



Nyugat-Magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár
Növényélettan és Növényi Biotechnológia Tanszék

BEVEZETÉS A NÖVÉNYI BIOTECHNOLÓGÁBA

Oktatási segédlet

Írta:
Dr. Molnár Zoltán

Mosonmagyaróvár
2004

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| 1. A biotechnológia általános áttekintése | 5 |
| 1.1 A biotechnológia fogalma, jelentősége | 5 |
| 1.2 A biotechnológia területei | 6 |
| 1.3 Irodalomjegyzék | 8 |
| 2. A növényi biotechnológiai eljárások technikai feltételei | 9 |
| 2.1 A laboratóriumi eszközök mosogatása, tárolása | 10 |
| 2.2 A tápközeg elkészítése, sterilizációja és tárolása | 10 |
| 2.3 Az izolálás aseptikus körülményeinek biztosítása | 12 |
| 2.4 A tenyészetek fenntartása | 14 |
| 2.5 A tenyészetek értékelése | 14 |
| 2.6 Irodalomjegyzék | 16 |
| 3. Növényi sejtekre alapozott biotechnológiai eljárások | 17 |
| 3.1 A növényi sejt- és szövettenyésztés fogalma, célja, alapjai, növény – sejt – növény rendszer | 17 |
| 3.2 Az izolált növényi részek anyagcseréje | 20 |
| 3.3 A növényi sejt- és szövettenyészetek csoportosítása | 23 |
| 3.3.1 <i>In vitro</i> termékenyítés és embriókultúra | 23 |
| 3.3.2 Generatív szervek kultúrái | 24 |
| 3.3.3 Vegetatív szervek kultúrái | 25 |
| 3.3.4 Kallusztenyészetek | 27 |
| 3.3.5 Sejtkultúrák | 28 |
| 3.3.6 Protoplasztkultúrák | 29 |
| 3.3.7 Génátviteli technikák | 33 |
| 3.4 Irodalomjegyzék | 33 |
| 4. Géntechnológia („genetic engineering”) | 34 |
| 4.1 A géntechnológia jelentősége a növénynevelésben | 34 |
| 4.2 A molekuláris genetika alapjai | 34 |
| 4.3 A rekombináns DNS előállításának módszerei | 38 |
| 4.4 A DNS-klónozás | 40 |
| 4.4.1 Vektorok | 41 |
| 4.5 Klóntárak, klónszelekció | 42 |
| 4.6 Növényi sejtek géntranszformációs rendszerei | 44 |
| 4.6.1 Közvetlen génátviteli rendszerek | 45 |
| 4.6.2 Közvetett génátviteli rendszerek | 45 |
| 4.6.3 A donor gén integrációjának és expressziójának kimutatása | 47 |
| 4.7 Sikeres növényi géntranszformációk | 48 |
| 4.8 Irodalomjegyzék | 49 |
| 5. Szakkifejezések | 50 |

1. A biotechnológia általános áttekintése

1.1 A biotechnológia fogalma, jelentősége

A kémiából, mint alaptudományból alakult ki a vegyipar, a biológiából a biológiai ipar, mely élő szervezeteket használ fel technológiai szinten. Az utóbbi évtizedekben a molekuláris biológia, a molekuláris genetika rohamos fejlődésével lehetőség nyílik a termelésbe bevont élő szervezetek genetikai anyagának tudatos megváltoztatásával a termelés hatékonyságát fokozni. A molekuláris biológia és genetika eredményeinek a gyakorlati hasznosításával bontakozik ki egy új alkalmazott tudományág, a biotechnológia, melynek pontos definíciója sok vitát keltett.

A Kémikusok Nemzetközi Szervezete (IUPAC) 1982-ben közreadott meghatározása szerint: „a biotechnológia a biokémia, a mikrobiológia és a műszaki tudományok olyan integrált alkalmazása, amelynek célja, a mikroorganizmusok, tenyésztett szöveti sejtek vagy azok valamely összetevőjének technológiai felhasználása”.

E definíció szerint a biotechnológia két csoportra osztható:

- hagyományos és
- modern biotechnológiai eljárásokra.

A hagyományos biotechnológiai eljárásokat tulajdonképpen évezredek óta ismerjük (pl.: bor-, sörkészítés, sütőélesztő-, sajtgyártás, stb.), de a mikroorganizmusok tudatos felhasználása Pasteurral kezdődött, aki bebizonyította, hogy az erjedést mikroorganizmusok okozzák. Kialakultak a biológiai iparok: a különböző fermentációs technológiák, az élelmiszeripar, a mezőgazdaság, a gyógyszeripar keretében. A második világháború után a penicillingyártás lendítette fel a fermentációs ipar fejlődését. Ezután egy sor antibiotikumot, vitaminokat (A, B₁₂, C) termeltetnek, szteránvázis vegyületeket alakítanak át mikroorganizmusokkal.

Élelmiszer- és takarmányadalékként is felhasználják őket konzerválás, íz- és aromaanyagok termeltetése céljából. A mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban, a háztartási iparban is használatosak.

A modern biotechnológia már genetikailag manipulált élő szervezetekkel dolgozik, melyekkel a hagyományos eljárások hatékonyságát tudjuk növelni. Pl.: baktériumokkal termeltethetünk emberi inzulint, interferont, lehetőség nyílik növényi fehérjék módosítására, stb. Ezt a lehetőséget a rekombináns DNS-technika (géntechnológia), illetve „genetic engineering” (génmérnökség, génsebészet) adja a kezünkbe. Az alap kutatás jellegű molekuláris genetika eredményei szokatlanul gyorsan mennek át a gyakorlatba.

A biotechnológia így napjaink óriási gazdasági jelentőségű, dinamikusan fejlődő tudományterületté vált. Világszerte nagy összegeket fordítanak biotechnológiai kutatásokra. Ma a világ legnagyobb biotechnológiai vállalatai a Du Pont és riválisa a Monsanto cég, mindkettő az USA-ban működik. Tevékenységükben a géntechnológia játsza a főszerepet, melyben óriási üzletet látnak.

Hazánkban a kormány idejében felismerte fontosságát és 1984-ben a "Biotechnológiai kutatás és fejlesztés a mezőgazdaságban és iparban" című kutatási programot felvette az

Országos Középtávú Kutatási és Fejlesztési Tervbe (OKKFT). Nagyon fontos a megfelelő műszaki háttér megteremtése. Új műszerek (lamináris boxok, széndioxid-inkubátorok, rázógépek, fermentorok, programozott mélyhűtő berendezések, stb.) tervezése és gyártása szükséges. A biotechnológia gazdasági szerepe hazánkban egyre növekszik, főleg a gyógyszergyártás és mezőgazdasági termelés területén várunk kimagasló eredményeket.

1.2 A biotechnológia területei

A biotechnológia komplex tudomány. Legfontosabb területei:

- a genetikai manipuláció (fúziós technikák, génsebészet),
- a sejt- és szövettenyésztés,
- a szaporodás biológia,
- a fermentáció és enzimtechnológia.

A biotechnológia fejlődésének a legnagyobb lendületet a genetikai manipuláció lehetősége adta. Ma már a biotechnológia valamennyi területén alkalmazzák módszereit. Az *in vitro* rekombináns géntechnika, a géntechnológia már a sejtekből kivont örökítő anyaggal, a DNS-sel manipulál, tehát molekuláris szintű. Lehetővé teszi, hogy egy tulajdonsághoz rendelt DNS darabot, gént izoláljunk, más fajba átvigyünk és ott működésre bírjuk. Mivel e módszerrel új, a természetben elő nem forduló genetikai kombinációkat lehet mesterségesen létrehozni, gyakran nevezik génsebészetnek, helyesebben „génmérnökségnek” („genetic engineering”).

A genetikai manipulációhoz tartozik a protoplasztfúzió, melynek során a sejtfalettól megfosztott sejteket (bakteriális, növényi, állati) protoplasztokat egyesítünk. Fúzió során nem izolált DNS-sel dolgozunk, hanem a két sejt teljes génállománya keveredik és új génkombinációk keletkeznek.

A megfelelő sejt- és szövettenyésztési technikák kidolgozásával lehetőség nyílik a génmanipulációs eljárások eredményeit növényi és állati sejtekre is alkalmazni. A növényi szövettenyésztés alapja, hogy a növény minden sejtje, szövete, vagy szerve *in vitro* tenyészthető, növényi hormont tartalmazó táptalajon steril, klimatizált körülmények között. A növényi sejt- és szövettenyésztés üzemi méretű alkalmazásával már jelentős gazdasági hasznot hozó eredmények születtek hazánkban is (pl. a Meriklón Gazdasági Társulás az 1990-es évek elején). Szövettenyésztéssel rezisztens és vírusmentes növényi szaporítóanyagot állítanak elő olcsón, nagy mennyiségben. A módszert bevezették dísnövények (szegfű, gerbera), gyümölcsfák, szőlő és egyéb gazdasági haszonnövények (pl. burgonya) vegetatív mikroszaporítására.

A folyékony táptalajban történő növényi sejttenyésztés, a növényi sejtfermentáció, alkalmas növényi anyagcseretermékek (pl. növényi alkaloidák) előállítására is. Az alkalmazott gyógyszerek hatóanyagának 25 %-át növényekből nyerik ki. Növényi sejtekkel termelhetünk aroma anyagokat (pl. vanillin), színezékeket, illatanyagokat is. Az eddig alkalmazott hagyományos technikát, az intakt növényből a hatóanyagok kivonását, mind jobban felváltja a bioreaktorokban történő növényi sejtfermentáció és a hatóanyagok

fermentléből történő kinyerése. Az utóbbi előnye, hogy független az éghajlattól, a termőterülettől, a növény korától, a növényi kártevőktől.

A növényvédelmi biotechnológia a peszticidek használatának csökkentése céljából, kórokozók elleni rezisztens új fajták előállításával foglalkozik. A géntechnológiai módszereket felhasználva ezen a területen már gazdasági hasznót hozó eredmények születtek.

Állati sejt- és szövettenyészetek felhasználásával Köhler és Milstein 1975-ben kidolgozta az ún. hibridóma technikát monoklonális ellenanyagok előállítására. A felfedezés nagy jelentőségű, 1984-ben a két tudós megkapja érte az orvosi Nobel-díjat. A monoklonális ellenanyagok termelése forradalmat jelent a humán, állati, növényi vírusdiagnosztikában (RIA-, ELISA-teszt, pl. az AIDS vírus kimutatása is az utóbbi tesztelési módszerrel történik). Felhasználható a daganatos sejtek gyógyításában. Fontos reagensai a molekuláris genetikának is. Felhasználják őket a rekombináns DNS-technikával előállított fehérjék (pl. inzulin, interferon) tisztítására, a gensebészettel a sejtekbe bevitt idegen gének expressziójának ellenőrzésére.

Az állatállomány javításának már ma is gyakorolt módja a szaporodásbiológiai beavatkozás: a mesterséges termékenyítés és az embrióátültetés. Az első technika évtizedek óta ismert és bevált beavatkozás, az embrióátültetés újabb módszer. Az embriómanipuláció egyik technikája az embriódarabolás. Az egyes embriódarabok különböző anyaállatokba való helyezésével genetikailag teljesen azonos utódokat, klónokat kapunk. Az embriódarabok fúziójával fajhibridek, kimérák állíthatók elő. Elsőként juh-kecske kimérát sikerült előállítani. Az embriók mélyhűtéses tárolása lehetővé teszi, hogy különböző genotípusokat embrió-bankokban, génbankokban hosszú ideig megőrizhessünk.

Inkább ipari jellegűek a fermentációs technológiák, melyek célja egyes mikroorganizmusok felszaporítása valamilyen anyagcseretermékük miatt (vitamin, aminosav, stb.), vagy magáért a mikroorganizmusért. Tehát maga a mikroba is lehet a gyártás célja, esetleg élelmiszer- vagy takarmányadalékként használva. Távolatilag tervezik emberi fogyasztás céljára való felhasználását egysejt-fehérje (single-cell protein, SCP) formájában. A mikroorganizmusok sejttömegének ugyanis 50-80 %-a fehérje. A mai fermentációs technológiák az ipari mikrobatorzsek termőképességét sorozatos ismételt mutációkkal, illetve fúziós technika segítségével, rekombinációval növelik. A géntechnológia segítségével új tulajdonságú mikrobatorzseket állíthatunk elő. Fermentorokban termeltethetünk velük emberi, állati, növényi fehérjét. A fejlesztéshez korszerűsíteni kell az ipari technológiai hátteret is. Nagy térfogatú automatizált fermentorokra van szükség. Nagyon bonyolult a kapott fermentléből a kívánt termék kivonása, amely fejlett elválasztástechnikát igényel (pl. affinitás-kromatográfia, nagynyomású folyadék-kromatográfia (HPLC)).

Az enzimtechnológia köre nemcsak az iparban, hanem a mezőgazdaságban, élelmiszeriparban, mosószergyártásban is bővül. A különböző sejtfallbontó enzimek (pektinázok, cellulázok, hemicellulázok, stb.) alkalmazásával növeljük az élelmiszerek és takarmányok biológiai értékét. Felhasználják őket a biomassa (kukoricaszár, szalma) hasznosításánál, pl. bioalkohol gyártásánál. Nagy jelentőségűek a hordozóhoz kötött immobilizált enzimek, melyek mint biokatalizátorok használatosak az iparban. Jelenleg legnagyobb jelentőségű a glükóizomeráz ipari felhasználása a fruktóz tartalmú izoszirup

gyártásban. Az izocukor technológiában a kukoricakeményítőt amiláz enzimekkel glükózzá alakítják. A glükóz izomerizálását fruktózzá immobilizált glükóizomeráz enzim katalizálja. Az izomeráció során kapott izocukor, a fruktóz, diabetikus édesítőszer.

A molekuláris genetika bevonásával a legújabb kutatások az enzimtervezés, enzimmódosítás irányába folynak. Ez az ún. irányított mutagenézis vagy „protein engineering” a biotechnológia viszonylag új területe.

1.3 Irodalomjegyzék

Altman A. et al. (szerk.)(1999): Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht-Boston-London.

Dudits D.-Heszky L. (2003): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.

Crueger W.-Crueger A. (1987): Biotechnológia. Alkalmazott mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Bp.

Gallo R.C. (1987): Az AIDS vírusa. Tudomány (Scientific American) 3, p.21-31.

Oláh J. (1982): Hibridóma. Ellenanyagtermelés lombikban. Természet Világa 1, p.56-61.

Sain B. (1981): A génebbélesztől ipar születik? Természet Világa 10, p.242-245.

Sain B.-Erdei S. (1985): Génebbélesztet. Gondolat Kiadó, Bp.

Skjervold H. (1989): Biotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

2. A növényi biotechnológiai eljárások technikai feltételei

Mielőtt a növényi biotechnológiai eljárások részletes ismertetésére rátérnénk, szükségesnek tartjuk azoknak a technikai feltételeknek az ismertetését, amelyek nélkül nem képzelhető el a növényi biotechnológiai munka. A további fejezetekben pontos meghatározásokat találunk az egyes fogalmakra, az ismételések elkerülése végett itt eltekintünk a részletes magyarázatoktól.

A növényi biotechnológiai eljárásoknál alkalmazott módszerek technikai kivitelezése alapvetően a mikrobiológiában használatos fogásokon alapszik. E fejezet további részeiben a növényi sejt- és szövettenyésztésnek, mint a növényi biotechnológia alapjának, legfontosabb laboratóriumi követelményeit részletezzük.

