

3.2 Protoplaszt fúzió

Mi lehet ez?

A fúzió szó jelentéséről mindenkinek van fogalma. Tudjuk, hogy ez valamiféle egyesülést, egyesítést jelent. A biotechnológiában a sejtek, vagy sejtalkotók fúzióját jelenti. Maga a **protoplaszt** egy sejtfaletől megfosztott sejt. Egy olyan sejt, amit csak a citoplazma membrán határol, tehát csak a lipid kettősréteg borítja.

A protoplaszt sejtfalet mesterségesen távolítjuk el, spontán, maguktól nem jönnek létre protoplasztok. A sejtfalet enzimés kezeléssel bontjuk, emésztjük le. Ettől a sejt puhává, deformálhatóvá válik, viszkózus folyadékceppként viselkedik. Lekerekített, gömbölyű alakját a felületi feszültség alakítja ki. A sejt teljesen védtelen lesz, tehát óvni kell a mechanikai hatásoktól, hiszen nincs mechanikai szilárdsága. Nem szabad keverni, rázni, a folyadékot óvatosan kell mozgatni.

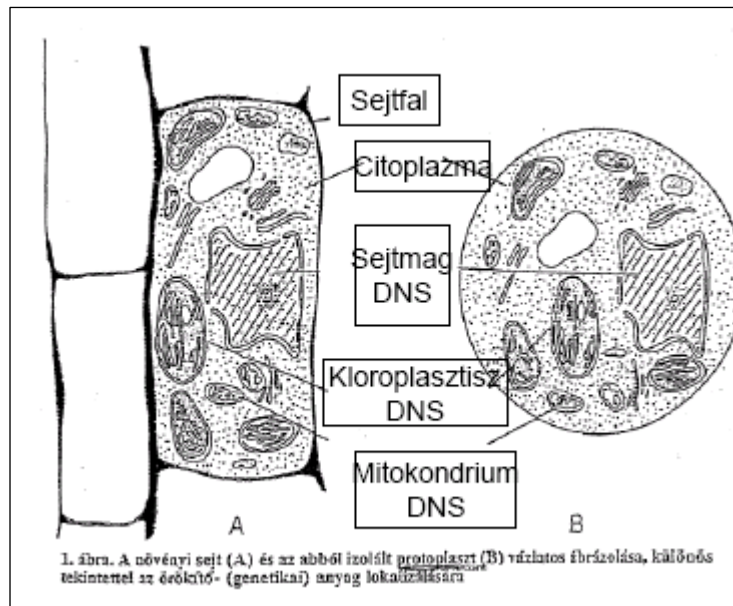
Érzékenyek ezen kívül az ozmózisnyomásra is (csak tömény cukor oldatokban tarthatók fenn).

(Kitekintés: az ozmózis jelensége azon alapul, hogy ha két különböző koncentrációjú oldat érintkezik, akkor az önként végbe menő folyamatban a koncentrációk kiegyenlítődnek. Ha az oldott anyag szét tud terjedni a folyadék teljes térfogatában, ez a folyamat a diffúzió. Ha az oldott anyagot valamilyen membrán megakadályozza a diffúzióban, akkor víz kezd el vándorolni, a töményebb oldat felhígításának irányában. Ha a membrán által határolt tér zárt, akkor a beáramló víz nyomást (= ozmózisnyomás) hoz létre.)

Mivel a sejtben belül tömény oldat van, kívülről a víz megpróbál behatolni, és felhígítani ezt az oldatot. Így az ozmózisnyomás belülről kifelé feszíti a sejtet. Amíg megvan a sejtfalet, addig az ellenáll ennek a nyomásnak, de a protoplasztoknál ez hiányzik, és a legkisebb nyomás is szétszakíthatja a sejtmembránt.

Ezért a protoplasztokat olyan tömény oldatokban tartjuk, melyek ozmotikus töménysége megegyezik a sejtben belül lévővel. Ha töményebb az oldat, akkor kiszívja a vizet a sejtől, ha hígabb az oldat, akkor a beáramló víz szétpukkasztja a protoplasztot.

Protoplaszmát gyakorlatilag mindenféle sejtől lehet készíteni, baktériumokból, élesztőkből, penészekből, növényi sejtekből is. Állati sejtekből nem is szükséges előállítani, mert alig van sejtfalet. Génmanipulációban tipikusan a növényi protoplasztokat alkalmazzák.



