

# Fajhibridek – a keresztezés révén nagyobb genetikai változatosság



## **Zebroid = zebra + ló hibrid**

[sites.google.com/site/rareanimalspage/zebroids](https://sites.google.com/site/rareanimalspage/zebroids)

- Egymáshoz közel álló fajok képesek lehetnek életképes utódot létrehozni.
- Az utód rendelkezhet szüleihez képest előnyös tulajdonságokkal (pl. a ló öszvér szívósabb, ellenállóbb a betegségekkel szemben és tovább él).



## **Grizzly + jegesmedve hibrid**

By Corradox - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=63796271>

- Viszont a hibridek sokszor nem szaporodóképesek a szülőkétől eltérő kromoszóma szám miatt. (A kromoszóma szám jellemző egy adott fajra. Ló: 32 pár, szamár: 31 pár. Öszvér: 31 pár + 1 páratlanul marad)



**„Szamár” öszvér (hinny)**



**„Ló” öszvér (mule)**

## Miért jó, hogy vannak hibridek?

Nem feltétlenül emberi közreműködés eredménye, hogy létrejönnek. Pl. a grizzly és a jegesmedve “kéznél vannak egymásnak”. Az elterjedési területük átfed.

Szekvenálás alapján a mai barna medve genomja 2%-ban tartalmazza a 10 000 éve kihalt barlangi medve génjeit, és a mai eurázsiai emberek genomjában 2-4%-ban megtalálhatóak a neandervölgyi ember génjei.

A zebroid és az öszvér már az ember által létrehozott hibridek.

A lóöszvér – a lókanca és a szamárcsődör közötti keresztezésből származó hibrid – nagyobb testi erővel, a betegségekkel szembeni nagyobb ellenállással és hosszabb élettartammal rendelkezik, mint bármelyik szülője. Termete a lóéhoz hasonló, hangja hasonló a szamár ordításához. Teherbírása akár a lóé, de erősebb és szívósabb. Keresi a lovak társaságát.  
<https://hu.wikipedia.org/wiki/%C3%96szv%C3%A9r>



# Növényi hibridek

## a keresztezés révén nagyobb genetikai változatosság



*Királybúza [2]*

*Varga Frigyes kutató –  
nemesítő nevéhez fűződik a  
kifejlesztése*

- királybúza – a közönséges búza és a tönkölybúza mesterségesen létrehozott fajhibridje.
- A legnagyobb szemű, tömegű és sűrűségű búzafaj [1].
- kedvező tulajdonságok a nagyobb genetikai változatosság révén → heterózis
- **Heterózis:** bizonyos szülői tulajdonságok hatványozott mértékű megjelenése az utódokban. Minél különbözőbbek voltak egymástól a szülők egy adott határon - a szaporíthatóság határán – belül, annál hatványozottabban erősödnek fel a szülői tulajdonságok.

*A keresztezéssel történő hibrid létrehozás hosszadalmas munka, mert meg kell várni, ameddig felnőnek az utódok, és ivaréretté válnak.  
(A királybúza 30 éves fejlesztés eredménye.)*

[1] <https://hu.wikipedia.org/wiki/Kir%C3%A1lyb%C3%BAza>

[2] Készítette: Godlikezaza - A feltöltő saját munkája, CC BY-SA 4.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50452122>

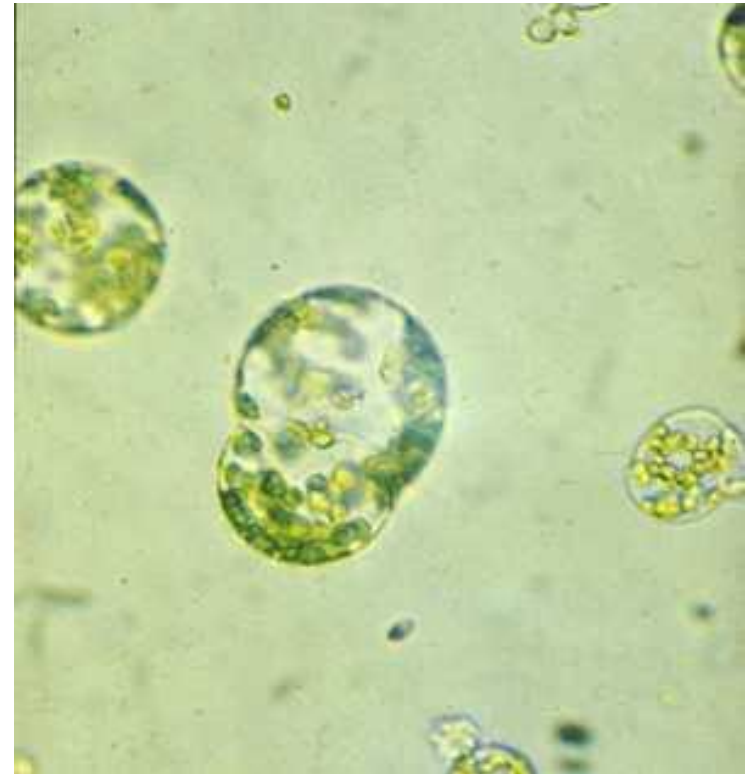
# Protoplaszt fúzió (szomatikus fúzió)

- Az ivaros szaporodást “kikerülő” génmódosítás, elősorban növényeken alkalmazható
- **Két testi sejt** (nem ivarsejt!) **mesterséges egyesítését jelenti**
- Célja a faj vagy fajta genetikai megváltoztatása,
- számunkra előnyös tulajdonságok létrehozása érdekében. → **heterózis létrehozása**
- Miért van létjogosultsága a hagyományos növénynemesítés (ivaros szaporítás) mellett?

1. Lerövidíti az idejét.
2. Könnyebben átléphetők a fajok közötti korlátok.
3. A vegetatívan szaporított növények (pl. krumpli) génállományának frissítésére is lehetőséget nyújt.

*Mit jelent a protoplaszt kifejezés?*

*Mi jellemző egy protoplaszt állapotú sejtre?*



# Protoplaszt fúzió

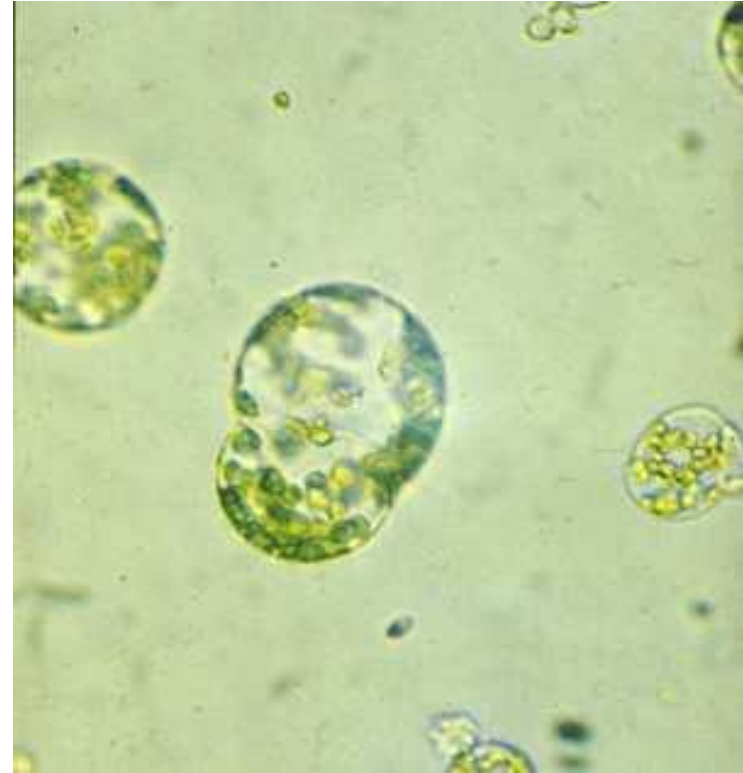
**Protoplaszt:** Sejtfalától megfosztott, kívülről csak **sejtmembránnal** borított sejt.

