

A növényi szövetek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Történeti áttekintés

- 1838 Schleiden és Schwann
A sejtelmélet kidolgozói: 1 totipotens sejtből elvileg a teljes növény (állat) regenerálható
- 1902 Szövettenyésztés lehetséges táptalajon
- 1934 Paradicsom gyökércsúcs tápoldaton nő és fenntartható (vitaminok alkalmazásával)
- 1939 Folytonos kallusz tenyésztés auxinnal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Növényi szövettenyésztés céljai

- Biológiai, biokémiai kutatás
- Unikális biokémiai utak lehetősége
- Vegetatív mikroszaporítás
- Szekunder metabolitok előállítása (gyógyszerek, pigmentek, alkaloidok, szteroidok)
- GM növények előállítása

A szövettenyésztés előnyei:

- független: éghajlattól, évszaktól, betegségtől
- termelés ellenőrizhető: pl. kábítószereknél
- olcsóbb lehet (vinkrisztin, taxol?)

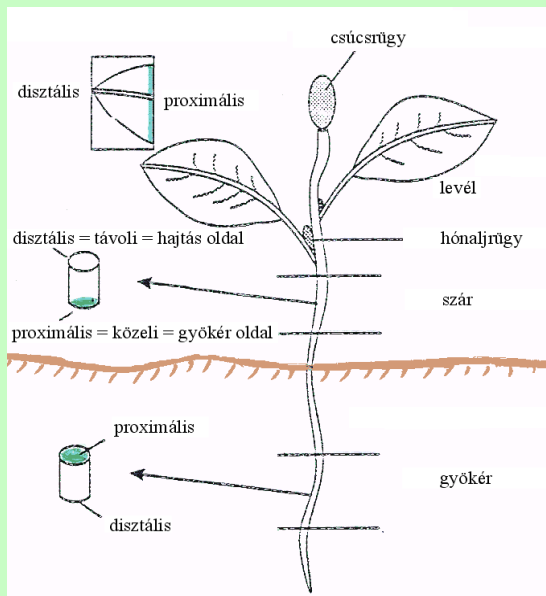


Tenyészetek fajtái

- Explantátum
- (Merisztéma)
- Hajszálgöckér tenyészet
- Kallusztenyészet
- Szuszpenziós tenyészet
- Protoplaszt tenyészet



Explantátumok



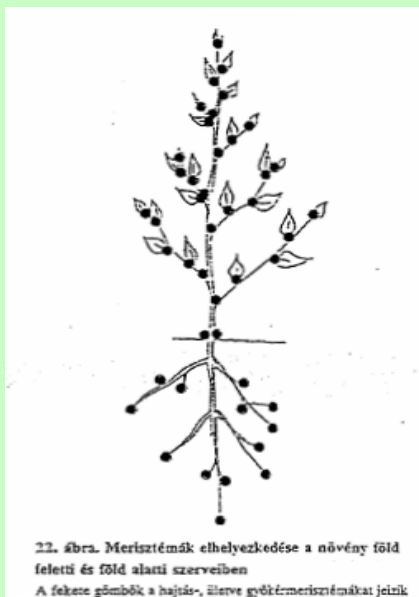
- A fiatal növény kedvezőbb, azonban ha túl kicsit vágunk annak nagy lesz a mortalitása.
- Optimális méret: ~2 mm
- Növekedési polaritást mutat
- Levél, gyökér, merisztéma



