand wurde in 1,00 ml Methanol aufgenommen und der Analyse zugeführt.

Für jede Elizitorbehandlung wurde Wurzelmaterial aus zwei Kolben aufgearbeitet und jeder Extrakt dreimal mittels HPLC analysiert. Mittelwert, Standardfehler und Varianzanalyse für Leoligin und 5-Methoxyleoligin wurden aus den 6 erhaltenen Messwerten mit der Software Statistica v6.1 (StatSoft Inc.) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Keimversuche mit Edelweißsamen der Sorte „Helvetia“

Keimung auf Filterpapier

Die von der schweizer Firma Mediplant erhaltenen Samen der Sorte „Helvetia“ wurden in einem 5x5 Raster auf Filterpapier in einer Petrischale angeordnet (siehe Abb. 6). Ziel war es, nach 2 Wochen möglichst viele Keimlinge zu erhalten, um diese in einem späteren Prozess in vitro zu überführen. Zur Befeuchtung der Samen wurde in dieser Diplomarbeit ausschließlich mit einer 0,1proz. Chinosollösung gearbeitet, um zu versuchen, die Keimbelastung der Edelweißsamen im Vorhinein zu senken. Über den Zeitraum von 2 Wochen wurde keine einzige erfolgreiche Keimung beobachtet (siehe Abb. 7). Der zuvor veranschlagte Zeitraum von 2 Wochen wurde um eine weitere Woche verlängert, jedoch konnte auch in dieser Woche keine Keimung beobachtet werden.

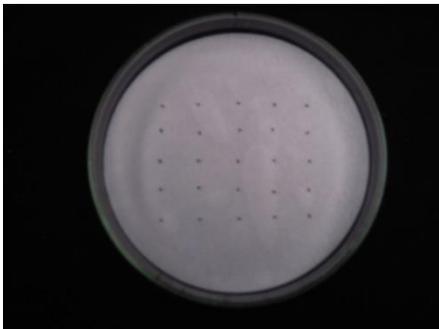


Abb. 6: Edelweißsamen am Beginn des Keimungsversuchs (Durchführung bei 15 C°, 80 % Luftfeuchtigkeit und einer 12 h Lichtperiode)

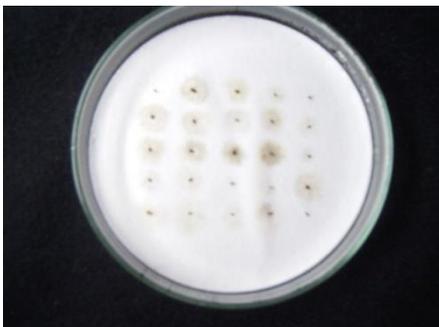


Abb. 7: Edelweißsamen nach drei Wochen in Kultur (Durchführung bei 15 C°, 80 % Luftfeuchtigkeit und einer 12 h Lichtperiode)

Keimversuch in Erde

Da die Keimversuche mit Edelweißsamen der Sorte „Helvetia“ auf Filterpapier keine positiven Ergebnisse lieferten, musste eine alternative Methode für die Keimung der Samen gefunden werden. Es wurden ca. 100 Edelweißsamen auf handelsübliche Aufzuchterde aufgebracht, und ausschließlich mit einer 0,1proz. Chinosollösung gegossen. Die Befeuchtung erfolgte die erste Woche alle 2 Tage und später alle 3 Tage. Wie Abb. 8 veranschaulicht, konnte von ca. 100 ausgesäten Edelweißsamen innerhalb von 2 Wochen bei 41 Samen eine Keimung beobachtet werden. Die Edelweißpflänzchen waren zu dieser Zeit durchschnittlich 2-3 cm groß und hatten ein bleiches und wachsartiges Aussehen (siehe Abb. 9).



Abb. 8: Keimversuch mit Edelweißsamen der Sorte „Helvetia“ in Erde: die Befeuchtung erfolgte mit einer 0,1proz. Chinosollösung



Abb. 9: Edelweißkeimlinge der Sorte „Helvetia“ nach 2 wöchiger Kultivierung in Erde

Durch den Keimversuch der Edelweißsamen in Erde konnte ausreichend Pflanzenmaterial für die spätere Überführung *in vitro* gewonnen werden. Auffällig war, dass die Chinosollösung die Keimrate und die Entwicklung der

Keimlinge, verglichen mit dem Keimversuch von Schleritzko (2015), negativ beeinflusste.

3.2. Etablierung von in vitro Kulturen des Edelweiß der Sorte „Helvetia“

Die nach Keimung in Erde (siehe Kap. 3.1., S. 15) erhaltenen 41 Pflänzchen wurden mit 10proz. Ethanol gespült und mit einer 10proz. NaOCl-Lösung sterilisiert, zur Hälfte auf wirkstofffreies bzw. zur Hälfte auf wirkstoffhaltiges MEW- Medium überimpft und im Klimaschrank gelagert (siehe Kapitel 2.3., S. 8). Das Überimpfen gestaltete sich schwierig, da die Keimlinge nach der Oberflächensterilisation an Festigkeit verloren hatten. Deshalb wurden davon betroffene Keimlinge bei der in vitro Überführung nur auf das Nährmedium gelegt und nicht gesteckt. In der ersten Woche mussten 18 Kulturen wegen einer Kontamination mit Schimmelpilzen aussortiert werden. In der zweiten Woche schieden weitere 15 Kulturen wegen Kontamination aus. Fünf der verbliebenen acht Kulturen wurden für das weitere Arbeiten nicht mehr berücksichtigt, da sie entweder keine Wurzeln im Nährmedium ausbildeten oder eingetrocknet waren. Die 3 verbliebenen Kulturen (siehe Abb. 10) konnten für eine Infektion mit drei verschiedenen *Agrobacterium rhizogenes*-Stämmen verwendet werden. Zusammenfassend sind 3 der 41 Edelweißkeimlinge in vitro überführt worden.

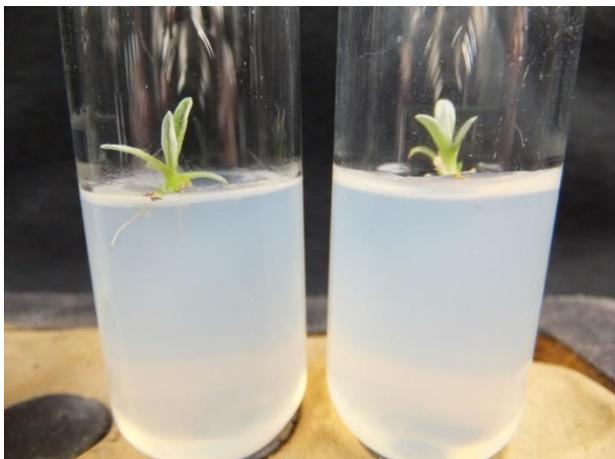


Abb. 10: In vitro Kulturen von *Leontopodium alpinum* „Helvetia“

3.3. Infektionen mit *Agrobacterium rhizogenes*

Infektion von in vitro-Kulturen des Edelweiß der Sorte „Helvetia“ mit *Agrobacterium rhizogenes*

Jene Edelweißpflanzen, die in vitro etabliert werden konnten und ein sichtbares Wachstum aufwiesen, wurden für die Infektion mit einem der drei Stämme von *Agrobacterium rhizogenes* verwendet. Die Infektion wurde wie in Kapitel 2.4. (siehe S. 8) beschrieben durchgeführt. Es konnte innerhalb von 6 Wochen keine „hairy roots“- Bildung an den Pflanzen beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit standen nur 3 Edelweißkeimlinge für die „hairy roots“- Induktion zur Verfügung. In der vorangegangenen Arbeit von Ondratschek (2012) wird je nach Bakterienstamm eine maximal 40proz. Erfolgsrate bei der „hairy roots“ Induktion beschrieben. Grundsätzlich hängt die Infektionsrate unter anderem auch von der Pflanze ab, bei einer gegebenen Pflanzenspezies daher auch von der Varietät oder Sorte. Möglicherweise lässt sich die Edelweiß-Sorte „Helvetia“ mit den drei von uns eingesetzten *Agrobacterium*-Stämmen nur schwer oder gar nicht infizieren. Zur Klärung dieser Sachlage wären weitere Versuche mit einer größeren Anzahl an Pflanzen bzw. in vitro-Kulturen nötig.

Infektion von Blattstücken des Edelweißklons C9

Neben dem „hairy roots“- Induktionsversuch an Edelweißkeimlingen der Sorte „Helvetia“ wurden auch Infektionsversuche an Blattstücken des Edelweißklons C9 mit jeweils einem der drei *Agrobacterium*-Stämme durchgeführt. Der Edelweißklon C9 wurde für den „hairy roots“- Induktionsversuch herangezogen, weil er bezüglich seines Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoligingehaltes sehr vielversprechend ist. Jeweils 10 Petrischalen (3 Blattstücke pro Petrischale) wurden für die „hairy roots“-Infektion mit einem der Bakterienstämme verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.4. (siehe S. 8) beschrieben. Es konnte keine „hairy roots“-Bildung an den Blattstücken beobachtet werden. In der Arbeit von Ondratschek (2012), die sich unter anderem mit der „hairy roots“- Induktion an

Edelweißkulturen beschäftigte, wird beschrieben, dass sich isolierte Blätter nicht optimal für eine „hairy roots“-Induktion eignen: So konnte in erwähnter Arbeit eine maximale Infektionsrate von 5 % erreicht werden. In unserer Arbeit standen ausschließlich Topfpflanzen und keine Samen des Edelweißklon C9 zur Verfügung, weshalb keine zusätzliche „hairy roots“-Induktion an Keimlingen, die sich nach Ondratschek (2012) besser für eine „hairy roots“-Induktion eignen, durchgeführt werden konnte.

3.4. Biomassezuwachs der „hairy roots“-Kulturen des Edelweißklon K8A

Für die in dieser Arbeit geplanten Elizitierungen musste zunächst genügend Biomaterial gewonnen werden. Die bestehende „hairy roots“-Linie des Edelweißklons K8A sollte daher aufvermehrt werden. Wie bereits in Kapitel 2.5. (siehe S.9) erwähnt, wurde jeweils ca. 0,5 g „hairy-roots“-Material des Edelweißklon K8A in frisches $\frac{1}{2}$ MS-Medium überimpft und vier Wochen später analysiert. Um den Biomassezuwachs zu ermitteln, wurden die „hairy-roots“ aus dem Erlenmeyerkolben entnommen, abgetrocknet und das Frischgewicht bestimmt. Im Zuge dieser Diplomarbeit sind insgesamt drei Vermehrungszyklen realisiert worden. In den ersten vier Wochen konnte ein Biomassezuwachs von 1350% beobachtet werden. Das Wachstum steigerte sich im zweiten Vermehrungszyklus auf 1680 % und im dritten Zyklus auf 1825 %. Wie aus Abb. 11 (siehe S. 19) ersichtlich, kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Biomasse von Vermehrungszyklus zu Vermehrungszyklus.

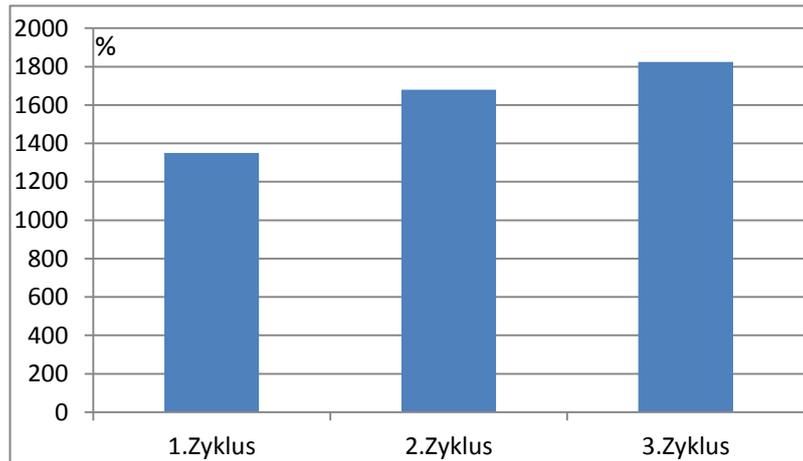


Abb. 11: Biomassezuwachs (%) der „hairy roots“ nach jeweils 4 wöchiger Kultivierung in $\frac{1}{2}$ MS-Medium, bezogen auf das Frischgewicht

3.5. Elizitierung der „hairy roots“ mit AgNO_3

Nach einer dreiwöchigen Kultivierung der „hairy roots“-Kulturen des Edelweißklon K8A (Kulturbedingungen siehe Kapitel 2.5., S. 9) konnte mit der Elizitierung begonnen werden. Für die Elizitierung wurde den „hairy roots“-Kulturen AgNO_3 -Lösungen zugesetzt und im Nährmedium der „hairy roots“ eine AgNO_3 Konzentration von entweder $15 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$ oder $60 \mu\text{m}$ eingestellt. Es wurden in dieser Diplomarbeit 6 Parameter erhoben, die den Effekt der Elizitierung mit AgNO_3 auf „hairy roots“ des Edelweiß belegen.