Mesterségesen hozzuk létre a sejtfal eltávolításával.

Elveszti az alakját, gömbölyű citoplazma cseppé válik. (A felületi feszültség gömb alakúra rántja össze.)

Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

- mechanikai hatásokra (keverés, rázás, pipettázás)
- **ozmózis nyomásra** (csak tömény cukoroldatokban tartható)

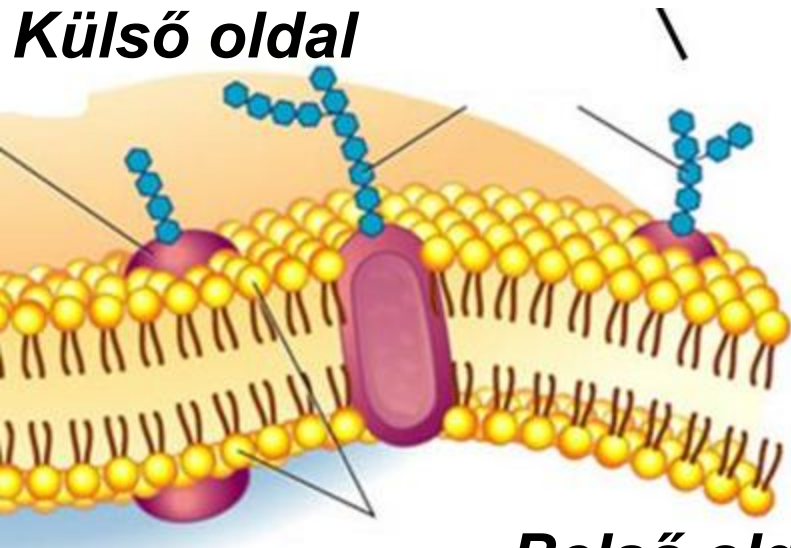


*Sejtfal, sejtembrán, ozmózis...*

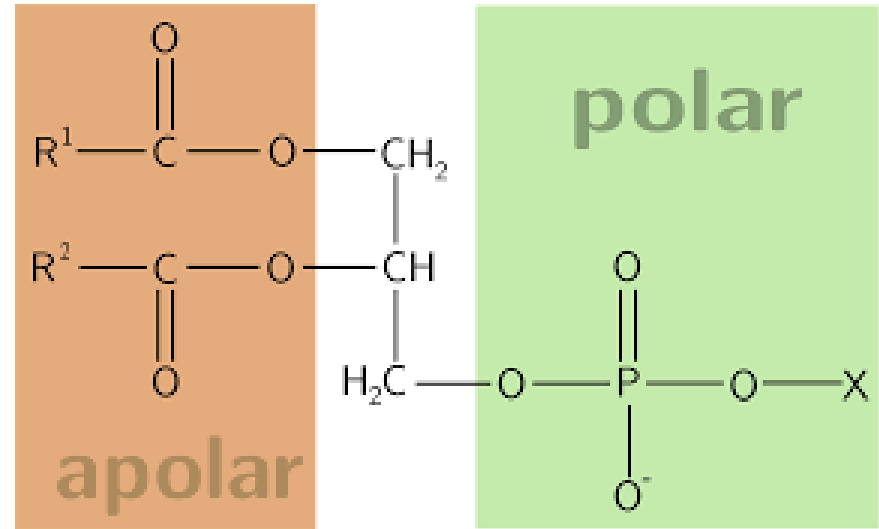


# Sejtmembrán (sejthártya)

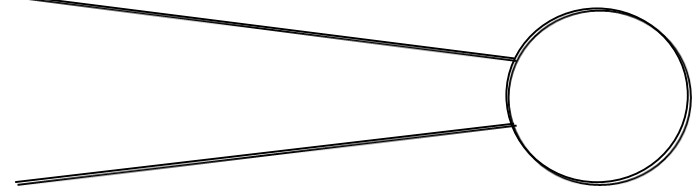
**Külső oldal**



**Belső oldal**



*Egy lipid molekula szerkezete*



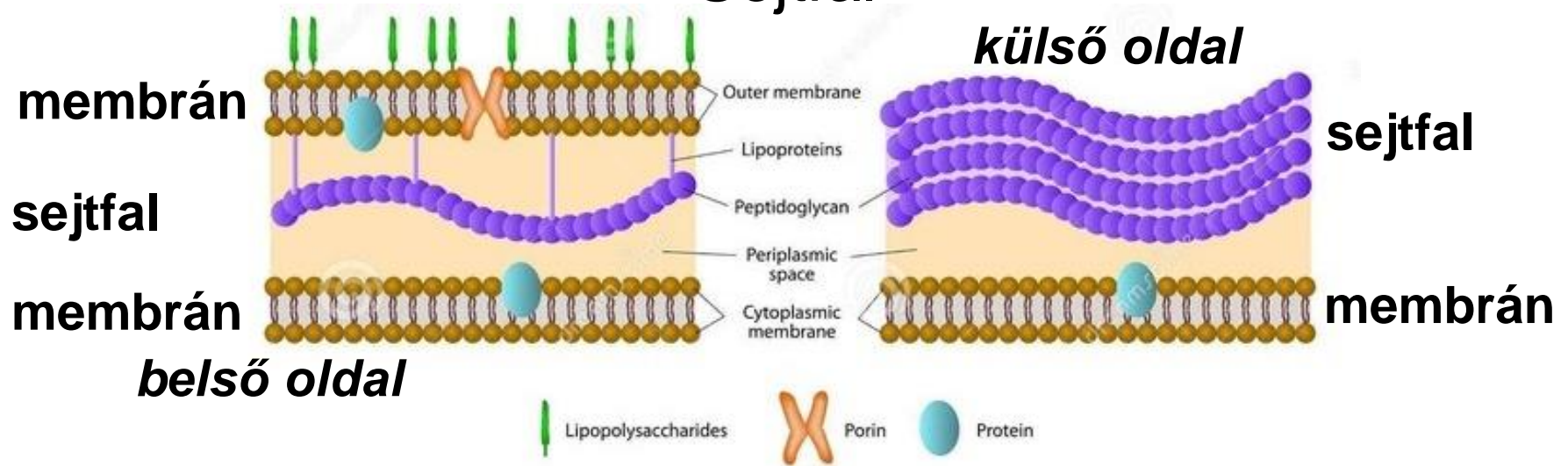
Hosszú apoláris szénlánc

Rövid poláris csoport

- zsírszerű anyagok = lipidek (sárga)
- Membránfehérjék (lila)
- felszíni cukor egységek (kék)
- **Apoláris** lánc és **poláris** „fej”
- Membrán nélkül a sejt elpusztul,
- mert „egyensúlyba kerül” a környezetével.
- A membrán tehát egy határoló felület.
- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló felület.



