

M. Kleinwächter, I. Hutter, C. Schneider, E. Schnug und D. Selmar

Entwicklung von *in vitro*-Vermehrungsverfahren zur Produktion glucosinolatreicher Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) für die landwirtschaftliche Nutzung

Einleitung

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) ist eine glucosinolathaltige Pflanze, die in ihren Blättern beträchtliche Mengen Glucotropaeolin enthält. In der Naturheilkunde werden Zubereitungen dieser Pflanze vor allem zur Behandlung von Infektionen der Harnwege eingesetzt (1). Ein Wirkprinzip basiert auf der Freisetzung von Senfölen im Verdauungstrakt. Wird das Gewebe glucosinolathaltiger Pflanzen verletzt und damit die Kompartimentierung aufgehoben, so werden diese Naturstoffe von einer Myrosinase hydrolysiert. Dabei entsteht ein Gemisch von unterschiedlichen Reaktionsprodukten, wie Isothiocyanaten, Thiocyanaten und Nitrilen (2, 3). Diese komplexen, je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich zusammengesetzten Mischungen werden als Senföle bezeichnet; entsprechend ent-

steht beim Verzehr von Kapuzinerkresse aus Glucotropaeolin das Benzylsenföle. Diese Mischung aus Benzylisothiocyanat, Benzylthiocyanat und Benzylnitril wird im Dünndarm resorbiert und – wie auch für andere Xenobiotika beschrieben – an Glutathion gebunden und anschließend über den Urogenitaltrakt ausgeschieden. Im Harn können dann vor allem das Benzylisothiocyanat und dessen Merkaptursäure-Derivate ihre antibakterielle Wirkung entfalten und so die Erreger von Harnwegsinfekten gezielt bekämpfen (4).

Ziel war es, ein *Tropaeolum*-Präparat zu entwickeln, das lediglich aus getrockneten Kapuzinerkresse-Blättern besteht. Um bei einer entsprechenden Therapie eine ausreichend hohe Senföle-Konzentration im Harn zu generieren, sind allerdings relativ hohe Glucosinolat-Dosen erforderlich: pro Tag sollten 120

– 240 mg Glucotropaeolin verabreicht bzw. dessen Reaktionsprodukte aufgenommen werden (1). Um zu gewährleisten, dass z.B. eine mittlere Menge von 150 mg Glucotropaeolin in einer angemessenen, nicht zu hohen Anzahl an Arznei-Kapseln (maximal 10 pro Tag) verabreicht werden kann und unter Berücksichtigung einer maximalen Füllmenge von 0,3 g Trockenmaterial pro Kapsel, ist es erforderlich, dass die *Tropaeolum*-Blätter Glucosinolat-Konzentrationen von mindestens 50 mg Glucotropaeolin pro g Trockengewicht, bzw. ca. 120 μmol / g TG aufweisen. Bis dato gibt es allerdings im Handel keine für eine entsprechende pharmazeutische Nutzung gezüchteten Kapuzinerkresse-Varietäten mit den erforderlichen hohen Glucosinolat-Konzentrationen in den Blättern. Eine weitere Schwierigkeit beruht auf der schnellen, auch im Zuge der Ernte und Trocknung einsetzenden Hydrolyse der Glucosinolate. Dabei kommt neben der Dekompartimentierung auch der Ascorbinsäure-induzierten, postmortalen Aktivierung der Glucosinolat-hydrolysierenden Myrosinase eine besondere Bedeutung zu (5). Um die im Zuge der Nacherntebehandlung induzierten Glucosinolat-Verluste zu minimieren, sollte die Myrosinase-Aktivität in den Blättern relativ niedrig sein, bzw. sollte die enthaltene Myrosinase nicht aktiviert vorliegen. Wünschenswert wären so niedrige Ascorbinsäure-Gehalte in den Blättern, dass die Myrosinase im Zuge der durch die Ernte und Trocknung ausgelösten postmortalen Dekompartimentierungen nicht oder nur sehr gering aktiviert wird.

Diesen Überlegungen entsprechend wurde ein Screening an mehr als zweihundert *Tropaeolum*-Pflanzen durchgeführt (6). Die hierbei verwendeten Pflanzen entstammten aus unterschiedlichsten Akzessionen, wie z.B. aus lokalen Garten- und Baumärkten sowie aus einer nicht züchterisch bearbeiteten Saatgutmischung, die von der Firma Dreluso

