

## 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 előállítás (gyógyszerek, pigmentek, alkaloidok, szteroidok)
- GM növények előállítása

A szövettenyésztés előnyei:

- független: éghajlattól, évszaktól, betegségtől
- termelés ellenőrizhető: pl. kábítószereknél
- 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

---

---

---

---

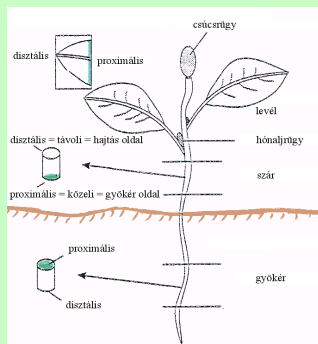
---

---

---

---

## 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

---

---

---

---

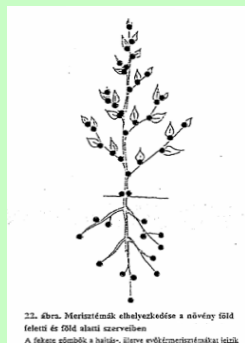
---

---

---

---

## Merisztéma



- Osztódó, még differenciálatlan szövetek
- Hajtáson vagy gyökéren az ábrán pontokkal jelölt helyeken található
- Merisztémából a növény regenerálható
- Elsősorban mikroszaporításhoz használják



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

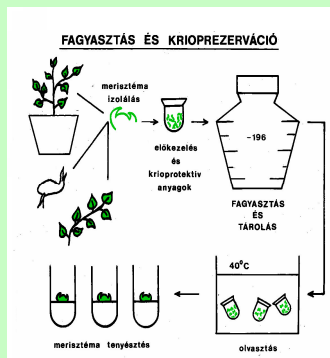
## Merisztémák fagyasztva tárolása

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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Hajszálgöyökér (hairy root) kultúra

*Agrobacterium rhizogenes* által okozott növényi betegség.

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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Hajszálgöyökér kultúra

Előnyei:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kallusztenyészet

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



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

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

A korongokat auxint és citokinint tartalmazó agaros táptalajra helyezik, 20 C-on megvilágítva inkubálják



10

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kallusztenyészet



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

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



11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Szuszpenziós tenyészet

Rendszerint nem különálló sejtek, hanem sejtcsomók

Előállítás kallusz tenyészetből

- > centrifugával 50 rpm-el (=ülepítés)
- > 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



12

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 újrászintézise kiváltható → kallusszá 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: gyökérképződést 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

---

---

---

---

---

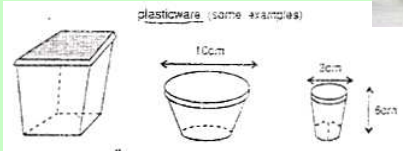
---

---

---

## 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 fedelébe ütött lyukakban szivacs-  
dugóval.



Erlenmeyer lombik, sokszor nyak nélkül



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

---

---

---

---

---

---

---

---



### Fontosabb citokininek

- ~ 25 féle adenin származék
- Zeatin, izopentenil-adenin, IPA
- Kinetin, furfuril-adenin
- Benzil-amino-purin, BAP

Nc1ncnc2n(cnc12)N  
**ADENIN**

Cc1c(Cc2c(C)C=C2)nc3ncn13  
**ZEATIN**

Nc1ncnc2n(cnc12)C3=CC=CC=C3  
**KINETIN**

Nc1ncnc2n(cnc12)C3=CC=CC=C3  
**BAP**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

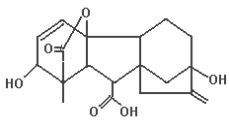
---

---

---

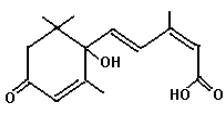
### Gibberellinek

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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Sejtszuszpenziók szaporodásának mérése