# Sejtfal

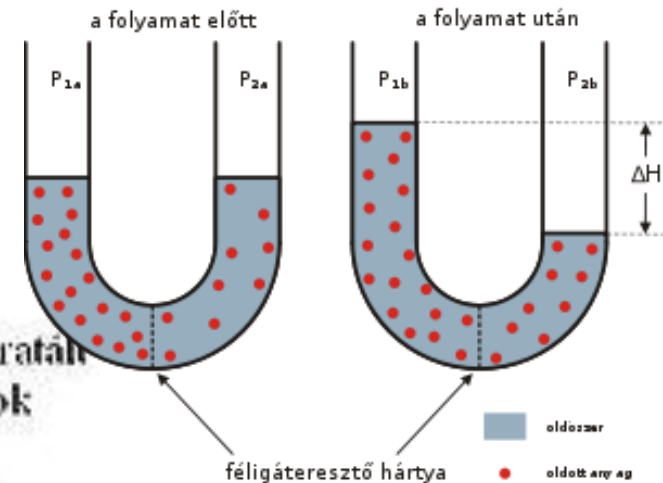
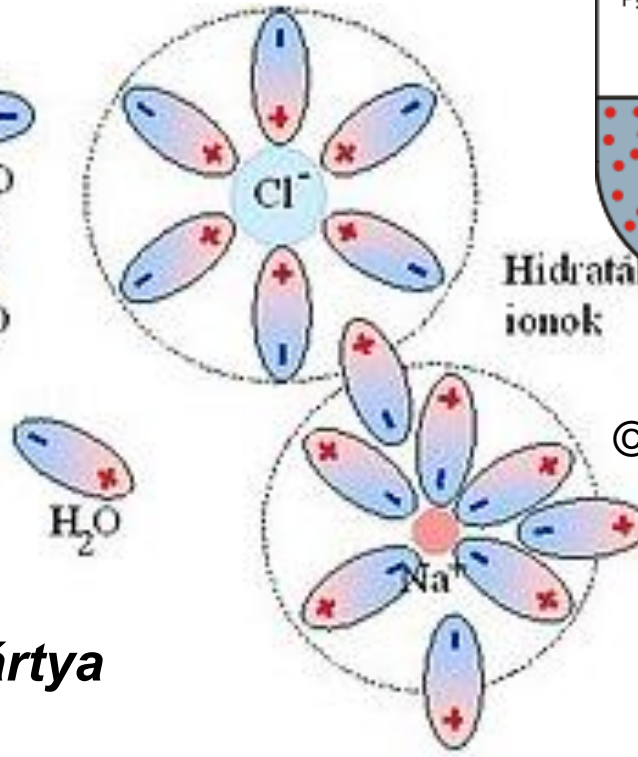
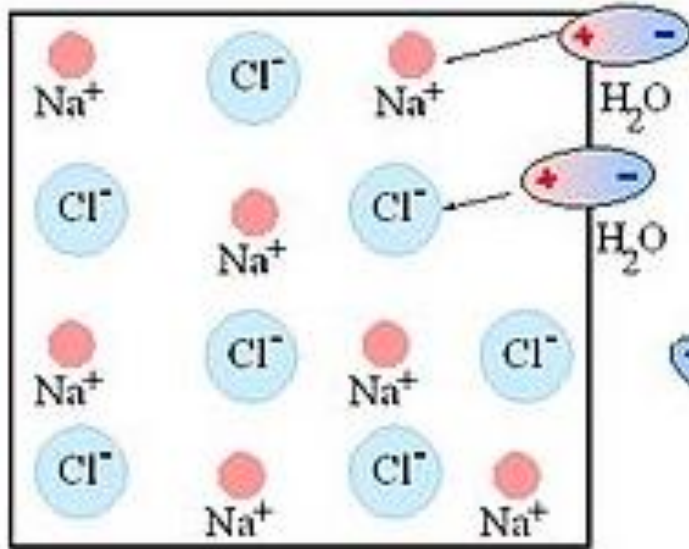


## *Gram-negatív (balra) és gram-pozitív (jobbra) baktériumok sejtfala*

- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló felület.
- Felépülhet pl. szén-hidrát polimerekből vagy cukor-aminosav óriásmolekulákból.
- Növényeknek, gombáknak, a legtöbb baktériumnak, algáknak van...
- De az állatoknak és állati egysejtűeknek (protista-k) nincsen sejtfaluk.
- Szilárdít, mechanikai védelmet ad, durva szűrőként működik,
- Véd az **ozmotikus stressz** ellen. → sejt+sejtfal ~ „nyomástartó edény”
- Megj.: a tengeralattjáró is tekinthető egy nyomástartó edénynek.