Zusammenfassung

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) wird in der Naturheilkunde unter anderem zur Behandlung von Infektionen der Harnwege eingesetzt. Das Wirkprinzip basiert auf der Freisetzung von Senfölen aus Glucotropaeolin. Zur Entwicklung eines *Tropaeolum*-Präparates, das lediglich aus getrockneten Kapuzinerkresse-Blättern besteht, ist allerdings eine ausreichend hohe Konzentration dieses Glucosinolats erforderlich. Bei einem Screening von über 200 Pflanzen wurden insgesamt 10 *Tropaeolum*-Pflanzen ausgewählt. Um somaklonale Variationen und die damit verbundene Variabilität der Regenerate möglichst auszuschließen, erfolgte die Massenvermehrung *in vitro* mittels Vielfachsporenbildung. Bei den Arbeiten zur Optimierung der Bedingungen der *in vitro*-Kultur wurde neben dem Vermehrungsfaktor vor allem die Wachstumscharakteristik von Spross und Wurzeln berücksichtigt. Dabei erwies sich die klassische Kultur auf Festmedien effektiver als der Einsatz von TI-Systemen (Temporary Immersion System). Die Analyse der Regenerate ergab, dass deren Glucosinolatgehalte deutlich niedriger waren, als die der Glucotropaeolin-reichen Ausgangspflanzen; dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Witterungsbedingungen der jeweiligen Jahre zurückzuführen. Allerdings wiesen die genetisch identischen über *in vitro*-Kultur vermehrten Pflanzen im Vergleich zu den aus klassischen Saatgutmischungen stammenden deutlich geringere Schwankungsbreiten der Glucosinolat-Gehalte auf. Da die angestrebten, sehr hohen Wirkstoff-Gehalte nicht erzielt werden konnten, erscheint der kosten- und arbeitsintensive Einsatz der *in vitro*-Kulturtechnik zur Massenvermehrung von *Tropaeolum* für die pharmazeutische Nutzung zunächst nicht gerechtfertigt. Andererseits ist das Wachstumsverhalten der *in vitro*-kultivierten Kapuzinerkressepflanzen wesentlich homogener als das bei Verwendung heterogener Populationen, so dass bei halbmechanisierter Ernte des Pflanzenmaterials wesentlich geringere verletzungsbedingte Verluste an Glucosinolaten zu erwarten sind. Ob und inwieweit allerdings die Massenvermehrung von *Tropaeolum*-Pflanzen zur pharmazeutischen Nutzung tatsächlich einen ökonomischen Vorteil hat, muss sich erst in weiteren entsprechenden Pilot-Projekten zeigen.

Schlüsselwörter

Glucotropaeolin, *in vitro*-Vermehrung, Myrosinase, Senföle, Temporary Immersion System, *Tropaeolum majus*

Pharmazeutika, Hessisch-Oldendorf, zur Verfügung gestellt wurde (6). Die Ascorbinsäure-Gehalte variierten zwischen 8 – 35 mmol / kg FG, die Myrosinase-Aktivitäten zwischen 0,2 μ kat / g TG und 4 μ kat / g TG. Auch die Glucosinolat-Gehalte der einzelnen Pflanzen variierten um mehr als das Dreifache von 40 bis zu 130 μ mol / g TG (6). Des Weiteren wurde das Ausmaß der jeweiligen, durch die Ernte und Trocknung hervorgerufenen Glucosinolat-Verluste ermittelt. Da die *in vitro* gemessenen Myrosinase-Aktivitäten nicht mit den Verlusten an Glucosinolaten bei der Trocknung korrelierten und auch die Ascorbinsäure-Konzentrationen in allen Pflanzen zur Aktivierung ausreichend hoch waren, wurde als Parameter zur Selektion ausschließlich der Glucosinolat-Gehalt in der getrockneten Droge heran gezogen (6).

Insgesamt wurden 10 *Tropaeolum*-Pflanzen, die für die pharmazeutische Nutzung besonders geeignet erschienen, für die vegetative Massenvermehrung ausgewählt. Diese erfolgte mittels steriler *in vitro*-Kultur. Diese Methode hat den Vorteil, dass ein langjähriger Züchtungsprozess, wie er bei genera-

tiv vermehrten Sorten erforderlich ist, extrem verkürzt werden kann, so dass häufig bereits nach zwei Vegetationsperioden die ersten Ergebnisse vorliegen können (7). Geprüfte Elitepflanzen mit hohen Wirkstoffgehalten stellen die Qualität der Droge über die vegetativ vermehrten Jungpflanzen sicher. Die Anwendung der Kultur definierter Linien hat sich vor allem auch im Zierpflanzenbereich verbreitet durchgesetzt (8). Aber auch für Medizinalpflanzen sind entsprechende Beispiele bekannt; hier sind die Arbeiten an *Baptisia tinctoria* hervorzuheben (9). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die *in vitro*-Vermehrung ökonomisch nur sinnvoll ist, wenn das Endprodukt entsprechend hochwertig ist, da die Methode arbeits-technisch aufwändiger ist, als die Produktion von Jungpflanzen über Saatgut. Sollte sich herausstellen, dass dies nicht der Fall ist, können die selektierten Mutterpflanzenbestände allerdings auch für spätere Züchtungsprogramme verwendet werden.

Um somaklonale Variationen und die damit verbundene Variabilität der Regenerate möglichst auszuschließen, sollte die Massenvermehrung über Vielfach-

sprossbildung vollständig differenzierter *in vitro*-Pflanzen erfolgen. Hierbei erwiesen sich zwei der zehn ausgewählten Pflanzen jedoch als wenig für die *in vitro*-Technik geeignet (10), so dass schließlich acht *Tropaeolum*-Klone (BG 8, 15, 25, 26 sowie FL 8, 31, 37, 50) für die *in vitro*-Vermehrung und den anschließenden Pilot-Feldanbau verwendet wurden. In diesem Artikel werden die Arbeiten zur Optimierung der Bedingungen der *in vitro*-Kultur und die semi-industrielle Massenvermehrung der *Tropaeolum*-Pflanzen vorgestellt. Weiterhin werden die Vor- und Nachteile der Verwendung *in vitro*-vermehrter Kapuzinerkresseklone im Gesamtzusammenhang des Projektes diskutiert.

