

Im Labor gezüchtete Pflanzen für die Bodensanierung

Bis jetzt existieren keine umweltschonenden Sanierungsverfahren für schwermetallbelastete Kulturböden. Dies soll mit Hilfe von «metallzehrenden» Pflanzen in Zukunft möglich werden. Allerdings muss dazu die Schwermetallaufnahmefähigkeit der eingesetzten Pflanzen deutlich gesteigert werden. Unser Forschungsprojekt, im Rahmen des «Schwerpunktprogrammes Umwelt» des Schweizerischen Nationalfonds, versucht mittels Gewebekultur-Techniken solche Pflanzen zu züchten.

M. Guadagnini*, R. Herzig*,
K. H. Erismann#, H. Müller-Schärer**

Möglichkeiten der Bodensanierung

Fachleute schätzen die Fläche von schwermetallbelastetem Kulturland (Cadmium, Zink, Kupfer, Blei) allein in der Schweiz auf gegen 10 000 ha [1]. Entsprechende Schätzungen der EU für Westeuropa erreichen die besorgniserregende Fläche von 4 Mio ha. Für den grossflächigen Einsatz von mässig belasteten Böden sind harte Sanierungsmassnahmen wie Bodendeponierung, Waschung, Säureextraktion oder Verbrennung nicht nur wirtschaftlich untragbar, sondern zerstören auch weitgehend die Fruchtbarkeit des behandelten Bodens. Eine Sanierung durch den Einsatz von metallakkumulierenden Pflanzen könnte in naher Zukunft neue Perspektiven eröffnen, zumal es sich dabei um ein schonendes und vergleichsweise kostengünstiges Sanierungsverfahren handelt.

Textkasten 1: Hyperakkumulatoren

Als Hyperakkumulatoren werden Pflanzen bezeichnet, die ungewöhnlich hohe Metallmengen in ihren Sprossteilen aufnehmen können. Der Begriff gilt für Pflanzen, die bezogen auf das Trockengewicht mindestens 0.1% Nickel, Kupfer oder Kobalt im Spross enthalten. Für Zink und Mangan betragen die Gehalte sogar 1%. Diese Pflanzen kommen ausschliesslich auf metallhaltigen Böden wie z.B. Serpentinböden oder auf Böden von Bergwerken vor. Obwohl es sich bei diesen Hyperakkumulatoren um ein seltenes Phänomen handelt, sind weltweit bereits 400 schwermetall-akkumulierende Arten beschrieben worden.

Im Zentrum des Interesses stehen sogenannte «hyperakkumulierende Pflanzen» (vgl. Textkasten 1) [2]. Solche Pflanzen sind in der Lage, dem Boden Schwermetalle zu entziehen und sie in hohem Masse in ihren oberirdischen Sprossteilen einzulagern. Sie können nachher problemlos geerntet und umweltschonend entsorgt werden.

Bisherige Gefäss- und Topfversuche haben gezeigt, dass dem Boden auf diese Weise beachtliche Mengen an Schwermetallen entzogen werden können. Die Sanierung eines Bodens würde derzeit jedoch mehrere Jahrzehnte dauern. Dies aus folgenden Gründen:

- Schwermetalle sind in der Regel an Bodenpartikel gebunden, daher können sie von den Pflanzen nur schwer aufgenommen werden. Diese Schwierigkeit lässt sich durch eine kontrollierte Mobilisierung im Boden überwinden; dadurch werden die Schwermetalle für die Pflanzen besser verfügbar (vgl. Textkasten 2) [3].
- Die heute zur Verfügung stehenden Hyperakkumulatoren produzieren nur wenig Biomasse, so dass der Gesamt-

Textkasten 2:

Die Mobilisierung erhöht die Schwermetallaufnahme

Ausschlaggebend für die Aufnahme von Schwermetallen durch Pflanzen sind nicht die Gesamtgehalte an Schwermetallen im Boden, sondern der lösliche oder pflanzenverfügbare Anteil. Dieser hängt in starkem Masse von den physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften ab. Aus der Sicht der sanften Bodensanierung sind diese mobilen Anteile meist zu gering, um die gewünschte Entzugsleistung zu erreichen. Im «Schwerpunktprogramm Umwelt» werden daher verschiedene Möglichkeiten untersucht, um die Schwermetalle durch den Einsatz von Mobilisierungsmitteln im Boden für die Pflanzen besser verfügbar zu machen (z.B. Absenken des Boden-pHs durch Zugabe von Säuren und/oder den Einsatz von Chelatbildnern, wie NTA).

