

## Entwicklung einer *in vitro* Vermehrungsmethode für Gelben Enzian (*Gentiana lutea* L.)

### Development of an efficient micropropagation method for *Gentiana lutea* L.

Maria Granilshchikova und Elisabeth Kopper<sup>1\*</sup>

#### Abstract

*Gentiana lutea*, also known as bitter root is part of the *Gentianaceae* plant family. It is a native of the Alpine and sub-Alpine areas of central and southern Europe. Gentian root has a long history of use as herbal bitter in the treatment of digestive disorders and is an ingredient of many proprietary medicines. The bitter principles of gentian root are the secoiridoid glycosides amarogentin and gentiopicrotin. Because of a long generative cycle (six to eight years until flowering), a low germination rate of seeds, as well as a very high variability of generatively produced plants, micropropagation may provide a useful alternative for producing plants with high glycoside content. Therefore the growth of axillary shoots was initiated on freshly grown shoots of greenhouse grown plants of *G. lutea* after sterilisation with ethanol (70%) for 5 m, Danchlorix (20%) for 5 m and HgCl<sub>2</sub> (0.2%) for 5 m. For shoot initiation and multiplication a modified MS-medium containing glucose (1.5%) and sucrose (1.5%), and a vitamine mixture from thiamine (0.3 mg·L<sup>-1</sup>), L-tyrosine (100 mg·L<sup>-1</sup>), adenine hemisulphate dehydrate (80 mg·L<sup>-1</sup>) and ascorbic acid (200 mg·L<sup>-1</sup>), gelrite (3 g·L<sup>-1</sup>), pH 5.8 was used. Optimum benzyladenine and naphthalene acetic acid concentrations for shoot development were established and found to be 6 mg·L<sup>-1</sup> for BAP und 0.5 mg·L<sup>-1</sup> for NAA. Roots were induced by using WPM-medium with glucose (0.75%) and sucrose (0.75%), and IBA (0.2 g·L<sup>-1</sup>).

#### Keywords

Gentian root, micropropagation, plant tissue culture, rooting, yellow gentian

als appetitanregender Magenbitter, Aperitif und für Schnaps verwendet. Der Gelbe Enzian wird auch als Fiebermittel benutzt; die Wirksamkeit gegen Fieber konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wird ein bitteres und verdauungsanregendes Tonikum gewonnen. Er wird eingesetzt gegen Müdigkeit, Untergewicht, Blutarmut und Appetitmangel in der Rekonvaleszenz (SCHÖPKE 2011). Aufgrund der langen Generationszeit, geringer Keimfähigkeit der Samen, sowie hoher Variabilität von generativ erzeugten Pflanzen bietet die Gewebekultur eine gute Alternative zur Erzeugung von inhaltsstoffreichen Pflanzen.

#### Material und Methoden

##### *Pflanzenmaterial*

Die Mutterpflanzen von *G. lutea* (Wurzeln, Knollen) wurden in Sand angezogen. Nach dem Austreiben der ersten 2-3 cm erfolgte der Schnitt (*Abbildung 1*).



*Abbildung 1: Frisch etablierte Gentiana lutea Kulturen*

*Figure 1: Freshly established in vitro micropropagation of Gentiana lutea*

##### *Sterilisation*

Die Sterilisation erfolgte mit 70% Ethanol für 5 m, 20% Danchlor für 5 m und HgCl<sub>2</sub> (0,2%) für 5 m. Der Schnitt erfolgte so, dass das Hauptmeristem und die Meristeme der Blattanlagen an der Basis der Wurzel weiterwachsen konnten.

#### Einleitung

Der Gelbe Enzian (*Gentiana lutea* L.) ist eine ausdauernde bis zu 120 Zentimeter hohe Staude mit einem runden, unverzweigten Stängel, die in den alpinen Gebieten Zentral- und Südeuropas heimisch ist (LANGE 1998). Als Droge Enzianwurzel, *Gentianae radix*, dienen die getrockneten, zerkleinerten, unterirdischen Pflanzenteile. Sie sind reich an Zuckern (z.B. Gentiobiose) und Bitterstoffen (Gentianopicrotin und Amarogentin). Die Bitterstoffe dienen eigentlich als Schutz vor Tierfraß. Die Droge wird als Bittermittel, z.B.

<sup>1</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

\* Ansprechpartner: Elisabeth KOPPER, elisabeth.kopper@ages.at



### Vermehrung und Bewurzelung

Die Vermehrung erfolgte auf Medium LV1 (Luteavermehrung) (Abbildung 2). Dies ist ein modifiziertes MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG 1962) mit Glucose (1,5%) und Saccharose (1,5%), sowie einem Vitaminzusatz aus Thiamin ( $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), L-Tyrosin ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Adeninsulfat ( $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Ascorbinsäure ( $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Gelrite ( $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pH 5,8, sowie den Phytohormonen BAP ( $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), NAA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Gibberellinsäure ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Nach ca. einem Monat wurden sterile Kulturen (Hauptexplantate) diametral geteilt und auf frisches Vermehrungsmedium gegeben. In der Folge wurde das Vermehrungsmedium folgendermaßen modifiziert (LV2). Die BAP-Konzentration auf  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  gesenkt, NAA auf  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und auf die Gibberellinsäure wurde verzichtet. Zur Bewurzelung wurde ein WPM-Medium (LLOYD und McCOWN 1980) mit Glucose (0,75%) und Saccharose (0,75%), sowie IBA ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) verwendet.