2. ábra: Egy növényi sejt és protoplasztja

A növényi sejt általában téglalakú és vastag erős sejtfala van. A génmanipuláció szempontjából minket a sejt genetikai anyagai érdekelnek, ezért szerepel az ábrán a mitokondrium és a zöld színtest is. (Emlékeztető: endoszimbionta elmélet, Biológia alapjai: a mitokondriumok és kloroplasztok bekebelezett sejtek, melyek leegyszerűsödtek az együttélés során, és ezek mint sejt-szervek dolgoznak a befogadó sejtben. Annyira leegyszerűsödtek, hogy már nem sejt-szerűek, de van egy kis saját génállományuk, kb két tucatnyi gén található bennük.). Ezt a DNS-t is ki lehet használni a genetikai manipuláció érdekében.

A protoplaszt izolálás, előállítás lépései:

Először kiválasztjuk a megfelelő sejtet. Elvileg bármely sejtől előállítható, de a legegyszerűbb a laboratóriumban nevelt növényi szövettenyészetből.

Fontos, hogy ezt a folyamatot steril körülmények között kell végrehajtani, tehát fontos a steril környezet biztosítása. Gondolunk itt a steril edényekre, táptalajra (mikrobák ellen antibiotikumot adnak a táptalajba). Magát a manipulációt is steril levegőjű térben hajtják végre. Ugyanis, ha a táptalaj nem steril, akkor azon a mikrobák könnyen elszaporodhatnak és tönkreteszhetik ez által az egész folyamatot.

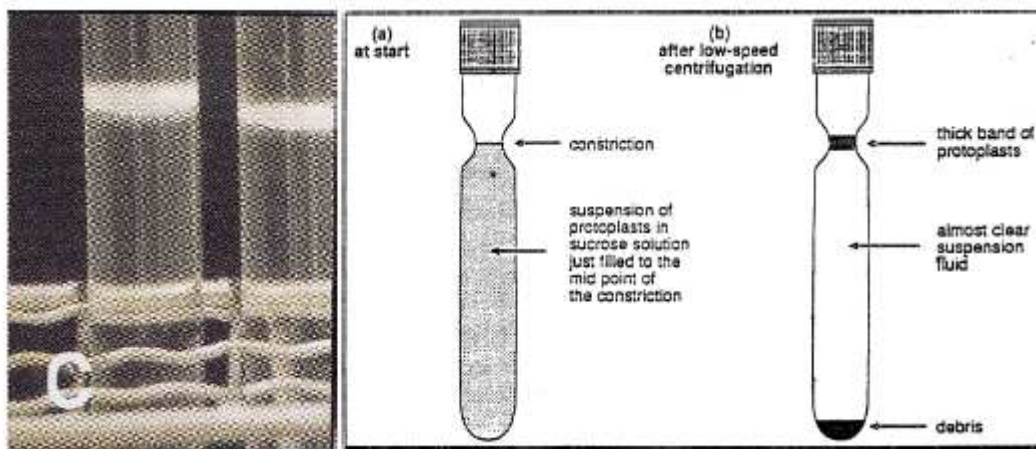
A harmadik lépés a sejtfal leemésztése a megfelelő enzimekkel. Ehhez ismerni kell az adott sejt falának kémiai összetételét, és ezt bontó enzimeket választani.

A negyedik feltétel a kíméletes körülmények biztosítása, ugyanis a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipettázás, centrifugálás, keverés során nagyon kell rájuk vigyázni, hogy ne sérüljenek.

Valamint az ötödik fontos dolog az ozmotikus védelem: Plazmolitikumok (= nem metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit) használata (10-13%)). (Kitekintés: a

xilittel a fogkrémek és rágógumik édesítő anyagaként találkozhatunk, mint ami megvédi a fogakat – mert a savképző baktériumok a xiliten nem tudnak szaporodni, savakat képezni, mint a „normál” cukrokon.) Lehetne glükózt és szaharózt is használni, de ezeket a sejtek felhasználják, ettől az oldatok ozmózisnyomása csökken. Ezért ezeket csak a sejtfal regenerálásánál alkalmazzák.