Ma a növényi szövettenyésztés alatt az életképes növényi részek *in vitro* tenyésztését értjük, aszeptikus – steril – körülmények között. A növényi szövettenyésztésnek, mint az összes többi tudományágnak, megvan a maga története. Az alkalmazott módszerek alapvetően nem sokban különböznek a múlt század ötvenes-hatvanas éveiben kidolgozott technikáktól. Gyakorlatilag az összes *in vitro* módszer esetünkben három alapvető tényezőre vezethető vissza:

1. A növényből izolálni kell a növényi részt, ezáltal az egyes szervek, szövetek, sejtek kölcsönhatásától függetlenítyük.

2. Az explantumot meghatározott körülmények között tartjuk fenn: a tápközeg kémiai összetevői és a tenyésztés fizikai körülményei hatásosan befolyásolják a növényi rész fejlődését, a genotípusos és fenotípusos jellegek expresszáldását.

3. A sterilitásra mindig ügyelni kell. A legtöbb tápközeg elősegíti a fertőző baktériumok, gombák, algák elszaporodását. Ezek az élőlények károsan hatnak a tenyésztés során: túlnothetik a tenyésztett növénydarabkát, az explantumra káros metabolitokat termelhetnek, stb.

A növényi biotechnológiai módszerek alkalmazási lehetősége többféle lehet (pl. egyszerű mikroszaporítás, genetikai jelenségek tanulmányozása, anyagcseretermékek képződésének, morfogenezisnek a vizsgálata, új növényfajták géntechnológiai úton történő előállítása, stb.). Az egyes céloknak megfelelően más-más a technikai feltételek iránt támasztott követelmény, az alapok azonban nem sokban térnek el egymástól. Ezeket az alapvető követelményeket a következőképpen csoportosíthatjuk:

- a) üveg-, műanyag és egyéb laboratóriumi eszközök tisztítása és tárolása;
- b) a tápközeg elkészítése, sterilizése és tárolása;
- c) az izoláláshoz szükséges aszeptikus körülmények biztosítása;
- d) a tenyészetek fenntartása kontrollált körülmények között (ellenőrzött hőmérséklet, fény és páratartalom);
- e) a tenyészetek értékelése.

A fentieket figyelembe véve legalább két különálló helyiség szükséges: egy az eszközök mosogatásához és tárolásához, a tápközeg összeállításához („táptalajkonyha”), egy pedig a tenyészetek fenntartásához („tenyésztőszoba”). A klimatizált tenyésztőszobában helyezhetjük el az izolációhoz, a tenyészetek értékeléséhez szükséges berendezéseket

(lamináris box, mikroszkópok, stb.). Egy közös mérlegszobát más laborokkal együtt használhatunk.

2.1 A laboratóriumi eszközök tisztítása, tárolása

A növényi szövetenyésztési munkák során sokféle üveg- és műanyag eszközt használhatunk. Ezek többsége megtalálható a legtöbb kutatóhely laboratóriumában, főleg ha mikrobiológiai profilal rendelkezik az intézet. Az üvegárukra jellemző, hogy könnyen tisztíthatók és jól sterilizálhatók (hőállóak) legyenek (bór-szilikát üvegek). Az első használat előtt célszerű alaposan elmosogatni az edényeket, mosó- és fertőtlenítőszeres oldatban. A leggyakrabban használatosak: mérőhengerek, lombikok, mérőlombikok, pipetták, szélesszájú Erlenmeyer lombikok, kémcsövek, Petri csészék. A műanyagból készült eszközök előnye, hogy meggyorsítják a munkát (ugyanis a legtöbb esetben egyszer használatosak, előre sterilizáltak). A többször felhasználhatóknál ügyelni kell az alapanyag hőtűrésére, a fertőtlenítőszer esetleges káros hatására (pl. kémiai reakciók játszódhatnak le, amelyek befolyásolják a tenyészeteket, stb.).

Az edények és más eszközök tisztítása hagyományosan a következőképpen történik. Áztatás 4 órán át krómsav-kénsav keverékében, mosogatás, majd többszöri öblítés csapvízzel és desztillált vízzel. Ma már speciális laboratóriumi mosószerek állnak rendelkezésünkre, ezek Magyarországon kevésbé elterjedtek (Decon 75, Liqui-nox), azonban a növényi szövetenyésztés iránti igény fokozódása miatt várhatóan használatosak lesznek. A detergensben való áztatás után – ennek időtartama min. 16 óra – az edényeket csapvízzel majd desztillált öblítjük le. Ha agarmaradékot látunk az üvegeken, először olvasszuk fel azt autoklávban, vagy egyszerű konyhai kuktában, utána áztassuk be és mossuk el. A fertőzött tenyészeteket tartalmazó edényeket sterilizzuk meg autoklávban, a zárókupak (papírvattadugó, alufólia, stb.) eltávolítása nélkül és csak utána áztassuk be. A sterilizálás során elpusztulnak a fertőző mikroorganizmusok, így újra fel lehet használni az eszközöket. Az egyszer használatos műanyag edényeket is sterilizzuk meg fertőzés esetén, ezáltal megakadályozzuk a baktériumok, gombák szétterjedését a laboratóriumban. Az elmosott eszközöket szárítószekrényben cseppmentesre szárítsuk le, majd pormentes helyen (polcon, szekrényben) tároljuk őket. A szárítás során a kisebb edényeket, pipettákat, mérőhengereket fémből készült kosarakba tesszük, így elkerülhetjük a felesleges töréseket.

2.2 A tápközeg elkészítése, sterilizése és tárolása

A tápközeg összetevőit részletesen egy későbbi fejezetben ismertetjük, itt csupán megemlítjük az alkotóelemeket, amikre ügyelni kell a sterilizálás, tárolás során.

A teljes táptalaj összetevői a következők:

- ásványos (makro- és mikro-) elemek;
- nitrogénforrások;
- szénforrások;
- vitaminok;

- hormonok;
- növényi kivonatok.

A tápközeg elkészítése során – a növényi kivonatok, egyes szerves nitrogén- és szénforrások kivételével – szintetikus anyagokat használunk fel. A tápközegkonyhában gyűjtünk össze minden olyan edényt, mérőhengert, mérőlombikot, amire szükségünk lesz. A külön mérlegszobában tára- és analitikai mérlegeken mérjük ki az összetevőket. A vegyszereket erre a célra kialakított vegyszerszobában tároljuk. Mindent vízben oldjunk fel, ezért legyen a közelben vízcsap, vízdesztilláló készülék. A sterilizációhoz autoklávot vagy közönséges konyhai kuktaedényt használjunk. A mikrohullámú sütőben gyorsan fel tudjuk olvasztani a táptalaj szilárdításához használt agart.

A tápközeg összeállítása során célszerű törzsoldatokat készíteni. Rendszerint 1-2 liter 10x-es töménységű oldatot mérjük be, a szénhidrátokat és hormonokat kivéve, ezt tároljuk hűtőszekrényben a későbbi felhasználásig. A mikroelemekből, vitaminokból és növényi növekedés-szabályozó anyagokból (hormonok) nagyon kicsi mennyiségre van szükség, ezért célszerű ezekből 100-200 ml törzsoldatot készíteni (10x-100x-os), amit szintén hűtőszekrényben tárolunk. Fontos, hogy analitikai tisztaságú vegyszereket használjunk, ügyeljünk a pontos mérésre, minden tápközegnél legyen meg az elkészítés egymás utáni lépése.

A táptalajok "receptjeit" megtaláljuk az ajánlott irodalmakban, ezért itt erre nem térünk ki. Ma már különböző módosításokkal együtt több száz "recept" létezik, a tenyészetek típusától, növényfajoktól, fajtáktól eltérően.

A leggyakrabban használt táptalajok:

- MS (Murashige-Skoog, 1962)
- B5 (Gamborg et al., 1968)
- N6 (Chu, 1978)
- Ei (Gamborg et al., 1983)

Mint már említettük, a tápközeg összetevőit vízben oldjuk fel (a növényi hormonoknál ügyelni kell az oldhatóságra, ugyanis legtöbbjük nem vízben, hanem apoláros oldószerben – acetonban, alkoholban – oldódik, törzsoldat készítésekor ezért először kis mennyiségű oldószerben oldjuk fel őket, majd utána fokozatosan adjuk hozzá a vizet). A közönséges csapvíz nem megfelelő a növényi szövettenyésztéshez, mert sokféle anyagot tartalmaz, ellenőrizhetetlen mennyiségben.

Ezek:

- kationok (ammónium, kalcium, vas, magnézium, stb.);
- anionok (bikarbonátok, karbonátok, kloridok, stb.);
- egyéb anyagok (fémoxidok, olajok, szerves anyagok, stb.);
- mikroorganizmusok (algák, baktériumok, stb.);
- gázok (ammónia, széndioxid, oxigén, stb.).

A csapvizet először különböző pórusméretű szűrőn engedjük át. Szűrés után a deionizációt ioncserélő gyantás desztillálóval végezzük el. Általában kétszer desztillált vizet használunk a tápközegeknél, ezért egy üvegdesztillálóra is szükség van. Az ioncsere során a szerves anyagokat, üvegdesztilláláskor a gázokat és szerves anyagokat távolítjuk el.

A kész táptalajt először a mikrobiológiában használatos agar-agarral megszilárdítjuk. Ezáltal az izolált növényi rész gázcseréje és tápanyagfelvétele biztosított. A folyékony tápközeget akkor használjuk, ha rázóasztalon a folyadék mozgását biztosítani tudjuk (a gázcsere miatt).

A táptalajt felhasználás előtt sterilizzuk meg. Amint a teljes tápközeg összetételéből látható: minden olyan anyagot tartalmaz, ami megfelel a mikroorganizmusok elszaporodásának. Ha nem az edényekbe kiadagolt médiumot sterilizzuk, akkor magát a tenyésztő edényt is meg kell sterilizálni. A sterilizációt autoklávbán vagy konyhai kuktaedényben végezzük el. Az autoklávozás 121 °C-on, 1,06 kg x cm² nyomáson 15-40 percig tart, a kiadagolt táptalaj mennyiségétől függően. A sterilizálás alatt esetleg növekedhet a tápközeg nutritív értéke. Vannak olyan összetevők, amelyek hőlabilisak, ezért ezeket nem lehet autoklávozni. Ilyenek a növekedési faktorok (pl. gibberellinsav, zeatin, abszcizinsav), egyes vitaminok (C-vitamin). Ha ilyen alkotókat használunk, először mérjük be az összes anyagot, kivéve a hőlabilis összetevőket. Amit lehet, autoklávozzunk meg, a maradékot szűrővel sterilizzunk és ezután adjuk a lehűlt oldathoz. A szűrés membránszűrővel történik, aminek pórusmérete 0,45 mikrométer vagy ennél kevesebb. A membránokat használat előtt természetesen sterilizálni kell, hasonló körülmények között, mint a tápközeget. Vannak egyszer használatos, eldobható membránszűrők. Az üvegeszközök csíráztatása történhet a táptalaj autoklávozásával együtt. Gyakran használják még a hőlégmentalizálókat is. Ezekben 3 órán keresztül, 160-180 °C-on vannak az alufóliába vagy csomagolópapírba csavart, lefedett edények. A száraz sterilizálás miatt ennek hatékonysága rosszabb az autoklávozáshoz képest.

A kész, kiadagolt, steril táptalajokat jól lezárjuk (csavaros kupakkal, alufóliával, parafilmmel) és száraz, pormentes helyen tároljuk a felhasználásig. Egy-két hónapnál tovább nem célszerű raktározni a kész médiumot.

2.3 Az izolálás aszeptikus körülményeinek biztosítása

Az izolálás során ügyelni kell a nagyfokú sterilitásra. Használat előtt az eszközöket alapanyaguktól függően autoklávozni vagy sterilizálni kell (autokláv: műanyagok, alufóliába csomagolt bonctűk, csipeszek, szikék, ollók, stb.; hőlégmentalizáló: üvegedények, Petri csészék, stb.).

Az izolálás során felhasznált növényi részek felületén sokféle mikroorganizmust találhatunk. A fertőzések elkerülése végett az explantumokat is sterilizálni kell. A gombákkal és baktériumokkal szisztematikusan fertőzött növényeket rendszerint nem vesszük *in vitro* tenyészetekbe. A sterilizálásra sokféle anyagot felhasználhatunk: Ca-hipoklorit, Na-hipoklorit, H₂O₂, brómos víz, higany-klorid, antibiotikumok, stb. Leggyakrabban hipokloritok 0,3-0,6%-os oldatában áztatják az explantátumokat 15-30 percig. Nem szabad azonban elfelejteni azt, hogy a felületi sterilizálóanyagok a növényi szövetekre is károsak. Ezért ügyelni kell a koncentrációra és a kezelés idejére. Az etil- és izopropil-alkohol egymagában vagy a fenti sterilizálószerekkel kombinálva (0,5-1 percig áztatás 70%-os alkoholban, utána 15-30 percig hipokloritban) szintén kielégítő eredményt ad. Általában nem magát az inokulumot szoktuk sterilizálni, hanem az azt hordozó nagyobb növényi részt. A sterilizálás után aszeptikus

körülmények között preparáljuk ki az explantumot. Pl. merisztématis tenyészeteknél magát a hajtásúcsot sterilizzük és ebből izoláljuk a merisztémát.

Gyakran csíráztatunk *in vitro* sterilizett magvakat és a csíranövény különböző részeit (gyökér, szárdarabok, levelek, stb.) használjuk fel.

Amint már többször említettük: a tenyészetek inicializálásakor fokozottan ügyelni kell az aszeptikus körülmények biztosítására. Legegyszerűbb esetben tiszta, pormentes helyiségben, tiszta asztalon, steril eszközökkel és edényekben is kielégítően el lehet végezni az izolálást. Nagyobb sterilitást biztosít azonban, ha legalább két Bunsen-állványhoz rögzített üveglap alatt előzőleg odakészített és sterilizett eszközökkel dolgozunk. Az üveglap alatt, illetve mellett felületileg sterilizált binokuláris sztereomikroszkópot is használhatunk, ami különösen kis objektumok esetén igen megkönnyíti és gyorsítja a munkát. A biztos sterilitást azonban csak oltófülkétől vagy oltó- illetve sterilizobától várhatjuk. Kisebb és rövidebb idejű műveletekhez egy üvegezett vas- vagy favázás kamrácska vagy szekrény teljesen kielégítő. Nagysága lehetőleg olyan legyen, hogy az eszközök, tápközegek, növényi objektumok, esetleg még torziós mérleg és mikroszkóp is elférjenek benne. Ebben a megfelelő előzetes sterilizálás után meglehetősen biztonsággal lehet a munkát folytatni. A beépített UV-lámpa tovább fokozza a sterilitást. Nagyobb és állandó jellegű izolálási munkákhoz oltófülkét, vagy ha egyszerre többen is dolgozni akarnak, oltószobát használunk. Korábban magát az egész helyiséget sterilizálták beépített vagy mozgatható UV-lámpával, baktericid és fungicid folyadékokkal vagy gázokkal. A mesterséges, steril légcseréről is gondoskodni kellett, továbbá a levegő kondicionálásáról is, mivel a műszerek, eszközök, edények sterilizálására használt Bunsen-égő lángja erősen felmelegíti a levegőt. Ma a külön erre a célra kialakított oltószobában vagy a laboratórium egyik nyugodt sarkában felállított lamináris boxot használjuk az izoláláskor. A lamináris boxból az egyik oldalról nyitott munkatéren keresztül áramlik a megszürt, steril levegő. A szűrést egy nagy hatékonyságú, ún. HEPA-szűrő végzi, aminek pórusmérete 0,3 mikrométer. Mielőtt elkezdenénk a munkát, alkoholos vattával alaposan kitöröljük a boxot, majd bekapcsoljuk a beépített germicid lámpát. A 15-20 perces kezelés elteltével kikapcsoljuk az UV-lámpát és nekifoghatunk az izolálásnak, átoltásnak. A munka során minden használat előtt és után Bunsen- vagy borszeszégővel égessük le az eszközöket. A megvilágításra a természetes fény gyakran nem elegendő (pl. mikroszkópi preparálásnál), ezért mesterséges fényt kell használni: a lamináris boxokban találunk beépített fénycsöveket.

