



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des  
Edelweiß mit biotischen Faktoren

Verfasserin

Stephanie Prisching

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Univ.- Prof. Mag. Dr. Bigitte Kopp

---

## Danksagung

Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp möchte ich für das interessante Thema, die persönliche Betreuung und für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die zuvorkommende Betreuung und Beratung in allfälligen Fragen während dieser Arbeit.

Für die Analysen meiner Proben, die an der Universität Innsbruck durchgeführt wurden, möchte ich mich bei Herrn Mag. pharm. Dr. Stefan Schwaiger und Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Stuppner bedanken.

Weiters möchte ich mich bei Florian Gössnitzer für seine hilfreiche Unterstützung während des praktischen Arbeitens und das nette Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium finanziell ermöglicht haben, sondern auch immer hinter mir standen und stets aufmunternde Worte bereit hatten.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinem Freund Robert bedanken, danke dass du mich immer in allem unterstützt hast, für die Geduld und die Liebe, die du für mich aufgebracht hast.

---

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>  | <b>iii</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>v</b>   |
| <b>1. Einleitung und Problemstellung</b>                                 | <b>1</b>   |
| 1.1. <i>Leontopodium alpinum</i> (Cass.) . . . . .                       | 1          |
| 1.2. Leoligin . . . . .  | 3          |
| 1.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . . . . .                           | 5          |
| 1.4. Elizitierung . . . . .  | 6          |
| 1.5. Problemstellung . . . . .   | 8          |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | <b>11</b>  |
| 2.1. Pflanzenmaterial . . . . .  | 11         |
| 2.2. Nährmedium . . . . .  | 12         |
| 2.3. Kulturbedingungen . . . . .   | 13         |
| 2.4. Elizitierung von „hairy roots“ . . . . .                            | 14         |
| 2.5. Analyse von „hairy roots“ . . . . .                                 | 16         |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>21</b>  |
| 3.1. Wachstum der „hairy roots“-Kulturen . . . . .                       | 22         |
| 3.2. Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“ . . . . . | 25         |
| 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate . . . . .         | 27         |
| 3.3.1. Einfluss von Methyljasmonat . . . . .                             | 29         |
| 3.3.2. Einfluss von Hefeextrakt . . . . .                                | 32         |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>43</b>  |

## INHALTSVERZEICHNIS

---

|                      |    |
|----------------------|----|
| 5. Zusammenfassung   | 49 |
| 6. Summary           | 51 |
| Literaturverzeichnis | 53 |

# Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| <b>B5</b>     | Nährmedium nach Gamborg et al. (1968)   |
| <b>DC</b>     | Dünnschichtchromatographie  |
| <b>EIC</b>    | Extracted Ion Chromatogramm   |
| <b>fMLP</b>   | N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin  |
| <b>HPLC</b>   | High-Performance Liquid Chromatographie   |
| <b>K30</b>    | „hairy roots“ Klonlinie K30   |
| <b>MJ</b>     | Methyljasmonat  |
| <b>MS</b>     | Nährmedium nach Murashige and Skoog (1962)  |
| <b>MS 1/2</b> | Nährmedium nach Murashige and Skoog (1962) mit halber Konzentration an Makromolekülen |
| <b>YMB</b>    | Nährmedium nach Wright et al. (1930)  |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

# 1.

## Einleitung und Problemstellung

### 1.1. *Leontopodium alpinum* (Cass.)

Die Gattung *Leontopodium* (R.Br. ex. Cassini) umfasst etwa 40 verschiedene Arten und gehört zur Familie der Asteraceae. In Europa kommen zwei verschiedene Spezies vor, *Leontopodium alpinum* (Cass.) und *Leontopodium nivale* (Safer et al. 2011). *Leontopodium alpinum* (Cass.), lautend auf den deutschen Namen Edelweiß, war ursprünglich in der mongolischen Steppe beheimatet. Erst nach dem Ende der Eiszeit besiedelte das Edelweiß Europa, hauptsächlich die Alpen, die Karpathen und die Pyrenäen (Dweck 2004). *Leontopodium* kommt aus dem Griechischen, setzt sich zusammen aus leon (= Löwe) und podion (= Füßchen) und bedeutet Löwenfüßchen. Dieser Name leitet sich von den wolligen Hochblättern der Köpfchen ab. Eine weitere Bezeichnung auch aufgrund seines Aussehens ist *Gnaphalium*, abgeleitet vom griechischen *gnaphalon* für Filz. In anderen Kulturkreisen bezeichnet man das Edelweiß als Wollblume, Stern der Alpen oder Gletscherstern (Scheidegger 2008).

Die Pflanze steht sowohl in Österreich als auch in Deutschland, Italien und Liechtenstein unter Naturschutz (Hook 1993).

Das Edelweiß ist eine mehrjährige Pflanze, deren oberirdische Teile eine große morphologische Vielfalt aufweisen und deren Wuchshöhe von 2 bis 45 cm reicht (siehe Abb.1, S.2). Der Wurzelstock ist verzweigt und besitzt fadenförmige Wurzeln (Hook 1993). Die Blattgestalt ist linear bis lanzettförmig, 3-8 mm breit, ober-

## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

---



**Abbildung 1: *Leontopodium alpinum*: Edelweiß an seinem natürlichen Standort, Privataufnahme.**

seits schwächer, unterseits dichter wollig-filzig behaart. Die Köpfchen sind 5 bis 6 mm lang und zu einer köpfigen, endständigen Trugdolde gehäuft. Die Hochblätter, die diese Trugdolde umgeben, sind dreieckig-lanzettlich, sternförmig und oberseits dicht schneeweiß behaart (Hegi 1965). Die Früchte sind stielrund, rauh, 1 mm lang und vom Grunde aus zu einem Pappus gebildet (Hegi 1965). *Leontopodium alpinum* bevorzugt kalkhaltige Böden, die steinig, lehmig, aber auch tonig sein können, vor allem aber sonnige und nicht zu trockene Standorte, sowie Felsspalten (Aichele und Schwegler 1928).

In der Volksmedizin ist *Leontopodium* weit verbreitet, bereits 1582 wurde die Verwendung bei Durchfall und Ruhr beschrieben. Weiters wird es für die Therapie von Bauchschmerzen, daher auch die völkstümliche Bezeichnung Bauchwehblume, sowie von Angina und Bronchitis eingesetzt. In Tirol beispielsweise wurde ein Tee aus den Edelweißblüten zur Behandlung von Lungenschwindsucht eingesetzt, während in der Steiermark das getrocknete Edelweiß in Milch getränkt und mit Honig und Butter bei Leibschmerzen aufgetragen wurde (Hegi 1965). In Tibet wird Edelweiß bei Erkrankungen der Lymphknoten und Metallvergiftungen eingesetzt. In der mongolischen Volksmedizin wird *Leontopodium* bei Krebserkrankungen, Durchfall, Herzerkrankungen, Hepatitis und Gelbsucht verwendet. Gyamtso und Kölliker (2007) beschreiben die Anwendung von *Leontopodium sp.* bei Moxibustion zum Beispiel zur Heilung von Erkältungskrankheiten, hierfür

wird das getrocknete Edelweiß verglüht. Diese tibetische Heilmethode wird auch zur Behandlung von Tumoren und diversen Krebserkrankungen eingesetzt.

Bemerkenswert ist, dass es trotz des Bekanntheitsgrades des Edelweiß wenig phytochemische Untersuchungen gibt, und es fehlen pharmakologische Studien (Stuppner et al. 2002).

Unlängst konnte anhand eines Versuches an Krotonöl-induzierten Ödemen von Mäuseohren eine antiinflammatorische Wirkung festgestellt werden. Dabei zeigte vor allem der mit Dichlormethan hergestellte Wurzelextrakt, aber auch der Extrakt oberirdischer Teile, eine dosisabhängige antiinflammatorische Wirkung. Die Ödemreduktionsrate der isolierten Inhaltsstoffe liegt bei 28–50 % verglichen mit dem unbehandelten Mäuseohr. Diese ist durchaus mit der des Indometacin, einem nicht steroidalen Antirheumatikum, zu vergleichen, hier konnte eine Reduktion von 59 % erreicht werden. Unter anderem wurde auch die Leukozyteninfiltration an den Ohrödemen untersucht, wobei Leoligin keine signifikante Reduktion brachte. Weitere Untersuchungen ergaben, dass hinsichtlich der fMLP- bzw. der IL-8-induzierten Chemotaxis einige Inhaltsstoffe, aber nicht Leoligin, eine Aktivität zeigten (Dobner et al. 2004).

Eine weitere Untersuchung mit humanen neutrophilen Granulozyten zeigte, dass manche Inhaltsstoffe, unter anderem Methoxyderivate von Lignanen, die Bildung von Leukotrienen hemmen, während sie keinen Einfluss auf die COX-1- bzw. COX-2-Synthese haben (Dobner et al. 2004).

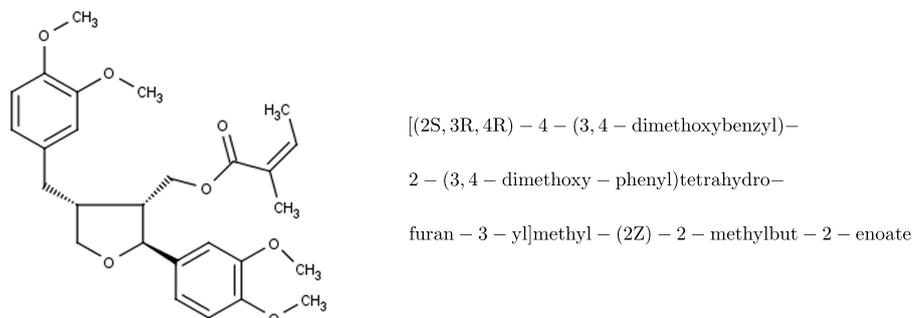
Bei den Inhaltsstoffen von *Leontopodium alpinum* handelt es sich um Phenolsäuren, Flavonoide, Chromane (Dweck 2004), Sesquiterpene (Comey et al. 1999), Lignane, Bisabolane, Benzofurane und -pyranderivate (Schwaiger et al. 2005).

## 1.2. Leoligin

Der für die vorliegende Arbeit relevante Inhaltsstoff des Edelweiß ist das Leoligin (Abb.2, S.4). Dieser sekundäre Metabolit konnte 2003 erstmals aus den Wurzeln von *Leontopodium alpinum* und *L.leontopodioides* isoliert und identifiziert werden (Dobner et al. 2003).

## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

---



**Abbildung 2: Struktur von Leoligin, linke Seite: Lignan aus *Leontopodium alpinum* Cass., rechte Seite: IUPAC-Nomenklatur.**

Wie unlängst Untersuchungen ergeben haben, erweist sich Leoligin sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe von Intimahyperplasie und Thrombose nach koronaren Bypass-Operationen als wirksam. In humanen Organkulturen der *Vena saphena* konnte gezeigt werden, dass Leoligin in Konzentrationen von 5  $\mu\text{mol}$  die Intimahyperplasie hemmt und es bei Konzentrationen von 50  $\mu\text{mol}$  zur Abnahme bereits bestehender Gefäßwandverdickungen kommt. Dies wurde anhand eines *in vivo* Versuches an Mäusen bestätigt (Reisinger et al. 2009).

Das Besondere an Leoligin im Vergleich zu anderen Medikamenten ist, dass es die Gefäßinnenwand nicht angreift. Mit Leoligin beschichtete Stents, sogenannte „drug eluting stents“, könnten möglicherweise die Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten erübrigen. Aus diesen Gründen wurden Leoligin und seine Derivate bereits 2008 zum Patent angemeldet (Stuppner und Schwaiger 2009).

In dieser Arbeit soll der Einfluss von biotischen Faktoren, insbesondere von Methyljasmonat und Hefeextrakt, auf das Wachstum von „hairy roots“ bzw. auf die Bildung des sekundären Metaboliten Leoligin untersucht werden. In der vorangegangenen Diplomarbeit von Ondratschek (2012) wurden die dafür benötigten „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß etabliert.

### 1.3. *Agrobacterium rhizogenes*

Bei *Agrobacterium rhizogenes* handelt es sich um ein gram-negatives Bodenbakterium, das die sogenannte „hairy roots-disease“ auslöst. Das Bakterium dringt in verletztes Pflanzengewebe ein, in Folge kommt es an der betroffenen Stelle zur vermehrten Wurzelbildung (Hu und Du 2006; Guillon et al. 2006). Diese „hairy roots“ bilden sogenannte Opine, die den *Agrobacterien* als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen dienen (Weising und Kahl 1992).

„Hairy roots“ sind charakterisiert durch eine hohe Wachstumsrate, genetische Stabilität und die Kultivierbarkeit in hormonfreien Medien. Das Wachstum von „hairy roots“ kann nahezu an allen Pflanzen induziert werden und in diesen „hairy roots“ sind meist dieselben sekundären Metabolite, oft sogar in höherer Konzentration als in den nicht transformierten Pflanzen, zu finden (Guillon et al. 2006; Shanks und Morgan 1999).

#### **Entstehung von „hairy roots“**

Die Verwundung des Pflanzengewebes führt zur Bildung phenolischer Stoffe, wie zum Beispiel Acetosyringon. Durch die chemotaktische Wirkung dieser Stoffe wird das *Agrobacterium* angezogen, dringt in das verletzte Gewebe ein und löst die „hairy roots-disease“ aus. Das Ri-Plasmid (= root-inducing Plasmid) des Bakteriums besitzt zwei für die Infektion wichtige Bereiche, die vir-Region (= virulence Region) und die T-DNA. Die Vir-Gene sind verantwortlich für die Codierung des Transfers der T-DNA vom Ri-Plasmid in die verletzte Pflanze. Die Transkription der vir-Gene des *Agrobacteriums* wird durch verschiedene, von der Pflanze freigesetzte, phenolischen Stoffen induziert. Die T-DNA des Ri-Plasmids wird in das Genom der verletzten Pflanze integriert. In Folge bildet die genetisch veränderte Pflanzenzelle transformierte Wurzeln aus, die sogenannten „hairy roots“ (Georgiev et al. 2007; Giri und Narasu 2000).

Zur Herstellung der „hairy roots“ werden zum Beispiel Blattnerve der Pflanzen mithilfe eines Skalpell verletzt und mit *Agrobacterium rhizogenes* infiziert. In der Folge kommt es an der Infektionsstelle zur Bildung der „hairy roots“, diese werden dann in flüssigem oder auf festem Medium kultiviert (Guillon et al. 2006).

### 1.4. Elizitierung

Pflanzen bilden eine Vielzahl an Naturstoffen und sekundären Metaboliten. Viele dieser Stoffe werden während des Wachstums oder der Entwicklung produziert. Außerdem können diese Sekundärstoffe als Reaktion auf Stress oder durch einen Abwehrmechanismus auf pathogene Stoffe gebildet werden (Chen et al. 2001). Unter Elizitierung versteht man, dass ein Pflanzenmaterial, das bestimmten Substanzen ausgesetzt wird, irgendeine Art von Abwehrreaktion hervorrufen kann (Angelova et al. 2006).

Elizitoren werden anhand ihrer Herkunft bzw. ihrer molekularen Struktur unterschieden. Aufgrund ihrer Charakteristika kann es zu unterschiedlichen Reaktionen kommen, abhängig von den Interaktionen zwischen Pflanze und Elizitor. Eine Möglichkeit, Elizitoren zu klassifizieren, ist eine Unterteilung in biotische und abiotische Faktoren.

Biotische – oftmals auch als endogen bezeichnete – Elizitoren haben biologischen Ursprung und stammen entweder vom Erreger oder von der Pflanze selbst. Biotische Faktoren können eine definierte chemische Struktur besitzen, wie Pektin, Alginat oder Chitosan. Andererseits kann es sich um komplexe Stoffgemische handeln, deren Struktur nicht eindeutig zuordenbar ist, wie zum Beispiel Hefeextrakte oder Pilzsporen. Im Gegensatz dazu sind die abiotischen Faktoren nicht biologischen Ursprungs und werden in physikalische oder chemische Substanzen, zum Beispiel Schwermetallsalze, unterteilt. Unter den physikalischen Einflussfaktoren versteht man, dass die Pflanze zum Beispiel erhöhtem osmotischen Stress oder erhöhter thermischer Belastung ausgesetzt ist (Vasconsuelo und Boland 2007).

