



universität
wien

DIPLOMARBEIT

In vitro Kultivierung von *Leontopodium alpinum*
Cass.

Verfasserin

Kristina Ondratschek

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin: Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner Betreuerin, Frau Professor Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp, die es mir ermöglicht hat, auf diesem Gebiet meine Diplomarbeit zu schreiben, und mir bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden hat. Weiters möchte ich mich bei Dr. Christoph Wawrosch bedanken, der mir immer seine Hilfe anbot, wenn es zu Schwierigkeiten während des Arbeitens oder der Beantwortung meiner Fragestellung kam. Bei Fragen bezüglich der Arbeitsvorgänge im Labor bekam ich Hilfe von Florian Gössnitzer, bei dem ich mich herzlich bedanken möchte.

Vor allem möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern für die finanzielle und moralische Unterstützung während der ganzen Studienzeit bedanken, denn so wurde mir diese Ausbildung ermöglicht. Auch bei meinem Freund und all meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleiteten und den Rücken stärkten, vor allem dann, wenn etwas nicht sofort gelang, bedanke ich mich.

Abkürzungen

B5	Nährmedium nach Gamborg et al. (1976)
½MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962) mit halber Konzentration an Makromolekülen
MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)
GA ₃	Gibberellinsäure
NAA	Naphthyllessigsäure
KIN	6-Furfurylaminopurin, Kinetin
LA2	Ansatz der Samen von <i>Leontopodium alpinum</i>
HR7	„hairy root“ Klonlinie 7

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. <i>Leontopodium alpinum</i> (Cass.)	1
1.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	4
1.3. Fragestellung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Pflanzenmaterial	9
2.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	10
2.3. Nährmedien	11
2.4. Infektion der Pflanzen	12
2.5. Kulturbedingungen	14
2.6. Kulturauswertung	15
3. Ergebnisse	17
3.1. Etablierung von Edelweiß-Klonlinien	17
3.2. Etablierung von „hairy roots“-Linien	21
4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	39
6. Summary	40
7. Literaturverzeichnis	41
Lebenslauf	47

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. *Leontopodium alpinum* (Cass.)

Leontopodium alpinum (Cass.), das Edelweiß, gehört zur Familie der *Asteraceae* und besteht aus etwa 30-40 Arten (Handel-Mazetti, 1927). Der Name stammt aus dem Griechischen und bedeutet λέων [léon] für Löwe und πόδιον [pódion] für Füßchen, also Löwenfüßchen, da die wollig-filzigen Hochblätter der Köpfchen einer Löwenpfote ähnlich sehen (Hegi, 1965).

Die Pflanze war ursprünglich in der mongolischen Steppe beheimatet. Nach der Eiszeit hat das Edelweiß hauptsächlich die Alpen, Karpaten und Pyrenäen besiedelt. Das Entstehungszentrum liegt also in den Gebirgen und Steppengebieten Südwest- und Zentralasiens, und genetisch weist nichts auf die Alpen hin, dennoch ist es heutzutage das Symbol des höchsten Gebirges im Inneren Europa (Pace et al., 2009, Hegi, 1965). In Österreich steht das Edelweiß seit 1886 unter Naturschutz (Dobner et al., 2004).

Man findet *Leontopodium*-Arten auf steinigen Wiesen, Berghängen und Kalkstein in einer Höhe von 220 bis zu 3140m (Dobner et al., 2003). Es ist eine mehrjährige Pflanze, deren oberirdische Teile eine große morphologische Vielfalt aufweisen und deren Wuchshöhe von 2-45 cm reicht (Hook, 1993). Der Wurzelstock ist walzenförmig, die Laubblätter sind lanzettlich, an der Unterseite stark behaart und am Grund bilden sie eine Rosette. Die Köpfchen, welche ungefähr 5mm lang sind, sind zu einer Trugdolde gehäuft. Diese ist von den charakteristischen weißen, wollig-filzigen Hochblättern umgeben. Die Blüten befinden sich auf den Köpfchen in der Mitte der sternförmigen Hochblatthülle und sind gelblich-weiß (Abb. 1, Seite 2). Die Früchte von *Leontopodium* sind 1mm lang, rau, stielrund und tragen einen aus am Grund miteinander verwachsenen Borsten gebildeten Pappus (Hegi, 1965).



Abb. 1: *Leontopodium alpinum* an seinem natürlichen Standort
(http://www.uibk.ac.at/ipoint/news/uni_und_forschung/662327.html)

Auf Grund des Aussehens und der Verwendung ist das Edelweiß auch unter anderen Namen bekannt, wie etwa Ruhrkraut (Speroni et al., 2006), Löwenfuß oder „Glacier Star“ (Dweck, 2004).

In der Volksmedizin ist *Leontopodium* weit verbreitet, wobei früher vor allem die oberirdischen Anteile genutzt wurden. Bereits im Jahr 1582 gab es Aufzeichnungen über die Verwendung dieser Pflanze. Zu dieser Zeit wurde sie hauptsächlich für die Behandlung von Durchfall und Ruhr verwendet (Tabernaemontanus, 1582). In Vorarlberg beispielsweise wurden die Blüten in Milch abgekocht und ebenfalls bei Durchfall und Beschwerden im Magen-Darmbereich angewendet (Kiene, 1992; Bitschnau, 1991). In Tirol galt *Leontopodium* außerdem als Mittel bei Angina, Bronchitis, Tonsillitis und als Antipyretikum, um Fieber zu senken (Knechtl, 1992; Wieser, 1995; Pickl-Herck, 1995). Hartwell (1968) beschreibt wiederum die Verwendung bei Krebserkrankungen, besonders Mammakrazinom, in der traditionellen polnischen Medizin.

Auch in Asien findet das Edelweiß Verwendung in der traditionellen Medizin: So werden verschiedene *Leontopodium*-Arten in Tibet bei Erkrankungen der Lymphknoten oder bei Metallvergiftungen angewendet (Kletter und Kriechbaum, 2001), in der Mongolei wiederum zur Therapie von Krebs, Durchfall, Hepatitis, Herzerkrankungen und Gelbsucht (Ligaa, 1996).

Interessant ist, dass es noch relativ wenig phytochemische Untersuchungen gibt, obwohl das Edelweiß eine sehr bekannte Pflanze ist, auch pharmakologische Studien fehlen (Stuppner et al., 2002).

Vor kurzem konnte anhand eines Versuches an Krotonöl-induzierten Ohrödemen von Mäusen gezeigt werden, dass Rohextrakte der Wurzeln von *Leontopodium* eine antiinflammatorische Wirkung aufweisen, indem sie die Leukotriensynthese hemmen (Dobner et al., 2004).

Untersuchungen der antimikrobiellen Aktivität von Dichlormethan-Extrakten, sowohl der oberirdischen Teile als auch der Wurzeln zeigten vor allem eine Wirksamkeit der Bisabolane gegenüber *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* (Dobner et al., 2003)

Zu den Inhaltsstoffen von *Leontopodium alpinum* zählen unter anderem Tannine, Flavonoide, Phenolsäuren und Cumarine (Dweck, 2004), ebenso Sesquiterpene (Comey et al., 1999), Benzofurane, Bisabolane und Lignane (Leoligin), welche an der Universität Innsbruck isoliert wurden (Reisinger et al., 2009). Die Extraktion der letztgenannten Substanzen erfolgte, ausgehend von luftgetrockneten Wurzeln, durch Mazeration mit Dichlormethan und Methanol. Der erhaltene Extrakt wurde eingeeengt und über Säulenchromatographie aufgetrennt. Die Struktur von Leoligin wurde mit Hilfe von ESI-MS und in weiterer Folge durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelt und über die 2D-NMR-Spektroskopieverfahren HMBC und NOESY bestätigt (Dobner et al., 2003).

Das Lignan Leoligin (IUPAC: [(2S,3R,4R)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)tetrahydrofuran-3-yl]methyl(2Z)-2-methylbut-2-enoat)) ist ein sekundärer Metabolit, welcher in den Wurzeln der Pflanze zu finden ist (Abb. 2, Seite 4). Diese Substanz ist gegen Verdickungen der Innenwand von Blutgefäßen wirksam. Ein Versuch an Mäusen zeigte, dass im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen eine einmalige Gabe von Leoligin unerwünschte Gefäßwandverdickungen in Venen-Bypässen deutlich reduzierte. Auch in einem *in vitro* Modell zeigte Leoligin eine hemmende Wirkung bei Hyperplasie (Reisinger et al., 2009).

Darüber hinaus wird die Gefäßinnenwand nicht angegriffen und bereits existierende Verdickungen werden reduziert. Die Idee, Stents mit Leoligin zu beschichten, so genannte „drug eluting stents“, wurde bereits zum Patent angemeldet. Lignane sind wichtige Verbindungen, welche in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eine große Rolle spielen könnten (Stuppner et al., 2009).

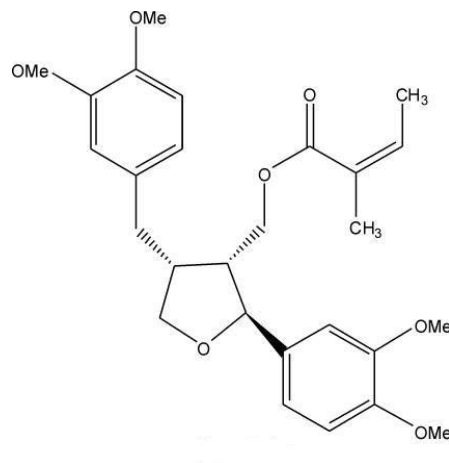


Abb. 2: Struktur des sekundären Metaboliten Leoligin

1.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes (Riker et al., 1930) gehört zur Gattung der Agrobakterien und ist ein gram-negatives Bodenbakterium, welches pflanzenpathogen wirkt. Das Bakterium dringt in verletztes Pflanzengewebe ein und löst so die sogenannte „hairy root – disease“ aus, was bedeutet, dass sie Wurzelwachstum an der betroffenen Stelle der Pflanze induzieren. Der molekulare Auslöser dieser Krankheit ist ein großes Plasmid, welches als Ri-Plasmid (root inducing plasmid) bezeichnet wird (Dingermann und Zündor, 1999; Guillon et al., 2006).

Entstehung von „hairy roots“:

Angelockt werden die Bakterien durch Acetosyringon, welches infolge einer Verwundung des Pflanzengewebes gebildet wird. Das Ri-Plasmid besitzt zwei wichtige Bereiche, zum einen die *vir*-Region, welche für den DNA-

Transfer codiert, und zum anderen die T-DNA, welche für das Wurzelwachstum verantwortlich ist. Die T-DNA des Ri-Plasmids wird geschnitten, transferiert und letztendlich in das Pflanzengenom integriert. Die veränderte Pflanzenzelle wird in Folge zum Wurzelwachstum angeregt. Außerdem werden in der nun genetisch veränderten Pflanzenzelle sogenannte Opine gebildet, welche als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die Agrobakterien dienen (Georgiev et al., 2007; Veena und Taylor, 2007).

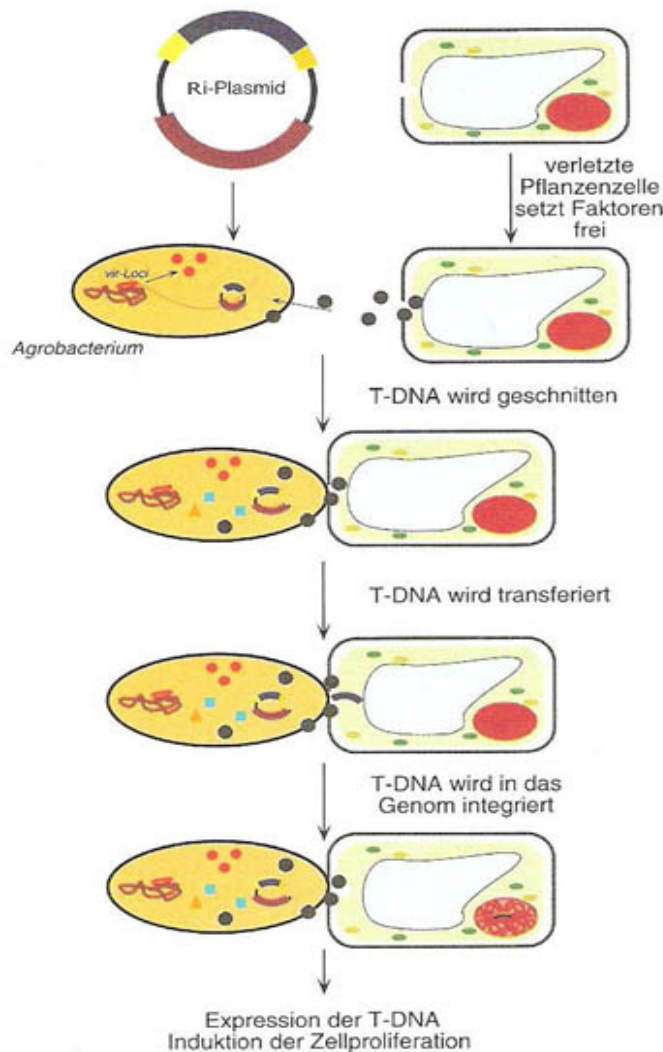


Abb. 3: Schema der Infektion einer Pflanze mit *Agrobacterium rhizogenes* (Dingermann und Zündorf, 1999)

„Hairy roots“-Kulturen werden oftmals gezielt hergestellt, da sie wichtige Vorteile gegenüber normalen Wurzeln besitzen. „Hairy roots“ wachsen schneller als normale, nicht transformierte Wurzeln. Zudem sind keine

zusätzlichen Wachstumsregulatoren im Nährmedium nötig und sie sind genetisch und biochemisch stabil (Shanks und Morgan, 1999; Guillon et al., 2006).

