

In-vitro-Züchtung, Selektion und Erprobung von metall-akkumulierenden Tabakvarianten zur Bodensanierung

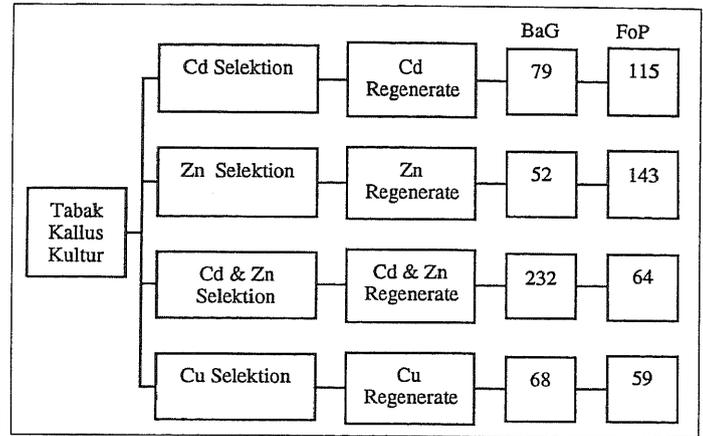
MICHELE GUADAGNINI, ROLF HERZIG,
KARL-HANS ERISMANN, HEINZ MÜLLER-SCHÄRER

Zur Verkürzung der Sanierungszeit schwermetall-belasteter Böden mit Hilfe von metallakkumulierenden Pflanzen auf eine praxisrelevante Zeitspanne von wenigen Jahren, ist sowohl eine kontrollierte Mobilisierungsbehandlung zur Erhöhung der pflanzenverfügbaren Schwermetallanteile im Boden erforderlich als auch eine effizientere Schwermetallaufnahme der eingesetzten Dekontaminationspflanzen. Die Ergebnisse eines Forschungsprojektes des Schwerpunktprogramms Umwelt des Schweizer Nationalfonds zur *In-vitro*-Züchtung, Selektion und Erprobung von metall-akkumulierenden Tabakvarietäten sind Gegenstand dieses Beitrages.

Grundvoraussetzung für eine erfolgversprechende Phytoextraktion von Schwermetallen aus kontaminierten Böden sind hochleistungsfähige Pflanzen, die dem Boden ausreichend große Mengen an Schwermetallen entziehen können. Eine effiziente Entzugsleistung erfordert allerdings Pflanzen, die sowohl hohe Erträge als auch hohe Metallgehalte in ihren oberirdischen Teilen aufweisen. Pflanzen mit letzterem Merkmal werden Hyperakkumulatoren genannt, und es sind weltweit gegen 400 Arten beschrieben [1]. Meist handelt es sich allerdings um Wildpflanzen mit geringer Biomasseproduktion, deren Gesamtaustrag an Schwermetallen oft kaum größer ist als derjenige großwüchsiger Kulturpflanzen, welche diese besondere Fähigkeit der gesteigerten Metallaufnahme nicht oder nur in sehr geringem Umfange besitzen.

In einem mehrjährigen Forschungsprojekt wurde der Versuch unternommen, durch *In-vitro*-Züchtung und Selektion die Aufnahme- und Akkumulationsfähigkeit von schwermetall-akkumulierenden Pflanzen maßgeblich zu verbessern. Dies mit dem Ziel – zusammen mit anderen optimierten Verfahren, insbesondere der kon-

1: Selektion von schwermetall-toleranten Kalluskulturen auf metallhaltigen Nährmedien mit anschließender Regeneration von Pflanzen



trollierten Schwermetallmobilisierung im Boden – die notwendige Sanierungszeit zur biologischen Dekontamination schwermetallbelasteter Böden von der heute unrealistisch langen Zeitspanne auf wenige Jahre verkürzen zu können.

Als erfolgversprechender Weg zur Effizienzsteigerung der sanften Bodensanierung werden unter anderem die *In-vitro*-Züchtung und Selektion von ertragreichen Tabak-Sorten verfolgt [2]. Parallel durchgeführte Schwermetall-Mobilisierungsbehandlungen im Boden führen zu einer starken Erhöhung der pflanzenverfügbaren Schwermetallanteile (siehe auch Beitrag *Neubauer* et al. in dieser Zeitschrift). Solche Mobilisierungsbehandlungen führen zu einer deutlich erhöhten Metallaufnahme in den Pflanzen und stellen damit hohe Ansprüche an die Toleranzeigenschaften. Somit bilden die Steigerung der pflanzlichen Schwermetalltoleranz, zusammen mit einer erhöhten Metallakkumulation in den oberirdischen Pflanzenteilen, die wohl wichtigsten Züchtungsziele. Eine ungenügende Schwermetalltoleranz würde nämlich zwangsläufig zu negativen Effekten auf Wachstum und Ertrag führen.