Biomassezuwachs der mit AgNO_3 elizitierten „hairy roots“

Zunächst wurde analysiert, wie sich eine Elizitierung mit AgNO_3 auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“ auswirkt. Abbildung 12 (siehe S. 20) zeigt, dass durch die Elizitierung mit AgNO_3 das Wachstum der „hairy roots“ signifikant gehemmt wurde, als Kontrolle dienten dabei unelizitierte „hairy roots“. Für die Kontrollkultur ergab sich ein Biomassezuwachs von 1825 %. Waren die „hairy roots“ eine Woche lang einer AgNO_3 Konzentration von $15 \mu\text{m}$ ausgesetzt, so verringerte sich der Biomassezuwachs auf 840 %. Eine Elizitorzugabe von $30 \mu\text{m}$ AgNO_3 verringerte das Wachstum auf 750 %, und eine Zugabe von $60 \mu\text{m}$ AgNO_3 führte nur noch zu einem Biomassezuwachs von 620 %. Es konnte also festgestellt werden, dass

Elizitorzusätze das Wachstum der „hairy roots“ immer negativ beeinflussten. Die Unterschiede zwischen den AgNO₃ Konzentrationen waren dabei nicht signifikant.

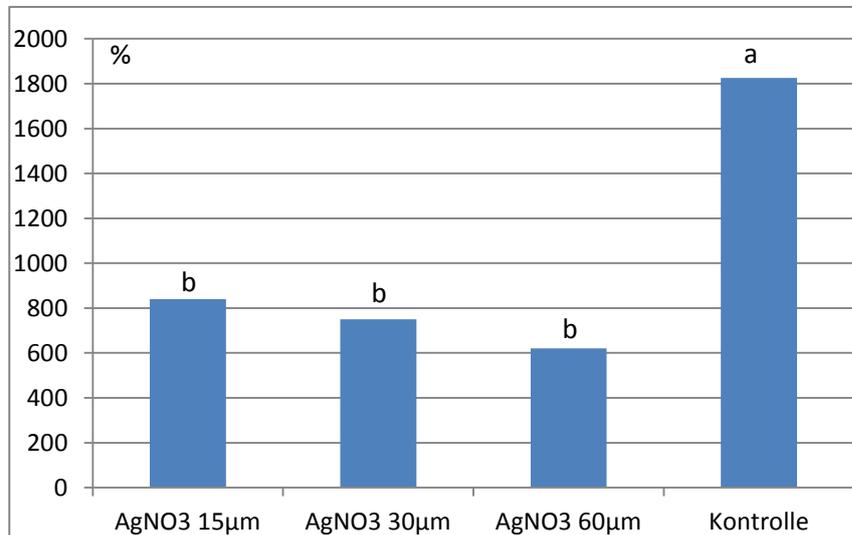


Abb.12: Biomassezuwachs (% , bezogen auf das Frischgewicht) der „hairy roots“ nach 1 wöchiger Elizitierung mit AgNO₃. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n=5

Bestimmung des Verhältnis Frischgewicht/Trockengewicht

Das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht sollte in dieser Diplomarbeit bestimmt werden, um Rückschlüsse auf die Wassermenge in den Zellen der „hairy roots“ zu gewinnen. Ein hohes FG/TG- Verhältnis hat zu bedeuten, dass die „hairy roots“ Zellen viel Wasser aufgenommen hatten, das dann im Laufe des Trocknungsprozesses verdunstete. Der tatsächliche Biomassezuwachs wird aussagekräftig durch das TG dargestellt, weil darin nur das Zellmaterial mit den zu analysierenden Wirkstoffen berücksichtigt wird. Um das Verhältnis FG/TG zu bestimmen, wurden die 4 Wochen alten „hairy roots“ aus den Kulturgefäßen entnommen und 1 Woche bei Zimmertemperatur getrocknet. Danach konnten die Kulturen abgewogen und das Trockengewicht bestimmt werden. Zur besseren graphischen Veranschaulichung wurde das TG der gesammelten „hairy roots“ in Relation zum zuvor bestimmten FG gesetzt. Wie Abb. 13 (siehe S. 21) zeigt, ergab sich bei der Kultur, die mit 15 µm AgNO₃ eliziert wurde, ein FG/TG

Verhältnis von 9,35:1. Bei jener Kultur, die mit 30 μm AgNO_3 eliziert wurde, konnte ein FG/TG Verhältnis von 9,2:1 dokumentiert werden. Für die „hairy roots“, die mit 60 μm AgNO_3 behandelt wurden, betrug das FG/TG Verhältnis 8,9:1. Als Referenzwert wurde die bereits zuvor erwähnte Referenzkultur (Kontrolle) herangezogen, deren FG/TG Verhältnis 14:1 betrug. Aus Abb. 13 geht hervor, dass eine Elizitierung das Verhältnis FG/TG gegenüber einer Kontrollkultur in jedem Fall sinken lässt.

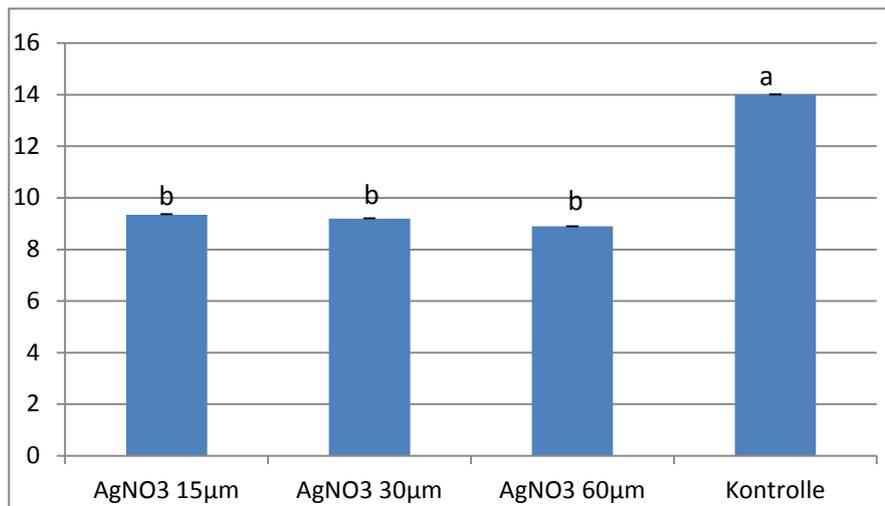


Abb. 13: Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus $n=6$

Bestimmung des Gehalts an Leoligin

Die Bestimmung des Leoligingehalts wurde von Dr. Stefan Schwaiger (Universität Innsbruck) vorgenommen, Durchführung und Analyseparameter wurden in Kapitel 2.6. (siehe S. 10) beschrieben. Wie Abb. 14 veranschaulicht, konnte der höchste Leoligingehalt in den „hairy roots“ aufgefunden werden, die mit einer AgNO_3 Konzentration von $15 \mu\text{m}$ Silbernitrat im Nährmedium eliziert worden waren: Es konnte ein Leoligingehalt von $0,0321 \%$ gemessen werden. Mit einem Leoligingehalt von $0,0217 \%$ folgten jene „hairy roots“, denen $60 \mu\text{m}$ AgNO_3 als Elizitor zugesetzt worden war. Der niedrigste Leoliginwert aller elizitierten Kulturen wurde in den „hairy roots“ ermittelt, die mit $30 \mu\text{m}$ AgNO_3 eliziert worden waren ($0,0183 \%$). In der unelizitierten Kontrollkultur konnten $0,00624 \%$ Leoligin in der Trockenmasse gemessen werden. Es zeigte sich, dass „hairy roots“ die mit $15 \mu\text{m}$ bzw. $60 \mu\text{m}$ AgNO_3 eliziert wurden, eine signifikant höhere Leoliginkonzentration aufweisen als unelizitierte „hairy roots“ (Kontrolle). Jene „hairy roots“, die mit $30 \mu\text{m}$ AgNO_3 eliziert wurden, bildeten ebenfalls mehr Leoligin als unelizitierte „hairy roots“ (Kontrolle). Die Konzentrationsunterschiede waren jedoch nicht signifikant.

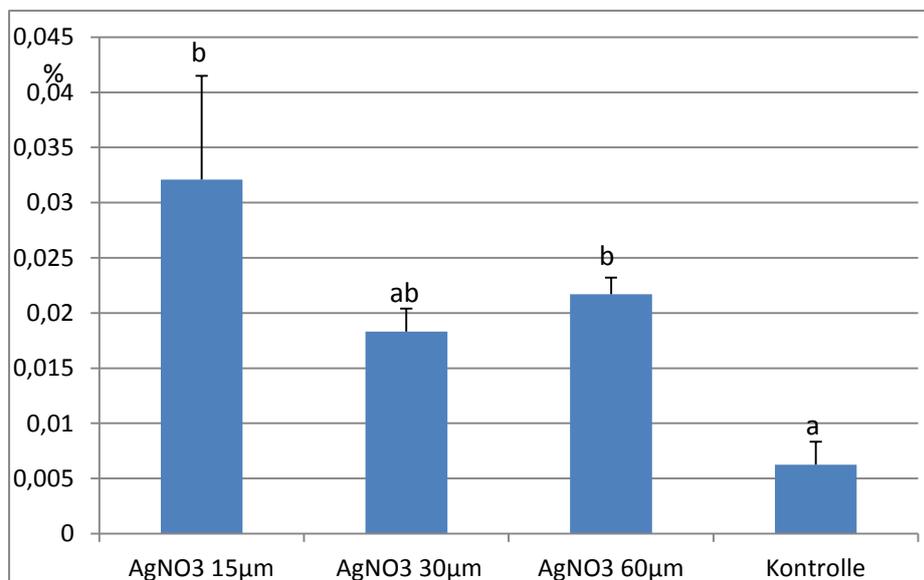


Abb. 14: Gehalt an Leoligin (%) nach Elizitierung von „hairy roots“ des Edelweißklon K8A mit Silbernitrat; Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus $n=6$

Bestimmung der Leoliginmenge pro Kolben

Wie bereits erläutert, hemmt eine Elizitierung mit AgNO_3 einerseits den Biomassezuwachs der „hairy roots“ des Edelweißklon K8A, aber erhöht andererseits den Leoligingehalt in den „hairy roots“. Um einen Zusammenhang zwischen Biomassezuwachs und Leoligingehalt herzustellen, wurde die Leoliginmenge pro Erlenmeyerkolben berechnet. Abb. 15 zeigt, dass die höchste Leoliginmenge (0,173 mg pro Kolben) in den „hairy roots“ gemessen wurde, die mit $15 \mu\text{m}$ AgNO_3 eliziert worden waren. Der zweithöchste Wert (0,128 mg) wurde in den „hairy roots“ gefunden, denen $60 \mu\text{m}$ AgNO_3 als Elizitor zugesetzt worden war. Mit einer Leoliginmenge von 0,100 mg pro Kolben produzierten jene „hairy roots“ das wenigste Leoligin, die mit $30 \mu\text{m}$ AgNO_3 eliziert worden waren. In der Referenzkultur (Kontrolle) wurde ein Leoligingehalt von 0,042 mg pro Kolben gemessen. Es kann also festgestellt werden, dass eine elizitierte „hairy roots“- Kultur in jedem Fall deutlich mehr Leoligin pro Kulturgefäß bildet als die Kontrollkultur.