Um solche Kulturen herzustellen, werden zum Beispiel Blätter der Pflanzen durch Ritzen der Nerven mittels Skalpells verwundet und mit dem *Agrobacterium rhizogenes* infiziert. Kultiviert werden entstandene „hairy roots“ entweder auf festem oder in flüssigem Medium (Guillon et al., 2006). Die einzelnen Schritte werden in Abbildung 4 dargestellt.

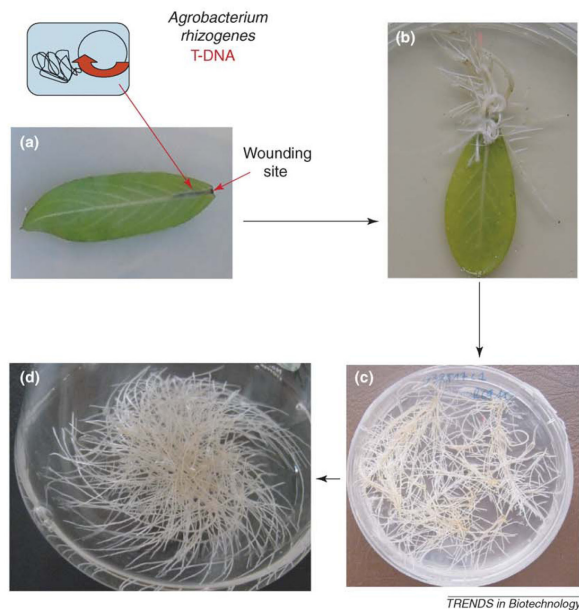


Abb. 4: Darstellung der Infektion einer Pflanze mit *Agrobacterium rhizogenes* (a), Entstehung von „hairy roots“ (b), Kultivierung auf festem (c) und in flüssigem Medium (d) (Guillon et al., 2006)

Außerdem kommt es vor, dass das Anlegen von „hairy roots“-Kulturen Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel einer Pflanze hat. Wie in der Literatur öfter beschrieben, ist es möglich, dass sich der Gehalt eines bestimmten Inhaltsstoffes ändert oder sich neue, ähnliche Strukturen bilden (Shanks und Morgan, 1999; Georgiev et al., 2007; Souret et al., 2003).

1.3. Fragestellung

Das eingangs beschriebene Lignan Leoligin kommt im Edelweiß nur in sehr geringer Konzentration vor. Aus etwa 800g luftgetrockneter Wurzel wurden bei der Extraktion mit Dichlormethan und Methanol nur knapp 40mg Reinsubstanz gewonnen (Dobner et al., 2003). Eine chemische Vollsynthese dieser Komponente wäre wahrscheinlich sehr aufwendig und wurde bislang noch nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser und folgender Arbeiten soll untersucht werden, ob in „hairy roots“ der sekundäre Metabolit Leoligin gebildet wird, und falls ja, in welchen Mengen er produziert wird.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Edelweiß-Samen oberflächensterilisiert und *in vitro* gekeimt werden. Zur Vermehrung einzelner Keimlinge sollten anschließend Sprosskulturen angelegt werden. Mit drei unterschiedlichen Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* sollten dann Infektionen durchgeführt werden, um zu „hairy roots“ zu gelangen.

Es sollte schließlich auch erhoben werden, in welchem Nährmedium die transformierten Wurzeln am besten wachsen und ob es Unterschiede in der Entwicklung hinsichtlich der verschiedenen Bakterienstämme gibt.

In der Literatur (Hook, 1994) wurde bereits die Induktion von „hairy roots“ an *Leontopodium alpinum* beschrieben, daher stellte sich nicht die Frage, ob dies grundsätzlich funktioniert.

Da „hairy roots“ schneller wachsen als normale Wurzeln, könnte man durch diese Organkulturen unter Umständen größere Mengen der Substanz in kürzerer Zeit gewinnen. Darüber hinaus könnten „hairy roots“ des Edelweiß auch neue, bislang unbekannte Lignane mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften bilden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Samen von *Leontopodium alpinum* Cass. der Firma Austrosaat AG, Wien, Österreich und der Firma Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt, Deutschland verwendet.

Um solche Samen in der Gewebekultur zur Etablierung einer *in vitro*-Kultur nutzen zu können, müssen sie oberflächensterilisiert werden.

2.1.1. Oberflächensterilisation

Die Sterilisation der Samen erfolgte zunächst mit 30proz. Ethanol für 10 Minuten. Anschließend wurden sie für 30 Minuten mit 20proz. Natriumhypochlorit-Lösung (NaOCl, W. Neuber's Enkel GmbH) behandelt und dann mit autoklaviertem Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Samen 10 Minuten mit autoklaviertem Wasser auf dem Magnetrührer gewaschen. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Etwa die Hälfte der Samen wurde vor der Sterilisation für 24 Stunden mit Gibberellinsäure (GA₃, 500ppm in wässriger Lösung) behandelt, um möglicherweise eine bessere Keimung zu erzielen (Strasburger et al., 1983). Zur Keimung wurden die Samen auf hormonfreies MS-Medium mit halber Konzentration an Makroelementen und 1% Saccharose gesetzt (siehe Kap. 2.3., Seite 11).

Um mögliche Auswirkungen verschiedener Sterilisationsmethoden zu testen, wurden einerseits die Konzentration der Natriumhypochlorit-Lösung und andererseits die Einwirkungsdauer verändert. So wurden die Samen einmal mit 20% NaOCl für 40 Minuten, einmal mit 25% NaOCl für 30 Minuten und einmal mit 25% NaOCl für 25 Minuten behandelt. Die anderen Arbeitsschritte änderten sich nicht.

2.1.2. Sprosskulturen

Nach etwa 3 bis 4 Wochen wurden die gekeimten Samen auf ein neues Medium mit Wuchsstoffen gesetzt (siehe Kap. 2.3., Seite 11), um

Sprosskulturen anzulegen. Dazu wurden die Wurzeln abgeschnitten und der Spross auf das neue Medium überimpft. Nach durchschnittlich 4 bis 5 Wochen hatten die Sprosse Seitensprosse gebildet und es wurden Klonlinien der Pflanzen hergestellt, indem wiederum die Wurzeln entfernt und die Seitensprosse voneinander getrennt wurden. Jeder Spross wurde einzeln auf das Medium gesetzt.

Subkultiviert wurde alle 4 bis 5 Wochen.

2.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Verwendet wurden folgende drei Stämme von *Agrobacterium rhizogenes*: ATCC15834, LBA9402 und TR105. Zur Verfügung gestellt wurden sie uns von Prof. Dr. Maike Petersen, Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Philips Universität Marburg, Deutschland.

Aufbewahrt wurden die Bakterienstämme auf festem YMB-Medium (siehe Kap. 2.3., Seite 11) bei 4°C im Dunklen. Suspensionskulturen wurden nur bei Bedarf hergestellt. Hierfür wurden 20ml flüssiges YMB-Medium mittels einer Impföse mit Bakterien beimpft und für 2 Tage im Dunklen bei 25°C kultiviert.

Um Dauerkulturen anzulegen, wurden die Bakterien von flüssigem auf festes YMB-Medium gebracht. Man kultivierte für 2 Tage bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ im 16h-Tag (Lichtstärke $40\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), um die Bakterien anwachsen zu lassen. Anschließend wurden sie wieder bei 4°C im Dunklen aufbewahrt (Abb. 5).

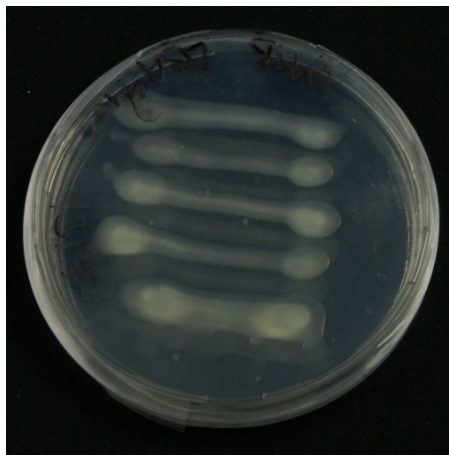


Abb.5: Dauerkultur des Bakterienstammes LBA9402 auf YMB-Medium

2.3. Nährmedien

Als Basisnährmedium diente das MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962).

Zur Samenkeimung wurde festes MS-Medium mit halber Konzentration an Makroelementen ($\frac{1}{2}$ MS) und 1% Saccharose eingesetzt.

Das Medium, welches zur Herstellung der Sprosskulturen und anschließenden Klonlinien verwendet wurde, war ein modifiziertes MS-Medium (MEW), dem nach Hook (1993) 0,55 μ M Naphthyllessigsäure (NAA), 0,25 μ M Kinetin (KIN), 0,4mg/l ThiaminHCl, 80mg/l Myo-Inosit, 100mg/l Caseinhydrolysat und 7g/l Agar zugefügt wurden. Die verwendeten Wuchsstoffe sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Wuchsstoffe, welche dem Nährmedium MEW zugesetzt wurden

Abkürzung	chemische Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
NAA	α -Naphthyllessigsäure	Sigma	N-0640
KIN	6-Furfurylaminopurin Kinetin	Sigma	K-0753

Nach der Infektion mit Agrobakterien wurden die Explantate wieder auf MS-Medium mit halber Konzentration an Makroelementen überimpft, Sprosse wurden in HIPP-Gläsern kultiviert und isolierte Blätter in Petrischalen.

Für den Versuch der Kultivierung von „hairy roots“ wurde zusätzlich zu MS- und $\frac{1}{2}$ MS-Medium das Medium B5 (Gamborg et al., 1976) verwendet.

Als Nährmedium für die Bakterien diente das YMB-Medium (Wright et al., 1930), welches 0,5g K_2HPO_4 , 0,2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g NaCl, 0,4g Hefeextrakt und 10g Mannitol in 800ml H_2O enthält.

Herstellung der Nährmedien:

Zunächst wurde etwa ein Drittel, der herzustellenden Menge, destilliertes Wasser vorgelegt. Anschließend wurden Makroelemente, Spurenelemente, Vitamine, Myo-Inosit, Saccharose und gegebenenfalls Wuchsstoffe in Form von Stammlösungen zugefügt. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte

durch Auflösen der entsprechenden Menge an Festsubstanz in destilliertem Wasser. Bis auf KNO_3 wurden alle Stammlösungen im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Schluss wurde mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und der pH-Wert mittels KOH bzw. HCl auf $5,7 \pm 0,1$ eingestellt.

Um Festmedien herzustellen, kann man Agar oder Gelrite® verwenden. Für die Samenkeimung und für die Kultivierung nach Infektion mit *Agrobacterium* setzten wir 3g/l Gelrite® ein, zur Vermehrung der Pflanzen über Sprosskultur kam Agar (7g/l) zum Einsatz (Hook, 1993). Alle Bestandteile waren von laborüblichem Reinheitsgrad (p.a. bzw. für biochemische Zwecke). Als Kohlenhydratquelle wurde handelsüblicher Haushaltszucker verwendet.

Nach der Abfüllung in die entsprechenden Kulturgefäße wurden die Medien im Autoklav für 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Gelagert wurden die Medien bei 5°C im Dunklen.

2.4. Infektion der Pflanzen

Sobald genug Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, konnten Infektionen mit 2 Tage alten *Agrobacterium*-Suspensionen durchgeführt werden.

Um die Pflanze zu infizieren, wurde der Blatthauptnerv mit einem Skalpell, das zuvor in die Bakteriensuspension getaucht wurde, vorsichtig geritzt (Santos et al. 2005). Eine weitere Methode war, einzelne Blätter abzutrennen, zu ritzen und diese auf das Medium in Petrischalen zu legen (Saleh und Thuc, 2009), wie in Abbildung 6 (Seite 13) zu sehen ist. Ebenso wird die Methode, den Blatthauptnerv vorerst zu ritzen und anschließend 1 bis 2 Tropfen Bakteriensuspension aufzutragen, in der Literatur beschrieben, in dieser Arbeit allerdings nicht angewendet (Hamill und Lidgett, 1997).

