



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur biotischen Elizitierung einer
transgenen Wurzelkultur des Edelweiß –
Leontopodium nivale ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter

verfasst von

Johanna Schleritzko

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Danksagung

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Betreuerin, Frau Professor Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp, für das interessante Diplomarbeitsthema und die nette Betreuung während der Durchführung meiner Arbeit richten.

Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch gebührt ebenfalls mein großer Dank für die umfassende Betreuung. Er stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite, wenn es um Beantwortung meiner Fragen oder Probleme ging.

Bei labortechnischen Fragen wandte ich mich an Mag. Florian Gössnitzer. Ihm will ich für seine Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Labor danken.

Herrn Prof. Dr. Hermann Stuppner und Mag. pharm. Dr. Stefan Schwaiger, Institut für Pharmazie/Pharmakognosie, Universität Innsbruck, bin ich zu Dank für die Durchführung der chemischen Analysen verpflichtet.

Auch meine Eltern haben meinen Dank verdient. Ohne eure finanzielle Unterstützung wäre mir mein Studium nicht möglich gewesen. Danke auch für die vielen Aufmunterungen und die motivierenden Worte, die ihr während meiner Studienzeit für mich übrig hattet.

Abkürzungen

MEW modifiziertes MS - Nährmedium

MJ Methyljasmonat

MS Standardnährmedium nach Murashige & Skoog

$\frac{1}{2}$ MS Standardnährmedium nach Murashige & Skoog mit halber
Konzentration an Makroelementen

YE Hefeextrakt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Das Edelweiß	1
1.2. „Hairy roots“ und Elizitierung	3
1.3. Problemstellung	5
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Pflanzenmaterial.....	7
2.2. Samenkeimung und in vitro-Etablierung von <i>Leontopodium nivale</i> ssp. <i>alpinum</i> cv. „Helvetia“	8
2.3. Nährmedien.....	9
2.4. Infektionen mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	10
2.5. Vermehrung von „hairy roots“	11
2.6. Elizitierung mit biotischen Elizitoren.....	12
2.7. Analyse der „hairy roots“	14
3. Ergebnisse	18
3.1. Etablierung einer in vitro-Kultur von <i>Leontopodium nivale</i> ssp. <i>alpinum</i> der Sorte „Helvetia“	18
3.2. Infektionen mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20
3.3. Wachstum der „hairy roots“ von Klon K8A.....	21
3.4. Quantifizierung der Lignane	23
3.4.1 Einfluss von biotischen Elizitoren auf die Leoliginbildung	23
3.4.2. Einfluss von biotischen Elizitoren auf die 5-Methoxyleoliginbildung.....	27
3.4.3. Einfluss von biotischen und abiotischen Elizitoren auf die Sekundärstoffbildung	32
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	42
6. Summary	43
7. Literaturverzeichnis	44
Lebenslauf.....	49

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Das Edelweiß

Die Gattung Edelweiß (*Leontopodium* Cass.) gehört zur Familie der Asteraceen und besteht aus 30-40 Arten, die in bergigen Regionen Japans, Asiens und Europa vorkommen (Hook, 1993). In Europa sind zwei Arten beheimatet: *Leontopodium alpinum* und *Leontopodium nivale* (Safer et al. 2011). Vor allem *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter, das gewöhnliche Alpen-Edelweiß, hat eine lange Tradition in der Volksmedizin. Bereits im Jahr 1582 wurde die Anwendung von Edelweiß gegen Durchfall und Dysenterie erwähnt (Tabernaemontanus, 1582). Weiters wird der Einsatz als Teedroge bei Bronchitis und Fieber beschrieben (Kiene, 1992). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Edelweiß viele pharmazeutisch interessante Eigenschaften wie z.B. eine antiinflammatorische (Dobner et al. 2004) und antibakterielle (Dobner et al. 2003) Wirkung aufweist. Hornick et al. (2008) testeten bei einem in vivo Experiment an Rattengehirnen den Einfluss eines Edelweißextrakts auf die AcetylcholinKonzentration. Der Extrakt wurde mit Dichlormethan aus getrockneten Wurzeln des *Leontopodium alpinum* extrahiert. Beim in vivo Versuch konnte eine gesteigerte Ach-Konzentration im zentralen Nervensystem der Ratten nachgewiesen werden. In einem in vitro-Modell war durch die Verwendung des Dichlormethan-Auszugs eine Hemmung der Acetylcholinesterase zu beobachten. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob ein Einsatz von *L. alpinum* bei der Therapie von Gehirnerkrankungen, die mit einem Mangel an cholinergen Transmittern assoziiert sind, in Frage kommt. Möglicherweise ist man damit auf einen neuen Ansatz in der Therapie von Erkrankungen wie Demenz und Alzheimer gestoßen.

Im Jahr 2003 erschien eine Arbeit, in der unter anderem die Isolierung von neuen Lignanderivaten aus getrockneten Wurzeln von *L. nivale* ssp. *alpinum* beschrieben wird (Dobner et al. 2003). Abbildung 1 (S. 2) zeigt die chemische

Struktur von Leoligin, dem Hauptlignan in den Edelweißwurzeln. Leoligin hemmt die Intimalhyperplasie nach Venen-Bypass-Operationen. Versuche an Mäusen zeigten, dass durch Leoligin eine Thromboseentstehung in transplantierten Venen deutlich reduziert werden konnte. Der große Vorteil von Leoligin im Gegensatz zu bisher verwendeten Arzneistoffen besteht darin, dass es weder toxisch auf die Endothelzellen der Gefäßinnenwand wirkt, noch Zelltod induzieren kann. Außerdem werden bereits vorhandene Gefäßverdickungen reduziert (Reisinger et al. 2009). Eine ausführliche Besprechung von *L. nivale* ssp. *alpinum* und seinen Inhaltsstoffen findet sich in der Diplomarbeit von Ondratschek (2012).

5-Methoxyleoligin, das 5-Methoxy-Derivat des Leoligins (siehe Abbildung 1), weist ebenfalls interessante Eigenschaften auf. In einer erst kürzlich erschienenen Studie beschreiben Messner et al. (2013) eine durch 5-Methoxyleoligin induzierte CYP26B1-abhängige Stimulierung der Angiogenese in einem in vitro-Zellkulturmodell. Weiters konnte das Forscherteam in einem in vivo-Experiment an Postinfarkttherzen von Ratten eine durch 5-Methoxyleoligin hervorgerufene Arteriogenese belegen. Die Autoren schreiben außerdem, dass nach aktuell laufenden Toxizitätsstudien noch weitere Studien auch an größeren Tieren und in weiterer Folge auch am Menschen durchgeführt werden müssen. Möglicherweise hat man mit 5-Methoxyleoligin einen neuen Wirkstoff zur Postinfarkttherapie gefunden.

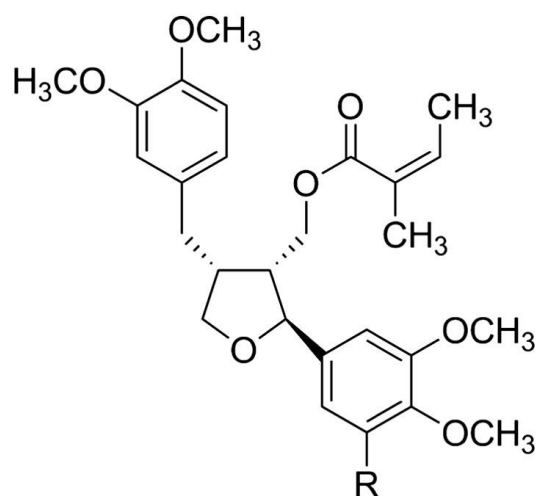


Abbildung 1: Leoligin (R = H) bzw. 5-Methoxyleoligin (R = OCH₃)

1.2. „Hairy roots“ und Elizitierung

Die Bildung von transgenen „hairy roots“ lässt sich durch das Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* induzieren. Dazu werden isolierte Pflanzenstücke oder ganze Pflanzen verletzt und anschließend an der verwundeten Stelle gezielt mit dem Bakterium infiziert. Es folgt die Einschleusung der bakteriellen T-DNA in das Pflanzengenom, woraufhin die „hairy roots“-Bildung induziert wird. Nach 1-4 Wochen werden die „hairy roots“ an der infizierten Stelle sichtbar (Toivonen 1993). Der große Vorteil von „hairy roots“ im Vergleich zu natürlichen Wurzeln besteht darin, dass sie Sekundärstoffe oft über eine lange Zeit hindurch produzieren. Ein weiteres Charakteristikum ist die hohe Wachstumsrate, die völlig unabhängig von jeglichem Hormonzusatz ist (Giullon et al. 2006). Es wurde außerdem beobachtet, dass „hairy roots“ nicht nur die Sekundärstoffbiosynthese steigern können, sondern auch in der Lage sind, neue Sekundärstoffe zu bilden (Kim et al. 2002).

Durch Elizitierung kann man die Sekundärstoffbildung oft verstärken (Chong et al. 2004). Die Anreicherung von sekundären Metaboliten in Pflanzen ist eine häufige Reaktion auf Stressfaktoren. Diese Tatsache macht man sich durch das Schaffen von künstlichen Stresssituationen durch biotische oder abiotische Elizitoren zu Nutze (Zhao et al. 2010). Elizitoren biologischen Ursprungs, wie z.B. Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine oder Zellwandfragmente von Pilzen oder Bakterien werden als biotische Elizitoren zusammengefasst. Elizitoren, die keines natürlichen Ursprungs sind, werden als abiotisch bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Metallionen oder UV-Licht (Baldi et al. 2009).

Die biotischen Elizitoren Methyljasmonat (MJ; ein Phytohormon) und Hefeextrakt (YE) werden häufig zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion in vitro eingesetzt. In der Literatur werden zahlreiche erfolgreiche Versuche mit diesen beiden Elizitoren beschrieben: Sun et al. (2012) arbeiteten z.B. mit „hairy roots“ von *Calotropis gigantea* und dokumentierten den Einfluss von MJ

und YE auf die Cardenolidbildung bzw. -akkumulation. In dieser Studie wurden MJ-Konzentrationen von 10, 25 und 50 mg/l und YE-Konzentrationen von 50, 100 und 150 mg/l getestet, nach 10, 15 und 20 Tagen wurde die Cardenolidkonzentration gemessen. Die Studie ergab, dass MJ in allen verwendeten Konzentrationen den Cardenolidgehalt anstiegen ließ. Bemerkenswert war, dass der Cardenolidgehalt mit der Zeit gleichermaßen abnahm. Das ließ die Forscher zu dem Entschluss kommen, dass die Cardenolidproduktion und die MJ-Konzentration korrelieren. Es ließ sich vermuten, dass eine wiederholte Gabe von MJ während der Kultivierungszeit den Anstieg der Cardenolidkonzentration aufrecht halten würde. Bei der Analyse der Proben, die mit YE eliziert wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen Dosis und Cardenolidgehalt nachgewiesen werden, und YE führte zu keinem signifikanten Cardenolidanstieg.

Van Fürden et al. (2005) untersuchten den Einfluss von MJ auf das Wachstum von Zellsuspensionskulturen von *Linum album* (Linien 2-5aH und X4SF). Außerdem analysierten sie die Auswirkung von MJ auf die Produktion der Lignane Podophyllotoxin und 6-Methoxypodophyllotoxin. Die Auswertung ergab, dass das Trockengewicht bei den mit 100 µM MJ versetzten Zellsuspensionen verglichen mit der Kontrollgruppe, die keinen MJ-Zusatz erhielt, am geringsten war. Das bedeutet, dass das Zellwachstum durch die MJ-Zugabe gehemmt wurde. Allerdings konnte festgestellt werden, dass durch die Zugabe von 100 µM MJ die Lignanbildung anstieg. Verglichen mit der nicht elizitierten Kontrollgruppe konnte nach Elizitierung der Zellsuspensionskultur von *Linum album* Linie X4SF eine 10fach höhere Podophyllinkonzentration gemessen werden. Die 6-Methoxypodophyllotoxin - Konzentration war durch die Elizitierung nicht beeinflusst. Bei der mit 100 µM MJ elizitierten Linie 2-5aH wurde eine Verdoppelung sowohl der Podophyllotoxin- als auch der 6-Methoxy-podophyllotoxinkonzentration erzielt.

Anhand dieses Beispiels sieht man, dass der Effekt der Elizitierung auf die Sekundärstoffproduktion von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich sein kann.

1.3. Problemstellung

Wie bereits erwähnt, ist man durch die Isolierung von Leoligin aus *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* auf einen interessanten Inhaltsstoff gestoßen, von dem man sich vor allem in der Behandlung von koronaren Herzkrankheiten viel verspricht. Neue Untersuchungen zeigen, dass auch das 5-Methoxyderivat große pharmazeutische Relevanz besitzt. Bisher kann man diese beiden Inhaltsstoffe lediglich durch Isolierung aus dem Pflanzenmaterial gewinnen. Ein Problem ist, dass beide Substanzen nur in sehr geringer Konzentration in den Wurzeln von *L. nivale* ssp. *alpinum* vorliegen. So konnte man durch Extraktion von 804 g getrockneten Wurzeln lediglich 38 mg Leoligin isolieren: Das entspricht unter Berücksichtigung von Verlusten während des Extraktionsprozesses 0,0047 % (Dobner et al. 2003). Aus 5,3 kg getrocknetem Wurzelmaterial konnten sogar nur 78 mg 5-Methoxyleoligin gewonnen werden, was einem Gehalt von 0,0015 % entspricht (Messner et al. 2013). Da das Edelweiß sowohl in Österreich als auch in Deutschland, Italien und Lichtenstein unter Naturschutz steht, darf es nicht wild gesammelt werden (Hook 1993), man müsste daher auf entsprechend großflächige Feldkulturen zurückgreifen.

Aus diesen Gründen bietet sich die *in vitro*-Kultivierung von „hairy roots“ des Edelweiß an, da man hier völlig unabhängig von der Vegetationsperiode vom schnellen Wachstum der Wurzeln profitieren und durch Elizitierung die Lignanbildung erhöhen könnte.