Material und Methoden

Etablierung der *in vitro*-Kultur

Achselabschnitte von Sprossen der im Screening ausgewählten Kapuzinerkressenpflanzen wurden mehrfach sterilisiert (1% NaOCl in 70% Ethanol) und anschließend in 0,8% Agarose enthaltendes MS-Medium (11) in Petrischalen überführt. In allen geprüften Nährmedien war als Auxin 0,5 ppm Indolessigsäure (IES) enthalten, wohingegen die Gehalte an Cytokinen variiert wurden. Dabei wurden (1-Phenyl-3-(1,2,3-Thiadiazol-5-yl-urea)-Konzentrationen (TDZ) von 0,1 – 2 ppm sowie eine Benzylaminopurin-Konzentration (BAP) von 2 ppm im Medium eingestellt. Die tägliche Belichtungszeit betrug 16 h, die Temperatur im Kulturraum 25 °C. Sobald die Sprosse Blattachselaustritte entwickelten wurden sie in Einweckgläser, die 100 ml Nährmedium enthielten, überführt. Auf diese Weise wurden 8 *Tropaeolum*-Klone für die weiteren Arbeiten etabliert.

Massenvermehrung der Kapuzinerkresse-Klone

Die semiindustrielle Massenvermehrung der etablierten *in vitro*-Klone erfolgte in Einweckgläsern, die 100 ml MS-Medium mit 0,5 ppm IES und 0,1 ppm TDZ mit 0,6% Phytoagar (Duchefa) enthielten.

Die Sproßbüschel wurden vierwöchentlich unter sterilen Bedingungen geteilt und auf frisches Nährmedium umgesetzt. Die Bewurzelung der Mikrostecklinge erfolgte mit der gewählten Hormonkonzentration spontan, so

Development of an *in vitro* system to propagate glucosinolate rich nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) varieties for agricultural use

Abstract

In natural medicine nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is used to treat infections of the urinary tract. The active principle is based on the liberation of mustard oils from glucotropaeolin. To develop a *Tropaeolum* preparation which exclusively consists of dried nasturtium leaves, a sufficient high concentration of this glucosinolate is required. From a screening of more than 200 nasturtium plants 10 *Tropaeolum* individuals were chosen. To prevent somaclonal variations and corresponding variabilities of the regenerates, *in vitro* mass propagation was achieved by multiple sprout formation. When optimizing the *in vitro* culture conditions, apart from the propagation factors, especially the growth characteristics of sprouts and roots were considered. In this context, classical *in vitro* culture on solid media was more effective than the application of temporary immersion systems (TIS). The analyses of the regenerates revealed that their glucosinolate contents were significantly lower than that of the glucotropaeolin-rich mother plants; this obviously was due to the different weather conditions in the corresponding years. Yet, the glucosinolate contents of the *in vitro* propagated and therefore genetically identical plants revealed a markedly lower range of variation in comparison to those of plants derived from classical seed mixtures. Since the required concentration of glucosinolates has not been achieved, on the first sight, the application of cost- and labor intensive *in vitro* culture technique for mass propagation of *Tropaeolum* for its pharmaceutical exploitation seems not to be justified. However, as the growth habits of the *in vitro* propagated nasturtium plants are much more homogenous than those of *Tropaeolum* plants derived from seed mixtures, it could be deduced that the loss of glucosinolates due to injuries caused by semi-mechanic harvest procedures will be much lower in the case of *in vitro* propagated plants. If and to what extent *in vitro* mass propagation indeed generates economical advantages must be elucidated in further pilot projects.

Keywords

Glucotropaeolin, *in vitro* propagation, mustard oils, myrosinase, temporary immersion system, *Tropaeolum majus*

dass keine Überführung auf Medium mit höheren Auxin-Gehalten zur Förderung der Bewurzelung notwendig war. Vier Klone wurden für die Massenvermehrung ausgewählt. Von diesen Pflanzen wurden 12700 Mikrostecklinge produziert.

Vermehrung von *Tropaeolum majus* im Temporary Immersion System

Das Temporary Immersion System (TIS) kann als ein Bioreaktor beschrieben werden, mit dessen Hilfe Pflanzen *in vitro* vermehrt werden können. Aufgrund des seltenen Austauschs des Nährmediums und des geschlossenen Systems kann von einer diskontinuierlichen Betriebsweise gesprochen werden. Die Grundeinheit eines solchen Systems besteht aus einem Kulturgefäß, in dem sich das Pflanzenmaterial befindet und einem Behälter mit flüssigem Nährmedium (Abb. 1). Beide Gefäße sind miteinander gekoppelt, so dass bei Bedarf Medium zwischen beiden gepumpt werden kann. Jeder Behälter besitzt eine weitere, mit Sterilfilter versehene Öffnung, durch die dem System Druckluft zugeführt wird.

Die Grundeinheit kann beliebig erweitert werden. An Magnetventile gekoppelt können verschiedene Flutungszeiten eingestellt werden. In den Vorversuchen wurden zwei verschiedene Flutungsmuster verwendet (8 x und 4 x/Tag für 1 Minute). Als Flüssigmedium wurde MS-Medium mit gleich bleibender IES-Konzentration (0,5 ppm) und variierenden TDZ-Konzentrationen (2, 1 und 0,1 ppm) verwendet.