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Merisztéma



Osztódó, még differenciálatlan szövetek

Hajtáson vagy gyökéren az ábrán pontokkal jelölt helyeken található

Merisztémából a növény regenerálható

Elsősorban mikroszaporításhoz használják



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

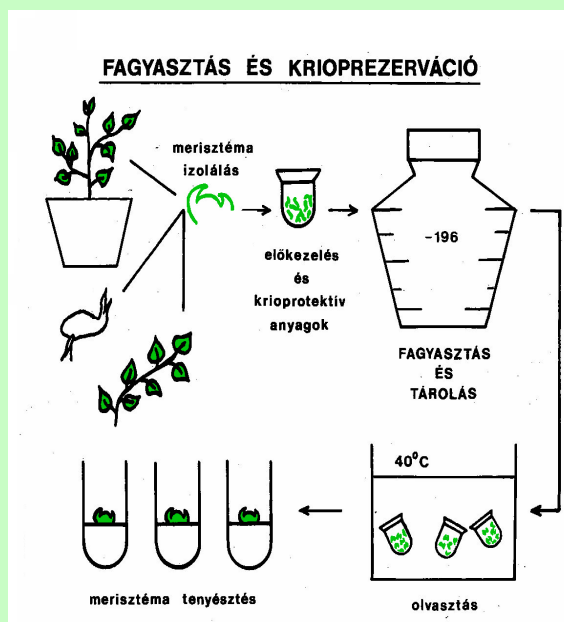
Merisztémák fagyasztva tárolása

Növény előkezelés: a merisztéma izolálás előtt a növényt 3 napig +4 °C-on tartják (2x túlélés)

Krioprotekció: glicerin, mannit, szorbit, szacharóz, DMSO (5-10%). PI: 1M DMSO + 1M glicerin + 2M szacharóz

Fagyasztás lehet:

- gyors: (egyből a cseppfolyós N₂-be)
- programozott: 1 °C/perc -35 °C-ig, ott 30 perc tartás, aztán a nitrogénbe.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Hajszálgyökér (hairy root) kultúra

Agrobacterium rhizogenes által okozott növényi betegség.

Az RI (root-inducing) plazmid beépül a növény genomjába, és differenciálódást okoz: hajszálgyökerek képződnek - ez a "Hairy Root Disease". Több mint 450 (elsősorban kétszikű) növényfaj érzékeny rá.

Hasonlít az *A. tumefaciens* Ti plazmidja által okozott betegséghez, ennél is opinokat termel a növény.

Az RI plazmiddal is géneket lehet bevinni a növénybe → a génmanipulációhoz remek vektor. Teljes növény is regenerálható a hairy root-ból.

A gyökérkultúra *in vitro* körülmények közt is jól szaporodik, nincs szükség fitohormonokra sem. Nagy mennyiségben is lehet termelni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Hajszálgyökér kultúra

Előnyei:

- Gyorsabban nő
- Nincs szükség fitohormonok adagolására
- Olyan metabolitok is termelhetők, amik kallusztenyészetben nem, csak differenciált szövetben termelődnek
- Egyszerű tápoldat szerves komponensekkel