entzug an Schwermetallen zu gering ist. Dieser Nachteil kann durch die Züchtung von hochakkumulierenden Kulturpflanzen wie z.B. Tabak (*Nicotiana tabacum*), Senf (*Brassica juncea*) oder Sonnenblume (*Helianthus annuus*) behoben werden. Solche Neuzüchtungen sollen im Idealfall die Eigenschaften der erwähnten Hyperakkumulatoren sowie die hohen Ertragsleistungen von Kulturpflanzen aufweisen.

* Michele Guadagnini und Dr. Rolf Herzig
AGB, Arbeitsgemeinschaft für Bioindikation,
Umweltbeobachtung und ökologische Planung.
Quartiergasse 12, CH-3013 Bern, Tel. ++41
(0)31 - 332 66 29, Telefax ++41 (0)31 - 332
66 83, e-mail: 101456.1671@compuserve.
com.

Prof. Dr. Karl Hans Erismann
PHYTOTECH – Phytotechnisches Labor
Quartiergasse 12, CH-3013 Bern.

** Prof. Dr. Heinz Müller-Schärer
Institut de biologie végétale. Université de
Fribourg, 3, rue Albert-Gockel, CH-1700
Fribourg (Suisse).

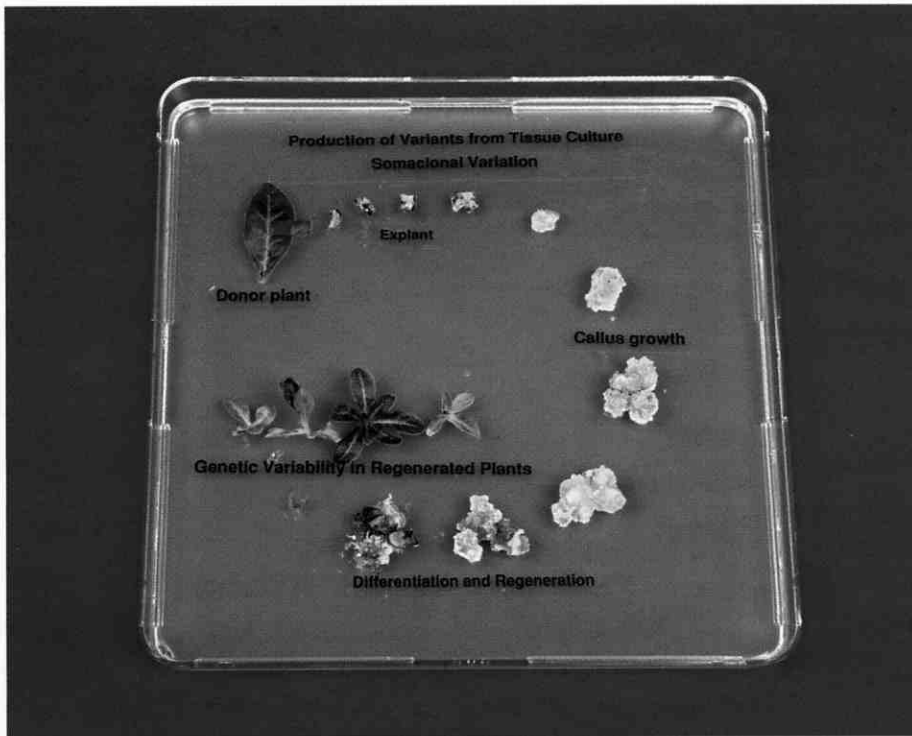


Abb. 1: Selektion von somaklonalen Varianten bei Tabak. Von jungen Blättern werden Explantate entnommen. An ihren Wundflächen bildet sich ein Kallus. Durch Zugabe von Phytohormonen lassen sich daraus wieder junge Pflänzchen gewinnen. Diese werden anschliessend auf ihre Fähigkeit, Schwermetalle zu akkumulieren, geprüft.

