

## III/2. Protoplaszt fúzió

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

Mesterségesen hozzuk létre a sejtfal eltávolításával. Elveszti az alakját, gömbölyű citoplazma cseppé válik.

Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

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

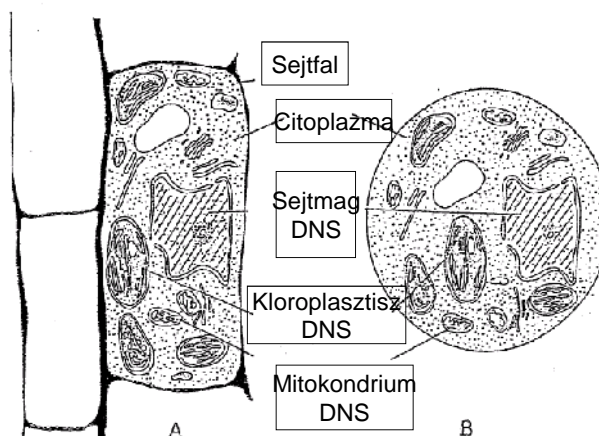


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

## Protoplasztok

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

## Protoplaszt izolálás, el állítás

### Sejtfal lebontása:

1. *A megfelelő sejt kiválasztása*  
Elvileg bármely sejtbe el állítható, de a legegyszerűbben laboratóriumban nevelt növényi szövetanyagból.
2. *Steril körülmények biztosítása:*  
Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)  
Manipuláció steril levegő térben
3. *A sejtfal leemésztése megfelelő enzimekkel.*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## Protoplaszt izolálás, el állítás

4. *Kíméletes körülmények:*  
a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipetázás, 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.



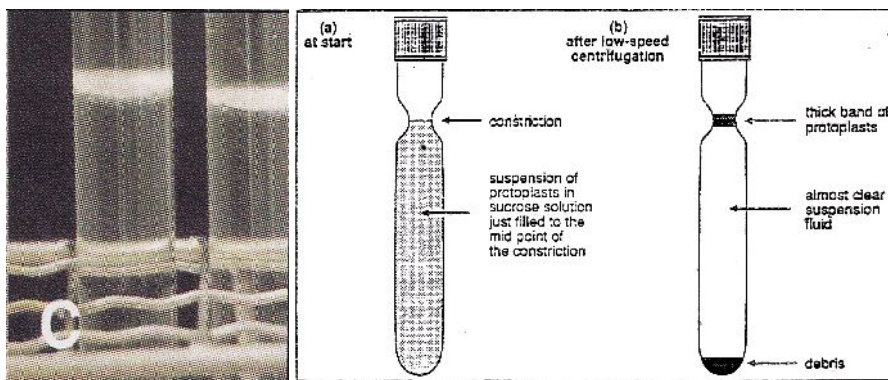
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## Protoplaszt el állítás

Centrifugálás: BABCOCK-CS BEN, „felfugálás”

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



5



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Protoplasztok tenyésztése

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

**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

6



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Protoplaszt fúzió

**Protoplaszt fúzió:** két protoplaszt beltartalmának egyesítése, fúziója. Eukarióták esetében a hibridnek két különböző sejtmagja lesz (heterokarion), és tartalmazza mindkét fél kloroplasztjait és mitokondriumait is (amelyek szintén tartalmaznak DNS-t).

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. → szelekció



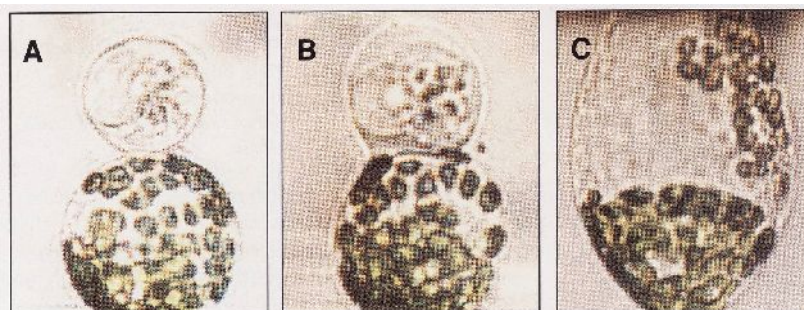
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Protoplaszt fúziós módszerek