Akklimatisierung

Die Mikrostecklinge wurden in leicht aufgedüngtes Torfsubstrat (Einheitserde Typ P) in Pikierplatten gepflanzt (Topfvolumen 70 cm³, 60 Pflanzen pro Multipotplatte). Um bei der Akklimatisierung eine hohe Luftfeuchtigkeit und eine gleich bleibende Temperatur (20 °C) gewährleisten zu können, wurde für vier Wochen ein Folienzelt über die Pflanzen gespannt. Die Pflanzen wurden zur besseren Abhärtung regelmäßig belüftet und mit Sprühnebel befeuchtet. Aufgrund der guten Wüchsigkeit wurden weder Düngungs- noch Pflanzenschutzmaßnahmen durchgeführt. Nach einer insgesamt achtwöchigen Akklima-

tisierungsphase wurden die Pflanzen auf dem Versuchsfeld ausgepflanzt.

Ergebnisse und Diskussion

Optimierung der *in vitro*-Kultur auf Festnährmedium

Bei den Arbeiten zur Optimierung der Bedingungen der *in vitro*-Kultur wurde neben dem Vermehrungsfaktor vor allem die Wachstumscharakteristik von Spross und Wurzeln berücksichtigt, um hochwertige Jungpflanzen zu produzieren, die eine hohe Vitalität im Gewächshaus aufweisen.

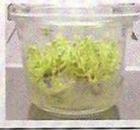
Bei der Etablierung wurden die Klone zunächst auf MS Medium (11) mit 2 ppm Thidiazuron (TDZ) und 0,5 ppm Indolessigsäure (IES) vermehrt. Hier wurden hohe Vermehrungsfaktoren bei den vierwöchentlichen Subkulturen festgestellt, allerdings verschlechterte sich der Habitus der Pflanzen bei jeder Subkultur. Ein hoher TDZ-Gehalt führt bekanntermaßen zu starker Hyperhydrität, d. h. zu viel Wasser wird in die Sprosse eingelagert. Dies war auch bei den *T. majus*-Kulturen der Fall und es bildeten sich außerdem kleine Spross-



Abb. 1: Grundeinheit des Temporary Immersion System (TIS), 1 = Gefäß für das Nährmedium, 2 = Druckluftzufuhr mit Sterilfilter, 3 = Verbindungsschlauch für Transport von Nährmedium, 4 = Kulturgefäß mit Pflanzenmaterial.

Fig. 1: Basic unit of the temporary immersion system (TIS), 1 = vessel for culture medium, 2 = compressed air inlet with aseptic filter, 3 = connecting tube for the transport of culture medium, 4 = culture vessel with plant material.

Tab. 1: Mittlere Vermehrungsfaktoren und Pflanzenqualität der *Tropaeolum majus*-Pflanzen in der *in vitro*-Kultur auf Festnährmedium (n=8; nach 4 Wochen Kultivierung)
Tab. 1: Mean Propagation factors and quality of *Tropaeolum in vitro* plants on varying solid culture medium (n=8; after 4 weeks of cultivation)

Variante (Variant)	V-Faktor (P-factor)	Erscheinungsbild (Appearance)	Wuchs-Charakteristik (Growth-characteristic)
2 ppm TDZ	4,1		Sprossbüschel, stark hyperhydriert
1 ppm TDZ	4,3		Sprossbüschel, stark hyperhydriert, geringe Ausbildung von Blattspreiten
0,5 ppm TDZ	3,6		Wuchsformen klonabhängig unterschiedlich
0,1 ppm TDZ	3,6		Gutes Sprosswachstum, 100% Wurzelbildung, direkt akklimatisierbar
2 ppm BAP	3,6		Sprossbüschel, viel Kallus, stark hyperhydriert, geringe Ausbildung von Blattspreiten

büschel mit sehr kleinen Blättern; Wurzelbildung wurde nicht beobachtet (Tab. 1). Daher wurde der TDZ-Gehalt stufenweise erniedrigt, um die Qualität der Pflanzen zu verbessern und die Wurzelbildung zu fördern. Wurde kein TDZ als Cytokinin verwendet, wurde stattdessen BAP eingesetzt. Es zeigte sich, dass der Vermehrungsfaktor mit sinkendem TDZ-Gehalt zunächst zunimmt (von 4,1 auf 4,3) und dann bei 3,6 verbleibt (Tab. 1).