In dieser Arbeit soll der Einfluss von biotischen Faktoren, insbesondere von Methyljasmonat und Hefeextrakt, auf das Wachstum von „hairy roots“ bzw. auf die Bildung des sekundären Metaboliten Leoligin untersucht werden. Deshalb soll im Folgenden näher auf, in der Literatur beschriebene, Versuche mit Methyljasmonat und Hefeextrakt eingegangen werden.

Der biotische Elizitor Methyljasmonat, ein ubiquitär verbreiteter Inhaltsstoff in Pflanzen, stimuliert die Bildung sekundärer Metaboliten in *Artemisia annua*. Putalun et al. (2007) setzten den „hairy roots“-Kulturen Methyljasmonat in einer

Konzentration von 50  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$  und 200  $\mu\text{mol}$  zu, wobei mit 200  $\mu\text{mol}$  der größte Effekt erzielt werden konnte. Die gemessene Artemisininkonzentration war fünfmal höher als in der Kontrollprobe.

In dieser Untersuchung wurde auch mit einem Hefeextrakt elizitiert, der in einer Konzentration von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml zugegeben wurde. Auch hier konnte der größte Effekt mit der höchsten Konzentration von 2 mg/ml erzielt werden (Putalun et al. 2007).

Eine andere Untersuchung, die in der Literatur beschrieben wird (Stojakowska et al. 2002), beschäftigt sich mit *Tanacetum parthenium*, dem Mutterkraut, einer Asteraceae. Hierbei wurde der Effekt von Methyljasmonat auf die im Mutterkraut enthaltenen Diacetylene vom Spiroketalenol Ether-Typ untersucht. Dabei wurde Methyljasmonat in einer Konzentration von 0,3 mmol zugesetzt, wobei kein signifikanter Effekt auf das „hairy roots“ Wachstum zu erkennen war, während die Bildung der Diacetylene zunahm (Stojakowska et al. 2002).

Mit dem Elizitor Hefeextrakt konnte in „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* Bunge die Bildung sekundärer Metaboliten angeregt werden. Bei dieser Pflanze handelt es sich um eine Lamiaceae, die in der traditionell chinesischen Medizin Anwendung in der Behandlung von koronaren Herzerkrankungen findet (Liang et al. 2012). Hierfür wurde der Hefeextrakt nach Hahn und Albersheim (1978) aufgereinigt und anschließend in vier unterschiedlichen Konzentrationen den Pflanzenkulturen zugesetzt. Alle Konzentrationen von 0,1; 0,25; 0,5 und 1 ml führten zur Biomassezunahme, die sieben Tage nach der Elizitorzugabe erkennbar war. Weiters führte die Zugabe des Elizitors zur gesteigerten Bildung von Rosmarinsäure und Tanshinonen, den zwei wichtigsten biologisch aktiven Komponenten in *Salvia miltiorrhiza* (Chen et al. 2001).

Methyljasmonat wurde den „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* in Konzentrationen von 50, 100 und 150  $\mu\text{mol}$  zugesetzt. Das Wachstum und die Bildung der Tanshinone, vor allem der Kryptotanshinone, konnte signifikant durch die mittlere Konzentration beeinflusst werden, während bei der geringsten Konzentration kein Effekt erkennbar war (Liang et al. 2012).

Der molekulare Mechanismus der Elizitierung beruht auf einer Elizitor-Rezeptor-Interaktion. Der Elizitor bindet an einen Plasmamembranrezeptor, einen G-Protein

## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

---

gekoppelten Rezeptor, der in weiterer Folge Ionenkanäle und Proteinkinasen aktiviert (Angelova et al. 2006).

Die Effektivität der Elizitierung hängt unter anderem von den Interaktionen zwischen Elizitor und Pflanzenkultur ab. Ein weiterer Faktor scheint die Konzentration, in der der Elizitor eingesetzt wird, zu sein. Die Konzentration sollte so gewählt werden, dass die gewünschten Metaboliten gebildet werden, das Pflanzenmaterial in ihrem Wachstum aber nicht beeinträchtigt wird. Weiters scheint der Zeitpunkt der Elizitorzugabe eine wesentliche Rolle zu spielen, wobei als bestmöglicher Zeitpunkt die exponentielle Wachstumsphase erachtet wird (Vasconsuelo und Boland 2007).

### 1.5. Problemstellung

Bei dem eingangs beschriebenen Inhaltsstoff Leoligin handelt es sich um eine sehr vielversprechende Substanz bezüglich der Therapie und Prophylaxe koronarer Herzerkrankungen. Das Edelweiß steht unter Naturschutz und kann daher nicht aus Wildbeständen bezogen werden, sondern wird aus Samen gezogen (Comey et al. 1997).

Das Lignan Leoligin ist in den Wurzeln des Edelweiß in nur sehr geringer Konzentration enthalten. Durch Extraktion mit Dichlormethan und Methanol konnten aus etwa 800 g der getrockneten Wurzel 40 mg Reinsubstanz gewonnen werden (Dobner et al. 2003).

Wie bereits beschrieben, besitzen „hairy roots“ meist eine höhere Wachstumsrate als normale Wurzelkulturen. Deshalb ist es denkbar, dass man durch Induktion der „hairy roots-disease“ größere Mengen an Leoligin in kürzerer Zeit produzieren kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der sekundäre Metabolit Leoligin in den „hairy roots“-Kulturen von *Leontopodium alpinum* enthalten ist und wenn ja, in welcher Konzentration er gebildet wird.

Einige Klonlinien, die von Ondratschek (2012) zur Verfügung gestellt wurden, sollten zunächst weiter vermehrt werden. In weiterer Folge sollte geklärt werden, ob die transformierten Wurzeln den sekundären Metaboliten bilden und ob dieser in das Medium abgegeben wird.

## 1.5. Problemstellung

---

Nach Klärung der Frage, ob Leoligin in den „hairy roots“-Kulturen enthalten ist, sollte die Auswirkung biotischer Elizitoren auf das Inhaltsstoffspektrum untersucht werden. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.4., S.6) können verschiedene Elizitoren die Bildung von sekundären Metaboliten in Pflanzen anregen.

## **1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG**

---

## 2.

# Material und Methoden

### 2.1. Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde mit „hairy roots“-Klonlinien von *Leontopodium alpinum* (Cass.) gearbeitet. Diese Klonlinien wurden von Ondratschek (2012) im Rahmen ihrer Diplomarbeit etabliert und uns in weiterer Folge zur Verfügung gestellt. Bei den zur Infektion eingesetzten *Agrobacterium rhizogenes* Stämmen handelte es sich um ATCC15834, LBA9402 und TR105.

Abbildung 3 (siehe S.12) zeigt die Größe und das Aussehen der von Ondratschek übernommenen „hairy roots“-Kulturen zu Beginn dieser Arbeit. Zunächst bestand die Aufgabe darin, die übernommenen 32 Klonlinien aufzuvermehren. Hierfür wurden die erhaltenen Klonlinien alle 4 Wochen in ein neues Nährmedium überimpft. Im Zuge dieser Passagierung wurden abgestorbene „hairy roots“ und etwaiges Kallusgewebe vorsichtig entfernt. Nachdem die „hairy roots“ eine gewisse Größe erreicht hatten, wurden diese geteilt und in frisches Medium übergeführt. Das Wachstum der „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß entsprach nicht den Erwartungen, daher mussten die „hairy roots“ einige Male in 100 ml-Kolben übergeführt werden bevor diese aufgeteilt und in 250 ml-Kolben überimpft werden konnten. Weiters wurde das Wachstum durch auftretende Infektionen beeinflusst, weshalb betroffene Kulturen 3 Wochen mit Antibiotika behandelt werden mussten. Schlussendlich wurde aus den 32 „hairy roots“ Klonlinien jener Klon ausgesucht, der das beste Wachstum zeigte. Diese, in weiterer Folge als K30 be-

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

zeichnete Klonlinie, wurde durch Infektion mit dem *Agrobacterium rhizogenes* Stamm LBA9402 generiert.

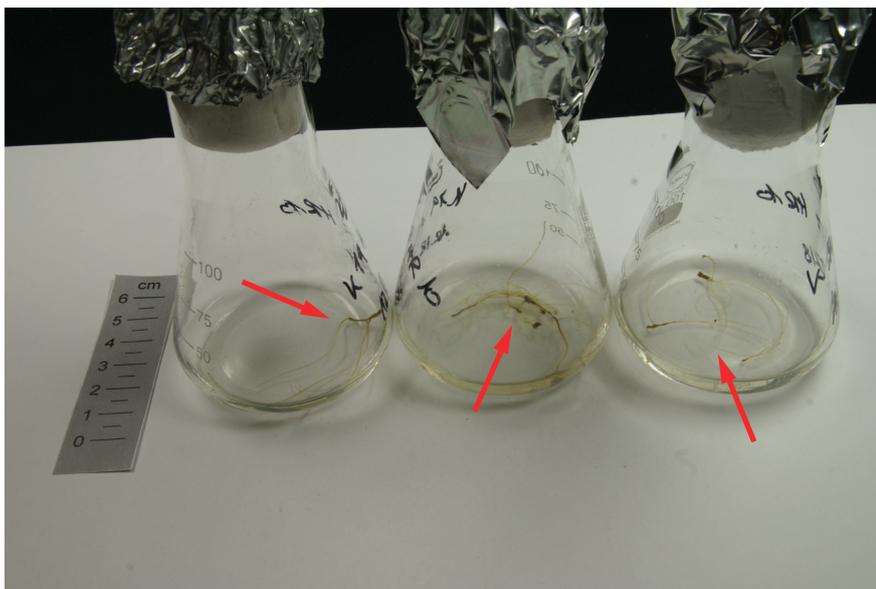


Abbildung 3: Eine „hairy roots“-Klonlinie in den Medien MS 1/2, B5 und MS zu Beginn dieser Arbeit.

### Wurzelmaterial

Bei den, am Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck, durchgeführten chemischen Analysen wurden der Gehalt und die Inhaltsstoffe der „hairy roots“-Klonlinie K30 mit jenen von Wurzeln aus *Leontopodium alpinum* verglichen. Bei den Wurzeln handelte es sich um zwei Edelweiß-Kultivare, Klon 9 und Klon 44, die aus Feldanbau des Schweizer Institutes Mediplant stammten.

## 2.2. Nährmedium

In der vorliegenden Arbeit wurden die 32 „hairy roots“ Klonlinien zunächst in drei verschiedenen Medien kultiviert.

## 2.3. Kulturbedingungen

---

Als Basismedium diente das MS-Medium nach (Murashige und Skoog 1962). Dieses Nährmedium enthält anorganische Makro- und Mikroelemente, 3% Saccharose und Vitamine. Als flüssige Nährmedien wurden MS und MS 1/2, mit einer Saccharosekonzentration von 1% und halber Konzentration an Makroelementen, verwendet. Weiters wurde das Medium B5 von Gamborg et al. (1968) verwendet, das sich von den beiden anderen durch eine höhere Stickstoffkonzentration unterscheidet. Im Verlauf der Kultivierung schränkte sich die Verwendung auf das Medium MS ein, da hier das beste Wachstum zu erkennen war.

Die Nährmedien wurden folgendermaßen zubereitet: Ein Drittel des benötigten destillierten Wassers wurde in einem geeigneten Erlenmeyerkolben vorgelegt. Anschließend wurden unter Rühren Stammlösungen (im üblichen Reinheitsgrad, bei 4 °C) der Makro- und Mikroelemente, sowie der Vitamine in entsprechender Menge zugesetzt. Als nächstes wurde myo-Inositol und handelsüblicher Zucker zugesetzt und gelöst. Zuletzt wurde mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Volumen aufgefüllt und mit HCl oder KOH auf einen pH-Wert von  $5,75 \pm 0,1$  eingestellt.

Die fertig zubereiteten Medien wurden anschließend in 100 ml, später in 250 ml-Kolben gefüllt, mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und einer Alukappe umhüllt. Die verschlossenen Medien wurden im Autoklaven bei 121 °C für 20 min. sterilisiert. Die abgekühlten Medien wurden in der Kühlkammer bei 5 °C im Dunkeln gelagert.

## 2.3. Kulturbedingungen

Die „hairy roots“ Klonlinien wurden zunächst mehrere Male in 100 ml-Kolben mit 25 ml Nährmedium passagiert. Aufgrund des Massezuwachses konnten die Kulturen später in 250 ml-Kolben mit 50 ml Medium überimpft werden. Die Passagierung der „hairy roots“ erfolgte alle 4 Wochen. Die Kultivierung erfolgte am Rotationsschüttler bei ca. 85 Umdrehungen pro Minute, einer Temperatur von 25 °C und bei Dunkelheit.

Nachdem einige der übernommenen Kulturen eine Trübung aufzeigten (siehe Abb.4, S.14), lag die Vermutung nahe, dass es sich um, die ursprünglich zur Infektion eingesetzten, *Agrobacterium rhizogenes* Stämme handelte. Zur Bestätigung

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

dieser Annahme wurden mit Impfösen Stichproben der betroffenen Kulturen genommen. Diese wurde auf festem YMB Medium, das dem Bakterien als Nährmedium dient, in einer Petrischale ausgestrichen und bei 25 °C für 2 Tage im Dunkeln inkubiert. Nach diesen Tagen war ein eindeutiges Wachstum von Bakterien zu erkennen.

Aus diesem Grund war es notwendig, die „hairy roots“-Kulturen einer Behandlung mit Antibiotika zu unterziehen. Hierfür wurde eine Stammlösung, bestehend aus 0,625 g in 5 ml destilliertem Wasser, des Antibiotikums Cefotaxim-Na (Claforan 1,0 g Trockenstechampullen, Sanofi Aventis) hergestellt. Von dieser zuvor steril filtrierten Stammlösung wurden 100 µl in 25 ml bzw. 200 µl in 50 ml frisches Nährmedium pipettiert. Einige Kulturen zeigten bereits wenige Tage nach der Antibiotikazugabe eine erneute Trübung, diese wurden abermals in ein neues antibiotikahältiges Medium passagiert. Die Antibiotikabehandlung dauerte 3 Wochen an, danach wurden jene Kulturen, die optisch betrachtet frei von Bakterien waren in antibiotikafreies Medium überimpft.



Abbildung 4: Infektion von „hairy roots“-Kulturen durch ursprünglich zur Transformation eingesetztes *Agrobacterium rhizogenes*.

### 2.4. Elizitierung von „hairy roots“

Nachdem genügend Pflanzenmaterial aufvermehrt worden war, wurden die entsprechenden Elizitoren zugegeben.

## 2.4. Elizitierung von „hairy roots“

---

In der folgenden Arbeit sollten Versuche mit den biotischen Elizitoren Methyljasmonat (Sigma Aldrich, 95 %) und Hefeextrakt (Sigma Aldrich) durchgeführt werden.

Die „hairy roots“-Kulturen wurden zunächst mit einem Animpfgewicht von 0,7 g für 3 Wochen in normales Nährmedium passagiert. Danach konnten die Elizitoren in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt werden. Nach einer weiteren Woche wurde die Versuchsreihe beendet und die Edelweißwurzeln aus dem Nährmedium genommen. Danach wurden diese mit Filterpapier mehrmals abgetupft und das Frischgewicht bestimmt. Nachdem die geernteten Kulturen für 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet worden waren, konnte das Trockengewicht bestimmt werden.

### **Methyljasmonat**

Nach drei Wochen Kultivierung in normalem MS-Medium wurde Methyljasmonat in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$  und 200  $\mu\text{mol}$  zugesetzt. Hierfür wurden entsprechende Stammlösungen von Methyljasmonat in Ethanol (96 %) hergestellt.

Um festzustellen, ob das Lösungsmittel, in diesem Falle Ethanol, einen Einfluss auf die Biomasse oder die Leoliginproduktion hat, wurde eine Kontrolle mit 125  $\mu\text{l}$  Ethanol (96 %) durchgeführt.