In ersten diesbezüglichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der „hairy roots“-Klon K30 grundsätzlich Leoligin bildet, und dass sich der Gehalt an diesem Lignan durch Elizitierung steigern lässt (Schmidtbauer 2012, Prisching 2013). Teil der vorliegenden Arbeit war es, an einer weiteren, besonders schnell wachsenden Linie (K8A) Elizitierungsversuche mit den biotischen Elizitoren MJ und YE durchzuführen. Dabei sollte neben dem Leoliginingehalt auch die 5-Methoxyleoliginproduktion gemessen werden. Ein weiteres Ziel war

es außerdem, neue „hairy roots“-Linien der Edelweiß-Klonlinie „Klon 9“ sowie der Sorte „Helvetia“ zu etablieren. Klon 9 wurde vom Schweizer „Mediplant Swiss Research Centre for Medicinal and Aromatic Plants“ etabliert und zeichnet sich durch einen hohen Leoligin-Gehalt aus (Schmidtbauer 2012, Prisching 2013). Durch weitere Kreuzungszüchtung entstand die Sorte „Helvetia“, welche folglich bezüglich der Lignanbildung ebenfalls von Interesse erscheint.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Die „hairy roots“ Kulturen von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* der Klonlinie K8A wurden von Ondratschek übernommen, die diese im Rahmen ihrer Diplomarbeit etabliert hatte. Die dazu verwendeten Samen stammten von der Firma Austrosaat AG, Österreich (Ondratschek 2012). Ondratschek etablierte die Klonlinie K8A durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ATCC15834.

Samen der Sorte „Helvetia“ wurden vom Mediplant Swiss Research Centre for Medicinal and Aromatic Plants in Conthey (Schweiz) zur Verfügung gestellt. Von diesem Forschungsinstitut erhielten wir auch Jungpflanzen des Edelweiß-Klons 9.

Die bei der Gehaltsbestimmung verwendeten Vergleichsproben - Wurzeln aus Erdkultur der Edelweiß-Klone 9 und 44 - stammten ebenfalls vom Mediplant Swiss Research Centre for Medicinal and Aromatic Plants. Die Vergleichsprobe FW 120602 aus Erdkultur wurde von Dr. Stefan Schwaiger, Institut für Pharmazie und Pharmakognosie der Universität Innsbruck, zur Verfügung gestellt.

2.2. Samenkeimung und in vitro-Etablierung von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* cv. „Helvetia“

Die Keimung der Samen der Edelweiß-Sorte „Helvetia“ erfolgte im Gewächshaus des Department für Pharmakognosie der Universität Wien. Die Samen wurden dazu dünn auf Erde in einer Styroporbox gesät und danach mit Wasser befeuchtet. Bereits nach 3 Tagen waren erste Keimlinge sichtbar. Nach zwei Wochen waren die Keimlinge kräftig genug, um sie in vitro überzuführen (Abbildung 2).



Abbildung 2: Keimlinge von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* cv. „Helvetia“ zwei Wochen nach der Aussaat

Bevor die Keimlinge in vitro genommen werden konnten, musste man sie einer Oberflächensterilisation unterziehen. Dazu wurden die Pflänzchen vorsichtig aus der Erde gezogen und danach mit Wasser von den größten Erdresten befreit. Unter Verwendung eines Nylonnetzes, in das die Pflänzchen gegeben wurden, wurden sie zuerst in einem Becherglas mit einer 10proz. Ethanollösung für 10 min gewaschen. Danach wurden sie in eine wässrige

12proz. NaOCl-Lösung (1,9% aktives Chlor) überführt, in der die Pflänzchen für 12 min verblieben. Danach wurde mit autoklaviertem Wasser gespült und daraufhin noch 3 mal je 10 min lang mit autoklaviertem Wasser gewaschen.

In einer sterilen Arbeitsbank konnte nun die in vitro-Überführung der oberflächensterilisierten Pflänzchen vorgenommen werden. Dabei wurde so vorgegangen, dass ca. die Hälfte der Pflänzchen (24 Stück) auf wuchsstofffreies MEW – Medium und die zweite Hälfte (22 Stück) auf wuchsstoffhaltiges MEW – Medium (siehe Kapitel 2.3.) transferiert wurde.

2.3. Nährmedien

Als Nährmedium für die „hairy roots“ Kulturen diente $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 3% Saccharose. Dabei handelte es sich um ein in der Gewebekultur sehr häufig verwendetes Standard-Nährmedium nach Murashige & Skoog (1962), bei welchem die Makroelemente in halber Menge zugesetzt wurden.

Für die in vitro-Kultivierung junger, aus Samen gezogener Pflänzchen wurde modifiziertes MS-Medium (MEW) mit bzw. MEW ohne Wachstumsstoffe verwendet. Neben den Bestandteilen eines normalen MS-Mediums waren im Medium MEW auch noch 0,3 mg/l Thiamin-HCl und 100 mg/l Caseinhydrolysat enthalten. Als Wachstumsstoffe wurden 0,55 μ M Naphthylelessigsäure (NAA) und 0,25 μ M Kinetin zugesetzt. Dieses Nährmedium hatte sich bei Hook (1993) für die Vermehrung von *L. alpinum* über Sprosskultur bewährt und wurde daher von uns übernommen. Da es sich hierbei um ein festes Nährmedium handelte, wurden als Gelbildner 7 g/l Agar (Merck) eingesetzt.

Zur Kultivierung von *Agrobacterium rhizogenes* setzten wir das YMB-Medium ein (Yeast Mannitol Broth; Rahimi et al. 2008). Die Bestandteile dieses Nährmediums sind 0,5 g/l K_2HPO_4 , 0,2 g/l $MgSO_4$, 0,1 g/l NaCl, 0,4 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Mannit sowie gegebenenfalls 8 g/l Agar.

Herstellung des ½ MS-Nährmediums:

In einem geeigneten Messkolben legten wir zunächst ca. 1/3 der benötigten Menge an destilliertem Wasser vor. Der Kolben wurde dann auf einen Magnetrührer gestellt, sodass nach der Zugabe der verschiedenen Bestandteile eine gute Durchmischung der Lösung gewährleistet war. Nach Zugabe der berechneten Menge an Stammlösung der Makromoleküle (100fach konzentriert), Vitamine (200fach) und Spurenelemente (1000fach) wurde Myoinosit als Feststoff beigemischt. Zuletzt ist die benötigte Zuckermenge eingewogen und ebenfalls in den Kolben gefüllt worden. Nachdem sich die festen Bestandteile gelöst hatten, wurde mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Ganz am Ende musste mittels KOH bzw. HCl ein pH-Wert von $5,7 \pm 0,1$ eingestellt werden.

Mittels einer Abfüllanlage wurden je 50 ml des frisch hergestellten Nährmediums in 250 ml Kolben gefüllt und mit Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen.

Alle hergestellten Nährmedien autoklavierten wir nach der Abfüllung in die Kulturgefäße bei 121 °C für 20 min. Bis zur Verwendung wurden sie im Dunkeln bei 5 °C aufbewahrt.

2.4. Infektionen mit *Agrobacterium rhizogenes*

Für die Infektionen wurden drei Wildstämme von *Agrobacterium rhizogenes* verwendet: TR 105, ATCC 15831 und LBA 9402. Die Bakterienstämme befanden sich auf YMB-Nährmedium auf einer Agarplatte und lagerten bei 5 °C im Dunkeln. Zur Herstellung aktiv wachsender Suspensionskulturen wurden jeweils 20 ml flüssiges YMB-Medium beimpft und für 3 Tage bei 25 °C am Rotationsschüttler kultiviert. Diesen Vorgang wiederholten wir 4 mal, danach war die Bakterienaktivität ausreichend hoch, sodass mit den Stämmen die Infektionen durchführbar waren.

Die Infektion von oberflächensterilisierten Pflänzchen der Edelweiß-Sorte „Helvetia“ erfolgte durch leichtes Anritzen von 2-3 Blättern mit einem Skalpell. Wichtig war dabei, die Blätter keinesfalls gänzlich durchzuschneiden. Das Skalpell wurde zuvor in eine der drei Bakteriensuspensionen getaucht, sodass beim Verletzen der Pflanzen eine Infektion stattfand. Die auf diese Weise infizierten Pflanzen wurden wieder auf festes $\frac{1}{2}$ MS-Nährmedium überführt und bei 25 °C in einem 16h-Tag (Lichtstärke $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) kultiviert.

An Jungpflanzen von *L. nivale* ssp. *alpinum* Klon 9 wurden ebenfalls Infektionen durchgeführt. Dazu wurden einzelne Blätter ausgewählt und von der Mutterpflanze abgeschnitten. Die Oberflächensterilisation dieser Blätter erfolgte, wie in Kapitel 2.2. (S. 8) beschrieben, wieder mit 10proz. EtOH und 12proz. NaOCl-Lösung. Bei der Infektion wurde dieses Mal jedoch anders vorgegangen: In diesem Fall wurden einzelne Blattstücke und nicht die ganze Pflanze infiziert. Die Blattstücke wurden am Blattnerf mit einem Skalpell, das zuvor in eine der drei Bakteriensuspensionen getaucht wurde, angeritzt. Daraufhin wurden die Blattstücke auf festes MS-Medium gelegt und bei 25 °C im Licht (siehe oben) kultiviert.

2.5. Vermehrung von „hairy roots“

Am Beginn der Arbeit war das Ziel, das vorhandene Material an „hairy roots“- (Klon K8A) soweit zu vermehren, dass damit Elizitierungsversuche durchführbar waren. Dazu mussten die „hairy roots“ alle 3 Wochen in neues $\frac{1}{2}$ MS Nährmedium überführt werden.

Unter sterilen Bedingungen in der Laminar Airflow – Arbeitsbank sind die „hairy roots“ aus dem Kulturgefäß genommen worden. Um das Wachstum dokumentieren zu können, wurden die „hairy roots“ mit sterilem Filterpapier leicht abgetupft und abgewogen. Danach konnten Kallusstellen und abgestorbenes Material mit einer Pinzette und einem Skalpell vorsichtig entfernt werden. Dann wurden je circa 0,5 g (genau gewogen) „hairy roots“

abgeteilt und in einen 250 ml Kolben mit frischem $\frac{1}{2}$ MS-Nährmedium eingebracht. Die beimpften Kolben wurden auf einen Rotationsschüttler gestellt und bei 80 Umdrehungen/min bei 25 °C im Dunkeln kultiviert. Nach ca. 3 Wochen hatte sich das Pflanzenmaterial soweit vermehrt, dass erneut ein Überimpfen der „hairy roots“ in neues Nährmedium nötig war. Die Vorgehensweise blieb dabei die gleiche. Wieder wurden die Gewichte für die Dokumentation notiert. Abbildung 3 zeigt deutlich, wie stark sich die „hairy roots“ innerhalb von 3 Wochen vermehrten.

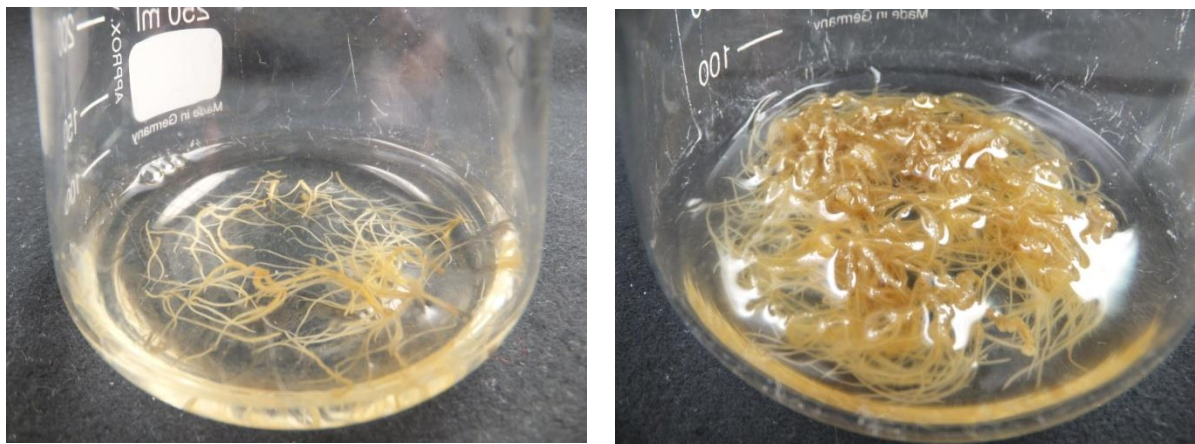


Abbildung 3: „Hairy roots“-Kulturen nach dem Beimpfen (links) und nach 3 Wochen Kultivierung (rechts)

2.6. Elizitierung mit biotischen Elizitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Methyljasmonat und Hefe auf Wachstum und Sekundärstoffbildung der „hairy roots“ von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* Klon K8A untersucht.

Elizitierung mit Hefeextrakt:

Bevor man die verschiedenen Elizitorkonzentration herstellen konnte, wurde der Hefeextrakt nach Hahn und Albersheim (1978) aufgereinigt:

Im ersten Schritt wurden 50 g Hefeextrakt in 250 ml destilliertem Wasser gelöst. Danach wurde soviel 96proz. Ethanol zugesetzt, dass eine Endkonzentration von 80 Vol % erreicht wurde. In diesem Fall waren das 1075,79 g EtOH. Diese Mischung ist dann über Nacht stehen gelassen worden, sodass sich die Feststoffe absetzen konnten. Am nächsten Tag wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand in 250 ml destilliertem Wasser gelöst und die Fällung mit EtOH wie oben beschrieben wiederholt. Der Hefeextrakt wurde nach 3 tägiger Lagerung bei 5 °C im nächsten Schritt abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen, sodass die Ethanolreste vom Hefeextrakt entfernt wurden. Der so aufgereinigte Hefeextrakt ist im Anschluss zur vollständigen Trocknung lyophilisiert worden.