Eine Hälfte der Kulturen wurde bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in 16h-Tag (Lichtstärke $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), die andere im Dunklen inkubiert.

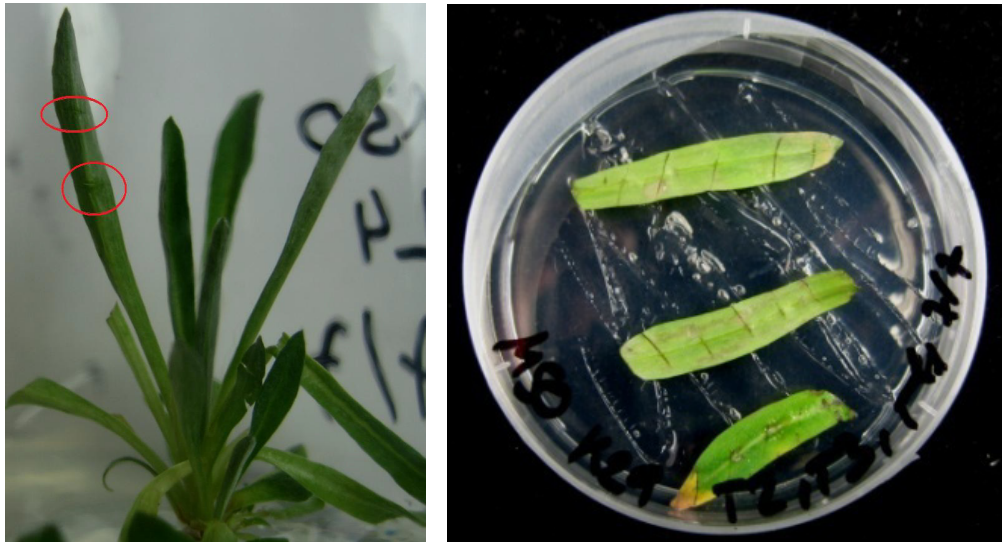


Abb. 6: Infektionen mit *Agrobacterium rhizogenes* durch Anritzen des Blatthauptnervs und durch Ritzen isolierter Blätter von *Leontopodium alpinum*

Behandlung mit Antibiotikum:

Durchschnittlich dauerte das Entstehen der transformierten Wurzeln 4-6 Wochen. Um die Bakterien nach Ausbildung der „hairy roots“ abzutöten, wurden sie mit Antibiotikum behandelt. Dafür wurden die Wurzeln vom Blatt abgetrennt und in flüssigem MS-Medium, welches 500mg/l Cefotaxim-Natrium (Claforan 1,0g Trockenstechampullen, Sanofi Aventis) enthielt, weiterkultiviert. Dazu wurde eine Stammlösung des Antibiotikums (0,625g in 5ml Aqua dest.) hergestellt, von der 100µl in 25ml Medium verwendet wurde. Behandelt wurde 2 mal für jeweils 10 Tage, um alle Bakterien zu eliminieren. Einmal in der Woche wurden Stichproben genommen, um zu überprüfen, ob das Medium frei von Bakterien war. Dies erfolgte mit einer Impföse, mit der man eine Petrischale mit YMB-Medium ausstrich und für 2 Tage bei 25°C im Dunklen inkubierte.

Kultiviert wurden die behandelten Wurzeln bei $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunklen am Rotationsschüttler.

Weiterkultivierung der „hairy roots“:

Nachdem 2 mal 10 Tage vergangen waren, wurden, wenn möglich, Klonlinien der „hairy roots“ hergestellt. Hierfür wurden die „hairy roots“ vorsichtig geteilt und auf die drei verschiedenen flüssigen Nährmedien MS, $\frac{1}{2}$ MS und B5 aufgeteilt. Jene „hairy roots“-Linien, welche zu klein waren, um

zu diesem Zeitpunkt Klonlinien herzustellen, wurden weiterhin in MS-Medium kultiviert.

2.5. Kulturbedingungen

Samenkultur:

Die Keimung der Samen erfolgte in Gläsern der Fa. HIPPI, welche mit Magenta B-Caps verschlossen wurden. In jedes Glas wurden 40ml Nährmedium gefüllt. Die Kultivierung erfolgte bei einer Raumtemperatur von $25\pm 1^\circ\text{C}$ in 16h-Tag (Lichtstärke $40\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%.

Sprosskultur:

Für die Kultivierung der Sprosskulturen und Herstellung der Klonlinien wurden Epprovetten (25mm i.D., Länge 150mm) verwendet, welche mit 13ml des modifizierten MS-Medium MEW (siehe Kap. 2.3., Seite 11) befüllt und mit Magenta 2-way caps verschlossen wurden.

Die Kulturen wurden bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ in 16h-Tag (Lichtstärke $40\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten.

Bakterienkultur:

Die Bakterienstämme in Petrischalen wurden ebenfalls bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ in 16h-Tag (Lichtstärke $40\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 2 Tage angezogen, um sie anschließend bei 4°C im Dunklen aufzubewahren. Jede Petrischale wurde mit etwa 30ml festem YMB-Medium (siehe Kap. 2.3., Seite 11) befüllt.

Für die Suspensionskulturen wurden 100ml Erlenmeyerkolben mit je 20ml YMB-Medium verwendet. Die Bakterien wurden am Schüttler mit 70 Umdrehungen pro Minute bei einer Raumtemperatur von $25\pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% gehalten.

Die mit *Agrobacterium* infizierten Pflanzen wurden in HIPPI-Gläsern mit je 40ml Nährmedium entweder bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ in 16h-Tag (Lichtstärke $40\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) oder bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ im Dunklen bzw. unter indirekter Lichteinstrahlung kultiviert.

„hairy roots“-Kulturen:

Die entstandenen „hairy roots“ wurden in 100ml Erlenmeyerkolben mit 25ml Nährmedium überimpft, welche mit Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen waren. Kultiviert wurden diese wiederum im Dunklen am Rotationsschüttler bei 70 Umdrehungen pro Minute und einer Raumtemperatur von $25\pm 1^\circ\text{C}$.

2.6. Kulturauswertung

Keimrate:

Nach etwa einer Woche begannen die Samen zu keimen. Nachdem nach 2-3 Wochen nicht viel Veränderung zu sehen war, wurde nach dieser Zeit die Keimrate ermittelt. Hierfür wurden die einzelnen Samen und jede gekeimte Pflanze gezählt und die Keimrate prozentuell berechnet.

Sprosskulturen:

Die Auswertung der Sprosskulturen erfolgte danach, ob man eine Pflanze weiterkultivieren bzw. Klonlinien herstellen konnte oder nicht. Es wurden nur Sprosse verwendet, welche Wurzeln gebildet hatten und nicht zur Hyperhydratisierung (Abb. 7) neigten. Um Klonlinien herzustellen, musste die Pflanze Seitensprosse gebildet haben, wie man in Abbildung 8 (Seite 16) erkennen kann.



Abb. 7: Hyperhydratisierung von *Leontopodium alpinum* auf MS- Medium



Abb. 8: Bildung von Seitensprossen in einer Sprosskultur von *Leontopodium alpinum* auf Medium MEW

Transformationsrate:

Es wurden jene Pflanzen gezählt, bei denen die Ausbildung von „hairy roots“ zu sehen war. Dabei war es bei der weiteren Auslegung der Ergebnisse von Bedeutung, mit welchem Bakterienstamm die Pflanze infiziert worden war. Protokolliert wurde auch, nach welchem Zeitraum die transformierten Wurzeln entstanden waren.

„hairy roots“-Linien:

Die Auswertung des Wachstums der „hairy root“-Linien in den drei getesteten Nährmedien erfolgte optisch nach 4, 5 und 6 Wochen. Die Kolben wurden nebeneinander gestellt, fotografiert und dann beurteilt, in welchem Nährmedium die Wachstumsrate am größten war.

3. Ergebnisse

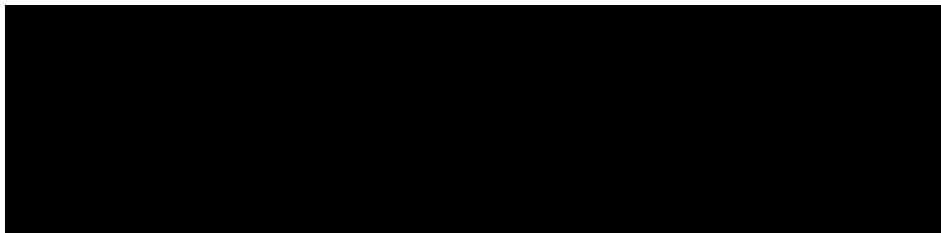
3.1. Etablierung von Edelweiß-Klonlinien

3.1.1. Samenkeimung

Bei Samen, die unter normalen Bedingungen niedrige Keimraten aufweisen, ist es möglich, die Keimung durch den Zusatz von Gibberellinsäure zu fördern (Strasburger et al., 1983). Aus diesem Grund wurde für den Versuch der *in vitro*-Keimung etwa die Hälfte der Samen für 24 Stunden mit einer 5proz. wässrigen Lösung von GA₃ behandelt. Anschließend wurden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen (siehe Kap. 2.1.1., Seite 9). Anfangs wurden vier verschiedene Ansätze gemacht. Von den Samenchargen der Firmen Jelitto und Austroaat AG wurde je ein Teil mit GA₃ behandelt, der andere Teil wurde ohne Vorbehandlung oberflächensterilisiert.

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Ansätze zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die Samenkeimungs-Ansätze LA2-LA4 bezüglich Ursprung und Vorbehandlung



Die nachfolgende Grafik (Abb. 9, Seite 18) stellt die Keimrate prozentuell dar.

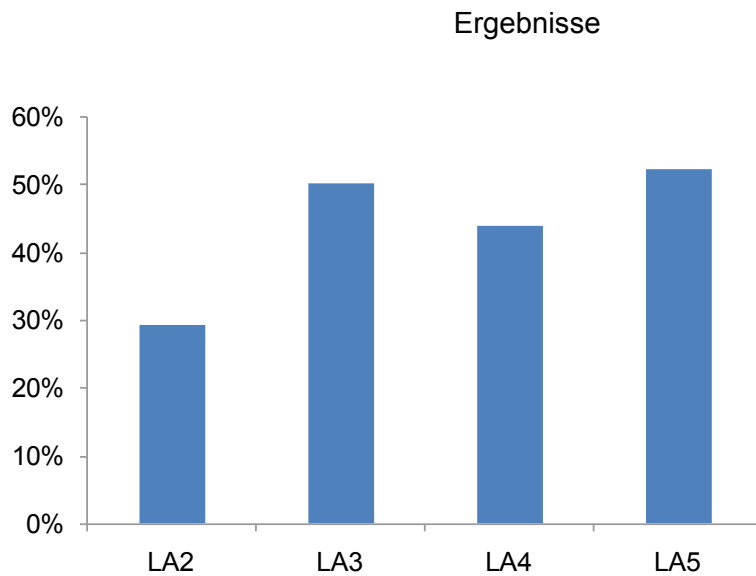


Abb. 9: Prozentuelle Darstellung der Keimraten der oberflächensterilisierten Samen von *Leontopodium alpinum*, Ansätze LA2-LA5 (bezogen auf kontaminations-freie Samen)

Eine interessante Beobachtung war, dass bei den Samen der Austroaat AG tatsächlich eine deutlich höhere Keimrate durch Vorbehandlung mit GA_3 erzielt werden konnte. Bei den Samen von Jelitto allerdings war kein großer Unterschied zwischen den beiden Chargen zu sehen. Hier keimten sogar mehr Samen des unbehandelten Ansatzes.

Nachdem der mikrobiologische Befall bei den Jelitto-Samen deutlich höher war und es somit mehr Ausfälle gegeben hatte, wurden drei neue Ansätze mit stärkerer Oberflächensterilisation durchgeführt, welche in der nachstehenden Tabelle angeführt sind. Alle Chargen wurden mit GA_3 vorbehandelt.

Tabelle 3: Übersicht über die Samenkeimungs-Ansätze LA6-LA8 mit stärkerer Oberflächensterilisation

--

Abbildung 10 (Seite 19) zeigt die resultierenden Keimraten.