Mit BAP wird ebenfalls ein hoher Vermehrungsfaktor von 4,3 erreicht. Ein hoher Vermehrungsfaktor ist unter kommerziellen Gesichtspunkten zunächst erwünscht; allerdings spielt die Qualität der Pflanzen ebenfalls eine erhebliche Rolle. Hohe TDZ-Konzentrationen (2 und 1 ppm) führten zu kleinen, verkürzten Sprossen in kleinen Büscheln. Die Sprosse wiesen Hyperhydrität auf, die für eine Wurzelbildung hinderlich ist. Diese Pflanzen waren für eine Überführung ins Gewächshaus nicht geeignet. Die Pflanzen, die auf einem Nährmedium mit 0,5 und 0,1 ppm TDZ vermehrt wurden, wiesen ein normales Pflanzenwachstum auf, d. h. es wurden sowohl Blätter als auch Wurzeln ausgebildet. Allerdings wuchsen die verschiedenen *Tropaeolum majus*-Klone auf dem Medium mit 0,5 ppm TDZ sehr unterschiedlich, so wurden kleine Sprossbüschel ebenso beobachtet wie fehlende Wurzelbildung. Diese uneinheitliche Reaktion führte zum Ausschluss dieses Nährmediums für weitere Versuche. Der Einsatz von BAP anstelle von TDZ führte ebenfalls zur Ausbildung von Sprossbüscheln und verringerter Blattausbildung bei gleichzeitiger Kalusbildung. Wurzelbildung wurde in keinem Fall beobachtet. Für die weitere Vermehrung auf Festkultur wurde den oben geschilderten Versuchsergebnissen entsprechend das Nährmedium mit 0,1 ppm TDZ und 0,5 ppm IES verwendet.

Vermehrung im Temporary Immersion System (TIS)

Alternativ zur klassischen *in vitro*-Kultur auf Festnährmedien wurde auch die Vermehrung mittels TIS-Technik untersucht (Abb. 1). Bei allen getesteten Varianten war der Biomassezuwachs im TI-System deutlich hö-

her als bei Verwendung der entsprechenden Festnährmedien. Allerdings zeigten Vorversuche im TIS mit dem Standardnährmedium, dass zwar ein hoher Vermehrungsfaktor vorliegt, dass das Pflanzenmaterial aber stark hyperhydriert und so stark ineinander verwachsen ist, dass die Weiterverarbeitung schwierig ist. Deshalb wurde versucht, durch eine Verminderung der TDZ-Konzentration die Kulturbedingungen so zu optimieren, dass einerseits noch hohe Vermehrungsfaktoren erzielt werden und andererseits die Pflanzen ausreichend gestaucht sind und nicht so stark ineinander verwachsen. Deshalb wurden in einer Versuchsreihe die TDZ-Konzentrationen der TIS-Ansätze variiert (2,0, 1,0 und 0,1 ppm); die IES Konzentration wurde jeweils bei 0,5 ppm gleich belassen.

Dabei zeigte sich, dass die zu starke Wassereinlagerung bei Verminderung der TDZ-Konzentration zurückgeht und sich mehr gestauchte Sprosse bildeten (Abb. 2).

Der Erfolg der Absenkung der TDZ-Konzentration wird besonders deutlich, wenn man für die jeweiligen Ansätze das Pflanzenmaterial, das für die weitere Vermehrung gewonnen werden konnte, dem gegenüberstellt, das für eine Weiterkultur ungeeignet war (Abb. 3).

Das bedeutet, dass die Ermittlung der Vermehrungsfaktoren nicht einfach nur auf dem Biomassenzuwachs basieren kann, sondern dass stets die Pflanzenqualität mit berücksichtigt werden muss. Stellvertretend für alle

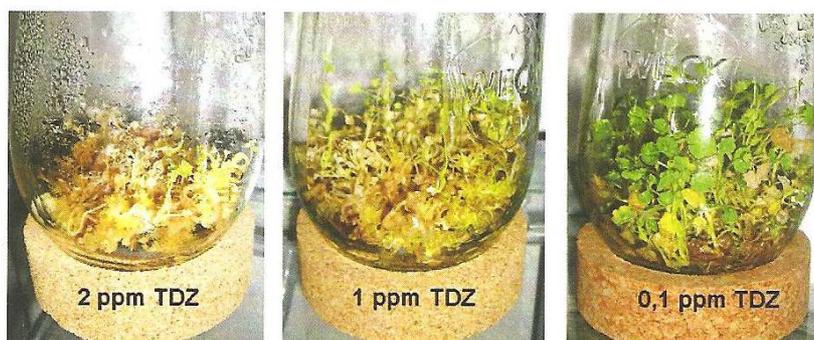


Abb. 2: *Tropaeolum majus* im TIS mit verschiedenen TDZ-Konzentrationen (Klon BG 26; nach 6 Wochen Kultivierung).

Fig. 2: Cultivation of *Tropaeolum majus* in the TIS with varying TDZ concentrations (Clone BG 26; after 6 weeks of cultivation).

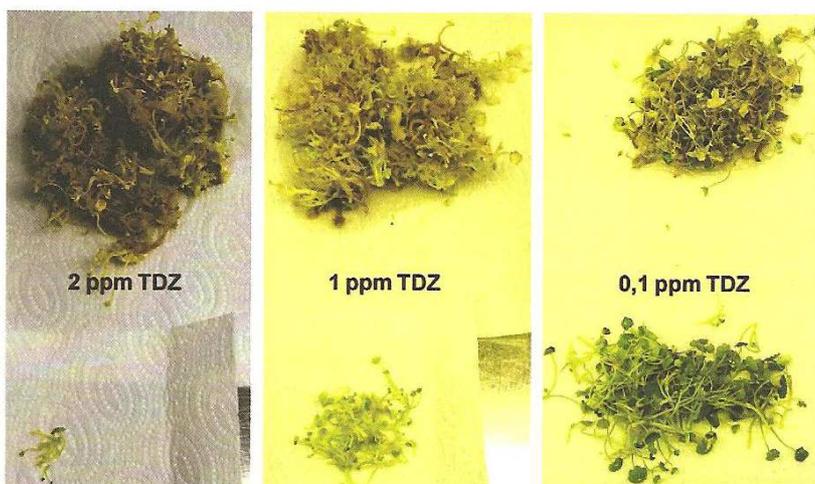


Abb. 3: Gegenüberstellung des Pflanzenmaterials, das zur Vermehrung ungeeignet (obere Reihe) bzw. geeignet ist (untere Reihe) bei variierenden TDZ-Konzentrationen im TIS (Klon BG 26; nach 6 Wochen Kultivierung).