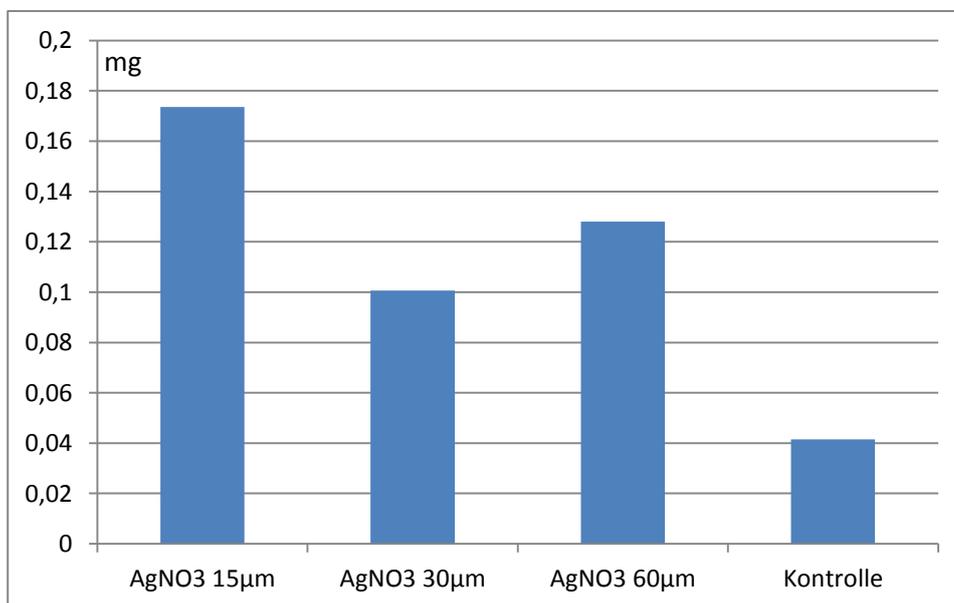


Abb. 15: Menge an Leoligin pro Kolben (mg) nach Elizitierung von „hairy roots“ des Edelweißklon K8A mit Silbernitrat, Mittelwerte aus $n=6$

Bestimmung des Gehalts an 5-Methoxyleoligin

Neben der Leoliginkonzentration in den „hairy roots“ des Edelweißklon K8A wurde von Dr. Stefan Schwaiger (Universität Innsbruck) auch der Gehalt an 5-Methoxyleoligin bestimmt. Die Aufarbeitung, Durchführung und die Analyse erfolgten analog zur Bestimmung des Leoligins. Jene Gehaltsunterschiede, die sich bei der Erfassung des Leoligingehalts zeigten, konnten auch bei der Bestimmung von 5-Methoxyleoligin bestätigt werden (siehe Abb. 16). Wiederum fand sich die höchste Konzentration an 5-Methoxyleoligin (0,0260 %) in jenen „hairy roots“, die mit 15 μm AgNO_3 eliziert worden waren. Die zweithöchste Wirkstoffkonzentration (0,0177 %) wurde in den „hairy roots“ gemessen, die mit 60 μm AgNO_3 eliziert worden waren. Die niedrigste 5-Methoxyleoliginkonzentration (0,0153 %) aller elizitierten Kulturen wurde in den „hairy roots“ gemessen, denen 30 μm AgNO_3 als Elizitor zugesetzt worden war. In der Referenzprobe (Kontrolle) wurde ein 5-Methoxyleoligin-Gehalt von 0,0049 % bestimmt. Es konnte somit festgestellt werden, dass „hairy roots“, die mit AgNO_3 eliziert wurden, in jedem Fall signifikant mehr 5-Methoxyleoligin bildeten als die unelizitierten Kontrolle.

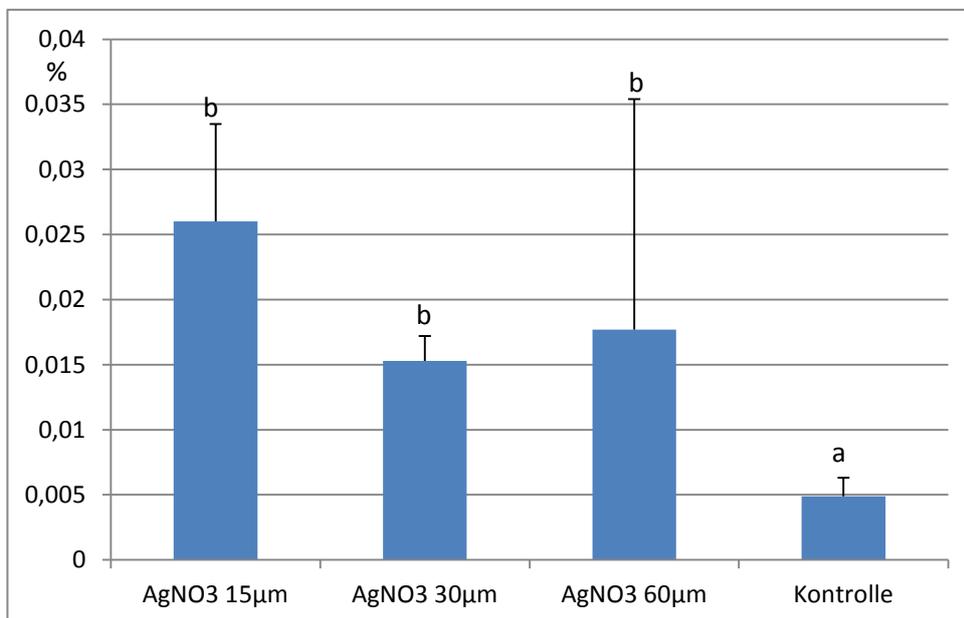


Abb. 16: Gehalt an 5-Methoxyleoligin (%) nach Elizitierung der „hairy roots“ des Edelweißklon K8A mit Silbernitrat. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus $n = 6$

Bestimmung der Menge an 5-Methoxyleoligin pro Kolben

Analog zur Bestimmung der Leoliginmenge pro Kolben wurde auch für das 5-Methoxyleoligin ein Zusammenhang zwischen Biomassezuwachs und Inhaltsstoffmenge erstellt, da letztlich weniger der prozentuelle Gehalt als vielmehr die absolute Menge an Inhaltsstoff pro Kultureinheit von Bedeutung ist. Wiederum konnte in jenen „hairy roots“ die größte Menge an 5-Methoxyleoligin pro Kolben (0,140 mg) gemessen werden, die mit 15 μm AgNO_3 eliziert worden waren. Der zweithöchste 5-Methoxyleoliginwert (0,104 mg) wurde in den „hairy roots“ dokumentiert, denen 60 μm AgNO_3 als Elizitor zugesetzt worden war. Der niedrigste 5-Methoxyleoliginingehalt (0,084 mg) aller elizitierten Kulturen wurde in den „hairy roots“ bestimmt, die mit 30 μm AgNO_3 eliziert worden waren. In der Kontrollkultur wurde ein Gehalt an 5-Methoxyleoligin von 0,033 mg pro Kolben ermittelt (siehe Abb. 17). Es kann demnach festgestellt werden, dass mit Silbernitrat elizitierte „hairy roots“- Kulturen des Edelweißklon K8A in jedem Fall mehr 5-Methoxyleoligin bilden als die unelizitierte Kontrollkultur.

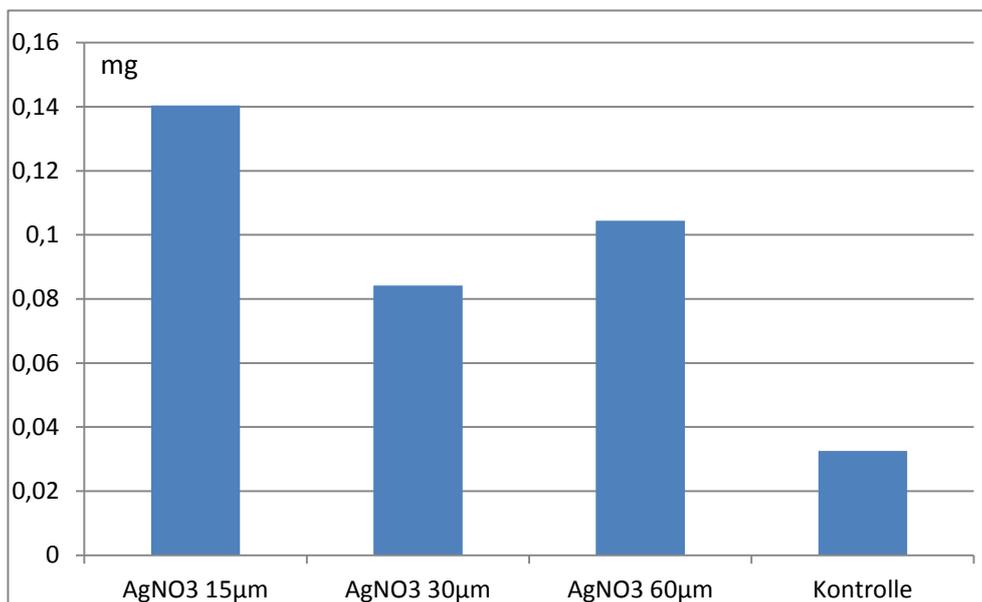


Abb. 17: Menge an 5-Methoxyleoligin pro Kolben (mg) nach Elizitierung von „hairy roots“ des Edelweißklon K8A mit Silbernitrat, Mittelwerte aus $n=6$

3.6. Elizitierung von „hairy roots“ mit erhöhtem Saccharosegehalt im Nährmedium

Neben der Elizitierung mit AgNO_3 wurde auch eine Elizitierung mit erhöhtem Saccharosegehalt im Nährmedium durchgeführt. Als Elizitor kamen drei verschiedene Saccharosekonzentrationen zur Anwendung (5 %, 6 %, 7 %). Die Einstellung der jeweiligen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium erfolgte wie in Kapitel 2.5 (siehe S. 9) beschrieben. Es wurden in dieser Arbeit 6 Parameter erhoben, die den Effekt der Elizitierung mit einer erhöhten Saccharosekonzentration im Nährmedium auf die „hairy roots“ belegen sollen.

Bestimmung des Biomassezuwachs

Abb. 18 (siehe S. 27) veranschaulicht den Biomassezuwachs der „hairy roots“, die jeweils eine Woche lang einer erhöhten Saccharosekonzentration im Nährmedium ausgesetzt waren. Als Referenz wurden unelizitierte „hairy roots“ herangezogen, bei welchen sich der Biomassezuwachs auf 1825 % belief. Jene Kultur, deren Saccharosekonzentration eine Woche lang auf 5 % angehoben worden war, erzielte einen Biomassezuwachs von 1455 %. „Hairy roots“, die mit einer Saccharosekonzentration von 7 % in ihrem Nährmedium elizitiert worden waren, verzeichneten einen Biomassezuwachs von 1220 %. Den geringsten Biomassezuwachs (1105 %) erzielten jene „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration auf 6 % angehoben worden war. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Elizitierung mit einer erhöhten Saccharosekonzentration zu einer signifikanten Senkung des Biomassezuwachses gegenüber einer Kontrollkultur führt.

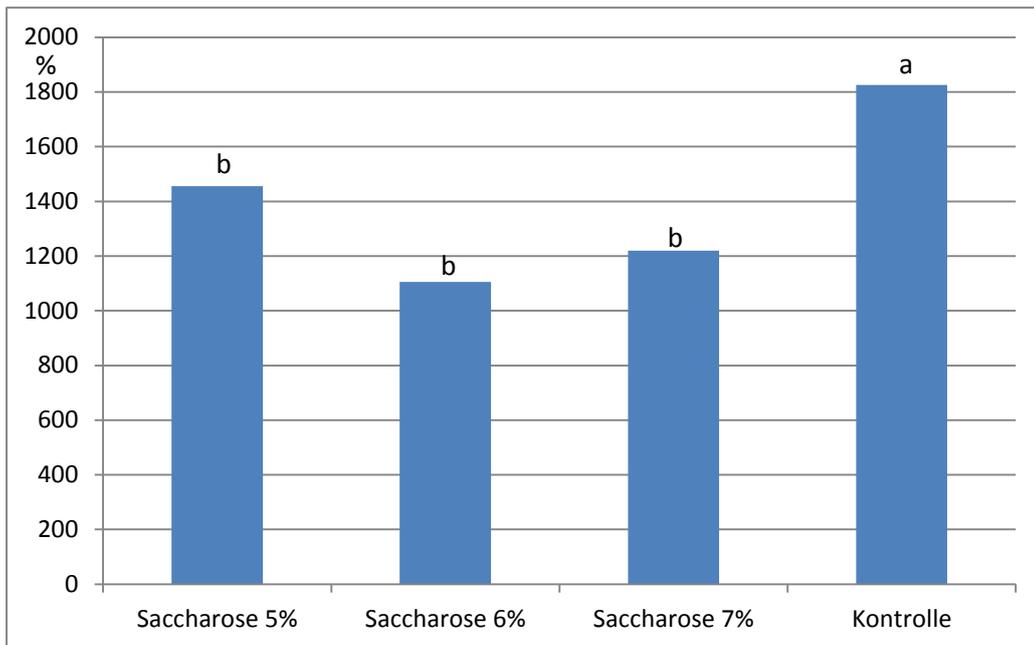


Abb. 18: Biomassezuwachs der „hairy roots“ (%) nach einwöchiger Elizitierung mit erhöhtem Saccharosegehalt (5 %, 6%, 7 %). Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Bestimmung des Verhältnis Frischgewicht/Trockengewicht

Das Verhältnis von FG zu TG der „hairy roots“ wurde analog zu der Elizitierung der „hairy roots“ mit AgNO_3 bestimmt. Zur besseren graphischen Veranschaulichung wurde das TG der gesammelten „hairy roots“ in Relation zum zuvor bestimmten FG gesetzt. Für jene „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 5 % angehoben worden war, wurde ein FG/TG Verhältnis von 9,75:1 berechnet. Für die „hairy roots“, die mit einer Saccharosekonzentration von 6 % elizitiert worden waren, konnte ein FG/TG Verhältnis von 10,85:1 bestimmt werden. Wurde die Saccharosekonzentration auf 7 % angehoben, resultierte das in einem FG/TG Verhältnis von 8,3:1. Als Kontrolle wurde die zuvor erwähnte Kontrollkultur herangezogen, deren Verhältnis von FG/ TG 14:1 betrug. Aus Abb. 19 (siehe S. 28) wird ersichtlich, dass das Verhältnis von FG zu TG in den elizitierten „hairy roots“ in jedem Fall signifikant geringer ist als in der unelizitierten Kontrollkultur.