Im folgenden werden die bis jetzt erreichten Resultate der *In-vitro*-Züchtungen

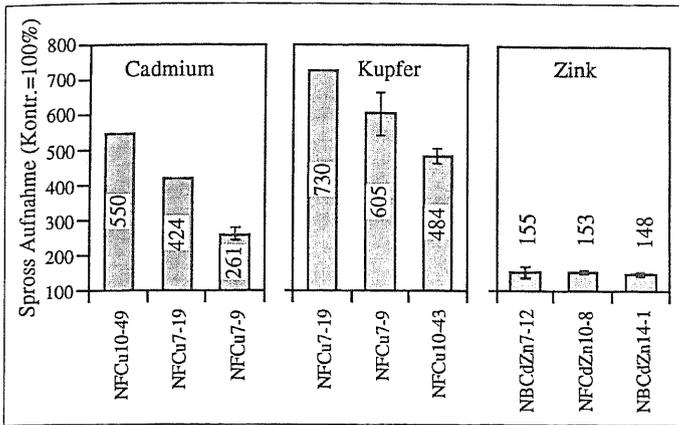
zweier Tabak-Sorten: Badischer Geudertheimer (BaG) und Forchheim Pereg (FoP) aufgezeigt und künftige Weiterentwicklungen, die zur Verfahrensoptimierung notwendig erscheinen, skizziert.

Züchtung und Selektion von schwermetalltoleranten und akkumulierenden Tabakvarianten

Das eingesetzte *In-vitro*-Züchtungsverfahren gründet auf der Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen auf künstlichen Nährmedien und der daraus resultierenden somaklonalen Variation [3]. Unter solch speziellen Kulturbedingungen erfolgt eine Destabilisierung des pflanzlichen Genoms, was zu einer Erhöhung von genetischen Veränderungen in den Zellen führt [4]. Da die Schwermetalltoleranz genetisch verankert ist und Pflanzen über verschiedene Entgiftungsmechanismen verfügen, zielte das Züchtungsverfahren darauf ab, auf Zellebene eine möglichst große Anzahl von genetischen Variationen zu produzieren und dabei gleichzeitig diejenigen Zellen zu selektieren, bei denen ein Toleranzmechanismus besonders ausgeprägt war.

Tab. 1: Hydrokultur-Screening von Tabakregeneraten auf standardisierten schwermetallhaltigen Nährlösungen

Zuchtlinien	BaG			FoP		
	Geprüfte Regenerate	Verbesserte Regenerate	(%)	Geprüfte Regenerate	Verbesserte Regenerate	(%)
Cd	79	6	7,6	115	8	7,0
Cu	52	18	34,6	143	48	33,6
Zn	232	22	9,5	64	9	14,1
Cd & Zn	68	2	2,9	59	7	11,9
Total	431	48	11,1	381	72	18,9



2: Cd-, Cu- und Zn-Akkumulation der neun effizientesten Tabakregenerate im Vergleich zu den Mutterklonen (= 100%). Test auf schwermetallhaltigen Nährlösungen.

Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Schwermetallionen ins Wachstumsmedium. Unter diesen toxischen Bedingungen überlebten nur die toleranten Zelltypen, welche isoliert und auf schwermetallhaltigen Nährmedien weiter kultiviert wurden. Unter ständiger Auswahl und Weiterkultivierung von besonders gut gewachsenen Kallusbereichen wurde dieses Vorgehen während 18 Monaten mehrmals wiederholt. Da Pflanzen schwermetall-spezifische Toleranzmechanismen aufweisen, wurden vier verschiedene Selektionsmedien (Cd-, Zn-, Cu- sowie ein kombiniertes Cd & Zn-Selektionsmedium) eingesetzt. Die Regeneration von vollständigen Tabakpflanzen aus den schwermetall-toleranten Kallusgeweben geschah schrittweise unter Zugabe von spezifischen Pflanzenhormonen während der ganzen Selektionsperiode. **Bild 1** stellt das Selektionsprozedere mit der Anzahl regenerierter Pflanzen beider Tabakvarietäten (BaG und FoP) aus den vier Zuchtlinien dar.