Fig. 3: Alignment of the plant material inadequate for propagation (upper line) with the suitable one (lower line) for varying TDZ concentrations (Clone BG 26; after 6 weeks of cultivation).

Tabelle 2: Vergleich der Vermehrungsraten der *Tropaeolum majus*-Pflanzen (Klon BG 26) auf Festnährmedium und im TIS.

Die Vermehrungsfaktoren (V-Faktoren) für das Festmedium wurden auf der Basis von 3 Pflanzen des Klons BG 26 nach vierwöchiger Kultivierung auf MS-Medium ermittelt. Als Basis diente nicht der Biomassenzuwachs sondern die Zahl der tatsächlich erzeugten Regenerate. Die Bedingungen für das TI-System waren: 6 einminütige Flutungen pro Tag bei einer Kultivierungsdauer von 6 Wochen.

Tab. 2: Comparison of propagation factors of *Tropaeolum majus* (Clone BG 26) on solid medium and in temporary immersion system.

For the cultivation on solid media the determination of propagation factors (P-factors) is based on 3 plants of the clone BG 26, cultivation period was 4 weeks. The calculation is based on the number of putative progenies and not on the pure increase of biomass. The cultivation conditions for the temporary immersion system were: 6 immersions per day for one minute; cultivation period was 6 weeks.

Variante (Variant)	Festkultur (Solid medium) V-Faktor (P-factor)	TIS V-Faktor (P-factor)
2 ppm TDZ	2,0	0,1
1 ppm TDZ	4,0	0,8
0,1 ppm TDZ	3,2	2,7

untersuchten Klone sind in Tab. 2 die entsprechenden, tatsächlichen Vermehrungsraten im TI-System für den Klon BG 26 aufgelistet und mit denen der Kultur auf klassischen Festnährmedien verglichen.

***In vitro*-Massenvermehrung von *Tropaeolum majus*-Klonen**

Da sich die Verwendung des TI-Systems zur Massenvermehrung von *Tropaeolum majus* gegenüber der Kultur auf Festnährmedien als weniger effektiv herausstellte (Tab. 2), wurde für die großtechnische Vermehrung der ausgewählten vier *Tropaeolum*-Klone die »klassische« Kultur auf Festnährmedien gewählt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: die Pflanzen wurden mit einem Transfer-Rhythmus von vier Wochen geteilt und jeweils auf frische MS-Festnährmedien mit 0,5 ppm IES und 0,1 ppm TDZ umgesetzt. Auf diese Weise konnten in wenigen Monaten etwa viertausend Pflanzen pro Klon produziert werden (Tab. 3).

Die Massenvermehrung dieser Pflanzen verlief bei den Klonen BG 8, BG 26 und FL 37 mit gleich bleibenden Vermeh-

rungsfaktoren. Nur der Klon FL 31 zeigte während der Produktion ein schwächeres Wachstum, die Vermehrungszahlen blieben weit hinter den Erwartungen zurück und mussten durch Mehrproduktion der anderen Klone aufgefangen werden. Der Klon BG 26 wies eine erheblich niedrigere Bewurzelungsrate auf (80% statt durchschnittlich 91%). Diese Erfahrungen zeigen, dass bei der Selektion von Mutterpflanzen mit einem hohen Wirkstoffgehalt für eine ökonomische Pflanzenproduktion die Fähigkeit des Pflanzenmaterials zur *in vitro*-Vermehrbarkeit ebenfalls geprüft werden muss.

Akklimatisierung von *Tropaeolum majus*-Klonen aus der *in vitro*-Massenvermehrung

Die *in vitro*-vermehrten Pflanzen wurden in Erde überführt und zunächst zur Akklimatisierung für acht Wochen in einem Gewächshaus kultiviert. Die Akklimatisierung im Folienzelt verlief problemlos: die Pflanzen erstarkten sehr schnell und zeigten keinerlei Krankheitssymptome. Auf Düngung und Pflanzenschutzmittel konnte daher verzichtet werden. Bewurzelungs- und Vitalitätsraten von 90 bzw. 100% wurden ermittelt (Tab. 3). Danach wurden über 11000 Einzelpflanzen Ende Mai im Rahmen eines großen Feldversuches ins Freiland gepflanzt. Drei Monate später konnten die gut entwickelten Kapuzinerkresse-Pflanzen geerntet und analysiert werden (7, 10).