Die Stammlösungen von Methyljasmonat wurden vor der Zugabe zu den „hairy roots“-Kulturen durch einen Filter (Porenweite 0,22  $\mu\text{m}$ ) steril filtriert.

### **Hefeextrakt**

Für diese Versuchsreihe wurde der Hefeextrakt zunächst nach Hahn und Albersheim (1978) aufgearbeitet. Aus dieser aufgereinigten Hefelösung wurden 200  $\mu\text{mol}$ , 400  $\mu\text{mol}$  oder 1000  $\mu\text{mol}$  entnommen und zu den Edelweiß-Kulturen pipettiert, sodass sich eine Endkonzentration von 1 g/l, 2 g/l oder 5 g/l ergab.

#### Hefevorreinigung nach Hahn und Albersheim (1978)

Schritt 1: 50 g eines handelsüblichen Hefeextraktes wurden in 250 g destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Nachdem sich der Hefeextrakt vollständig aufgelöst hatte, wurde 96 proz. Ethanol hinzugefügt, sodass sich eine Endkonzentration von

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

80 % (v/v) ergab. Anschließend wurde diese Lösung mit einer Alufolie abgedeckt und bei 6 °C für 4 Tage gelagert.

Schritt 2: Nach diesen 4 Tagen wurde der Überstand abdekantiert und verworfen. Der gummiartige Rückstand wurde erneut in 250 g destilliertem Wasser gelöst und der Vorgang von Schritt 1 wiederholt.

Schritt 3: Der Überstand wurde erneut abdekantiert und verworfen. Anschließend wurde der Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst.

Vor der Zugabe dieses gereinigten Hefeextraktes zu den „hairy roots“-Kulturen wurde dieser bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

### Referenzmaterial

Als Referenzmaterial dienten die „hairy roots“-Kulturen K30. Diese wurden mit einem Animpfgewicht von 0,6 g für 4 Wochen in MS-Medium kultiviert. Nach diesen 4 Wochen wurden sie geerntet, mit Filterpapier abgetupft und für 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Elizitierung wurde ein höheres Animpfgewicht (0,7 g anstatt der üblichen 0,6 g) gewählt, da möglicherweise der Elizitor das Wachstum beeinflusst (Zhang et al. 2004). Somit wurde sichergestellt, dass am Ende der Versuchsreihe ausreichend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand.

## 2.5. Analyse von „hairy roots“

Eine erste Analyse sollte klären, ob das Lignan Leoligin in den „hairy roots“ des Edelweiß gebildet wird. Weiters wurden die Inhaltsstoffe eines normalen Wurzelmaterials mit den von „hairy roots“-Kulturen verglichen. Für diese Untersuchung wurde ein Dichlormethanextrakt hergestellt und mittels HPLC analysiert.

Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Stefan Schwai-ger am Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck durchgeführt.

### Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Etwa 1 g der getrockneten „hairy roots“ von Klone K30 wurden mittels Mörser und Pistill verrieben und in 50,00 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde

## 2.5. Analyse von „hairy roots“

---

die Mischung für 5 Minuten im Ultraschallbad extrahiert, filtriert und getrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in Methanol gelöst, durch einen Wattestopfen filtriert und analysiert. Die Konzentration dieser Lösung betrug am Ende 10 mg/ml Extrakt.

Als Vergleichsprobe wurde ein tiefgefrorener Dichlormethanextrakt von Wurzeln des *L. alpinum* herangezogen („Edelweiss-Referenz“). Dieser Extrakt wurde durch erschöpfende Mazeration gewonnen. Bei dem verwendeten Pflanzenmaterial handelte es sich um Kultivare der Universität Innsbruck. Der erhaltene Extrakt wurde ebenso aufbereitet wie die „hairy roots“-Probe.

Beide Lösungen wurden mittels DC und HPLC-MS untersucht.

### Aufarbeitung des Nährmediums

Das Nährmedium wurde nach Entnahme der „hairy roots“ entsprechend aufgearbeitet. Zunächst entfernten wir aus dem Nährmedium durch Filtration verbliebene „hairy roots“-Reste. Anschließend schüttelten wir das Medium mit je 20 ml Dichlormethan dreimal aus. Da es zu keiner optimalen Auftrennung der Phasen gekommen war, wurde nach jedem Ausschüttelungsvorgang für 5 min. bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Die so erhaltene organische Dichlormethanphase wurde abdekantiert und in einem Erlenmeyerkolben gesammelt. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend durch Filtration wieder entfernt. Den erhaltenen Rückstand haben wir für die Analyse in 1 ml Methanol gelöst.

### LC-Parameter

Das verwendete HP 1100 System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) war mit einem Autosampler, DAD (Diodenarray-Detektor) und Säulenthermostat ausgestattet.

- Stationäre Phase: Phenomenex Luna 3 $\mu$  C8 (2) Säule, 3 $\mu$ mol Partikel mit einer Vorsäule: LiChroCART 4-4, LiChrospher 100 RP 18 5 $\mu$ mol
- Mobile Phase: A= Wasser, B= Acetonitril  
Zusammensetzung: 0 min: A 50 %, B 50 %; 20 min: A 25 %, B 75 %; 30 min: A 1 %, B 99 %; 55 min: Stopp; Posttime: 15 min.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

- Temperatur: 30 °C
- Injektionsvolumen: 5 µmol
- Flussrate: 0,20 ml/min
- Detektion bei einer Wellenlänge von 205 nm

### MS-Parameter

Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland); ESI, LC-MS: alternating mode; HV Kapillare: 4,00 kV, HV end plate offset:- 500 V, 350 °C; Trockengas: 8,00 l/min; Nebulisator: 30 psi; Full Scan Modus: m/z 100-1500

### DC-Parameter

- Stationäre Phase: Silica-Gel 60 F254 Platten (VWR Darmstadt, Deutschland)
- Mobile Phase: Dichlormethan
- Detektion bei UV 254 – 366 nm, nach Besprühen mit Vanillinschwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 120 °C für 5 min. im vis-Bereich

### Quantitative Analyse

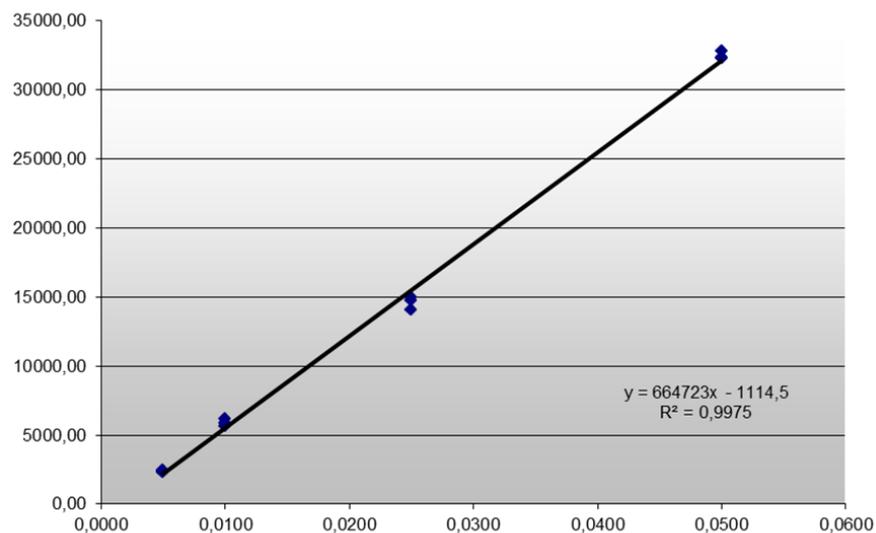
Sämtliche Untersuchungen wurden am Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck durchgeführt, wofür wir Herrn Dr. Stefan Schwaiger zu Dank verpflichtet sind.

Für die Quantifizierung des Leoligins und seiner Derivate wurde das Versuchsmaterial wie folgt aufgearbeitet und untersucht: Die getrockneten „hairy roots“ Proben wurden zerkleinert. 100 mg Probe wurden mit 20 ml gefolgt von 2x 10 ml Dichlormethan am Ultraschallbad extrahiert (10 min). Anschließend wurden die vereinigten Filtrate am Rotavapor zur Trockene eingedampft, in 1 ml Methanol gelöst und mittels HPLC analysiert.

### HPLC-Parameter

- Stationäre Phase: Phenomenex- Luna 3 $\mu$  C8 (2) 100 A 3,00 x 150 mm mit einer Merck LiChroCart 4-4, LiChrosper 100 RP- 18, 5  $\mu$ mol Vorsäule
- Temperatur: 30 °C
- Injektionsvolumen: 10  $\mu$ l
- Flussrate: 0,30 ml/min
- Detektion: UV 205 nm
- Mobile Phase: A= Wasser, B= Acetonitril  
Zusammensetzung 0 min: A: 50 %, B: 50 %; 45 min: A: 50 %, B: 50 %; 50 min: A: 1 %, B:99 %; Stopp: 80 min; Posttime: 15 min

Die Quantifizierung der erhaltenen Leoliginmenge erfolgte nach der Methode des externen Standards (siehe Abb. 5).



**Abbildung 5: Kalibrierungskurve zur HPLC-Quantifizierung des Leoligin (die zugrundeliegenden Daten sind am Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck hinterlegt).**

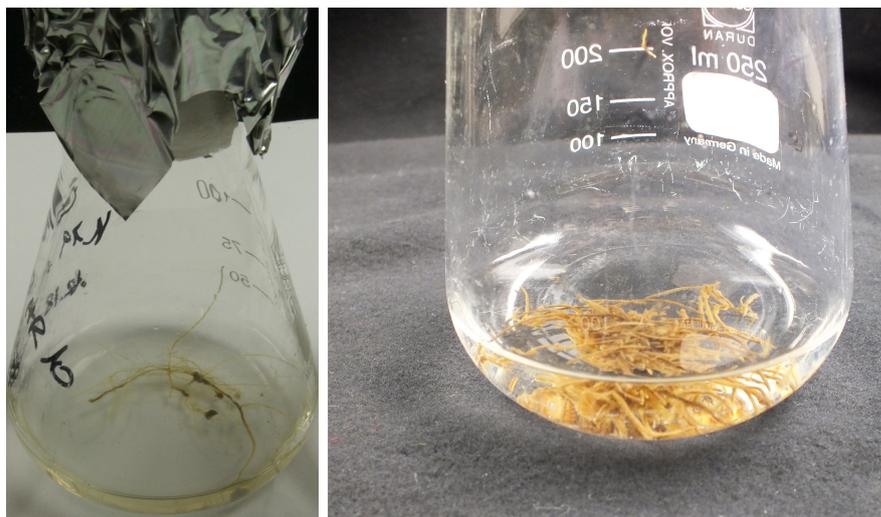
## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.

## Ergebnisse

Die von Ondratschek (2012) erhaltenen 32 „hairy roots“ Klonlinien wurden zunächst in allen drei flüssigen Nährmedien MS, MS 1/2 und B5 (siehe Kapitel 2.2., S. 12) kultiviert. Die folgende Abbildung 6 zeigt Größe und Aussehen unbehandelter „hairy roots“-Kulturen. Zu Beginn dieser Arbeit waren diese nur wenige Zentimeter groß. Das rechte Bild zeigt die „hairy roots“ vier Wochen nach Passagierung in frisches MS-Medium.



**Abbildung 6: Größe und Aussehen von „hairy roots“-Kulturen zu Beginn der Arbeit (links) bzw. vier Wochen nach Transfer in frisches Nährmedium (rechts).**

### 3. ERGEBNISSE

---

Nachdem jene „hairy roots“, die auf MS-Medium passagiert wurden, das beste Wachstum bzw. die beste Lebendrate zeigten, wurde dieses Medium für die weitere Kultivierung herangezogen.

Für die erste Kontrollanalyse, in der untersucht werden sollte, ob Leoligin in den „hairy roots“-Kulturen des *Leontopodium alpinum* enthalten ist, wurden 30 g Frischgewicht bzw. 3 g Trockengewicht der „hairy roots“ benötigt. Um abschätzen zu können, mit welchem Animpfgewicht welches Endgewicht erhalten wird bzw. wieviel Pflanzenmaterial für die Elizitierung benötigt wird, bestimmten wir den durchschnittliche Biomassezuwachs.

#### 3.1. Wachstum der „hairy roots“-Kulturen

Die „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* wurden alle 4 Wochen mit einem Animpfgewicht von 0,6 g pro Erlenmeyerkolben in frisches MS-Medium passagiert. Nach diesen 4 Wochen wurden das Frischgewicht und der Zuwachs der „hairy roots“ bestimmt. Aus den erhaltenen Werten konnte ein durchschnittlicher Zuwachs von 537 % verzeichnet werden. Aus diesen „hairy roots“ wurden durch Teilung weitere Subkulturen generiert. Diese Subkulturen wurden ebenfalls mit einem Animpfgewicht von 0,6 g pro Erlenmeyerkolben für 4 Wochen kultiviert. Nach diesen 4 Wochen wurde noch einmal das Frischgewicht ermittelt und wieder aufgeteilt, insgesamt wurden die „hairy roots“ dreimal aufgeteilt nach 4, 8 und 12 Wochen. Bei der Subkultur 2 lag der prozentuelle Zuwachs bei etwa 195 %, während der Massezuwachs bei Subkultur 3 bei 98 % lag.

Die Grafik 7 (siehe S.23) verdeutlicht, dass der durchschnittliche Biomassezuwachs bei der Subkultur 1 am größten war, während der Massezuwachs bei Subkultur 2 und auch bei 3 geringer war. Eine mögliche Erklärung für diesen abnehmenden Trend sind die unterschiedlichen Kulturgefäße bzw. Flüssigkeitsvolumina im Laufe der Kultivierung. So wurden die „hairy roots“-Kulturen anfangs in 100 ml-Kolben kultiviert, aufgrund des Massezuwachses konnten sie in 250 ml-Kolben überführt werden. Im Zuge dessen änderte sich auch die Menge des Nährmedium von 25 ml auf 50 ml. Möglicherweise könnte der veränderte Gas-

### 3.1. Wachstum der „hairy roots“-Kulturen

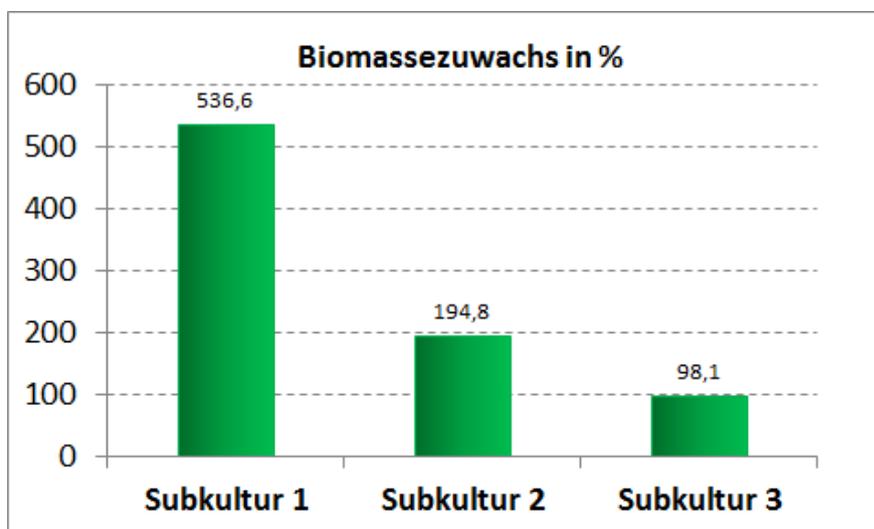


Abbildung 7: Biomassezuwachs von „hairy roots“ Klonlinie K30 nach 4, 8 bzw. 12 Wochen in MS Medium.

raum bzw. die unterschiedliche Menge an Nährmedium das Wachstum der „hairy roots“ beeinträchtigt haben.