Züchtungs- und Selektionsverfahren

In unserem Forschungsprojekt versuchen wir, ausgehend von pflanzlichen Gewebe- und Zellkulturen solche Pflanzen zu züchten. Dabei kommen Techniken zum Einsatz, die mit dem Begriff der Mutationszüchtung umschrieben werden (vgl. Abb. 1). Solche Techniken bieten – wie im folgenden beschrieben – die Möglichkeit, die Mutationsrate in Gewebekulturen zu erhöhen, also möglichst viele Mutationen in der Erbanlage zu induzieren [4]. Durch entsprechende Selektionsverfahren werden dann die gewünschten Mutanten isoliert. Da die Schwermetallresistenz genetisch kodiert ist und die Pflanzen über verschiedene Entgiftungsmechanismen verfügen, mit denen sie Schwermetalle «physiologisch unschädlich» machen können, zielen die Züchtungstechniken mittels Zell- und Gewebekulturen darauf hin, jene Mutanten zu selektionieren, bei denen dieser Toleranz- und Akkumulationsmechanismus besonders ausgeprägt ist. Ziel der Arbeit ist die

Selektion von Mutanten von Kulturpflanzen mit grosser Biomassenproduktion. Diese Pflanzen sollen in der Lage sein, ohne Ertragseinbussen zu wachsen und die Schwermetalle in hohem Masse in

ihre oberirdischen Pflanzenteile aufzunehmen.

Dazu haben wir Verfahren entwickelt, welche auf folgenden fünf Grundschritten basieren.

- *Etablierung einer Gewebekultur:* Eine Kalluskultur wird für jede zu züchtende Pflanze angelegt und weiterkultiviert.
- *Genetische Variation:* In Zell- oder Gewebekulturen wird eine möglichst breite Vielfalt an genetisch unterschiedlichen Zellen erzeugt; diese bildet das Ausgangsmaterial der Züchtung.
- *Selektion:* Auf Schwermetall-belasteten Nährböden werden die Zellen oder Gewebe einer Selektion unterworfen; die toleranten, überlebenden Zellen werden isoliert.
- *Regeneration:* Aus den toleranten Zellen bzw. Geweben werden wieder ganze Pflanzen regeneriert (sog. Regenerate).
- *Prüfung und Vermehrung:* Die Regenerate werden auf ihre Akkumulationseigenschaften hin getestet und die erfolgversprechenden in grossem Massstab vermehrt (geklont).

Der Arbeitsablauf wird hier am Beispiel zweier spezieller Tabaksorten (Badischer Geudertheimer und FoPereg) gezeigt, welche aufgrund ihrer ausgeprägten Akkumulationsfähigkeit für Cadmium, ihrer hohen Biomasseproduktion sowie ihrer Eignung für die Gewebekultur ausgewählt wurden.

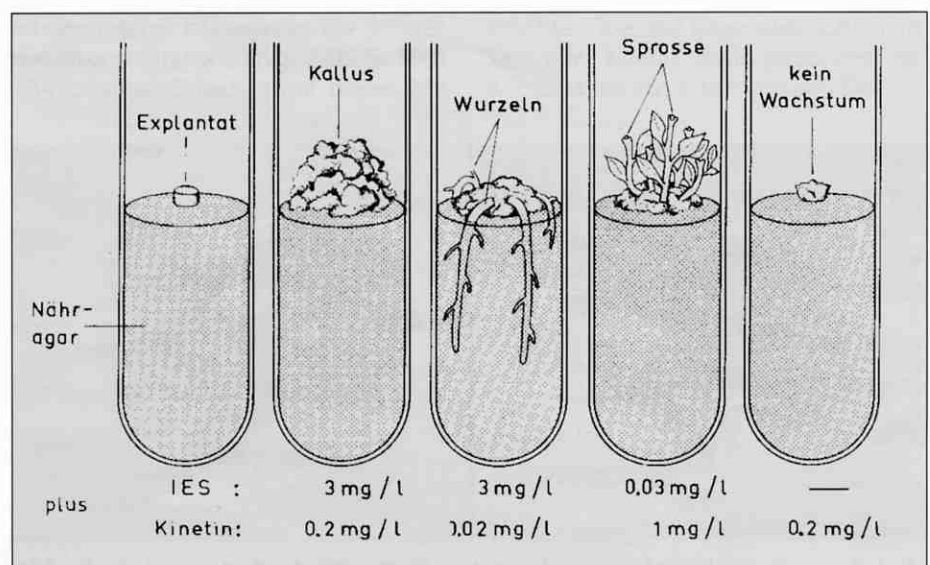


Abb. 2: Kalluswachstum bzw. Differenzierung in Abhängigkeit vom Mengenverhältnis an Phytohormonen (nach Hess 1988).