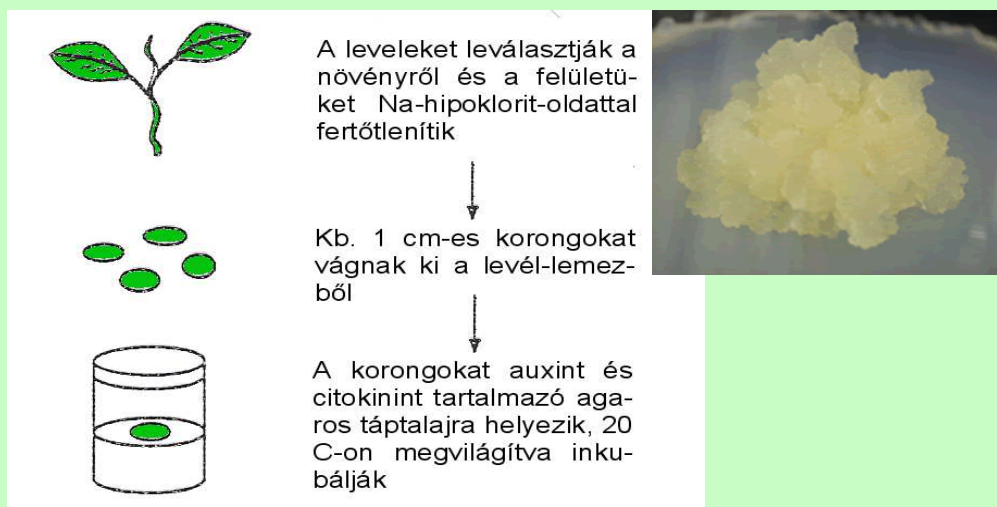


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Kallusztenyészet

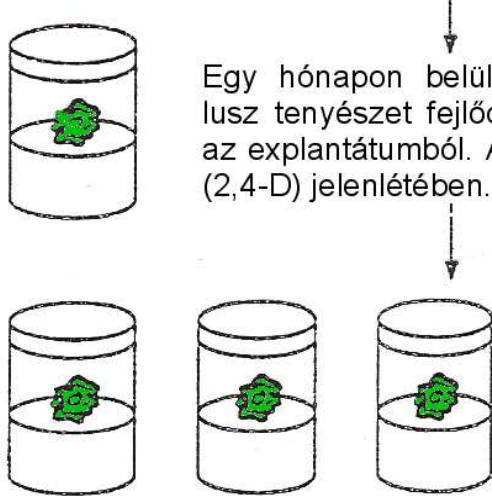
- Dedifferenciálódott (totipotens) sejtek
- MS tápközeg + auxinok, citokininek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


10

Kallusztenyészet



Egy hónapon belül kalusz tenyészet fejlődik ki az explantátumból. Auxin (2,4-D) jelenlétében.

A kalusz tenyészet 4-6 hetenkénti „átoltással” (szétvágás, friss agarra helyezés) fenntartható. ~10 fokon tartva a növekedés lelassítható.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

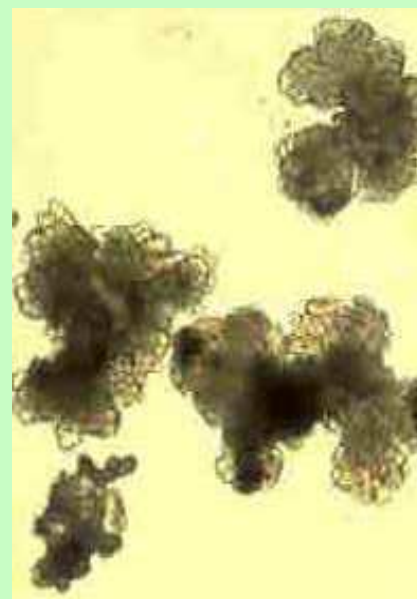
Szuszpenziós tenyészet

Rendszerint nem különálló sejtek, hanem sejtcsomók

Előállítása kallusz tenyészetből

- centrifugával 50 rpm-el (=ülepítés)
- kis mennyiségű sejtfallatózó enzim + szorbit
- Auxinos MS tápközegben
- megvilágítás 16 órán át 1000 lux-szal 25-29 °C-on

Gyorsabban nő, ezért 2 hetente szubkultúrás átoltás szükséges



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Protoplaszt tenyészet

enzimes sejtfa1 lebontás (celluláz, pektináz) és/vagy mechanikus roncsolás

nagy ozmózisnyomás (szacharóz, mannitol) beállítása

nagyon érzékeny ozmotikus és mechanikai hatásokra

osztódásra, szaporodásra képes

a sejtfa1 újraszintézise kiváltható → kallusszá alakul → teljes növény



Tenyésztési körülmények

Sterilitás: a befertőződés lehet

- A növényt megbetegítő kártevő mikrobák
- A táptalajon növő mikroorganizmusok

Steril munkavégzés: mint a mikrobiológiai laborban, sterilfülke, steril eszközök, oldatok

Hőmérséklet: 15-32 °C, befolyásolja a szaporodási sebességet

Gázösszetétel: néha 1-5 % CO₂, etilén

Páratartalom: magas, az edényeken belül ~100%

Aktív szén: gyökéreképződést elősegíti



Tenyésztési körülmények - fény

A megvilágítás erőssége: 1000 – 8000 lux

A fény színe/hullámhossza befolyásolja a növény fejlődését: a kék fény a hajtás, a vörös fény a gyökérszet fejlődését segíti elő

A világos – sötét periódusok hossza is befolyásoló tényező



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

EDÉNYEK, ESZKÖZÖK

Hasonlók a mikrobiológiai laborokban használatos eszközökhöz, de a légtér belmagassága nagy, hogy elérjen a növény.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

EDÉNYEK, ESZKÖZÖK

Magasítani lehet, ha kettőt összeillesztünk.