- A biomassa térfogata alapján

10 ml sejtszuszpenziót beosztásos centrifugacsőbe mérünk



Le: centrifugáljuk 4000 g, 5 perc



Leolvassuk a sejttömeg térfogatát

← sejtek

- Nedves súly méréssel
- Szárazanyag méréssel

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



## 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




---

---

---

---

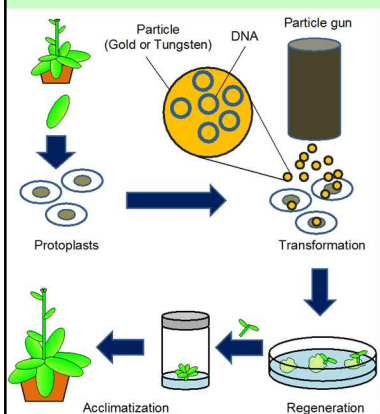
---

---

---

---

## Növényregenerálás



- Steril fenntartás, gén-bank
- Genetikai manipuláció
- Kallusz tenyészet
- Hajtástenyészet
- Gyökeresítés
- Edzés kiültetés

---

---

---

---

---

---

---

---

## Növényregenerálás

Két útja van:

- Organogenezis: egy szerv regenerálódik (hajtás, gyökér, hajtás, gumó), ebből alakítjuk ki az egész növényt
- Embriogenezis: egyetlen sejtből 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. gyökeresítés (2,4-D nélkül)
    3. kiültetés
  - Merisztémából → inkább organogenezis

TELJES ÉRTÉKŰ NÖVÉNY REGENERÁLHATÓ




---

---

---

---

---

---

---

---

## Hajtástenyészetek

Gyökér nélküli hajtások növekedése táptalajon steril, kontrollált körülmények között

Előállítás: hajtásokból és levélhóraljban 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 Bioteknológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

---

---

---

---

---

---

---

---

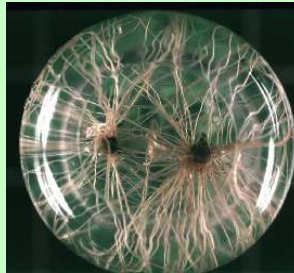
---

---

## Gyökeresítés

A felszaporított hajtásokat kiültetés előtt gyökeresíteni kell:

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



BME Alkalmazott Bioteknológia 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 Bioteknológia 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

---

---

---

---

---

---

---

---

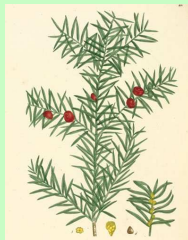
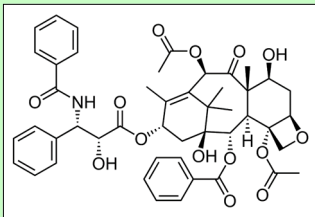
---

---

## Taxol/Paclitaxel

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

Hatása: 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 tűlevelben 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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A taxol előállítása

Extrakció tiszafából



Félszintézis



10-Deacetylbaccatin III

Szövettenyésztés





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

---

---

---

---

---

---

---

---


---

---

## A taxol előállítása szövettenyésztéssel

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

- Nagy inokulumbertéogat, ~20% szükséges,
- $t_{gmax} \sim 2,5$  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. sejtzaporítás:  
~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 taxánvázis 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

**Prekurzor:** 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)
- Adszorpcióval (megkötés apoláris gyantán)
- A vizes metanolt kb. 0,1 térfogatra bepárolják.
- Extrakció erős oldószerrel – a taxol feldúsul
- Bepárlás
- Acetonban fölvéve és vízzel kicsapva a legapolárisabb anyag, a taxol csapódik ki először.

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 39

---

---

---

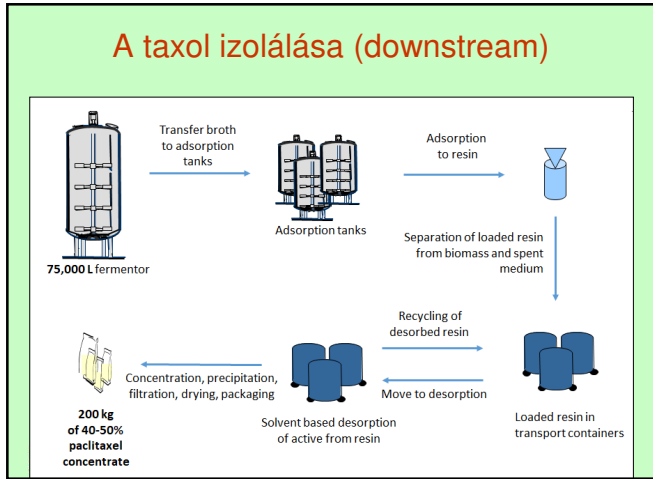
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---