Ergebnisse

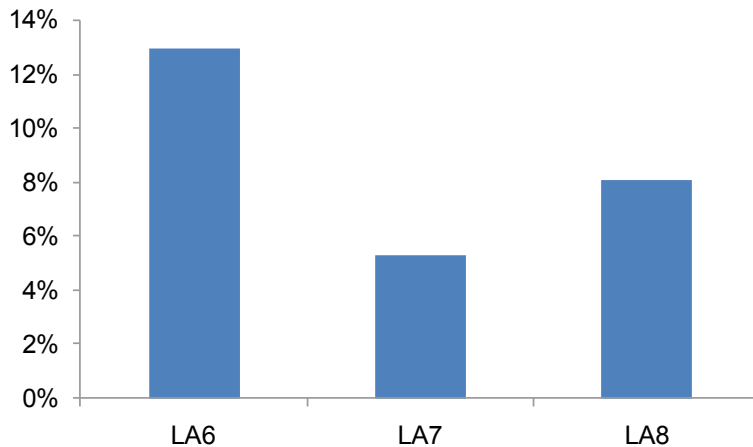


Abb. 10: Prozentuelle Darstellung der Keimraten der oberflächensterilisierten Samen von *Leontopodium alpinum*, Ansätze LA6-LA8

An diesem Ergebnis sieht man, dass durch die verstärkte Oberflächensterilisation nur noch sehr wenige Samen gekeimt waren. Da die Keimrate nicht im Vordergrund der Fragestellung dieser Arbeit stand, wurden keine weiteren Versuche durchgeführt, um eine optimale Oberflächensterilisation der Samen zu finden. Es standen genügend Keimlinge für die Etablierung von Sprosskulturen zur Verfügung.

Die Ansätze LA6, LA7 und LA8 wurden nicht zur Weitervermehrung verwendet.

3.1.2. Sprosskulturen

Nachdem die Keimrate ermittelt wurde und die Pflanzen eine Größe von etwa 2-3cm erreicht hatten, wurden sie auf das Medium MEW mit Wachstumsstoffen gesetzt.

Bei der Auswertung der Sprosskulturen wurden zwei Punkte berücksichtigt. Einerseits wurde berechnet, wie viele Pflanzen von $\frac{1}{2}$ MS Medium auf das Medium MEW (siehe Kap. 2.3, Seite 11) überimpft werden konnten, und andererseits wurde die Anzahl an Klonlinien ermittelt, welche durch Subkultivierung etabliert werden konnte.

Das nachstehende Diagramm (Abb. 11, Seite 20) zeigt, wie viele Pflanzen zur Vermehrung genützt werden konnten und vom Medium $\frac{1}{2}$ MS auf das Medium MEW überimpft wurden.

Ergebnisse

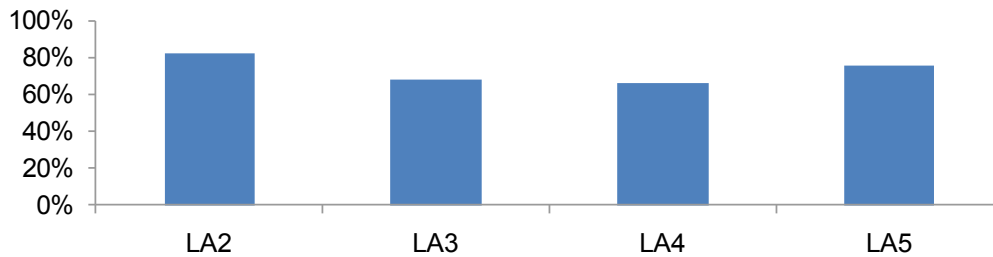


Abb. 11: Prozentuelle Darstellung der Sprosse, welche von $\frac{1}{2}$ MS auf das Medium MEW überimpft wurden, und der Vermehrung und Etablierung einer Sprosskultur dienten

Hier kann man sehen, dass es zwischen den unterschiedlichen Chargen keine gravierenden Unterschiede gab. Überraschend war, dass bei Ansatz LA2 zwar die Keimrate am niedrigsten war, prozentuell aber die meisten Pflanzen (80%) auf das neue Medium überimpft werden konnten. Bei den Ansätzen LA3 und LA4, welche mit GA_3 vorbehandelt waren, neigten mehr Pflanzen zur Hyperhydratisierung und konnten somit nicht weiterverwendet werden.

Um Pflanzen subkultivieren zu können, mussten sie Seitensprosse gebildet haben, damit man sie teilen konnte. Abbildung 12 zeigt, aus wie vielen Sprossen (bezogen auf Abb. 11) Klonlinien hergestellt werden konnten.

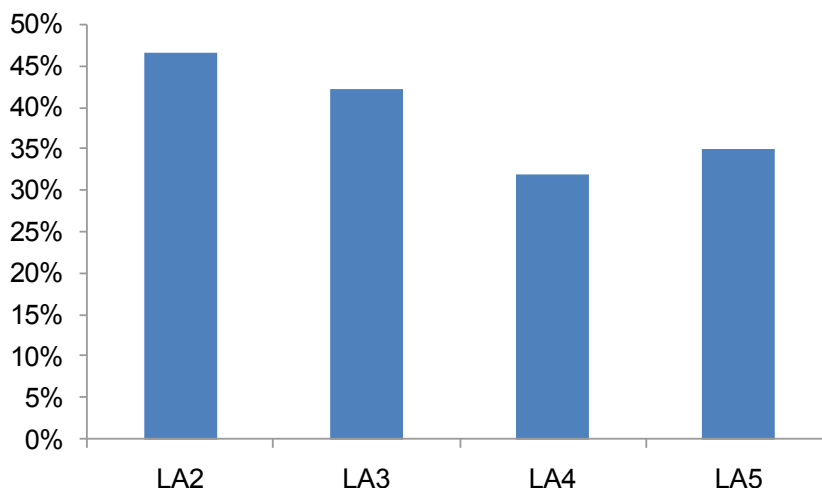


Abb. 12: Prozentuelle Darstellung der hergestellten Klonlinien (bezogen auf das Ergebnis von Abb. 11) durch Seitensprossbildung

Man kann erkennen, dass der Ansatz LA2 mit 47% den anderen Chargen überlegen ist und bei Ansatz LA4 (32%) die wenigsten Klonlinien hergestellt werden konnten.

Ergebnisse

Im anschließenden Diagramm werden alle Chargen auf dem Medium MEW zusammengefasst, um einen Überblick zu geben, wie die hergestellten Klonlinien im Verhältnis zu den verworfenen Proben stehen.

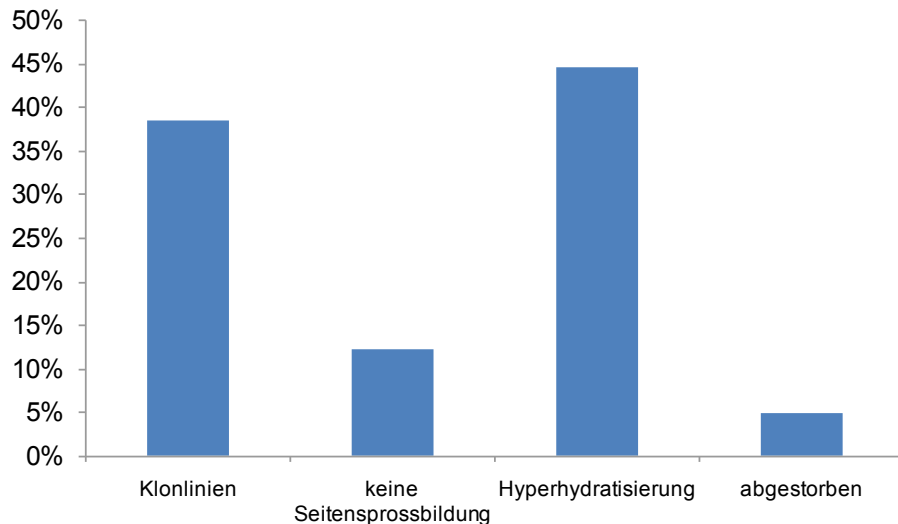


Abb. 13: Darstellung des Verhältnisses der hergestellten Klonlinien gegenüber jenen Proben, welche nicht weiterverwendet werden konnten

Von insgesamt 229 Pflanzen (=100%) auf Medium MEW konnten 88 Klonlinien hergestellt werden. Fast die Hälfte, nämlich 102 Pflanzen, neigten zur Hyperhydratisierung, und 11 Pflanzen waren abgestorben. Die restlichen Exemplare wuchsen gut, bildeten aber keine Seitensprosse aus und konnten somit nicht weiterverwendet werden.

3.2. Etablierung von „hairy roots“-Linien

Zur Induktion der Bildung von „hairy roots“ wurden, wie schon beschrieben, die Bakterienstämme ATCC15834, LBA9402 und TR105 verwendet.

Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 7 Wochen 404 Infektionen durchgeführt. Davon wurden bei 110 Proben einzelne Blätter der Pflanze mit dem Skalpell angeritzt (siehe Kap. 2.4., Seite 12) und auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in Petrischalen gelegt. Die restlichen 294 Pflanzen wurden nach der Infektion in HIPP-Gläsern kultiviert.

Ergebnisse

Etwa die Hälfte der Proben wurde im Licht kultiviert, die andere Hälfte im Dunklen bzw. unter indirekter Lichteinstrahlung. Es wurde beobachtet, unter welchen Bedingungen die Pflanzen „hairy roots“ ausbildeten.

Nachdem bereits nach wenigen Tagen alle Edelweißkulturen im Dunklen vertrocknet und abgestorben waren, wurden die nächsten Ansätze versuchsweise auch unter indirektem Licht kultiviert - dafür wurde Alufolie über die Kulturgefäße gelegt. Die im Dunklen abgestorbenen Pflanzen wurden verworfen und in kein Ergebnis miteinbezogen.

Hook (1993) hatte in ihren Untersuchungen beobachtet, dass sich „hairy roots“ beim Edelweiß sieben Wochen nach Infektion bildeten. In unseren Versuchen konnten wir das Erscheinen von Wurzeln drei bis fünf Wochen nach Infektion feststellen, unabhängig vom eingesetzten Bakterienstamm. Im Mittel bildeten sich „hairy roots“ nach vier Wochen (Abb. 14).

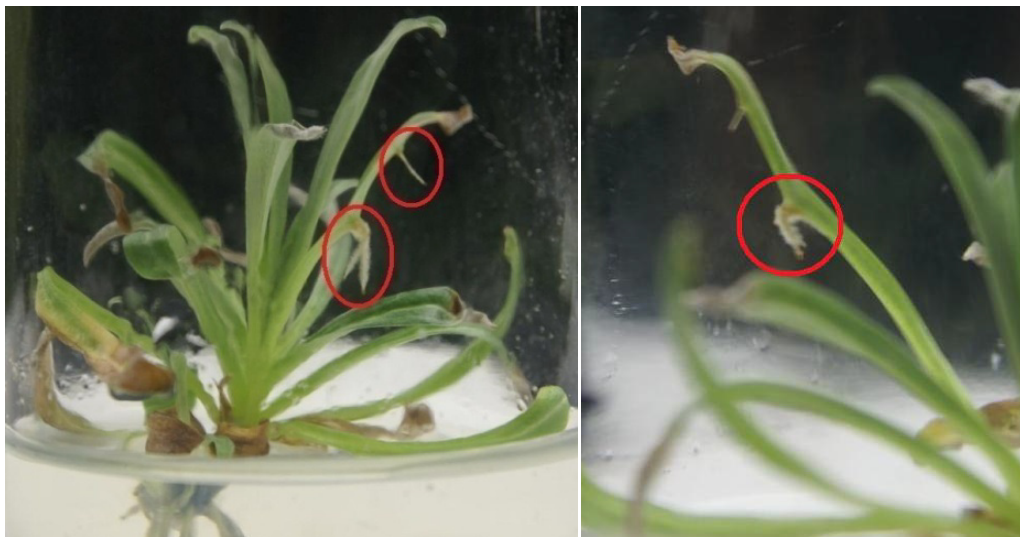


Abb. 14: „Hairy roots“- Bildung an *Leontopodium alpinum* nach Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes*

Transformationsrate

Die beiden Infektionsarten, Sprosskultur und isolierte Blätter, resultierten in unterschiedlichen Transformationsraten, wie aus Abbildung 15 (Seite 23) ersichtlich ist.

Man kann erkennen, dass bei *Leontopodium alpinum* die Methode mit isolierten Blättern eine geringe Effizienz aufwies. Die Transformationsrate an Sprosskulturen betrug hingegen knapp über 30%.