Abbildung 2: *Gentiana lutea* auf Vermehrungsmedium LV  
Figure 2: *Gentiana lutea* on LV medium (modified MS medium)

### Inkubationsbedingungen und Transfer ins Glashaus

Die Kultivierung erfolgte im 16 h Tag bei  $23^\circ\text{C}$ . Zur Akklimatisierung wurden die bewurzelten Pflanzen in ein Gemisch aus Sand, Tennenrot, aufgedüngtem Torfkultursubstrat und Perlit gepflanzt und für drei Wochen in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchte (80-90%) gehalten. Anschließend wurden die Pflanzen für 6 bis 8 Wochen im Glashaus kultiviert (Abbildung 3) und vor dem Auspflanzen im Freien abgehärtet.



Abbildung 3: *Gentiana lutea* im Glashaus  
Figure 3: Regenerated *Gentiana lutea* plants in the greenhouse

### Ergebnisse und Diskussion

Es ist allgemein bekannt, dass es sehr schwierig ist, *in vitro*-Kulturen von *Gentiana* Arten zu etablieren, da dafür eine sehr hohe Konzentration von Cytokinin erforderlich ist (LAMPROYE et al. 1987, HOSOKAWA et al. 1996). Aus diesem Grund wurde eine BAP-Konzentration von  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  gewählt (MOMČILOVIĆ 1997) und ein Vitaminzusatz, der zuvor bei der Kultur von Bananen erfolgreich erprobt worden war, angewendet. Dies führte zu einer erfolgreichen Vermehrung der Explantate. Bei der Verwendung von LV1 (BAP  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) entwickelten sich buschige Pflanzen mit mehreren dünnen Seitentrieben. Die Dauer einer Passage betrug ca. 6 Wochen. Die Vermehrungsrate pro Passage lag bei 6-8. Allerdings war es sofort nach der Verwendung von LV1 nicht möglich, die Pflänzchen zu bewurzeln. Schwierigkeiten bei der Bewurzelung von *G. lutea* sind auch aus der Literatur bekannt (LAMPROYE et al. 1987). Aus diesem Grund wurde eine weitere Passage auf Medium LV2 (BAP  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , NAA  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) vermehrt und anschließend auf Bewurzelungsmedium umgesetzt.

Zur Bewurzelung wurden verschiedene Medien- und Auxinkonzentrationen erprobt (Daten nicht gezeigt). Schließlich erwies sich ein Woody Plant Medium (LLOYD und McCOWN 1980) mit Glucose (0,75%) und Saccharose (0,75%), sowie IBA ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) als erfolgreich.

Die Bewurzelungsrate lag bei ca. 75%. Dies stimmt mit den Bewurzelungsdaten von VIOLA und FRANZ 1989, überein. Bei der Verwendung von NAA als Auxin, konnten wir allerdings, im Gegensatz zu diesen, keine Bewurzelung erzielen. Bei der Kultivierung im Glashaus überlebten durchschnittlich 50 Prozent der Pflanzen. Bei einigen Chargen jedoch, die länger (bis zu 9 Wochen) auf dem Bewurzelungsmedium blieben, konnte eine Überlebensrate von 90 % beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, eine effiziente *in vitro* Vermehrungsmethode für *G. lutea* zu

entwickeln, die in Zukunft für die Produktion von inhaltsstoffreichen *Gentiana lutea*-Klonen zur Verfügung steht.

## Danksagung

Wir danken Herrn Rathbauer und seinem Team für die gärtnerische Betreuung der Pflanzen, sowie der Firma Bionorica SE, Neumarkt, für die Bereitstellung der Mutterpflanzen.

## Literatur

- HOSOKAWA K, NAKANO M, OIKAWA Y, YAMAMURA S, 1996: Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. *Plant Cell Rep* 15: 578-581.
- LAMPROYE A, CREVECOEUR M, KEVERES C, GASPAR T, 1987: Multiplication végétative *in vitro* de *Gentiana lutea* et de *Gentiana pneumonante*. *Med Fac Landbouw Rijksuniv Gent* 52: 1255-1257.
- LANGED, 1998: Europe's medicinal and aromatic plants: Their use, trade and conservation. *Traffic Int*, Cambridge.
- LLOYD G, McCOWN B, 1980: Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421-427.
- MOMČILOVIĆ I, GRUBIŠIĆ D, NEŠKOVIĆ M, 1997: Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 141-144.
- MURASHIGE T, SKOOG F, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- SCHÖPKE T, 2011: Enzianwurzel - *Gentianae radix* [Ph. Eur. 7.0 (01/2008: 0392)]. *Arzneipflanzenlexikon*, Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. [Available online: [http://www.pharmakobotanik.de/systematik/6\\_droge/gentia-r.htm](http://www.pharmakobotanik.de/systematik/6_droge/gentia-r.htm); accessed 10 Jan 2012]
- VIOLA U, FRANZ C, 1989: *In vitro* propagation of *Gentiana lutea*. *Planta Med* 55: 690.

---

**Anmerkung:** Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.