Aus dem lyophilisierten Hefeextrakt wurden dann durch Auflösen in destilliertem Wasser 3 Elizitorlösungen (1 g/l, 2 g/l, 5 g/l) hergestellt. Vor der Zugabe zu den „hairy roots“-Kulturen wurden die Elizitorlösungen für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Elizitierung wurden 15 Kolben willkürlich ausgewählt (je 5 Kolben pro Elizitorkonzentration). Die darin enthaltenen „hairy roots“ waren zum Zeitpunkt der Elizitierung 3 Wochen alt. Das zugegebene Elizitorvolumen betrug jeweils 1 ml.

Elizitierung mit Methyljasmonat (MJ):

Bevor mit der Elizitierung begonnen werden konnte, musste eine geeignete Stammlösung berechnet werden: MJ = Molekulargewicht 224,3 g/mol/L

Es wurden 6 ml einer 300 µmol MJ Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 67,29 mg MJ in 6 ml 96proz. EtOH gelöst.

Im Anschluss wurde die Stammlösung mit 96proz. EtOH weiter verdünnt, sodass am Ende folgende 4 verschiedene Konzentrationen in den elizitierten Kulturen vorlagen: 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM.

50 µM: 200 µl Stammlösung + 1000 µl 96proz. EtoH
100 µM: 400 µl Stammlösung + 800 µl 96proz. EtoH
200 µM: 800 µl Stammlösung + 400 µl 96proz. EtoH
300 µM: 1200 µl Stammlösung

In der Laminar Airflow Werkbank wurden die MJ-Lösungen vor der Zugabe zu den „hairy roots“-Kulturen durch einen sterilen Filter mit 0,22 µm Porenweite filtriert. Wieder wurden pro Elizitorkonzentration 5 Kolben eingesetzt. Die zugegebene Menge jeder Elizitorlösung betrug jeweils 200 µl.

2.7. Analyse der „hairy roots“

Biomassebestimmung:

Eine Woche nach der Elizitierung wurden die „hairy roots“ aus dem Nährmedium genommen, mittels Filterpapier leicht abgetupft und abgewogen (Frischgewicht). Danach wurden die „hairy roots“ für 1 Woche bei Raumtemperatur im Labor getrocknet, um auch das Trockengewicht der „hairy roots“ zu ermitteln.

Als Referenzmaterial dienten 5 nicht elizitierte „hairy roots“-Kulturen, die 4 Wochen in ½ MS - Medium kultiviert wurden (= Kontrolle K8A). Auch davon wurde das Frisch - bzw. Trockengewicht bestimmt, um einen etwaigen Einfluss der Elizitoren auf den Biomassezuwachs feststellen zu können.

Die Bestimmung des Gehalts an Leoligin und 5-Methoxyleoligin wurde von Herrn Dr. Stefan Schwaiger am Institut für Pharmazie und Pharmakognosie der Universität Innsbruck (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hermann Stuppner) durchgeführt.

Gehaltsbestimmung: LC-Parameter

Mittels HPLC-UV-Verfahren wurde sowohl die Leoligin- als auch die Methoxyleoligin-Konzentration der elizitierten „hairy roots“ ermittelt.

Es wurde ein HP 1050 System (Agilent, Waldbronn, Germany) mit Autosampler, Diodenarray-Detektor und Säulenthermostat verwendet.

Bedingungen:

- stationäre Phase: Phenomenex Kinetex 2.6 μ C18 100 A (100 mm $\times$ 2,1 mm) mit 2,6 μ m Partikeln
- Temperatur: 40 °C
- Mobile Phase: Gemisch aus 2 Lösungsmitteln: A=Wasser, B=Acetonitril
Die Lösungsmittelzusammensetzung war folgendermaßen:
0 min: 65 % A, 35% B; 20 min: 50 % A, 50 % B; 25 min: 1 % A, 99 % B;
stop: 35 min; post time: 15 min.
- Flussrate: 0,250 ml/min
- Detektionswellenlänge: 205 nm

Quantifizierung: mittels externem Standard:

Die Reinsubstanz Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin wurden in 1,00 ml Methanol gelöst und durch weiteres Verdünnen 5 Referenzlösungen (73.1 μ g/ml - 4.6 μ g/ml; 54.4 μ g/ml - 3.4 μ g/ml) hergestellt, welche zur Erstellung von Kalibriergeraden (Abbildung 4 und 5 (S.16)) analysiert wurden.

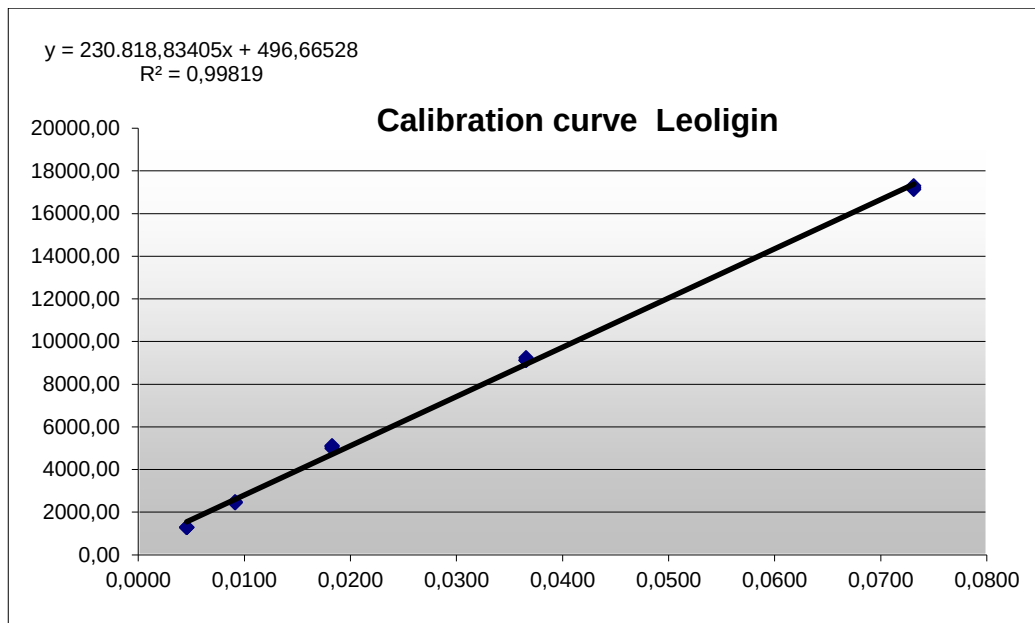


Abbildung 4: Kalibriergerade zur Leoliginbestimmung

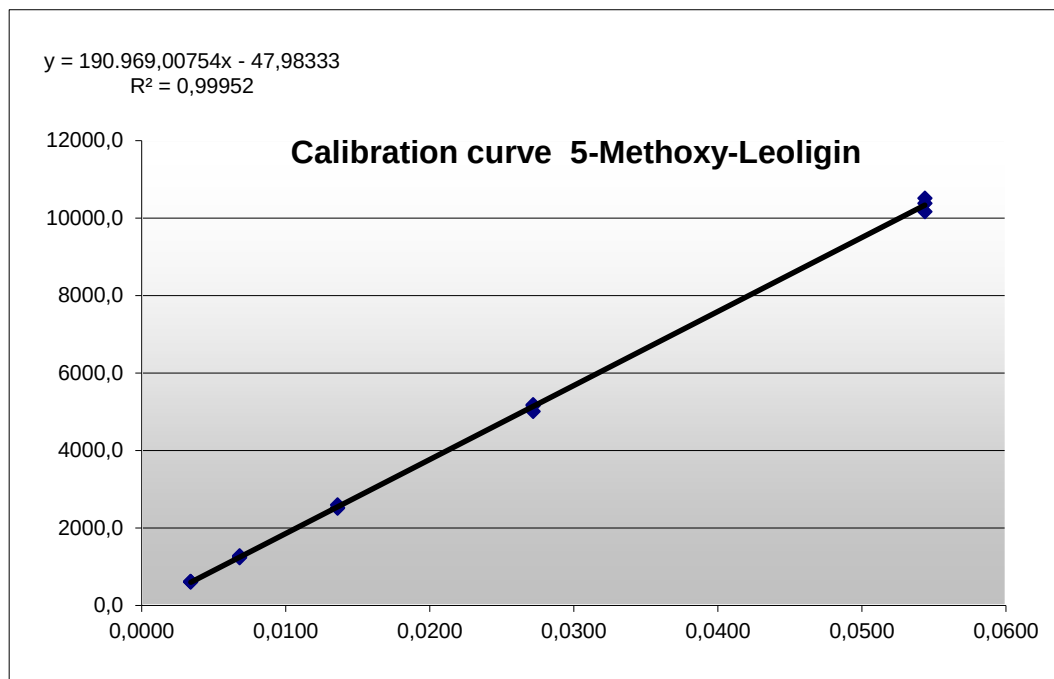


Abbildung 5: Kalibriergerade zur 5-Methoxyleoliginbestimmung

Probenaufbereitung:

Für die Analyse mittels HPLC wurden 100,0 mg im Mörser fein zerriebenes Wurzelmaterial mit 20 ml Dichlormethan 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach Filtration über Watte wurde der Rückstand nochmals zwei mal mit jeweils 10 ml des Lösungsmittels extrahiert. Die Filtrate wurden vereinigt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 1,00 ml Methanol aufgenommen. Nach erneutem Filtrieren über Watte erfolgte die Analyse wie oben angegeben.

Pro Elizitorbehandlung wurden Wurzeln aus zwei von fünf Kolben ausgewählt und aufgearbeitet, jeder Extrakt wurde drei mal mittels HPLC analysiert. Die erhaltenen 6 Werte für Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin dienten der Berechnung von Mittelwert und Standardfehler sowie der Varianzanalyse mit dem Softwarepaket Statistica v6.1 (StatSoft Inc.).

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung einer in vitro-Kultur von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* der Sorte „Helvetia“

Die auf Erde gesäten Samen von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* cv. Helvetia wurden, wie bereits in Kapitel 2.2. (S. 8) beschrieben, nach der Keimung in vitro überführt. Dabei wurden einerseits wuchsstoffhaltiges und andererseits wuchsstofffreies MEW-Nährmedium verwendet. Bei den Wuchsstoffen handelte es sich um 0,55 µM NAA und 0,25 µM Kinetin, die gemeinsam in Verwendung waren.

Wenn man Abbildung 6 mit Abbildung 7 (S. 19) vergleicht, ist deutlich ersichtlich, dass es einen Unterschied im Wachstum und in der Entwicklung der Pflänzchen gab, der von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig war. Jene Pflänzchen, die auf wuchsstoffhaltiges MEW-Nährmedium überimpft wurden, zeigten schnelleres Wachstum als jene, die ohne Wuchsstoffzusatz kultiviert wurden.

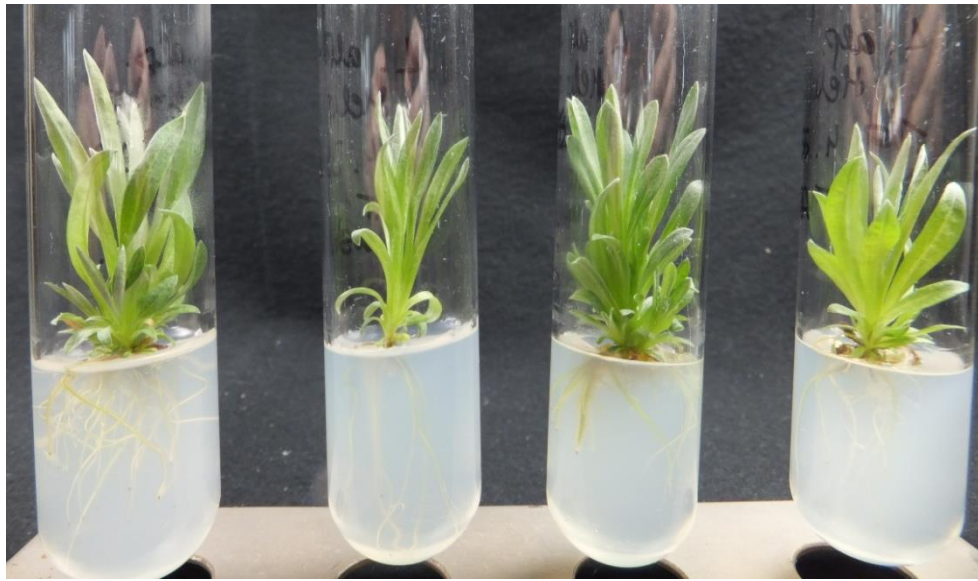


Abbildung 6: *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Sorte „Helvetia“) auf MEW-Medium mit 0,55 µM NAA und 0,25 µM Kinetin

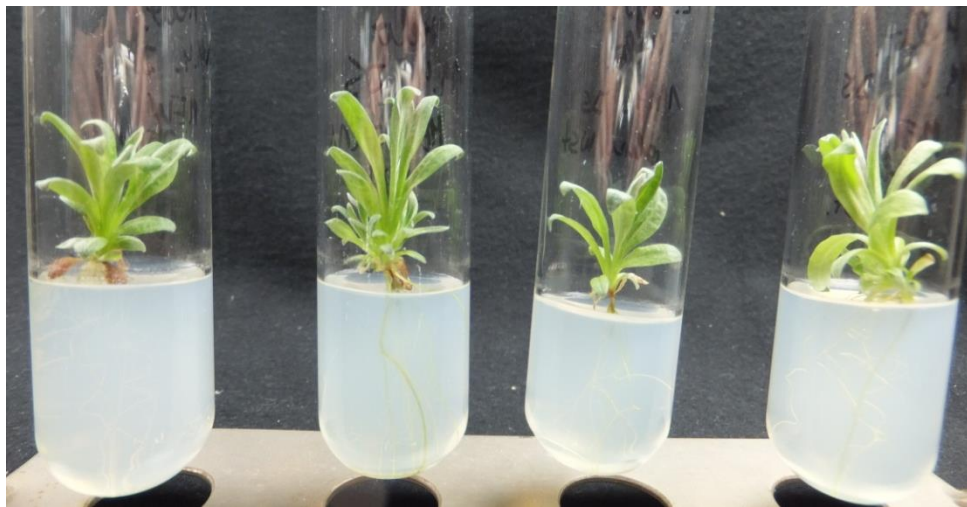


Abbildung 7: *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Sorte „Helvetia“) auf wuchsstofffreiem MEW-Nährmedium

Während der Kultivierung mussten Pflanzen wegen Schimmelbefall aussortiert werden, schlussendlich standen 19 von 46 Pflänzchen für weiterführende Versuche zur Verfügung.