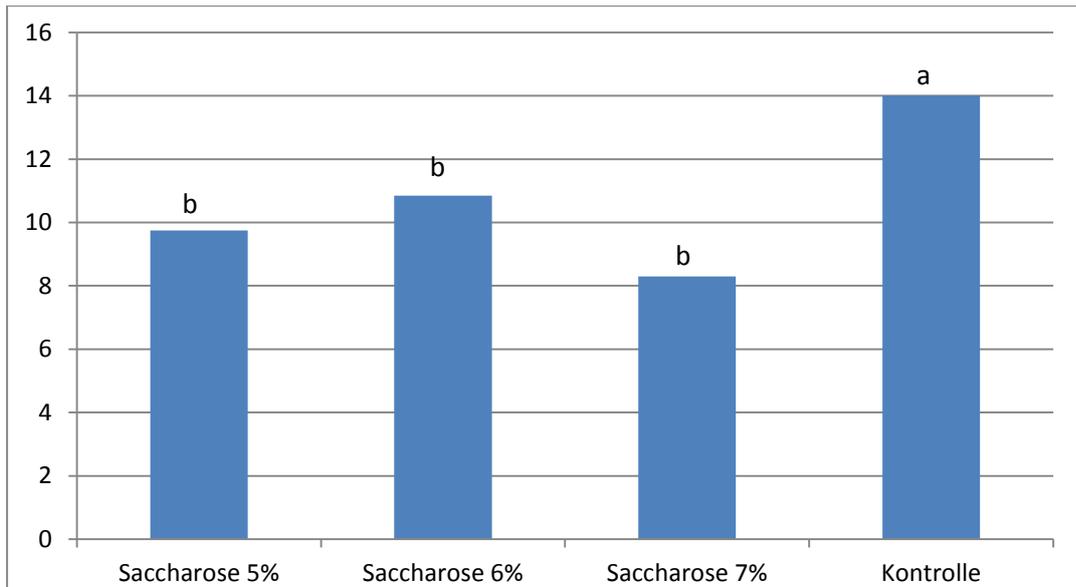


Abb. 19 Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht von „hairy roots“ des Edelweißklon K8A nach Elizitierung mit erhöhtem Saccharosegehalt (5 %, 6 %, 7 %). Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Bestimmung des Gehalts an Leoligin in „hairy roots“

Abbildung 20 (siehe S. 29) verdeutlicht, dass der signifikant höchste Leoliginegehalt (0,0678 %) in den „hairy roots“ gemessen wurde, die zuvor eine Woche lang mit einer Saccharosekonzentration von 6 % im Nährmedium eliziert worden waren. In jenen „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 7 % angehoben worden war, konnte ein Leoliginegehalt von 0,0222 % bestimmt werden. Die niedrigste Leoliginkonzentration (0,0141 %) wurde in den „hairy roots“ gemessen, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 5 % angehoben worden war. In der Kontrollkultur (3 % Saccharose) wurde ein Leoliginegehalt von 0,0062 % gemessen. Aus Abb. 20 (siehe S. 29) wird ersichtlich, dass eine Elizitierung mit 6 % Saccharose im Nährmedium in jedem Fall die Produktion von Leoligin in den „hairy roots“ signifikant steigert.

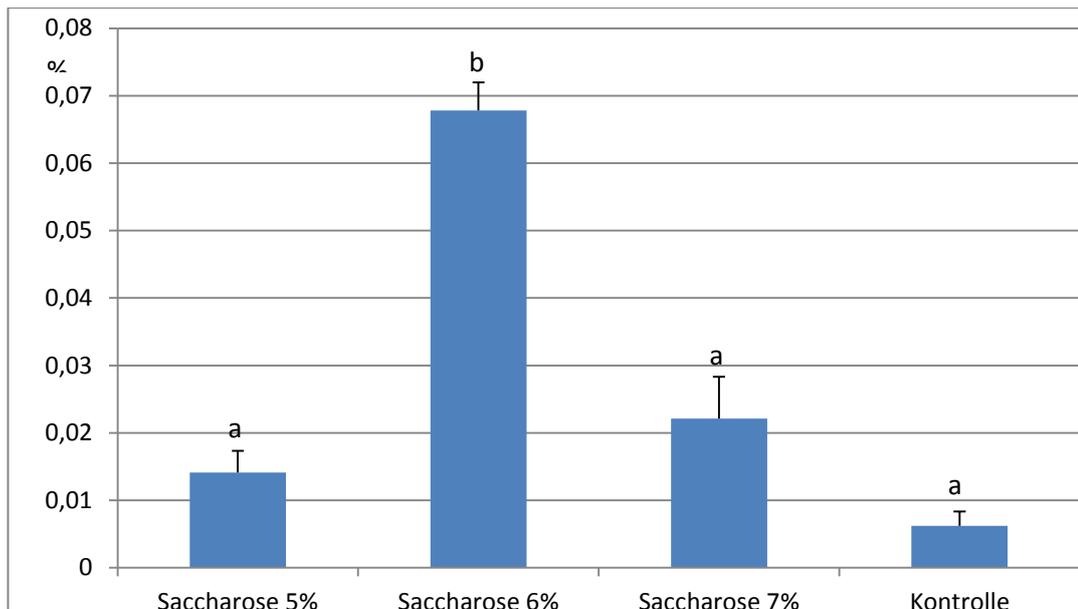


Abb. 20: Gehalt an Leoligin (%) in „hairy roots“ des Edelweißklon K8A nach Elizitierung mit erhöhter Saccharosekonzentration. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Bestimmung der Menge an Leoligin pro Kolben

Der signifikant höchste Gehalt an Leoligin (0,339 mg) wurde in den „hairy roots“ gemessen, die eine Woche lang mit einer Saccharosekonzentration von 6 % im Nährmedium elizitiert worden waren. Für jene „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 7 % angehoben worden war, wurde eine Leoliginmenge von 0,104 mg pro Kolben bestimmt. Jene „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 5 % angehoben worden war, wiesen eine Leoliginmenge von 0,069 mg pro Kolben auf. In der Kontrollkultur wurde eine Leoliginmenge von 0,041 mg pro Kolben aufgefunden. Aus Abb. 21 (siehe S. 30) geht hervor, dass „hairy roots“, die mit 6 % Saccharose im Nährmedium elizitiert wurden, in jedem Fall signifikant mehr Leoligin pro Kolben produzieren als eine unelizitierte Kontrollkultur.

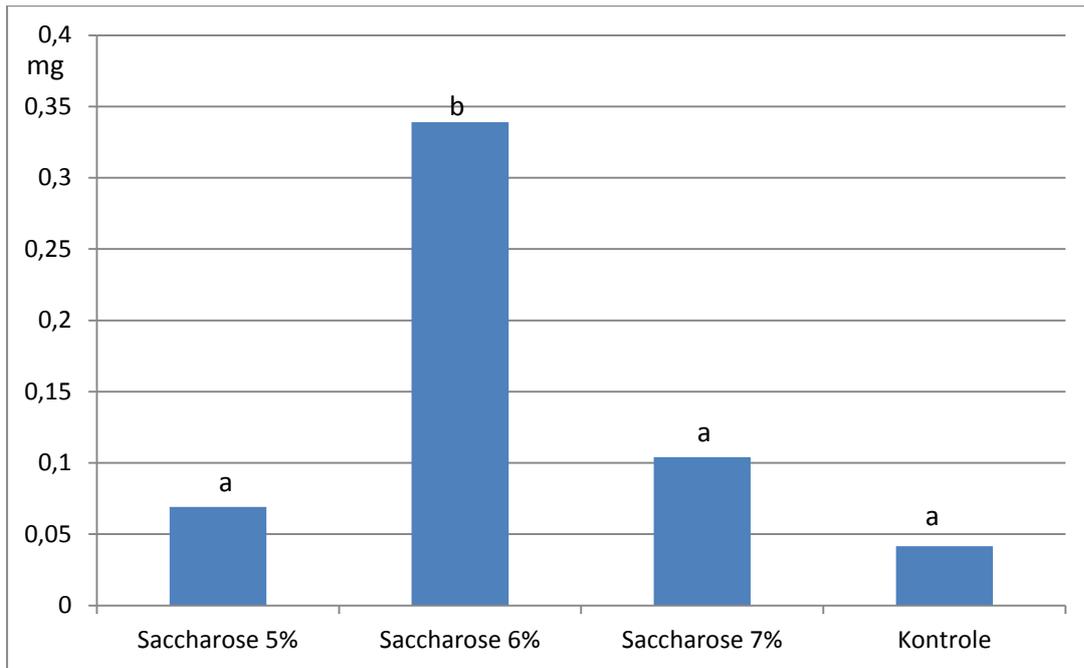


Abb. 21: Menge an Leoligin pro Kolben (mg) in „hairy roots“ des Edelweißklon K8A nach Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Bestimmung des Gehalts an 5-Methoxyleoligin

Die signifikant höchste Konzentration an 5-Methoxyleoligin (0,037 %) konnte in den „hairy roots“ gemessen werden, die zuvor eine Woche lang mit einer Saccharosekonzentration von 6 % elizitiert worden waren. Die „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 7 % bzw. 5 % angehoben worden war, wiesen eine Wirkstoffkonzentration von 0,010 % bzw. 0,008 % auf. In jenen unelizitierten „hairy roots“, die in dieser Arbeit als Kontrolle dienten, wurde ein Gehalt an 5-Methoxyleoligin von 0,005 % gemessen. Aus Abb. 22 (siehe S. 31) wird ersichtlich, dass „hairy roots“, die mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 6 % im Nährmedium elizitiert worden waren, signifikant mehr 5-Methoxyleoligin bilden als die unelizitierte Kontrollkultur sowie jene „hairy roots“, die mit 5 oder 7 % Saccharose elizitiert worden waren.