Ergebnisse

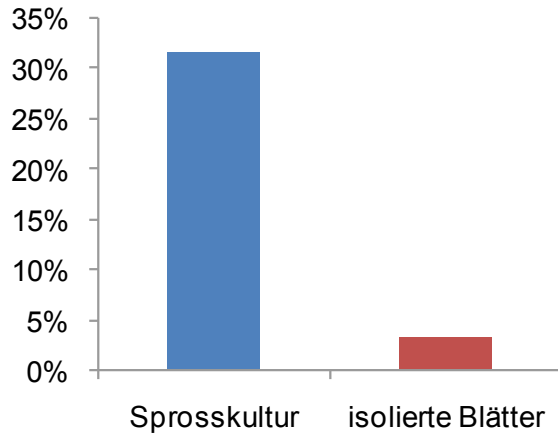


Abb. 15: Transformationsraten von Sprosskulturen (Kultur in HIPP-Gläsern) und von isolierten Blättern (Kultur in Petrischalen)

Die folgende Abbildung zeigt den Einfluss der Lichtbedingungen auf die Transformationsraten. Es ist sofort ersichtlich, dass die Infektion von Sprosskulturen zu wesentlich besseren Ergebnissen führte als der Einsatz von isolierten Blättern. Die Kultivierung im Licht schien außerdem ein wesentlicher Faktor für die Induktion von „hairy roots“ zu sein. Etwa 42% der Sprosskulturen, welche im Licht kultiviert wurden, zeigten „hairy roots“-Bildung.

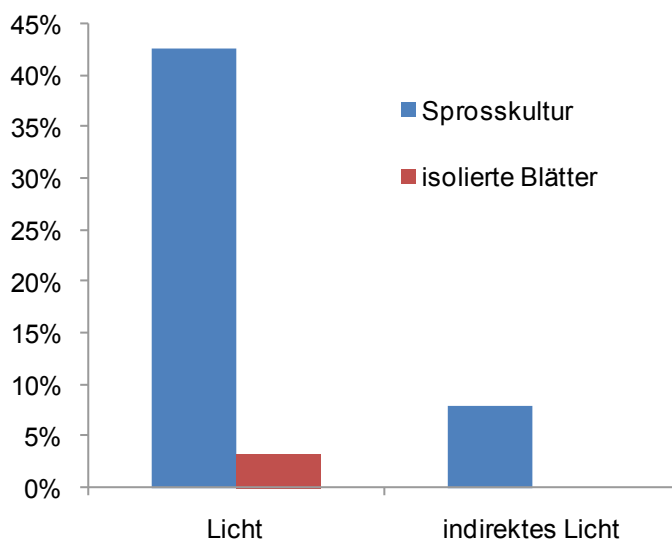


Abb. 16: Einfluss der Lichtbedingungen auf die „hairy roots“-Bildung an Sprosskulturen und an isolierten Blättern von *Leontopodium alpinum*

Ergebnisse

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse aus den Infektionsversuchen an Sprosskulturen behandelt, da der Einsatz von isolierten Blättern zu keinen nennenswerten Transformationen geführt hatte.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass in Summe knapp über 80% aller Sprosskulturen, kultiviert im Licht, überlebte. Etwa die Hälfte davon zeigte „hairy roots“-Bildung, die andere Hälfte wuchs ohne Produktion von „hairy roots“ weiter. Ein deutlich geringerer Prozentsatz der Kulturen überlebte nicht im Licht. Unter indirekter Lichteinstrahlung hingegen starben mehr als zwei Drittel der Sprosskulturen und bei weniger als 10% waren „hairy roots“ zu sehen.

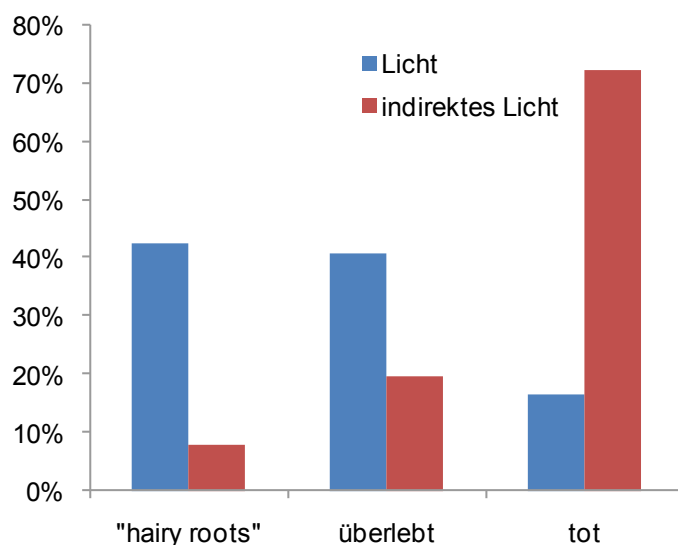


Abb. 17: Einfluss der Lichtbedingungen auf die Entstehung von „hairy roots“ bzw. das Absterbender Sprosskulturen von *Leontopodium alpinum*

Wie bereits aus den vorherigen Diagrammen ersichtlich, wurden bei Kultivierung im Licht deutlich bessere Ergebnisse erzielt als unter indirektem Licht.

Bei der Infektion mit dem Bakterienstamm TR105 wurden nur unter Lichtbedingungen „hairy roots“ gebildet, die Kultivierung im indirekten Licht führte zu keiner Wurzelbildung. Die beiden anderen Stämme ATCC15834 und LBA9402 induzierten vergleichbare Wurzelbildung, wobei durch letzteren Stamm etwas bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Im Gegensatz zu Stamm TR105 kam es auch unter indirektem Licht zur Bildung von „hairy roots“ (Abb. 18, Seite 25).

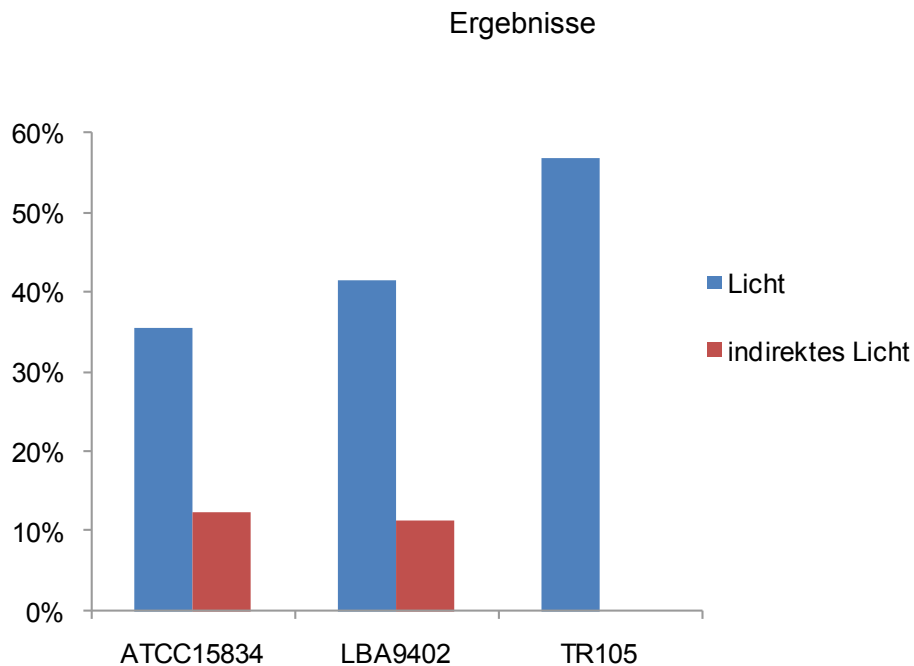


Abb. 18: Einfluss von Bakterienstamm und Lichtbedingungen auf die Bildung von „hairy roots“ an Sprosskulturen von *Leontopodium alpinum*

„hairy roots“ – Kulturen

Die transformierten Wurzeln wurden vom Spross entfernt und in flüssigem MS-Medium 2 mal 10 Tage mit dem Antibiotikum Cefotaxim-Natrium behandelt. Alle „hairy roots“-Klone, die nach etwa drei Wochen ausreichend gewachsen waren, wurden aufgeteilt und in den Flüssigmedien MS, $\frac{1}{2}$ MS und B5 weiterkultiviert. Alle anderen „hairy roots“ wurden in flüssigem MS-Medium zur Erhaltung weiterkultiviert. Das Wachstum der einzelnen Klonlinien wurde nach 4, 5 und 6 Wochen optisch bewertet. Insgesamt wurden 32 „hairy roots“-Linien (HR1-HR32) hergestellt.

Im Zuge der Auswertungen wurde festgestellt, dass bei wenigen Linien noch Bakterien vorhanden waren. Die transformierten Wurzeln wuchsen zwar weiterhin, diese Proben wurden aber verworfen und in die Auswertung nicht miteinbezogen. Die Ausfallrate betrug insgesamt 18%, offensichtlich hatte die Dauer der Antibiotikumbehandlung nicht immer ausgereicht, um alle Bakterien abzutöten.

Jene „hairy roots“-Klonlinien, welche durch die beiden Bakterienstämme ATCC15834 und TR105 induziert wurden, hatten in etwa dieselbe Wachstumsrate. Beim Stamm LBA9402 waren die meisten Ausfälle durch

Ergebnisse

Bakterienwachstum festzustellen und nur 30% entwickelten sich weiter, wie man in Abbildung 19 erkennen kann.

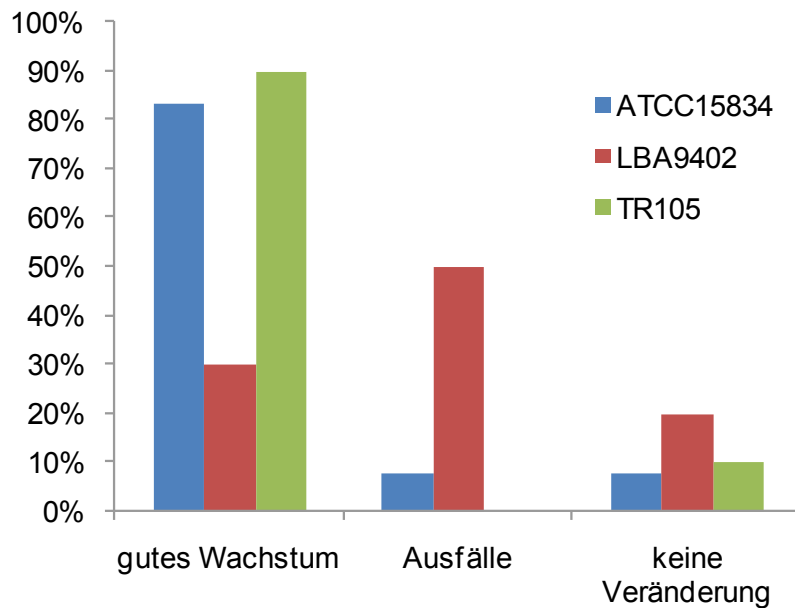


Abb. 19: Einfluss der unterschiedlichen Bakterienstämme auf das Wachstum von „hairy roots“

Es soll herausgefunden werden, in welchem Nährmedium die „hairy roots“-Linien, abhängig vom verwendeten Bakterienstamm, am besten wachsen. In der nächsten Grafik (Abb. 20, Seite 27) wird zunächst auf das Nährmedium, nicht aber auf die unterschiedlichen Bakterienstämme eingegangen. Jene Linien, welche verworfen wurden oder keine Veränderung zeigten (Abb. 19) werden in den nächsten Auswertungen nicht mehr berücksichtigt.

Das Medium B5 weist eine höhere Stickstoffkonzentration auf als die beiden anderen Nährmedien. Möglicherweise ist für die im Rahmen unserer Arbeit etablierten „hairy roots“ eine geringere Konzentration an Stickstoff von Vorteil: Wie man in Abbildung 20 (Seite 27) sehen kann, zeigten die Medien MS und $\frac{1}{2}$ MS bessere Ergebnisse, bezogen auf jene Proben, die Veränderungen bezüglich des Wachstums zeigten.

Ergebnisse

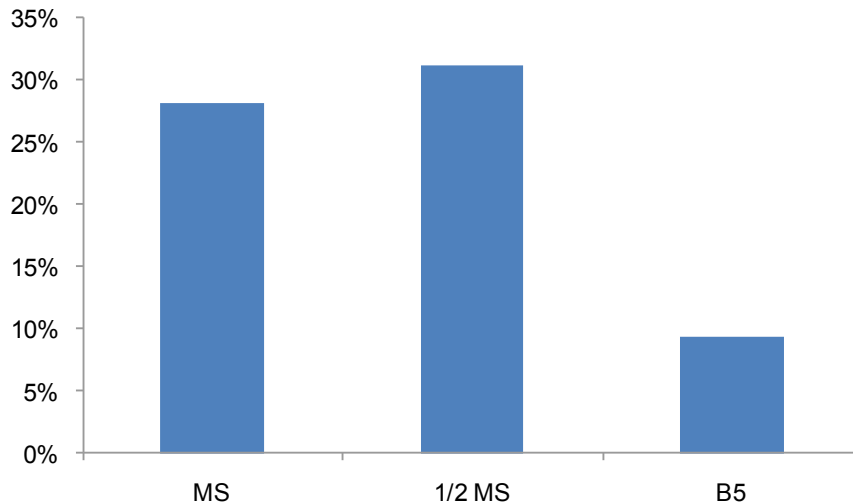


Abb. 20: Einfluss des Nährmediums auf das Wachstum der „hairy roots“-Klonlinien von *Leontopodium alpinum*

In Abbildung 21 (Seite 28) ist zu sehen, dass die „hairy roots“, durch Infektion mit TR105, im MS Medium mit halber Konzentration an Makroelementen am besten wuchsen, aber auch in Medium MS entwickelten sich einige gut weiter. Das Nährmedium B5 schien für die Kultivierung am wenigsten geeignet. „Hairy roots“-Linien, induziert durch den Bakterienstamm ATCC15834, wiesen die höchste Wachstumsrate in Medium MS auf, aber auch in den beiden anderen Medien kam es größtenteils zu einem guten Wachstum.