Krumphuber (2015) verwendete im Rahmen seines Keimungsversuchs Chinosollösung zum Befeuchten der Edelweißsamen bzw. der Keimlinge. Durch die Behandlung mit Chinosol erwartete man sich durch die antiseptische

Eigenschaft eine bessere Überlebensrate der Pflänzchen, doch wie in der Diplomarbeit von Krumphuber (2015) beschrieben wird, waren die Ausfälle so hoch, dass nur 7,3 % der in vitro genommenen Edelweißpflänzchen überlebten.

Wenn man die mit Chinosol behandelten Pflänzchen mit denen, die keinen Chinosolzusatz erhielten, vergleicht, sieht man einen deutlichen Entwicklungsunterschied (Abbildung 8). Es war auffallend, dass die Chinosollösung offensichtlich das Wachstum, die Entwicklung und Robustheit der Keimlinge und in weiterer Folge der Pflanzen negativ beeinflusste.

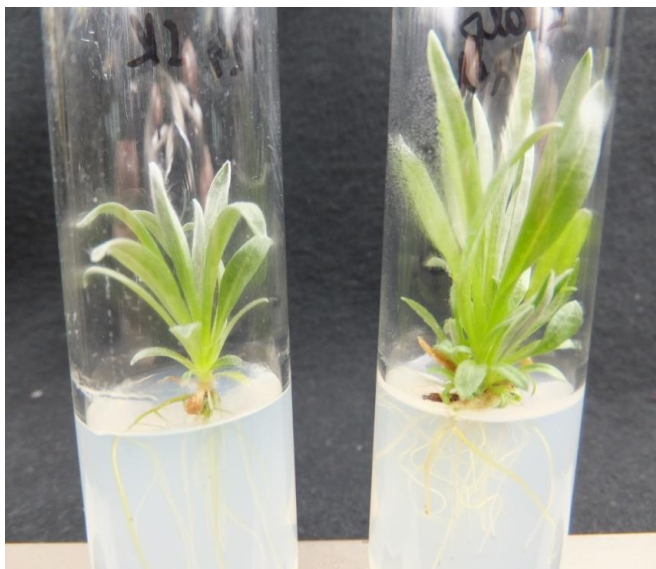


Abbildung 8: In vitro-Kulturen von *Leontopodium nivale ssp. alpinum*, links nach Chinosol-Behandlung der Keimlinge (Krumphuber 2015), rechts ohne Chinosol-Behandlung

3.2. Infektionen mit *Agrobacterium rhizogenes*

Wie in Kapitel 2.4. (S. 10) beschrieben, wurden Infektionen mit 3 verschiedenen Bakterienstämmen von *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt. An *Leontopodium nivale ssp. alpinum* der Sorte „Helvetia“ wurden die Infektionen an der Sprosskultur durchgeführt. Von Klon 9 wurden

einzelne Blattstücke von der Mutterpflanze abgeschnitten, nach Oberflächensterilisation infiziert und auf MS-Medium in Petrischalen kultiviert. Die durchgeführten Infektionen führten in beiden Fällen zu keiner „hairy roots“-Bildung. Selbst nach über 6 Wochen waren an den infizierten Blättern keine transformierten Wurzeln zu erkennen. Mögliche Ursachen dafür werden in Kapitel 4. (S. 36) besprochen.

3.3. Wachstum der „hairy roots“ von Klon K8A

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass es sich bei den „hairy roots“ des Klon K8A um sehr schnell wachsende handelte: Nach 3 Wochen war bereits ein Überimpfen in neues $\frac{1}{2}$ MS Medium nötig. Die entstandene erste Subkultur konnte einen Biomassezuwachs von 594 % verzeichnen.

Abbildung 9 (S. 22) verdeutlicht den prozentuellen Biomassezuwachs, der durch die Elizitierung der „hairy roots“- Kulturen stattfand. Für die Berechnung wurden Animpfgewicht und das nach 4 Wochen Kulturzeit ermittelte Frischgewicht herangezogen. Es ist deutlich erkennbar, dass alle verwendeten Elizitoren in allen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Hemmung des „hairy roots“-Wachstums verursachten. Der Biomassezuwachs der Kontrolle lag bei etwa 1800% und wurde durch keine andere Gruppe auch nur annähernd erreicht.

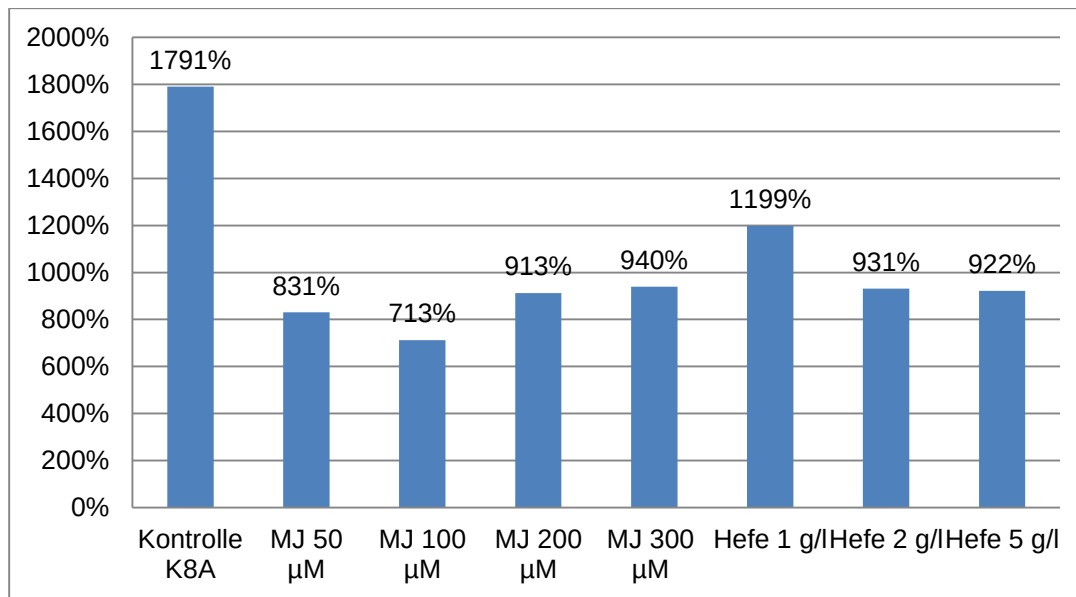


Abbildung 9: Einfluss der Elizitierung auf den Biomassezuwachs (%) der „hairy roots“-Kulturen nach 4 Wochen Kultivierung

Einfluss von Hefeextrakt auf das Wachstum:

Innerhalb der mit Hefeextrakt elizitierten „hairy roots“ konnte in der Gruppe, die mit 1 g/l Hefeextrakt behandelt wurde, mit knapp 1200 % die höchste Gewichtszunahme gemessen werden. Dennoch war der Wert nicht so hoch wie der, der in der Kontrollgruppe ermittelt wurde (1800%).

Die anderen beiden Hefeextrakt-Konzentrationen lieferten annähernd gleiche Ergebnisse im Biomassezuwachs, bei 2 g/l Hefeextrakt war der Zuwachs mit 930 % etwas höher als bei 5 g/l Hefeextrakt (920 %).

Einfluss von Methyljasmonat auf den Biomassezuwachs:

Innerhalb der MJ-Gruppe war der Biomassezuwachs bei den mit 300 µM MJ elizitierten „hairy roots“ mit 940 % am größten. An zweiter Stelle stand die Gruppe, die mit 200 µM MJ behandelt wurde. Die Berechnung lieferte hier einen Zuwachs von ungefähr 910 %. Durch die Elizitierung mit 50 µM lag der Biomassezuwachs bei etwa 830 % und damit doch deutlich vor der Gruppe, die mit 100 µM MJ elizitiert wurde: Das Ergebnis lag hier nur bei ca. 710 %.

3.4. Quantifizierung der Lignane

Die Gehaltbestimmungen wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Stefan Schweiger an der Universität Innsbruck durchgeführt. Mittels HPLC-Analyse konnte der Leoligin- und 5-Methoxyleoligingehalt der getrockneten „hairy roots“ ermittelt werden.

3.4.1 Einfluss von biotischen Elizitoren auf die Leoliginbildung

Einfluss von Methyljasmonat:

In Abbildung 10 (S. 24) erkennt man, dass Methyljasmonat in allen verwendeten Konzentrationen zu einem gesteigerten Leoligingehalt in den „hairy roots“ führte. Die Analyse ergab, dass die Elizitierung mit MJ in einer Konzentration von 100 μM den größten Leoliginanstieg bewirkte (0,0498 %). Wenn man hier den absoluten Leoligingehalt auf Basis des Trockengewichts berechnet, kommt man dabei auf einen Wert von 0,215 mg Leoligin pro Kolben. Die Leoliginkonzentration in den mit 100 μM MJ elizitierten „hairy roots“ unterschied sich nicht signifikant vom Gehalt nach Elizitierung mit 50 μM bzw. 200 μM . Der Wert unterschied sich allerdings signifikant von dem der Kontrollgruppe und dem der mit 300 μM MJ elizitierten Gruppe. Der Leoligingehalt der nicht elizitierten Kontrollgruppe lag bei 0,0062 % bzw. umgerechnet bei 0,041 mg Leoligin pro Kolben. Durch die Zugabe von 50 μM MJ konnte ein Leoligingehalt von 0,0316 % gemessen werden, und die Elizitierung mit 200 μM MJ bewirkte in den „hairy roots“ einen Leoligingehalt von 0,0249 %. Der niedrigste Leoligingehalt (0,0173 % bzw. 0,112 mg pro Kolben) war nach Behandlung mit 300 μM MJ festzustellen, aber auch dieser Wert lag deutlich über dem der Kontrollgruppe, wenn auch nicht signifikant.

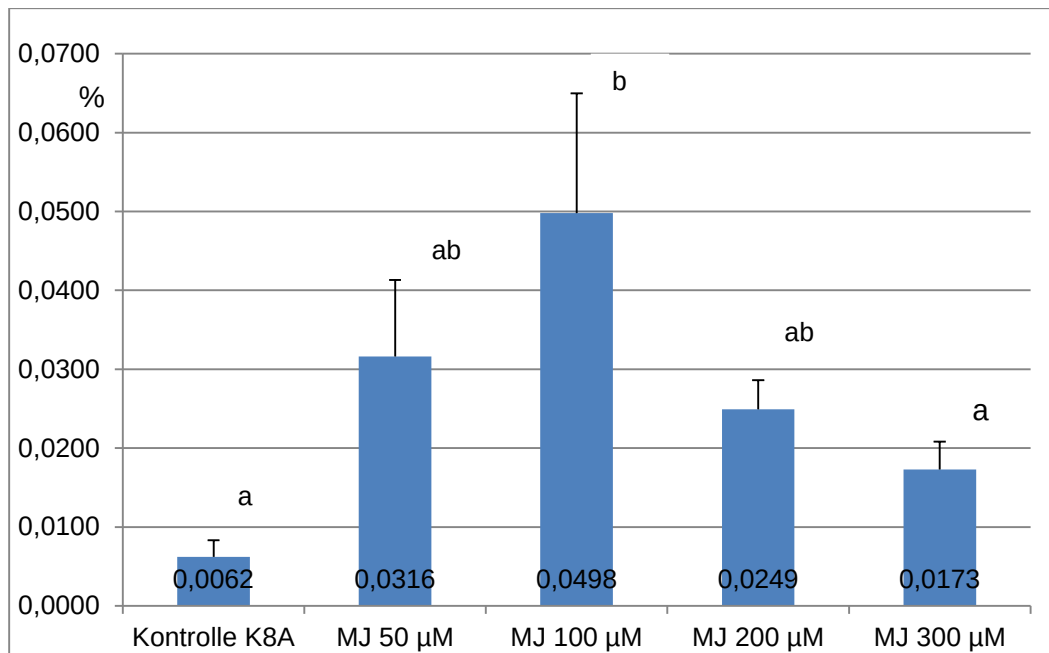


Abbildung 10: Leoligehalt in % bezogen auf das Trockengewicht nach Behandlung mit verschiedenen MJ-Konzentrationen bzw. ohne Elizitorzugabe (Kontrolle); Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Tabelle 1: Leoliginmenge in mg/Kolben bezogen auf das Trockengewicht nach Behandlung mit verschiedenen MJ-Konzentrationen bzw. ohne Elizitorzugabe (Kontrolle)

Probe	Leoligin (mg pro Kolben)
Kontrolle K8A	0,041
MJ 50 µM	0,162
MJ 100 µM	0,215
MJ 200 µM	0,123
MJ 300 µM	0,112

Einfluss von Hefeextrakt (YE):

Wie in Abbildung 11 dargestellt bewirkte die Elizitierung mit 2g/l YE den höchsten Anstieg der Leoliginkonzentration: Es wurde ein Gehalt von 0,0337 % ermittelt, das umgerechnet einen Wert von 0,173 mg Leoligin pro Kolben ergab. Auch der Zusatz von 1 g/l Hefeextrakt führte zu einer Zunahme des Leoligingehalts (0,0192 %). Dieser Wert unterschied sich jedoch nicht signifikant von den anderen Werten. Bei Elizitierung mit 5 g/l Hefeextrakt sank der Leoligingehalt mit 0,0035 % unter den Wert, der in der Kontrollgruppe gemessen werden konnte (0,0062 %).