# Az ozmózis



© Hans Hillewaert, osmosis, wikipedia.org

$$P_{\text{ozmózis}} = \rho \cdot g \cdot \Delta H$$

**Négyzet: féláteresztő hártya (pl. sejthártya)**

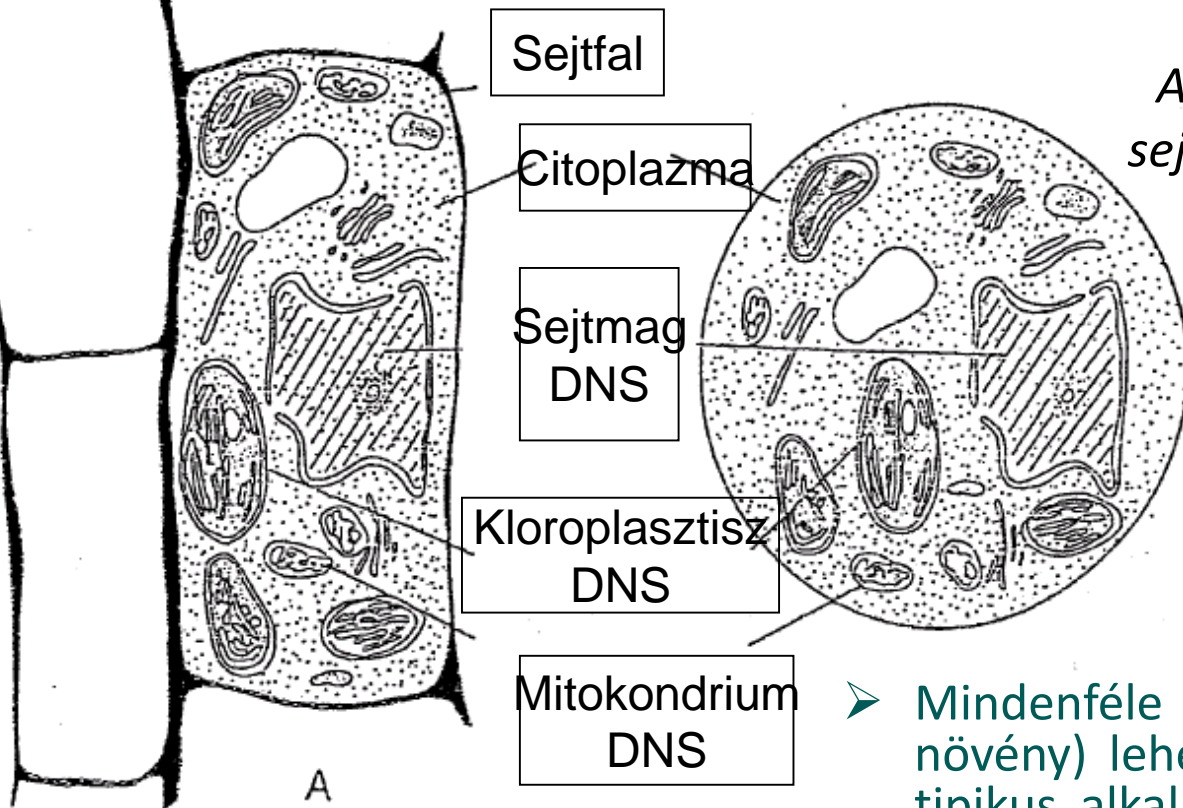
© Dr. Báder Imre, ozmózis, wikipedia.hu

- Az oldószer (itt a víz) átjut a sejthártyán
- De a nagyobb molekulák (pl. fehérjék, RNS) nem tudnak kilépni
- Hajtóerő a belső és külső kémiai potenciál (~ a koncentráció különbség) kiegyenlítésére.
- Ozmózis nyomás fogalma





# Milyen sejtekből lehet protoplasztot csinálni?



*A sejtfaluktól megfosztott sejtek gömb alakúak, mert a felületi feszültség összehúzza őket.*

1. ábra. A növényi sejt (A) és az abból izolált protoplaszt (B) váz tekintettel az örökítő- (genetikai) anyag lokalizálására

➤ Mindenféle sejtől (baktérium, élesztő, növény) lehet protoplasztot csinálni, de a tipikus alkalmazása a **növények genetikai manipulációja**.

- Ennek az az oka, hogy a növényi sejtekre jellemző a **totipotencia**, vagyis egyetlen növényi sejtől lehetőség van egy egész növényt regenerálni.
- Megj.: állati sejtekből nem szükséges protoplasztot csinálni, mert az állati sejteknek nincs vagy csak alig van sejtfaluk.
- Másrészt az állati sejtek nem totipotensek, belőlük jelenlegi tudásunk szerint nem regenerálható egy teljes, élő állat.

# A protoplaszt előállítás (izolálás) lépései

## Sejtfal lebontása:

### 1. *A megfelelő sejt kiválasztása*

Elvileg bármely sejtől előállítható, de a legegyszerűbb laboratóriumban nevelt növényi szövet-tenyészetből.

### 2. ***Steril körülmények biztosítása:***

Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)  
Manipuláció steril levegőjű térben

### 3. *A sejtfal leemésztése megfelelő enzimekkel.*

*pl. celluláz – a cellulózt bontó enzim*



# A protoplaszt előállítás (izolálás) lépései

## 4. Kíméletes körülmények:

a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipet-tázás, centrifugálás, keverés, rázás során vigyázni

## 5. Ozmotikus védelem:

Plazmolitikumok - nem metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit) használata (10-13%).

A glükóz vagy szacharóz erre nem jó, mert a sejtek elfogyasztják, ettől csökken a közeg ozmózisnyomása – elpusztulhat a sejt. Ezért csak a tápláláshoz adnak egy keveset.

Megjegyzés: izotóniás oldat. **Fiziológiás nátrium-klorid oldat** (fiziológiás sóoldat, szakmai zsargonban: *fiz-só*) a legegyszerűbb összetételű fiziológiás oldat. A vérplazma fagyáspont csökkenésével ( $-0,56\text{ °C}$ ) megegyező NaCl oldat moláris koncentrációja 0,15 M, ami megfelel 0,9%-os oldatnak. [Issekutz B., Issekutz L.: *Gyógyszerrendelés*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1979.]

Az alábbi elérésről letöltve:

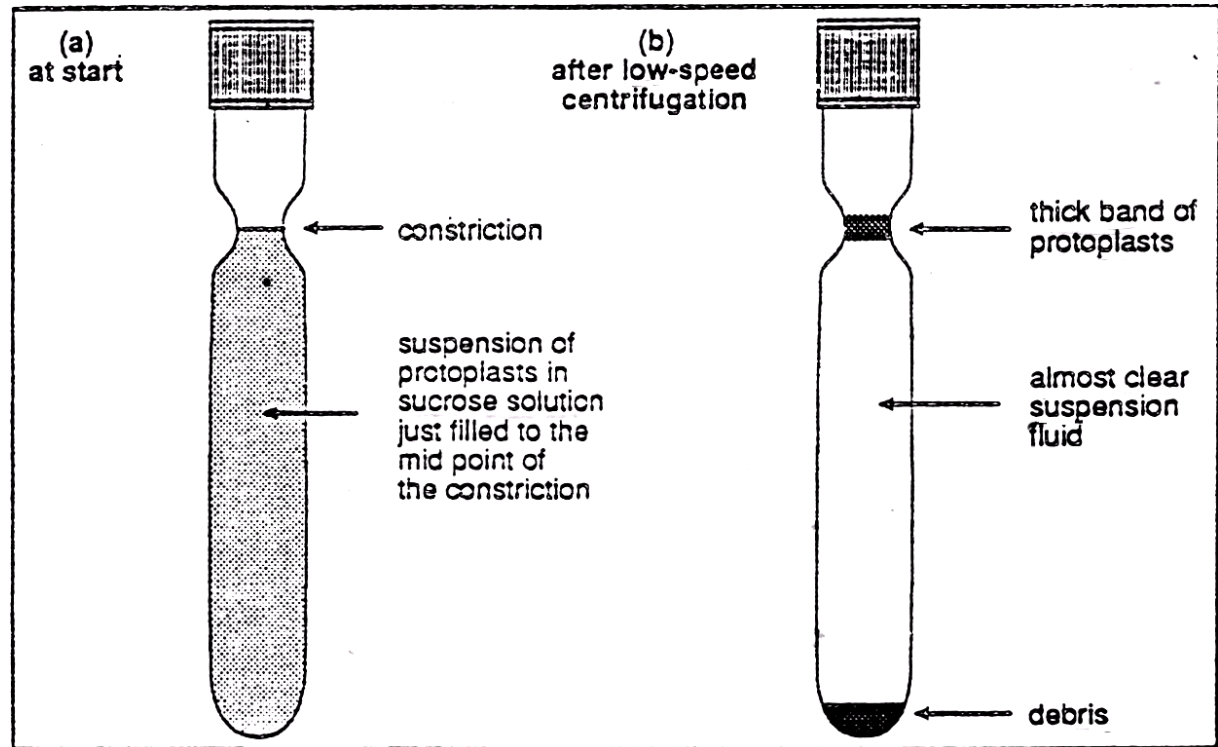
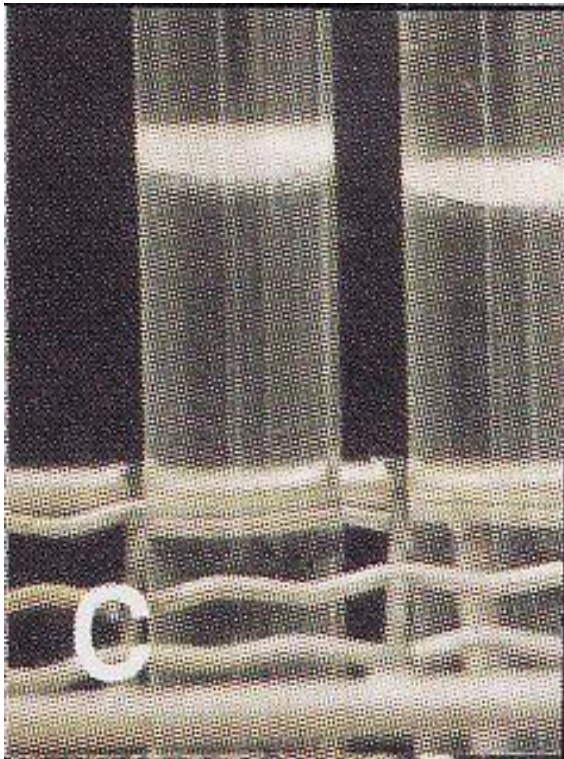
[https://hu.wikipedia.org/wiki/Fiziol%C3%B3gi%C3%A1s\\_oldat#cite\\_note-5](https://hu.wikipedia.org/wiki/Fiziol%C3%B3gi%C3%A1s_oldat#cite_note-5)