Jene „hairy roots“-Linien, welche durch Infektion mit LBA9402 gebildet wurden, wiesen die niedrigste Wachstumsrate auf. Am besten wuchsen diese im Nährmedium ½MS.

Ergebnisse

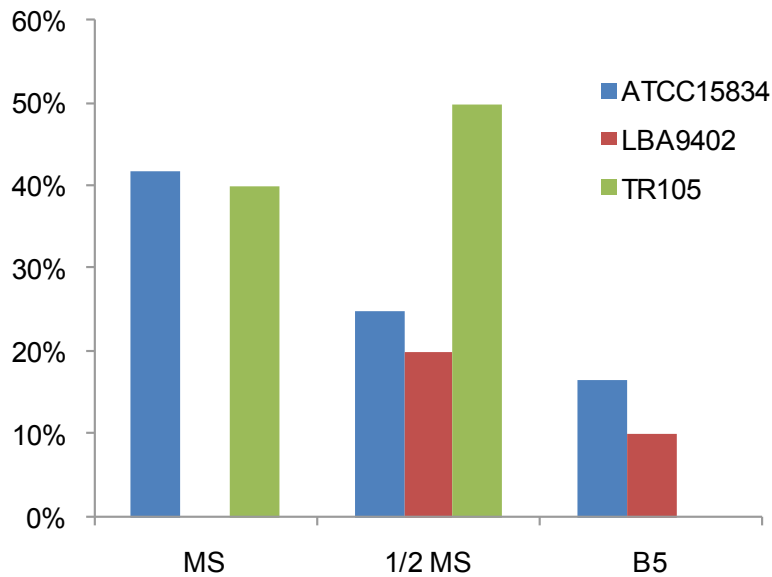


Abb. 21: Einfluss von Nährmedium und zur Infektion eingesetzten *Agrobacterium*-Stamm auf das Wachstum von „hairy roots“ des Edelweiß

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die unterschiedlichen Bakterienstämme, was *Leontopodium alpinum* betrifft, anders verhalten. Man kann allerdings schon erkennen, dass die Kultivierung in den beiden Medien MS und $\frac{1}{2}$ MS, abgesehen von LBA9402, ähnliche Ergebnisse aufweisen. Der Versuch, „hairy roots“ zu induzieren und anschließend zu kultivieren, funktionierte, bezüglich Transformationsrate und Wachstum, durch Infektion mit TR105 am besten. Hier hatte man keine Ausfälle und auch schon bei der Transformationsrate war zu sehen, dass durch Infektion mit dem *Agrobacterium*-Stamm TR105 die meisten „hairy roots“ erhalten wurden. Obwohl in der Literatur bei *Leontopodium* (Hook, 1994) zur Transformation der *Agrobacterium*-Stamm LBA9402 verwendet wurde, funktionierte er bei unseren Versuchen am schlechtesten.

Auf den Abbildungen 22-24 (Seite 29) kann man erkennen, wie gut, mit TR105 erhaltene „hairy roots“ in Medium $\frac{1}{2}$ MS im Vergleich zu den anderen beiden Medien, nach 4, 5 bzw. 6 Wochen ausgewertet, wuchs.

Angeimpft wurde jeweils eine 0,5 – 1cm große Wurzel.

Ergebnisse

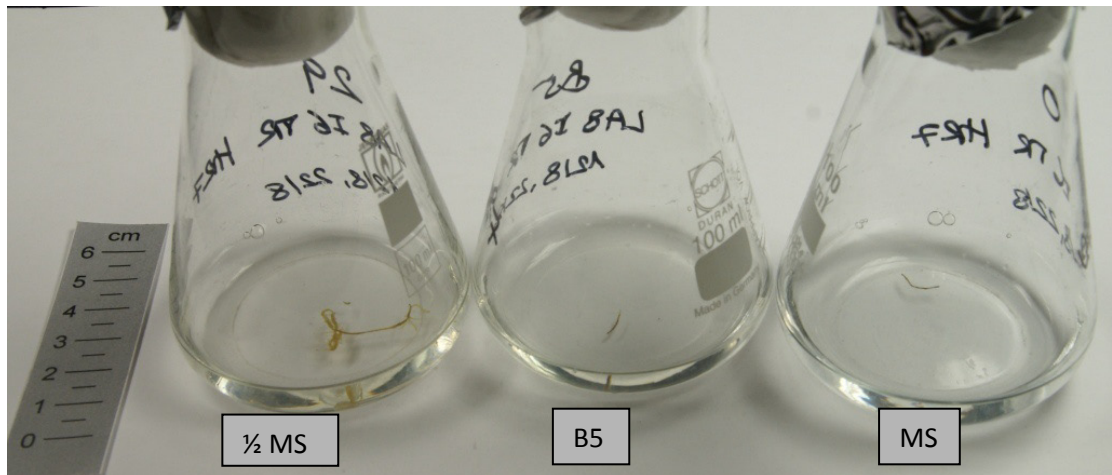


Abb. 22: Kulturen von Klon HR7 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm TR105) nach vier Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

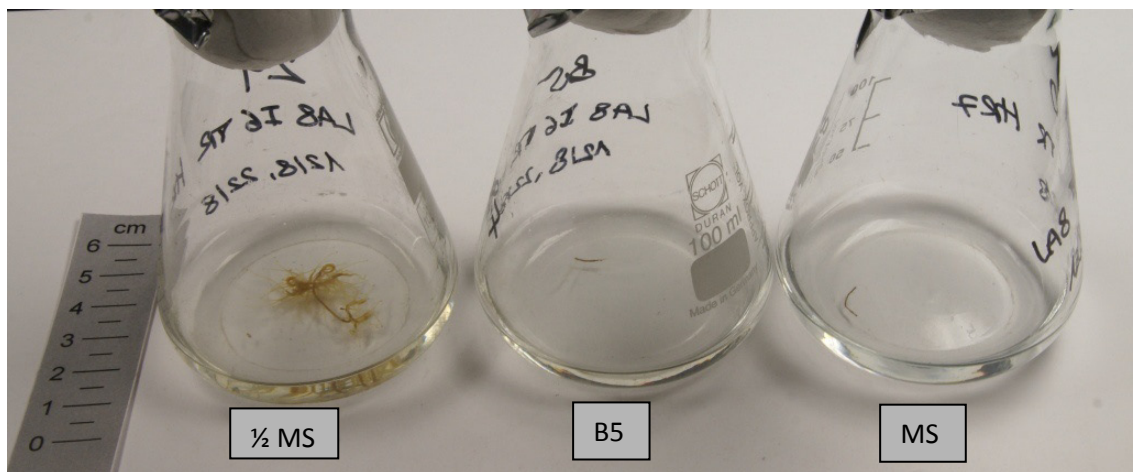


Abb. 23: Kulturen von Klon HR7 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm TR105) nach fünf Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

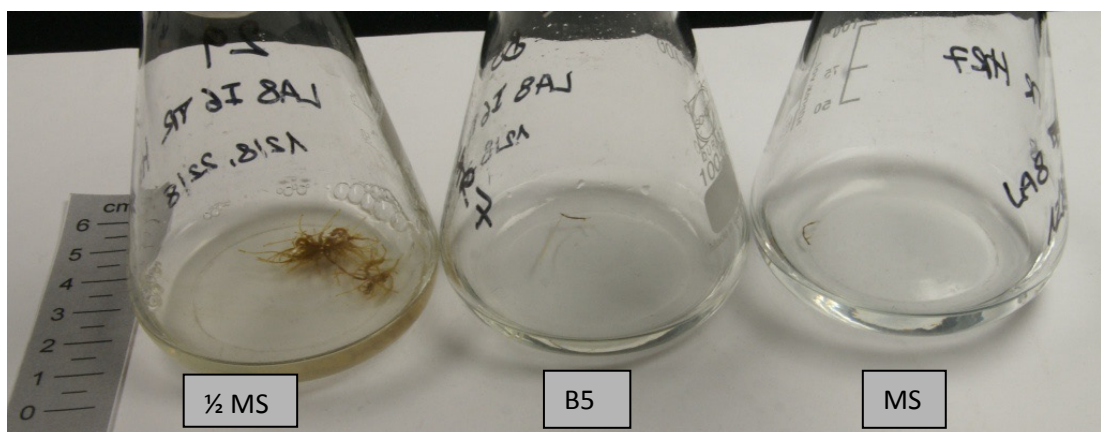


Abb. 24: Kulturen von Klon HR7 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm TR105) nach sechs Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

Ergebnisse

Die Abbildungen 25-27 (Seite 30, 31) veranschaulichen die Auswirkungen der verschiedenen Medien auf das Wachstum bei „hairy roots“, induziert durch den *Agrobacterium*-Stamm ATCC15834. Man kann erkennen, dass die „hairy roots“ im Medium MS am besten wuchsen.

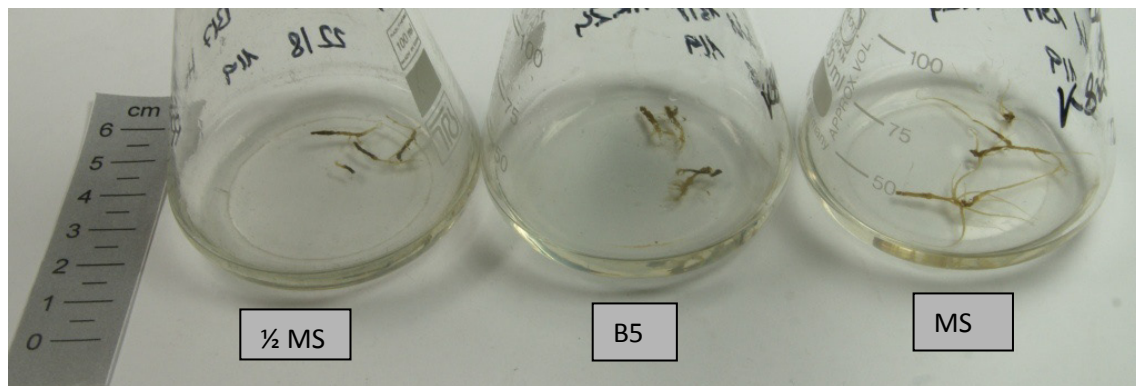


Abb. 25: Kulturen von Klon HR24 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ATCC15834) nach vier Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

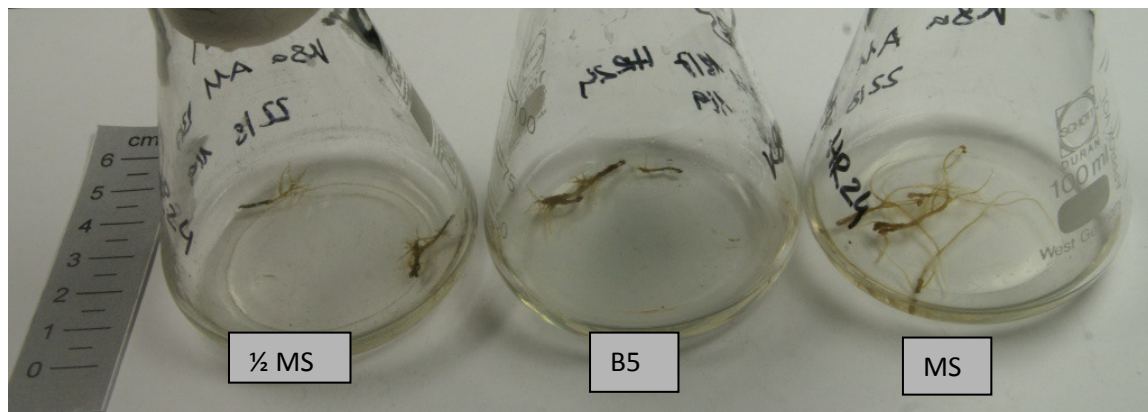


Abb. 26: Kulturen von Klon HR24 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ATCC15834) nach fünf Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

Ergebnisse

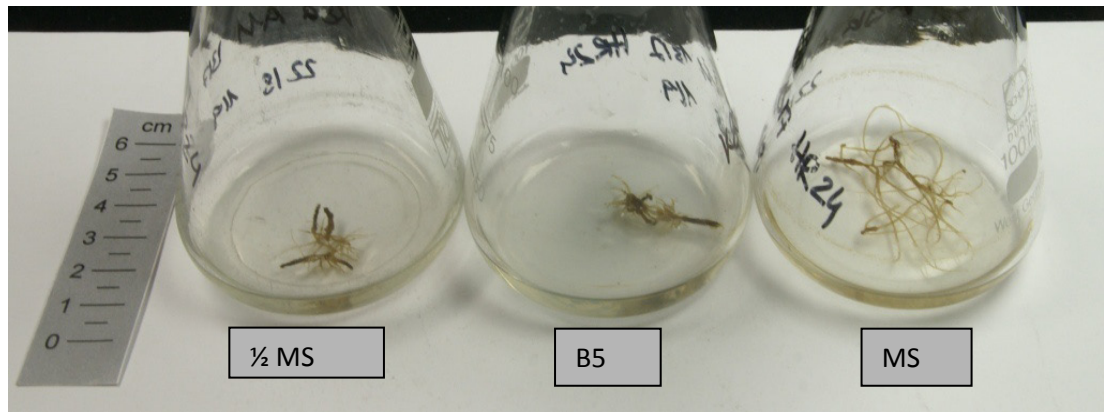


Abb. 27: Kulturen von Klon HR24 (Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ATCC15834) nach sechs Wochen in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS

Ergebnisse

4. Diskussion

Leontopodium alpinum (Cass.), aus der Familie der *Asteraceae*, ist eine mehrjährige Pflanze (Hook, 1993), welche auf steinigen Wiesen und Berghängen in Höhen bis zu 3140m zu finden ist (Dobner et al., 2003). In der Volksmedizin wird das Edelweiß hauptsächlich zur Behandlung von Durchfall, Beschwerden im Magen-Darmbereich und Bronchitis angewendet, aber auch um Fieber zu senken (Kiene, 1992; Knechtel, 1992).