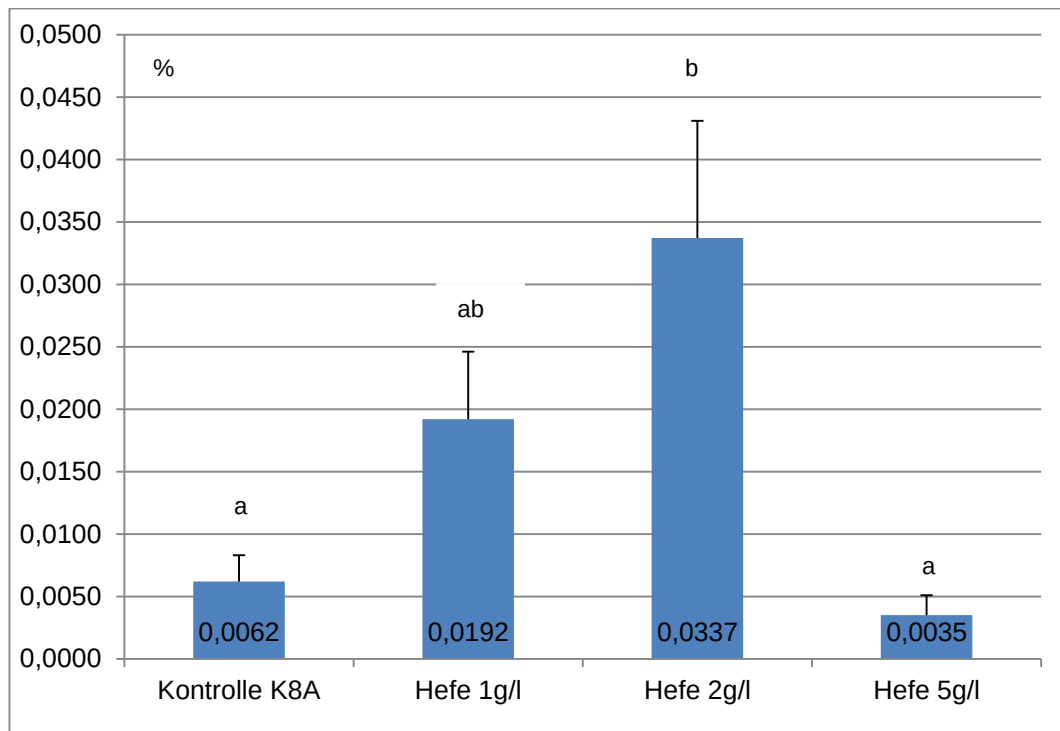


Abbildung 11: Leoliginegehalt in % bezogen auf das Trockengewicht nach Behandlung mit verschiedenen Hefekonzentrationen bzw. ohne Elizitorzugabe (Kontrolle); Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Tabelle 2: Leoligingehalt in mg/Kolben bezogen auf das Trockengewicht nach Behandlung mit verschiedenen Hefekonzentrationen bzw. ohne Elizitorzugabe (Kontrolle)

Probe	Leoligin (mg pro Kolben)
Kontrolle K8A	0,041
Hefe 1 g/l	0,132
Hefe 2 g/l	0,173
Hefe 5 g/l	0,023

Abbildung 12 (S. 27) soll den Leoligingehalt der mit biotischen Elizitoren behandelten „hairy roots“ zusammenfassend darstellen und gleichzeitig auch die statistischen Aspekte veranschaulichen. Die Elizitierung mit 100 µM MJ resultierte in der höchsten Leoliginkonzentration, bezieht man die statistischen Aspekte mit ein, so unterscheidet sich der gemessene Wert (0,0498 %) nicht signifikant von dem Wert, der durch die Zugabe von 50 µM MJ bzw. durch die Elizitierung mit 2 g/l Hefeextrakt erreicht wurde. Verglichen mit allen anderen Werten lässt sich allerdings ein signifikanter Unterschied feststellen. Durch Elizitierung mit 2 g/l YE konnte mit 0,0337 % die zweithöchste Leoliginkonzentration in den „hairy roots“ gemessen werden.

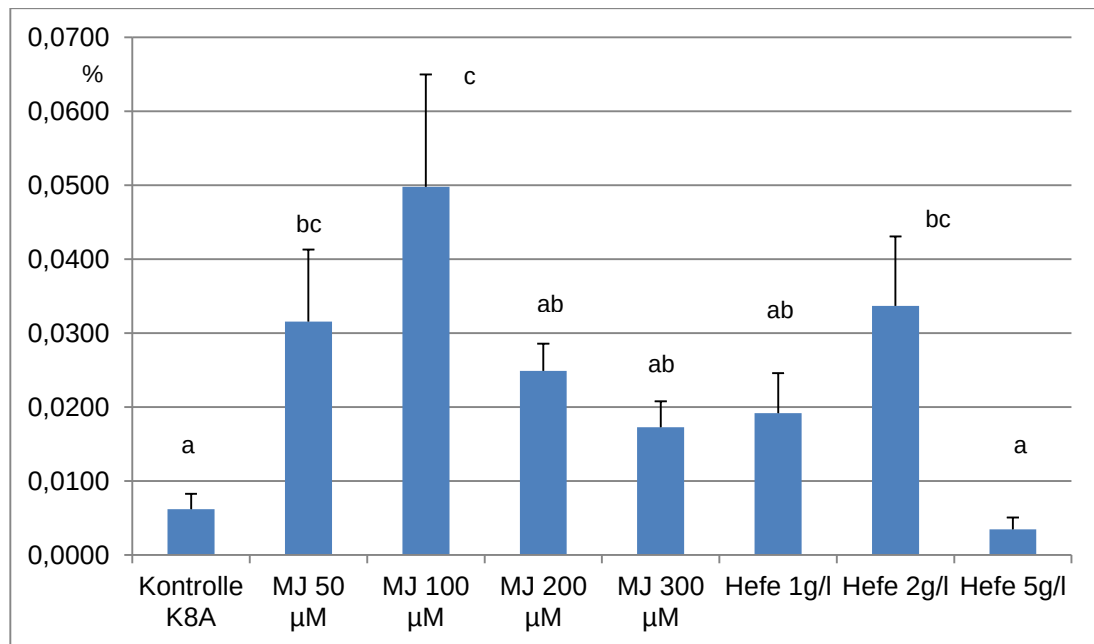


Abbildung 12: Leoliginkonzentration in % bezogen auf das Trockengewicht der mit biotischen Elizitoren behandelten „hairy roots“ bzw. ohne Elizitorzugabe (Kontrolle); Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

3.4.2. Einfluss von biotischen Elizitoren auf die 5-Methoxyleoliginkbildung

Neben dem Leoligingehalt wurde auch die 5-Methoxyleoliginkonzentration der „hairy roots“ mittels HPLC-Analyse ermittelt.

Einfluss von Methyljasmonat

Abbildung 13 (S. 28) zeigt den Einfluss von verschiedenen MJ-Konzentrationen auf den 5-Methoxyleoligingehalt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, führte die Elizitierung mit MJ zu einer gesteigerten 5-Methoxyleoliginkonzentration in den „hairy roots“. Der höchste gemessene Wert wurde in der Gruppe, die mit 100 µM MJ eliziert wurde, ermittelt: Die Messung ergab einen Gehalt von 0,0188 %. Statistisch gesehen unterscheidet sich dieser

Wert signifikant vom gemessenen Wert der Kontrolle und dem der mit 200 μM elizitierten „hairy roots“.

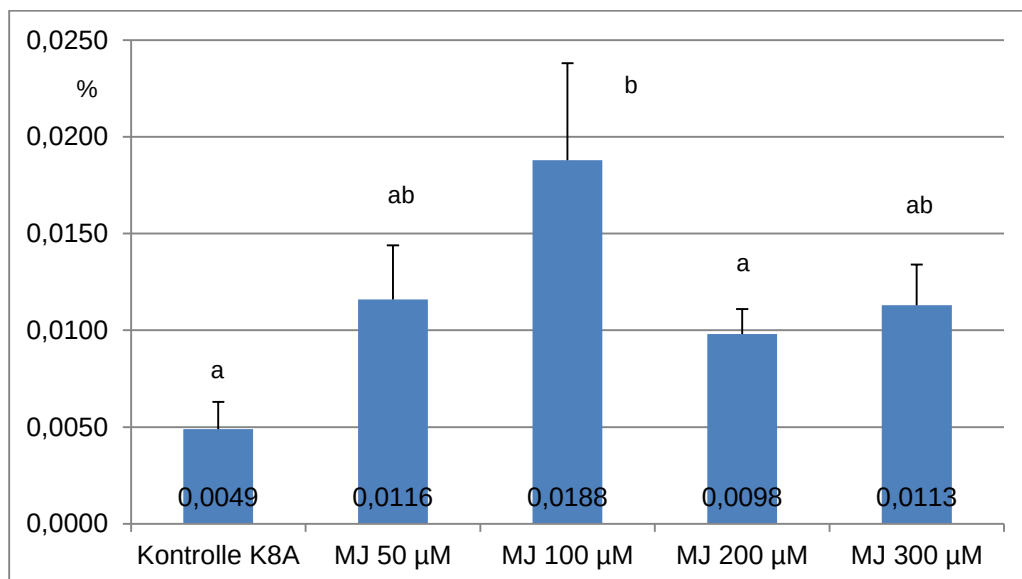


Abbildung 13: 5-Methoxyleoliginkonzentrationen in % bezogen auf das Trockengewicht der mit unterschiedlichen MJ-Konzentrationen elizitierten „hairy roots“ bzw. der unelizitierten Kontrolle; Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($n=2$), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Tabelle 3: 5-Methoxyleoliginkonzentrationen in mg/Kolben bezogen auf das Trockengewicht der mit unterschiedlichen MJ-Konzentrationen elizitierten „hairy roots“ bzw. der unelizitierten Kontrolle

Probe	5-Methoxyleoligin (mg pro Kolben)
Kontrolle K8A	0,033
MJ 50 μM	0,060
MJ 100 μM	0,082
MJ 200 μM	0,049
MJ 300 μM	0,073

Einfluss von Hefeextrakt

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, führte der Zusatz von 2 g/l YE im Vergleich zu den anderen verwendeten Hefekonzentrationen zum höchsten Gehalt an 5-Methoxyleoligin (0,0204 %). Bezogen auf das Trockengewicht bedeutet dies eine Menge von 0,105 mg 5-Methoxyleoligin pro Kolben. Dieser Wert lag um den Faktor 10 höher als der bei Einsatz von 5g/l Hefeextrakt. Das zweithöchste Ergebnis lieferte die Gruppe, die mit 1 g/l YE eliziert wurde. Die gemessenen 0,0118 % unterschieden sich allerdings unter Berücksichtigung der statistischen Auswertung nicht signifikant vom Gehalt der mit 2 g/l YE elizitierten „hairy roots“. Die „hairy roots“, die mit 5 g/l YE eliziert wurden, ergaben bei der Analyse einen geringeren 5-Methoxyleoliginingehalt als die Kontrolle: Es konnte ein Wert von 0,0019 % gemessen werden.

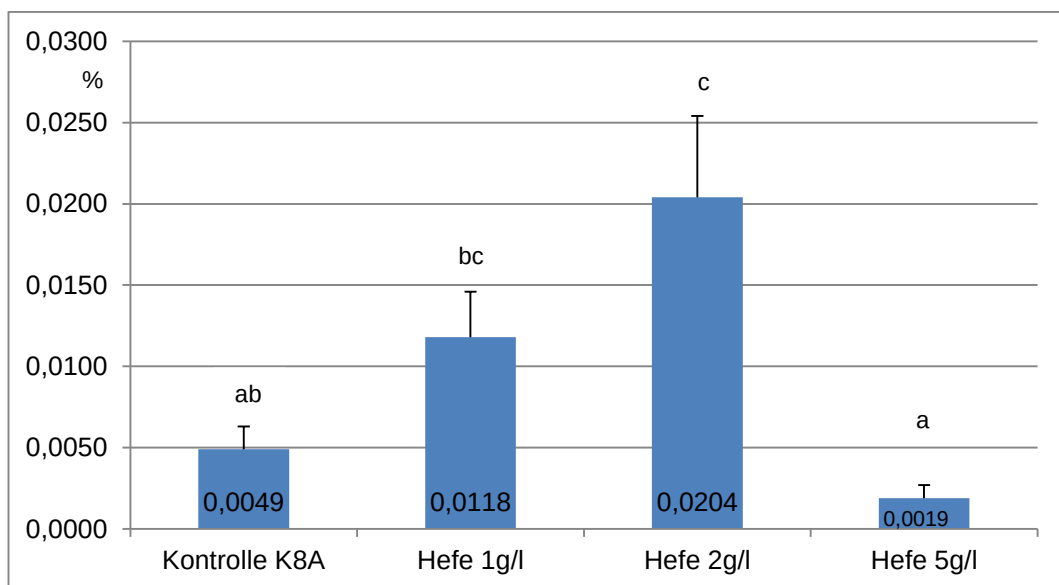


Abbildung 14: 5-Methoxyleoliginkonzentrationen in % bezogen auf das Trockengewicht der mit unterschiedlichen Hefe-Konzentrationen elizitierten „hairy roots“ bzw. der unelizitierten Kontrolle; Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Tabelle 4: 5-Methoxyleoliginkonzentrationen in mg/Kolben bezogen auf das Trockengewicht der mit unterschiedlichen Hefe-Konzentrationen elizitierten „hairy roots“ bzw. der unelizitierten Kontrolle

Probe	5-Methoxyleoligin (mg pro Kolben)
Kontrolle K8A	0,033
Hefe 1 g/l	0,081
Hefe 2 g/l	0,105
Hefe 5 g/l	0,013

Abbildung 15 soll den 5-Methoxyleoligingehalt der mit biotischen Elizitoren versetzten „hairy roots“ unter Berücksichtigung der statistischen Auswertung graphisch darstellen. Die Elizitierung mit 2 g/l YE und 100 μ M MJ führten zur größten Steigerung der 5-Methoxyleoliginkonzentration in den „hairy roots“. Die genannten Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, jedoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen und dem gemessenen Wert der Kontrolle. Aus der statistischen Auswertung geht weiters hervor, dass sich die ermittelten 5-Methoxyleoliginkonzentrationen der „hairy roots“, die mit MJ elizitiert wurden, nicht signifikant unterscheiden.