Mit diesem Selektionsverfahren konnten insgesamt 812 verschiedene Tabakpflanzen regeneriert werden. Diese wurden nach einem Mikrovermehrungsschritt auf standardisierten, schwermetallhaltigen Nährlösungen auf ein gesteigertes Akkumulationsverhalten gegenüber den Mutterklonen getestet (Hydrokultur-Screening). Dieses Prüfverfahren war unumgänglich, da Schwermetalltoleranz zwar eine Grundvoraussetzung für die Metallakkumulation darstellt, die Pflanzen jedoch sowohl mit erhöhter Akkumulation im Spross als auch mit gesteigertem Ausschluss von Schwermetallen durch die Wurzeln reagieren können. Letztere als «Exkluder» bezeichnete Tabakregenerate galt es von den interessanten «Akkumulator-Typen» auszuschließen. In **Tabelle 1** sind die Anzahl der getesteten Tabakvarianten im Hydrokultur-Screening sowie die mit verbesserter Metallakkumulation, getrennt nach den beiden Tabak-Kultivaren (BaG und FoP) und den vier Selektionslinien, dargestellt.

Für 120 der insgesamt 812 Tabakvarianten konnte im standardisierten Schwermetall-Hydrokulturtest eine deutlich gesteigerte Cadmium-, Kupfer- und Zink-Aufnahme in den Pflanzensprossen nachgewiesen werden. Etwa 3/4 dieser verbesserten Varianten zeigten im Vergleich zu den Mutterpflanzen eine 30–100%ige Steigerung der Metallakkumulation. Gemäß **Bild 2** zeigten die jeweils drei Besten dieser Tabakregene-

rate für Kupfer eine fünf- bis sieben-fach, für Cadmium eine drei- bis sechs-fach und für Zink eine 1,5-fach gesteigerte Akkumulation in den Spross im Vergleich zu den Mutterklonen.

Evaluation auf schwermetallhaltigen Böden

Diejenigen Tabakvarianten, welche auf Nährlösungen eine deutlich verbesserte Metallaufnahme aufwiesen, wurden anschließend mit Hilfe von Gefäßversuchen auf den schwermetallhaltigen Böden Rafz (ZH) und Dottikon (AG) erneut auf ihre Leistungsfähigkeit getestet. Von den insgesamt 112 geprüften Tabak-Varianten zeigten 18 auch unter diesen Bedingungen eine um 20–75% erhöhte Schwermetall-Aufnahme in den Spross. Diese Ergebnisse wurden ohne eine zusätzliche Schwermetall-Mobilisierungsbehandlung im Boden erzielt. Die Verbesserungen für Cadmium, Kupfer und Zink der fünf besten Varianten, im Vergleich zu den Mutterklonen (= 100%), sind in **Bild 3** dargestellt.

Von diesen 18 Tabakvarianten wiesen 13 eine mit den Mutterpflanzen vergleichbare Ertragsleistung auf, fünf Varianten wiesen deutlich reduzierte Erträge auf, weshalb für diese auch keine signifikant gesteigerte Schwermetall-Entzugsleistung festgestellt werden konnte.

Die im Vergleich zu den metallhaltigen Nährlösungen wesentlich strengeren Ver-

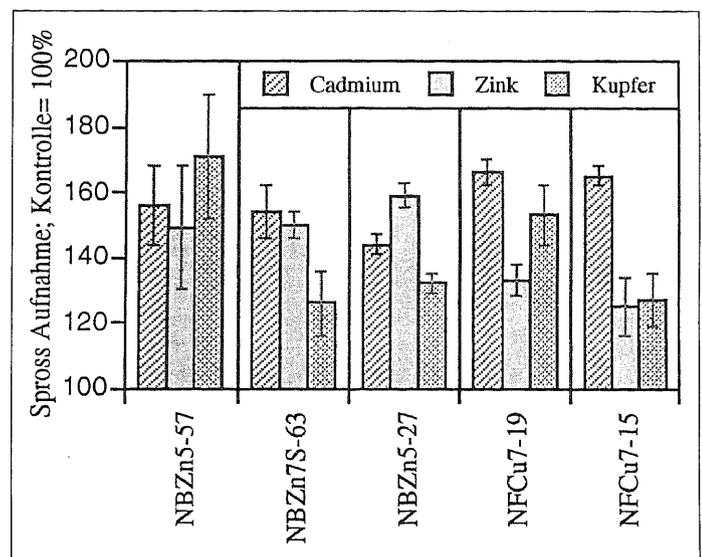
suchsbedingungen im Boden haben vermutlich dazu geführt, dass beim „Screening auf Boden“ ein gewisser Teil an potentiell interessanten Varianten „verloren“ ging und auch die erzielten Leistungssteigerungen eher bescheiden ausgefallen sind. Dies hängt jedoch zu einem großen Anteil mit den relativ geringen pflanzenverfügbaren Anteilen der an und für sich stark belasteten Testböden zusammen. Diese limitierten pflanzenverfügbaren Schwermetall-Anteile haben möglicherweise zu einer ungenügenden Diskriminierung in der Aufnahme zwischen verschiedenen Züchtungen und den Mutterpflanzen geführt, was sich in den erzielten, eher bescheidenen Verbesserungsfaktoren widerspiegelt.