Textkasten 3: Die somaklonale Variation

Die genetischen Veränderungen, die während der Kultivierung von Zellkulturen entstehen bzw. in daraus regenerierten Pflanzen auftreten, werden als »somaklonale Variation« bezeichnet [5]. Spontane Mutationen kommen in Zellkulturen verstärkt vor und sind auf eine Destabilisierung des Genoms zurückzuführen. Die genetischen Änderungen gehen auf Punktmutationen bzw. strukturelle und numerische Veränderungen der Chromosomen zurück. Es ist noch nicht restlos geklärt, welche Faktoren für die Mutationen verantwortlich sind. Eine wichtige Rolle spielen unter anderem: die rege Zellteilung, die Kulturzeit, die eingesetzten Phytohormone, die Lichtverhältnisse und mechanische Einwirkungen. Die *in-vitro* Kultur von Pflanzenzellen ist für die Züchtung neuer Sorten eine reiche Quelle von genetischen Neukombinationen. So sind durch dieses Verfahren bis heute mehrere für die Landwirtschaft bedeutende Neuzüchtungen auf den Markt gekommen (zB. Zuckerrohr, Tomate sowie mehrere Zierpflanzen).

Schritt 1: Etablierung der Gewebekultur

Der Tabakpflanze werden Gewebe (sog. Explantate) entnommen und unter sterilen Bedingungen auf ein festes Nährmedium gebracht. Diesem Nährboden werden geeignete Konzentrationen von Phytohormonen zugesetzt, so dass an den Wundflächen der Explantate eine rege Zellteilung stattfindet. Daraus geht durch fortgesetzte Teilung ein strukturloses, undifferenziertes Gewebe, ein sog. Kallus, hervor. Sobald dieser gross genug ist, werden Teilstücke davon für eine weitere Kultivierung auf frisches Nährmedium übertragen. Solche Subkulturen lassen sich nach Bedarf wiederholen und können unabhängig von der Mutterpflanze jahrelang weiterkultiviert werden. Die Regeneration von Pflanzen aus den Kalluskulturen wird durch eine spezifische Kombination und Dosierung der Phytohormone im Nährmedium angeregt. Als Folge davon beginnen sich die Zellen zu redifferenzieren und entwickeln sich schliesslich wieder zu einer intakten Pflanze (vgl. Abb. 2).

Schritt 2: Die Erzeugung genetischer Variabilität

Die künstlichen Bedingungen in den Zell- und Gewebekulturen führen zu einer Destabilisierung der Erbanlagen. So entstehen durch stark angeregte spontane Mutationen Zelltypen mit unterschiedlichen genetischen Merkmalen (vgl. Textkasten 3) [5]. Darunter können sich auch Zellen mit den gewünschten Eigenschaften

finden. Sinnvollerweise wird hier bereits eine erste Selektion auf der Zellebene vorgenommen. Das gesamte Züchtungsverfahren kann dadurch enorm beschleunigt werden, weil nicht erst die Entwicklung zur ganzen Pflanze abgewartet werden muss.

Schritt 3: Die Selektion

Bei der Selektion der Zellen gehen wir folgendermassen vor: Die Kalluskulturen werden auf stark schwermetallhaltige Nährböden gesetzt. Unter diesen, für sie toxischen Bedingungen überleben nur die toleranten Zelltypen, welche wir isolieren und auf frisches schwermetallhaltiges Nährmedium übertragen. Diese Prozedur wiederholen wir mehrmals und erhöhen dabei stufenweise die Schwermetallkonzentrationen (vgl. Abb. 5). Nach 18-monatiger Selektion auf diesen Me-