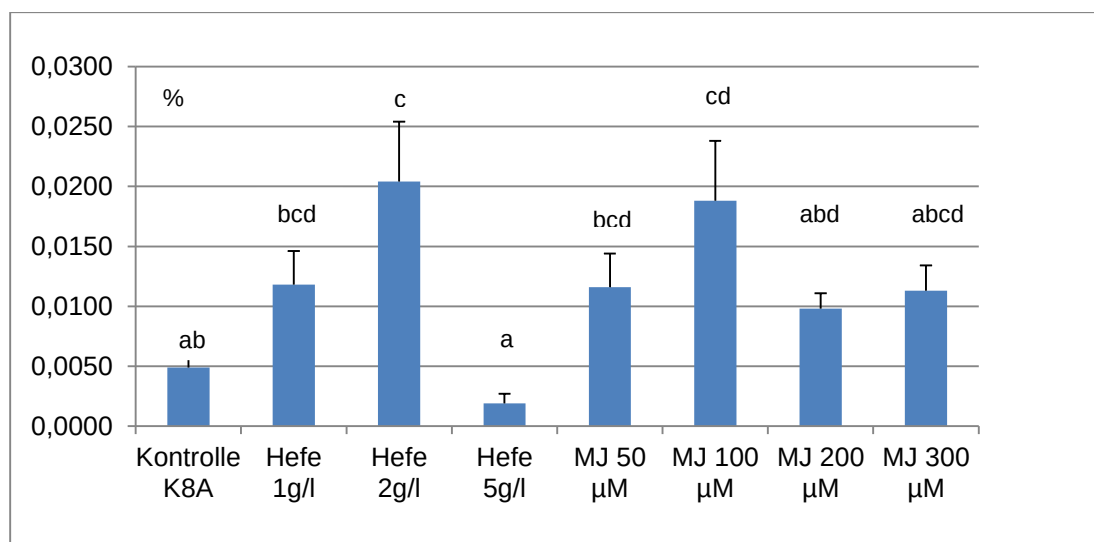


Abbildung 15: 5-Methoxyleoliginegehalt (%) der mit biotischen Elizitoren behandelten „hairy roots“; Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Bei gemeinsamer Darstellung des Gehaltes an Leoligin und 5-Methoxyleoligin (Abbildung 16) wird deutlich, dass die Elizitierung mit 100 μ M MJ zwar den Leoliginingehalt am höchsten ansteigen ließ, der Methoxyleoliginingehalt jedoch nach Elizitierung mit 2 g/l YE am höchsten war. Die Behandlung mit 5 g/l YE führte verglichen mit der Kontrolle zu einer Hemmung der Sekundärstoffproduktion.

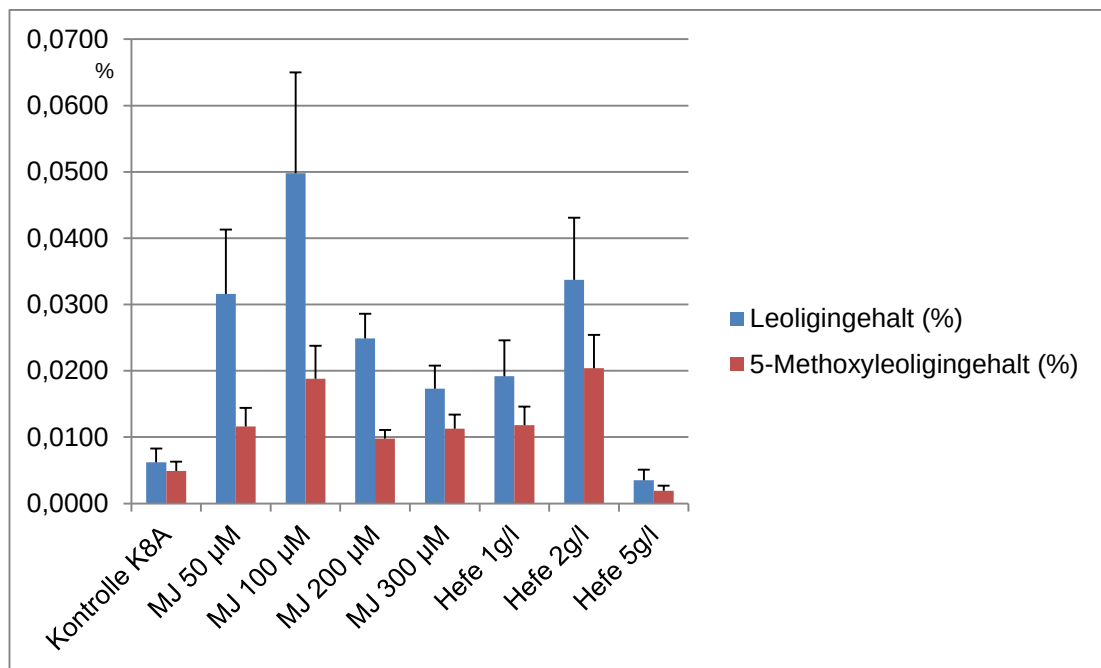


Abbildung 16: Leoligin- und 5-Methoxyleoliginingehalt in % bezogen auf das Trockengewicht in den „hairy roots“ nach Elizitierung bzw. in der Kontrolle

In Tabelle 5 (S. 32) ist der Einfluss der biotischen Elizitoren auf das Biomassewachstum und auf die Sekundärstoffproduktion zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass es generell zu einer Hemmung des Wachstums kam, jedoch die Leoligin- und 5-Methoxyleoliginkonzentration in allen Gruppen über der unelizitierten Kontrollgruppe lagen. Eine Ausnahme war lediglich bei Elizitierung mit 5 g/l Hefeextrakt festzustellen, hier lag der Lignangehalt unter dem der Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Einfluss von biotischen Elizitoren auf den Biomassezuwachs und die absolute Leoligin- und 5-Methoxyleoliginkonzentration

Probe	Biomasse- zuwachs (%)	Leoligin (mg pro Kolben)	5-Methoxyleoligin (mg pro Kolben)
Kontrolle K8A	1791	0,041	0,033
MJ 50 µM	831	0,162	0,060
MJ 100 µM	713	0,215	0,082
MJ 200 µM	913	0,123	0,049
MJ 300 µM	940	0,112	0,073
Hefe 1 g/l	1199	0,132	0,081
Hefe 2 g/l	931	0,173	0,105
Hefe 5g/l	922	0,023	0,013

3.4.3. Einfluss von biotischen und abiotischen Elizitoren auf die Sekundärstoffbildung

Im Rahmen der Diplomarbeit von Krumphuber (2015) wurde der Einfluss von abiotischen Elizitoren (Saccharose und Silbernitrat) auf die Sekundärstoffbildung des „hairy roots“-Klon K8A untersucht. Abbildung 17 und 18 (S. 33 und 35) zeigen alle verwendeten Elizitoren und die resultierenden Werte für den Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoliginegehalt. Die beiden Abbildungen beinhalten auch die graphische Darstellung der Leoligin- bzw. 5-Methoxyleoliginkonzentration der drei Vergleichsproben FW120602, Klon 44 und Klon 9. Dabei handelt es sich um unter natürlichen Bedingungen kultivierte *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* Klone, die aus der Schweiz (Klon 44 und Klon 9) bzw. aus Innsbruck (FW120602) stammten.

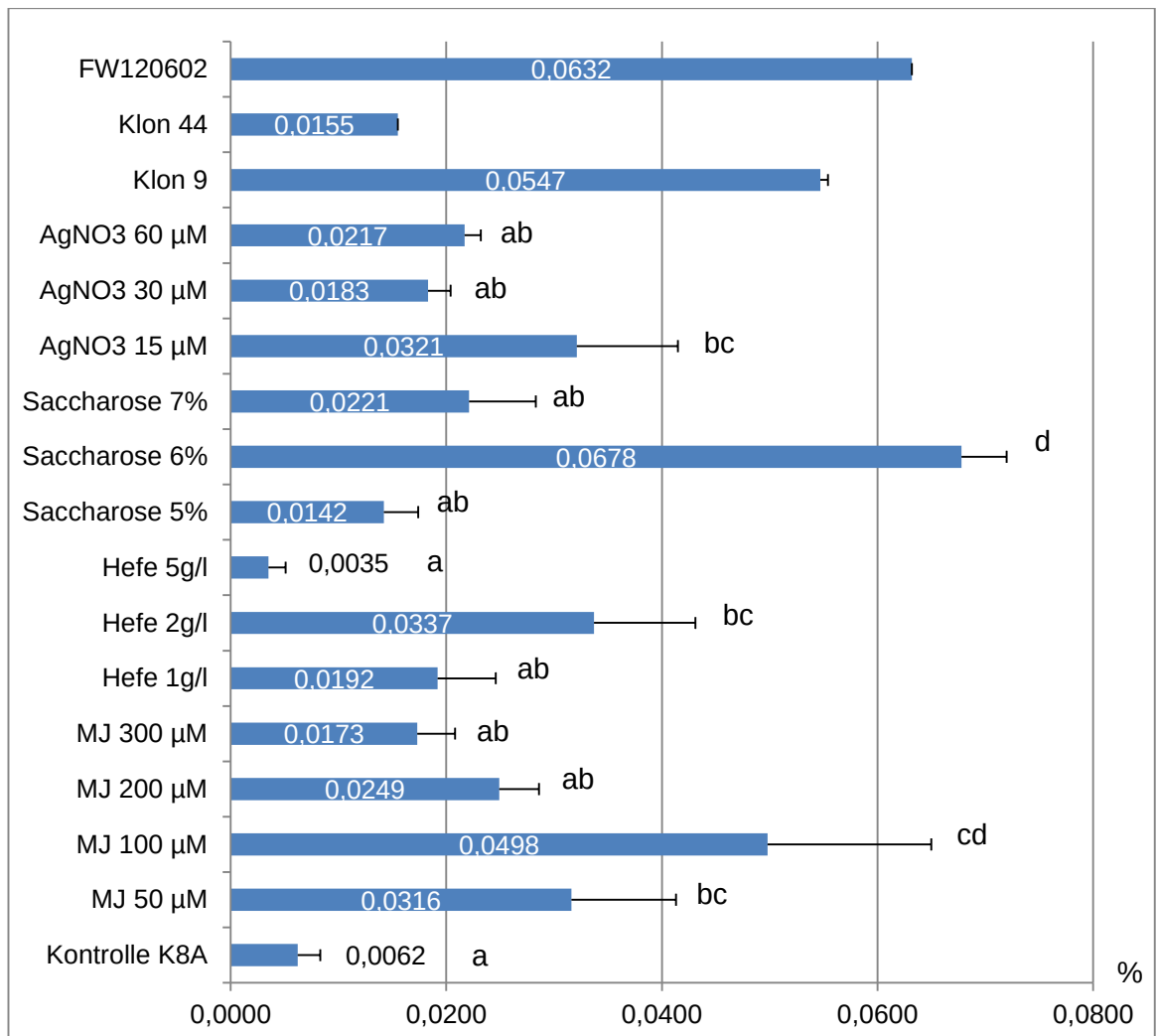


Abbildung 17: Leoliginkonzentration in % bezogen auf das Trockengewicht der biotisch und abiotisch elizitierten „hairy roots“ (K8A) und der 3 aus Feldkultur stammenden Edelweißkultivare (FW120602, Klon 44, Klon 9) Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Bei Betrachtung der Abbildungen 17 und 18 (S. 35) ist auffallend, dass eine Saccharosekonzentration von 6 % im $\frac{1}{2}$ MS Nährmedium sowohl die Leoligin- als auch die 5-Methoxyleoliginkonzentration am meisten ansteigen ließ. Die gemessenen Werte waren 0,068 % Leoligin und 0,037 % 5-Methoxyleoligin. Durch die Elizitierung mit 100 µM MJ konnte ein Wert von 0,050 % Leoligin gemessen werden. Die statistische Auswertung ergab, dass kein signifikanter Unterschied zwischen diesem Wert und dem Leoliginingehalt, der durch Elizitierung mit 6 % Saccharose gemessen wurde, vorliegt.

Folgende Ergebnisse lieferte die Analyse der Wurzeln von FW120602, Klon 44 und Klon 9, die aus Feldkultur stammten: In FW120602 wurden 0,063 %, im Klon 44 0,016 % und im Klon 9 0,055 % Leoligin gemessen.

Anhand der Abbildung 17 (S. 33) erkennt man deutlich, dass nur durch die Elizitierung mit 6 % Saccharose eine höhere Leoliginkonzentration gemessen werden konnte als bei den Edelweißkultivaren FW120602 und Klon 9. MJ-Zusatz in einer Konzentration von 100 μM bewirkte einen annähernd so hohen Leoliginingehalt wie in Klon 9 gemessen wurde. Alle anderen verwendeten Elizitoren konnten derart hohe Werte nicht erzielen.

Der Leoliginingehalt, der im Klon 44 ermittelt wurde, liegt verglichen mit den anderen beiden Edelweißkultivaren weit niedriger. Die Messung ergab einen Leoliginingehalt von 0,016 %. Eine sehr ähnliche Konzentration wurde auch durch die Elizitierung mit 30 μM AgNO_3 , 5 % Saccharose oder 300 μM MJ erreicht.