BME Alkalmazott

EDÉNYEK, ESZKÖZÖK

Egész növények nevelésénél tipikus:

konzerves/lekváros üveg, a fedelébe ütött lyukakban szivacs-dugóval.



Erlenmeyer lombik, sokszor nyak nélkül



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Táptalajok

Murashige és Skoog		Gamborg B5	Murashige és Skoog		Gamborg B5
Makrokomponensek (g/l):			Mikrokomponensek, mg/l		
Szacharóz	30	20	KI	0,83	0,75
NH ₄ NO ₃	1,65		H ₃ BO ₃	6,2	3
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O		0,15	MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	10
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,13	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	2
KNO ₃	1,9	2,5	Na ₂ MoO ₄	0,25	0,25
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,44	0,15	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,37	0,25	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025
Vitaminok (mg/l)			Vas, kelát formában		
mio-inozitol	100	100	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	28
nikotinsav	0,5	1	Na ₂ EDTA* 2H ₂ O	37,3	
piridoxin-HCl	0,5	1			
tiamin-HCl	0,5	10		pH = 5,7 -5,8	pH = 5,5
glicin	2				



NÖVÉNYI HORMONOK

Gibberellinek – elsősorban a lineáris növekedést csírázást, virágzást, gyümölcstermést fokozó hormonok

Auxinok – a sejtosztódást és megnyúlást serkentik, a gyökér, szár, virág, gyümölcs növekedését szabályozzák

Citokininek – az auxin hatását moderálják.

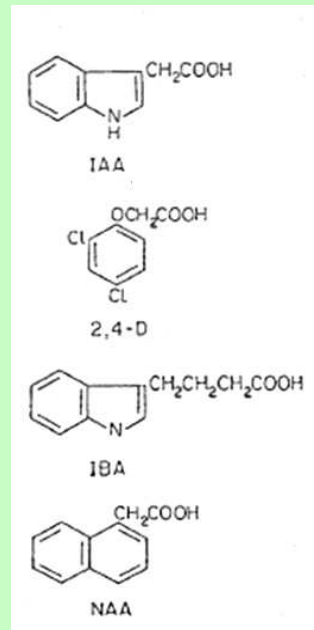
- Együtt a sejtosztódást stimulálják,
- A citokininek visszafogják az auxin által kiváltott szár-megnyúlást
- Az auxin/citokinin arány szabályozza, hogy a kalluszból szár vagy gyökér lesz

Etilén - érésszabályozó



AUXINOK

- Indol-ecetsav, IAA – ez a természetes, de bomlékony
- 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, 2,4D – szintetikus, stabil, autoklávozható
- Indol-vajsav, IBA
- Naftil-ecetsav, NAA



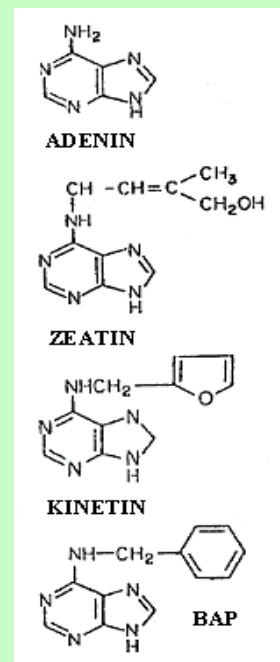
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Fontosabb citokininek

~ 25 féle adenin származék

- Zeatin, izopentenil-adenin, IPA
- Kinetin, furfural-adenin
- Benzil-amino-purin, BAP