Der für diese Arbeit wichtige Inhaltsstoff von *Leontopodium alpinum* ist das Leoligin, ein Sekundärmetabolit, welcher zur Klasse der Lignane gehört. Leoligin wirkt antiinflammatorisch (Dobner et al., 2004) und ist gegen Verdickungen der Innenwand von Blutgefäßen wirksam (Reisinger et al., 2009). Da Leoligin im Edelweiß nur in geringer Konzentration vorkommt (Dobner et al., 2003), sollte untersucht werden, ob man mit Hilfe von „hairy roots“ eine größere Menge an Reinsubstanz gewinnen kann. In der Literatur wurde die Herstellung und Kultivierung von „hairy roots“-Kulturen an *Leontopodium alpinum* bereits beschrieben (Hook, 1994).

„Hairy roots“-Kulturen werden hergestellt, um gewisse Vorteile gegenüber normalen Wurzeln zu nutzen. Zum einen wachsen sie schneller als normale, nicht transformierte Wurzeln, außerdem werden keine zusätzlichen Wachstumshormone in den Nährmedien benötigt (Shanks und Morgan, 1999). Zum anderen kann es vorkommen, dass sich der Gehalt eines bestimmten Inhaltsstoffes in „hairy roots“ ändert oder sich neue, ähnliche Strukturen bilden (Georgiev et al., 2007; Shanks und Morgan, 1999). Ein weiterer Vorteil ist die genetische und biochemische Stabilität der Sekundärmetaboliten in „hairy roots“ (Giri und Narasu, 2000).

Die Lignanproduktion in „hairy roots“ wurde unter anderem an *Linum tauricum* ssp. *tauricum* bereits untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die beiden Bakterienstämme von *Agrobacterium rhizogenes* TR105 und ATCC15834 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in „hairy roots“ ein weitaus höherer Gehalt an Lignan gebildet wurde als in Zellsuspensionen derselben Pflanze. Die höchste Menge an Lignan wurde durch Infektion mit ATCC15834 erreicht (Ionkova und Fuss, 2009). Ebenso wurde ein

ähnliches Ergebnis an *Linum flavum* festgestellt. Auch hier war der Gewinn des Lignanderivates 5 bis 12 mal höher als in untransformierten Wurzeln (Oostdam et al., 1993).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit umfassten zunächst die *in vitro* Keimung von oberflächensterilisierten Edelweiß-Samen und die Anlegung und anschließende Vermehrung von Sprosskulturen. Verwendet wurden Samen von *Leontopodium alpinum* der Firma Austroaat AG und Jelitto. Um zu „hairy roots“ zu gelangen, wurden Infektionen mit drei unterschiedlichen Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt. Letztendlich sollte erhoben werden, in welchem Nährmedium sich die erhaltenen „hairy roots“ am besten entwickelten und ob es Unterschiede bezüglich der verwendeten Bakterienstämme gab.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Samen schneller oder effektiver zum Keimen zu bringen. Fariman et al. (2011) testeten diesbezüglich drei verschiedene Methoden an den Samen von *Echinacea purpurea*. Zum einen wurden die Samen für zwei Stunden in unterschiedlich konzentrierte wässrige Lösungen (100, 200, 300ppm) von Gibberellinsäure eingelegt, zum anderen wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von KNO_3 getestet. Für das dritte Experiment wurden die Samen für unterschiedliche Zeiträume der Kälte ausgesetzt. Die Resultate zeigten, dass bei allen durchgeführten Vorbehandlungen die Keimung der Samen im Vergleich zur Kontrolle verbessert werden konnte. Da die Keimung der Samen nicht die ursprüngliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, sondern eine möglichst hohe Keimrate erzielt werden sollte, entschieden wir uns für die Vorbehandlung mit Gibberellinsäure, da diese Methode in der Literatur oft beschrieben wird (Rahnama-Ghahfarokhi und Tavakkol-Afshari, 2007; Tilki, 2004). Wie bei den Ergebnissen (siehe Kap. 3.1.1., Seite 18) zu sehen war, keimten tatsächlich mehr Samen durch die Behandlung mit Gibberellinsäure (500ppm) vor der Oberflächensterilisation, allerdings nur bei jenen der Austroaat AG. Möglicherweise wäre bei den Samen von Jelitto eine höhere Konzentration an Gibberellinsäure notwendig gewesen, um das Ergebnis zu verbessern. Vielleicht spielt es auch eine Rolle, dass der mikrobiologische

Befall der Samen von Jelitto deutlich höher war als bei jenen der Austro Saat AG und man deshalb das Ergebnis nicht richtig auslegen konnte, denn wir haben im nächsten Versuch nur die Oberflächensterilisation verändert, nicht aber die Vorbehandlung.

Für die Anlegung der Sprosskulturen und zur Vermehrung der Kulturen wurde das verwendete Medium von Hook (1993) übernommen. Da dieses Nährmedium für *Leontopodium alpinum* entwickelt wurde und die Kultivierung gut funktionierte, wurde keine andere Zusammensetzung des Mediums getestet.

Die Infizierung einer Pflanze mit *Agrobacterium rhizogenes* erfolgt laut Literatur oft durch Ritzen des Hauptblattnervs mit einem Skalpell und anschließend Aufbringen einer kleinen Menge Bakteriensuspension (Hamill und Lidgett, 1997; Georgiev et al., 2007). Die von uns angewandte Methode, nämlich das Eintauchen des Skalpells in Bakteriensuspension vor der Verwundung der Pflanzennerven, wird bei Santos et al. (2005) für *Levisticum officinale* beschrieben. Nachdem wir genug Pflanzenmaterial zur Verfügung hatten, wurde eine weitere Technik angewendet, um festzustellen, bei welcher der angewandten Methoden mehr „hairy roots“ entstehen. Die Blätter wurden vom Spross abgetrennt, wiederum mit einem Skalpell, das zuvor in Bakteriensuspension eingetaucht wurde, geritzt und einzeln in Petrischalen gelegt (Saleh und Thuc, 2009). Bei Hook (1994) wird die Vorgangsweise nicht genau beschrieben, aber, an unseren Ergebnissen (siehe Kap. 3.2., Seite 23) ersichtlich, funktioniert es bei unseren Samenchargen von *Leontopodium alpinum* besser, nach der Infektion die komplette Pflanze in neues Medium zu überimpfen. Mit einer Transformationsrate von etwa einem Drittel aller infizierten Sprosse stand bei der Anzahl der durchgeführten Infektionen genügend Material für die weiteren Versuche zur Verfügung.

Der Zusatz von Acetosyringon zum Medium kann, wie bei Ionkova (2007) gezeigt, die Frequenz der induzierten „hairy roots“ steigern, da diese Substanz die *vir* Region des *Agrobacteriums* aktiviert. Durchgeführt wurde dieser Versuch an *Linum*-Arten (Ionkova und Fuss, 2009). Bei Saleh und Thuc (2009) wurden zusätzlich zum Einfluss von Acetosyringon

verschiedene Bakterienstämme miteinander verglichen. Auch hier konnte man sehen, dass durch den Zusatz von Acetosyringon mehr „hairy roots“ entstanden und auch der Zeitraum der Entstehung verkürzt war.

Die Frage stellt sich nun, ob durch Verwendung von Acetosyringon auch bei *Leontopodium alpinum* die Transformationsrate gesteigert werden kann. Man könnte also bei weiteren Forschungen diesen Versuch mit einbeziehen.

Wie im Ergebnisteil (siehe Kap.3.2., Seite 25) zu sehen ist, konnte mit dem *Agrobacterium*-Stamm TR105 die höchste Transformationsrate erzielt werden. ATCC15834 und LAB9402 unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Bisher wurde für die Gattung *Leontopodium alpinum* die Infektion mit dem Bakterienstamm LBA9402 beschrieben. Man erfährt keine prozentuelle Angabe darüber, wie hoch die Transformationsrate gewesen war, da nur mit fünf „hairy roots“-Linien weitergearbeitet wurde (Hook, 1994). Bei Saleh und Thuc (2009) wurden dieselben *Agrobacterium*-Stämme verwendet wie bei unseren Versuchen. Es wurde an *Solenostemon scutellarioides* gezeigt, dass in der Abwesenheit von Acetosyringon ATCC15834, bezüglich „hairy roots“-Bildung, mit etwa 56% bessere Ergebnisse als TR105 (ca. 25%) erzielte und sich bei LBA9402 keine „hairy roots“ ausbildeten. Auch bei *Glycyrrhiza glabra* L. erreichte man mit LBA9402 kein positives Ergebnis (Tenea et al., 2008). Bei *Linum tauricum* wiederum entstanden durch die Infektion mit TR105 (55%) mehr „hairy roots“ als durch ATCC15834 (32%) (Ionkova und Fuss, 2009). Man kann also nicht sagen, dass ein bestimmter Bakterienstamm bei allen Pflanzen gleich effektiv zur „hairy roots“-Bildung führt. Deshalb wäre es sinnvoll, bei jedem Versuch „hairy roots“ zu induzieren, mehrere unterschiedliche Stämme des *Agrobacterium rhizogenes* zu verwenden, um herauszufinden, welcher Stamm für die jeweilige Gattung am geeignetsten ist. Möglicherweise gibt es Zusammenhänge innerhalb einer Familie.

Es wurden drei verschiedene Nährmedien (MS, ½MS, B5) getestet, um festzustellen, in welchem dieser Medien sich „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* am besten weiterentwickeln. Auch hier gab es kein einheitliches Ergebnis bezüglich der unterschiedlichen Bakterienstämme. So war bei ATCC15834 das optimale Wachstum beim Standardmedium MS zu sehen,

bei TR105 war es $\frac{1}{2}$ MS, obwohl auch bei diesem Stamm im MS-Medium ein Fortschritt zu sehen war. LBA9402 zeigte keine positive Veränderung in diesem Medium.

Jene Kulturen allerdings, welche nicht auf die drei Medien aufgeteilt wurden, sondern nur zum Erhalt in MS-Medium weiterkultiviert wurden, zeigten keine Ausfälle und alle „hairy roots“, unabhängig vom Bakterienstamm, wuchsen gut. Für die Sprosskulturen wurden nur Medien nach Murashige und Skoog (1962) verwendet. Da die Kultivierung in diesem Medium gut funktionierte, verhalten sich eventuell die Wurzeln ähnlich.

In der Literatur findet man ein weiteres Nährmedium, SH (Schenk und Hildebrandt) (Gamborg et al., 1976). Sowohl bei *Levisticum off.* (Santos et al., 2005) als auch bei *Angelica gigas* (Xu et al., 2009) zeigten die „hairy roots“ in diesem Medium eine sehr gute Wachstumsrate. Da bezüglich *Leontopodium* dieses Medium in der Literatur nicht erwähnt wird, wurde SH in dieser Arbeit nicht verwendet.

Bei weiteren Untersuchungen bezüglich der „hairy roots“-Kultivierung und des Wachstums der transformierten Wurzeln von *Leontopodium* könnte man allerdings in Erwägung ziehen, das oben erwähnte Medium auch noch zu testen. In der Literatur werden zur Kultivierung von „hairy roots“ oft die beiden Medien MS (Królicka et al., 2001; Taya et al., 1989) und B5 (Saito et al., 2001; Santos et al., 2005) verwendet.