Glucosinolat-Gehalte der *Tropaeolum majus*-Klone im Pilot-Feldanbau

Die Glucosinolat-Analysen zeigten auf, dass – obgleich es sich bei den Pflanzen jeweils eines Klones um genetisch identisches Material handelt – dennoch deutliche Schwankungen im Glucotropaolin-Gehalt auftraten (7). Die entsprechenden Standardabweichungen waren allerdings mit 9

bis 15% wesentlich geringer als die der ursprünglichen, heterogenen Mischpopulation der Saatgutmischungen, die mehr als 30% betragen (7). Überraschend war, dass die Glucosinolatgehalte der Regenerate deutlich niedriger waren, als die der glucosinolatreichen Ausgangspflanzen. Eine Wiederholung des Versuches im darauf folgenden Jahr bestätigte diesen Befund (7). Da auch die Pflanzen aus den heterogenen Saatgutmischungen entsprechend geringere Glucotropaolin-Gehalte aufwiesen, wird angenommen, dass die beobachteten Unterschiede auf unterschiedliche Witterungsbedingungen in den Vegetationsperioden der jeweiligen Jahre zurückzuführen sind (7).

Schlussfolgerungen und Fazit

Für die *in vitro*-Massenvermehrung von *Tropaeolum majus* erwies sich die Verwendung von MS Festnährmedien mit Phytohormon-Konzentrationen von 0,5 ppm IES und 0,1 ppm TDZ als am besten geeignet. Hierbei resultierten mittlere Vermehrungsfaktoren von bis zu 4,3; die Bewurzelungs- und Vitalitätsraten lagen bei 91 bzw. 100%. Bei Verwendung des Temporary Immersion System resultierten – trotz höheren Biomassezuwachses – geringere Vermehrungsfaktoren, da das Pflanzenmaterial sehr stark hyperhydrierte und ineinander verwachsen war. Hinsichtlich einer abschließenden Nutzensabschätzung der Verwendung *in vitro*-vermehrter, genetisch identischer Kapuzinerkressepflanzen ist es wichtig, die Ergebnisse des Pilot-Feldanbaus mit einzubeziehen. Hier ist zunächst festzuhalten, dass die angestrebten, sehr hohen Glucosinolat-Gehalte von 120 µmol / g TG nicht erzielt werden konnten. Aus diesem Grund erscheint der kosten- und arbeitsintensive Einsatz der *in vitro*-Kulturtechnik

Tab. 3: *In vitro*-Massenproduktion von *Tropaeolum majus*

Tab. 3: *In vitro* mass propagation of *Tropaeolum majus*

Klon (Clone)	Anzahl Pflanzen (Number of plants)			Bewurzelungsrate (Rooting rate) (%)	Vitalitätsrate (Vitality rate) (%)
	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>	Akklimatisiert (Acclimatised)		
FL 37	4175	4096	4096	98	100
BG 8	3904	3755	3755	96	100
BG 26	4320	3463	3463	80	100
FL 31	286	258	258	90	100
Summe (Total)	12685	11572	11572	\bar{x} = 91	\bar{x} = 100



Abb. 4: Kapuzinerkresse-Pflanzen mit heterogenem Habitus. Die Pflanzen entstammen einer nicht züchterisch bearbeiteten Saatgutmischung (*T. majus* L.).

Fig. 4: Nasturtium plants exhibiting a heterogeneous growth. Plants are derived from a seed mixture (*T. majus*, L.).



Abb. 5: Kapuzinerkresse-Pflanzen (*T. majus* L.) mit homogenem Habitus. Die Pflanzen wurden mittels *in vitro*-Kultur erzeugt (Klon FL 37).

Fig. 5: Nasturtium plants (*T. majus* L.) exhibiting a homogeneous growth. Plants are derived from *in vitro*-culture (Clone FL 37).

zur Massenvermehrung von *Tropaeolum* zunächst nicht gerechtfertigt. Im Gegensatz hierzu sprechen allerdings zwei andere Aspekte dennoch für die Verwendung *in vitro*-kultivierter Kapuzinerkresse: die geringere Schwankungsbreite der Glucosinolat-Gehalte und das homogenere Wuchsverhalten. Die Glucosinolat-Gehalte der Klone variierten nur um 9 bis 15 %, während sie in den Pflanzen der Saatgutmischung um mehr als 30 % variierten. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass auch der resultierende Drogenrohstoff homogener ist, wodurch eine präzisere Dosierung des Arzneimittels erleichtert wird. Hinsichtlich des Wuchsverhaltens ist herauszustellen, dass der Habitus – vor allem die Ausprägung eines rankendem Wuchses – bei den heterogenen, aus den Saatgutmischungen erzeugten Pflanzen, sehr unterschiedlich ist (Abb. 4), während das Wachstum und die Wuchsform der Individuen eines Klones sehr homogen sind (Abb. 5).