Ha sikerült leemészteni a sejtfalat, akkor valahogyan el kell választani a sejteket. A protoplasztok szerencsére eléggé kis sűrűségűek, a sűrűségük kisebb, mint a vízé, úgyhogy a centrifugálás során a növényi protoplasztok nem leülepednek, hanem felülednek, felszállnak a folyadék felszínére.



3. ábra: Centrifugálás: BABCOCK-CSŐBEN „felfugálás”

Az ábrán egy speciális kémcső látható, a folyadék tetején összegyűlt fehér rétegben vannak a protoplasztok. Használunk speciális, nyakas centrifugáló csöveket (ún. Babcock csövek), ezek szűkített nyakánál jobban összegyűlnek a protoplasztok.

A protoplasztok tenyésztése

A protoplasztoknak nincsen sejtfaluk, de ha vigyázunk rájuk, akkor képesek ugyanúgy működni, mint az ép sejtek. Tehát anyagcserét folytatnak, növekednek, sőt osztódni is képesek. Protoplaszt csomók jönnek létre belőlük. A tápoldatban adunk az ozmózis nyomás fenntartása érdekében nem bontható cukrokat és adunk nekik egy kis bontható cukrot is - tápanyagként. Fontosak még az ásványi sók, (N, P, K - a mezőgazdaságban ezeket műtrágya formájában biztosítják a növényeknek, a laborokban ásványi sókat használnak.)

Növényi hormonokat is adnak a tápoldatba. Az állati szervezetekhez hasonlóan növényeknek is vannak szabályozó anyagaik, hormonjaik, és ezek bizonyos koncentrációját biztosítani kell.

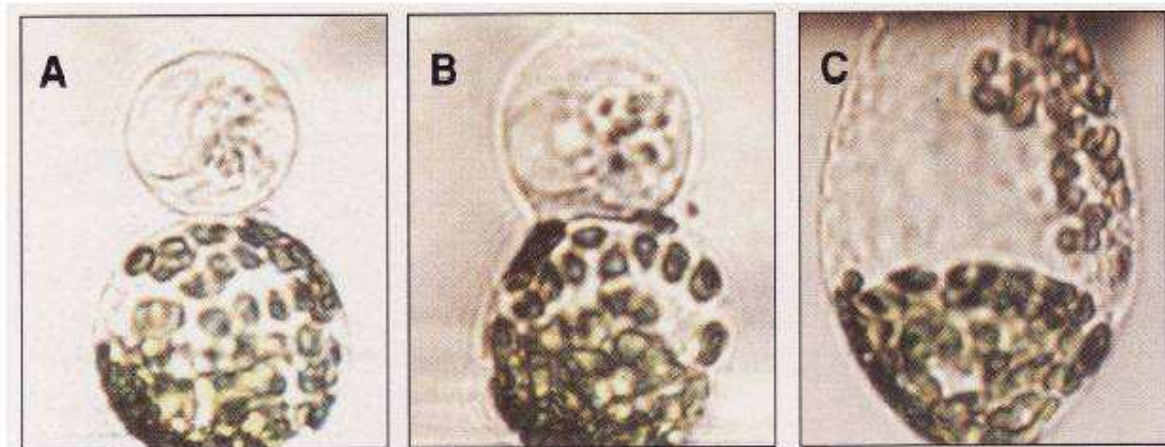
A protoplasztok előállítását speciális tárgylemezen, mikroszkóp alatt, néhány cseppnyi folyadékban szokták végezni. A mikroszkóppal meg lehet figyelni, hogy mi történik a sejtekkel, és hogy mikor milyen stádiumban vannak.

A protoplaszt fúzió

Általában nem egy egyed két sejtjét szokták fúzionáltatni, egyesíteni. Mivel a cél egy faj(ta) genetikai megváltoztatása, így két különböző faj(tá)hoz tartozó protoplasztot egyesítenek. A két protoplaszt beltartalmát egyesítjük, tehát a két különálló sejtet összegegyrjük. Ezt követően lesz egy kétszer akkora protoplazma csepp, amiben két sejtmag van, méghozzá két különböző mag. Erre a szakkifejezés a **heterokarion**. A hetero azt jelenti, hogy különböző, a karion az a sejtmag. Tehát különböző sejtmagú élőlényről beszélünk. De az egyéb DNS hordozó elemek is összekeverednek.