2.4 A tenyészetek fenntartása

A folyékony vagy szilárd tápközegen tartott növényi szövettenyészeteket kontrollált környezetben inkubáljuk. Itt a hőmérsékletre, megvilágításra, fotoperiódusra, nedvességtartalomra, légmozgásra kell ügyelni. Ezek a környezeti tényezők közvetlenül befolyásolják a szövetek növekedését és fejlődését. Az anthera és portoplaszt kultúrák különösen érzékenyek a környezeti feltételek és a tápközeg változásaira. Termosztátokban, növénynevelő kamrákban, fitotronokban lehet a legjobban biztosítani a szükséges feltételeket a tenyésztéshez.

A tenyészetek inkubálása során a hőmérséklet 25 ± 2 °C. Ezt a hőfokot a helyiség méretétől függő teljesítményű légkondicionálóval, illetve ha szükséges elektromos kályhával biztosítjuk. A kultúrákat általában diffúz fényen neveljük (kevesebb mint 1 klux-on). Némelyik típusnál szükséges lehet a magasabb fényintenzitás vagy éppen a teljes sötétség. A fotoperiódus hossza változó, a fény/sötét periódusokat automatikus kapcsolóórával biztosíthatjuk. Ha a tenyésztőszobában a relatív nedvességtartalom 50 % alá esik, párologtatással növelni kell, mert a tápközeg gyorsan kiszárad, ami végső soron a tenyészet pusztulásához vezet.

A legtöbb szövettenyésztő laboratórium klimatizált tenyésztőszobájában a kultúrákat különböző polcrendszeren tartják. A polcok általában fémből készülnek, üveg- vagy vékony drótból készült betéttel. A megvilágításra használt hidegfényű fénycsőket a polcok között vagy közvetlenül a tenyészeteket tartalmazó edények fölé helyezik el. Állandó megvilágításnál a fénycsővek elég sok hőt termelhetnek ahhoz, hogy a közelükben lévő tenyészeteket túlságosan felmelegítsék. Ilyenkor célszerű a világítótestek között egy perforált csövet elvezetni, aminek a végén egy kis ventilátor szívja el a meleg levegőt. Az Erlenmeyer lombikokat, Petri csészéket közvetlenül, a kémcsöveket fémből készült tartókba helyezve tesszük a polcokra. A tenyésztőszobában különböző rázógépeket is működtethetünk, ezekben a folyékony tápközegen nevelt kultúrákat tartalmazó edények vannak. Így a szuszpenziós kultúrák számára is biztosítottak az optimális környezeti feltételek.

2.5 A tenyészetek értékelése

A steril tenyészetek technikai kivitelezésének egyik alapvető problémája a kultúrák növekedésének, fejlődésének egzakt ellenőrzése, azaz a növekedés értékelése és összehasonlítása. Különösen az inkubációs idő közben ütközik nehézségekbe a növekedés mérése, és az esetek többségében csak a kísérlet végén mérhetők le a növekedés számadatai, addig jórészt csak becslésekre szorítkozhatunk. Az inkubációs idő alatt elsősorban az egyes szervtenyészeteknél (pl. gyökér) van meg a lehetőség a pontos mérésekre (pl. hossz mérés). Az aseptikus friss tömeg mérésének is adott a lehetősége (pl. torziós mérleg, digitális kijelzésű elektromos mérleg, stb.), de itt a fertőzés veszélye fokozódik.

A kvantitatív elemzések során általában a friss tömeg a leggyakrabban mért paraméter. Ezt néha kiegészítik a száraztömeg adataival. E kettő önmagában nem sok tájékoztatást ad, ezért célszerű a sejtszámot is megállapítani. Szuszpenziós tenyészeteknél ez egyszerűbben

megadható, mint a szilárd táptalajon nevelt kultúrák esetén. Mindkettőnél azonban szükség van hosszabb-rövidebb ideig tartó macerálásra, és csak ezt követi a hemocitométeres sejtszámlálás.

A kvalitatív elemzéseknél leggyakrabban különböző biokémiai vizsgálatok elvégzésével kapunk objektív eredményeket. Ezek a növekedés és fejlődés paramétereiben szolgálhatnak, pl. a nukleinsav- és protein szintézis, az enzim aktivitások és a légzés intenzitás mértékének, arányának meghatározása, stb. A statisztikai módszerekkel alátámasztott több egzakt kísérlet parallel méréseinek átlagai komplex módon fejezik ki az *in vitro* tenyésztés során lejátszódó változásokat.

A különböző fény- és elektronmikroszkópos technikákat szintén nem nélkülözhetjük a pontos vizsgálatok során.

A növényi sejt- és szövettenyésztés technikai feltételeinek rövid ismertetése után célszerűnek tartjuk egy alap módszer ismertetését, amit bármilyen növényi rész tenyésztése során alkalmazhatunk. Az egyes speciális igényekhez igazodva azonban természetesen különböző módosításokra lehet szükség.

Aszeptikus növényi szövettenyészetek létesítésének lépései:

- 1., Gyűjtsük össze a növénydarabkákat egy csavaros tetejű üvegbe. Öntsünk az üvegbe sterilizőszert. A folyadék teljesen lepje el az anyagot. Zárjuk le az üveget és vigyük be a steril oltókamrába. A sterilizés ideje alatt kétszer-háromszor rázzuk meg az üveget.
- 2., Sterilizés után nyissuk ki az üveget és öntsük ki belőle a folyadékot. Öntsünk bele steril desztillált vizet, majd zárjuk le. Néhányszori rázás után cseréljük ki friss, steril desztillált vízzel az elhasználtat. Az egymás utáni öblítést háromszor-négyszer végezzük el.
- 3., Az öblítések után tegyük a növénydarabkát egy steril Petri csészébe.
- 4., Az izolálás során használandó eszközöket mártsuk 70 %-os alkoholba, majd égessük le és hagyjuk kihűlni őket. Mindezt a növényanyag sterilizési ideje alatt célszerű elvégezni.
- 5., A megfelelő izolátumot (pl. merisztéma, embrió, mikrospóra, ovulum, stb.) a steril eszközökkel preparáljuk ki (szike, csipesz, bonctű, dugófűró, sztereomikroszkóp, stb.).
- 6., Vegyük le a tenyészedényt záró dugót vagy alufóliát, tegyük az inokulumot a táptalajra, lángoljuk le az edény nyílását, majd gyorsan zárjuk le.
- 7., Vigyük a tenyészedényeket a klimatizált szobába.
- 8., A tenyésztési idő leteltével értékeljük a tenyészeteket (kvantitatív és kvalitatív értékelés, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok, fotózás, stb.).

2.6 Irodalomjegyzék

Bhojwani S.S.-Razdan M.K. (1983): Plant Tissue Culture – Theory and Practice. Amsterdam, Elsevier, p.11-24.

Debergh P.C.-Zimmermann (szerk.)(1993): Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.

Hall R.D. (szerk.)(1999): Plant Cell Culture Protocols. Humana Press, Totowa.

Maróti M. (1976): A növényi szövettenyésztés alapjai, Akadémiai Kiadó, Bp. p.300-322.

Thorpe T.A. (szerk.)(1981): Plant Tissue Culture – Methods and Application in Agriculture. New York, Academic Press, p.1-20.

Vasil I.K. (szerk.)(1984): Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Laboratory Procedures and Their Application, New York, Academic Press, p.1-12.

3. Növényi sejtekre alapozott biotechnológiai eljárások

A növényi sejt- és szövettenyésztés a biológiának az utóbbi néhány évtizedekben kialakult speciális iránya és módszere. Igazi határterületi tudomány, mert egyrészt elmélyíti és továbbfejleszti a klasszikus sejttan, szövettan és morfológia eddigi eredményeit, másrészt pedig a növényélettan, biokémia, genetika, nemesítéstan, stb. közötti kapcsolatokat segíti és új eredmények szintézisét katalizálja. A kezdetben csak táplálkozási, növekedés-fejlődési, hormonális-reguláció, morfogenetikai és egyes patológiás problémák vizsgálatára alkalmazott szövettenyészeteket ma már vegetatív szaporításra, patogénmentes törzsanyagok előállítására, biológiailag aktív anyagok szintézisére, sőt molekuláris genetikai célokra (rezisztencia, szelekció, mutáció, transzformáció, stb.) is felhasználják.

A növényi szövettenyésztés gondolatának eredetét a XIX. század hetvenes éveitől vezethetjük vissza, amikor H. Vöchting a keltike (*Corydalis solida*) gumójának különböző irányú feldarabolásával nyert vágásfelületen a regenerátumokból (levél, gyökér, kallusz) a sejtek, szövetek genetikai autonómiájára, a sejtek totipotenciájára, a növényi részecskék „intakt” növényhez hasonló genetikai potenciáljára következtetett. Ezt a gondolatot vitte tovább a magyarországi Magyaróváron (Altenburg) született Gotlieb Haberlandt (1854-1946), aki 1902-ben közzétett munkájában („Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen”) több növényvel végzett kísérletei eredményeként a növényi szövettenyésztés lehetőségének elveit, okait is megfogalmazta, amelyet azután az utolsó évtizedekben kísérletileg is bebizonyítottak.

A növényi részek tenyésztésének lehetősége a sejt-, szövet- és szervfiziológia számára új utat jelent és a módszerek tökéletesedésével további eredményeket hoz. Az izolált kultúrák módszerét napról napra mind többen alkalmazzák a sejtfiziológia, valamint a magasabb rendű növények morfogenezisének, differenciálódásának, organogenezisének tanulmányozásában.

3.1 A növényi sejt- és szövettenyésztés fogalma, célja, alapjai, növény – sejt – növény rendszer

Az izolált növényi részek sikeres tenyésztésének fogalmát pontosan definiálni nehéz. Talán a legfontosabb kritérium a tenyésztés lehetőségének potenciális korlátlanlansága, vagyis hogy többszöri átültetéssel hónapokon, éveken át fenntartható legyen a kultúra. Ugyancsak fontosnak tűnik az a követelmény, hogy a növényi rész (szerv, szövet, sejt) a természetének megfelelő anyagcserét folytassa, tehát a sejtosztódás, növekedés zavartalan és folyamatos legyen. A sikeres tenyésztés kritériumaihoz lehetne még sorolni azt - különösen a kallusz- és szervkultúrák esetében -, hogy a transzplantált szubkultúrák megtartsák eredeti habitusukat, azaz az egyik szerv (gyökér) ne regenerálja a másikat (hajtás) vagy fordítva, és szöveti differenciálódás vagy organizáció ne következzen be. Ez a kíváncsi azonban nem általánosítható, mert pl. a magból sterilen felnevelt növényt vagy az izolált embrióból előállított csíranövényt, továbbá a gyökérből vagy hajtásból steril viszonyok között regeneráltatott teljes növényt nem foglalja az izolált tenyésztés fogalmába. A differenciálatlan kallusz szövetből létesített sejt-kultúrák vagy az egy sejtől létrejött sejt-koloníák, szövetek, még inkább a kalluszból redifferenciálódott szövetek, szövetrendszerek vagy organizálódott

szervek, teljes növények vagy a sejtből, pollenből kifejlesztett teljes növényi szervezetek sem tartoznának így a steril tenyésztés fogalmába. A differenciálódás és organizálódás tehát nem zárja ki ezeket a kultúrákat a steril tenyésztés fogalomköréből, annál is inkább, mert a legtöbb kísérletben ma ez az egyik cél.

Tehát a növényi sejt- és szövettenyésztés lényegében a természetes környezetétől izolált növényi részecskék (embriók, szervek, szövetek, sejtek, ivarsejtek) *in vitro*, potenciálisan korlátlan ideig tartó anyagcseréje és fejlődése, amely tetszés szerint reprodukálható, kontrollálható, sőt esetleg regulálható (programozható) a fejlődést kiváltó fizikai és kémiai faktorok segítségével. Cél: az intakt növény kölcsönhatásától függetlenített részecske anyagcseréjének, fejlődésének megismerése, szabályozása. A legtöbb esetben az előbbieket kiegészítik a teljes növényre regeneráltatással.

A növényi sejt- és szövettenyésztés kialakulása és máig elért eredményei lényegében három tényezőre vezethetők vissza:

- a) a növényi sejtek totipotenciája,
- b) a hormonok és hormonális reguláció felfedezése,
- c) a molekuláris biológiai szemlélet kialakulása.

A növényi sejtek totipotenciája: Haberlandt XX. század elején publikált munkájában feltételezte, hogy az eukarióták egyes sejtjei „elemi organizmusként” működhetnek, ha szervi, szöveti kapcsolataikból elválasztjuk őket. A következő évtizedekben sikeresen végrehajtott szerv-, szövet- és sejttenyésztések igazolták ezt a feltevést: azaz bármely növényi sejt (még az ivarsejt is) a fajra jellemző összes genetikai adottságokkal rendelkezik, amelyek a külső faktorok hatására az *in vivo* viszonyoknak megfelelő, de attól eltérő anyagcserét és morfogenezist mutathatnak. A növényi sejt- és szövettenyésztés igazolta elsőként azt a XIX. század közepén felállított sejtelméletet, amely szerint az egyes sejtek teljes organizmust képezhetnek és a soksejtes szervezetek minden differenciált sejtjében jelen vannak azok az információk, amelyek a megtermékenyített petesejtben is.

A fitohormonok szerepe: a szövettenyésztés mai eredményei másodsorban a hormonok interakcióira és reguláló hatásukra vezethetők vissza. Kezdetben a tápközegek csak ásványi sókat és szacharózt tartalmaztak. A húszas években az ásványi elemeken kívül már mikroelemeket, élesztő kivonatot és aminosavakat is alkalmaztak. A vitaminok (tiamin, nikotinsavamid, piridoxin), a különböző nitrogén-források és mikroelemek általánosabb használatára csak az 1930-40-es években került sor. Ebben az időben alkalmazták a táptalajokban először a nemrégiben felismert növényi hormonokat is, melyeket azóta is a sejt-, szövetfejlődés és regenerációs organizáció egyik nélkülözhetetlen faktoraiként ismerünk. Először a naftil-ecetsav (NES) és indol-ecetsav (IES) használata terjedt el. Hamarosan ismertté vált, hogy az auxinok egyes sejtfiziológiai folyamatokat speciálisan is szabályozhatnak. Így az osztódásban és szövetgyarapodásban a NES-nek, a gyökér indukcióban az IES-nek és indol-vajsavnak (IVS), a kallusz szövetgyarapodásában a szintetikus 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavnak (2,4-D) tulajdonítottak kiemelkedő szerepet. Később ismertté vált, hogy sem a sejtnövekedést, sem a sejtosztódást, a differenciálódást és az organizálódást nem egyes exogén hormonok, hanem ezek interakciói okozzák, amelyek a sejtek endogén hormonszintjét, illetve ennek arányát változtatják meg. Ezt a feltételezést

alátámasztotta az 1950-es évek közepétől felismert gibberellinhatás is, amely elsősorban a szövettényészetek szervképzésében nyilvánult meg. A hormonális interakciók létét és szerepét azután az 1955-ben felfedezett DNS-ből származó műtermék kinetinnel vagy a későbbben felismert természetes citokininekkel (zeatin, izopentenil-adenozin) végzett kísérletek is bizonyították. Egyes növényfajok szövettényészetében az auxinok és citokininek exogén interakcióival a sejtek dedifferenciálódásától az osztódáson és organizálódáson át a teljes növény regenerálódását indukálni tudták. Ezzel a hetvenes évek elejére a szerv- és szövettényésztésen túl az egyes sejtek tenyésztéséhez, a sejtekből és pollenből kiinduló organogenezishez és embriogenezishez, valamint az intakt növény regeneráltatásának szabályozásáig sikerült eljutni. Így a növényi sejtek totipotenciája teljes bizonyítást nyert. Az újabb kutatási eredmények a redifferenciálódást kiváltó tényezők között nemcsak a fitohormonokat tartják számon, hanem fontos jelentőséget tulajdonítanak az adott faj genotípusának is.