# Protoplaszt előállítás

Centrifugálás: BABCOCK-CSÖBEN, „felfugálás”

A protoplasztok sűrűsége kisebb, mint a cukor oldaté, ezért feljönnek felszínre. A növényi maradék pedig leülepszik.



# A protoplasztok tenyésztése

A protoplasztot a sejtfal hiánya nem akadályozza a növekedésben és az osztódásban.

A sikeres tenyésztéshez kellenek →

*Szénhidrátok:*

- bontható cukrok – tápanyag (glükóz, szacharóz, maltóz v. ezek keveréke) 1-2%
- nem bontható cukoralkoholok – 10-13%

*Tápanyag:* ásványi sók

*Növényi hormonok*

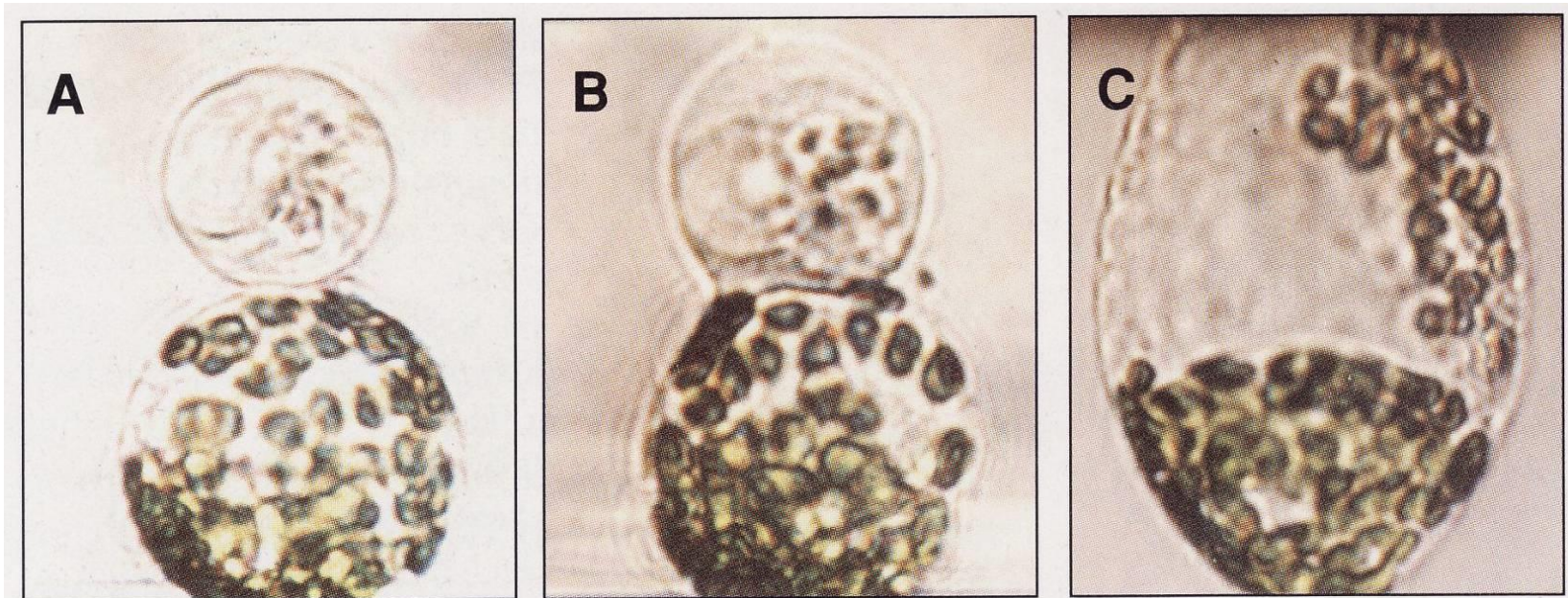
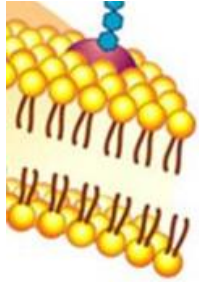
*Módszer:* mikroszkóp alatt, tárgylemezen, néhány cseppnyi folyadékban



# Hogyan vehetünk rá két testi sejtet, hogy egyesüljenek?

## Protoplaszt fúziós módszerek

- Elektromos és/vagy vegyszeres technikák állnak rendelkezésre.
- Mikroszkóp alatt, speciális tárgylemezen, folyadékban végzik.
- A sejtmembrán felépítése az egymástól távol álló fajokban is alapvetően azonos. Ha megzavarjuk a lipid molekulák egymással kialakított kölcsönhatásait, azok rávehetők, hogy egymással egyesüljenek.
- Megj.: ha egymásnak fújunk két szappanbuborékot, azok időnként összeolvadnak egyetlen nagy buborékká. Vagy: vírus is fuzionálhat a célsejttel.