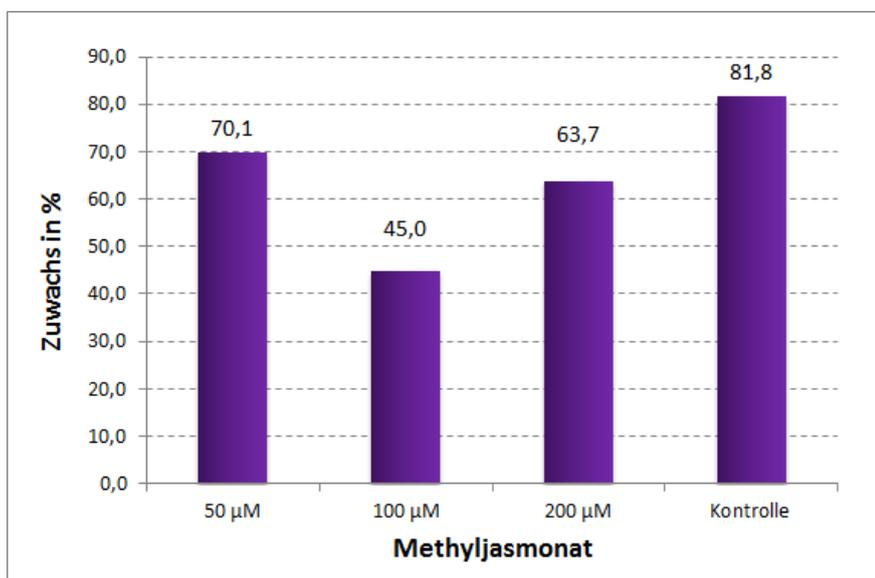
Weiters musste vorübergehend aus technischen Gründen der Standort des Rotationschüttler gewechselt werden. Auch dies könnte ein möglicher Einflussfaktor gewesen sein, der sich auf das Wachstum der „hairy roots“ ausgewirkt hat.

Zur Beurteilung des Einflusses bestimmter biotischer Elizitoren auf das Wachstum von „hairy roots“-Kulturen wurde das Animpfgewicht (ca. 0,7 g), das Frischgewicht und das Trockengewicht bestimmt.

Abbildung 8 (siehe S.24) soll den Einfluss von Methyljasmonat bzw. einer Kontrollprobe auf den Biomassezuwachs grafisch darstellen. In dieser Versuchsreihe wurden nach 3 Wochen Etablierung in MS-Medium 50  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$  bzw. 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat zugesetzt. Nach einer Woche Behandlung mit diesem Elizitor wurde das Frisch- und das Trockengewicht bestimmt sowie der prozentuelle Zuwachs ermittelt. Weiters wurde eine Kontrollreihe mit 125  $\mu\text{mol}$  96 proz. Ethanol durchgeführt. Diese Abbildung veranschaulicht, dass der Zuwachs der „hairy roots“-Kulturen am höchsten bei der Behandlung mit 125  $\mu\text{mol}$  96 proz. Ethanol war. Bei der Behandlung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat kam es zu einer Zunahme von ca. 71%. Bei der Zugabe von 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat ließ sich

### 3. ERGEBNISSE

---



**Abbildung 8: Biomassezuwachs nach Elizitierung mit Methyljasmonat; Kontrolle: 125 µl Ethanol (96 %).**

ein Wachstum von 64 % verzeichnen, hingegen betrug der prozentuelle Zuwachs bei Behandlung mit 100 µmol Methyljasmonat nur noch 45 %.

Weiters wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Hefeextraktes auf das Wachstum von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß untersucht. Bei dieser Versuchsreihe wurde ein zuvor nach Hahn und Albersheim aufgereinigter Hefeextrakt den „hairy roots“-Kulturen in einer Konzentration von 1 g/l, 2 g/l bzw. 5 g/l zugesetzt.

Die Abbildung 9 (siehe S.25) soll den Einfluss unterschiedlicher Hefekonzentrationen auf das Wachstum von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß bzw. unbehandelte „hairy roots“ K30 grafisch darstellen.

Diese grafische Darstellung zeigt, dass der Biomassezuwachs bei jenen „hairy roots“ die nicht eliziert wurden höher war als nach Zugabe unterschiedlicher Hefekonzentrationen. Der Massezuwachs lag bei 103 % während nach Zugabe von 1, 2 bzw. 5 g/l Hefe der Massezuwachs abgenommen hatte.

Die beiden Grafiken 8 und 9 veranschaulichen, dass jene „hairy roots“, die mit Hefeextrakt behandelt worden waren, einen etwas höheren Biomassezuwachs aufwiesen als jene, die mit Methyljasmonat eliziert worden sind.

### 3.2. Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“

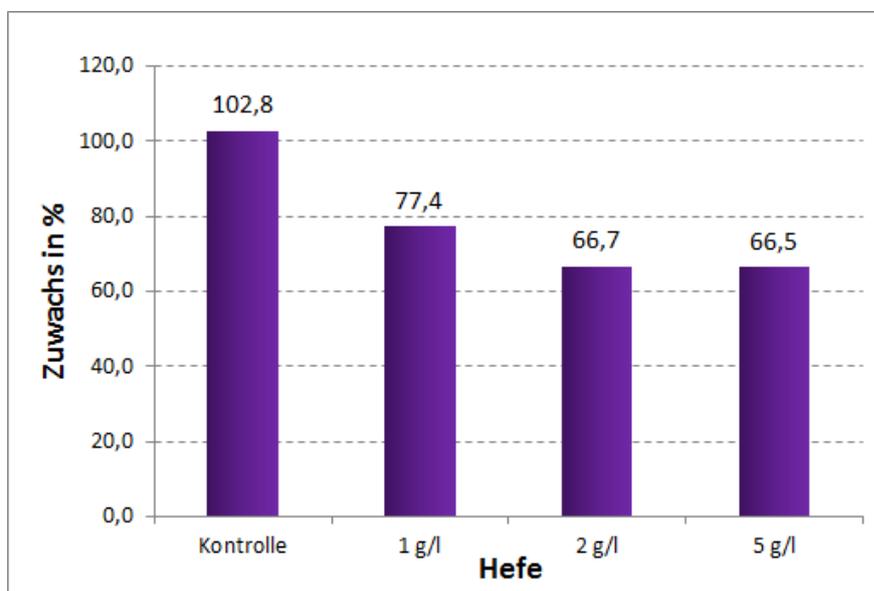


Abbildung 9: Biomassezuwachs nach Elizitierung mit Hefeextrakt; Kontrolle: nicht elizitiert.

### 3.2. Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“

Die im folgenden beschriebenen DC- und HPLC-Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Schwaiger, Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck durchgeführt.

Die DC-Untersuchung (siehe Abb.10, S.26) des Extraktes von K30 zeigte, dass die im Referenzextrakt enthaltenen pinken und blauen Banden (Bild Mitte, rechte Bahn) nur in einer geringen Konzentration enthalten waren bzw. fehlten. Allerdings zeigte der Extrakt von K30 eine grau-blaue Zone mit einem  $hR_f$ -Wert von 78.6 (Bild rechts, linke Bahn). Da die Bande keine Löschung bzw. Fluoreszenz zeigt, handelt es sich, sofern sie nicht von einer Verunreinigung stammt, möglicherweise um eine terpene Struktur.

Die Ergebnisse der HPLC-Analysen des Wurzelextraktes und des Extraktes von Klon K30 unterschieden sich wie folgt: Die Komponenten 1-3 (Abb.11 Bild A,

### 3. ERGEBNISSE

---

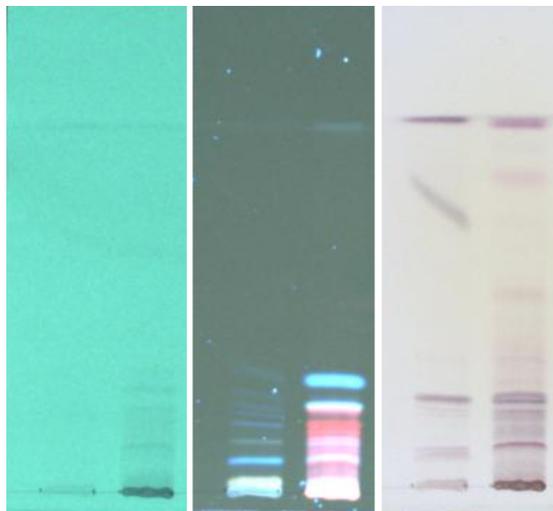


Abbildung 10: Dünnschichtchromatogramme von *Leontopodium alpinum*-Extrakten; linke Bahn: „hairy roots“-Klon K30, rechte Bahn: Edelweiss-Referenz siehe S.17. Detektion: UV 254 nm (links), UV 366 nm (Mitte), Vanillin- Schwefelsäurereagenz (rechts).

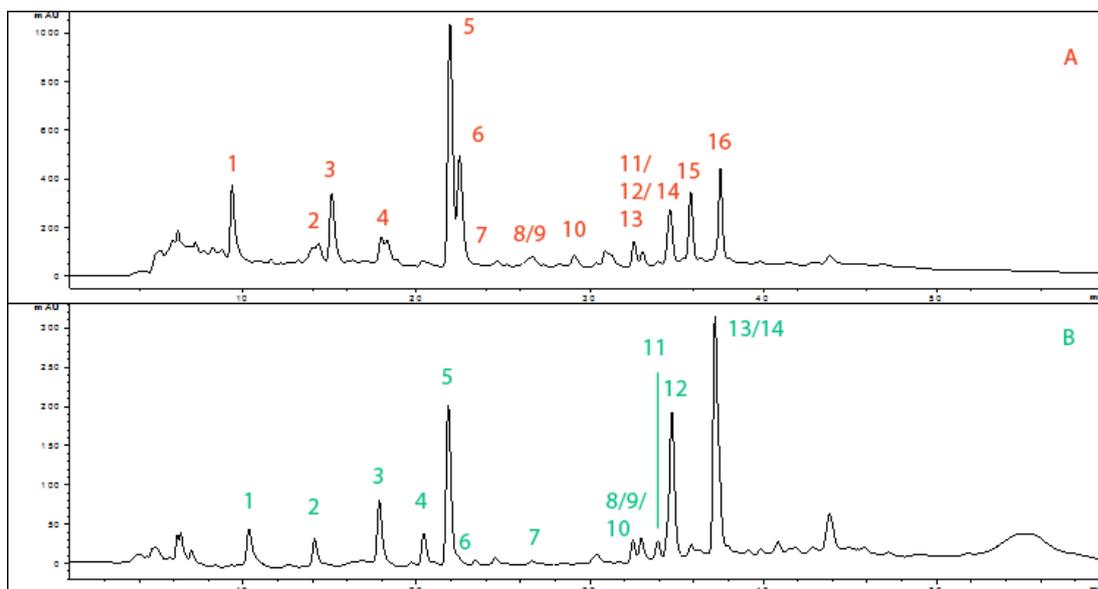


Abbildung 11: Chromatogramme der HPLC Analyse; Bild A/ rot: Wurzelextrakt, Bild B/ grün: Extrakt von Klon K30 bei 205 nm.

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

---

S.26), im folgenden als 5-Hydroxyobliquin, 5-Methoxyobliquin und als Obliquin bezeichnet, konnten im Extrakt der „hairy roots“ Klonlinie K30 (Abb.11 Bild B, S.26) nicht detektiert werden. Die Peaks 1, 2 und 4 der Abb.11 Bild B (siehe S.26) stimmten mit keinen der bekannten Inhaltsstoffe von *Leontopodium alpinum* überein.

Der Peak 3 (Abb.11 Bild B, S.26) stimmte mit dem ersten Teil des Peak 4 des Referenzextraktes überein, dabei handelt es sich um 4-Norleoligin, während der zweite Peakteil dem 5'-Hydroxy-5-Methoxyleoligin entspricht. Die Verbindungen 5 und 6 beider Extrakte wurden als Leoligin und 5-Methoxyleoligin identifiziert. Im Referenzextrakt wurde ein zusätzliches Lignan 5,5'-Dimethoxyleoligin, Komponente 7, gefunden (Abb.11 Bild A, S.26).

Zusammengefasst kommt man zu folgenden Schlussfolgerungen: Die Extrakte sowohl des Wurzelmaterials als auch der „hairy roots“ von Klon K30 enthalten folgende Lignanderivate: 4-Norleoligin, Leoligin und 5-Methoxyleoligin, weiters Linolensäure, ein Gemisch der Diastereomere Bisabolan C und D sowie die Polyacetylene. Auffallend ist, dass im „hairy roots“-Extrakt keine bekannten Cumarine bzw. Kaurensäurederivate enthalten sind, weiters fehlen die bekannten Bisabolane A, B und E. Der Extrakt von Klon K30 enthält zusätzliche Komponenten (1,2,4,11-14), für deren Identifikation es noch weitere Untersuchungen bedarf.

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

Die Quantifizierung des Lignan Leoligin erfolgte wie in Kapitel 2.5. (siehe S.16) beschrieben, durch die Methode des externen Standards. Beim Vergleich der durch HPLC-UV-Analyse erhaltenen Chromatogramme (siehe Abb.12, S.28) des Referenzpflanzenmaterials Klon 44 und eines bekannten Testmixes (Leoligin, 5-Methoxyleoligin bzw. 5'5-Dimethoxyleoligin), konnten die Verbindungen Leoligin, 5-Methoxyleoligin bzw. 5'5-Dimethoxyleoligin detektiert werden. Eine Trennung

### 3. ERGEBNISSE

---

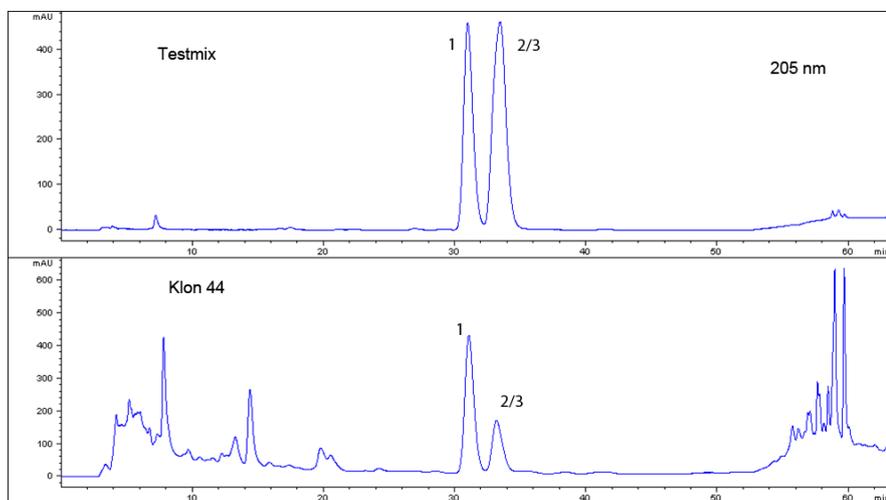


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme eines bekannten Testmixes und des Referenzextraktes aus *Leontopodium alpinum* Klon 44 (Feldkultur); Verbindung 1: Leoligin, Verbindung 2: 5-Methoxyleoligin, Verbindung 3: 5'5-Dimethoxyleoligin.

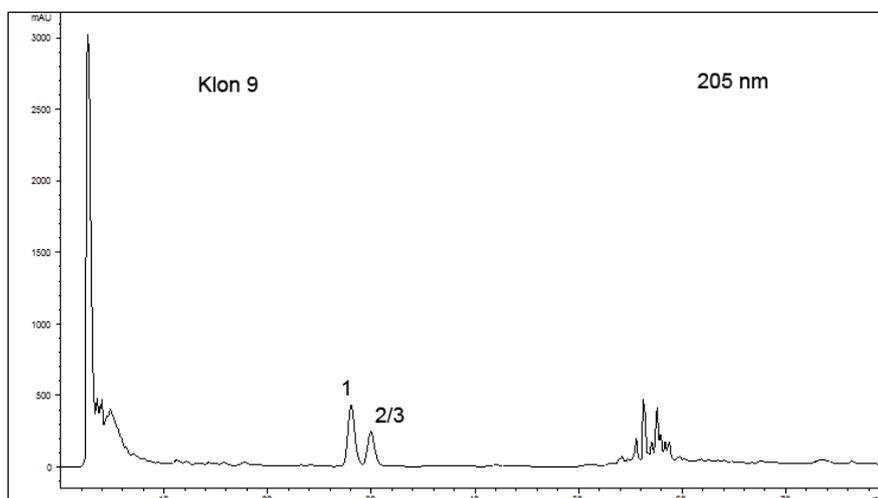


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm von Klon 9 (Feldkultur) von *Leontopodium alpinum*; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung 2: 5-Methoxyleoligin, Verbindung 3: 5'5-Dimethoxyleoligin.

