

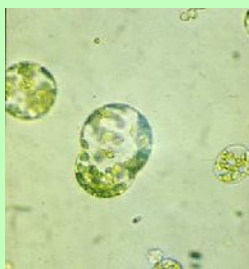
III/2. Protoplaszt fúzió

Protoplaszt: Sejtfaától megosztott, kívül l csak sejtmembránnal borított sejt.

Mesterségesen hozzuk létre a sejtfa eltávolításával. Elveszti az alakját, gömböly citoplazma cseppé válik.

Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

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



Protoplaszt izolálás, el állítás

4. Kíméletes körülmények:

a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipettázás, centrifugálás, keverés, rázás során vigyázni

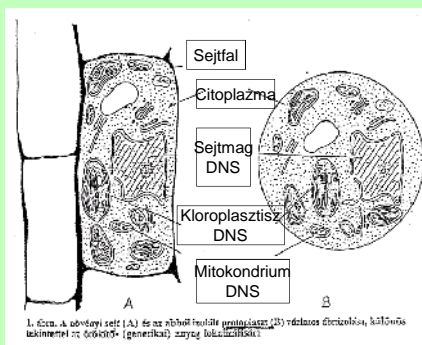
5. Ozmotikus védelem:

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

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

Protoplasztok

Mindenféle sejt l (baktérium, éleszt , növény) lehet protoplasztot csinálni, de a tipikus alkalmazása a növények genetikai manipulációja.

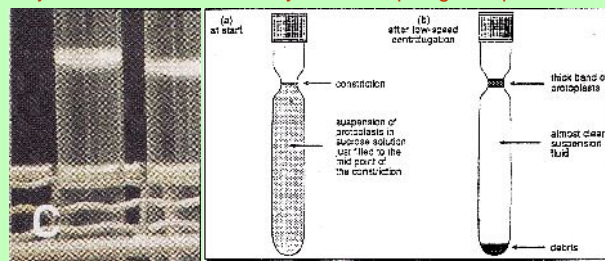


1. Kétn. A növényi sejt (A) és az abból levált protoplaszt (B) részletes ábrázolása, különös tekintettel az örökítőanyag (genetikai) anyag felállítására.

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.



Protoplaszt izolálás, el állítás

Sejtfa lebontása:

1. A megfelelő sejt kiválasztása
Elvileg bármely sejt l el állítható, de a legegyszer bb laboratóriumban nevelt növényi szövet-tenyészté l.
2. Steril körülmények biztosítása:
Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)
Manipuláció steril leveg j térben
3. A sejtfa leemésztése megfelelő enzimekkel.

Protoplasztok tenyésztése

A protoplasztot a sejtfa 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

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



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

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 sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kallusz** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.

Ebből aztán teljes növényt lehet regenerálni.



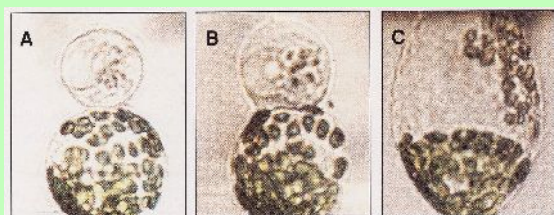
EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Protoplaszt fúziós módszerek

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

Burgonya PP elektrofúziója:



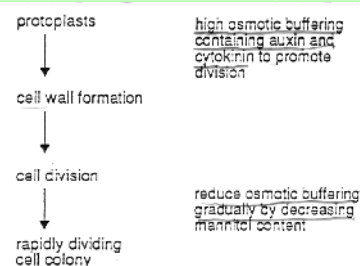
8



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Protoplasztból növényregenerálás

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



11



EME 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. →

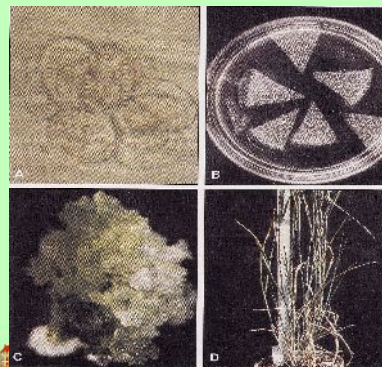
Egy megváltoztatott tulajdonságú sejtből teljes, életképes növényt fejleszthetünk, amelynek minden sejtje hordozza az új géneket. Az ivarsejtek is, azaz a változás öröklik.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztokból



A: PP eredet többsejtes kolónia

B: Mikrokolóniák kialakulása agar-rózba ágyazott sejtekből

C: kallusz tenyészet

D: PP eredet termékeny búzanövény

12



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Keresztezés és protoplaszt fúzió összehasonlítása

Keresztezés: két különböző tulajdonságú egyed génállományának egyesítése ivaros szaporítással. Régi nemesítési módszer – kulcsszerepe (volt) az új fajták elállításában

Fajon belüli fajták keresztezése: néhány tulajdonság változik

De: nem lehet mindent keresztezni mindennel. Csak rokon fajták, fajok között m ködik.

A rendszertani távolság növeli az inkompatibilitást.

A megtermékenyítés szabályozása (anatómiai és egyéb) rendszerint kizárja az idegen pollennel való beporzást, csak a fajon belül termékenyül.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

13

Cibridizáció

= citoplazmatikus hibridizáció

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

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



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

16

Keresztezés és protoplaszt fúzió

→ ezért elnyös 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.

Sejtvonalaként fenntarthatók, de nem regenerálhatók:

sárgarépa-árpa, szója-repce, kukorica-borsó,

szója-Drosophila: mindkét sejtmag osztódik

petúnia-egér: osztódás, sejtfal és hemoglobin szintézis



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

14

Protoplaszt fúzió - eredmények

Vírus-rezisztens burgonya fajták elállítása:

Solanum tuberosum (étkezési burgonya) és

Solanum brevidens (perui, vírusálló fajta) fúziója →

A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

17

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.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

15

Protoplaszt fúzió - értékelés

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

~40 éve megkezdtek, 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.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

18