A molekuláris biológia hatása a szövettényésztésre: a növényi szövettényésztés harmadik alapvető tényezőjének a molekuláris biológia (molekuláris genetika) kialakulását tartják. A molekuláris biológia az egyes életjelenségeket molekuláris szinten vizsgálja, és arra keres választ, hogy azok hogyan vezethetők vissza az élőt alkotó molekulák, főként a makromolekulák szerkezetére, fizikai és kémiai tulajdonságaira. A múlt század negyvenes éveiben kialakult molekuláris biológia szerint az öröklés anyagi hordozója csak molekuláris lehet és a kromoszómák tartalmazzák valamilyen kód formájában az egyed jövőbeli fejlődésének és érett formában való működésének teljes sémáját. Ez az átfogó szemlélet a növényi szövettényésztésnek is új lendületet adott. A sejttől a szervezetig vezető morfogenetikai változások biokémiai hátterének, az indukált anyagcsere, az organogenezis és az embriogenezis összefüggéseinek megismerhetősége és különösen a genetikai manipuláció lehetősége, a szövettényésztést új szemlélet és új módszerek kialakítására készítette és ezzel eddig nem látott eredményeket ígért és hozott. A molekuláris biológiai szemlélet a szövettényésztés a molekuláris biológiának (molekuláris genetikának) egyik alapvető módszerévé vált.

Az a tény, hogy a növényi sejtek, szövetek a mikrobiológiában általánosan használt módszerekhez hasonlóan tenyészthetők, megteremtették annak lehetőségét, hogy a molekuláris genetikai módszereket a magasabb rendű növények genetikai kutatásaiban is alkalmazni lehessen. Biotechnológiai nézőpontból egyenlőségjelet kell tennünk a sejt és növény között. A növény-nemesítési eljárások egy részét tehát sejtszinten elvégezhetjük. A sejtszintű manipulációt követő redifferenciálódással a növény nemesítési alkalmazásának legnagyobb akadálya: a tenyészetek morfogenetikai képessége jelentős függőséget mutat a genotípustól, tápközegtől, a tenyészetek korától, a ploidszinttől, stb. Az univerzális rendszerek kidolgozása csak az egyedfejlődés és regulációja molekuláris mechanizmusának alapos ismerete esetén várható. A szövettényésztés növény-nemesítési alkalmazásának alapja tehát a növény – sejt – növény rendszer kidolgozása a különböző mezőgazdasági kultúrákra.

A növényi sejt- és szövettényésztésre alapozott sejtgenetika az a híd, amely a növénygenetika és a molekuláris genetika között napjainkig áthidalhatatlannak hitt szakadékot megszüntette.

3.2 Az izolált növényi részek anyagcseréje

Az izoláció miatt a növényi részek az intakt növénytől némileg eltérő anyagcserét mutatnak, ez az anyagcsere azonban ugyanúgy az élő növényi részek fenntartását és növekedését, fejlődését eredményezi, mint az intakt, korrelációval rendelkező növényben.

Táplálkozási anyagcsere vizsgálatok:

- az egyes tápanyagok milyen szerepet játszanak az izolált részek anyagcseréjében,
- a tápközegből esetleg hiányzó elemek hogyan befolyásolják a kultúrák anyagcseréjét, milyen szerves, kiegészítő adalékanyagok vagy biológiailag aktív vegyületek külső alkalmazására van szükség hatásuk pótlására.

A növényi *in vitro* kultúrák annál „komplettebb” tápközeget igényelnek, minél kisebb az organizációs szintjük (pl. kallusz szervkultúra).

A teljes tápközeg összetevői:

- ásványi (makro- és mikro-) elemek,
- nitrogén források,
- szénforrások,
- vitaminok,
- hormonok,
- növényi kivonatok.

Az összes szerves és szervetlen tápanyagot pótolni kell, ugyanis a nagy mennyiségű szénhidrát (glükóz, szacharóz) miatt az explantumok elvesztik autotrófiájukat még akkor is, ha klorofillt tartalmaznak. A jó növekedéshez a tápközeg és a tenyésztési feltételek megfelelő fizikai faktora (pH, levegő, fény, hőmérséklet) is szükségesek.

Szervetlen tápanyagok

Makroelemek: nitrogén (N), foszfor (P), kálium (K) esszenciálisak, akárcsak az intakt növényben, mellettük fontos még a kén (S), kalcium (Ca) és magnézium (Mg). Sokan vizsgálták hatásukat a tenyészetben, eltérő eredményeket kaptak. Általánosságban elmondhatjuk, hogy az ásványi elemek kezdeti összkoncentrációja megemelkedett (1000 mg/l-től 4-5000 mg/l-re). Ugyanazokat el lehet mondani a makroelemek szerepéről, mint amit a növényélettanból ismerünk, azaz:

N – sejtosztódásban, szövetek gyarapodásában, szervképzésben fontos;

P – a sejtek energiaforgalmában játszik szerepet;

K – a sejtmembránok működéséhez szükséges, fotoszintézishez, légzéshez kell.

Mikroelemek: enzimek alkotórészei,

Fe (vas) – a sejtek oxidatív metabolizmusában, egyes anyagok szintézisében, végeredményben a szövetek gyarapodásában fontos;

Cu (réz) – több oxidáz alkotórésze;

Mo (molibdén) – nitrát-reduktáz aktiválásában játszott szerepét ismerték fel;

Mn (mangán) – Mn-Mo kölcsönhatás: a mangán gátlólag hatott a paradicsomgyökerek növekedésére molibdén jelenlétében. Mg-Mn arány fontos, a mangán helyettesítheti a magnéziumot;

B (bór) – koncentrációja meghatározza az auxinszabályozó rendszerek természetes inhibitorainak szintjét, ami a növekedés regulációjának szempontjából lényeges;

I (jód) – növekedéshez szükséges;

Zn (cink) – auxinok bioszintézisének serkentése.

Nitrogénforrások

Különböző szerves és szervetlen nitrogén vegyület lehet, jónak bizonyultak: egyes aminosavak, kazein-hidrolizátum, pepton, élesztő- és maláta kivonat. Szervetlen nitrogén források: ammónium vagy nitrát forma lehet, melyik jobb még ma nem tisztázott, mindkettőt használják. Nitrogén forrás értékük elsősorban a pH függvénye. Szerves nitrogén források: elsősorban aminosavak, kazein-hidrolizátum, pepton, élesztőkivonat is gyakran hatásosnak bizonyult. Felvételüket és hasznosulásukat szintén döntően befolyásolja a pH-érték.

Szénhidrátforrások

Leggyakrabban alkalmazottak a cukrok (glükóz, fruktóz, szacharóz). Optimális koncentrációjuk: 0,5-3,0 % (de 0,015-10,0 % is lehet). A cukrokon kívül még szóba jöhetnek a poliszacharidok, alkoholok, szerves savak. Növekedésre gyakorolt hatásuk függ:

- koncentrációjuktól,
- a tápközeg pH-értékétől,
- a növény fajtától,
- a szövet természetétől.

Vitaminok

Egy részüket szintetizálja az izolált növényi rész, más részüket kívülről kell adagolni. Közülük elsősorban a B-vitamincsoport fontos, itt is a tiamin (B₁), nikotinsav (B₃) és piridoxin (B₆). Prosztetikus csoportjai vagy koenzimjei az élő sejtek anyagcseréjét befolyásoló enzimeknek. Jelentős még: a biotin (H) és a mezo-inozit. Nagyon kis mennyiségben szükségesek (0,001-0,1 mg/l). Serkentő hatásuk függ:

- a szövet típusától,
- koncentrációjuktól,
- környezeti viszonyoktól (pH, hőmérséklet, stb.).

Szabályozó anyagok (fitohormonok) szerepe:

Auxinok: a szövettényészetekben jelentősek – IES, IVS, NES, 2,4-D. Egy részük a szövetekben képződik, más részük mesterségesen előállított szintetikus vegyület. A sejtosztódásban (szövetgyarapodásban) játszanak szerepet. Kis koncentrációban szükségesek, hatásuk ettől függően erős (10^{-10} - 10^{-8} g/l), közepes (10^{-7} - 10^{-4} g/l) és gyenge (10^{-5} - 10^{-3} g/l). Általában az alacsony auxinszintek hajtás organizációt, a magas szintek gyökérképzést eredményeznek.

Citokininek: a kinetin, benzil-amino-purin (BAP) és zeatin a leggyakrabban használatosak, a sejtosztódást aktiválják, fokozzák a merisztematikus szövetek sejtjei működésének időtartamát, amit az auxinok és gibberellinek általában csökkentenek. Ezáltal a sejtek „öregedését” akadályozzák meg. A citokininek és auxinok aránya befolyásolja a tényészetekben lezajló organogenetikus változásokat:

citokinin > auxin = hajtásképzés

citokinin < auxin = kallusz, gyökérképződés

Szintén kis mennyiségben fejtik ki serkentő hatásukat (10^{-8} - 10^{-7} g/l), nagyobb mennyiségben gátlólag hatnak.

Gibberellinek: ma már mintegy 50 féle gibberellin hatású vegyület ismert, a GA₃ jelű gibberellinsav a leggyakrabban használatos. Szerepet játszik a sejtosztódás serkentésében, valamint mind a jarovizációt, mind a fotoperiodikus hatást helyettesíti.

A felsorolt fitohormonok hatásukat nem külön-külön, hanem együtt fejtik ki, interakcióik révén. A növekedésserkentő anyagok a következőkben ismertetésre kerülő egyéb anyagokkal komplexen gyakorolnak hatást a tenyésztés során izolált növényi részre.

A növényi szövettényészetekre ható egyéb anyagok

Kókusztej, vadgesztenye és kukorica magjának kivonata: embriótenyészetekben bizonyultak megfelelőnek, aránylag tömény koncentrációban (pl. kókusztej esetén 10-30 %-os).

Élesztőkivonat: általában már 1 g/l koncentrációban növekedésserkentő hatása van, amely feltehetőleg a B-vitaminok jelenlétével magyarázható.

Nukleinsavak, antibiotikumok: mind növekedés serkentőként, mind nitrogén- és szénforrásként kipróbálták a szövettényészetekben, azonban egyik szempontból sem mutattak kielégítő hatást.

Abszcizinsav: hatása ellentétes az auxinokkal és gibberellinokkal, ezek működését kompetitíve gátolja. A citokininekkel szinergizmust mutatott a kallusztényészetekben.

Gáz halmaz állapotú etilén: a sejteket állandó növekedési fázisban tartja és akadályozza, hogy átmenjenek differenciálódás fázisába (búza kallusztényészetéhez adagolt AgNO₃ fokozta a hajtásregenerációt, az etilén megkötése révén).

3.3 A növényi sejt- és szövettenyésztések csoportosítása

Az izolált növényi részek tenyésztéséhez a tápközegek a tenyésztési módszerek és a folyamatos tenyészthetőség kidolgozása után, a szövettenyésztés vizsgálati objektumok elkülöníthetősége alapján az alábbi módon csoportosítható:

1. *in vitro* termékenyítés és embriókultúra,
2. generatív szervek kultúrái (ovulum, ovárium, pollen, endospermium),
3. vegetatív szervek kultúrái (gyökér, hajtás, levél, merisztéma),
4. kalluszkultúra,
5. sejtkultúra (szuszpenziós és szélesztett),
6. protoplasztkultúra,
7. géntechnológiai eljárások.

3.3.1 *In vitro* termékenyítés és embriókultúra

A növényvilágban nagy jelentőségű, hogy több faj saját virágporával nem termékenyíthető. Az idegen termékenyülés a genetikai variabilitást fokozza, ami végső soron a természetes kiválogatódás, az evolúció alapja. A fajok közti kereszteződések korlátai a különböző szinten megnyilvánuló inkompatibilitásból származnak (pl. a pollen nem csírázik ki a bibén, a pollentömlő növekedése megáll a bibeszálban, stb.). A különböző védekező mechanizmusok korlátok közé szorítják az öntermékenyülést és határt szabnak a fajok egymással való kereszteződésének, bár ezzel segítik elő a fajok fennmaradását és életképességének növekedését, mégis sokszor akadályozzák a növénynemesítők munkáját. A termékenyülést gátló inkompatibilitási tényezők kizárásának egyik módja lehet az *in vitro* termékenyítés, amelyet a növénynemesítés következő területein alkalmazhatjuk sikerrel:

- faj- és nemzetséghibridek létrehozása,
- öninkompatibilitás leküzdése,
- haploid indukció,
- fiziológiai vizsgálatok végzése kontrollált körülmények között.

A megtermékenyítés bonyolult, több lépésből álló folyamat, *in vitro* történő végrehajtásánál sok szempontot kell figyelembe venni, melyek közül a legfontosabbak:

- a pollen és a magkezdemények megfelelő stádiumban legyenek,
- a tápközeg megválasztása,
- az alkalmazott módszer (pl. izolált magkezdemények beporzása, izolált termő beporzása bibén keresztül, stb.).

Az *in vitro* termékenyítési folyamat a következő:

a magház (ovárium) kireparálása, a magkezdemény (ovulum) és vele együtt egy kis placentadarab izolálása, táptalajra helyezése. Virágporgyűjtés, táptalajon pollentömlő hajtatás. Átoltás az ovulumot tartalmazó tenyésztetre, termékenyítés. A kapott embriót ezután embriókultúrában neveljük fel.

A magasabb rendű növények embriói a petesejt megtermékenyülése után a női ivarú gametofiton speciális szöveteibe ágyazva növekednek és fejlődnek. Az embriótenyésztési

technika egyre tökéletesebbé vált, bővültek azok az ismeretek, amelyek lehetővé tették a módszernek a gyakorlati alkalmazását.

Az embriókultúrákat az izolált embriók fejlettsége és a tenyésztési cél alapján a következőképpen csoportosíthatjuk:

1., Pregerminál kultúrák: a petesejt megtermékenyül az életképes csírák kialakulásának valamilyen akadálya van. Cél: a normális embriófejlődést akadályozó endogén és exogén faktorok hatásának kiküszöbölésén keresztül életképes növények felnevelése. Felhasználási terület:

- faj- és nemzetségkeresztezés,
- beltenyésztés (öntermékenyítés),
- minden olyan esetben, amikor a normális embriógenézisnek valamilyen akadálya van.

2., Posztgerminál kultúrák: a petesejt megtermékenyül, az életképes embrió kialakul, a csírázás azonban akadályozott. Cél: a normális csírázást akadályozó külső és belső tényezők kiküszöbölése, életképes növény felnevelése. Felhasználási terület:

- a generációváltás meggyorsítása,
- mutagén és hormonkezelés,
- minden más esetben, ahol a normális csírázás akadályozott.