A protoplaszt fúzió után jön a bizonytalanság, mert szaporítjuk ezeket a sejteket és az osztódás során egy nehezen irányítható folyamat zajlik. A két sejtmag nehezen fér meg egymás mellett egy sejtben. A sorozatos osztódás során általában a géneknek, a kromoszómáknak egy része eltűnik a rendszerből és valamelyik szülő fél irányába fog elmozdulni a genetikai állomány. Tehát a legvégén valamelyik szülő félre fog hasonlítani és csak néhány gén, vagy tulajdonság marad meg a másiktól állandóra, öröklődően.

A bizonytalansága a rendszernek az, hogy nagyon nem tudjuk, hogy mi történik az osztódás során. Ez sem egy előre meghatározott módszer, mert a kombinációk véletlenszerűen alakulnak. És nem tudjuk előre megmondani, hogy mi marad és mi nem.



4. ábra: A protoplaszt fúzió

Az ábrán elektromos hatásra bekövetkezett protoplaszt fúzió fázisai láthatók, de vannak vegyszeres (pl. poli-etilén-glikolos) egyesítési technikák is. Fent két burgonya-növényből származó protoplaszt fúziója látható.

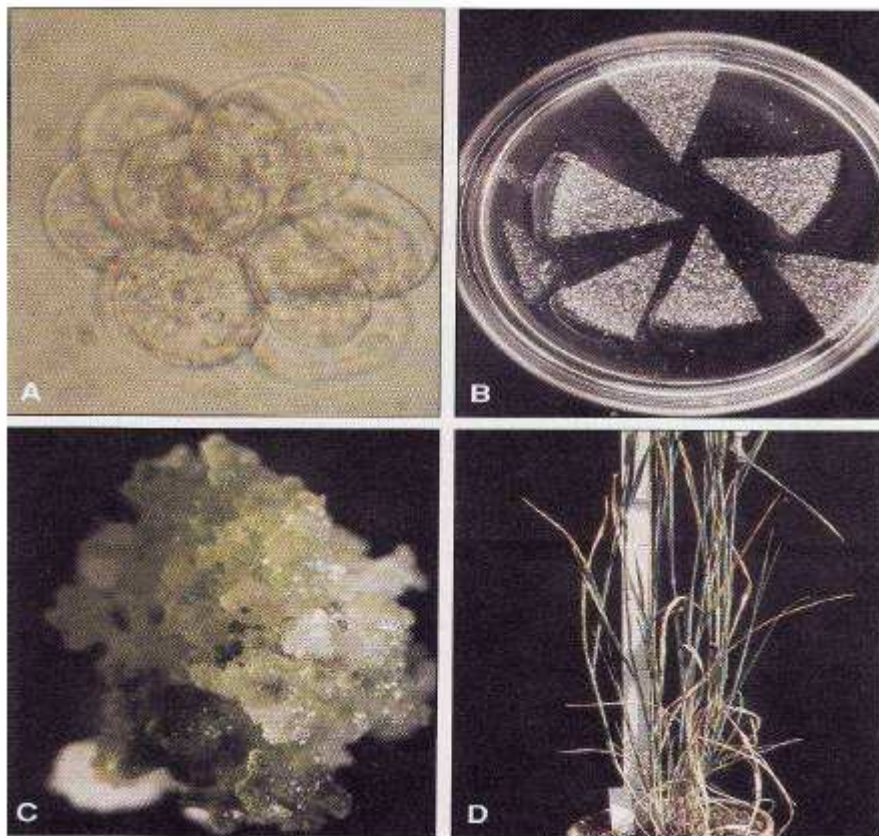
A növények totipotensek, ami azt jelenti, hogy egyetlen egy sejtből vissza lehet nevelni az egész élőlényt. Ezt az állatokkal nem lehet megcsinálni. A növényeknél meg lehet oldani, hogy egyetlen egy sejtből, annak genetikai állományának megtartásával, soklépéses technikával fel lehet nevelni egy teljes növényt, amely később ivaros szaporodásra is képes, tehát virágzik, termést hoz, utódai lehetnek. A növényvilágban ez egy óriási előny.

Az embernél és az állatoknál az egyed fejlődése elején magzati korban nagyon sok gén a működése után végérvényesen kikapcsolódik. Tehát mire megszületünk, génállományunk egy jelentős része végérvényesen kikapcsol. Például magzati korunkban van olyan periódus, amikor kopoltyúink vannak, ez később végérvényesen eltűnik.