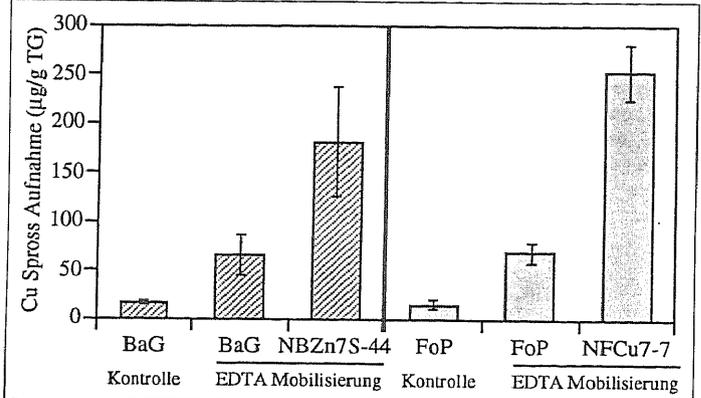
Mit einem zusätzlichen Mobilisierungsversuch mit dem Komplexbildner Ethylen-diamin-tetraessigsäure (EDTA), welcher dem Testboden zwei Wochen vor der Pflanzenernte beigegeben wurde, soll dies verdeutlicht werden. Sowohl die Tabakvarianten als auch die Mutterklone reagierten auf die Mobilisierungsbehandlung mit einer erhöhten Cu-Aufnahme im Spross. Allerdings reagierten die beiden Tabakvarianten NBZn7S-44 und NFCu7-7, für welche eine Effizienzsteigerung bereits früher nachgewiesen wurde, mit einer 2,7- bzw. 3,6-fachen Erhöhung der Sprosskonzentrationen, gegenüber den Mutterpflanzen (**Bild 4**). Damit zeigt sich, dass auf mobilisierten Böden beide Varianten über ein deutlich gesteigertes Akkumulationspotential für Schwermetalle verfügen.

Vergleicht man unter diesen Testbedingungen den Metallentzug der zuchttechnisch verbesserten Tabakvarianten auf mobilisierten Böden mit dem Metallentzug der Mutterklone (Boden unmobilisiert), so ergibt sich für das exemplarische Beispiel Kupfer eine theoretische „Overall-Effizienzsteigerung“ um einen Faktor 10–16.

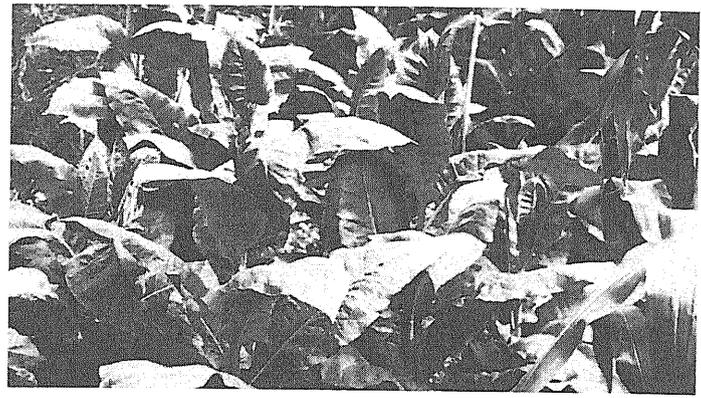
In dieser Größenordnung müssen die Verfahrensverbesserungen zur sanften Bodendekontamination von Schwermetallen mit Hilfe metallakkumulierender Pflanzen und kontrollierter Bodenmobilisierung mindestens sein, damit ein praktischer Einsatz sinnvoll und auch wirtschaftlich vertretbar wird. Wie gezeigt werden kann, lohnt sich

3: Cd-, Zn- und Cu-Akkumulation der fünf effizientesten Tabakregenerate, im Vergleich zu den Mutterklonen (= 100%). Test auf schwermetallhaltigen Böden.





4: Steigerung der Kupfer-Aufnahme von zwei Tabakvarianten mit verbesserter Metallakkumulation im Vergleich zu Mutterklonen ohne und mit Schwermetall-Mobilisierungsbehandlung im Boden (25mM/kg Boden EDTA).