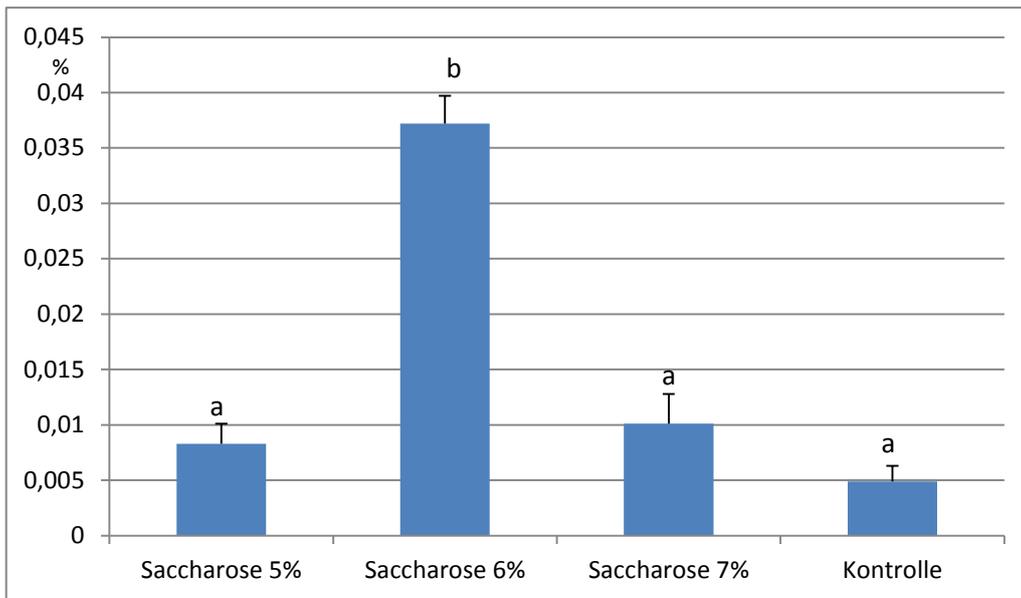


Abb. 22: Gehalt an 5-Methoxyleoligin (%) in „hairy roots“ des Edelweißklon K8A nach Elizitierung mit erhöhter Saccharosekonzentration (5 %, 6 %, 7 %). Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n=6

Bestimmung der Menge an 5-Methoxyleoligin pro Kolben

Wie in Abb. 23 (siehe S. 32) veranschaulicht, wurde für jene Kultur, die eine Woche lang mit einer Saccharosekonzentration von 6 % elizitiert worden war, eine Menge an 5-Methoxyleoligin von 0,186 mg pro Kolben bestimmt. In jenen „hairy roots“-Kulturen, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 5 % bzw. 7 % angehoben worden war, konnten 0,040 mg bzw. 0,047 mg 5-Methoxyleoligin pro Kolben aufgefunden werden. In der Kontrollkultur waren 0,033 mg 5-Methoxyleoligin pro Kolben gebildet worden. Aus Abb. 23 (siehe S. 32) geht hervor, dass „hairy roots“, die mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 6 % im Nährmedium elizitiert wurden, in jedem Fall signifikant mehr 5-Methoxyleoligin pro Kolben bilden als die unelizitierte Kontrollkultur bzw. die mit 5 oder 7 % Saccharose elizitierten Kulturen.

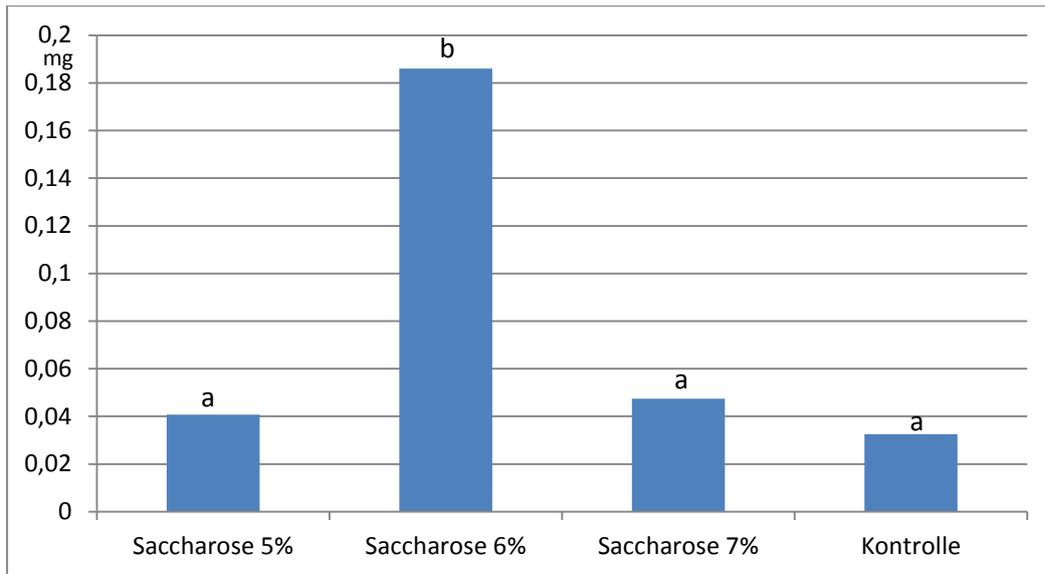


Abb. 23: Menge an 5-Methoxyleolin pro Kolben (mg) in „hairy roots“ des Edelweißklon K8A nach Elizitierung mit erhöhter Saccharosekonzentration. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

4. Diskussion

Um an Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs zu gelangen, gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits können einfache Strukturen mit einem geeigneten chemischen Verfahren synthetisiert werden, andererseits können Wirkstoffe aus Pflanzen, Organkulturen oder Zellkulturen isoliert werden. Eine chemische Synthese hat gegenüber einer Isolierung von Wirkstoffen aus biogenen Quellen viele Vorteile: So kann der Syntheseprozess kostengünstiger, mit weniger Materialaufwand und schneller durchgeführt werden. Die Struktur des Leoligins bzw. des 5-Methoxyleoligins (siehe Abb.1, S. 2) weist 3 Chiralitätszentren auf, wodurch jedoch die chemische Synthese sehr aufwendig ist. Deshalb und wegen des sehr niedrigen Gehalts in natürlichen Wurzeln des Edelweiß scheint die Gewinnung von Leoligin und 5-Methoxyleoligin eher *in vitro* praktikabel zu sein. Eine Möglichkeit dazu wären Zellkulturen, jedoch weisen diese in der Regel eine hohe Variabilität und Heterogenität auf, wodurch eine kontinuierliche Wirkstoffbildung oft nicht gewährleistet ist (Hussain et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit ist die Wirkstoffgewinnung aus „hairy roots“-Kulturen. Diese zeichnen sich durch eine hohe genetische Stabilität, schnelles Wachstum und die Möglichkeit der Kultivierung auf wirkstofffreiem Medium aus (Hussain et al. 2012). Zusätzlich ist die Elizitierung von „hairy roots“ Linien schon gut untersucht. So konnte z.B. die Konzentration von Silybin, Silychristin und Silydianin in „hairy roots“-Linien der Mariendistel durch Elizitierung mit Pilzextrakten um das zweifache gesteigert werden (Hasanloo et al 2013). In einer weiteren Arbeit konnte der positive Effekt von Kupfersulfat als Elizitor auf die Produktion von Forskolin in „hairy roots“-Kulturen von *Coleus forskohlii* Briq (*Plectranthus barbatus*) erwiesen werden (Reddy et al 2012).

In vorangegangenen Arbeiten von Ondratschek (2012), Prisching (2013) und Schmidtbauer (2012) konnte bereits gezeigt werden, dass sich „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß einfach kultivieren lassen und einen schnelles Wachstum aufweisen. Aus diesen Gründen fanden auch in dieser Diplomarbeit „hairy roots“ Kulturen des Edelweiß ihre Anwendung. Die vorliegende Diplomarbeit befasst sich mit transgenen „hairy roots“-Kulturen

des Edelweiß. Neben der Aufvermehrung und anschließenden abiotischen Elizitierung des „hairy roots“-Klon K8A sollten zunächst Samen der Sorte „Helvetia“ gekeimt werden, um nach Etablierung von in vitro-Kulturen eine Infektion mit drei Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* durchzuführen. In dieser Arbeit wurden die Edelweißsamen nach dem Säen auf Erde ausschließlich mit einer Chinosollösung gegossen, die auch in der Gärtnerei ihre Anwendung findet. Es sollte damit die Keimbelastung der Edelweißkeimlinge soweit als möglich gesenkt werden. Die Keimlinge wurden in regelmäßigem Abstand (alle 3-4 Tage) ausreichend mit dieser Chinsollösung bewässert. Am Anfang konnte man sehen, dass die Keimlinge im Vergleich zum Keimansatz von Schleritzko (2015), die ihren Pflänzchen nur mit Wasser gegossen hatte, langsamer keimten. Bezüglich der Keimrate der Edelweißsamen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Es konnte allerdings eindeutig beobachtet werden, dass die Pflanzen, die ausschließlich mit Wasser gegossen wurden, größer und vitaler waren (siehe Abb. 24). Die Chinossollösung hemmte also das Wachstum der Edelweißkeimlinge. Zusätzlich konnte bei den mit Chinosollösung gegossenen Pflanzen ein bleiches, wachsartiges Erscheinungsbild festgestellt werden.



Abb. 24 Edelweißkeimlinge nach Bewässerung mit Chinossollösung (links) und Wasser (rechts)

Die geringere Größe der mit Chinosollösung gegossenen Pflanzen (siehe Abb. 24) führte bei der Überführung in vitro zu Problemen: Einige Keimlinge

konnten nur auf das Nährmedium gelegt werden, da sie zu klein und schwach waren, um herkömmlich in das Nährmedium gesteckt zu werden. Trotz der Chinosolbehandlung kam es nach der Etablierung von in vitro-Kulturen zu hohen Ausfällen: Immer wieder mussten im Laufe der ersten zwei Wochen Pflanzen wegen Schimmelbefall aussortiert werden. Insgesamt konnten nur 7,3 % der transferierten Pflanzen für eine Infektion mit *Agrobacterium* herangezogen werden. Das häufige Auftreten von Schimmelbefall in den in vitro-Kulturen deutet darauf hin, dass die Parameter der Oberflächensterilisation nicht optimal waren. Eine stärkere Oberflächensterilisation hätte jedoch auch eine stärkere Belastung für die Keimlinge zur Folge gehabt. Eine Möglichkeit wäre gewesen, die Keimlinge länger in Erde zu belassen und die Etablierung von in vitro-Kulturen mit größeren und stärkeren Pflanzen durchzuführen. Dies war jedoch in dieser Arbeit zeitlich nicht durchführbar, da nach der Etablierung in vitro noch weitere Arbeitsschritte mit den Pflanzen geplant waren.

An den drei schlussendlich zur Verfügung stehenden in vitro-Kulturen wurden Infektionen mit *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt, wobei die Wildstämme TR 105, LBA 9402 und ATCC 15834 zum Einsatz kamen. Über einen Beobachtungszeitraum von 6 Wochen zeigte sich jedoch keine „hairy roots“- Bildung. Auch Blattstücke des Edelweißklons C9 wurden mit den drei Agrobakteriumstämmen infiziert, es kam jedoch ebenfalls nicht zur Ausbildung von „hairy roots“. Eine erfolgreiche Induktion von „hairy roots“ hängt von vielen Faktoren ab. Neben Alter, Genotyp (Sorte) der Pflanze und dem *Agrobacterium*-Stamm konnte in einer weiteren Arbeit auch belegt werden, dass die jeweilige Wachstumsphase, in der sich das Bakterium zum Zeitpunkt der Infektion befindet, einen großen Einfluß auf den Erfolg der Infektion hat (Gafni und Levy 2005). Eine erfolgreiche „hairy roots“- Induktion hängt demnach von vielen verschiedenen Faktoren ab, weshalb es zunächst unklar bleibt, warum es in der vorliegenden Arbeit zu keiner „hairy roots“- Induktion an Edelweißkeimlingen der Sorte „Helvetia“ bzw. Blattstücken des Edelweißklons C9 kam.

Die „hairy roots“- Kulturen des Klons K8A, die von Ondratschek 2012 etabliert worden waren, zeigten ein ausgezeichnetes Wachstum. So konnte

innerhalb von 4 Wochen ein Massezuwachs von bis zu 1825 % dokumentiert werden. In der Arbeit von Prisching (2012), die sich unter anderem mit der Weitervermehrung der „hairy roots“-Linie K30 befasste, zeigte sich ein durchschnittlicher Biomassezuwachs von 400 %. Daraus wird ersichtlich, dass sich verschiedene „hairy roots“-Linien in ihrem Wachstum stark unterscheiden können.

Nach zwei vierwöchigen Vermehrungszyklen der „hairy roots“ der Linie K8A stand ausreichend Probematerial für die Elizitierung zur Verfügung. Als Elizitor fanden in dieser Arbeit Silbernitrat in drei Konzentrationen (15 µm, 30 µm, 60 µm) und erhöhte Saccharosekonzentration im Nährmedium (5 %, 6 %, 7 %) ihre Anwendung. Die Auswahl der jeweiligen Elizitor-konzentrationen beruht auf der Erkenntnis der vorangegangenen Arbeit von Schmidtbauer (2012), die in ihrer Arbeit die selben Elizitoren in den jeweils gleichen Konzentrationen verwendet hat.