# De mi lesz a hibrid sejttel a fúziót követően?

- A protoplaszt fúzió során két protoplaszt beltartalma egyesül, fuzionál.
- Eukarióták esetében a hibridnek két különböző sejtmagja lesz (**heterokarion**), és tartalmazza mindkét fél színtestjeit és mitokondriumait is (amelyek szintén tartalmaznak DNS-t).
- Egy idő után a protoplaszton belül a sejtmagok is találkozhatnak és fuzionálhatnak.
- A fúzió után a hibrid sejt a következő osztódások során a fölös számú kromoszómák nagy részét elveszti, és valamelyik szülő félhez válik hasonlóvá, csak néhány új gén/tulajdonság stabilizálódik.
- Ez a génmanipulációs módszer sem célzott, irányított, a létrejövő utódok tulajdonságai véletlenszerűen alakulnak ki.
- Emiatt mesterséges szelekcióval kell az életképesnek bizonyuló hibrid génállományú sejtek közül a számunkra ígéretes tulajdonságokkal rendelkezőket kiválasztani.

**Heterokarion:** (átmenetileg) egynél több sejtmagot tartalmazó sejt



# Növények regenerálása protoplasztból

Mai tudásunk szerint az állati sejtek nem totipotensek, így állatot nem tudunk “regenerálni” (klónozni) protoplasztból.

A növényi sejtek különleges tulajdonsága a **totipotencia** = egyetlen sejtől regenerálható a teljes növény, ami azután kiültethető, szaporítható. →

Egy megváltoztatott tulajdonságú sejtől teljes, életképes növényt fejleszthetünk, amelynek minden sejtje hordozza az új géneket. Az ivarsejtek is, azaz a változás öröklődik.

A megfelelő növényi hormonok megfelelő időben történő adagolásának segítségével tudjuk a totipotens sejteket a szöveti differenciálódás (**szövetté fejlődés**) irányába terelni.





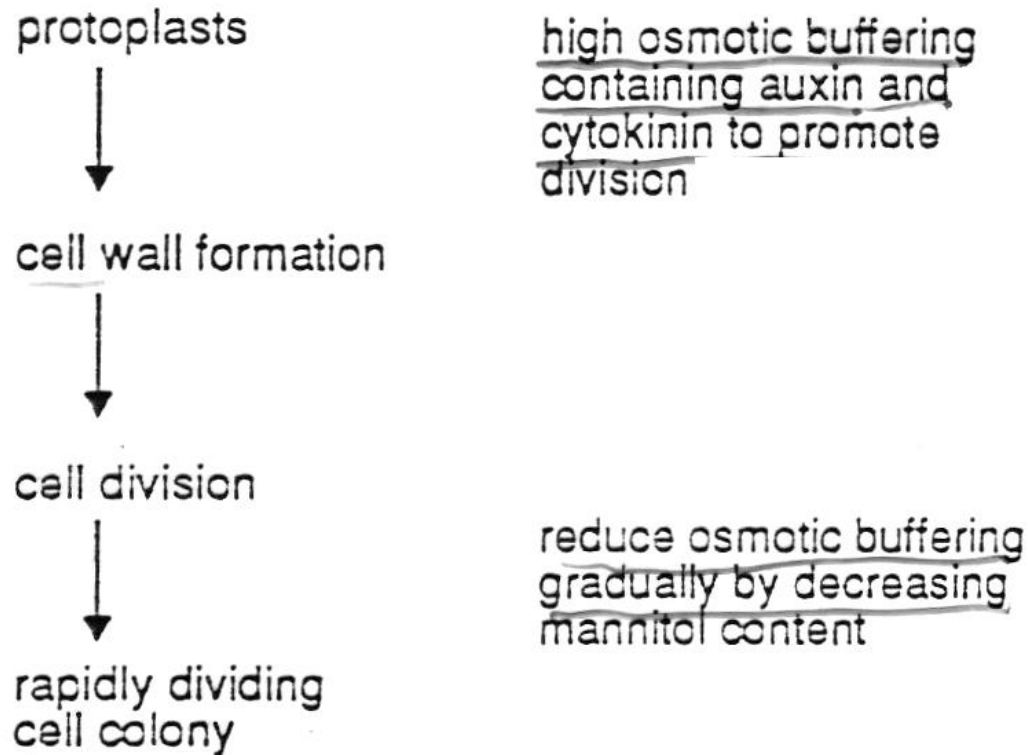
# Protoplaszt tenyésztés, növény regenerálás

- A regenerálás első lépése a sejtfa újraképzése.
- A falszintézis a protoplaszt létrejöttének pillanatától megindul. Ezt a természetes folyamatot meg lehet gyorsítani, egyrészt hormonálisan, másrészt a közeg ozmózisnyomásának fokozatos csökkentésével.
- Pl.: a kiindulásnál 9 %-nyi mannitot a hetenkénti átoltásnál 6, majd 3 %-ra csökkentik.
- A regenerálódó sejtek előbb sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kalluszt** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.
- A megfelelő növényi hormonokkal való kezelés nemcsak a sejtfa szintézisét segíti elő, hanem a totipotens sejtek megfelelő irányba történő szöveti elköteleződését is elősegíti.
- A megfelelő növényi hormonál kezelt kallusz tenyészetből aztán teljes növényt lehet regenerálni.



# A protoplasztból történő növényregenerálás lépései sematikusán

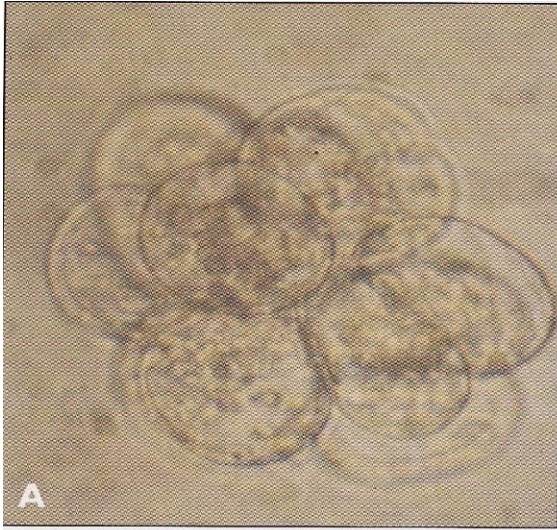
---



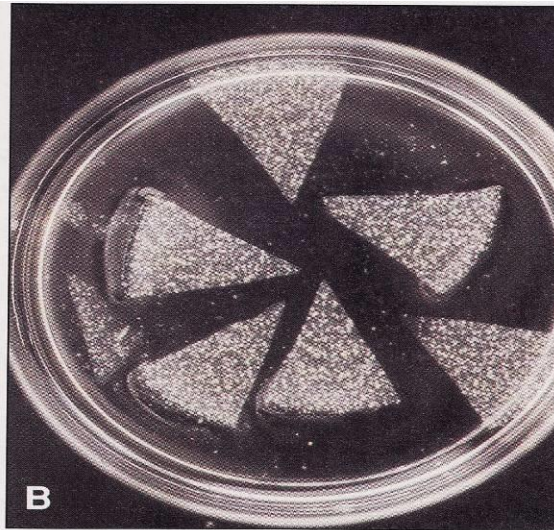
Az első protoplasztból regenerált növény a dohány volt  
(Takabe 1971).



# Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztokból



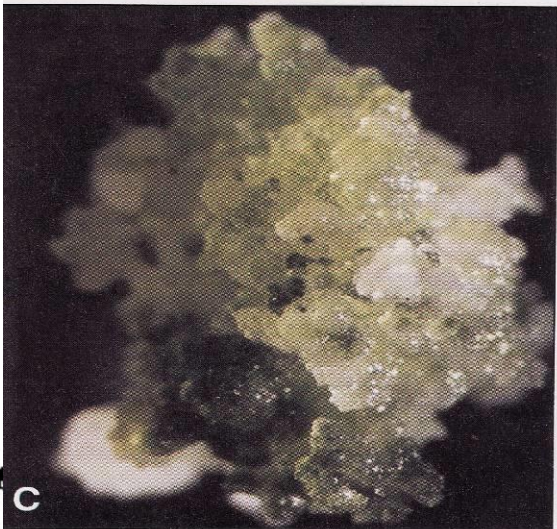
A



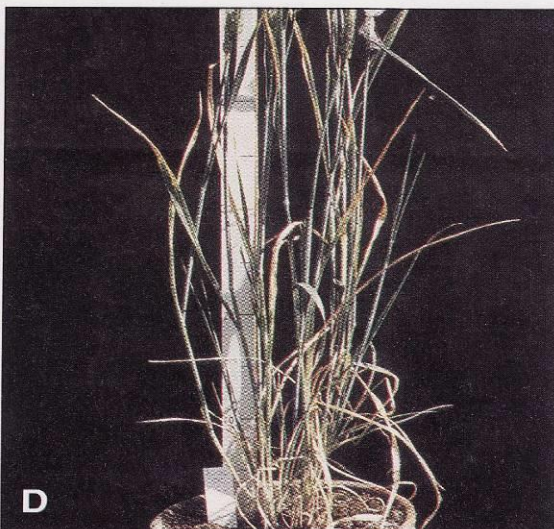
B

A: protoplaszt eredetű többsejtes kolónia

B: mikrokolóniák kialakulása agárba ágyazott sejtekből



C



D

C: kallusz tenyészet

D: protoplaszt eredetű termékeny búzanövény

# A keresztezés és protoplaszt fúzió összehasonlítása

- Keresztezés: két különböző tulajdonságú egyed génállományának egyesítése ivaros szaporítással. Régi nemesítési módszer – kulcsszerepe (volt) az új fajták előállításában
- Fajon belüli fajták keresztezése: néhány tulajdonság változik
- De: nem lehet mindent keresztezni mindennel. Csak rokon fajták, fajok között működik.
- A rendszertani távolság növeli az inkompatibilitást.
- A megtermékenyítés szabályozása (anatómiai és egyéb) rendszerint kizárja az idegen pollennel való beporzást, csak a fajon belül termékenyül.
- Ezért előnyös keresztezés helyett protoplasztokat egyesíteni, ez megkerüli az ivaros szaporodás akadályait.



# A protoplaszt fúzió különböző fajok között is elképzelhető (Ló + darázs = lódarázs? 😊)

A fúzió nagyon különböző fajok között is lehetséges!

„Mindent mindennel lehet fuzionáltatni” – a protoplasztok szintjén – de azután jönnek a problémák.

A fuzionált sejtek osztódnak, de a növény-regeneráció csak ritkán valósítható meg.

Sejtvonalként fenntarthatók, de nem regenerálhatók:  
sárgarépa-árpa, szója-repce, kukorica-borsó,

szója-*Drosophila*: mindkét sejtmag osztódik

petúnia-egér: osztódás, sejtfal és hemoglobin szintézis



# A protoplaszt fúzió során létrejövő növények rendszerint aszimmetrikus hibridek

Ha sikerül is növényt nevelni, akkor legtöbbször rendellenes morfológiájú és steril alakok jönnek létre.

Vö. a fajhibrid állatokkal, akik legtöbbször nem szaporodóképesek.

Hosszú (több éves) sejtenyésztés során valamelyik partner génjei fokozatosan eltűnnek, és csak néhány kromoszóma marad = aszimmetrikus hibrid.

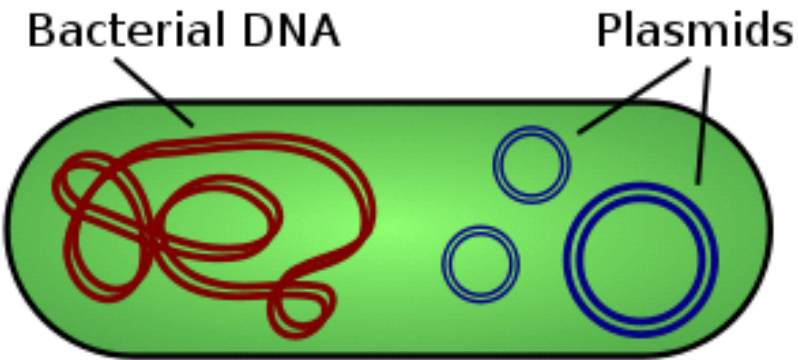
Ezekből lehet élet- és szaporodóképes növényt regenerálni, ami a domináns eredeti partnerhez képest csak egy-két új tulajdonságot hordoz.

Megjegyzés: az öszvérek sem szimmetrikus hibridek, mindig az anyára állatra hasonlítanak jobban. (Ezért tesznek különbséget ló-öszvér és szamár-öszvér között.)



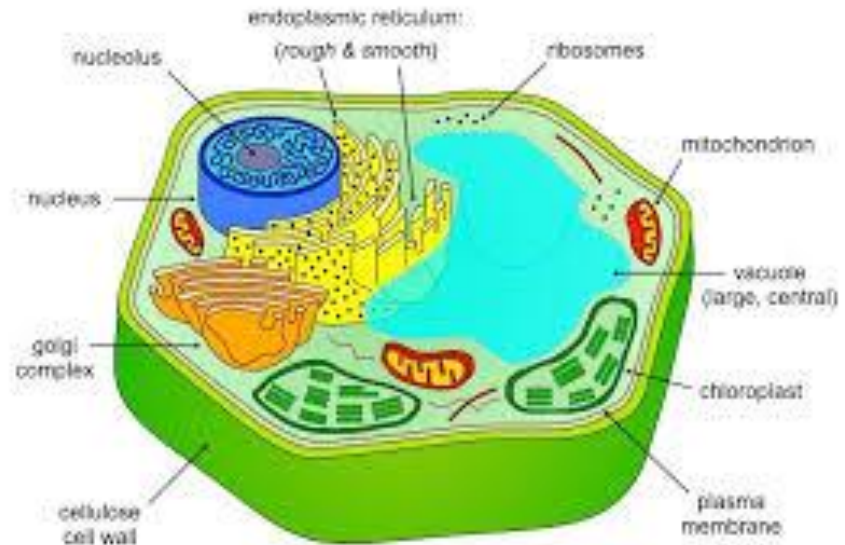
# Hol találhatóunk DNS-t egy sejtben?