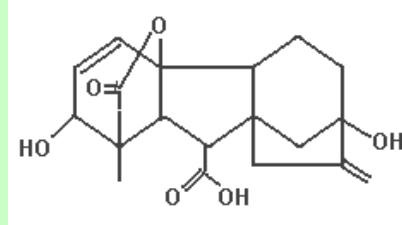


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Gibberellinek

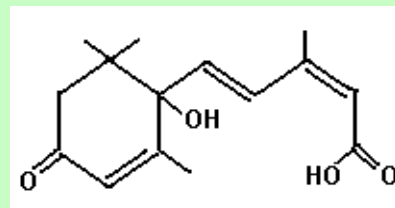
Sok hasonló szerkezetű vegyület, leggyakrabban ez: GA_3

Fermentációs termék, ld. ott



Abszcizinsav

Gátló anyag: stressz hatására leállítja a növekedést és (téli) nyugalmi állapotba állítja a növényt (abscisio – lombhullás)

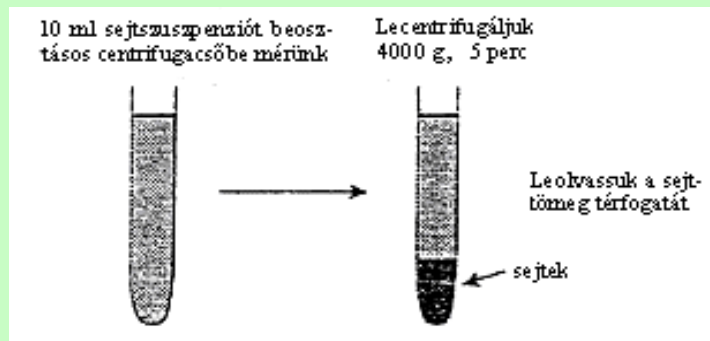


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Sejtszuszpenziók szaporodásának mérése

- A biomassa térfogata alapján



- Nedves súly méréssel
- Szárazanyag méréssel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Sejtszuszpenziók szaporodásának mérése

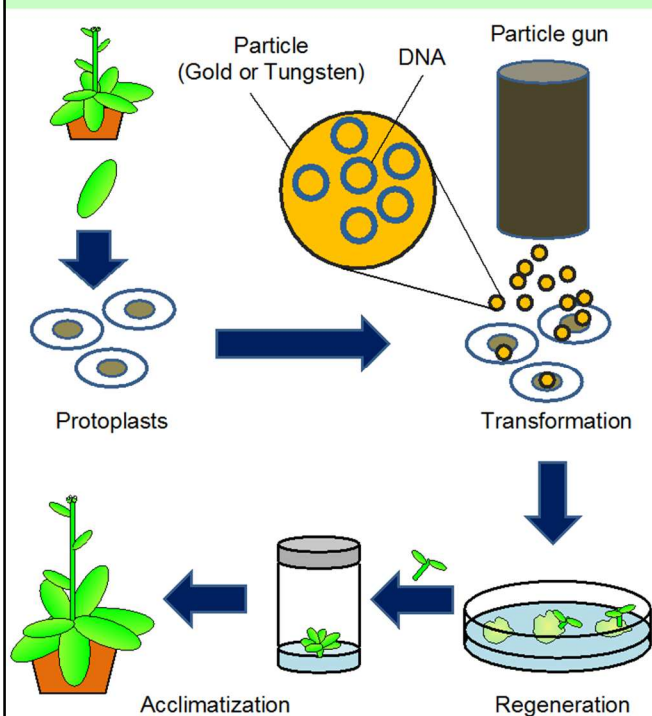
- Az egyes sejtek megszámlálása/vizsgálata csak az aggregátumok szétbontása után lehetséges (króm-trioxidos melegítés) → Bürker kamra, citofluoriméter
- Közvetett módszerek: fehérje, DNS, klorofill mérése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Növényregenerálás



- Steril fenntartás, gén-bank
- Genetikai manipuláció
- Kallusz tenyésztés
- Hajtástenyésztés
- Gyökeresítés
- Edzés, kiültetés