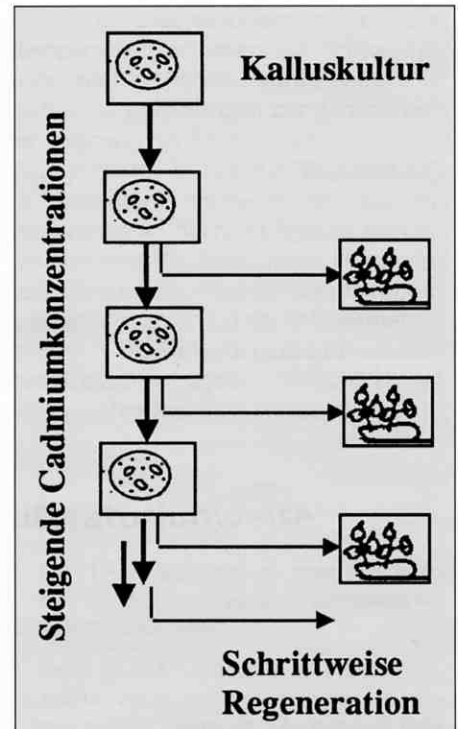


Abb. 5: Schema der Selektion von Cadmium-toleranten Kalluskulturen. Gutgewachsene Kallusbereiche werden selektioniert und weiterkultiviert. Ein Teil davon wird zur Regeneration gebracht.

dien unter ständiger Auswahl von besonders gut gewachsenen Kallusbereichen sind vier Kalluslinien entstanden, die deutlich resistenter gegen Schwermetalle sind als das Ausgangsmaterial. Dabei unterscheiden wir Kalluslinien mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Cadmium, Zink oder Kupfer sowie gegenüber der Kombination aus Cadmium und Zink.

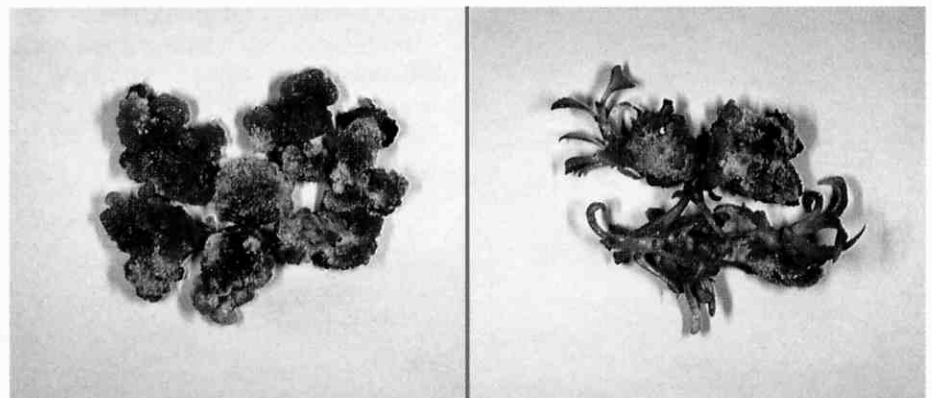


Abb. 3+4: Links: Kalluskultur. Kalli entstanden aus den Blättern von Tabak. Rechts: Regeneration. An mehrere Kalli, die auf einem schwermetallhaltigen Nährmedium gewachsen sind, bilden sich junge Sprosse.

Schritt 4: Die Regeneration

Die Regeneration von Pflanzen aus dem toleranten Gewebe erfolgt schrittweise, nämlich vor jeder Erhöhung der Schwermetalldosis. Mit dieser Massnahme wird sichergestellt, dass die Regenerationsfähigkeit während des Selektionsprozesses intakt bleibt; denn es ist möglich, dass lange Kulturdauer und extreme Stressbedingungen zum Verlust der Totipotenz der Zellen (die Fähigkeit, aus einer einzelnen Zelle eine ganze Pflanze zu regenerieren) führen können, was die Selektionsarbeit zunichte machen würde.

Den Regenerationsmedien werden ebenfalls Schwermetalle beigelegt, allerdings in geringeren Konzentrationen als bei den Selektionsmedien. Damit wird keine eigentliche Zellselektion (das Abtöten nicht toleranter Zellen) bezweckt, sondern das Verhindern der Regeneration noch vorhandener nicht toleranter Zellen. Dieses Vorgehen ist notwendig, weil man am Anfang der Selektion mit einer Mischpopulation an Zellen konfrontiert ist, welche nur durch eine fortschreitende Selektion resistenter gemacht werden kann. Es sollen idealerweise nur tolerante Zellen regenerieren.