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

---

dieser beiden Lignanderivate war mit der eingesetzten HPLC-UV-Analyse nicht möglich.

In einem weiteren Edelweißkultivar, Klon 9 (siehe Kapitel 2.1.), konnten ebenso die Verbindungen Leoligin, 5-Methoxyleoligin bzw. 5'5-Dimethoxyleoligin detektiert werden (siehe Abb.13, S.28).

Das HPLC-Chromatogramm des „hairy roots“-Extraktes von K30 (Abb.14) wies die Verbindung Leoligin auf, während die Lignanderivate 2 und 3 nicht detektierbar waren. Der Leoliginegehalt lag hier bei  $c = 0,0089$ .

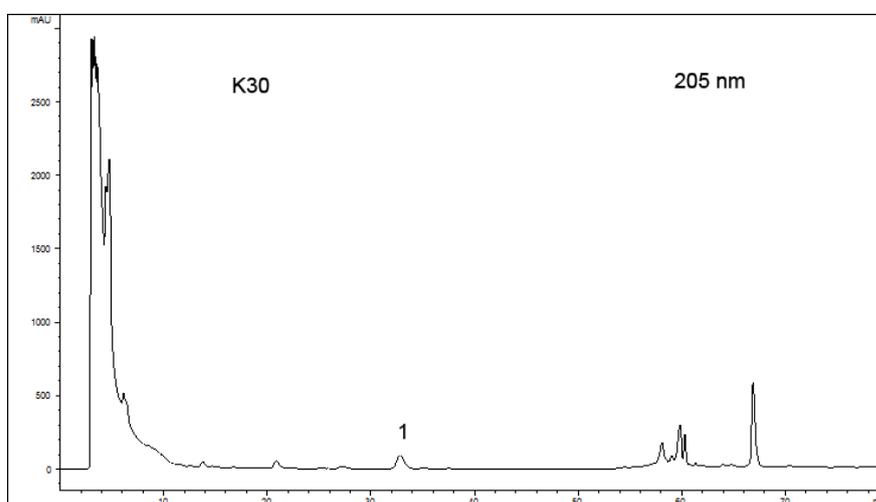


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von „hairy roots“-Klon K30; Verbindung 1: Leoligin.

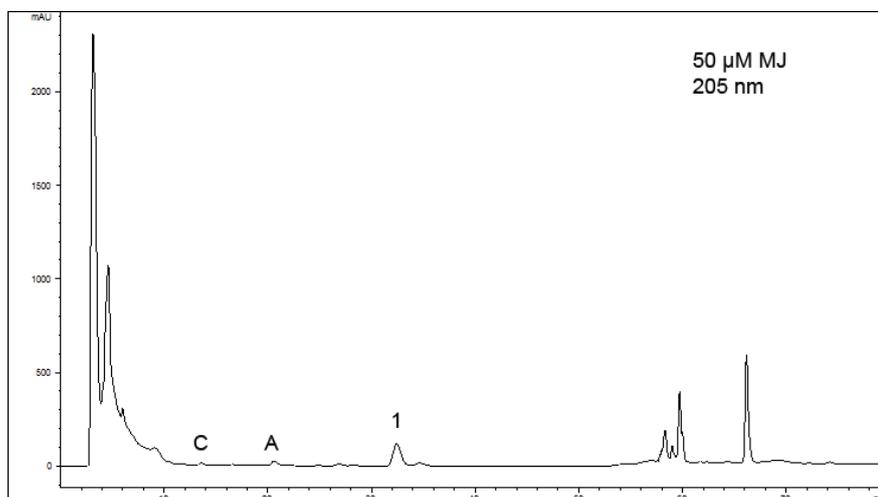
#### 3.3.1. Einfluss von Methyljasmonat

Die „hairy roots“ der Klonlinie K30, die mit dem Elizitor Methyljasmonat bzw. Hefeextrakt behandelt werden sollten, wurden für 3 Wochen in frischem MS-Medium kultiviert, anschließend wurde der jeweilige Elizitor in einer entsprechenden Konzentration zugesetzt. Nach einer Woche wurden die „hairy roots“ entnommen, getrocknet und mittels HPLC-UV analysiert.

Bei den „hairy roots“ der Klonlinie K30, welche mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat behandelt worden waren, konnte Leoligin nachgewiesen werden. Weiters wurden unbekannte polare Lignanverbindungen (Verbindung(en) C) detektiert. Wie in

### 3. ERGEBNISSE

---



**Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von „hairy roots“-Klon K30 nach Elizitierung mit 50 µmol Methyljasmonat; Verbindung 1: Leoligin, Verbindungen A: polare bekannte Verbindungen, Verbindungen C: unbekannte polare Verbindungen.**

der Abbildung 15 zu erkennen ist, enthält die Probe weiters die Verbindungen A. Bei den Verbindungen A handelt es sich um bekannte polare Lignanderivate 5'-Hydroxy-5-methoxy-leoligin, 5-Hydroxy-leoligin und 4-Nor-leoligin. Diese drei Lignane wurden unter den eingesetzten HPLC-Bedingungen nicht aufgetrennt (Dr. Stefan Schwaiger, persönliche Mitteilung).

Jene „hairy roots“ der Klonlinie K30, welche mit 100 µmol bzw. 200 µmol Methyljasmonat behandelt worden waren, wiesen die oben genannten Verbindungen auf. Bei jenen „hairy roots“ die mit 200 µmol Methyljasmonat elizitiert wurden, waren möglicherweise noch die Verbindungen 2 und 3 enthalten (siehe Abb.16, Bild B, S.31).

Weiters wurde in dieser Versuchsreihe der „hairy roots“-Klonlinie K30 96 proz. Ethanol zugesetzt, in weiterer Folge als Kontrolle bezeichnet. Das HPLC-Chromatogramm dieser Kontrollprobe wies ebenso Leoligin, die Verbindungen A und deutlich erhöhte Konzentrationen von 5-Methoxyleoligin und 5'5'- Dimethoxyleoligin auf (siehe Abb.17, S.31).

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

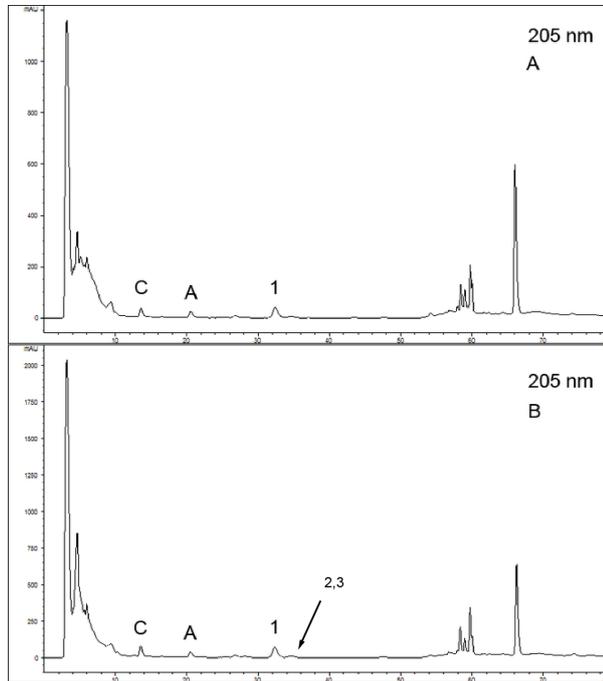


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramme von „hairy roots“-Klon K30 nach Elizitierung mit Methyljasmonat; Bild A: 100  $\mu$ mol, Bild B: 200  $\mu$ mol; Verbindung 1: Leoligin, Verbindungen A: polare bekannte Verbindungen, Verbindungen C: unbekannte polare Verbindungen, Verbindung 2/3: 5-Methoxyleoligin/ 5'5-Dimethoxyleoligin.

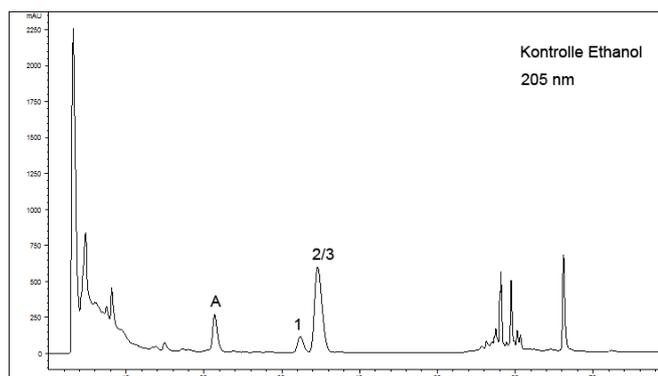


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von „hairy roots“-Klon K30 nach Elizitierung mit 125  $\mu$ mol 96 proz. Ethanol; Verbindung 1: Leoligin, Verbindungen A: polare bekannte Lignane, Verbindung 2/3: 5-Methoxyleoligin/ 5'5-Dimethoxyleoligin.

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.3.2. Einfluss von Hefeextrakt

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Beurteilung des Einflusses von Hefeextrakten auf „hairy roots“-Kulturen.

Im HPLC-Chromatogramm der „hairy roots“ der Klonlinie K30, die mit 1 g/l eines vorgereinigten Hefeextraktes eliziert worden waren, konnte man die Verbindung 1, Leoligin, nachweisen (siehe Abb.18, Bild A). Allerdings konnten die bekannten Verbindungen A, 2 und 3 sowie die unbekannt Verbindungen C nicht detektiert werden.

Ein vergleichbares Chromatogramm ergab sich bei der Zugabe von 5 g/l eines vorgereinigten Hefeextraktes. In diesem Chromatogramm (siehe Abb.18, Bild B) konnte ebenso Leoligin nachgewiesen werden, hinsichtlich der anderen oben genannten Verbindungen gab es keinen Hinweis.

In jenen „hairy roots“-Kulturen, in denen Hefe in einer Konzentration von

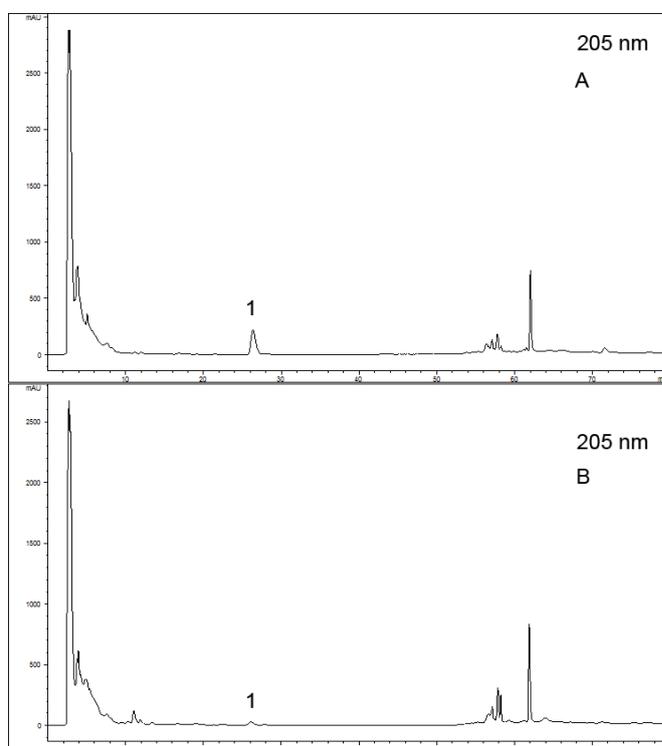
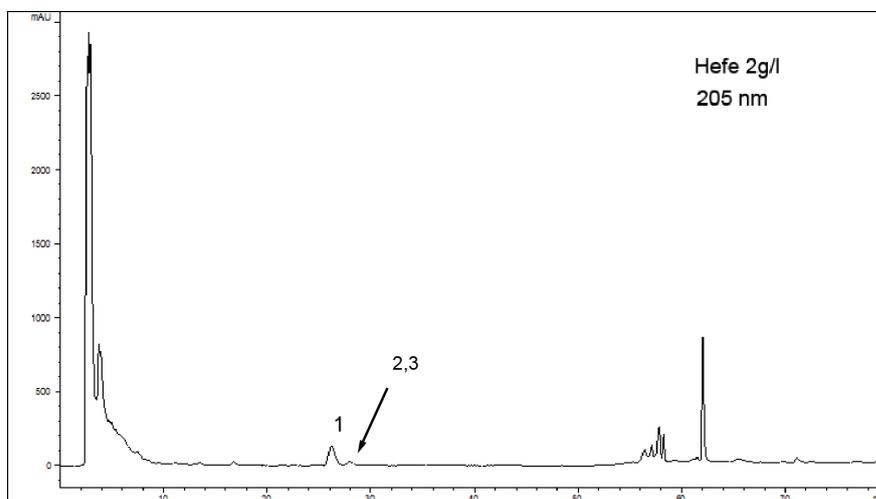


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm von K30 nach Elizitierung mit Hefeextrakt; Bild A: 1 g/l, Bild B: 5 g/l; Verbindung 1: Leoligin.

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate



**Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm von K30 nach Elizitierung mit 2 g/l Hefeextrakt; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung 2/3: 5-Methoxyleoligin/ 5'5-Dimethoxyleoligin.**

2 g/l zugesetzt worden war, zeigte sich, im Chromatogramm eindeutig das Vorhandensein von Leoligin (siehe Abb.19). Weiters könnten die Verbindungen 2 und 3 in einer kaum noch detektierbaren Menge enthalten sein (siehe Abb.19, mit Pfeil gekennzeichnet).

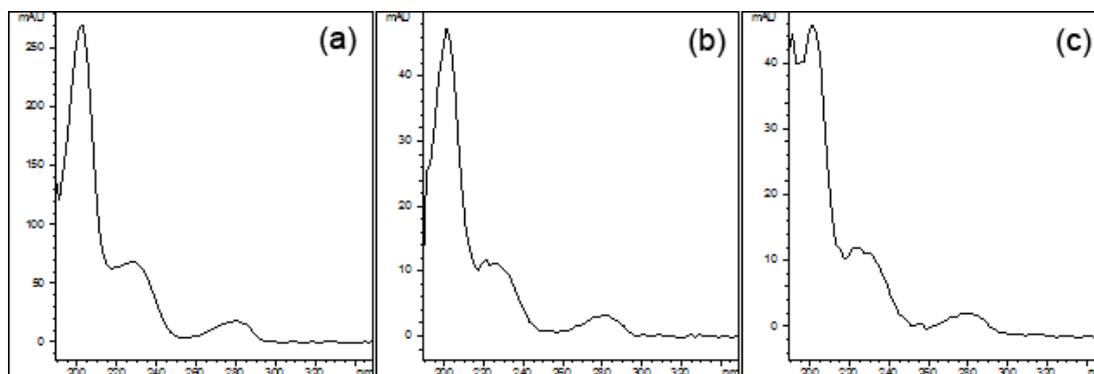
Weder das Lignan Leoligin noch seine Derivate konnten im Medium der „hairy roots“-Klonlinie K30 nachgewiesen werden. Deshalb war es nicht notwendig, die nach Ende der Elizitierung erhaltenen Medien aufzuarbeiten und zu analysieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei allen analysierten „hairy roots“-Extrakten der Klonlinie K30 aus *Leontopodium alpinum* das Lignan Leoligin enthalten ist. Bei jenen „hairy roots“-Extrakten, die mit Methyljasmonat (50, 100 und 200  $\mu\text{mol}$ ) elizitiert wurden, kann man zusätzlich bekannte und unbekannte polare Verbindungen erkennen. Interessanterweise konnte in der Kontrollprobe (Zugabe von 125  $\mu\text{l}$  96 proz. Ethanol) zusätzlich zu den Verbindungen 1 und A deutlich erhöhte Konzentrationen der Verbindungen 2 und 3 (5-Methoxyleoligin und 5,5'-Dimethoxyleoligin) nachgewiesen werden.