26

és Élelmiszertudomány Tanszék

Növényregenerálás

Két útja van:

Organogenezis: egy szerv regenerálódik (hajtás, gyökér, hajtás, gumó), ebből alakítjuk ki az egész növényt

Embriogenezis: egyetlen sejtől egy embrió jön létre (van sziklevele, gyökere) és ebből lesz a növény (egyedfejlődés előlről)

Kiindulás: bármelyik (protoplaszt, kallusz, merisztéma), de:

Protoplasztból → kallusz tenyészet (auxinokkal)

Kalluszból → inkább embriogenezis

1. kallusz → embrió (2,4-D)

2. gyökereztetés (2,4-D nélkül)

3. kiültetés

Merisztémából → inkább organogenezis

TELJES ÉRTÉKŰ NÖVÉNY REGENERÁLHATÓ



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Hajtástenyészetek

Gyökér nélküli hajtások növekedése táptalajon steril, kontrollált körülmények között

Előállítás: hajtásokból és levélhóonaljban differenciálódó rügyekből, vagy kalluszból

Körülmények:

- MS táptalaj kiegészítésekkel (auxin + kevés citokinin)
- Inkubáció: kék fény, 8000 lux, 16 h, 18-30°C
- Átoltási gyakoriság: 3-5 hét

Energiatermelés: kettős

- szacharóz a táptalajból
- fotoszintézis (ha már kifejlődött a hajtás)



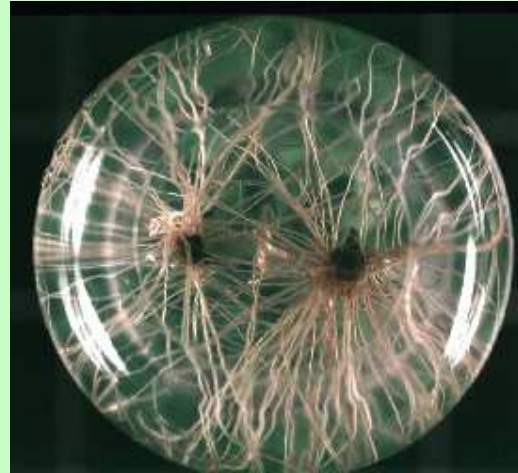
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Gyökeresítés

A felszaporított hajtásokat kiültetés előtt gyökeresíteni kell:

- A hajtáserkentők elnyomják a gyökérképződést
- Hormonelvonással (kevés auxin) viszont indukálható
- Vörös fény
- Fásszárúaknál nehéz megvalósítani



Akklimatizálás, kiültetés

A növény a zárt edényben, steril körülmények között nem adaptálódott a természetes környezethez sem fiziológiailag sem szerkezetileg.

Megvalósítás: üvegház és fóliasátor, fokozatos pára csökkentés és mikrobiális védelem

Kiszáradás-veszély, mert:

- eddig 100% nedvességtartalmú térben nőtt
- a légző nyílások nyitottak
- vékony a viaszréteg a leveleken
- gyengén fejlett gyökér – kevés vizet képes felvenni



Esettanulmány: Taxol gyártás

A tumorok gyógykezelésének alternatívái:

- sebészeti beavatkozás
- besugárzás
- kemoterápia
- monoklonális antitestek

Kemoterápia: citosztatikumok – minden gyorsan osztódó sejtet elpusztítanak = a gyorsan osztódó szövetekre hatnak elsősorban, ezért a daganatokon kívül károsítják:

- a vérképző szerveket
- ivarsejteket
- hajhagymákat
- nyálkahártyákat
- immunrendszert