Az embriókultúrák létrehozásának módja:

a sterilizett növényi részből a különböző fejlődési stádiumban lévő embriót kipreparáljuk, táptalajra helyezzük, amelyben az embriófejlődést befolyásoló ozmózisnyomást a nagy mennyiségű szénhidrát (az embrió fejlettségétől függően 1-20 %) biztosítja. Minél fiatalabb az embrió, annál differenciáltabb táptalaj szükséges a növekedéséhez és fejlődéséhez.

3.3.2 Generatív szervek kultúrái

Virágtenyészetek: magát a virág *in vitro* kultúráját a virágszerveződés, termés- és magérés, valamint az általános hisztogenetikus (szövetfejlődési) és organogenetikus (szervfejlődési) differenciálódás vizsgálata során használják. Nagyobb jelentősége van a virágrészek tenyészeinek (portok, pollen, ovárium, ovulum).

Portok (anthera), pollen kultúrák: a haploidok genetikai és növénynemesítési jelentőségét régóta ismerik. Az alkalmazásának lehetősége azonban korlátozott volt, mivel a természetben mindössze 0,001-0,01 %-ban fordulnak elő a spontán haploid növények, amelyek a partenogenezis folyamata során keletkeznek (embriófejlődés a megtermékenyítetlen petesejtből). Az anthera kultúrákból nyert haploid növények jelentősége egyre növekszik, számos gazdaságilag fontos növénynél kialakították a haploid indukció technikáját. Az *in vitro* androgenezis folyamata során a fejlődésben levő, egysejtmagvas vakuólos pollenszemet (mikrospóra) izoláljuk. A mikrosporogenezisnek ebben a korai szakaszában a továbbfejlődés még nem determinált. Az izolálást követően, átmenet a gametofita fejlődésből a sporofita irányba, általában néhány órától néhány napig tarthat a fajtól, hőmérséklettől, a sporofita fejlődés típusától, stb. függően. A sporofita osztódások

során, minden esetben soksejtes pollenszemek alakulnak ki a portokokban. Vannak ettől eltérő fejlődési formák, amelyek azonban nem vezetnek embrió, vagy növény kialakulásához. A fentieknek megfelelően nem minden mikrospórából differenciálódik haploid növény. A pollen dimorfizmus alapján a polleneket két csoportba sorolhatjuk:

1. normál,
2. P (parthenogenetic).

Potenciálisan a második típus alkalmas arra, hogy belőle növény regenerálódjon. Ezek kis százalékban találhatók a portokokban, ezért nagyon nagy mennyiségű portokot kell izolálni ahhoz, hogy elegendő haploid növényt kapjunk. A soksejtmagvas pollen két irányban fejlődhet tovább:

1. pollen-embriógenézis vagy
2. pollenkallusz és organogenezis indukciójával nevelhetők fel haploid növények.

Sok esetben azonban nemcsak haploid, hanem különböző poliploid növények fejlődnek a pollenekből portokkultúrákban.

Az androgenetikus haploidok jelentősége elsősorban növénynemesítésben: belőlük rediploidizációval „homozigóta” stabil, további szelekciót nem igénylő diploid (dihaploid) növények állíthatók elő. Ezáltal a beltenyésztett vonalak előállítási ideje lecsökken. A rediploidizáció folyamata spontán vagy kémiai szerekkel (pl. kolhicin) indukálva játszódhat le. A haploidok további jelentőségei:

- bizonyított a haploid sejtek totipotenciája,
- az androgenézis citológiai, élettani, stb. vizsgálatának lehetősége.

Ovárium, ovula kultúrák: hasonlóak az anthera kultúrákhoz, a haploid növényeket a fejlődésben levő ovulából állítjuk elő.

A portok és ovárium kultúrák létesítése: mikroszkópi vizsgálatok után a megfelelő fejlődési stádiumban levő bimbók begyűjtése, sterilizése. A steril bimbókból izolálás (portok, ovárium) táptalajra, amelyben az embriókultúrákhoz hasonlóan a megfelelő ozmózisnyomást biztosítani kell (10-12 % szacharóz). A kultúrák fejlődéséhez általában fény nem szükséges.

3.3.3 Vegetatív szervek kultúrái

Célszerű a felületileg sterilizett magokból kiindulni, amelyekből *in vitro*, aszeptikus körülmények között csíranövényeket kapunk. A növények megfelelő részei kerülnek felhasználásra a tenyészetek inicializálásakor.

Gyökértenyészetek: a szervtenyészetek közül a gyökérizolációkkal értek el legelőször sikereket. Jelentősége: a kezdeti tenyésztetőségi kérdésről az élettani problémák vizsgálata felé terelődött el (gyökerek növekedése, morfológiai változások, tápanyagok felvétele, környezeti tényezők hatásai, stb.). Aszeptikus körülmények között csíráztatott növénykéek gyökere az izolátum. Agarral szilárdított vagy folyékony tápközegen nevelhető. A gyökércsúcs merisztéma sejtjeinek működése, majd a szállítószöveti kambiumok sejtjei is szerepet játszanak a növekedésben. Az élettani vizsgálatok során nem kalluszosodik el a gyökér, hanem sejtjei, szövetei megtartják eredeti struktúrájukat. Növényregenerációval ritkán találkozunk.

Hagymából, gumóból létrehozott kultúrák: járulékos hajtások és egyéb szervek képződése a rügy- vagy gyökér primordiumokat nem tartalmazó növényi részekből. Történhet az inokulum elkalluszosodása után kalluszból, célszerű azonban a genetikai variabilitások kiküszöbölése miatt a kallusz állapotot kihagyni. A tenyésztés során elsősorban a fitohormonoknak van jelentősége: mérsékelt koncentrációban (1-3 mg/l) szükségesek az auxinok és citokininek. A képződött hajtásokat meggyökereztetik, a járulékos hagymák, gumók esetén nem feltétlen kell gyökereztetni, viszont fontos figyelembe venni a nyugalmi állapot biztosításához szükséges tényezőket. Jelentősége a mikroszaporításban van.

Hajtástenyészetek: a növény föld feletti része apikális csúcsának izolátuma. Célunk a tenyésztés során: a hajtáscsúcs merisztéma hisztogenetikus és organogenetikus differenciálódásának vizsgálata, a gyökér és egyéb szervek korrelációjától mentesen. Sterilen csíráztatott illetve hajtattott növényekből izoláljuk a tenyészeteket. Komplikáltabb tápközeget igényelnek, mint pl. a gyökértenyészetek.

Levélkultúrák: hasonlóak a hajtástenyészetekhez, izolátum az aszeptikusan nevelt növények lomblevél kezdeménye (a primer lomblevél primordium a legjobb). A tenyésztés célja is hasonló az előbbihez, ami kiegészül a növényregenerációval, szomatikus organo- illetve embriógenézis útján. A tenyészetekben fejlődő levelek szállítószövetrendszerében található osztódószövet (levélérkambium) fejlődése vezet a redifferenciálódáshoz.

Merisztématenyészetek: merisztématikus gócból indulunk ki, amelyek a gyökércsúcson, levélhónaljakban, hajtáscsúcsokon helyezkednek el. Nemcsak az *in vitro* csíranövényekből izolálhatunk, hanem az *in vivo* felneveltekből is. Jelentősége a mikroszaporításban van: meriklónos növény szaporítás (merisztéma + klón), vírusmentesítés. Az intenzíven osztódó, fiatal merisztématikus sejtek nem fertőződtek meg vírussal, ezért a 0,2-0,5 mm-es tenyésztőcsúcsot izolálva, hormont tartalmazó vagy anélküli táptalajon tenyésztve kapunk vírusmentes növény egyedeket. (A preparálás előtti hőkezelés 39 °C-on a vírusszaporodást csökkenti, több lesz a vírusmentes sejt.) Egy tenyésztőcsúcsból számos járulékos hajtáscsúcs képződik, ami fajonként változó lehet: 5-50 db. Az organogenezis útján keletkezett hajtásokat egyenként a gyökereztető tápközegre oltjuk át, ami kis mennyiségű auxint tartalmaz vagy hormonmentes. A meggyökeresedett hajtásokat a szabadföldbe kiültetés előtt edzetni kell: fokozatos hőmérsékletcsökkentés (22-25 °C-ról 16-18 °C-ra), páratartalom csökkentése, megvilágítás csökkentése vagy növelése, attól függően, hogy fényben vagy sötétben történt-e a tenyésztés. Az előbbieket leggyakrabban üvegházban vagy klímakamrában végezhetjük el. Léteznek speciális mikroszaporító berendezések, ilyen pl. a magyar gyártmányú „Clonmatic”. Ezek egy átalakított lamináris boxból és a hozzacsatolt különböző kiegészítő berendezésekből állnak (pl. kis méretű szállítószalagon mozognak a sterilizett műanyag edények, így a dolgozónak nem kell elmozdulnia munka közben a lamináris boxból). A mikroszaporítási technikát kidolgozták már több dísz- és gazdasági növényfajra (pl. gerbera, orchidea, burgonya, stb.).

3.3.4 Kallusztenyészetek

A nem differenciált, vagy még inkább a differenciált szövetekből származó növényi tenyészeteket számítjuk ide, amelyek megtartják merisztémás, kallusz jellegüket. Ezeket tekinthetjük a szoros értelemben vett szövettenyészeteknek. Ezekben a tenyészetekben általában megkívánják, hogy ne differenciálódjanak szövetrendszerekké, illetve organizációjuk elmaradjon, és legfeljebb a tápanyag felvétele és szállítása miatt alakul ki többféle sejttípus. Természetesen sokszor megtörténik, sőt egyes vegyületekkel tudatosan előidézhető, ennek a homogén sejttömegnek az organizációja és ilyenkor gyökér- és hajtáskezdemények jelennek meg rajta, sőt teljes növényké is keletkezhetnek belőle.

A kallusztenyészet tehát a differenciálódott sejtek halmazából áll. Az izolálásra kivágott növényi rész bármilyen eredetű szövet lehet, amely nem állandósult, azaz osztódásra, proliferációra alkalmas sejtekből áll. Rendszerint a parenchimasejtek alkalmasak erre, melyek a kambialis vagy merisztémás zónák közelében vannak, de a fa és hancs fiatal sejtei is képezhetik a kiindulási anyagot. Az egyes növényfajok szövetei gyenge kalluszosodást mutathatnak a táptalajra helyezés után. Az intenzív kalluszképződés megindításához a szövetek belső auxinszintjét lényegesen meghaladó külső auxinkoncentráció szükséges. A kalluszosodás mind természetes – IES – mind szintetikus – 2,4-D, NES – auxinokkal kiváltható és fenntartható folyamat. A kétszikű növények szöveteinek kalluszosításakor a citokininek – kinetin, BAP – egy optimális koncentrációig általában fokozzák az auxinok által létrehozott kalluszosodást. Ezzel szemben a gabonafélék kallusztenyészeit nem serkenthetők citokininekkal. Ezek a vegyületek különböző mértékű gátló hatást gyakorolnak az egyszikű növények kalluszainak növekedésére.

Az inokulumból, a tenyészetbe vitt szövetekből, kinőtt ún. elsődleges kallusz szövetek friss táptalajra olthatók. A kallusz szövetek táplálékigénye különböző lehet. Egyes kultúrákat olyan egyszerű tápközegen is lehet tenyészteni, amely csak szervetlen sókat és cukrokat tartalmaz. Más esetekben a tápközeget fel kell javítani vitaminok, auxinok, aminosavak vagy más szerves anyagok hozzáadásával. A tenyészetek többszöri átoltással – passzálassal – folyamatosan fenntarthatók. A viszonylag gazdag táptalajon a kalluszosodást követő dedifferenciálódással párhuzamosan a sejtfunkciók egy része kikapcsolódik, illetve megváltozik. Az anyagszereutak egy része szükségtelenné válik. Ilyenkor pl. a kifehéredő szövetekben a fotoszintetikus folyamatok leállása figyelhető meg.

Különleges tenyésztési körülmények szükségesek a zöld, fotoszintetizáló szövet-kultúrák létrehozásához. A továbbtenyésztés során a látszólag homogén sejtpopulációban eltérő sejttípusokat találhatunk. A különbözőségeknek több oka van:

- a kallusz eredete,
- a kultúra inkubációs időtartama,
- a tápközeg összetétele,
- a tenyésztés fizikai körülményei (fény, hő, stb.),
- a vizsgált szövetrészt.

A kallusztenyészetek dedifferenciált sejtei a legkiterjedtebben használt sejttípusok az *in vitro* kultúrákkal végzett kísérletekben. Ennek oka egyrészt az, hogy a kalluszosodás folyamata bizonyos ideig és meghatározott feltételek mellett visszafordítható. A kallusz szövetekben újraindítható a differenciálódás folyamata. További okként említhetjük, hogy a

kalluszosodás sok esetben elkerülhetetlen, pl. ha nem osztódó sejtekben az osztódást indukálni akarjuk, ami a tenyészetek kialakításának feltétele. Ebből következik, hogy a sejtgenetikai kutatásokban a dedifferenciált kalluszsejt a leggyakrabban használt sejtípus. Genetikai szempontból a kallusztenyészetek a tenyésztési idő növekedésének függvényében fokozódó heterogenitást mutatnak. Ez főként az aneuploid vagy poliploid sejtek felszaporodásában nyilvánul meg. A tenyészetek táptalajában levő hormonokról – pl. 2,4-D, 2,4,5-T – bebizonyosodott, hogy mutagén hatásúak. A kallusz szövetekben spontán kialakult genetikai heterogenitás bizonyos határok között kiindulási alapot adhat új genotípusok szelekciójához. Ugyanakkor, mint ellenőrizhetetlen tényező, megnehezíti az ezekkel a sejtekkel végzett genetikai jellegű vizsgálatokat. Célszerű ezért a frissen indított, elsődleges tenyészeteket használni. A kallusztenyészetek nem alkalmasak egy-egy genotípus megőrzésére. A kalluszsejtek által képviselt variánsok genetikai stabilizálását a kallusz szövetből regenerált növények segítségével biztosíthatjuk.

3.3.5 Sejtkultúrák

A növényi részek tenyésztésének egyik eredménye az egyes sejtek izolálásának és nevelésének módszere. Ezzel elérhetjük azt, hogy olyan sejt- és szövetklónokat nyerünk, amelyek egy sejtől indulnak ki, s egy sejtől teljes növényt organizáltathatunk.

Az agaros táptalaj felszínén nevelt kallusz szövetek számos szempontból nem tekinthetők ideális kísérleti objektumnak. Elsősorban azért, mert az ilyen tenyészetek eltérő típusú sejtekből állnak, azaz heterogének. Az intenzíven osztódó merisztématikus gócok és a nem osztódó, vakuolizált sejtek lényegesen különböző anyagcsere-állapotot képviselnek. A sejteknek csak egy része érintkezik közvetlenül a táptalajjal, így a szövet különböző részei eltérő módon reagálnak a táptalajba adott hatóanyagokra és nem teszik lehetővé az elkülönített sejtekre alapozott módszerek alkalmazását. Az említett hátrányok kiküszöbölését szolgálja a sejtszuspenziós tenyészetek létesítése. Izolátum lehet bármilyen – elsősorban merisztématikus – növényi rész vagy az ebből indukált kallusz. A kallusz szövetek folyadék kultúrába helyezésével, majd folyamatos rázatásával elérhető a sejtek leválása, elkülönülése, majd sejtszuspenzió kialakulása. A megfelelő növekedési ütemet mutató, homogén sejttenyészet létrehozása sejtípusonként különböző ideig tartó adaptációs periódust igényel. Célszerű a tenyészeteket magas sejtrendzítással indítani és 3-5 naponként friss táptalajba helyezni. A sejtkultúrák növekedését leggyakrabban a sejtek száraztömegével, vagy a térfogatra eső sejtszámmal jellemzik. A táptalaj összetételére, a hormonok jelenlétére a kallusz szövetekhez hasonló módon reagálnak. A tenyészetek növekedésére jellemző, hogy 1-2 napos várakozási (lag) periódus után a növekedés felgyorsul (logaritmus szakasz), majd az utolsó ún. nyugalmi (stacioner) szakasz elérése után a száraztömeg lényegesen nem változik. Létrehozhatók olyan sejtkultúrák, amelyeket elsősorban különálló sejtek vagy kevés számú sejtől álló kolóniák alkotnak. Az elkülönült sejtek nem minden növény szuspenziós kultúráiban képesek osztódni (pl. a búza vagy rizs sejtszuspenziókban az osztódás csak soksejtes aggregátumokban figyelhető meg).

