

## A növényi szövetek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

## Történeti áttekintés

- 1838 Schleiden és Schwann  
A sejtelmélet kidolgozó: 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. kábítószerknél
- olcsóbb lehet (vinkrisztin, taxol?)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## Tenyészetek fajtái

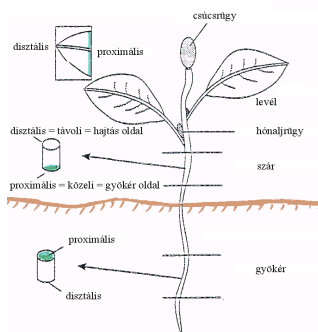
- Explantátum
- (Merisztéma)
- Hajszálgökér tenyészet
- Kallusztenyészet
- Szuszpenziós tenyészet
- Protoplaszt tenyészet



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## 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

22. ábra. Merisztémák elhelyezkedése a növény föld feletti és föld alatti szerveiben  
A fekete pontokból a hajtás, illetve gyökérmérszékletai jönnék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

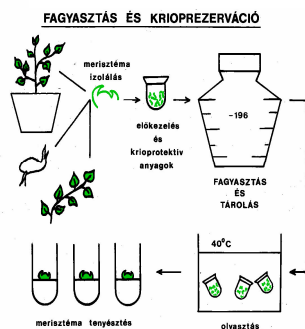
## Merisztémák fagyasztva tárolása

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

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

Fagyasztás lehet:

- gyors: (egyből a cseppfolyós N<sub>2</sub>-be)
- programozott: 1 °C/perc -35 °C-ig, ott 30 perc tartás, aztán a nitrogénbe.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Hajszálgökér (hairy root) kultúra

*Agrobacterium rhizogenes* által okozott növényi betegség.

Az RI (root-inducing) plazmid beépül a növény genomjába, és differenciálódást okoz: hajszálgökörek 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

## Hajszálgökér kultúra

Előnyei:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## Kallasztenyésztés

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



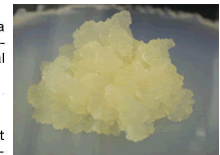
A leveleket leválasztják a növényről és a felületüket Na-hipoklorit-oidattal fertőtlenítik



Kb. 1 cm-es korongokat vágunk ki a levél-lemez-ből



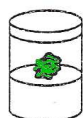
A korongokat auxint és citokint tartalmazó agaros tápoldatra helyezik, 20 °C-on megvilágítva inkubálják



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

## Kallasztenyésztés



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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

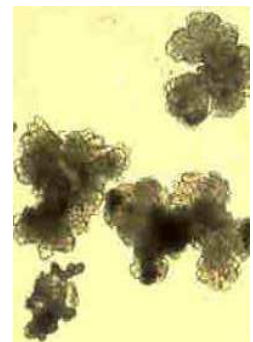
## Szuszpenziós tenyésztés

Rendszerint nem különálló sejtek, hanem sejtsomók

Előállítás kallasz tenyésztésből

- centrifugával 50 rpm-el (=üleptítés)
- kis mennyiségű sejtfalbontó 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

12

## Protoplaszt tenyészet

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

nagy ozmózisnyomás (szacharóz, mannitol) beállítása

nagyon érzékeny ozmotikus és mechanikai hatásokra

osztódásra, szaporodásra képes a sejtfal újraszintézise kiváltható → kalluszá alakul → teljes növény



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## 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 % CO<sub>2</sub>, etilén

Páratartalom: magas, az edényeken belül ~100%

Aktív szén: gyökérvégződést elősegíti



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## 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 gyökérzet fejlődését segíti elő

A világos – sötét periódusok hossza is befolyásoló tényező

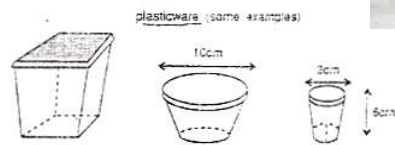


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 fedelére ütött lyukakban szivacsdugóval.



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 <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		0,15	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	10		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,13	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	2		
KNO <sub>3</sub>	1,9	2,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25	0,25		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,44	0,15	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,37	0,25	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025		
Vitaminok (mg/l)			Vas, kelát formában				
mio-inozitol	100	100	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	28		
nikotinsav	0,5	1	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,3			
piridoxin-HCl	0,5	1					
tiamin-HCl	0,5	10				pH = 5,7 - 5,8	pH = 5,5
glicin	2						



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## NÖVÉNYI HORMONOK

Giberellinek – elsősorban a lineáris növekedést csírázást, virágzást, gyümölcsstermetést fokozó hormonok

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

Citokininek – az auxin hatását moderálják.