Die Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen lieferte einen klaren Trend: Mit steigender Saccharosekonzentration stieg auch die Leoliginkonzentration stetig an. Die maximale Leoliginkonzentration wurde in den „hairy roots“ gemessen, die mit 6 % Saccharose im Nährmedium elizitiert worden waren (0,067 % Leoligin bezogen auf das Trockengewicht). Wurde die Saccharosekonzentration noch weiter gesteigert, resultierte das in einem starken Einbruch der Leoliginkonzentration. So wiesen die „hairy roots“, die mit einer Saccharosekonzentration von 7 % im Nährmedium elizitiert worden waren, 0,022 % Leoligin in der Trockenmasse auf (siehe Abb. 25, S. 38). In der Studie von Park et al. (2006), die sich mit der Elizitierung von Zellkulturen von *Echscoltzia californica* mittels verschieden hoher Saccharosekonzentrationen beschäftigte, konnte festgestellt werden, dass höhere Saccharosekonzentrationen auch eine höhere Wirkstoffkonzentration in den Zellkulturen zur Folge hatten. Als Elizitor wurden 6 Saccharosekonzentrationen (0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %) angewandt. Dadurch ließ sich der Wirkstoffgehalt kontinuierlich steigern, bis er bei einer Saccharosekonzentration von 3 % einbrach. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von Leoligin und 5-Methoxyleoligin durch Elizitierung zuerst kontinuierlich gesteigert, bis sie bei 7 % Saccharose im Nährmedium einbrach. Kikowska (2012) beschäftigte sich in ihrer Studie

unter anderem mit der Elizitierung von Kalluskulturen von *Eryngium planum* L. Als Elizitor fanden drei verschiedene Saccharosekonzentrationen (4 %, 5 % und 6 %) ihre Anwendung. Es zeigte sich, dass mit einer steigenden Saccharosemenge auch der Gehalt an Phenolsäuren kontinuierlich anstieg. Den größten Effekt brachte eine Elizitierung mit einer 4 %igen Saccharoselösung und einer nachfolgenden Elizitierung mit einer Methyljasmonatlösung (100 µm). Dadurch konnte der Wirkstoffgehalt in den Kalli gegenüber der Kontrollkultur nahezu verdreifacht werden. Eine Elizitierung mit zwei verschiedenen Elizitoren würde sich auch für die „hairy roots“ der Linie K8A anbieten. So wäre es vielleicht möglich, den Gehalt an Leoligin und 5-Methoxyleoligin noch stärker zu steigern. In der Studie von Yamaner und Erdag (2013) wurde versucht, den Hypericin- und Pseudohypericingehalt in Keimlingen von *H. adenotrichum* unter anderem durch Elizitierung mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen zu steigern. Verwendet wurden als Elizitor drei Saccharoselösungen (1,5 %, 3 % und 6 %). Es zeigte sich, dass der Wirkstoffgehalt mit steigender Saccharosekonzentration nur langsam anstieg, jedoch nie den Wirkstoffgehalt der Kontrollkultur erreichte. Dadurch wird verdeutlicht, dass eine Elizitierung nicht bei jeder Pflanze einen positiven Effekt auf die Wirkstoffproduktion hat.

Die Elizitierung mit Silbernitrat lieferte, verglichen mit den Ergebnissen der Elizitierung mit erhöhtem Saccharosegehalt im Nährmedium, weniger eindeutige Ergebnisse. So fand sich in den „hairy roots“, die mit der niedrigsten Silbernitratkonzentration (15 µm) elizitiert worden waren, die höchste Leoliginkonzentration (0,031 % bezogen auf das Trockengewicht) aller mit Silbernitrat elizitierten Kulturen. Wie Abb. 25 (siehe S. 38) zeigt, lieferten jene Kulturen, welchen 30 µm bzw. 60 µm Silbernitrat zugesetzt worden war, annähernd gleiche Ergebnisse (0,018 % bzw. 0,021 %). In der Studie von Khalili et al. (2010) wurde festgestellt, dass die Elizitierung von „hairy roots“ von *Silybum marianum* mit einer 2 mM Silbernitratlösung den größten Effekt auf die Produktion von Silymarin hatte. Dadurch konnte die Wirkstoffkonzentration gegenüber der Kontrollkultur um mehr als das zweifache gesteigert werden. Auffällig war, dass eine Elizitierung mit einer

1 mM Silbernitratlösung zu einer geringeren Wirkstoffkonzentration gegenüber der Kontrollkultur führte. Alle weiteren in dieser Studie verwendeten Silbernitratlösungen (0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM) führten zu einer signifikanten Steigerung der Silymarinproduktion, konnten jedoch das Ergebnis der Kultur, die mit einer 2 mM Silbernitratlösung eliziert wurde, nicht erreichen. In einer weiteren Studie (Zaker et al. 2015) wurde unter anderem die Elizitierung mit verschiedenen Silbernitratlösungen von Adventivwurzeln von *Perovskia abrotanoides* beschrieben. Es wurden Silbernitratlösungen in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet (5 μm , 25 μm und 50 μm). Die Elizitierung mit einer der beiden Silbernitratlösungen (5 μm bzw. 25 μm) führte gegenüber der Kontrollkultur jeweils zu einer Konzentrationsverdopplung an Tashinonen. Durch eine Elizitierung mit 50 μm olarer Silbernitratlösung konnte der Wirkstoffgehalt an Tashinonen verdreifacht werden. In der vorliegenden Diplomarbeit konnte mit der niedrigsten Silbernitratkonzentration (15 μm) die stärkste Wirkstoffzunahme erzielt werden. In weiteren Untersuchungen wäre es also ratsam, „hairy roots“ der Linie K8A mit niedrigeren Silbernitratkonzentrationen zu elizieren, um möglicherweise einen noch stärkeren Effekt auf die Wirkstoffproduktion in den „hairy roots“ zu erhalten.

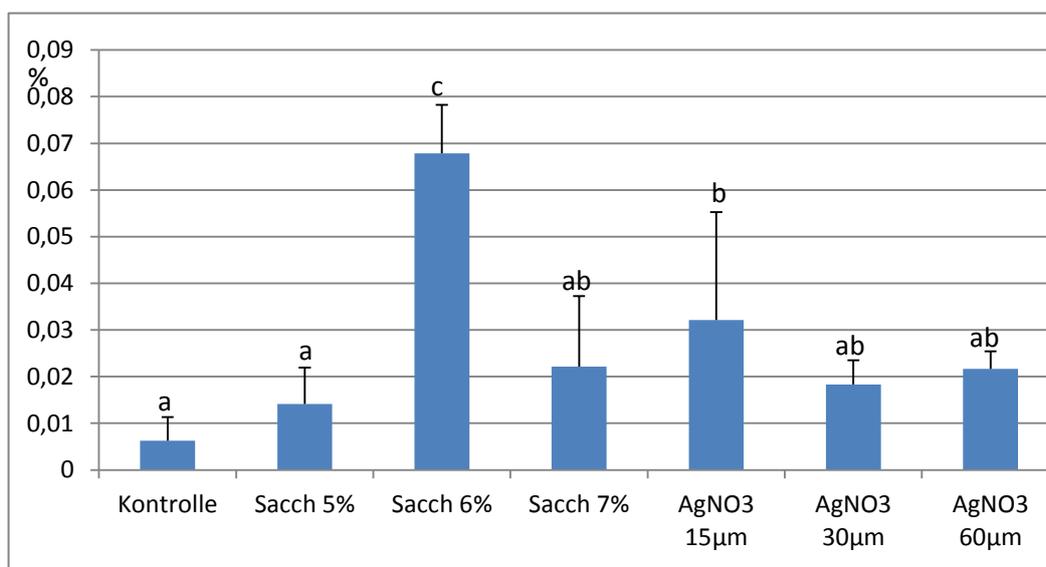


Abb. 25: Gehalt an Leogin (% des TG) nach Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen im Nährmedium oder Elizitierung mit Silbernitrat. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Neben dem Gehalt an Leoligin wurde auch die Konzentration an 5-Methoxyleoligin in den „hairy roots“ bestimmt. In den unelizitierten „hairy roots“ wurden 0,005 % 5-Methoxyleoligin bestimmt. Verglichen mit dem Wert in den unelizitierten „hairy roots“ stieg die 5-Methoxyleoliginkonzentration in den „hairy roots“, die mit 5 % Saccharose eliziert worden waren, leicht an, erreichte bei 6 % Saccharose im Nährmedium ihr Maximum (0,037 %), und brach bei 7 % Saccharose im Nährmedium (0,010 %) ein. Die mit Silbernitrat elizitierten Kulturen lieferten ein differenziertes Bild. Die höchste 5-Methoxyleoliginkonzentration (0,026 %) wurde in den „hairy roots“ gemessen, welchen als Elizitor 15 µm Silbernitrat zugesetzt wurden. Jene „hairy roots“, die mit 30 µm bzw. 60 µm Silbernitrat eliziert worden waren, weisen eine ähnliche 5-Methoxyleoliginkonzentration (0,015 % bzw. 0,017 %) auf (siehe Abb. 26).

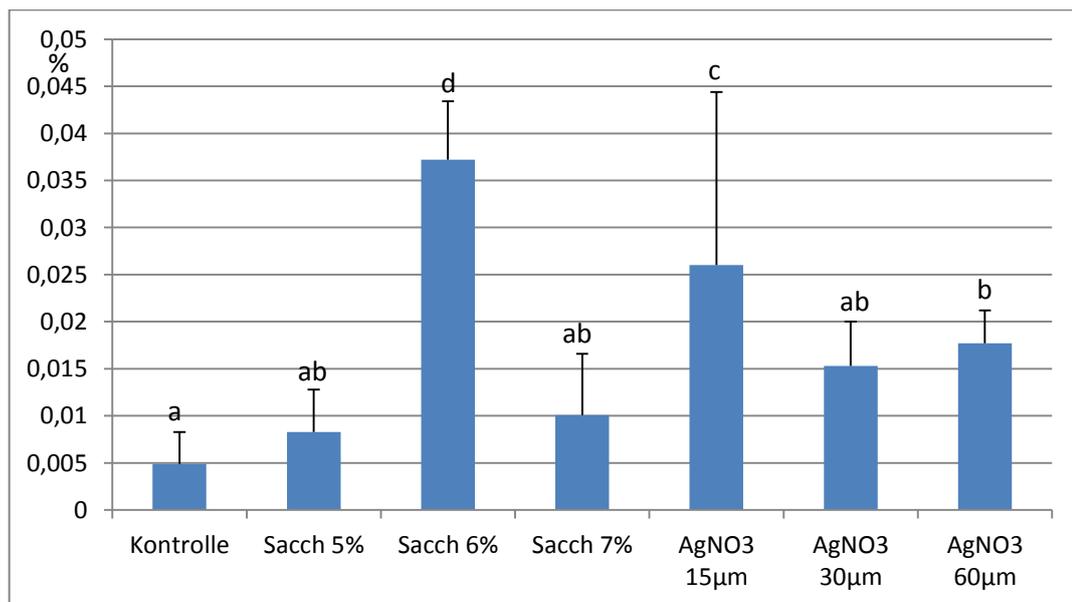


Abb. 26: Gehalt an 5-Methoxyleoligin (% des TG) nach Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentration im Nährmedium oder Elizitierung mit Silbernitrat. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n= 6

Elizitierte „hairy roots“ unterschieden sich bezüglich des Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht stark von unelizitierten „hairy roots“. Das FG/TG Verhältnis der unelizitierten Kultur betrug 14:1. Elizitierte „hairy roots“ hatten ein wesentlich geringeres FG/TG Verhältnis: Es reichte von 8,3:1 in den „hairy roots“, die mit 7 % Saccharose im Nährmedium elizitiert worden waren, bis zu 10,8:1 in den „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration auf 6 % angehoben worden war. In jedem Fall lag das Verhältnis deutlich unter dem der Kontrollkultur, wodurch gezeigt werden kann, dass Zellen unelizitierter „hairy roots“ gegenüber elizitierten „hairy roots“ größere Mengen an Wasser speichern. In der Studie von Park und Kim (1993) konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht von der Osmolarität des Kulturmediums abhängig war. In dieser Studie wurden Zellkulturen von *T. rugosum* verschiedenen hohen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium ausgesetzt. Es zeigte sich, dass mit höheren Saccharosekonzentrationen das Verhältnis FG zu TG sank. So war das Verhältnis FG zu TG in der Kultur, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 10 % angehoben wurde, weniger als halb so hoch als das Verhältnis in der Kultur, die einer Saccharosekonzentration von 2 % im Nährmedium ausgesetzt war. Damit kann erklärt werden, warum die in dieser Arbeit mit Saccharose elizitierten „hairy roots“ gegenüber der Kontrollkultur ein geringeres Verhältnis von FG zu TG hatten.

Wie zuvor bereits erläutert hemmte eine Elizitierung mit AgNO_3 bzw. eine Elizitierung mit einer erhöhten Saccharosekonzentration im Nährmedium einerseits den Biomassezuwachs der „hairy roots“ des Edelweißklon K8A, aber erhöhte andererseits den Gehalt an Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin in den „hairy roots“. Um den negativen Einfluss von Elizitoren auf das Wachstum und den positiven Einfluss auf die Wirkstoffkonzentration gemeinsam darzustellen, wurde die Wirkstoffmenge pro Kolben bestimmt (siehe Tab. 1, S. 41).