Diesem Gesichtspunkt kommt vor allem in Hinblick auf eine mechanisierte Ernte mit möglichst geringen, durch Gewebeverletzungen bedingten Verlusten an Glucosinolaten eine große Bedeutung zu. Nur gleichmäßig gewachsene, wenig rankende *Tropaeolum*-Pflanzen mit möglichst kompaktem Habitus und einheitlicher Entwicklung zum Erntetermin können problemlos mechanisiert bzw. halbmechanisiert geerntet werden, ohne die Pflanzen zu stark zu verletzen und so zu hohe Verluste an Glucosi-

nolaten zu generieren. Da die Verluste an Glucosinolaten im Zuge einer geeigneten Trocknung von manuell geernteten Pflanzen mit durchschnittlich ca. 5 % stets relativ klein gehalten werden konnten (10), ist zu erwarten, dass auch bei Einsatz adäquater, halbmaschineller Erntetechniken und bei Verwendung der über *in vitro*-Technik regenerierten *Tropaeolum*-Pflanzen mit kompaktem Habitus die auftretenden Glucosinolat-Verluste nicht wesentlich höher als 10 % sein sollten. Im Gegensatz dazu verursachen die bislang in der Literatur beschriebenen Erntetechniken, bei der die Blätter gehäckselt werden bevor die Trocknung erfolgt (12), massive Glucosinolat-Verluste, die in einigen Fällen über 80 % betragen können. Das bedeutet, dass sich die Glucosinolat-Ausbeuten bei Anwendung einer vorsichtigen, halbmechanisierten Ernte von *Tropaeolum*-Pflanzen, die über *in vitro*-Technik vermehrt wurden, im Vergleich zu den Ernte-Techniken mit Blattzerkleinerung nahezu vervierfacht werden können. Allerdings resultieren selbst bei vernachlässigbar geringen Glucosinolat-Verlusten während der Nachernte-Behandlungen lediglich mittlere Glucotropaeolin-Gehalte von 80 $\mu\text{mol/g}$ TG. Um die erforderlichen 120 $\mu\text{mol/g}$ TG zu erreichen, ist es somit erforderlich, die produzierte Trockendroge mit entsprechendem Glucosinolat-Trockenextrakt anzureichern. Darüber hinaus sichert diese Vorgehensweise auch eine gleich bleibende Qualität des Produktes, selbst wenn Trockendrogen mit schwan-

kenden Wirkstoffgehalten verwendet werden.

Anmerkungen

Dieses Forschungsvorhaben (FKZ: 22018101) wurde von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. (Gülzow) gefördert.

Die Autoren danken der Firma Dreluso Pharmazeutika GmbH (Hessisch-Oldendorf) für die Bereitstellung der Kapuzinerkressesaat sowie die technische Unterstützung und Juliane Thiele für die Organisation des Feldversuches.

Literatur

1. Hoffmann-Bohm K, Koch HP. *Tropaeolum*. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Hrsg. Drogen P-Z Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1994. S. 1004-1013.
2. Bones AM, Rossiter JT. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 2006;67:1053-1067.
3. Selmar D. Biosynthesis of cyanogenic glucosides, glucosinolates and nonprotein amino acids. In: Wink M, editor. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield: CRC Press;1999. S.79-150.
4. Mennicke WH, Görler K, Krumbiegel G, Lorenz D, Rittmann N. Studies on the metabolism and excretion of benzyl isothiocyanate in man. *Xenobiotica* 1988;18(4):441-447.

5. Kleinwächter M, Selmar D. A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases. *J Biochem Bioph Meth* 2004;59:253-265.
6. Kleinwächter M, Schnug E, Selmar D. The glucosinolate-myrosinase-system in nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): Variability of biochemical parameters and screening for clones feasible for pharmaceutical utilization. *J Agr Food Chem* 2008a;56:11165-11170.
7. Kleinwächter M, Hutter I, Schneider C, Schnug E, Selmar D. Experimental field cultivation of *in vitro* propagated high-yield varieties of *Tropaeolum majus* L. *J Appl Bot Food Qual* 2008;82:55-59.
8. Mohan JS, Ochatt JS. *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*. 1. Auflage. Heidelberg: Humana Press (Springer-Verlag); 2009.
9. Hutter I, Grotkass C, Harnischfeger G, Lieberei R, Feldmann F. *Baptisia tinctoria* (L.) R. Br.: Von der Wildsammlung zur *in vitro* vermehrten Kulturpflanze. *Z Arznei- Gewurzpfla* 2001(6):35 - 41.
10. Kleinwächter, M. Pflanzenbiologisch-biochemische Grundlagen zur pharmazeutischen Nutzung der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) [Dissertation]. Braunschweig: Technische Universität; 2007.
11. Murashige T, Skoog F. Revised medium for growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 1962;15:473-497.
12. Mikus-Plescher B, Goos K-H, Plescher A. Qualitätsbeeinflussende Faktoren im Anbau und in der Verarbeitung von Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.). *Z Arznei- Gewurzpfla* 2003;8(2):61-67.

Anschriften der Verfasser

Dr. Maik Kleinwächter,
 Prof. Dr. Dirk Selmar
 Institut für Pflanzenbiologie, TU
 Braunschweig
 Mendelssohnstraße 4
 D-38106 Braunschweig, Germany

Imke Hutter, Dr. Carolin Schneider
 Institut für Pflanzenkultur e.K.
 Solkau 2
 D-29465 Schnega, Germany

Prof. Dr. Ewald Schnug
 Julius Kühn-Institut, Bundesforschungs-
 institut für Kulturpflanzen (JKI)
 Institut für Pflanzenbau und Boden-
 kunde
 Bundesallee 50
 D-38116 Braunschweig, Germany

Received: 31.08.2009
 Accepted: 21.12.2009

Originalbeiträge