A növény – sejt – növény rendszer alapja az izolált, különálló sejtek tenyésztése, majd ezt követően a növénygeneráció. Az egysejttenyészeteket a szuszpenziós tenyészetek agarlemezre történő szélesztésével állíthatjuk elő. Itt a mikrobiológiában bevált módszereket alkalmazva, a mikroorganizmusokhoz hasonlóan kezelhetjük a szoliter növényi sejteket. Megvan tehát a lehetőség pl. a mutánsizolálásra, genetikai manipulációk elvégzésére.

A növényi szuszpenziós tenyészetek sejtjei lényegében dedifferenciált kalluszsejtek. Ennek ellenére a sejttypus megválasztásával, valamint a megfelelő tenyésztési feltételek biztosításával elérhető, hogy a speciális funkciók fennmaradjanak, illetve, hogy a másodlagos anyagcseretermékek szintézise folytatódjék. Ez lehetőséget ad arra, hogy alkaloidokat – hioszciamin, szkopolamin, morfin – szintetizáló sejt vonalakat állítsunk elő. Világszerte kiterjedt kutatásokat folytatnak a sejt kultúrákban termelt, biológiailag aktív vegyületek hozamának fokozására, hogy ezzel a növényi sejtekre alapozott fermentációs ipar alapjait megteremtsek.

3.3.6 Protoplaszt kultúrák

Az utóbbi néhány évtizedekben jelentős haladást figyelhettünk meg a prokarioták genetikai módosítása terén. A transzdukció és transzformáció, mint a genetikai manipuláció módszerei széles körben elterjedten használatosak a mikroorganizmusok esetében. Az eukariota szervezeteknél a genetikai anyag átvitelének hagyományos módja a szexuális hibridizáció. Így a növények genetikai variabilitása fokozásának egyik módja a hibridizáció. A növényi sejtekre alapozott nemesítési technikák lehetővé teszik a távoli fajok közti keresztezést a szomatikus hibridizáció útján, amelynek révén a prokarioták genetikai manipulációja során alkalmazott módszerek felhasználhatóvá válnak.

A protoplasztok fogalma már régóta nem ismeretlen a biológiában, pontos meghatározás azonban több is létezik. Mindegyik definíció tartalmazza azt, hogy élő maggal és organelumokkal rendelkező plazmaegységről van szó. Ebben az értelemben az állati sejtek felfoghatók protoplasztként is. Ma a növényi protoplasztok alatt a különböző növényekből izolált, falaitól megfosztott, lecsupaszított sejteket értjük, amelyek megfelelő körülmények között, mesterséges tápközegen növekedni, osztódni képesek és belőlük szövetek, szervek vagy teljes növények fejlődnek. A növényi sejteket határoló poliszacharid sejtfal védőburkot képez a sejtmembrán és a citoplazma körül. Korlátozza vagy megakadályozza, hogy nagy molekulású vegyületek, különböző méretű részecskék elérjék a külső sejtmembránt és a citoplazmába jussanak. A sejtfal eltávolításával ez a védelmet biztosító gát megszűnik. A sejtmembrán közvetlen hozzáférhetővé, nyitottá válik számos beavatkozással szemben. A növényi sejtfal mesterséges eltávolításának egyik célja az, hogy így kedvező feltételeket biztosítsunk a genetikai rendszer megváltoztatását célzó módszerek alkalmazásához. Ugyanakkor a sejtmembrán szabaddá tétele új utakat nyit a membránstruktúra és -funkció tanulmányozására. A sejtfal eltávolításával könnyebbé válik a különböző sejtorganelumok – sejtmagok, kloroplasztizok – károsodásmentes izolálása.

A sejtfal eltávolításának többféle módszere ismert. Kezdetben a növényi protoplasztok izolálása a plazmolizált sejteket tartalmazó szövetek feldarabolása útján történt. Azonban így

is csak bizonyos sejttípusokra korlátozva és kis mennyiségben sikerült protoplasztokat nyerni. Alapvető előrelépést a sejtfalbontó enzimek felhasználása jelentett.

A növényi sejtfal főbb alkotórészeinek megfelelően cellulázok és hemicellulázok segítségével történik a sejtfal enzimatis lebonatása. Az izolálás hatékonyságát jelentősen növeli a szövetek fellazítására használt pektináz jelenléte. Az említett enzimeket általában egyszerre, enzimkeverékként alkalmazzák növényfajonként és sejttípusonként változó koncentrációban (0,5-2,0 %). A sejtfal eltávolításában egyidejűleg ozmotikusan stabilizálni kell a membránnal határolt sejteket. Ozmotikumként mannitot, szorbitot, glükózt (0,4-0,6 M), illetve sókat alkalmazhatunk. A membrán stabilizálására az izoláló oldatok Ca^{2+} -t tartalmaznak, pH-juk 5-6 értékű. Az enzimkezelés történhet táptalaj jelenlétében, ami kedvezően befolyásolja a protoplasztok életképességét.

Protoplasztokat nyerhetünk közvetlenül a növény különböző szerveiből. Gyakran a levelek szolgálnak protoplaszt forrásként. Az epidermisz eltávolítása után nagyszámú levélprotoplaszt izolálható 2-8 órás enzimkezeléssel. Vékony csíkokra vágott gyökér- vagy hajtás tenyészőcsúcsok sejtszi szintén felhasználhatók protoplaszt izolálásra. Protoplasztokat könnyen és nagy hatékonysággal kaphatunk tenyésztett növényi sejtekből. Szuszpenziós kultúrában fenntartott és intenzíven osztódó sejteket az izoláló enzimoldattal inkubálva nagy mennyiségű homogén protoplaszt nyerhető. Szobahőmérsékleten a sejtfal teljes eltávolításához szükséges idő sejttípusonként 6-24 óra között változik. A frissen izolált protoplasztok az enzimoldatból történt kimosás után a genetikai manipulációs kísérletekben használhatók, majd táptalajon tenyészthetők.

Az enzimkezelés megszüntetése után a protoplasztok a tenyészoldatban új sejtfalat szintetizálnak. A sejtfal regenerálása általában valamennyi protoplaszt típusnál az enzim hatásának felfüggesztése után azonnal megindul. A további tenyészthetőséget elsősorban az újonnan kialakult sejtek osztódási képessége határozza meg. A megfelelő sejtosztódási gyakoriság biztosítása növényfajonként és sejttípusonként eltérő, bizonyos fokú optimalizálást igényel mind a tenyészoldat összetevőit, mind a külső környezeti feltételeket illetően. Sokszor osztódó sejtekben gazdag növényi részekből, így pl. embriókból vagy hajtás merisztémákból nyerhetünk tenyésztésre alkalmas protoplasztokat.

A genetikai manipulációk elvégzése után a protoplasztokat szilárd táptalajra széleszthetjük, melyekből kallusz szövet képződik. A kalluszból embrió- vagy organogenezis útján növényeket regenerálhatunk.

A mai genetikai kutatásokban kiemelt szerepet játszanak a sejttenyészetek, azaz a kísérleteket a növényi sejtek szintjén végzik el, majd ezt követően vizsgálják a tulajdonság organum szintű kifejeződését. A kallusz, mint dedifferenciált sejtömeg nem stabil szövet, az egyes passzálások során a sejtek genomja megváltozik, még akkor is, ha az eredetivel megegyező tenyésztési körülmények közé kerül. A szomaklonális variabilitásnak több forrása lehet. Ezek:

- 25-30 %-ban az eredeti sejtekben meglevő szomaklonális variabilitás (poliszomatikuság): endopoliploidia, mutáció, stb.
- 70-75%-ban az *in vitro* tenyésztés eredménye: kariotípusváltozások, kromoszóma átrendeződések, molekuláris változások.

A protoplasztokultúrákban, illetve a belőlük inicializált növényi sejt kultúrákban a genetikai variabilitás fokozásának módszere, a véletlenszerűen fellépő szomaklonális variabilitás mellett: a protoplasztok fúziója. A fúzió során kapott hibrid paraszexuális, ugyanis az ivaros folyamatok kikerülése útján keletkezett.

A negatív elektromos töltést hordozó protoplasztok között a spontán egybeolvadás kevés kivételtől eltekintve ritka jelenség. A membránfelületek közvetlen molekuláris kapcsolatának kialakulásához a töltésviszonyok módosítása szükséges. Lényegében ezt szolgálják a különböző fúziós módszerek. Legáltalánosabban a Ca^{2+} jelenlétében végzett polietilén-glikol (PEG) kezelés hatására a protoplasztok szorosan összetapadnak. A gyengén negatív polaritású PEG molekula hidrogénhid-kötéssel kapcsolódhat a víz, a fehérjék és a szénhidrátok megfelelő molekularészleteihez és ezáltal molekulahidat képez a protoplasztok között. A PEG kapcsolódhat a Ca^{2+} -hoz is. Így a protoplaszt negatív töltéshelyeire kötődve a Ca^{2+} fokozhatja a PEG által kiváltott összetapadást. Az összetapadt protoplasztok között lehetővé válik a membránok fúziója. A hőmérséklet emelésével megnő a fuzionált protoplasztok száma, illetve lerövidül a fúzióhoz szükséges idő. A membránfúzió eredményeképpen megtörténhet a protoplasztok egybeolvadása, a citoplazmák keveredhetnek egymással. Kialakul a fuzionált protoplaszt, amely a táptalajban először új sejtfalat szintetizál, majd többszöri osztódással többsejtes kolóniát képez. A PEG által indukált fúzió gyakorisága általában 2-10 %, de elérheti a 30-40 %-ot is. A protoplasztok fuzionálására használatos fizikai módszer, amelynek során a protoplasztok negatív töltését elektromos árammal változtatják meg, majd ezután egyenáramú impulzus révén játszódik le a fúzió.

A fúzió fiziko-kémiai folyamat, nincs evolúciós határ a fúziós partnerek között, azaz nemcsak növényi sejtek között, hanem baktériumok, gombák, emlős sejtek között is létrejöhet. Beszámoltak már élesztő-protoplasztok és csirke vörösvérsejtek, növényi protoplasztok és emlős sejtek fuzionáltatásáról. A protoplasztfúziót követően kialakulnak a heteroplazmás sejtek. Az eltérő szülői sejtmagokat tartalmazó hibrid sejteket – ha a sejtmagok nem olvadnak össze – heterokarionoknak nevezzük. Ha a fúzióban azonos protoplasztok vesznek részt, homokarionokról beszélünk. Amennyiben a citoplazmán kívül összeolvad a sejtmag is, szinkarionokat kapunk.

A hibrid sejtekben az egyik szülő vagy mindkettő kromoszómái részben vagy teljesen elveszhetnek. Fontos a szinkron mitózis, ekkor van esély arra, hogy mindkét sejtmag kromoszómái megmaradjanak, valamint a szinkarionok kialakuljanak.

A fúzió után a szomatikus hibrideket azonosítani kell, ugyanis a tenyészetek eltérő genotípusú sejteket tartalmaznak. A két szülői sejt mellett viszonylag kis gyakorisággal vannak jelen a fuzionált sejtek, melyek közül csak néhány képes osztódásra. Ezért a szomatikus sejthibridek vizsgálatához a fuzionált sejteket ki kell szelektálni a kevert sejtpopulációkból. A szelekcióra több lehetőség adott, ilyenek:

- a fuzionált sejtek kiemelése,
- hormonautotrófián alapuló szelekció (a hibrid sejtek fitohormonképző képességükkel eltérnek a szülőktől, így a hormonmentes tápközegen felnevelhetők),

- a hibridek szelekciója a klorofilmutáns (albinó) és a zöld növény protoplasztjainak fúziója után (a fúziós termék és a zöld szülő később morfológiai tulajdonságok alapján különböztethető meg),

- citoplazmás bélyegek alapján (pl. az antibiotikum rezisztencia),

- irreverzibilis anyagcseregátlók alkalmazása a szülői sejtek kizárására (a hibrid sejtben az egyik szülő kikapcsolt bioszintetikus útja a másik fúziós partner enzimeitől révén biztosított, így csak a fúzióval egyesített sejtek maradnak életben).

A növényi protoplasztok mezőgazdasági felhasználásának lehetőségei:

- inkompatibilitás és rokonságilag távoli növények protoplasztjainak fúziója révén szomatikus paraszexuális hibridek előállítása;

- nitrogén-fixáló baktériumok és kék-zöld algák nem hüvelyes növények protoplasztjaiba való bejuttatása;

- extrakromoszomális (citoplazmás) jellegek kutatása (ivaros hibridizáció során az anyától származik a citoplazma és a benne lévő organellumok – kloroplasztisz, mitokondrium – fuzionált sejteknél keveredik a szülők citoplazmája. A citoplazmatikus hibrid – cibrid. Az organellum átvitel révén növelhető a kórokozó toxinokkal szembeni rezisztencia – herbicidek – fotoszintetizációs rendszer javítása, stb.);

- mutánsok izolálása és detektálása;

- protoplasztkultúrákból klónok előállítása vegetatív szaporítás céljából;

- teljes vagy részleges genom bevitele (kromoszómák) transzformáció, mutáció, modifikáció kiváltása céljából különböző fajok protoplasztjaiba.

Ezekkel a lehetőségekkel azonban csak akkor számolhatunk, ha minden mezőgazdaságilag fontos növényfajra rendelkezésünkre áll a növény – sejt – növény rendszer.

3.3.7 Génátviteli technikák

A következő fejezetben leírt technikákat nemcsak mikroorganizmusokon, hanem növényi sejteken (pl. protoplasztokon, kalluszsejteken) is el lehet végezni. Ezért itt az ott ismertetett módszerekre – az ismételések elkerülése végett – nem térünk ki.

3.4 Irodalomjegyzék

Altman A. et al. (szerk.)(1999): Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht-Boston-London.

Bhojwani S.S.-Razdan M.K. (1983): Plant Tissue Culture – Theory and Practice, Amsterdam, Elsevier, p.25-372.

Dudits D. (1982): Fuzionált sejtek, hibrid növények. Akadémiai Kiadó, Bp. p.1-115.

Dudits D.-Heszky L. (2003): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.

Dudits D.-Maliga P.-Farkas G. (szerk.)(1979): Növényi sejtgenetikai és szövettenyésztési módszerek alkalmazása. Biológiai tanulmányok No.6. Akadémiai Kiadó, Bp.p.1-195.

Evans D.A.-Sharp W.R.-Ammirato P.V. (szerk.)(1986): Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4. Techniques and Applications. MacMillan Publ. Company, New York.

Hall R.D. (szerk.)(1999): Plant Cell Culture Protocols. Humana Press, Totowa.

Maróti M. (1976): A növényi szövettenyésztés alapjai. Akadémiai Kiadó, Bp. p.11-299.