Wie aus Abbildung 18 (S. 35) hervorgeht, ergab die Bestimmung von 5-Methoxyleoligin bei Klon 44 einen sehr hohen Wert (0,129 %). Die Konzentration von 5-Methoxyleoligin des Edelweißkultivar Klon 9 liegt, verglichen mit allen anderen gemessenen Proben, an zweiter Stelle (0,067 %), gefolgt von FW120602 (0,052%). Durch die Elizitierung der Klonlinie K8A konnten derart hohe Werte nicht erzielt werden. Der Wert von 5-Methoxyleoligin der „hairy roots“, die mit 6 % Saccharose elizitiert wurden, ist annähernd so hoch wie die gemessenen Werte der drei Edelweißkultivaren und liegt bei 0,037 %. Dieser Gehalt unterscheidet sich signifikant von allen anderen ermittelten Werten. Der Gehalt an 5-Methoxyleoligin lag nach Elizitierung mit 15 μM AgNO_3 bei 0,026 %. Innerhalb der mit biotischen Elizitoren behandelten „hairy roots“ konnte durch den Zusatz von 2 g/L YE der höchste Wert an 5-Methoxyleoligin gemessen werden (0,034 %). Die statistische Auswertung ergab, dass kein signifikanter Unterschied zwischen diesem Wert und dem, der durch Elizitierung mit 15 μM AgNO_3 gemessen wurde, besteht.

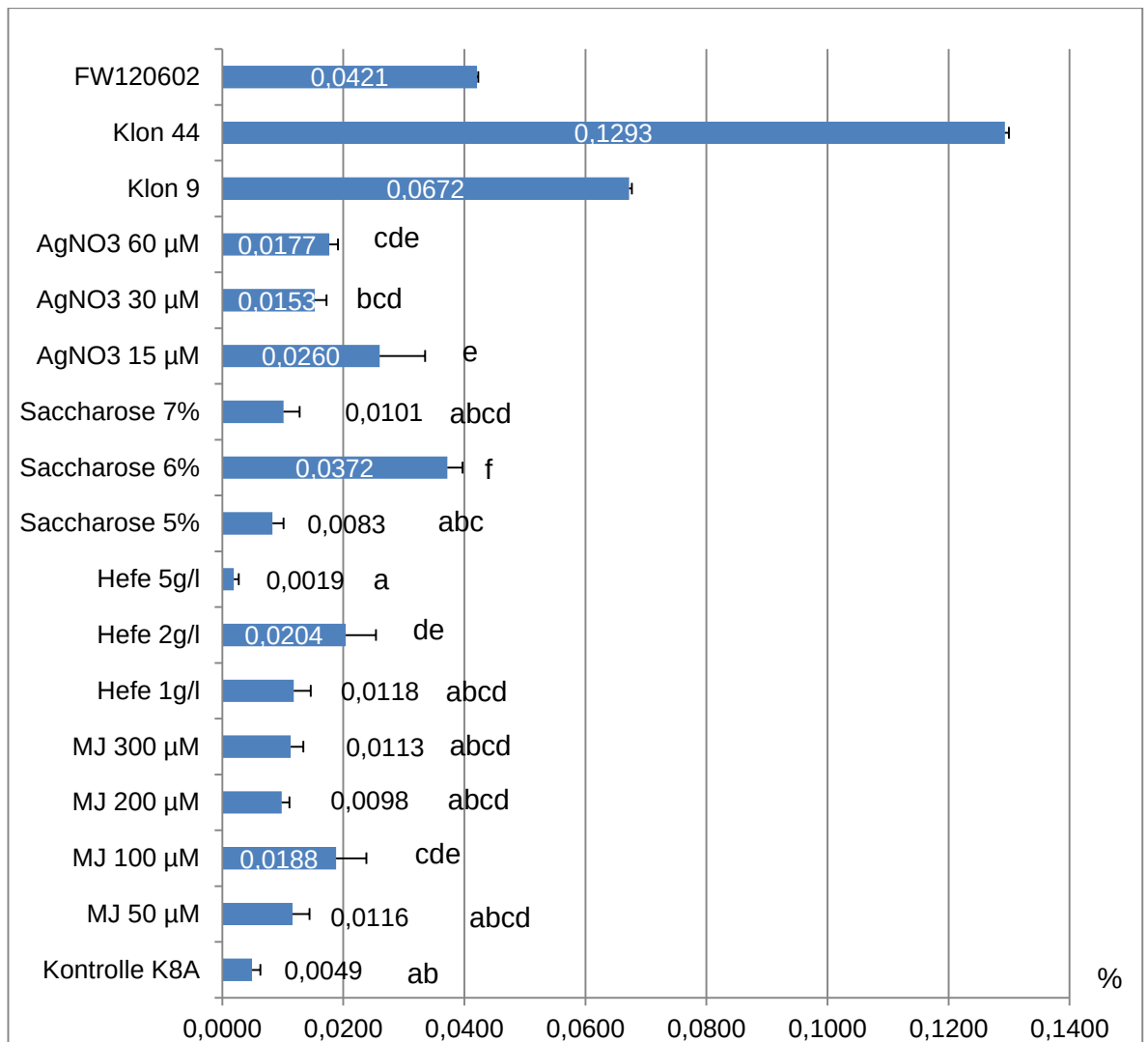


Abbildung 18: 5-Methoxyoleoliginkonzentration in % bezogen auf das Trockengewicht der biotisch und abiotisch elizitierten „hairy roots“ (K8A) und der 3 aus Feldkultur stammenden Edelweißkultivare (FW120602, Klon 44, Klon 9), Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n=2), Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

4. Diskussion

Die zur Familie der Asteraceen gehörende Gattung *Leontopodium* (Edelweiß) kommt vorwiegend auf Kalkstein an steinigen und grasbedeckten Abhängen in Höhen von 220-3140 m vor (Meusel und Jäger, 1992). In den Pyrenäen, Alpen und Karpaten finden sich die Arten *Leontopodium alpinum* und *Leontopodium nivale* (Safer et al. 2011). Die beiden in den Wurzeln enthaltenen Lignane Leoligin und 5-Methoxyleoligin weisen interessante Eigenschaften für den Einsatz in der Therapie von koronaren Herzerkrankungen auf. Da Leoligin in natürlichen Edelweißwurzeln allerdings nur in sehr geringen Mengen enthalten ist (0,0047 %), braucht man eine alternative Gewinnungsmethode, um Leoligin in höherer Konzentration zu erhalten (Dobner et al. 2003). Mit 5-Methoxyleoligin verhält es sich ähnlich: Lediglich 0,0015 % lassen sich aus getrockneten Edelweißwurzeln isolieren (Messner et al. 2013).

Grundsätzlich gibt es zwei alternative Wege, pflanzliche Inhaltsstoffe zugänglich zu machen. Es gibt einerseits die Möglichkeit, Verbindungen chemisch zu synthetisieren, oder andererseits den gewünschten Inhaltsstoff über ein biotechnologisches Verfahren (wie Zell- oder Organkultur) in vitro herzustellen. Bei der Taxolgewinnung beispielsweise greift man auf die Möglichkeit der pflanzlichen Zellkultur zurück. Mit dieser Methode ist es möglich, etwa $\frac{3}{4}$ des Weltbedarfs an Paclitaxel und verwandten Taxoiden zu gewinnen.

Bei Zellkulturen handelt es sich um undifferenziertes Gewebe, wodurch eine gewisse Variabilität und Heterogenität auftritt, sodass das Wachstum und die synthetisierte Sekundärstoffmenge je nach Zellkultur unterschiedlich sein können (Vongpaseuth et al. 2007). Daher ist die Verwendung von Organkulturen wie z.B. „hairy roots“-Kulturen zielführender, da man hier von einer genetischen und biochemischen Stabilität solcher differenzierter Strukturen ausgehen kann (Parr et al. 1988).

Die Vorteile, die sich durch die Verwendung von „hairy roots“ Kulturen ergeben, sind deutlich: „Hairy roots“ sind, wie bereits erwähnt, im Gegenteil zu Zellkulturen genetisch und biosynthetisch stabil. Weiters profitiert man vom

schnellen Wachstum auf hormonfreiem Nährmedium, der einfachen Kultivierung und der Tatsache, dass „hairy roots“ Sekundärstoffe in relativ hoher Menge synthetisieren können (Rahimi et al. 2008; Shanks und Morgan 1999).

Satdive et al. (2007) untersuchten zum Beispiel, ob die Azadirachtin-Konzentration in „hairy roots“ von *Azadirachta indica* höher ist als in natürlichen Wurzeln von *Azadirachta indica*. Die Gehaltsbestimmung ergab einen starken Anstieg der Azadirachtin Konzentration in den „hairy roots“ verglichen mit den natürlichen Wurzeln. So wurde ein Gehalt von 0,016 % Azadirachtin in den „hairy roots“ ermittelt, die Konzentration in natürlichen Wurzeln liegt bei 0,00032 %. Weiters wurde der Einfluss von 100 mM und 200 mM Jasmonsäure (biotischer Elizitor) untersucht. Die Gehaltsbestimmung der mit 100 mM Jasmonsäure elizitierten „hairy roots“ ergab 0,095 % Azadirachtin.

Am eben genannten Beispiel erkennt man den positiven Effekt der „hairy roots“ Induktion bzw. des Elizitoreinsatzes auf die Sekundärstoffbildung.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, durch Elizitierung des schnell wachsenden „hairy roots“-Klon K8A, der von Ondratschek (2012) etabliert wurde, eine Steigerung der Leoligin bzw. 5-Methoxyleoligin-konzentration zu erreichen. Weiters sollten mit Hilfe des Bodenbakteriums *Agrobacterium rhizogenes* neue „hairy roots“- Kulturen von der Edelweiß-Klonlinie „Klon 9“ und der Sorte „Helvetia“ etabliert werden. Sowohl „Klon 9“ als auch die durch Kreuzzüchtung entstandene Sorte „Helvetia“ zeichnen sich durch hohen Lignangehalt aus, weshalb die Etablierung von „hairy roots“ von Interesse ist. Dazu musste im Vorfeld eine neue Kultur von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* cv. „Helvetia“ etabliert werden. Aus Vorversuchen wusste man, dass es bei in vitro Keimung trotz Oberflächensterilisation zu Schimmelbefall der Keimlinge kommt. Aufgrund dessen wurde die Samenkeimung in Erde im Glashaus bevorzugt und die gekeimten Pflänzchen erst vor der in vitro Überführung oberflächensterilisiert. Krumphuber (2015) verwendete zum Befeuchten der Samen und später der Keimlinge Chinosollösung, die einen Schimmelbefall verhindern sollte. Der Versuch zeigte allerdings, dass eine Befeuchtung der Samen und in weiterer Folge der Pflänzchen mit Wasser, wie von uns

durchgeführt, vollkommen ausreicht bzw. die Verwendung von Chinosollösung sich negativ auf die Entwicklung und Robustheit der Keimlinge auswirkt (Krumphuber 2015).

Für die Etablierung der „hairy roots“-Kulturen wurden die *Agrobacterium rhizogenes* Stämme TR 105, ATCC 15831 und LBA 94002 verwendet. Der Versuch, „hairy roots“-Wachstum bei *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* cv. „Helvetia“ und dem Klon C9 zu induzieren, war jedoch nicht erfolgreich. Faktoren wie Alter des Pflanzenmaterials, Spezies und Pflanzentyp spielen eine große Rolle bei der „hairy roots“-Bildung. Aber auch der verwendete Bakterienstamm und die Bakteriendichte der Suspension haben Einfluss auf die erfolgreiche „hairy roots“-Bildung (Georgiev et al. 2007). Lin et al. (2003) induzierten „hairy roots“ Wachstum an *Linum flavum*. Dazu wurden 4 verschiedene *Agrobacterium rhizogenes* Stämme verwendet. Die besten Ergebnisse mit einer Transformationsrate von ca. 50 % konnten durch die Stämme TR105 und LBA9402 erzielt werden. Durch die beiden anderen Bakterienstämme 15834 und A4 konnte keine effektive „hairy roots“ Induktion erreicht werden.

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit wurden weitere Elizitierungsversuche an „hairy roots“ der Klonlinie K8A durchgeführt, die von Ondratschek (2012) im Rahmen ihrer Diplomarbeit etabliert worden war. Eingesetzt wurden die biotischen Elizitoren Methyljasmonat (MJ) und Hefeextrakt (YE) in verschiedenen Konzentrationen. In der Literatur finden sich viele Studien, die den positiven Einfluss von Methyljasmonat bzw. Hefeextrakt auf die Sekundärstoffbildung belegen. Dabei lassen sich erfolgreiche Elizitierungsversuche bei unterschiedlichen Stoffklassen dokumentieren.

So konnte beispielsweise in einer Zellsuspensionskultur von *Eschscholtzia californica* CHAM. (Kalifornischer Mohn) durch die Elizitierung mit MJ eine deutliche Steigerung der Sanguinarinkonzentration festgestellt werden. Der Gehalt stieg nach der Elizitierung mit MJ nahezu linear an. 48 h nach der MJ-Zugabe konnte eine im Vergleich zur unelizitierten Kontrollgruppe 4,76-mal höhere Sanguinarin-konzentration gemessen werden. Danach sank der Gehalt wieder langsam ab (Kollarova et al. 2014).

Wongwicha et al. (2011) untersuchten den Effekt von MJ und YE auf die Glycyrrhizin-Konzentration in „hairy roots“ Kulturen von *Glycyrrhiza inflata*. Der höchste Glycyrrhizingehalt konnte 5 Tage nach Elizitierung mit 100 µM MJ gemessen werden, der Wert war 5,7-mal höher als in der Kontrollgruppe. Auch die Elizitierung mit YE führte zu einer gesteigerten Glycyrrhizinproduktion. Der höchste Wert innerhalb der mit YE elizitierten Gruppe wurde 7 Tage nach Zusatz von 1 mg/ml YE gemessen: Er war 1,4-mal so hoch wie der der Kontrollgruppe.

Die Zugabe von Methyljasmonat zu einer Zellkultur von *Silybum marianum* zeigte einen deutlichen Anstieg der Silymarin-Konzentration. Es wurde beobachtet, dass verglichen mit den anderen Elizitoren durch die Zugabe von 100 µM MJ alleine oder in Kombination mit Hefeextrakt Silymarin in den Zellen in höherer Konzentration gebildet wurde (Sánchez-Sampedro et al. 2005).