Die Abbildung 20 (siehe S.34) zeigt die LC-online-UV-Spektren, der oben genannten Verbindungen 1, A und C. Wie bereits beschrieben erfolgte die Quantifi-

### 3. ERGEBNISSE

---



**Abbildung 20: LC-online-UV-Spektren. (a) Leoligin; (b) Verbindung(en) C: Lignanderivate; (c) Verbindungen A: Lignanderivate.**

zierung des erhaltenen Leoligins mittels externen Standards. Die daraus resultierenden Leoliginkonzentrationen werden in der Tabelle 1 (siehe S.35) zusammengefasst. Die erhaltenen Gehaltsangaben sind jeweils das Ergebnis eines hergestellten Extraktes, der dreimal mittels HPLC analysiert wurde. Zusätzlich wird der Leoligingehalt der Klone 9 und 44 angeführt, zwei Edelweißkultivare die vom Schweizer Institut Mediplant zur Verfügung gestellt wurden. Diese Edelweißkultivare stammen aus „normaler Anbauweise“ und werden hier zum Vergleich mit natürlichen Gehalten von Wurzeln des Edelweiß angeführt. Daran lässt sich zudem erkennen, dass der Leoligingehalt verschiedener natürlich vorkommender Edelweißkultivare stark von einander abweichen kann. In dieser Tabelle sind auch die Einflüsse der für die vorliegende Arbeit relevanten biotischen Faktoren dargestellt.

Die Tabelle 2 (siehe S.36) enthält weiters die Gehaltsangaben von jenen „hairy roots“ Extrakten, denen die abiotischen Elizitoren, Saccharose und Silbernitrat, zugesetzt wurden. Dies wurde im Rahmen der Diplomarbeit „Elizitierung von ‚hairy roots‘-Kulturen des Edelweiß mit abiotischen Faktoren“ Schmidtbauer (2012) durchgeführt. Die grafische Darstellung in Abb.21 (siehe S.37) dient der besseren Veranschaulichung der Einflüsse biotischer Elizitoren unterschiedlicher Konzentrationen in Bezug auf den Leoligingehalt.

Die höchste Konzentration an Leoligin konnte bei jenen „hairy roots“, denen der biotische Elizitor Methyljasmonat in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol}$  zuge-

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

---

| Probe                | Elizitor         | Gehalt (%) | s      |
|----------------------|------------------|------------|--------|
| Klon K30             | -                | 0,0089     | 0,0003 |
| Klon K30, Nährmedium | -                | 0,0000     | 0,0000 |
| Klon K30             | 1 g/l Hefe       | 0,0042     | 0,0003 |
| Klon K30             | 2 g/l Hefe       | 0,0043     | 0,0000 |
| Klon K30             | 5 g/l Hefe       | 0,0026     | 0,0001 |
| Klon K30             | Kontrolle MJ     | 0,0065     | 0,0001 |
| Klon K30             | 50 $\mu$ mol MJ  | 0,0114     | 0,0003 |
| Klon K30             | 100 $\mu$ mol MJ | 0,0049     | 0,0002 |
| Klon K30             | 200 $\mu$ mol MJ | 0,0071     | 0,0001 |

**Tabelle 1: Einfluss von biotischen Elizitoren auf den Leoligingehalt in „hairy roots“-Kulturen. Klon 44, Klon 9: Edelweiss-Wurzeln aus Feldkultur; Klon K30: „hairy roots“ ohne Elizitierung s...Standardabweichung.**

### 3. ERGEBNISSE

---

| Probe                | Elizitor                     | Gehalt (%) | s      |
|----------------------|------------------------------|------------|--------|
| Klon 44              | -                            | 0,0107     | 0,0005 |
| Klon 9               | -                            | 0,0386     | 0,0006 |
| Klon K30             | -                            | 0,0089     | 0,0003 |
| Klon K30, Nährmedium | -                            | 0,0000     | 0,0000 |
| Klon K30             | 1 g/l Hefe                   | 0,0042     | 0,0003 |
| Klon K30             | 2 g/l Hefe                   | 0,0043     | 0,0000 |
| Klon K30             | 5 g/l Hefe                   | 0,0026     | 0,0001 |
| Klon K30             | Kontrolle MJ                 | 0,0065     | 0,0001 |
| Klon K30             | 50 µmol MJ                   | 0,0114     | 0,0003 |
| Klon K30             | 100 µmol MJ                  | 0,0049     | 0,0002 |
| Klon K30             | 200 µmol MJ                  | 0,0071     | 0,0001 |
| Klon K30             | 5 % Saccharose*              | 0,0101     | 0,0005 |
| Klon K30             | 6 % Saccharose*              | 0,0124     | 0,0001 |
| Klon K30             | 7 % Saccharose*              | 0,0064     | 0,0002 |
| Klon K30             | 15 µmol AgNO <sub>3</sub> ** | 0,0036     | 0,0001 |
| Klon K30             | 30 µmol AgNO <sub>3</sub> ** | 0,0039     | 0,0001 |
| Klon K30             | 60 µmol AgNO <sub>3</sub> ** | 0,0082     | 0,0001 |

\*Konzentration im MS-Medium

\*\*wässrige Silbernitratlösung

---

**Tabelle 2: Einfluss von biotischen und abiotischen Elizitoren auf den Leoligehalt in „hairy roots“-Kulturen. Klon 44 und Klon 9: Edelweiss-Wurzeln aus Feldkultur; Klon K30: ohne Elizitierung s... Standardabweichung.**

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

setzt wurde, gemessen werden. Der Leoligingehalt ist annähernd so hoch wie bei Klon 44, wobei dieser nicht elizitiert worden ist. Verglichen mit dem Leoligingehalt von unbehandelten „hairy roots“-Kulturen K30 kommt es durch Zugabe von 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat zu einer eindeutigen Steigerung des Leoligingehaltes. Hingegen nimmt der Leoligingehalt nach Elizitierung mit 100  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat ab und liegt unterhalb des Gehaltes der Kontrollprobe mit Ethanol (96 %) und der unbehandelten „hairy roots“-Kulturen. Der Gehalt von mit 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat behandelten „hairy roots“ nimmt im Vergleich zu den unbehandelten „hairy roots“ K30 geringfügig ab.

Bei der Elizitierung mit 1 g/l, 2 g/l bzw. 5 g/l eines gereinigten Hefextraktes wurde die Syntheseleistung erniedrigt.

Die grafische Darstellung in Abb.22 (siehe S.38) ermöglicht den Vergleich biotischer und abiotischer Elizitoren in Bezug auf den Leoligingehalt. In dieser Abbildung wird 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat mit einem roten Pfeil hervorgehoben, da dort im Vergleich zum nicht elizitierten Klon ein höherer Leoligingehalt zu sehen war, jedoch durch das inhibierte Wachstum die absolute Leoliginmenge pro

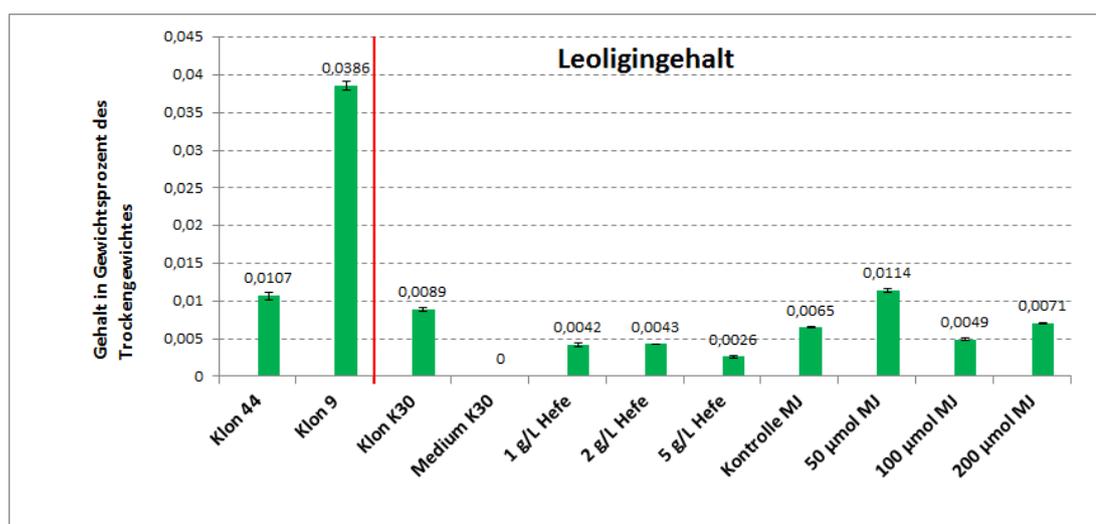


Abbildung 21: Leoligingehalt von mit biotischen Elizitoren behandelte „hairy roots“-Kulturen, im Vergleich unbehandelte Edelweißkultivare Klon 44 und Klon 9.

### 3. ERGEBNISSE

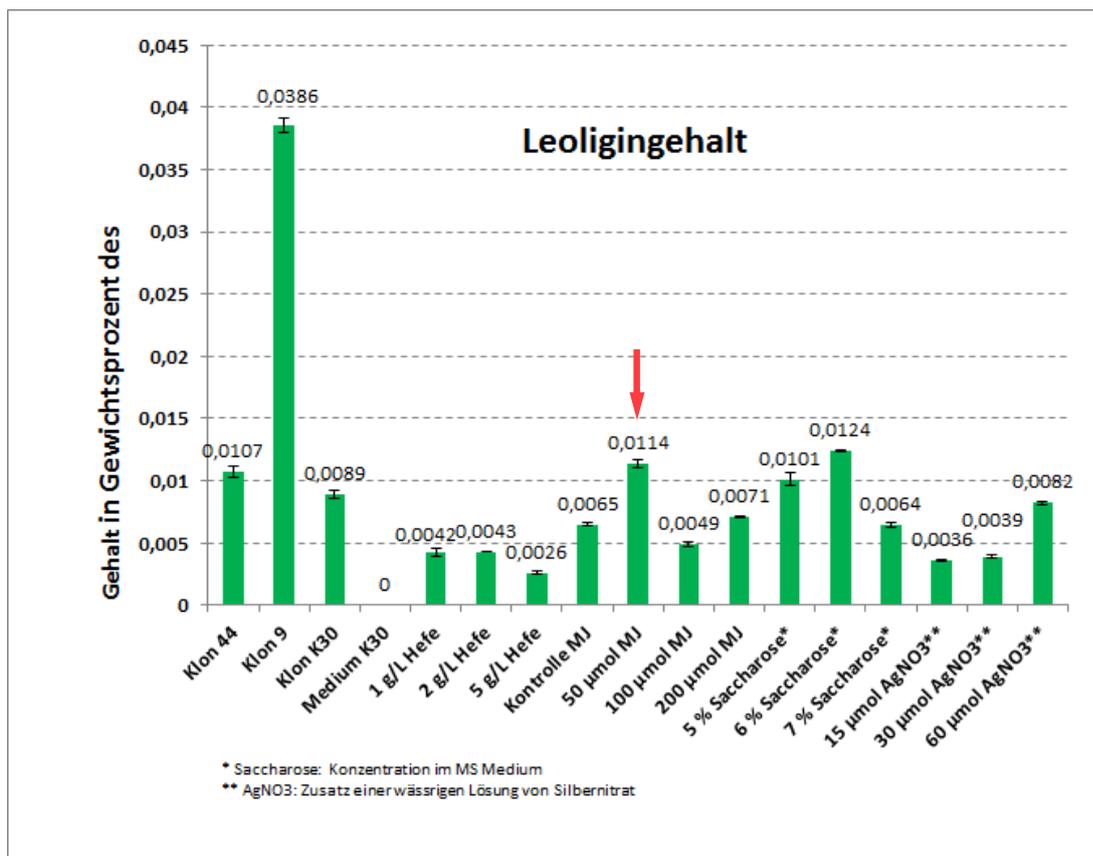


Abbildung 22: Leoligehalt von mit biotischen und abiotischen behandelten „hairy roots“-Kulturen, im Vergleich dazu unbehandelte Edelweißkultivare Klon 44 und Klon 9.

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

| Probe        | Biomassezuwachs<br>(%) | Leoligingehalt |                 |
|--------------|------------------------|----------------|-----------------|
|              |                        | (%)            | (mg pro Kolben) |
| Klon K30     | 161                    | 0,0089         | 0,042           |
| 1 g/l Hefe   | 77                     | 0,0042         | 0,008           |
| 2 g/l Hefe   | 67                     | 0,0043         | 0,009           |
| 5 g/l Hefe   | 66                     | 0,0026         | 0,005           |
| Kontrolle MJ | 82                     | 0,0065         | 0,013           |
| 50 µmol MJ   | 70                     | 0,0114         | 0,024           |
| 100 µmol MJ  | 45                     | 0,0049         | 0,009           |
| 200 µmol MJ  | 64                     | 0,0071         | 0,014           |

**Tabelle 3: Einfluss von biotischen Elizitoren auf Biomassezuwachs, prozentuellen Leoligingehalt und absolute Leoliginmenge pro Kolben bei „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum*.**

Kolben deutlich erniedrigt war.

Bei den verwendeten abiotischen Elizitierungsfaktoren handelte es sich um handelsübliche Saccharose bzw. AgNO<sub>3</sub>. Die Elizitierung mit 15 bzw. 30 µmol Silbernitrat resultierte in einem niedrigeren Leoligingehalt während es bei 60 µmol Silbernitrat weder zu einer Steigerung noch Senkung des Leoligingehaltes gekommen ist. Eine eindeutige Steigerung des Leoligingehaltes im Vergleich zu dem Gehalt unbehandelter „hairy roots“-Kulturen konnte durch 5 % bzw. 6 % Saccharose erzielt werden (Schmidtbauer 2012).

Bei der Elizitierung wird die Erhöhung des prozentuellen Leoligingehaltes angestrebt, allerdings betrachtet in Zusammenhang mit dem Wachstum der „hairy roots“-Kulturen kann es zur Verringerung der absoluten Leoliginmenge kommen. Der Einfluss von biotischen Elizitoren auf den Biomassezuwachs von „hairy roots“-Kulturen wurde im Kapitel 3.1. (siehe S.22) erläutert. Die oben abgebildete Tabelle 3 dient zur Übersicht der absoluten Leoliginmenge pro Kultur. Weiters

### 3. ERGEBNISSE

---

wird in dieser Tabelle der Biomassezuwachs und der prozentuelle Leoligingehalt sowohl unbehandelter als auch elizitierter „hairy roots“-Klone K30 aufgelistet. Hierbei wird ersichtlich, dass es durch Elizitierung mit biotischen Faktoren zur Verringerung des Biomassezuwachses und in den meisten Fällen auch zu einem verringerten Leoligingehalt der Wurzeln kam. Einzig bei Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat war der Leoligingehalt (0,0114 %) höher als im unbehandelten Klon K30 (0,0089 %). Allerdings resultierte auch hier wegen des deutlich geringeren Wachstums letztlich nur in etwa die Hälfte an Leoligin pro Kolben. Bei dem nicht elizitierten Klon K30 betrug der Biomassezuwachs 161 %, der prozentuelle Leoligingehalt 0,0089 %, das entsprach einer absoluten Leoliginmenge von 0,042 mg pro Kultur. Obwohl der prozentuelle Leoligingehalt niedriger ist als nach Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat resultiert aufgrund des Wachstums der „hairy roots“-Kulturen eine doppelt so hohe Leoliginmenge pro Kolben.

Zur besseren Übersicht sind diese Zusammenhänge in der Abbildung 23 (siehe S.41) grafisch dargestellt. Nach Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat war der prozentuelle Leoligingehalt höher und betrug 0,0114 %, allerdings konnte das Wachstum der „hairy roots“ nicht angeregt werden und so erhielt man einen Gehalt von 0,024 mg pro 250 ml-Kolben.

Der prozentuelle Leoligingehalt jener „hairy roots“-Kulturen, die mit 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat elizitiert wurden, liegt geringfügig unter jenem Wert der nicht elizitierten „hairy roots“. Aufgrund des inhibierten Wachstums betrug auch hier die absolute Leoliginmenge nur 0,014 mg pro Kultur. Die Elizitierung mit 100  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat konnte die Erwartungen nicht erfüllen, weder der Biomassezuwachs (45 %), der prozentuelle Leoligingehalt (0,0049 %) noch die absolute Leoliginmenge (0,009 mg) pro Kultur konnten gesteigert werden. Jene „hairy roots“, denen 125  $\mu\text{l}$  Ethanol (96 %) zugesetzt wurde, hatten trotz des Biomassezuwachses (82 %) einen vergleichbar niedrigen Leoligingehalt von 0,013 mg pro 250 ml-Kolben.