Thorpe T.A. (szerk.)(1981): Plant Tissue Culture – Methods and Application in Agriculture. New York, Academic Press, p.21-272.

4. Géntechnológia („genetic engineering”)

4.1 A géntechnológia jelentősége a növénynemesítésben

A klasszikus nemesítési eljárások a növények teljes genom szintű génrekombinációs lehetőségeit használják ki. A növényi gének száma 10^4 - 10^5 nagyságrendű. Tehát nagyszámú növényből több generáción át kell kiválasztanunk a nekünk kedvező génrekombinációkat, a kedvező tulajdonságú növényeket. A hagyományos nemesítési munka nagyon időigényes.

A fúziós technikák során mesterségesen idézünk elő teljes sejtgenomok közti átrendeződést, rekombinációt.

A géntechnológia lehetővé teszi a növény tervezett megváltoztatását, a DNS-molekulák *in vitro* összekapcsolását. Segítségével a kiválasztott tulajdonságot hordozó DNS darabot, vagyis gént, izolálhatjuk és növényi sejtbe juttathatjuk. Pl. baktériumból átvihetünk herbicid-rezisztenciagént növénybe, egy vad fajtából vírusrezisztenciagént egy már elfogadott burgonyafajtába, stb. A génbevitel növényi sejtbe csak sejtszinten, helyesebben protoplaszt szintjén valósulhat meg. A manipulált protoplasztokból kell növényt regenerálni. Tehát a növényi genetikai manipuláció gyakorlati hasznának feltétele egy növény – protoplaszt – növény rendszer kidolgozása (szövettenyésztés). A rekombináns DNS-technika segítségével a nemesítés célzottabb lesz és a nemesítés ideje egyötödére, egytizedére csökkenthető. Természetesen a kötelezően előírt fajtaminósítás 3-5 éves idejét, egy új fajta elfogadásához nem rövidíthetjük le. Tehát a genetikai manipulációk segítségével tulajdonképpen egy új nemesítési alapanyagot állíthatunk elő *in vitro*.

A géntechnológiának jelentős hatása lesz a jövőben a nemesítésre és a vetőmag-szaporításra, haszna tulajdonképpen a vetőmagtermelő vállalatoknál az új fajtában realizálódik.

A géntechnológiai technikák bemutatása előtt tekintsünk át néhány molekuláris genetikai alapfogalmat.

4.2 A molekuláris genetika alapjai

A molekuláris genetika a sejtekből kivont örökítőanyaggal a DNS-sel (dezoxiribonukleinsav) dolgozik. A sejtekben a DNS összecsavarodott állapotban van jelen. Növényi sejtek DNS-e néhány cm-től néhány méterig terjedhet, az *Escherichia coli* baktériumban a mérete 1 mm.

Köztudott, hogy az életjelenségek, tulajdonságok kialakításában közvetlenül a fehérjék, enzimek vesznek részt. A különböző fehérjék szintéziséhez szükséges információ tárolása a sejt egy speciális molekulájában a DNS-ben történik. Vagyis közvetve ez szabja meg egy élőlény minden jellegzetességét, tulajdonságát.

Általánosan mondhatjuk, hogy a gén egyetlen tulajdonságot meghatározó DNS darab (szemszín, járás, növénynél pl. ráncos mag, virágszirom színe, herbicidrezisztencia, stb.).

Genetikai szempontból az élővilágot két nagy csoportra osztjuk:

- prokariotákra (baktérium, vírus, cianobaktérium),

- eukariotákra (élesztők, gombák, növény, állat, ember).

A prokariotáknak nincs maghártyával határolt sejtmagjuk. A kromoszómális DNS-t, mely baktériumokban általában egyetlen gyűrű alakú molekula, genoformának nevezzük. A baktériumokban gyakran előfordul egy vagy több gyűrű alakú DNS molekula, plazmid, mely néhány gént hordoz. A plazmidok általában valamilyen antibiotikum-rezisztenciagént hordoznak, nagyon fontos eszközei a molekuláris genetikának.

Az eukariotákban a DNS maghártyával körülvett sejtmagban található és lineáris kromoszómákká szerveződik. Egy kromoszóma egyetlen DNS molekula. A sejtmagi DNS-en kívül megtalálhatók az ún. extranukleáris DNS molekulák, a mitokondrium DNS és növényeknél a plasztisz DNS. Mindkettő gyűrű alakú.

A DNS molekula három komponensből áll:

- cukor (dezoxiribóz, ez egy 5 szénatomos cukormolekula, dezoxi, mert a kettes C-atomhoz OH helyett csak H kapcsolódik),
- foszforsav,
- bázisok, melyek nitrogén tartalmú gyűrűs vegyületek.

Négyféle bázis található a DNS-ben:

- citozin (C),
- guanin (G),
- adenin (A),
- timin (T).

J. Watson és F.Crick 1953-ban röntgendiffrakciós vizsgálatokkal állapították meg a DNS szerkezetét, megalkották a DNS háromdimenziós modelljét. Ezzel a felfedezéssel kezdődik a molekuláris genetika rohamos fejlődése, mindketten Nobel-díjat kaptak 1962-ben.

A DNS molekulában a cukor 1' szénatomjához (a DNS-t alkotó cukor szénatomjait vesszővel jelölik) kapcsolódik egy bázis és ezek a cukor-bázis ún. nukleozidok foszfodiészter kötéssel kapcsolódnak egymáshoz a 3'-5' szénatomon keresztül. Így mindig van egy 5'-foszfor és egy 3'-OH vég. A cukor-foszfátcsoportok és a bázisok együttesen egy nukleotidot alkotnak. A DNS szintézis folyamatában újonnan belépő nukleotid 5' helyzetben foszfodiészter kötéssel kapcsolódik az utolsó nukleotid 3' hidroxil-csoportjához. Tehát a szintézis mindig 5'-3' irányú.

A Watson-Crick modell szerint a DNS kettős spirál, hélix szerkezetű. A két egymást átfonó szál párhuzamosan fut, de ellenkező polaritással. Gerincét foszfátcsoportok és dezoxiribóz alkotja. A cukorgyűrűhöz kapcsolódnak befelé fordulva a bázisok. A C-nal szemben G, T-nel szemben A helyezkedik el. Vagyis a két szál komplementer. A komplementer szálakat elektrosztatikus kötések, gyenge hidrogénhidak kapcsolják össze.

A komplementaritás biztosítja, hogy a DNS változatlanul megy át az utódokba. A sejt osztódásakor ugyanis a két lánc elválik és a szétvált láncokkal szemben nukleotidokból komplementer szálak szintetizálódnak különböző enzimek segítségével. Mivel a szintézis során kiegészítő másolat (replika) keletkezik és az új molekula egyik szála a régi marad, a folyamatot szemikonzervatív replikációnak nevezzük.

A Watson-Crick modell ad magyarázatot arra, hogyan tárolhatja és adhatja tovább a DNS molekula a genetikai információt, mely végül a fehérjék szintézisében az aminosavak

sorrendjét és számát határozza meg. A fehérjék bioszintézisét a DNS csak közvetve irányítja. A bioszintézis két fő lépése a transzkripció és a transláció.

A transzkripció (átírás) során a fehérjemolekula felépítéséhez közvetlen mintául az ún. hírvívő, vagy messenger mRNS szolgál. Az átírás folyamatában a genetikai anyagról az információ áttevődik a mRNS-re (az RNS abban különbözik a DNS-től, hogy dezoxiribóz helyett ribóz, timin helyett uracil (U) található). Az átírást, a mRNS szintézisét az ún. RNS polimeráz enzim végzi, a DNS egyik szálát ($3' \rightarrow 5'$) használva templátként. A mRNS szintézise is $5' \rightarrow 3'$ irányú.

A transláció (fordítás) a riboszómák felületén megy végbe a citoplazmában. A riboszómák nukleinsav, r-RNS (riboszóma RNS) és fehérje komplexek. A transláció során a mRNS nukleotid sorrendjének megfelelő aminosav-sorrendű fehérje szintetizálódik. A translációhoz riboszómákra, mRNS-re, szállító transzfer, tRNS, a fehérjék építőköveire (aminosavak) és energiára van szükség.

A genetikai kód a nukleinsav – fehérje lefordítás kulcsa. A fehérjék aminosav-sorrendjét a DNS (illetve a vele komplementer mRNS) nukleotid bázis sorrendje határozza meg. Egy-egy aminosavat három nukleotidból álló kodon vagy triplet határoz meg. A négy nukleotid hármas kombinációja $4 \times 4 \times 4 = 64$ különböző tripletet ad. Mivel húsz aminosav van, egy aminosavat több triplet határozhat meg. Minden élőlényre igaz, hogy ugyanaz a három bázis egyféle aminosavat kódol.

Biokémiai vizsgálatokkal a 60-as években felállítják a kódszótárt (négy tudós kap Nobel-díjat). A kódszótár táblázatban mutatja, hogy a 20 aminosavat milyen mRNS-ben levő tripletok kódolják. A kódszótár univerzális, minden élőlényre igaz (az utóbbi időben az emberi és élesztő mitokondriális DNS-ében találtak más jelentésű tripleteteket). Az univerzalitás az alapja, hogy emberi, állati, növényi fehérjét kódoló géneket tudunk bevinni baktériumba vagy fordítva.

A fehérjeszintézisben az eukariota és a prokariota sejtben ugyanaz a háromfajta RNS vesz részt (mRNS, tRNS, rRNS).

Lényeges különbség azonban, hogy az eukariota sejtekben a fehérjét kódoló DNS nukleotidsorokat (exonokat) közéjük ékelődött intronok választják el. Az intronok a transzkripció során az ún. elsődleges, vagy heteronukleáris hnRNS-sé íródnak át. A hnRNS egy érésen megy keresztül, még a sejtmagon belül feldarabolódik, az intronok kivágódnak és fehérjévé már nem íródnak át. Tehát az intronok nem informatív jellegűek. Az értelmes információt nyújtó mRNS-darabok (exonok) újra összekapcsolódnak (splicing) és ezek fordítódnak le fehérjévé. Az intronok szerepe ma még nem ismert.

Az eukariotákban tehát egy fehérje információja a génben nem egy darabban helyezkedik el. Az egyszerű mikroorganizmusokban (prokariotákban) nincsenek intronok, tehát a gén nem hosszabb a mRNS-nél. A prokariotákban egyetlen polimeráz enzim katalizálja a reakciókat, míg az eukariotáknál három polimeráz enzim van. Baktériumokban elektronmikroszkóppal látható, ahogyan a DNS egyik láncáról leválik a frissen keletkezett mRNS és arra mindjárt ráfűződnek a fehérjét szintetizáló komplexek, a riboszómák, melyeken folyamatosan keletkeznek a fehérjeláncok. Az eukariotákban az „érett” mRNS-nek át kell hatolnia a sejtmaghártyán, ez valószínűleg megkönnyíti az intronok eltávolítását és az exonok

újbbóli összekapcsolódását. A folyamatot enzimek szabályozzák. Az érett mRNS, a tRNS és a riboszómák csak a citoplazmában egyesülnek. Itt történik a fehérjeszintézis.

Tehát láthatjuk, hogy egy tulajdonság információját kódoló DNS darab, gén, eukariotáknál darabokban vannak, melyeket intronok választanak el. Az értelmes információt, mely fehérjévé fordítódik az „érett” mRNS tárolja, mely a citoplazmában található.

A genetikai manipulációkor a bevinni kívánt DNS-t izoláljuk, tisztítjuk. De eukariota DNS közvetlen bevitele az intronok miatt nem megfelelő. Intron nélküli informatív DNS-t a mRNS-sel komplementer, cDNS előállításával kaphatunk. Az eljárást fordítva átírásnak vagy reverz transzkripciónak nevezzük.

A transzkripció DNS – RNS átírást jelent, a folyamatot az RNS polimeráz enzim katalizálja. Reverz transzkripció alatt RNS templáton történő DNS szintézist értünk, RNS → DNS.

Néhány vírus örökítő anyaga RNS. Ilyenek az RNS-tumórvírusok, melyek daganatot keltenek, vagy az AIDS vírusa. Ezek a retrovírusok termelnek egy olyan enzimet, mely RNS minta alapján DNS-t készít. Ezt az enzimet reverz transzkriptáznak (fordítva átíró) enzimnek nevezzük. Ma ezek az enzimek már kereskedelmi forgalomban kaphatók. Az RNS-ről készített másolat a komplementer, cDNS.

A reverz transzkriptáz felfedezése (1963) az eukariota sejtek genetikai manipulációja szempontjából forradalmi jelentőségű. Segítségével tehát intron nélküli DNS állítható elő, ha rendelkezésünkre áll a megfelelő mRNS. Ehhez tudnunk kell, hogy a kívánt fehérjét kódoló mRNS a szervezet mely részében és mikor indukálódik, majd megfelelő elválasztási technikával kivonni. A mRNS-ről reverz transzkriptáz enzimmel komplementer, egyszálú cDNS-t készítenek. A reverz transzkriptáz működésnek feltétele, hogy a DNS lánc meg legyen kezdve. A mRNS esetén ezt könnyű megvalósítani, mert az eukariotáknál a mRNS 3' végén egy ún. poli-A (150-200 adenint tartalmazó nukleotid sor) lánc található. Ehhez a bázispárosodás révén egy poli-T darabot illesztünk és így a reverz transzkriptáz egy elkezdett DNS láncot szintetizálhat RNS templátról. Az így létrejövő molekulát hibridnek mondjuk, mert az egyik része RNS, míg a másik DNS. A keletkezett egyszálú cDNS-t kétfonalúvá kell alakítani. A hibridmolekulának az RNS részét lúggal elbontják, s így csak a DNS szál marad. Ennek kiegészítő szálát a DNS polimeráz segítségével szintetizálhatják. A hajtűszerű képződményt az ún. S1-nukleázzal kezelik és megkapják az eredeti mRNS-nek megfelelő kétfonalas DNS másolatot, a dsRNS-t (double stranded = kettős szálú).

A másik lehetőség intron nélküli DNS előállítására a bevinni kívánt gén kémiai szintézise. A kívánt fehérje - a géntermék - kinyerése után meghatározzuk az illető fehérje aminosav sorrendjét, majd a kódszótár segítségével a fehérjét kódoló gén nukleotid sorrendjét. Ennek segítségével szintetizálható a fehérjét kódoló gén.

Ma már léteznek automata génszintetizátorok, melyek mikroprocesszoros irányítással végzik az egyes nukleozidok (bázis + cukor) összekapcsolását foszforsav jelenlétében. Egy kapcsolás ideje kb. 20 perc. A kapcsolási irány $3' \rightarrow 5'$ (a természetben a DNS polimeráz fordítva, $5' \rightarrow 3'$ irányban végzi a foszfodiészter kötés kialakítását). Ezt a módszert csak rövidebb, 40-60 nukleotidnyi DNS darabok előállítására lehet használni. Így sikerült pl. a 14 tagú peptidet, a szomatosztatin nevű hormont kódoló gént szintetikusán előállítani.

Ha rendelkezésünkre áll a kívánatos tulajdonság DNS alakjában, melyet tehát eukariotáknál vagy szintetikusan vagy mRNS-ről reverz transzkripcióval állítunk elő, akkor a DNS darabot többször fel kell szaporítani, azonosan másolni, klónozni kell, hogy elegendő mennyiségben megkaphassuk. A génklónozás több lépés után általában baktériumokban történik.