Bisher konnten aus den verschiedenen Regenerationsversuchen insgesamt etwa 1000 Regenerate gewonnen werden. Diese potentiellen Akkumulatoren sind anschliessend mit Hilfe der *in-vitro* Mikrovermehrung geklont worden. Mit dieser Technik kann in kurzer Zeit eine genügende Anzahl genetisch identischer Pflanzen für die nachfolgenden Akkumulationstests bereitgestellt werden.

Schritt 5: Die Prüfung der Varianten

Die Varianten müssen in einem weiteren Selektionsschritt auf ihr verbessertes Ak-

kumulationsverhalten gegenüber Schwermetallen geprüft und mit der Leistung der Mutterklone verglichen werden. Die Prüfung erfolgt *ex-vitro* auf schwermetallhaltiger Nährlösung. Unter kontrollierten Experimentalbedingungen können so in kurzer Zeit eine grosse Zahl von somaklonalen Varianten geprüft werden. Bisher wurden etwa die Hälfte der gewonnenen Regenerate auf ihr Akkumulationsverhalten in Nährlösungen getestet. Darunter sind 16 Varianten mit einer deutlich gesteigerten Aufnahme-fähigkeit identifiziert worden. Wir haben bei Zink eine bis zu 50% Steigerung, bei Cadmium eine Verdoppelung und bei Kupfer eine knappe Verdreifachung der Akkumulationsleistung gegenüber den Mutterklonen festgestellt.

Im Gegensatz dazu zeigen 11 Varianten eine bis zu 70% geringere Schwermetallaufnahme. Solche Pflanzen werden als «Excluder» bezeichnet. Ihre Toleranz gegenüber Schwermetallen beruht folglich auf einer reduzierten Metallaufnahme im Wurzelbereich. Obwohl die Excluder für unsere Züchtungsziele nicht direkt von Bedeutung sind, lassen auch sie auf genetische Veränderungen während der *in-vitro* Kultur schliessen. Da die Mutationen in Zellkulturen ungerichtet sind, sind sowohl verbesserte Akkumulatorentypen als auch Excluder zu erwarten. Ebenso bestätigt das sporadische Auftreten von Regeneraten mit Zwergwachstum oder anderen phänotypischen Abweichungen die Existenz somaklonaler Variation in unserem *in-vitro* Züchtungsverfahren.

Zukunftsperspektiven

Neben der Prüfung der restlichen Regenerate werden zurzeit die aussichtsreichsten Varianten zwecks Verifikation der Laborergebnisse auf ihre Akkumulationsleistung und Biomasseproduktion im Feld

untersucht. Dies geschieht in Topf- und Kleinparzellenversuchen auf schwermetallbelasteten Böden. Vorgesehen sind auch erste Abklärungen zur genetischen Verankerung der Mutationen.

Gelingt es, die bisher auf Nährlösungen nachgewiesene Verbesserung mehrere Tabakvarianten auch im Feld zu bestätigen, besteht die berechnete Hoffnung, dass, verbunden mit einer ebenfalls optimierten Mobilisierung der Schwermetalle im Boden, die Sanierungszeit für schwermetallbelastete Böden tatsächlich auf wenige Jahre reduziert werden kann.

Literaturhinweise

- [1] EDI (1993): Botschaft zu einer Änderung des Bundesgesetzes über den Umweltschutz (USG), Bern.
- [2] Baker A.J.M., Brooks R.R. (1989): Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 26-81.
- [3] Wenger K. und Gupta S.K. (1997): Kann eine kontrollierte Mobilisierung die Phytoextraktion von Schwermetallen wesentlich erhöhen? *Bulletin BGS* 21: 91-96.
- [4] Hess, D. (1992): *Biotechnologie der Pflanzen: eine Einführung*. Ulmer, Stuttgart.
- [5] Larkin, P. and Scowcroft, W. (1981): Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
- [6] Dix, P.J. (1990): *Plant cell line selection. Procedures and applications*. VHC, Weinheim.