Tab. 1 Einfluss der Elizitierung auf die Menge an Leoligin- und 5-Methoxyleoliginmenge pro Kolben

	Leoligin (mg)	5-Methoxyleoligin (mg)
Kontrolle	0,04	0,03
Saccharose 5 %	0,07	0,04
Saccharose 6 %	0,34	0,19
Saccharose 7 %	0,10	0,05
AgNO₃ 15 µm	0,17	0,14
AgNO₃ 30 µm	0,10	0,08
AgNO₃ 60 µm	0,13	0,10

Aus Tab. 1 geht hervor, dass eine Elizitierung mit 5% Saccharose gegenüber der Kontrollkultur nur einen geringen Vorteil hatte. Alle weiteren Elizitierungen hatten jedoch eine starke Zunahme der Lignanmenge gegenüber der Kontrollgruppe zur Folge. Die Elizitierung mit 6 % Saccharose führte gegenüber der Kontrollgruppe zu einer 8 fachen (Leoligin) bzw. einer 6 fachen Wirkstoffzunahme (5-Methoxyleoligin). Durch alle weiteren Elizitoren konnte die Menge an Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin, bezogen auf die Kontrollkultur, zumindest verdoppelt werden. Demnach kann eindeutig festgestellt werden, dass elizitierte „hairy roots“ des Edelweißklon K8A in 5 von 6 Fällen pro Kulturgefäß wesentlich mehr Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin produzieren als eine unelizitierte Kontrollkultur. Vergleicht man die Lignankonzentrationen, die im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden, mit den von Schleritzko (2015) nach biotischer Elizitierung erhaltenen Werten, so ergab sich folgendes Bild (siehe Abb. 27, S. 42).

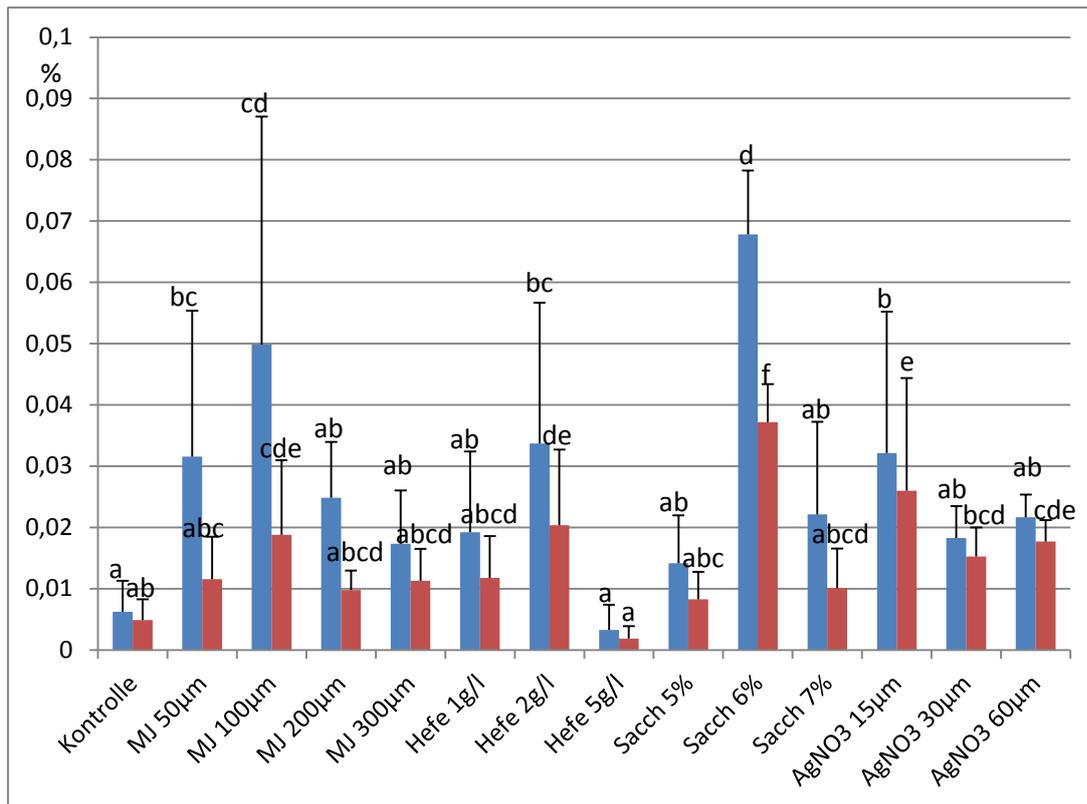


Abb. 27: Gehalt an Leoligin- (blau) und Gehalt an 5-Methoxyleoligin (rot) nach Elizitierung mit Methyljasmonat oder Hefeextrakt (Schleritzko 2015) sowie mit erhöhter Saccharosekonzentration im Nährmedium oder Silbernitrat. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant, Mittelwerte aus n=6

Die höchste Leoliginkonzentration wurde in jenen „hairy roots“ aufgefunden, die eine Woche lang mit einer Saccharosekonzentration von 6 % eliziert worden waren (0,067 %). Nach biotischer Elizitierung (Schleritzko 2015) wiesen nur die „hairy roots“, denen 100 µm Methyljasmonat als Elizitor zugesetzt wurde, ein ähnliches Ergebnis (0,049 %) auf, wobei der Konzentrationsunterschied nicht signifikant war.

Die höchste 5-Methoxyleoliginkonzentration wurde ebenfalls in jenen „hairy roots“ gemessen, deren Saccharosegehalt im Nährmedium eine Woche lang auf 6 % angehoben worden war (0,037 %). Diesem Ergebnis am nächsten kamen die „hairy roots“, die mit 15 µm Silbernitrat eliziert worden waren (0,026 %), wobei der Konzentrationsunterschied signifikant war.

Neben der in dieser Arbeit erwähnten „hairy roots“ Linie K8A wurden von Dr. Schwaiger an der Universität Innsbruck auch drei Klone aus Erdkultur (Klon 9, Klon 44 und FW 120206) untersucht. In Abb. 28 sind die Konzentrationen an Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoligin der drei Klone der Wirkstoffkonzentration der „hairy roots“ gegenübergestellt, die mit einer Saccharosekonzentration von 6 % eliziert worden waren.

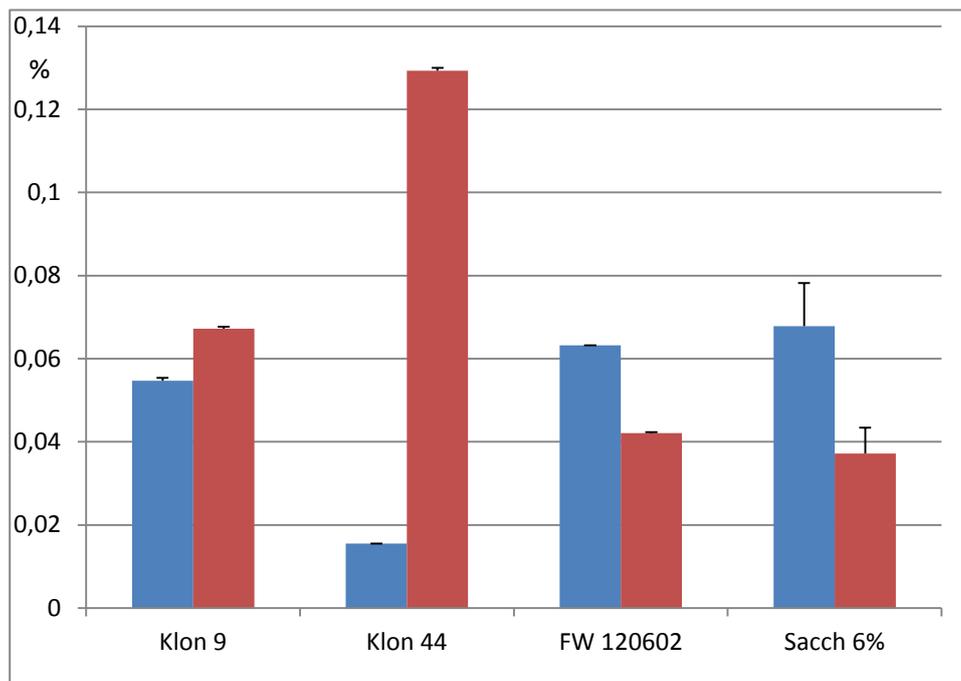


Abb. 28 Gehalt an Leoligin- (blau) und Gehalt an 5-Methoxyleoligin (rot) in natürlichen Wurzeln aus Erdkultur (Klon 9, Klon 44, FW 120602) und in „hairy roots“ Klon K8A nach Elizitierung mit 6 % Saccharose. Angaben in (% des TG), Mittelwerte aus n= 6

Es ist klar ersichtlich, dass die „hairy roots“ der Linie K8A, die mit 6 % Saccharose eliziert worden waren, an den 5-Methoxyleoliginegehalt von Klon 9 und FW 120602 heranreichten und nur von Klon 44 übertroffen wurden. Der Gehalt an Leoligin in den elizitierten „hairy roots“ der Linie K8A war in jedem Fall höher als in der Erdkultur FW 120602, in Klon 9 und in Klon 44. Die Wirkstoffmenge und deren Zusammensetzung in Pflanzen hängt von vielen Faktoren ab. So sind der Zeitpunkt der Aussaat, die Dauer und Stärke der Belichtung, die Seehöhe, der Zeitpunkt der Ernte und das Nährstoffangebot essentiell (Lück, 2001 und Göttmann, 2006). Die Dokumentation dieser Parameter wurden für Klon 9, Klon 44 und FW 120602

nicht übermittelt, weshalb in dieser Arbeit keine Aussage getätigt werden kann, inwieweit die gemessene Leoliginmenge bzw. 5-Methoxyleoliginmenge in den Erdkulturen durch vorhin erwähnte Parameter beeinflusst wurde bzw. gesteigert werden kann.

Der Vorteil einer biotechnologischen Produktion von Leoligin und 5-Methoxyleoligin über „hairy roots“ soll über eine Hochrechnung veranschaulicht werden. Der Wurzelanteil einer etwa 2 Jahre alten Edelweißpflanze (Saatgut: Fa. Austrofaat AG) aus dem Arzneipflanzengarten des Departments für Pharmakognosie, Universität Wien, wies im März 2015 ein Frischgewicht von 0,9 g und ein Trockengewicht vom 300 mg auf. Bei Zugrundelegen eines Lignangehalts, wie er in Klon FW 120602 gemessen wurde (siehe oben), ließen sich aus dieser Einzelpflanze einmalig etwa 0,19 mg Leoligin und 0,13 mg 5-Methoxyleoligin gewinnen. Bei Kultivierung von „hairy roots“ des von uns eingesetzten Klons K8A in MS-Medium mit 3 % Saccharose („Kontrolle“, siehe Abb. 18, S. 27) beläuft sich der Biomassezuwachs auf etwa 1800 %, das entspricht bei einem typischen Inokulum von 0,5 g einem Frischgewicht von 9 g. Würde man davon 1 g für die laufende Weitervermehrung der „hairy roots“ und 8 g für die Lignanproduktion einsetzen, so ließen sich pro 4 wöchigem Kultivierungszyklus bei Elizitierung mit 6 % Saccharose 5,5 g Wurzelmaterial mit einem Trockengewicht von etwa 600 mg erhalten. Dies würde einer absoluten Menge von ca. 0,41 mg Leoligin und 0,22 mg 5-Methoxyleoligin entsprechen, und da der biotechnologische Prozess kontinuierlich das ganze Jahr über durchgeführt werden kann, ließen sich so bei einem Vermehrungs- und 11 Produktionszyklen ausgehend von 0,5 g „hairy roots“ 4,5 mg bzw. 2,4 mg der Lignane herstellen.

Es sollten in weiteren Arbeiten von Klon 9, Klon 44 und FW 120602 „hairy roots“ angelegt werden, um vom schnellen Wachstum der „hairy roots“ zu profitieren. Anschließend wäre es möglich, die „hairy roots“ zu elizitieren, um deren Wirkstoffkonzentrationen zu maximieren. Damit hätte man den hohen natürlichen Gehalt der beiden Klone bzw. den der Feldkultur mit dem Verfahren der hohen Biomassegewinnung optimal kombiniert.