5: Freilandprüfung von Tabakvarianten mit optimierter Metallaufnahme im Feldversuch Dornach.

der vertiefte Forschungs- und Entwicklungseinsatz für diese in Europa noch sehr junge Disziplin durchaus. Nicht zuletzt auch wenn man bedenkt, welche enorme Flächen an schwermetall-kontaminierten Böden dringend einer Risikoverminderung bedürfen [5].

Im Feldsommer 1999 wurden vier dieser aussichtsreichsten Tabakvarianten ebenfalls im Kleinparzellenversuch Dornach (SO) auf ihre Freiland-Eignung erprobt. Die Wachstumsmessungen sind für drei der vier Tabakvarianten sehr positiv verlaufen und zeigten bei den verbesserten Tabakvarianten keine Ertragseinbußen. Die Schwermetallanalysen, welche zu vertieften Erkenntnissen führen werden, stehen zur Zeit noch aus.

Es ist vorgesehen, die positiven Ergebnisse dieses *In-vitro*-Züchtungs- und Selekti-

onsprogramms mit Tabak in weiterführenden Forschungsprojekten zu vertiefen. Nebst einer gründlichen Evaluation der aussichtsreichsten Tabak-Neuzüchtungen in Bezug auf Schwermetall-Aufnahme, -Toleranz und Ertrag, sind auch Gefäß- und Freilandversuche unter verschiedenen Bodenbedingungen, mit und ohne Mobilisierungsbehandlungen, vorgesehen. Auch soll die genetische Stabilität der aussichtsreichsten Varianten geprüft werden. Solche Untersuchungen sind u.a. im Rahmen der neuen COST Action 837 geplant [6].

Literaturhinweise:
 [1] Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). *Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery* 1: 81-126.
 [2] Herzig R., Guadagnini, M., Erismann, K.H. (1997). *Chancen der Phytoextraktion. Sanfte Boden-*

dekontamination von Schwermetallen mit Hilfe von biotechnisch verbesserten Akkumulatorpflanzen. TerraTech, Zeitschrift für Alllasten und Bodenschutz. Sonderteil Schweiz. Vereinigte Fachverlage 2: 49-52, Mainz.
 [3] Larkin, P. and Scowcroft, W.R. (1981). *Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
 [4] Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. (1998). *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Publishers, NL.*
 [5] Meyer, K. (1991). *Bodenverschmutzung in der Schweiz. Nationales Forschungsprogramm 22. Bern-Liebefeld, Schweiz.*
 [6] COST Action 837 (1999). *Plant biotechnology for the removal of organic pollutants and toxic metals from wastewaters and contaminated sites. Bundesamt für Bildung und Wissenschaft, Bern. BBW C9.00.28.*

Integration der sanften Bodensanierung in ein regionales Bodenschutzkonzept

ARMIN KELLER, BERCHTOLD VON STEIGER, RAINER SCHULIN

Landwirtschaftlich und gartenbaulich genutzte Böden lassen sich aufgrund ihrer ökologischen Bodenqualität bewerten. Auch sanft sanierte Böden sind als besonders wertvoll einzustufen, weil ihr Schadstoffgehalt unter Schonung des physikalischen Aufbaus sowie der biologischen Prozesse mit erheblichem Aufwand auf ein akzeptables Maß gesenkt wurde. Nach der sanften Bo-

densanierung wird eine nachhaltige Folgenutzung angestrebt. Schutz vor erneuter Kontamination der sanierten Flächen kann im Rahmen eines regionalen Bodenschutzkonzeptes mit einer angepassten Folgenutzung gewährleistet werden.

Bei der sanften Sanierung mit Hilfe metallakkumulierender Pflanzen werden dem Boden Schadstoffe über einen Zeitraum in der Größenordnung von Jahren bis Jahrzehnten entzogen. Der Planung und Kontrolle von sanften Bodensanierungen kommt in dieser Hinsicht eine besondere Rolle zu, um die Wirksamkeit der Maßnahmen über sol-

che Zeiträume erfassen zu können [1]. Unabhängig davon, wie die Sanierungsziele definiert werden, z.B. als totale oder lösliche Schwermetallkonzentration im Boden, muss nach deren Erreichen sichergestellt werden, dass die Folgenutzung der sanierten Flächen keine erneute Akkumulation der Schadstoffe im Boden verursacht. Die Folgenutzung muss möglichst ausgeglichene Schadstoffbilanzen gewährleisten, andernfalls würde sich die Bodenqualität erneut verschlechtern und der hohe Aufwand einer sanften Bodensanierung wäre mittel- oder langfristig zunichte gemacht. Diese Befürchtung stützt sich auf Stoffbilanzen von landwirtschaftlich genutzten Böden, welche auf eine längerfristige Schadstoffakkumulation hindeuten [2, 3].