Die Analysen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass innerhalb der verwendeten biotischen Elizitoren MJ in einer Konzentration von 100 µM bzw. 2 g/l Hefeextrakt den Leoligin- und 5-Methoxyleoliginegehalt weitaus am höchsten ansteigen ließen. Innerhalb der abiotischen Elizitoren, deren Auswirkung auf die Sekundärstoffbildung im Rahmen der Diplomarbeit von Krumphuber (2015) untersucht wurde, lieferten 6 % Saccharose bzw. AgNO₃ in einer Konzentration von 15 µM den höchsten Leoligin- und Methoxyleoliginwert.

Wenn man bedenkt, dass die verwendeten Elizitoren auch das Wachstum der „hairy roots“ beeinflussen, sollte man sich überlegen, ob sich der Aufwand, den die Elizitierung mit sich bringt, lohnt. Es kann sein, dass die Elizitoren das Wachstum der „hairy roots“ soweit herabsetzen, dass eine Elizitierung im Endeffekt zu keiner Steigerung der Ausbeute an Sekundärstoff führt. In diesem Fall würde man die Kultivierung der „hairy roots“ ohne Elizitorzugabe bevorzugen. Prisching (2012) arbeitete im Rahmen ihrer Diplomarbeit am „hairy roots“-Klon K30 ebenfalls mit den biotischen Elizitoren Methyljasmonat und Hefeextrakt. Die Elizitoren hemmten den Biomassezuwachs der „hairy roots“ so stark, dass kein Anstieg der Leoliginkonzentration gemessen werden konnte. Daher ist es in diesem Fall wegen des durch die Elizitierung inhibierten Wachstums zu keiner Steigerung der Leoliginmenge gekommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden „hairy roots“ von *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* Klon K8A für die Elizitierung herangezogen. Obwohl die Elizitoren auch hier das Wachstum hemmten, kam es trotzdem zu einem starken Anstieg der absoluten Leoligin- bzw. Methoxyleoliginkonzentration.

Die quantitative HPLC-Analyse der Leoligin- und 5-Methoxyleoliginkonzentration wurde nicht nur an *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* Klon K8A durchgeführt, sondern auch an drei anderen Klonlinien, die aus Feldkultur stammten. Dabei handelte es sich um Klon 9, Klon 44 und FW120602. Vor allem der 5-Methoxyleoliginegehalt dieser drei Proben war sehr hoch und lag deutlich über den Werten, die die Analyse von „hairy roots“ des Klon K8A ergab. Die 5-Methoxyleoliginkonzentration von Klon 44 betrug 0,129 % und ist damit um beinahe 7x höher als der Wert der „hairy roots“, die mit 2g/l Hefe elizitiert wurden. Hier war der ermittelte Gehalt von 0,020 % innerhalb der biotisch elizitierten „hairy roots“ am höchsten.

Die Analyse von Klon FW120602 ergab einen Leoliginwert von 0,063 %, der damit die ermittelten Leoliginwerte innerhalb der biotisch elizitierten „hairy roots“ leicht überstieg. Durch Elizitierung mit 100 µM MJ wurde ein Ergebnis von 0,050 % Leoligin erreicht.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre es sinnvoll, von den bisher nur in Feldkultur gehaltenen Klonen 9, 44 und FW120602 „hairy roots“- Kulturen zu etablieren. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde dementsprechend bereits versucht, eine neue „hairy roots“ Linie von Klon 9 zu erhalten, da man dadurch von den Vorteilen der in vitro Kultivierung profitieren und, wenn genug „hairy roots“ – Material zur Verfügung ist, auch Elizitierungsversuche starten könnte. Es wäre vorstellbar, dass sich die ohnehin schon hohe Sekundärstoffbildung der drei genannten Klone aus Feldkultur unter in vitro Bedingungen noch weiter steigern lässt. Zwar sind uns Daten zum Ertrag von Edelweiß-Feldkulturen nicht bekannt, doch zeigt sich am Beispiel von *Panax ginseng* in beeindruckender Weise, dass über Fermentation von Adventivwurzeln im Vergleich zur Feldkultur ein Vielfaches an Biomasse produzieren lässt (Murthy et al. 2014). Die biotechnologische Produktion ist außerdem auch ganzjährig und unabhängig von Faktoren wie Bodenbeschaffenheit, Bewässerung und Düngung oder klimatischen Bedingungen möglich. Würde man nur einen

10.000-Liter-Bioreaktor einsetzen, so wäre innerhalb eines Jahres die Herstellung von etwa 390 g Leoligin und 150 g 5-Methoxyleoligin möglich – diese Mengen wären über Feldkultur kaum realisierbar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigte sich mit der in vitro-Herstellung der beiden Lignane Leoligin und 5-Methoxyleoligin aus dem Edelweiß (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter), welche für die Behandlung von koronaren Herzkrankheiten von Interesse sind. Diese beiden Inhaltsstoffe liegen in der Wurzel in sehr geringer Konzentration vor. Daher bietet sich die Etablierung von „hairy roots“-Kulturen an, da solche transgenen Wurzeln bei schnellem Wachstum oft dieselben Sekundärstoffe bilden wie die natürliche Wurzeln. Eine Möglichkeit, die Sekundärstoffproduktion in vitro weiter zu steigern, ist der Einsatz von biotischen oder abiotischen Elizitoren wie zum Beispiel Hefeextrakt oder Schwermetallsalze.

Im Rahmen dieser Arbeit analysierten wir den Einfluss der biotischen Elizitoren Methyljasmonat und Hefeextrakt auf den Biomassezuwachs. Außerdem wurde durch die Verwendung von verschiedenen Konzentrationen der Elizitoren untersucht, inwieweit sich die Leoligin- und 5-Methoxyleoliginkonzentration in „hairy roots“-Kulturen verändert.

Durch die Elizitierung wurde eine Hemmung des Biomassezuwachs verursacht. Bei unelizitierten „hairy roots“ betrug der Biomassezuwachs nach 4 Wochen etwa 1800 %, bei den elizitierten Proben kam es nur zu einer Zunahme von 700 - 1200 %.

Mittels HPLC-Analysen der getrockneten „hairy roots“ wurden der Leoligin- und 5-Methoxyleoliginegehalt ermittelt. Der Zusatz von MJ in einer Konzentration von 100 μ M resultierte im höchsten Leoliginwert (0,050 %). Im Vergleich dazu konnten in der unelizitierten Kontrollgruppe lediglich 0,006 % gemessen werden. Der Gehalt an 5-Methoxyleoligin in der unelizitierten Kontrollgruppe betrug 0,005 %. Am höchsten lag der gemessene Wert bei den „hairy roots“, die mit 2 g/l Hefeextrakt elizitiert wurden (0,020 %).

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich die Elizitierung trotz Hemmung des Biomassezuwachs positiv auf die Sekundärstoffproduktion ausgewirkt hat und weitaus höhere Lignankonzentrationen als in den unelizitierten „hairy roots“ gemessen werden konnten. Der Einsatz von „hairy roots“-Kulturen zur Gewinnung der Edelweiß-Lignane stellt eine attraktive Alternative zur Feldkultur dar.

6. Summary

The present thesis dealt with the in vitro production of the lignans leoligin and 5-methoxyleoligin from Edelweiß (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter), which are promising drugs for the therapy of coronary diseases. The concentration of both leoligin and 5-methoxyleoligin in natural roots of *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* is very low. Transgenic hairy root cultures show fast growth and often produce the same secondary metabolites as the intact roots. Through elicitation with biotic or abiotic factors like yeast extract or heavy metals a further enhancement of secondary product formation in vitro can be achieved.

In this diploma thesis the influence of the biotic elicitors methyl jasmonate and yeast extract on the content of leoligin- and 5-methoxyleoligin and the impact on the growth rate of „hairy roots“ were investigated.

Our results showed that elicitation reduced hairy root growth of all samples compared to the non elicited control group. After 4 weeks of cultivation the increase of hairy root material was about 1800 % within the control group, while elicited hairy roots gained between 700 - 1200 % biomass. Although growth was reduced, the content of leoligin and 5-methoxyleoligin of all elicited samples was higher compared to the control group. The highest leoligin concentration (0.050 %) was measured after elicitation with 100 µM methyl jasmonate while 0.006 % leoligin was accumulated in the untreated control. The concentration of 5-methoxyleoligin was investigated as well. The best result (0.020 %) was achieved by elicitation with 2g/l yeast extract, concentration within the control group being 0.005 %.

Our results indicate that despite a certain growth inhibition elicitation with biotic elicitors is an interesting way to improve leoligin and 5-methoxyleoligin concentration in „hairy roots“ of *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum*. The use of hairy roots for the production of Edelweiß lignans is an attractive alternative to field culture.

7. Literaturverzeichnis

Baldi A., Srivastava A.K., Bisaria V.S. (2009), Fungal Elicitor for Enhanced Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Suspension Cultures, *Soil Biol.* **18**: Chapter 23, 373-380.

Chong T.M., Abdullah M.A., Lai O.M., Nor'Aini F.M., Lajis N.H. (2004), Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture, *Proc. Biochem.* **40**: 3397-3405.

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

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., 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.

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

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.

Hahn M. G., Albersheim P. (1978), Host-Pathogen Interactions: XIV. Isolation and Partial Characterization of an Elicitor from Yeast Extract. *Plant Physiol.* **62**: 107-111.

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, Berlin, Heidelberg, S. 217-232.

Hornick A., Schwaiger S., Rollinger J.M., Phung Vo N., Prast H., Stuppner H. (2008), Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: BrainACh increasing and memory improving properties, *Biochem. Pharmacol.* **76**: 236-248.

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

Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. (2002), Secondary metabolism of „hairy root“-cultures in bioreactors, *In Vitro Cell. Biol.-Plant* **38**: 1-10

Kollárová R., Oblozinsky M., Kováčiková V., Holková I., Balazová A., Pekárová M., Hoffman P., Bezáková L. (2014), Lipoxygenase activity and sanguinarine production in cell suspension cultures of California poppy (*Eschscholtzia californica* CHAM.), *Pharmazie* **69**: 637–640

Krumphuber S. (2015), *Abiotische Elizitierung einer transgenen „hairy roots“-Kultur des Edelweiß*, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Lin H.-W., Kwok K.H., Doran P.M. (2003), Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin, *Biotechnol. Lett.* **25**: 521-525.

Meusel H., Jäger E.J. (1992), *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*, Band 3, Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, New York, S. 235.

Messner B., Kern J., Wiedermann D., Schwaiger S., Türkcan A., Ploner C., Trockenbacher A., Aumayr K., Bonaros N., Laufer G., Stuppner H., Untergasser G., Bernhard D. (2013), 5-Methoxyleoligin, a Lignan from Edelweiss, Stimulates CYP26B1-Dependent Angiogenesis In Vitro and Induces Arteriogenesis in Infarcted Rat Hearts In Vivo, PLOS ONE **8**: Issue 3.

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

Murthy H.N., Lee E.-J., Paek K.-Y. (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, Plant Cell Tissue Organ Cult. **118**: 1-16.

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

Parr A. J., Peerless A. C. J., Hamill J. D., Walton N. J., Robins R. J. and Rhodes M. J. C. (1988), Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*, Plant Cell Rep **7**: 309-312.

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

Rahimi K., Haghbeen K., Marefatjo J., Rastgar F., Sheikhan R. (2008), Successful Production of Hairy Root of *Valeriana sisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*, Biotechnol. **7 (2)**: 200-204.

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.

Safer S., Cicek S. S., Pieri V., Schwaiger S., Schenider P., Wissemann V., Stuppner H. (2011), Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC-ESI-MS, *Phytochem.* **72**: 1379-1389.

Safer S., Tremetsberger K., Guo Y.-P., Kohl G., Samuel M.R., Stuessy T.F., Stuppner H. (2011), Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data, *Bot J Linn Soc*: **165** (4): 364-377.

Sánchez-Sampedro M. A., Fernández-Tárrago J., Corchete P. (2005), Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *J. Biotechnol.* **119**: 60-69

Satdive R. K., Fulzele D. P., Eapen S. (2007), Enhances production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization, *J. Biotechnol.* **128**: 281-289

Schmidtbauer K. (2012), Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß` mit abiotischen Faktoren, Diplomarbeit, Univ. Wien.

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

Sun J., Xiao J., Wang X., Yuan X., Zhao B. (2012), Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* „hairy roots“ using mechanical wounding and elicitation, *Biotechnol. Lett* **34**: 563-569.

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

Toivonen L. (1993), Utilization of Hairy Root Cultures for Production of Secondary Metabolites, *Biotechnol. Prog.* **9**: 12-20.

Van Fürden B., Humburg A., Fuss E. (2005), Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures, Plant Cell Rep. **24**: 312-317

Vongpaseuth, K., Roberts, S. C. (2007), Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture (review), Current Pharmaceutical Biotechnol. **8**: 219-236.

Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Putalun W. (2011), Methyl Jasmonate Elicitation Enhances Glycyrrhizin Production in *Glycyrrhiza inflata* Hairy Roots Cultures, Z. Naturforsch. **66 c**: 423 – 428

Zhao J.-L., Zhou L.-G., Wu J.Y. (2010), Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures, Appl. Microbiol. Biotechnol. **87**: 137-144.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johanna Schleritzko

Schulbildung

1995-1999: Volksschule Allentsteig

1999-2007: Bundesgymnasium Waidhofen/Thaya

Studium und Berufserfahrung

Seit Oktober 2007: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

August 2008: Praktikantin, Apotheke zum Schwarzen Adler, Zwettl/NÖ

September 2009: Praktikantin, Apotheke zum Schwarzen Adler, Zwettl/NÖ

Juli 2011: Praktikantin, Anstaltsapotheke im LKH Horn

Seit September 2012 : Angestellte, Apotheke Alte Remise, 1160 Wien

März 2013 – Juli 2013: Durchführung der praktischen Arbeiten der Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie, Universität Wien