Ha egy sejtől visszanevelhető az egész növény, akkor annak minden egyes sejtje ugyanazt a genetikai állományt hordozza. Ennek a növénynek az ivarsejtjei is tartalmazzák a kromoszóma szerelvényét, tehát a változás az öröklődő lesz.

A regenerációs folyamat első lépése a sejtfal reszintézise. A falszintézis a protoplaszt létrejöttének pillanatától megindul, ha nem akadályozzuk meg valamivel. Ezt a természetes folyamatot meg lehet gyorsítani, egyrészt hormonálisan, másrészt a közeg ozmózis nyomásának fokozatos csökkentésével. (Pl. a 9 %-nyi mannitot a hetenkénti átoltsátnál 6, majd 3 %-ra csökkentik.)

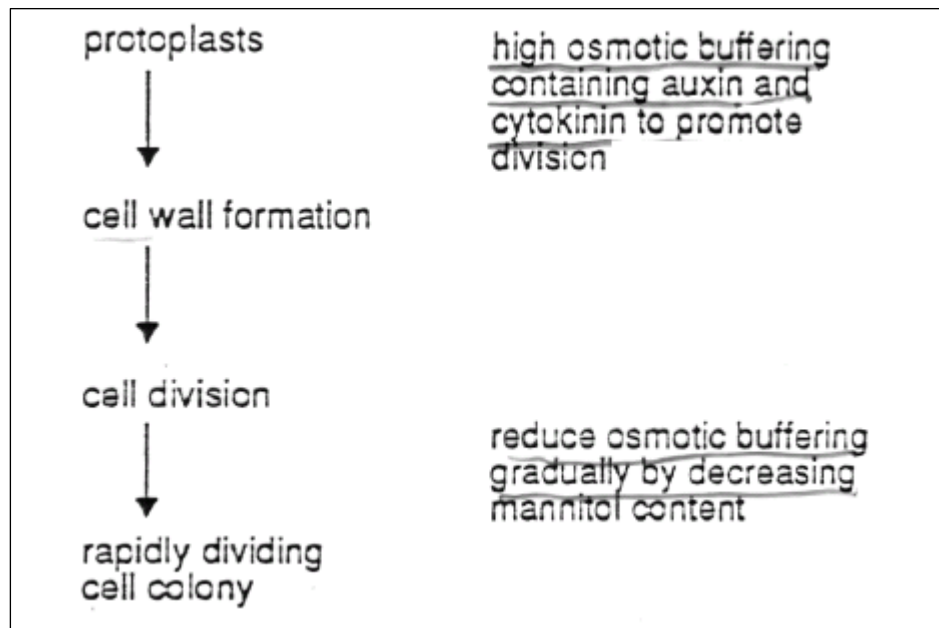
Több hét szükséges ahhoz, hogy a sejtfal visszaépüljön. A regenerálódó sejtek előbb sejtsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészetet), majd kalluszt (= nem differenciálódott növényi sejtek együttesét). Ebből lehet aztán teljes növényt regenerálni.



5. ábra: Búzanövény felnevelése protoplasztból

Az 5. ábrán az A fotó is egy sejtsomót ábrázol. Majd ezeket a sejt csomókat táptalajra tesszük, Petri-csészékbe. A B ábrán a kis fehér pöttyök, azok növényi sejtsomók, telepek, melyek egy mikroszkópikus sejtsomóból fejlődtek ki. Ez a telep, ha sokáig neveljük, akkor egy furcsa tenyészetet alkot, ezt hívják kallusznak, kallusz tenyészetnek. A kallusz tenyészet

„dedifferenciálódott” növényi szövet, azaz nem ismerhető fel, hogy levél, gyökér vagy szállító szövet. Ebből a kalluszból lehet a megfelelő technikával életképes növényt nevelni.



6. ábra: A protoplaszt regenerálás lépései

Az első protoplasztból regenerált növény a dohány volt, japán kutatóknak sikerült először, 1971-ben.