Auch hier sieht man also, dass es nicht das optimale Medium gibt und man nicht alle Pflanzen gleich behandeln kann. Weiters könnte man testen, ob sich die Wurzeln vielleicht anders verhalten wenn sie nicht nur der Dunkelheit ausgesetzt sind, sondern einem Tag/Nacht-Rhythmus (Santos et al., 1998).

Es gäbe also noch viele Möglichkeiten, andere oder vielleicht bessere Ergebnisse für die Entstehung von „hairy roots“ an *Leontopodium alpinum* zu erzielen und die Kultivierung bzw. das Wachstum der „hairy roots“ zu optimieren.

Diskussion

5. Zusammenfassung

Das Edelweiß (*Leontopodium alpinum* [Cass.]) wird in der Volksmedizin bei verschiedenen Beschwerden eingesetzt. Neben unterschiedlichen, schon länger bekannten Inhaltsstoffen wurde 2003 aus den Wurzeln das Lignan Leoligin isoliert, welches unter anderem antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen Verwendung finden könnte. Diese Verbindung liegt jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen vor.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten „hairy roots“ des Edelweiß etabliert werden. Diese transformierten Wurzeln könnten möglicherweise größere Mengen an Leoligin oder auch ähnliche, in der natürlichen Wurzel nicht vorkommende Strukturen bilden. Dazu wurden zunächst Samen des Edelweiß unter sterilen Bedingungen gekeimt. Eine Vorbehandlung mit Gibberellinsäure zur Verbesserung der Keimrate zeigte je nach verwendeter Samencharge eine hemmende oder eine fördernde Wirkung auf die Keimung. In weiterer Folge wurden auf Wuchsstoff-hältigem Nährmedium Klonlinien etabliert, welche mit drei Wildstämmen von *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, LBA9402 und TR105) infiziert wurden. Die Ausbildung von „hairy roots“ konnte durchschnittlich nach vier Wochen beobachtet werden, wobei sich der Bakterienstamm TR105 als der geeignetste erwies. Eine Infektion von Sprosskulturen führte außerdem zu deutlich besseren Transformationsraten als der Einsatz isolierter Blätter, und „hairy roots“ wurden grundsätzlich nur unter Lichtbedingungen gebildet. Insgesamt konnten 32 „hairy roots“-Klone etabliert werden.

Ein erster Vergleich des Wachstums in MS-Medium, halbkonzentriertem MS-Medium und B5-Medium zeigte tendenziell, dass MS-Medien zu besseren Ergebnissen führten als das vergleichsweise Stickstoff-reichere B5-Medium. Weiterführende Untersuchungen werden klären, wie sich das Nährmedium sowie gegebenenfalls der Einsatz von Elizitoren auf die Bildung von Leoligin und ähnliche Strukturen auswirkt.

6. Summary

Edelweiss (*Leontopodium alpinum* [Cass.]) is traditionally used as a remedy against various ailments. Besides various well known compounds the lignan leoligin was isolated 2003 from the roots. This secondary metabolite has amongst others anti-inflammatory properties, which makes it a candidate for the treatment of cardiovascular diseases. However, the concentration of this compound in the roots is rather low.

The aim of the present diploma thesis was the establishment of Edelweiss hairy roots. These transformed roots might synthesize higher levels of leoligin, or even structurally similar metabolites which do not occur in non-transformed roots. To start with, seeds were germinated aseptically. A pretreatment with gibberellic acid with the aim of improving germination rates had either promoting or inhibiting effects, depending on the seed provenance. Subsequently clonal lines were established on nutrient medium supplemented with growth regulators. These clones were then infected with three wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, LBA9402 and TR105). Formation of hairy roots was observed after four weeks in average, with bacterial strain TR105 leading to the best results. Infection of shoot cultures resulted in clearly better transformation rates than the use of isolated leaves, and generally hairy root formation only occurred under light conditions. In total, 32 hairy root clones could be established.

A first comparison of root growth in media MS, half strength MS, and B5 tendentially indicated that MS media led to better results than the nitrogen rich B5 medium.

Further investigations will reveal possible influences of nutrient medium and possibly the use of elicitors on the formation of leoligin and structurally related compounds.

7. Literaturverzeichnis

Bitschnau T. (1991), Arzneidroge der Volksmedizin im Montafon, Diplomarbeit, Universität Wien

Comey N., Grey A., Hook I., Jamey P., Sheridan H. (1999), Sesquiterpenes from *Leontopodium alpinum*, Phytochemistry **50**: 1057-1060

Dingermann T., Zündorf I. (1999), Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in der Pharmazie und Medizin, Wiss Verl Ges, Stuttgart, S. 213-228

Dobner M.J., Ellmerer E.P., Schwaiger S., Batsugkh O., Narantuya S., Stütz M., Stuppner H. (2003), New Lignan, Benzofuran, and Sesquiterpene Derivates from the Roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides*, Helv. Chim. Acta **86**: 733-738

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

Dobner M.J., Sosa S., Schwaiger S., Altinier G., Della Loggia R., Kaneider N.C., 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-Journal **130**: 2-4

Fariman Z.K., Azizi M., Noori S. (2011), Seed Germination and Dormancy Breaking Techniques for *Echinacea purpurea* L., J. Biol. Environ. Sci. **5**: 7-10

Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K. (1976), Plant tissue culture media, In Vitro **12**: 473-8

Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. (2007), Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances, Appl. Microbiol. Biotechnol. **74**: 1175-1185

Giri A., Narasu M.L. (2000), Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22

Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. (2006), Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era, *Trends. Biotechnol.* **24**: 403-409

Hamill J.D., Lidgett A.J. (1997), Hairy root cultures – Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering in Doran P.M. (Hrsg.), *Hairy roots Culture and Applications*, Harwood academic publishers, Australia, S. 1-29

Handel-Mazetti H. (1927), Systematische Monographie der Gattung *Leontopodium*, Beihefte zum botanischen Centralblatt **44**: 1-178

Hartwell J.L. (1968), Plants used against cancer, *J. Nat. Prod. (Lloydia)* **31**: 71-170

Hegi G. (1965), Illustrierte Flora von Mitteleuropa mit besonderer Berücksichtigung von Österreich, Deutschland und der Schweiz, Band VI, Teil 1, Verlag J.F. Lehmann, S. 458-461

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

Hook I. (1994), Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss), *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **38**: 321-326

Ionkova I. (2007), Biotechnological approaches for the production of lignans, *Pharmacog. Rev.* **1**: 57-68

Ionkova I., Fuss E. (2009), Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum*, *Pharmacog. Mag.* **4**: 14-18

Kiene K. (1992), Volksmedizin in verschiedenen Gebieten Vorarlbergs, Diplomarbeit, Universität Wien

Kletter C., Kriechbaum M. (2001) in Kletter C., Kriechbaum M. (Hrsg.), Tibetan Medicinal Plants, Med pharm Scientific Publishers, Stuttgart, S. 277

Knechtl E. (1992), Volksmedizinisch verwendete Heilpflanzen und Hausmittel im Inntal und umgebenden Seitentälern (Tirol), Diplomarbeit, Universität Wien

Królicka A., Staniszevska I., Bielawski K., Maliński E., Szafranek J., Łojkowska E. (2001), Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*, Plant Sci. **160**: 259-264

Ligaa U. (1996) in Ahn D.K. (Hrsg.), The Medicinal Plants in Mongolian Traditional Medicine, KCA Press, Ulaanbaatar, S. 269

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

Oostdam A., Mol J.N.M., Plas L.H.W. (1993), Establishment of hairy root cultures of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxypodophyllotoxin, Plant Cell Rep. **12**: 474-477

Pace L.G., Bruno A.A., Spanò L. (2009), *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand.-Mazz. (Asteraceae), Plant Biosystems **143**: 12-16

Pickl-Herck W. (1995), Volksmedizinische Anwendung im Norden Südtirols, Diplomarbeit, Universität Wien

Rahnama-Ghahfarokhi A., Tavakkol-Afshari R. (2007), Methods for Dormancy Breaking and Germination of Galbanum Seeds (*Ferula gummosa*), Asian J. Plant. Sci. **6**: 611-616

Reisinger U., Schwaiger S., Zeller I., Messner B., Stigler R., Wiedemann D., Mayr T., Seger Ch., Schachner T., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Bonatti J.O.,

Stuppner H., Laufer G., Bernhard D. (2009), Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts, *Cardiovasc. Res.* **82**: 542-549

Riker A.J., Banfield W., Wright W., Keitt G., Sagen H. (1930), Studies on infectious hairy root of nursery apple trees, *J. Agr. Res.* **41**: 507-540

Saito K., Sudo H., Yamazaki M., Koseki-Nakamura M., Kitajima M., Takayama H., Aimi N. (2001), Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*, *Plant Cell Rep.* **20**: 267-271

Saleh N.M., Thuc L.V. (2009), Assessment of hairy roots induction in *Solenostemon scutellarioides* leaves by different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 3519-3523

Santos P.M., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Younus A.K.M., Scheffer J.J.C. (1998), Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*, *Phytochem.* **48**: 455-460

Santos P.A.G., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Scheffer J.J.C. (2005), Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch, *Plant Sci.* **168**: 1089-1096

Schwaiger S., Adams M., Seger Ch., Ellmerer E.P., Bauer R., Stuppner H. (2004), New Constituents of *Leontopodium alpinum* and their *in vitro* Leukotriene Biosynthesis Inhibitory Activity, *Planta Med.* **70**: 978-985

Shanks J.V., Morgan J. (1999), Plant "hairy root" culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 151-155

Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil E., Wobbe K.K., Weathers P.J. (2003) Scale-Up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression, *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 653-667

Speroni E., Schwaiger S., Egger P., Berger A., Cervellati R., Govoni P., Guerra M.C., Stuppner H. (2006), *In vivo* efficacy of different extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) in animal models, J. Ethnopharmacol. **105**: 421-426

Strasburger E., Noll F., Schenk H., Schimper A.F.W. (1983), Lehrbuch der Botanik, 36.Auflage (2008), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 450-452

Stuppner H., Schwaiger S. (2009):
http://www.uibk.ac.at/ipoint/news/uni_und_forschung/662327.html 4.12.2011

Stuppner H., Ellmerer E.P., Ongania K., Dobner M. (2002), Bisabolane Derivates from *Leontopodium alpinum*, Helv. Chim. Acta **85**: 2982-2989

Tabernaemontanus J.T. (1582), Das Ander Buch von Kreutern, in Bauhin H. (Hrsg.), Tabernaemontanus J.T. neu vollkommen Kreuter-Buch, Reprint Basel, König (1731), Verlag Kölbl, Grünwald bei München (1993), S. 779-782

Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C. (1989), Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors, J. Chem. Eng. Jpn. **22**: 84-89

Tenea G.N., Calin A., Gavrilă L., Cucu N. (2008), Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation, Roum. Biotechnol. Lett. **13**: 3922-2932

Tilki F. (2004), Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L., Pakistan J. Biol. Sci. **7**: 1640-1642

Veena V., Taylor Ch.G. (2007), *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant **43**: 383-403

Wieser G. (1995), Volksmedizinische Verwendung von Heilpflanzen und Hausmitteln im osttiroler Pustertal mit Seitentälern und im Lesachtal, Diplomarbeit, Universität Wien

Wright W.H., Hendrickson A.A., Riker A.J. (1930), Studies on the progeny of single-cell isolations from the hairy-root and crown-gall organisms, J. Agric. Res. **41**: 541-547

Xu H., Park J.H., Kim Y.K., Park N., Lee S.Y., Park S.U. (2009), Optimization of growth and pyrano coumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas*, J. Med. Plant. Res. **3**: 978-981

Lebenslauf

Kristina ONDRATSCHEK



PERSÖNLICHE DATEN:

Nachname:	Ondratschek
Vorname:	Kristina
Geburtsdatum:	23.10.1986
Geburtsort:	Wien
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Österreich
Adresse:	Helene-Potetz-Weg 5/1.13 A-1120 Wien
Email:	kristina.ondratschek@gmx.at

AUSBILDUNG:

1993 – 1997	Volksschule: 1020 Wien, Schönngasse 2
1997 – 2005	AHS: 1150 Wien, Auf der Schmelz 4
seit Oktober 2005	Studium der Pharmazie

FREMDSPRACHEN:

Englisch, Französisch

PRAKTISCHE ERFAHRUNG:

Seit 2006	Adler Apotheke - Herstellung magistraler Zubereitungen, Warenbestellung und Warenannahmen, Defektur, Blutdruck-, Zucker- und Cholesterinmessungen, Identitätsprüfungen eingehender Substanzen
März 2011	Beginn des praktischen Teils der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie, Universität Wien