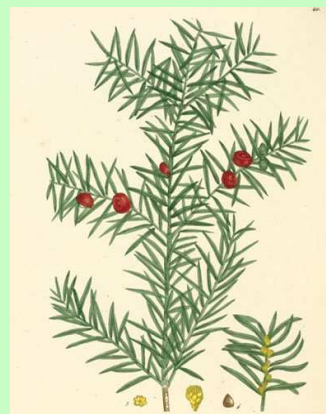
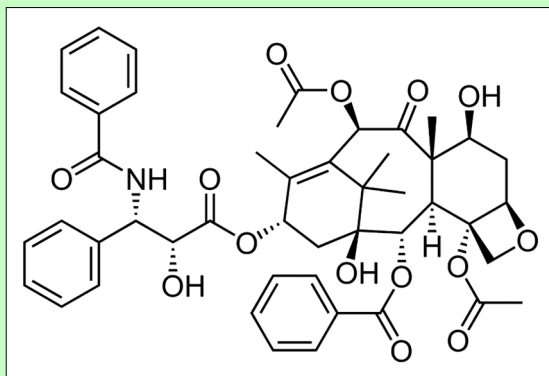
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Taxol/Paclitaxel

Az tiszafa (*Taxus*) fajok kérgéből és tűleveléből izolálható vegyület. Vízben rosszul oldódik, szerves oldószerekkel extrahálható.

Hatása: sztöchiometrikusan kapcsolódik a mikrotubulusokba beépült tubulinhoz, ezzel a depolimerizációt akadályozza.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

A taxol előállítása

Extrakció tiszafából:

A természetes források nagyon korlátozottak, mert a tiszafa igen lassan nő (több száz év), és a kérgében nagyon kis mennyiségben (50-150 mg/kg) fordul elő a taxol, a tűlevélben csak 15-50 mg/kg van. A növényi anyagban elég nagy mennyiségben előfordul a 10-dezacetil-bakkatin III (10-DAB) köztitermék is, ami félszintézissel taxollá alakítható.

Egy beteg kezeléséhez három öreg tiszafát kell feldolgozni. Nagy ültetvények Kanadában és Kínában.

Totálszintézis: megoldható, de nem gazdaságos (négy C*)

Növényi szövettenyésztés (Paclitaxel)



A taxol előállítása

Extrakció tiszafából

Félszintézis

Szövettenyésztés



A taxol előállítása szövettenyésztéssel

Taxus baccata explantátumokat screeneltek, ebből kalluszt, majd szuszpenziós tenyészetet nevelnek.

- Nagy inokulumtérfogat, ~20% szükséges,
- $t_{gmax} \sim 2,5$ nap,
- Gamborg B5 tápoldat, 3% szacharóz
- Megvilágítás nem szükséges
- 5 x 75 m³ keverős fermentor
- Enyhe keverés, levegőztetés, CO₂ befúvatás



A taxol előállítása szövettenyésztéssel

Másodlagos anyagcseretermék - kétszakaszos fermentáció:

1. sejtszaporítás:

~10 nap után tápoldatcsere vagy (tömény, kis térfogatára-mú) rátáplálás

2. termékképzés: tápoldatcserénél 10-12 nap, rátáplálással akár 20 nap

Ezalatt kb. 1 g/l termék keletkezik, ennek fele taxol, a többi más taxánvázas vegyület, pl. bakkatinok.





A taxol előállítása szövettenyésztéssel

Fitohormonok:

Auxinok és citokininek (~5:1)

Az etilén-hatást ezüst sókkal (tioszulfát) ellensúlyozzák.

Elicitorok: a szekunder metabolizmust elősegítő anyagok.

Szerveetlen: V és Co sók

Szerves: metil-jazmonát, szalicilsav

Prekurzor: a fenil-propionsav oldallánchoz fenilalanin. A lebontása gátolható szerkezetanalógokkal.



A taxol izolálása (downstream)

A termék fele a sejteken belül, fele a lében található.

Apoláris molekulák, kinyerhetők:

- Extrakcióval (áztatás metanolban ~3 órán át)
- Adszorpcióval (megkötés apoláris gyantán)
- A vizes metanolt kb. 0,1 térfogatra bepárolják.
- Extrakció erős oldószerrel – a taxol feldúsul
- Bepárlás
- Acetonban főlvéve és vízzel kicsapva a legapolárisabb anyag, a taxol csapódik ki először.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

A taxol izolálása (downstream)