A protoplaszt fúzió és a keresztezés, mint növénynevelési technika összevetése. Mind a kettőnél arról van szó, hogy két valamennyire különböző növényi egyednek a tulajdonságait próbáljuk meg összehozni. A kereszteződés az egy ivaros szaporodás. Egy apai és egy anyai ivarsejt egyesítésével hozzuk létre a sejtet. Ez egy régi nevelési módszer, melynek kulcsszerepe volt az új fajták megjelenésében. A protoplaszt fúzióval pedig két sejtmagú sejtek jönnek létre.

A kereszteződés csak bizonyos rendszertanilag közelálló fajták, fajok között működik. A természet ügyel arra, hogy idegen fajjal történő beporzás ne történjen meg (növényanatómiai trükkök és időzítések). Tehát a kereszteződésnek meg vannak a maga korlátai. De ha távolabbi fajok keresztezése létre is jön nem biztos, hogy az utódok termékenyek lesznek. Pl. a ló és szamár esetében az öszvér már nem termékeny.

A protoplaszt fúzióval nagyon különböző egyedek sejtjeit is lehet egyesíteni. A protoplasztfúzió, a sejt egyesítés szintjén nagyon sok mindent meg lehet csinálni.

A petúnia, mint virág-, és az egér, mint állatsejtet is lehet egyesíteni. A genetikai szempontból távoli egyedek egyesítése után jön az a probléma, hogy ezekből a sejtekből, nagyon nehéz növényt regenerálni. Egyéb példák:

Sárgarépa-árpa. (ez egy kétszikű és egy egyszikű növény egyesítése).

Szója-repce (mind a kettő kétszikű) és a kukorica borsó párosítása sem hoz ki használható eredményt. Gyakorlati jelentőségük nincs.

Ha sikerül is felnevelni a növényt nem biztos, hogy az normális lesz. Gyakran rendellenes morfológiájú, steril lesz. Általában hosszú, több éves sejtenyésztés után, az az eredmény, hogy valamelyik szülő faj irányába fog egyszerűsödni a genetikai állomány, a másiktól csak néhány kromoszóma marad. Aszimmetrikus hibrid keletkezik. Ezekből lehet életképes, szaporodó növényt regenerálni, ami a domináns eredeti partnerhez képest csak egy-két új tulajdonságot hordoz.

Cibridizáció

A cibridizáció a citoplazmikus hibridizáció rövidített elnevezése. A protoplaszt fúzió tipikusan a citoplazmák egyesítését jelenti illetve minden, ami a citoplazmában van, az átkerül a közös utódsejtbe. A citoplazmában vannak ezek a bizonyos sejtszervek is. A mitokondrium és a kloroplaszt, és mivel a mitokondriumban és a kloroplasztban is van néhány genetikai állomány, ezek a plusz genetikai állományok is összekeverednek a növényekben. Tehát ez egy genetikai kombinációt tesz lehetővé, hogy a sejtmag az egyik féltől származik a kloroplasztok. Ezzel új tulajdonságokat és új kombinációkat lehet létrehozni.

Olyan növényeknél értek el eredményt, melyeket a mezőgazdaságban nem ivaroson, hanem vegetatív módon szaporítanak. Amit nem magról vetnek pl. burgonya, melyet vetőgumóval szaporítanak, az eper, málna, szőlő, stb. Ezen növényeknél lehet hatékonyabban alkalmazni a protoplaszt fúziót.

Példa: Vírusálló burgonya előállítás: étkezési burgonya protoplasztját egyesítették egy perui vírusálló fajtával. A vírusállóságot sikerült átvinni az utódokra, a minőséget és a terméshozamot azután szelekcióval fokozták. A burgonyánál a vírusmentesség azért érdekes, mert a vegetatív szaporításnál a vírust az utód is öröklő. Pl. elvetünk egy vírusos krumpli gumót akkor az utód is vírusos lesz, míg ha egy búzamatot vetünk el, az nem tartalmazza a vírust. A burgonyánál már 27 fajta vírust azonosítottak, a vegetatív szaporítás „összegyűjti”, a vírusokat.

Protoplasztfúzió értékelés

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

Már 40 éve működik a klasszikus technika. (1971 - japánok, első növényregenerálás)

Veszélyessége szintén kicsi, mert:

A hibridek kevésbé életképesek, mint a vad törzsek, és a természetbe kikerülve kevésbé versenyképesek.

A természetben jelenlévő gének a saját környezetükkel együtt kerülnek át más sejtbe.