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

Etilén - érésszabályozó

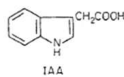


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

## AUXINOK

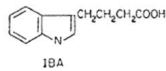
• Indol-ecetsav, IAA – ez a természetes, de bomlékony



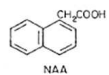
• 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, 2,4D – szintetikus, stabil, autoklávozható



• Indol-vajsav, IBA



• Naftil-ecetsav, NAA

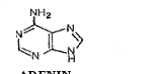


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

## Fontosabb citokininek

~ 25 féle adenin származék



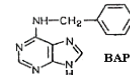
• Zeatin, izopentenil-adenin, IPA



• Kinetin, furfural-adenin



• Benzil-amino-purin, BAP



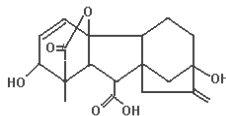
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

## Giberellinek

Sok hasonló szerkezetű vegyület, leggyakrabban ez: GA<sub>3</sub>

Fermentációs termék, ld. ott



## Sejtszuszpenziók szaporodásának mérése

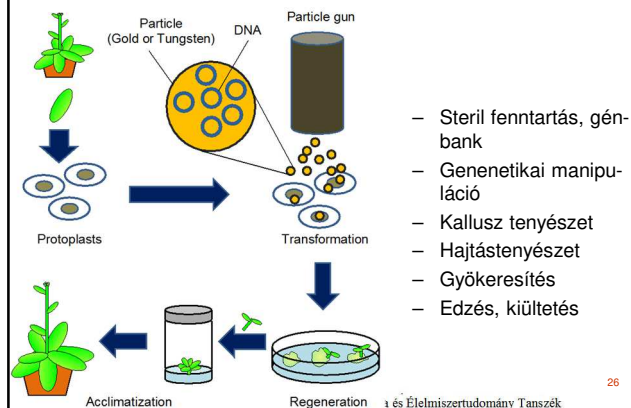
- Az egyes sejtek megszámlálása/vizsgálata csak az aggregátumok szétbontása után lehetséges (króm-trioxidos melegítés) → Bürker kamra, citofluoriméter
- Közvetett módszerek: fehérje, DNS, klorofill mérése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

## Növényregenerálás



- Steril fenntartás, gén-bank
- Genetikai manipuláció
- Kallusz tenyésztet
- Hajtástenyésztet
- Gyökeresítés
- Edzés, kiültetés

Acclimatization Regeneration és Élelmiszertudomány Tanszék

26

## 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 tenyésztet (auxinokkal)
- Kalluszból → inkább embriogenezis
1. kallusz → embrió (2,4-D)
  2. gyökeresítés (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 levélhónaliban 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 hajtásserkentők elnyomják a gyökérképződést
- Hormonelvonással (keves auxin) viszont indukálható
- Vörös fény
- Fásszárúaknál nehéz megvalósítani



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30



## 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



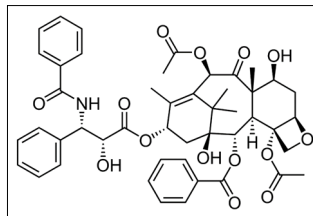
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## Taxol/Paclitaxel

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

Hatása: sztöchiometrikan 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 tűlevelében csak 15-50 mg/kg van. A növényi anyagban elég nagy mennyiségben előfordul a 10-dezacetil-bakkatin III (10-DAB) közti termék is, ami félszintézissel taxollá alakítható.

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

Totalszintézis: megoldható, de nem gazdaságos (négy C\*)

Növényi szövettenyésztés (Paclitaxel)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## A taxol előállítása

Extrakció tiszafából

Félszintézis

Szövettenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

## A taxol előállítása szövettenyésztéssel

*Taxus baccata* explantátumokat screeneltek, ebből kullaszt, majd szuszpenziós tenyésztéssel nevelnek.

- Nagy inokulumtér fogat, ~20% szükséges,
- $t_{gmax}$  ~2,5 nap,
- Gamborg B5 tápoldat, 3% szacharóz
- Megvilágítás nem szükséges
- 5 x 75 m<sup>3</sup> keverős fermentor
- Enyhe keverés, levegőztetés, CO<sub>2</sub> befúvatás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

## A taxol előállítása szövettenyésztéssel

Másodlagos anyagcseretermék - kétszakaszos fermentáció:

1. sejt szaporítás:

~10 nap után tápoldatcsere vagy (tömény, kis térfogatárámú) 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36



### A taxol előállítása szövettenyésztéssel

Fitohormonok:

Auxinok és citokininek (~5:1)

Az etilén-hatást ezüst sókkal (tioszulfát) ellensúlyozzák.

Elicitorok: a szekunder metabolizmust elősegítő anyagok.

Szervetlen: V és Co sók

Szerves: metil-jazmonát, szalicilsav

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

### A taxol izolálása (downstream)

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

Apoláris molekulák, kinyerhetők:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

### A taxol izolálása (downstream)