Die Elizitierung mit Hefeextrakt führte hinsichtlich des Biomassezuwachses zu ähnlichen Ergebnissen wie mit Methyljasmonat, allerdings konnte weder der prozentuelle Leoligingehalt noch die absolute Leoliginmenge pro Kultur gesteigert werden. Nach Elizitierung mit 1 g/l Hefeextrakt betrug der Biomassezuwachs

### 3.3. Quantifizierung des Leoligins und dessen Derivate

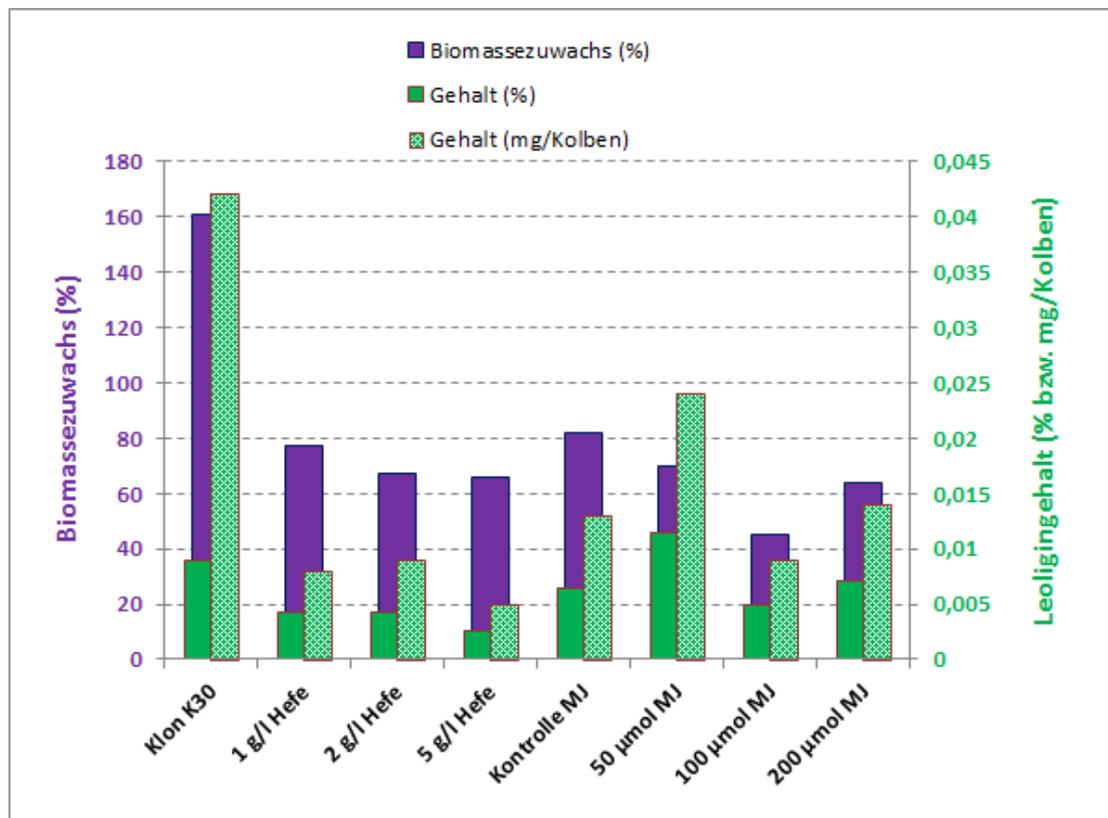


Abbildung 23: Einfluss von Elizitoren auf Biomassezuwachs, prozentuellen Leoligingehalt und absolute Leoliginmenge pro Kolben bei „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum*.

### 3. ERGEBNISSE

---

77 %, der prozentuelle Leoligingehalt 0,0042 %, das entsprach einer Leoliginmenge von 0,008 mg pro 250 ml-Kolben. Ein ähnliches Resultat ergab sich bei der Elizitierung mit 2 g/l bzw. 5 g/l Hefeextrakt, so betrug die erhaltene Leoliginmenge 0,009 mg bzw. 0,005 mg pro Kultur.

Aus dieser Grafik geht eindeutig hervor, dass die Elizitierung sowohl mit Methyljasmonat als auch mit Hefeextrakt, aufgrund des inhibierten Wachstums, zu keiner Steigerung des Leoligingehaltes führte.

## 4.

# Diskussion

*Leontopodium alpinum* (Cass.) aus der Familie der Asteraceae ist vor allem auf kalkhaltigen Felsformationen in Höhen bis zu 3140 m zu finden. Das Edelweiß ist eine mehrjährige Pflanze, die in Österreich, Liechtenstein, Deutschland und Italien unter Naturschutz steht (Hook 1993). In der Volksmedizin wird *Leontopodium* seit jeher zur Behandlung von Durchfall, Bauchschmerzen, Bronchitis, Angina und zur Fiebersenkung eingesetzt (Pace et al. 2009).

Der für die vorliegende Arbeit interessante Inhaltsstoff aus *Leontopodium alpinum* ist Leoligin, ein Sekundärmetabolit, der in die Klasse der Lignane einzuordnen ist. Leoligin wurde 2003 erstmals an der Universität Innsbruck aus den Wurzeln des Edelweiß isoliert. Diesem Inhaltsstoff hat man bisher eine Reihe positiver Wirkungen zuschreiben können, wodurch sich möglicherweise neue Einsatzgebiete für *Leontopodium alpinum* ergeben könnten. Eine dieser Wirkungen, die in darauffolgenden Untersuchungen dem Edelweiß zugeschrieben werden konnte, ist die antiinflammatorische Wirksamkeit (Dobner et al. 2004). Weiters ist man zu der Kenntnis gelangt, dass das Lignan die Intimahyperplasie hemmt und gegen bereits bestehende Gefäßwandverdickungen wirksam ist (Reisinger et al. 2009).

Leoligin ist in den Wurzeln von *Leontopodium alpinum* in geringer Menge enthalten, so konnten aus etwa 800 g luftgetrocknetem Wurzelmaterial nur etwa 40 mg Reinsubstanz isoliert werden (Dobner et al. 2003).

Ein vielversprechendes System zur Gewinnung von Sekundärmetaboliten wie Leoligin stellen „hairy roots“ dar. Diese transformierten Wurzeln weisen eine Viel-

## 4. DISKUSSION

---

zahl an Vorteilen gegenüber normalen, nicht transformierten Wurzeln auf. Diese Vorteile sind unter anderem die genetische und biochemische Stabilität, außerdem wachsen „hairy roots“ schneller als normale Wurzeln (Hu und Du 2006). Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass man „hairy roots“ auch ohne Wachstumsregulatoren kultivieren kann. Zum anderen kann es auch den Sekundärstoffwechsel der Pflanze verändern, indem neue Strukturen gebildet werden oder die Menge des gebildeten Inhaltstoffe erhöht wird (Shanks und Morgan 1999; Georgiev et al. 2007). „Hairy roots“-Kulturen aus *Leontopodium alpinum* konnten erstmals 1993 erfolgreich generiert werden (Hook 1993). Die Lignanproduktion in „hairy roots“ wurde bereits an *Linum flavum* (Oostdam et al. 1993) sowie *Linum tauricum ssp. tauricum* untersucht. Die Untersuchung an der letztgenannten Pflanze ergab, dass die Lignanproduktion in „hairy roots“ 10-12 mal höher war als in Zellsuspensionskulturen derselben Pflanze (Ionkova und Fuss 2009).

Im Rahmen der Diplomarbeit von Ondratschek (2012) wurden „hairy roots“-Kulturen aus *Leontopodium alpinum* durch Infektion mit drei verschiedenen *Agrobacterium rhizogenes* Stämmen etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden die daraus resultierenden 32 Klonlinien für weiterführende Versuche herangezogen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit umfassten die Vermehrung der erhaltenen „hairy roots“-Kulturen um genügend Pflanzenmaterial für eine erste Analyse zu erhalten. Diese erste Analyse diente zum Nachweis, dass Leoligin in den „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* enthalten ist. In weiterer Folge sollte verifiziert werden, ob durch Zugabe verschiedener biotischer Elizitoren das Wachstum der „hairy roots“ bzw. die Bildung der Sekundärmetabolite beeinflussbar ist. Eine weitere Untersuchung sollte Aufschluß darüber bringen, ob die „hairy roots“ des Edelweiß Leoligin an das Nährmedium abgeben.

Zunächst bestand die Aufgabe darin, die „hairy roots“, die zu Beginn der Arbeit nur wenige Zentimeter groß waren, aufzuvermehren. Die „hairy roots“ wurden zunächst in drei Medien (MS, MS 1/2 bzw. B5) jeweils 4 Wochen kultiviert. Am besten wuchsen die „hairy roots“ im MS-Medium. Im MS 1/2-Medium war das Wachstum geringer bzw. war überhaupt kein Fortschritt im Hinblick auf das Wachstum festzustellen, und auch die Ausfallrate war relativ hoch. Möglicherweise lag der Grund dafür in der halben Konzentration an Makroelementen bzw. in der geringeren Saccharosekonzentration. Das B5-Medium, das

---

sich von den anderen beiden Medien durch eine wesentlich höhere Stickstoffkonzentration unterscheidet, war ebenso wie das Medium MS 1/2 nicht optimal für die weitere Kultivierung. Im Folgenden wurde der Klon K30 ausgewählt, da dieser das beste und schnellste Wachstum aufwies und weil es notwendig war, in möglichst kurzer Zeit möglichst viel Pflanzenmaterial zu gewinnen.

Als nächstes musste der Nachweis über das Vorhandensein von Leoligin in den „hairy roots“ des Edelweiß erbracht werden. Um sicher zu gehen, dass für die erste Analyse genügend Pflanzenmaterial vorhanden war, wurden die „hairy roots“ mit einem Frischgewicht von 30 g, dies entspricht einem Trockengewicht von 3 g, geerntet. In weiterer Folge stellte sich heraus, dass für die Aufbereitung der „hairy roots“ 1 g Trockengewicht ausreicht.

Die Ergebnisse der ersten durchgeführten HPLC-Analyse zeigten, dass sowohl im Extrakt der „hairy roots“ K30 als auch im normalen Wurzelextrakt (siehe Kapitel 2.5., S.16) Leoligin enthalten ist. Weiters konnten in beiden Extrakten die Lignanderivate 4-Norleoligin sowie 5-Methoxyleoligin nachgewiesen werden. Die beiden Extrakte unterscheiden sich darin, dass im Extrakt von K30 weder 5-Hydroxyobliquin, 5-Methoxyobliquin noch Obliquin nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnten keine bekannten Cumarine, Kaurensäurederivate oder Bisabolane (A, B, E) detektiert werden. Der Extrakt von K30 enthält weiters sieben Verbindungen, deren Struktur mit den durchgeführten Analysen (HPLC-MS) nicht bestimmbar waren. Eine Bestimmung dieser Verbindungen könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Die quantitative Untersuchung ergab, dass Leoligin in einer Konzentration von 0,0089 % in den unbehandelten „hairy roots“-Kulturen K30 enthalten ist. Diese Konzentration liegt im Bereich von Edelweißkultivaren, so weist Klon 44 einen Gehalt von 0,0107 % auf.

Nachdem geklärt werden konnte, dass Leoligin in den „hairy roots“ K30 enthalten ist, wurde der Einfluss biotischer Elizitoren untersucht. Die Auswahl an biotischen Elizitoren fiel in der vorliegenden Arbeit auf Methyljasmonat und auf Hefeextrakt. Den „hairy roots“-Kulturen wurde eine ethanolsche Methyljasmonat- bzw. eine aufgereinigte Hefelösung in einer entsprechenden Konzentration zugesetzt. In der Literatur findet man dazu einige Beispiele, in denen es zum erfolgreichen Einsatz von Methyljasmonat und Hefeextrakt gekommen ist. So kann-

## 4. DISKUSSION

---

te durch Zugabe von Methyljasmonat in einer Konzentration von 200  $\mu\text{mol}$  die Bildung von Artemisinin in *Artemisia annua* um das Fünffache gesteigert werden (Putalun et al. 2007). Weiters konnte Methyljasmonat erfolgreich bei *Salvia milthorriza* eingesetzt werden. Hierbei wurde sowohl das Wachstum als auch die Bildung sekundärer Metaboliten, in diesem Fall der Tanshinone, durch Gabe von 100  $\mu\text{mol}$  positiv beeinflusst (Liang et al. 2012).

Daher fiel die Entscheidung mit 50  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$  bzw. 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat zu elizitieren. Zur Herstellung einer geeigneten Stammlösung wurde Methyljasmonat in Ethanol (96 %) gelöst. Es wurde eine Kontrollreihe durchgeführt, in der den 3 Wochen alten „hairy roots“ je 125  $\mu\text{mol}$  Ethanol (96 %) zugesetzt wurde. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob das Lösungsmittel einen Einfluss hinsichtlich der Bildung sekundärer Metabolite bzw. des Wachstums hat. Die höchste Konzentration an Leoligin wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat erreicht. Der Gehalt betrug 0,0114 % und liegt über dem Wert der unbehandelten „hairy roots“ K30 von 0,0089 %.

Die in dieser Arbeit verwendeten biotischen Faktoren beeinflussten nicht nur den Leoliginegehalt, sondern auch das Wachstum von „hairy roots“-Kulturen. Dabei bestätigte sich die Beobachtung, dass nach Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat auch der größte Biomassezuwachs verzeichnet werden kann. Das Lösungsmittel Ethanol (96 %) scheint tatsächlich einen Einfluss auf die „hairy roots“ zu haben. Nach der Elizitierung kam es zu einer Verringerung des Leoliginegehaltes, dieser betrug nach der Zugabe nur mehr 0,0065 %. Außerdem beeinflusst das Lösungsmittel den Biomassezuwachs, dieser ist noch höher als nach Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat. Der Massezuwachs, der durch 96 proz. Ethanol erzielt worden ist, liegt bei 82 %.

Als zweiter biotischer Elizitor wurde für diese Arbeit Hefeextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählt. Auch dazu findet man in der Literatur einige Beispiele für den positiven Einsatz dieses Elizitors. So konnte durch Elizitierung mit Hefeextrakt in „hairy roots“-Kulturen von *Salvia milthorriza* sowohl die Bildung von Rosmarinsäure als auch der Tanshinone, insbesondere der Kryptotanshinone, gesteigert werden. In dieser Untersuchung konnte auch der Einfluss auf die Biomasse verdeutlicht werden, so kam es zu einer deutlichen Anregung des Wachstums (Chen et al. 2001). Auch in *Artemisia annua* erreichte man durch

---

Elizitierung mit Hefeextrakt eine Steigerung der Artemisininproduktion. Ebenso wie bei der Behandlung mit Methyljasmonat, wurde hier der größte Effekt mit einer Konzentration von 2 mg/ml erzielt (Putalun et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem aufgereinigten Hefeextrakt gearbeitet, der in Konzentration von 1 g/l, 2 g/l bzw. 5 g/l den „hairy roots“-Kulturen zugesetzt wurde. Die mit Hefeextrakt elizitierten „hairy roots“ wiesen alle Leoligin als Inhaltsstoff auf, allerdings kam es nicht zu einer Steigerung, sondern im Gegenteil zu einer Senkung der Leoliginproduktion. Diese „hairy roots“ wiesen einen Leoliginingehalt von 0,0042 – 0,0026 % auf und liegen damit deutlich unter jenem Wert der unbehandelten „hairy roots“ K30 von 0,0089 %. Hinsichtlich des Biomassezuwachses kam es durch Elizitierung mit 1 g/l Hefeextrakt, im Vergleich zu den unbehandelten „hairy roots“ K30 (102 %), zur Senkung des Massezuwachses (77 %). Die beiden anderen Hefeextraktkonzentrationen erzielten ebenso einen geringeren Biomassezuwachs als die unbehandelten K30.