5. Zusammenfassung

Das Edelweiß (lat. *Leontopodium* sp.) ist eine krautige Pflanze aus der Familie der Asteraceen. Im Jahre 2003 wurden an der Universität Innsbruck zum ersten Mal die Naturstoffe Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin aus den Wurzeln des Edelweiß isoliert. Diese beiden Lignan-Verbindungen könnten in näherer Zukunft in der Therapie von koronaren Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine wichtige Rolle einnehmen. Der Wirkstoffgehalt der beiden Lignane in den Wurzeln des Edelweiß ist jedoch sehr gering (etwa 0,007 % in der Trockenmasse). Eine Möglichkeit für die Naturstoffgewinnung ist die Nutzung von „hairy roots“, transgenen Wurzeln, die sich durch einfache Kultivierung und schnelles Wachstum auszeichnen. Zusätzlich kann durch Elizitierung der „hairy roots“ der Wirkstoffgehalt erhöht werden. In dieser Arbeit finden AgNO_3 in drei Konzentrationen (15 μm , 30 μm , 60 μm) und erhöhte Saccharosekonzentration im Nährmedium (5 %, 6 %, 7 %) ihre Anwendung. Zuerst wurden bereits bestehende „hairy roots“-Kulturen (Klon K8A) weitervermehrt, wobei sich ein durchschnittlicher Biomassezuwachs von 1800 % zeigte. Bei der Elizitierung mit AgNO_3 führten alle drei Konzentrationen zu einer Steigerung an Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoligin gegenüber nicht elizitierten „hairy roots“. In jenen „hairy roots“, die mit 15 μm Silbernitrat elizitiert worden waren, wurde die Konzentration von Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoligin gegenüber der Kontrollkultur um mehr als das Fünffache gesteigert. Durch eine Elizitierung von „hairy roots“, deren Saccharosekonzentration im Nährmedium auf 6 % angehoben worden war, wurde die Konzentration an Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoligin gegenüber der Kontrollkultur verzehnfacht bzw. verachtzefacht. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Elizitierung zwar den Biomassezuwachs der „hairy roots“ immer negativ beeinflusste (bis zu -1200 % in der Kultur, die mit 60 μm AgNO_3 elizitiert wurde), dies konnte jedoch durch die vermehrte Wirkstoffproduktion kompensiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine in vitro Kultivierung gegenüber einer Feldkultur viele Vorteile bietet. So ist man nicht mehr von Umwelt und Jahreszeiten abhängig und kann das schnelle Wachstum von „hairy roots“-Kulturen nutzen.

Zusätzlich kann durch eine Elizitierung auch der Wirkstoffgehalt gegenüber einer Feldkultur signifikant gesteigert werden.

6. Summary

Leontopodium sp., also known as „Edelweiß“, is a herbaceous plant often used in folk medicine (e.g. for the treatment of gastroenteritis). In 2003 the two lignans, leoligin and 5-Methoxyleoligin, were first isolated from the roots of “Edelweiß”. It was shown that these two lignans might be used for the treatment of vein graft disease. However the natural concentration of leoligin and 5-Methoxyleoligin in roots of “Edelweiß” is very low (about 0,007 % in the dry mass). A possible way of increasing the concentration of leoligin and 5-Methoxyleoligin is by using transgenic hairy roots. Hairy roots, symptomatic for a plant disease caused by *Agrobacterium rhizogenes*, are biochemically and genetically stable and grow fast even on hormone free medium. By using elicitation we tried to improve the content of leoligin and 5-methoxyleoligin in hairy roots. In this diploma thesis three concentrations of a sucrose solution (5 %, 6 %, 7 %) were used as an elicitor, in order to create osmotic stress in the hairy roots. Beside that three silver nitrate solutions (15 µm, 30 µm, 60 µm) were used as well. The first step was the cultivation of hairy roots clone K8A in order to produce enough biomass for the following elicitation. It was shown that these hairy roots had an average biomass increase of 1800 %. The elicitation with 15 µm silver nitrate resulted in a 5fold increase in leoligin and 5-methoxyleoligin content when compared to the control culture. Elicitation with 6 % sucrose increased the leoligin and 5-methoxyleoligin content 10 times over the control culture. Elicitation always reduced the biomass production of hairy roots, but this disadvantage was balanced by the higher leoligin and 5-methoxyleoligin content, compared to the control culture.

All together in vitro cultures of “Edelweiß” have some major advantages compared to field culture. In vitro cultures guarantee a stable production of leoligin and 5-methoxyleoligin, they are not influenced by seasonal and enviromental factors and they benefit from the fast growth of hairy roots. Through elicitation the content of leoligin and 5-methoxyleoligin could be definitively raised when compared to a field culture.

7. Literaturverzeichnis

Ai J., Zhou B. und Jia J. (2009), The effects of NO and AgNO₃ on cell growth and salidroside synthesis in *Rhodiola sachalinensis* A.Bor. cell suspension culture, *J. Microbial. Biochem. Technol.* **1**: 11-14

Dobner M., Schwaiger S., Jennewein I.H. und Stuppner H. (2003), Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss). *J. Ethnopharmacol.* **89**: 301-303

Dobner M., Ellmerer E., Schwaiger S., Odonchimeg B., Samdan N., Stutz M. und Stuppner H. (2003), New Lignan, Benzofuran, and Sesquiterpene Derivatives from the Roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides*. *Helv. Chim. Acta.* **86**: 733–738

Dobner M., Sosa S., Schwaiger S., Altinier G., della Loggia R., Kaneider N.C. und Stuppner H. (2004), Anti-Inflammatory Activity of *Leontopodium alpinum* and its Constituents. *Planta Med.* **70**: 502-508

Duwensee K., Schwaiger S., Tancevski I., Eller K., van Eck M., Markt P., Linder T., Stanzl U., Ritsch A., Patsch J.R., Schuster D., Stuppner H., Bernhard D. und Eller P. (2011), Leoligin, the major lignan from Edelweiss, activates cholesteryl ester transfer protein, *Atherosclerosis* **219**: 109-115

Gafni Y. und Levy Y. (2005), Coniferyl Alcohol, a Lignin Precursor, Stimulates *Rhizobium rhizogenes* A4 Virulence, *Curr. Microbiol.* **50**: 262-265

Ganzera M., Greifeneder V., Schwaiger S. und Stuppner H. (2012), Chemical profiling of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Fitoterapia* **83**: 1680-1686

Grabley S. und Thiericke R. (1999), Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**: 101-154

Gössnitzer, F. (2012). Hairy roots of *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch: Establishment and HPLC analysis. Diplomarbeit, Universität Wien

Göttmann S. (2006), Einfluss von Sorte, Saatzeit und Standraum auf Blattertrag und Wirkstoffgehalt der Artischocke (*Cynara cardunculus ssp. flavescens* WIKL., Dissertation, Universität Gießen

Gorelick J. und Bernstein N. (2014), Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites, *Adv. Agron.* **124**: 201-230

Hasanloo T., Ahmadi M., Khayyan Nequei S. M. und Salehi Jouzani G. R. (2013), Elicitation effects of fungal extract on silymarin accumulation in *Silybum marianum* (L.) Gaertn hairy root culture, *Fasnamah-i Giyahan-i Daruyi* **12**: 25 -39

Hornick A., Schwaiger S., Rollinger J.M., Nguyen P.V., Prast H. und Stuppner H. (2008), Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: Brain Ach increasing and memory improving properties, *Biochem. Pharmacol.* **76**: 236-248

Hook I. (1993), *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss): In Vitro Culture, Micropropagation, and the Production of Secondary Metabolites, in Bajaj Y.P.S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Band 21, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 217–232

Hussain M., Sarfaraj F., Sheeba A., Saba; Rahman M., Akhlaquer A., Iffat Z. und Saeed M. (2012), Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *J. Pharm. BioAll. Sci.* **4**: 10-20

Kikowska M., Budzianowski J., Krawczyk A. und Thiem B. (2012), Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L., *Acta Physiol. Plant.* **34**: 2425-2433

Khalili M., Hasanloo T. und Tabar S.K.K. (2010), Ag+ enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L .) Gaertn, *Plant Omics* **3**: 109-114.

Khatodia S. und Biswas K. (2014), A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes*, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **3**: 625-633

Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. (2002), Secondary metabolism of “hairy root”- culture in bioreactors, *In Vitro Cell. Biol.- Plant* **28**: 1-10

Kubes J., Tumova L., Martin J., Vildova A., Hendrychova, H. und Sojkova K. (2014), The production of isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. cell suspension culture after abiotic stressors treatment, *Nat. Prod. Res.* **28**: 2253-2263

Lück L. (2010), Intraspezifische Variabilität und Einflüsse von Anbaumaßnahmen auf den Inhaltsstoffgehalt und Ertrag von *Solidago virgaurea* L., Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin

Lulli D., Potapovich A., Maurelli R., Dellambra E., Pressi G., Kostyuk V., dal Tosso R., de Luca C., Pastore S. und Korkina L. (2012), Anti-Inflammatory Effects of Concentrated Ethanol Extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) Callus Cultures towards Human Keratinocytes and Endothelial Cells, *Mediators Inflamm.*, Article ID 498373

Messner B., Kern J., Wiedemann D., Schwaiger S., Türkcan A., Ploner C., Trockenbacher A., Aumayr K., Bonaros N., Laufer G., Stuppner H., Untergasser G und David B. (2013), 5-Methoxyleoligin, a Lignan from Edelweiss, Stimulates CYP26B1-Dependent Angiogenesis In Vitro and Induces Arteriogenesis in Infarcted Rat Hearts In Vivo, *PLoS ONE* **8**: e58342

Meusel H. und Jäger E.J. (1992), Vergleichende Chronologie der zentraleuropäischen Flora, vol. 3, Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, New York: S. 235

Murashige T. und Skoog F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiol.* **15**: 473–497

Ondratschek, K. (2012). In vitro Kultivierung von *Leontopodium alpinum* Cass., Diplomarbeit, Universität Wien

Park S. und Kim D.I. (1993), Significance of fresh weight to dry cell weight ratio in plant cell suspension cultures, *Biotechnol. Techniques* **7**: 627-630

Park J.J., Yoon S.-J. H., Cho H.Y., Son S. J., Rhee H.S. und Park J.M. (2006), Patterns of protein expression upon adding sugar and elicitor to the

cell culture of *Eschscholtzia californica*; *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **86**: 257-269

Prisching S. (2012), Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß mit biotischen Faktoren, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Reddy C. S., Praveena Ch. und Veeresham C. (2012), Strategies to improve the production of forskolin from hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq., *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* **5**: 1720-1726

Reisinger U., Schwaiger S., Zeller I., Messner B., Stigler R., Wiedemann D., Mayr T., Seger C., Schacher T., Dirsch V., Vollmar A., Bonatti J., Stuppner H., Laufer G. und David B. (2009), Leoligin, the major lignan from Edelweiß, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts, *Cardiovasc. Res.* **82**: 542-549

Safer S., Tremetsberger K., Yan-Ping G., Kohl G., Samuel M.R., Stuessy T.F. und Stuppner H. (2011), Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data. *Bot. J. Linean Soc.* **165**: 364–377.

Schleritzko J. (2015), Untersuchungen zur biotischen Elizitierung einer transgenen Wurzelkultur des Edelweiß – *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter, Diplomarbeit, Universität Wien

Schmidtbauer K. (2013), Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß` mit abiotischen Faktoren, Diplomarbeit, Universität Wien

Shi M., Kwok K.W. und Jian Y.W. (2007), Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**: 191-196

Tumova L. und Polivkova D. (2006), Effect of AgNO₃ on the production of flavonoids by the culture of *Ononis arvensis* L. in vitro, *Ceska a Slovenska Farmacie* **55**: 186-188

Yamaner O. und Erdag B. (2013), Effects of sucrose and polyethylene glycol on hypericins content in *Hypericum adenotrichum*, *EurAsia J. BioSci.* **7**: 101-110

Zaker A., Sykora C., Gössnitzer F., Abrishamchi P., Asili J., Mousavi S. H. und Wawrosch C. (2015), Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel, *Ind. Crops Prod.* **67**: 97-102

Zhang L., Zhang X. und Sun M. (2011), Comparative analysis of the essential oils from normal and hairy roots of *Panax japonicas* C.A. Meyer, *Afr. J. Biotechnol.* **10**: 2440-2445

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefan Krumphuber
Geburtsdatum	20.09.1987
Geburtsort	Linz
Nationalität	Österreich

Schulbildung

1994-1998	Volkschule Pasching
1998-2002	Übungshauptschule der pädagogischen Akademie der Diözese Linz
2002-2006	Stiftergymnasium Linz

Studium und Berufserfahrung

seit Okt. 2007	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
März 2013 – Juli 2013	Durchführung der praktischen Arbeiten der Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie, Universität Wien