Mikroszkóp alatt, speciális tárgylemezen, folyadékban (elektromos és/vagy vegyszeres technikák)

Burgonya PP elektrofúziója:



8



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Növények regenerálása protoplasztból

Az növényi sejtek különleges tulajdonsága a totipotencia = egyetlen sejtből regenerálható a teljes növény, ami aztán kiültethető, szaporítható. →

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## Protoplaszt tenyésztés, regenerálás

A regenerálás első lépése a sejttel 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 átváltásnál 6, majd 3 %-ra csökkentik.

A regenerálódó sejtek előbb sejtsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kalluszt** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.

Ebből aztán teljes növényt lehet regenerálni.

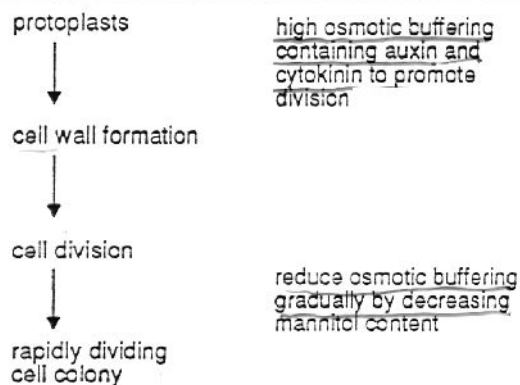


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

## Protoplasztból növényregenerálás

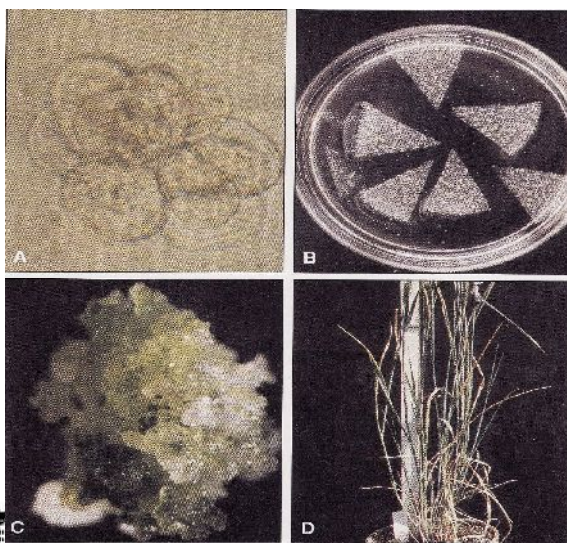
Az első protoplasztból regenerált növény a dohány volt (Takabe 1971). Lépések:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

## Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztkból



A: PP eredet többsejtes kolónia

B: Mikrokolóniák kialakulása agarba ágyazott sejtekből

C: kallasz tenyészet

D: PP eredet termékeny búzanövény

12

Élelmiszertudomány Tanszék

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## Keresztezés és protoplaszt fúzió

→ ezért előnyös keresztezés helyett protoplasztokat egyesíteni, ez megkerüli az ivaros szaporodás akadályait.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## Protoplaszt fúzió, aszimmetrikus hibridek

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

Hosszú (több éves) sejtenyésztés során valamelyik partner génei 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## Cibridizáció

= citoplazmatikus hibridizáció

Nem a sejtmagban lévő kromoszómák átvitelére irányul, hanem a sejtszervekben (kloroplaszt, mitokondrium) lévő DNS bevitelére.

A hibrid sejtben az egyik félből származik a sejtmag, a másiktól kloroplasztok → új kombinációk → új tulajdonságok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16



## Protoplaszt fúzió - eredmények

Vírus-rezisztens burgonya fajták előállítására:

*Solanum tuberosum* (étkezési burgonya) és  
*Solanum brevidens* (perui, vírusálló fajta) fúziója →

A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## Protoplaszt fúzió - értékelés

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

~40 éve működik, 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18