Die Ergebnisse sollten immer in Zusammenhang mit etwaigen Einflüssen des Elizitors auf das Wachstum betrachtet werden. Der Leoliginingehalt kann durchaus erhöht werden, wenn aber der Biomassezuwachs im Gegenzug verringert ist, könnte dies letztendlich darin resultieren, dass bei einem Vergleich der absoluten Menge des Produkts pro Kultureinheit kein Unterschied zu nicht elizitierten Material bestünde. In so einem Fall würde man natürlich eine Elizitierung die zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet weglassen. Beim Vergleich des Wachstums und des Leoliginingehalts von „hairy roots“-Kulturen K30, die mit 50 µmol Methyljasmonat elizitiert wurden (siehe Tabelle 3, S.39 bzw. Abbildung 23, S.41) resultiert absolut gesehen letztlich in etwa die Hälfte an Leoligin pro Kultur. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Elizitierung mit biotischen Faktoren, sowohl mit Methyljasmonat als auch mit Hefeextrakt, der Leoliginingehalt aufgrund des verringerten Wachstums nicht gesteigert werden kann.

In weiterführenden Untersuchungen könnten Edelweißwurzeln herangezogen werden, die bereits von vornherein einen höheren Leoliginingehalt aufweisen. Dabei wäre interessant herauszufinden, ob durch Generierung von „hairy roots“ aus diesen Wurzeln ein höherer Leoliginingehalt erreicht werden kann. Weiters könnte man den Leoliginingehalt jener „hairy roots“ Klone untersuchen, die nicht zur Verwendung in der vorliegenden Arbeit gekommen sind.

#### 4. DISKUSSION

---

Ausgehend von dieser Arbeit ergibt sich auch die Frage, ob durch die Kombination von zwei oder mehreren Elizitoren synergistische Effekte hinsichtlich der Bildung von Sekundärmetaboliten erzielt werden können. In Wurzelkulturen von *Angelica gigas* konnte durch die Kombination von zwei Elizitoren die Bildung der Cumarine, insbesondere von Decursin und Decursinol, gesteigert werden. In dieser Studie wurden die Elizitoren Hefeextrakt und Kupferionen miteinander kombiniert. Hierfür wurde eine Konzentration von 2 g/l Hefeextrakt und 0,5 µmol Kupfer gewählt (Rhee et al. 2010). Ein weiterer Ansatzpunkt für eine fortführende Arbeit wäre andere biotische Elizitoren, wie zum Beispiel Chitosan auszuwählen. Putalun et al. (2007) beschrieb die erfolgreiche Anwendung von 150 µg/l Chitosan zur Steigerung der Artemisininkonzentration in *Artemisia annua*.

In weiterführenden Untersuchungen könnte die Zusammensetzung des Basismedium nach Murashige und Skoog (1962) verändert werden. Eine mögliche Modifikation des Nährmediums könnte in der Erhöhung der Saccharosekonzentration oder in der Halbierung der Makroelemente liegen. In der Diplomarbeit von Schmidtbauer (2012) konnte gezeigt werden, dass durch eine erhöhte Saccharosekonzentration von 6 % der Leoligingehalt gesteigert werden kann.

## 5.

# Zusammenfassung

Das Edelweiß, *Leontopodium alpinum* Cass., eine Asteraceae wird in der Volksmedizin bei unterschiedlichsten Erkrankungen wie Bronchitis oder gastrointestinaler Beschwerden eingesetzt. Neben schon länger bekannten Inhaltsstoffen wurde 2003 aus den Wurzeln des Edelweiß ein strukturell neues Lignan entdeckt, wodurch sich möglicherweise neue Einsatzgebiete für das Edelweiß ergeben könnten. Diesem Lignan, namentlich Leoligin, konnte bereits eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben werden, weiters wirkt es den Verdickungen der Innenwände von Blutgefäßen entgegen. Allerdings kann das Leoligin nur in geringen Konzentrationen von 0,01 – 0,04 % in den Wurzeln des Edelweiß nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit zur Gewinnung sekundärer Inhaltsstoffe stellen „hairy roots“ dar, dabei handelt es sich um eine sehr gut etablierte Methode, die gegenüber nicht transformierten Wurzeln eine Reihe an Vorteilen besitzt. Diese liegen in der genetischen und biochemischen Stabilität sowie in einem schnellen Wachstum begründet. Außerdem könnten durch Generierung von „hairy roots“ größere Mengen an Inhaltsstoffen in kürzerer Zeit oder neue, noch unbekannte Lignane gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* generierten „hairy roots“ das Lignan Leoligin oder dessen Derivate bilden. Wir konnten Leoligin als auch die Derivate 4-Norleoligin, 5-Methoxyleoligin sowie sieben unbekannte Verbindungen in den Kulturen von Edelweiß nachweisen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

In weiterer Folge sollte der Einfluss der biotischen Elizitoren Methyljasmonat und Hefeextrakt untersucht werden. Das Augenmerk lag hierbei auf der Beeinflussung des Leoligingehalts als auch des Wachstums von „hairy roots“-Kulturen. Elizitiert wurde mit 50, 100 und 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat bzw. mit 1, 2 und 5 g/l eines gereinigten Hefeextraktes. Hinsichtlich des Leoligingehaltes konnte durch Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat die Biosynthese, im Vergleich zu unbehandelten „hairy roots“-Kulturen, gesteigert werden. Hingegen führte die Elizitierung mit 100 und 200  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat bzw. 1, 2 und 5 g/l Hefe zur Senkung des Leoligingehaltes. Die Kontrollreihe, die mit 125  $\mu\text{mol}$  Ethanol durchgeführt wurde, führte zu keiner Steigerung des Leoligingehaltes. Allerdings konnten neben Leoligin noch weitere polare bekannte Verbindungen A (5'-Hydroxy-5-methoxy-leoligin, 5-Hydroxy-leoligin und 4-Nor-leoligin) sowie die Verbindungen 5-Methoxyleoligin und 5'5-Dimethoxyleoligin nachgewiesen werden.

Der Leoligingehalt von unbehandelten „hairy roots“ von Klon K30 betrug 0,0089% das entspricht 0,042 mg pro 250 ml-Kolben. Der Leoligingehalt betrug nach Elizitierung mit 50  $\mu\text{mol}$  Methyljasmonat 0,0114%, dies entspricht 0,024 mg Leoligin pro 250 ml-Kolben. Die Zugabe von 2 g/l Hefeextrakt erbrachte einen Leoligingehalt von 0,009 mg pro 250 ml-Kolben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Elizitierung sowohl mit Methyljasmonat als auch mit Hefeextrakt der Leoligingehalt aufgrund des inhibierten Wachstums nicht gesteigert werden kann.

Der Leoligingehalt jener „hairy roots“-Kulturen, die nicht elizitiert wurden, liegt durchaus im normalen Bereich von Edelweißwurzeln. Die *in vitro* Kultivierung könnte ohne Beeinflussung äußerer Faktoren, Umwelt oder Jahreszeiten, einen konstanten Leoligingehalt erbringen. „Hairy roots“-Kulturen des *Leontopodium alpinum* wären daher als Alternative zum Feldanbau denkbar.

## 6.

# Summary

Edelweiss (*Leontopodium alpinum* (Cass.)) is commonly used in alpine folk medicine as a therapy for bronchitis, gastrointestinal disorder and other illnesses. Although its ingredients are well-known, researchers recently found a structurally new lignan called leoligin that could be isolated from the roots of *Leontopodium alpinum*. Leoligin has anti-inflammatory effects and might represent a novel drug for the treatment of vein graft disease. Despite these advantageous properties, one major problem is the rather low concentration of leoligin in the roots (0.01–0.04 %).

One attractive system to produce large amounts of secondary metabolites are hairy roots, a plant disease caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Hairy roots exhibit several outstanding properties such as a fast growth, genetic and biochemical stability and growth in hormone-free medium. These transformed roots of Edelweiss might synthesize higher levels of leoligin or structurally similar metabolites which are not found in non-transformed roots.

The aim of the present diploma thesis was to prove if the hairy root-cultures of *Leontopodium alpinum* produce leoligin or its derivatives. In fact 4-Norleoligin, 5-Methoxyleoligin and seven unknown compounds were identified. Furthermore we studied the effect of different biotic elicitors, such as methyl jasmonate and yeast extract, on the production of leoligin and on the growth of the hairy roots culture. Hairy roots were cultivated in MS-medium containing 50, 100 and 200 µmol methyl jasmonate or alternatively 1, 2 and 5 g/l yeast extract. The elicitation with 100 µmol und 200 µmol methyl jasmonate and 1, 2 and 5 g/l reduced

## 6. SUMMARY

---

the leoligin production. With a concentration of 50  $\mu\text{mol}$  methyl jasmonate the highest levels of leoligin concentration were reached in comparison with untreated hairy roots. In the control series, where 125  $\mu\text{mol}$  ethanol was added, the amount of leoligin did not increase but in addition compounds as 5-Methoxyleoligin and 5'5-Dimethoxyleoligin were identified.

The leoligin concentration of untreated hairy roots was 0.0089 % which is equivalent to 0.042 mg per 250 ml flask. After the elicitation with 50  $\mu\text{mol}$  methyl jasmonate the concentration was 0.0114 % which is equivalent to 0.024 mg leoligin per 250 ml flask. The addition of 2 g/l yeast extract resulted in 0.009 mg leoligin per 250 ml flask. In summary the elicitation with methyl jasmonat as well as yeast extract did not increase the leoligin concentration because of the inhibited growth.

If the hairy roots were not subject to an elicitor, the leoligin concentration was comparable to the concentration found in normal roots of Edelweiß. The exclusion of external factors and environmental effects through in-vitro cultivation therefore might lead to a significant improvement over cultivation in open fields.

# Literaturverzeichnis

- Aichele, D. und Schwegler, H. W. (1928). Die Blütenpflanzen Mitteleuropas. Teil 4. Stuttgart: Franckh-Kosmos.
- Angelova, Z., Georgiev, S. und Roos, W. (2006). Elicitation of Plants. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **20**: 72–83.
- Chen, H., Chena, F., Chiu, F. und Lo, C. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microb. Tech.* **28**: 100–105.
- Comey, N., Grey, A. I., Hook, I. L., James, P. und Sheridan, H. (1999). Sesquiterpenes from *Leontopodium alpinum*. *Phytochemistry* **50**: 1057–1060.
- Comey, N., Hook, I., Sheridan, H., Walsh, J. und James, P. (1997). Isolation of (S)-(-)-2,3-Dihydro-2,6-dimethyl-4H-benzopyran-4-one from Roots of *Leontopodium alpinum*. *J. Nat. Prod.* **60**: 148–149.
- Dobner, M., Ellmerer, E., Schwaiger, S., Odonchimeg, B., Samdan, N., Stütz, 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. und Stuppner, H. (2004). Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents. *Planta Med.* **70**: 502–508.
- Dweck, A. C. (2004). A Review of Edelweiss. *SÖFW* **130**: 65–67.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50**: 151–158.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I. und Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biot.* **74**: 1175–1185.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Giri, A. und Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots. recent trends and applications. *Biotech. Adv.* **18**: 1–22.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M. und Gantet, P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.* **24**: 403–409.
- Gyamtso, K. und Kölliker, S. (2007). Tibetische Medizin - Eine Einführung in Geschichte, Philosophie, Heilpraxis und Arzneimittelkunde. Stuttgart: AT Verlag: 185–187.
- Hahn, M. G. und Albersheim, P. (1978). Host-Pathogen Interactions: XIV. Isolation and Partial Characterization of an Elicitor from Yeast Extract. *Plant physiol.* **62**: 107–111.
- Hegi, G. (1965). Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band VI/1. Wien: Verlag J.F. Lehmann: 458–461.
- Hook, I. (1993). *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss): In Vitro Culture, Micropropagation, and the Production of Secondary Metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 21. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. Kap. XV: 217–232.
- Hu, Z.-B. und Du, M. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *J. Integr. Plant Biol.* **48**: 121–127.
- Ionkova, I. und Fuss, E. (2009). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum*. *Pharmacogn. Mag.* **5**: 14–18.
- Liang, Z.-S., Yang, D.-F., Liang, X., Zhang, Y.-J., Liu, Y. und Liu, F.-H. (2012). Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Rep.* **31**: 873–883.
- 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.
- Oostdam, A., Mol, J. N. und Plas, L. H. van der (1993). Establishment of hairy root culture of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxypodophyllotoxin. *Plant Cell Rep.* **12**: 474–477.

- Pace, L. G., Bruno, A. A. und Spanò, L. (2009). In vitro plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand.-Mazz. (Asteraceae). *Plant. Biosyst.* **143**: S12–S16.
- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. und Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol. Lett.* **29**: 1143–1146.
- Reisinger, U., Schwaiger, S., Zeller, I., Messner, B., Stigler, R., Wiedemann, D., Mayr, T., Seger, C., Schachner, T., Dirsch, V. M., Vollmar, A. M., Bonatti, J. O., Stuppner, H., Laufer, G. und Bernhard, D. (2009). Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts. *Cardiovasc. Res.* **82**: 542–549.
- Rhee, H. S., Cho, H.-Y., Son, S. Y., Yoon, S.-Y. H. und Park, J. M. (2010). Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell Tiss. Org.* **101**: 295–302.
- Safer, S., Tremetsberger, K., Guo, Y.-P., 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. Linear Soc.* **165**: 364–377.
- Scheidegger, T. (2008). Mythos Edelweiss: zur Kulturgeschichte eines alpinen Symbols. Techn. Ber. Zürich: Botanische Gärten Zürich und Genf.
- Schmidtbauer, K. (2012). Elizitierung von hairy roots-Kulturen des Edelweiss mit abiotischen Faktoren. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Schwaiger, S., Cervellati, R., Seger, C., Ellmerer, E. P., About, N., Renimel, I., Godenir, C., André, P., Gafner, F. und Stuppner, H. (2005). Leontopodic acid—a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties. *Tetrahedron* **61**: 4621–4630.
- Shanks, J. V. und Morgan, J. (1999). Plant hairy root culture. *Curr. Opin. bBiotech.* **10**: 151–155.
- Stojakowska, A., Malarz, J. und Kisiel, W. (2002). Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. *Plant Sci.* **163**: 1147–1152.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Stuppner, H., Ellmerer, E. P., Ongania, K.-H. und Dobner, M. (2002). Bisabolane Derivatives from *Leontopodium alpinum*. *Helv. Chim. Acta.* **85**: 2982–2989.
- Stuppner, H. und Schwaiger, S. (2009). Universität Innsbruck. [http://www.uibk.ac.at/ipoint/news/uni\\_und\\_forschung/662327](http://www.uibk.ac.at/ipoint/news/uni_und_forschung/662327).
- Vasconsuelo, A. und Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* **172**: 861–875.
- Weising, K. und Kahl, G. (1992). Natural genetic engineering of plant cells : the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 327–351.
- Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W.-K. und Wu, J. (2004). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag+ elicitation and nutrient feeding. *Planta Med.* **70**: 147–51.

# Lebenslauf

## Stephanie Prisching



### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 23.12.1984

Geburtsort: St. Pölten

Familienstand: ledig

Nationalität: Österreich

Adresse: Traismauerstraße 34, A- 3134 Nußdorf

Email: stephanieprisching@gmail.com

### Ausbildung:

1991-1995 Volksschule: 3133 Traismauer, Alter Schulweg 2

1995-2003 AHS: 3500 Krems, Ringstrasse 33

Seit Oktober 2003 Studium der Pharmazie

### Fremdsprachen:

Englisch, Französisch

### Berufserfahrung:

Sommer 2000/2001: N.Ö. Pressehaus, 3100 St. Pölten

Juli 2002 und 2003: Schubert Apotheke, 1120 Wien

Juli 2004 - August 2011: N.Ö. Pressehaus, 3100 St. Pölten

September 2006 - April 2012: Apotheke Zur Mutter Gottes, 3133 Traismauer

Sommer 2009/ 2010/ 2011: Apotheke zur Mariahilf, 3150 Wilhelmsburg

Oktober 2011: Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie, Universität Wien