\* **endoszimbionta elmélet**



## **Prokarióták:**

- **Genomi DNS**
- **Lehetnek jelen plazmidok**



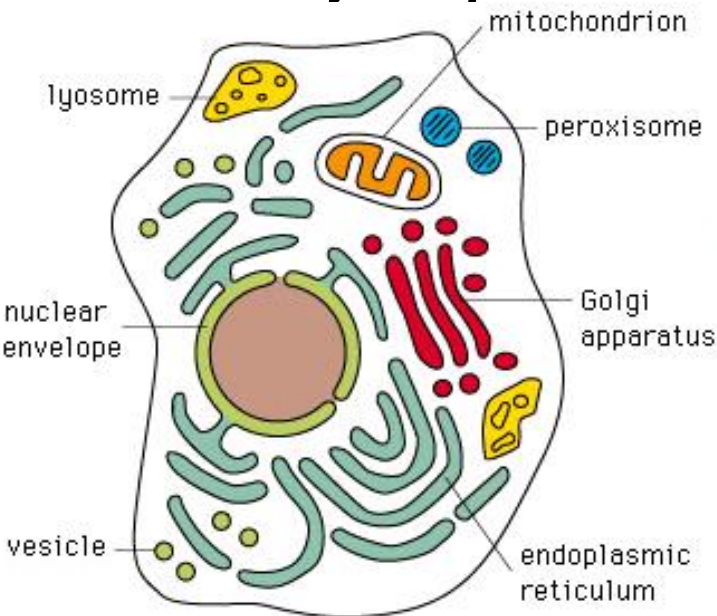
Forrás: [bioninja.com.au](http://bioninja.com.au)

## **Növényi eukarióták:**

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS\***
- **Színtest DNS\***
- **Esetenként plazmidok**

## **Nem növényi eukarióták:**

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS\***
- **Gombákban létezhetnek plazmidok**



# Citoplazmikus hibridizáció = cibridizáció

- Nem a sejtmagban lévő kromoszómák átvitelére irányul, hanem a sejtszervekben (színtest, mitokondrium) lévő DNS bevitelére.
- A hibrid sejtben az egyik félből származik a sejtmag, a másiktól kloroplasztok → új kombinációk → új tulajdonságok
- Pl. a mitokondriális DNS betegségek vizsgálatára használnak citoplazmikus hibrid sejteket ( $\rho_0$ -s sejtvonal)





# Protoplaszt fúzió - eredmények

- Sikeresen alkalmazzák vegetatívan szaporított növény fajok génfrissítésére.
- A vegetatív szaporítás (pl. a krumplit a gumójáról szaporítják, tehát lényegében az anyanövényt klónozzák) nem ad lehetőséget az ivaros szaporodás során megfigyelhető génetikai információ cserére.
- A vegetatív szaporítás során ráadásul a vírusok is átkerülnek az új növénybe. Ez történt az étkezési burgonya esetében is.
- Ezért vírus-rezisztens burgonya fajták előállítását kísérelték sikeresen meg.
- Minél közelebb áll egymáshoz genetikailag a két sejt, annál nagyobb esélye van annak, hogy a hibrid sejtből később életképes növényt nevelhetnek.

*Solanum tuberosum* (étkezési burgonya) és *Solanum brevidens* (perui, vírusálló fajta) fúziója → A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



# Protoplaszt fúzió - értékelés

Ez sem célzott, irányított változtatás. Nem lehet előre tudni, hogy milyen tulajdonságok stabilizálódnak végül. Lassú módszer, hónapokig, évekig tart. A kiszámíthatatlansága miatt hátrányos tulajdonságok is átkerülhetnek.

~40 éve művelik, klasszikus technika.

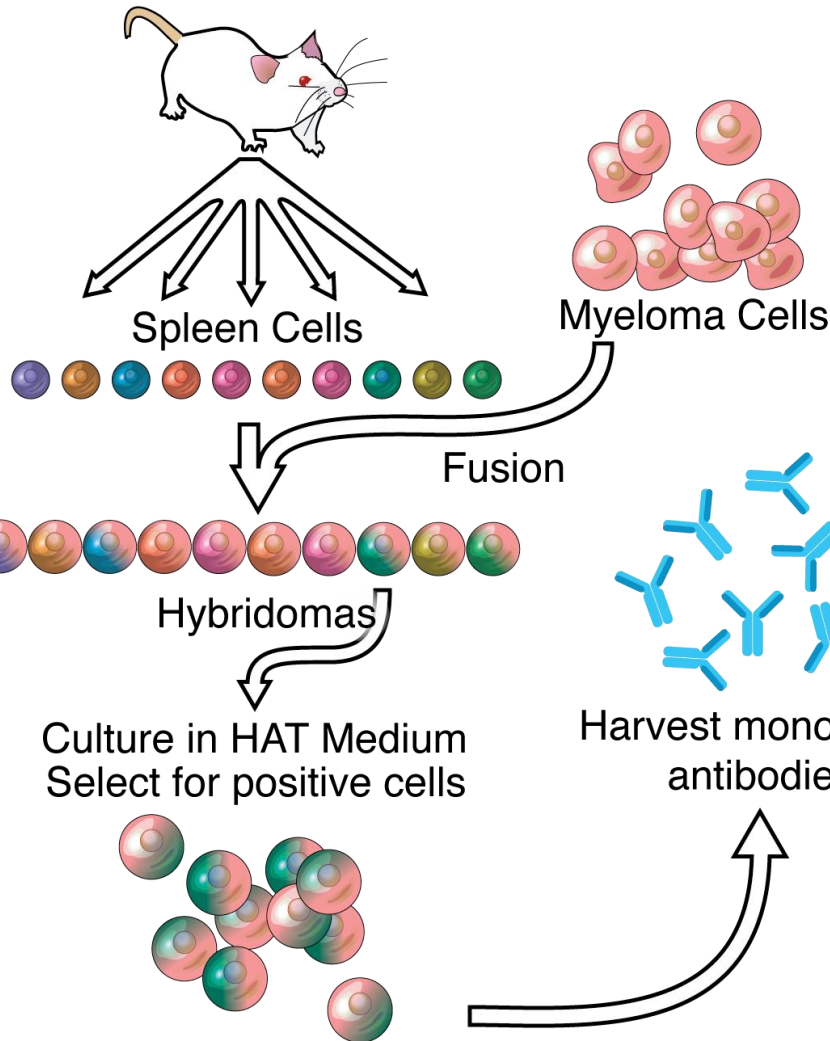
Veszélyessége kicsi, mert:

- A hibridek általában kevésbé életképesek, mint a vad törzsek – a természetbe kikerülve nem versenyképesek
- A természetben jelen lévő gének a saját környezetükkel együtt kerülnek át más sejtbe.



# Állati protoplasztok – hibridóma sejtek

Mouse challenged with antigen



- **monoklonális antitestek (mAB-ok)** előállítására használják őket.
- Ezek azonos immunsejtek klónjai által termelt ellenanyagok, amelyek azonos molekuláris célpontot ismernek fel.
- A molekuláris célpontok olyan molekulák, amelyek aktiválják az immunrendszert (sejtek vagy vírusok felszínén található ún. antigének, allergia esetén akár pollenek, autoimmun betegségek esetén a szervezet egy saját molekulája).
- Lehetséges mAB-ot előállítani elméletileg bármilyen sejt felszíni vagy sejten kívüli molekula ellen, amit egy adott szervezet (példánkban a fehér egér) immunsejtjei idegenként felismerni képesek.
- Példa: rákellenes gyógyszerként felhasznált mAB-ok