4.3 A rekombináns DNS előállításának módszerei

A rekombináns DNS (rekombináns = újraprendezett) különböző eredetű DNS molekulák összekapcsolását jelenti. Előállítását a restrikciós enzimek felfedezése tette lehetővé. Felfedezőik (a svájci Arber, az amerikai Smith és Nathans) 1978-ban orvosi Nobel-díjat kaptak. A restrikciós (korlátozó) endonukleázok olyan DNS bontó enzimek, melyek a kétfonalas DNS-en belül 4-6 bázisból álló meghatározott szakaszokat ismernek fel és ott a DNS mindkét szálát elhasítják. A felismerés és a hasítás szigorúan meghatározott, tehát ha a sok milliárd molekulából álló DNS oldatot egy ilyen enzimmel kezeljük, akkor minden egyes DNS molekula ugyanazonokon a helyeken hasad el. A hasítás láncon belül történik, ezért endonukleázok. A géntechnológia kialakulásához éppen ez a specifikus hasítási lehetőség nyújtotta az alapot.

A restrikciós enzimeket baktériumokból vonják ki és a baktérium latin nevéből kapják nevüket, pl. EcoRI (*Escherichia coli*) és SmaI (*Serratia marcescens*). Mivel egyes mikrobákban többféle restrikciós enzim is lehet, ezért az azonos baktériumból kivont enzimek neve után római számot teszünk.

A restrikciós endonukleázok a géntechnológia legfontosabb eszközei, így intenzív kutatás folyik újabb és újabb enzimek keresésére. Minden baktériumot megvizsgálunk, amely nem kórokozó. Ma kb. 100-féle különböző specifikus enzimet ismerünk, amelyek kereskedelmi forgalomban kaphatók.

Különösen jelentősek azok az enzimek, amelyek a kettős szálú DNS-t ún. palindrom (görög, tükörszó, visszafelé olvasva is ugyanaz az értelme, pl.: Géza kék az ég) szekvenciánál ismerik fel és ezen belül hasítják. Így ún. sticky end, ragadós végeket nyerünk, a hasított DNS végén egy rövid egyfonalas egymással komplementer szál marad.

Pl.: EcoRI hasítása:

| | |
|----------------|-------------------|
| felismerőhely: | 5'...GAATTC...3' |
| | 3'...CTTAAG...5' |
| hasítás után: | 5'...G AATTC...3' |
| | 3'...CTTAA G...5' |

Tehát az EcoRI végigfut mindkét szál DNS-en és ahol a specifikusának megfelelő szekvenciát (a leolvasás mindig 5' → 3' irányú) talál, ott hasít. A hasítás lekötetlen komplementer végeket eredményez. Ha egy másfajta pl. állati, növényi DNS-t hasítunk ugyanezzel az enzimmel, ugyanilyen komplementer végeket kapunk. A komplementer részek között megfelelő hűtésnél és sókoncentrációnál, hisz oldatban történik az emésztés, hidrogénhidak keletkeznek, az „összeragadt” végeket ligáz enzimmel kovalensen összekapcsolhatjuk. A DNS-ligáz az 5'-foszfor és a 3'-OH közti kémiai kötést hozza létre. Így *in vitro* előállíthatunk különböző eredetű rekombináns DNS-t.

Vannak olyan enzimek, pl. SmaI, melyek ún. tompa (blunt) végeket adnak hasítás után, vagyis a DNS teljes hosszában kétfonális marad.

Pl.: SmaI hasítása:

| | |
|----------------|-----------------------|
| felismerőhely: | 5'...GGGCCC...3' |
| | 3'...CCCGGG...5' |
| hasítás után: | 5'...GGG CCC...3' |
| | 3'...CCC GGG...5' |

Ilyen tompavégű kétszálas DNS-t kapunk az előzőekben leírt reverz transzkripció során, mikor eukarióta mRNS-ről készítettünk kettős szálú cDNS-t és a DNS kémiai szintézisekor is.

Ezekhez a DNS darabokhoz ún. farkazásos módszerrel (tailing) alakíthatunk ki ragadós végeket. Egy kettős szálú fragmentum két 3' végéhez pl. egy poli-A szálát szintetizálunk a terminális transzferáz enzim segítségével. A terminális transzferáz borjútípusból izolálható enzim, mely olyan nukleotidokat told a DNS lánc 3' végeihez, melyek éppen a reakcióelegyben vannak. A másik fragmentumhoz, mellyel össze akarjuk kapcsolni, egy komplementer poliT-véget szintetizálnak. Amikor ezeket a fragmentumokat összekeverik, kialakulnak a bázispárok, végül a két fragmens DNS ligázzal kovalensen kapcsolható, így létrejön egy rekombináns DNS molekula.

Az első rekombináns DNS-t *in vitro* ezzel az utóbbi farkazásos módszerrel Paul Berg és munkatársai állították elő 1972-ben. Berg 1980-ban Nobel-díjat kapott. Berg állati eredetű tumorkeltő gént kapcsolt össze *E.coli* DNS-ével. Berg nem merte folytatni kísérletét, ha ugyanis ezt a rekombináns DNS darabot visszaviszi baktériumba, „életre” kelti, ez az emberiségre súlyos veszélyt jelent, hisz tumorkeltő *E.coli* baktériumok szaporodhatnak el. A *coli* baktérium pedig az emberi bélcsatorna közönséges lakója.

Néhány évig tiltva volt mindenféle genetikai manipuláció. Az 1975-ös, kaliforniai Asilomarban megtartott konferencián a kutatók megállapodtak, hogy biztonsági intézkedések mellett tovább kell folytatni az ilyen jellegű kutatásokat, betiltva a rákgének vizsgálatát. 1979-ben ez a szabály is enyhült és újra kezdődtek a rákot okozó génekkel kapcsolatos kutatások is.

Tehát a következő lépés az összekapcsolt rekombináns DNS élő sejtbe juttatása és a sejttel együtt történő felszaporítása, klónozása.

4.4 DNS-klónozás

A DNS-klónozás, vagy génklónozás során az élő sejtbe bevinni kívánt donor DNS-t egy önálló osztódásra, replikációra képes hordozóhoz, vektorhoz kötik és ezt a rekombináns vektort juttatják be a baktériumba, általában *E.coli*-ba. Ez a bevinni kívánt gént hordozó rekombináns vektor a baktériummal együtt szaporodik.

A leggyakrabban használt vektorok a plazmidok. A plazmidok azok a gyűrű alakú DNS molekulák (1-50 kilobázispár nagyságúak), melyek a legtöbb baktériumban megtalálhatók a baktérium saját kromoszómáján kívül és önálló osztódásra, replikációra képesek, tehát a sejttel együtt szaporodnak. A plazmidok általában egy vagy több antibiotikum rezisztenciagént hordoznak. A genofortól sűrűség gradiens centrifugálással választhatók el.

A rekombináns vektor és általában egy izolált DNS darab élő sejtbe juttatását, a vegyszerekkel fellazított sejtmembránon keresztül transzformációnak nevezzük. A befogadó recipiens sejtet pedig transzformánsnak. A transzformáció során a DNS-nek csak egy része jut be a sejtbe.

A bejutott hibrid plazmid, mely a kívánt gént hordozza, a baktériummal együtt szaporodik. Megfelelő hígításnál egy-egy különálló baktériumtelep egyetlen sejt leszármazottja, klónja és több millió baktériumból áll. A baktériumklónok tehát egyben DNS-klónokat is jelentenek.

Az eljárás neve génklónozás, hisz a replikáció során a vektorba épített DNS fragmens számos másolata, klónja keletkezik. Klónozásra leggyakrabban használt baktérium az *Escherichia coli*, mivel plazmidjai vannak, jó duplikációs idejű és jól transzformálható. Használhatnak más baktériumokat (*Bacillus*, *Streptomyces*) és élesztőt is klónozásra. A donor DNS-t tartalmazó sejteket megfelelő szelekcióval, általában antibiotikum-rezisztencia markergénre szelektálva szűrik ki.

Ha lehetséges kohezív végeket adó restrikciós enzimekkel dolgoznak a vektor és donor DNS összekapcsolásakor. De olyan specifikus enzimet kell választani, amely nem hasít a bevinni kívánt génbe. Ugyanazzal az enzimmal hasítják a donor DNS-t és a vektor-plazmidot. Így komplementer végeket kapnak, melyek DNS-ligázzal kovalensen kapcsolhatók. Tehát a donor DNS így vektorba építhető, mely transzformációval élő sejtbe vihető.

Összefoglalóan tehát a géntechnológia („genetic engineering”) vagy DNS-klónozás olyan biokémiai-genetikai-mikrobiológiai művelet, amelynek során egy vektor DNS molekulával beviszünk egy élő sejtbe valamely (bármilyen eredetű) DNS-t, mely a sejtben fennmarad és a sejttel együtt tovább szaporodik.

4.4.1 Vektorok

Vektorként használható bármely DNS szakasz, amely egy adott sejtek belül (gazdasejt) képes biztosítani bármely egyéb eredetű DNS fragmentum osztódását azáltal, hogy a két DNS össze van építve. A vektor DNS tehát a gazdasejtben osztódni tud, restriktációs hasító helyet hordozzon és legyen rajta olyan genetikai marker, melynek révén felismerhetők azok a sejtek, amelyekbe bekerült a donor DNS.

A vektorként felhasználható DNS-ek mindig kötve vannak egy adott sejtfeleséghez, minden vektornak megvan a maga gazdasejtje. Vektorként általában plazmidot használnak, de vannak vírus, fág vagy kozmid vektorok. Használatosak természetes plazmidok, de már kidolgoztak különböző plazmid-vektor konstrukciókat, melyeket névvel láttak el. Pl.: pBR322 nevű plazmid, mely a leggyakrabban használt plazmid vektor. Előnye, hogy kicsi (4 kbázispár) és két antibiotikum-rezisztenciagént hordoz (ampicillin, *Amp^r* és tetraciklin, *Tet^r*), és restriktációs felismerőhelyei többnyire csak az egyik rezisztenciagént érinti. Ez megkönnyíti a rekombináns klónok kiválasztását. Pl. az EcoRV és *Tet^r*-génbe hasít. Tehát ide építhetjük be a donor DNS-t. A sejteket transzformálva az ampicillinrezisztens telepeket egyenként megvizsgáljuk tetraciklin érzékenységre. Az erre szenzitívek hordozzák az idegen DNS-t, a rekombináns plazmidot.

A plazmid-vektorok közül az ipar szempontjából nagyon fontosnak az ún. kifejező vagy expressziós vektorokat tartjuk, amelyek a beépített géneket működésre bírják. A plazmid maga ugyanis tartalmaz olyan transzkripció (átíró) és transzláció (leolvasó) jeleket, melyek révén a beültetett eukariotikus gén működni tud baktériumban.

A fágok (baktériumok vírusai) DNS-üket a baktériumba juttatják, ahol az sokszorosán lemásolódik. Az újonnan keletkezett DNS fehérjeburokba kerül és a baktérium elpusztul, lizál, a sejtéből kiszabadult utódfágok további lehetséges gazdasejteket keresnek. Fertőzéskor a fáguszuspenzió megfelelő hígítását baktériummal keverjük össze, majd ezt a keveréket agar táptalajt tartalmazó Petri-csészében 10-12 órát 37 °C-on inkubáljuk. A baktériumok egy összefüggő „pázsitot” képeznek és ezen az egyenletes baktériumrétegen kerek kis tarfoltok, ún. plakkok keletkeznek. Egy-egy plakk egyetlen fágból alakul ki, tehát klónnak tekinthető, mint egy baktériumtelep. Egy-egy tarfoltban 10^5 - 10^6 fág van. Fágvektorok esetén a fág DNS szaporodásához nem szükséges génszakaszai helyére építjük be az idegen donor DNS-t. A hibrid DNS-t *in vitro* pakolással juttatjuk be a fág köpenyfehérjébe bepakoló enzimkivonat segítségével. A rekombináns DNS-t hordozó fágokat hozzákeverve a baktériumsejtekhez litikus fertőzés útján új fágok szintézise indul meg. A bakteriofágok közreműködésével történő génátvitelt transzdukciónak nevezzük. Leggyakrabban az *E.coli* lambda-fágját használják klónozásra. A lambda-fágvektorok segítségével 15 kbázisnyi fragmensek is klónozhatók. Némely emlős gén ennél hosszabb, ezek csak kozmid vektorral klónozhatók, melyek 44 kbázisnyi donor DNS-t tudnak befogadni.

A kozmid vektor tulajdonképpen egy olyan plazmid, melyet be lehet pakolni lambda-fág feji fehérjébe. A gazdasejtje ugyanúgy az *E.coli*. A lambda-fág mindkét végén egyfonalas komplementer kohezív végeket tartalmaz, ún. *cos* helyeket. A vektor innen kapta a nevét. Normális esetben a fág szaporodásakor egy hosszú konkatenát keletkezik, mely több száz

lambda genomot tartalmaz, melyek ezeknél a *cos* helyeknél kapcsolódnak egymáshoz. A bepakolóenzimek ezt a konkaténát DNS-t a *cos* helyeknél vágják el és ezeket az egységeket csomagolják be a keletkező fágfejbe. Tehát a *cos* helyek szükségesek csak a DNS fágfejbe kerüléséhez. Ha tehát ezt a *cos* helyet beépítjük plazmidba, akkor a plazmid becsomagolódik a fágfejbe. A kozmid vektor kicsi (6 kbázis), egy kis plazmidból (pBR322) konstruálták. A vektorba építve a donor DNS-t és lambda-bepakoló kivonatot adva a rendszerhez, mely felismeri és elhasítja a *cos* helyek által közrefogott 35-45 kbázisnyi DNS szakaszokat és a fágfejbe csomagolja. Kisebb méretű DNS nem kerül a fágfejbe, ezért csak eukarióta DNS klónozására alkalmasak a kozmid vektorok. A hibrid plazmidot tartalmazó fággal fertőzik az *E.coli* sejteket. Fertőzéskor a fágfehérjék befecskendezik a rekombináns plazmidot a baktériumba, mintha fág DNS lenne. A transzdukciónak után a DNS már plazmidként viselkedik és az azt hordozó sejteket szelektálhatjuk a plazmid által hordozott antibiotikum rezisztenciára.

A lambda-fág és kozmid vektorok a legalkalmasabbak egy egész genomot reprezentáló genomkönyvtár, klóntár vagy génbank készítésére.

4.5 Klóntárak, klónszelekció

Az *in vitro* rekombináns DNS-technika, a klónozás segítségével létre lehet hozni olyan nagyszámú klónból álló gyűjteményt, klóntárat, mely adott valószínűséggel tartalmazza az illető organizmus tetszőleges génjét. A klóntár (génbank) reprezentálja valamely élőlény teljes genomját, hosszú ideig tárolható egyedi klónok formájában, így egyes gének klónozásához nem kell előállítani az összes lehetséges klónt. A kívánt gén, tehát nem tiszta formában van jelen, hisz a klóntár készítésekor egy genomból restriktációs enzimmel előállított kisebb-nagyobb DNS töredékek heterogén populációja áll rendelkezésre, amelyből véletlenszerűen kapcsolódnak be a darabok a vektorba.

Az első klóntárat 1974-ben készítették Kaliforniában plazmid vektorral. Ez a klóntár ma is létezik, az *E.coli* baktérium génjeit képviseli, 2000 klónból áll. Ez a 2000 klón 99,9% valószínűséggel tartalmazza az *E.coli* bármely tetszőleges génjét. A 45 db Petri csészén vannak elhelyezve a sorszámozott baktériumtelepek. Az újabb klóntárak már lambda-fág vagy kozmid vektorokkal készülnek. A plazmid vektorok nem a legjobbak klóntár készítésére, mivel a beépíthető DNS mérete nem haladhatja meg a 8-10 kbázist. A lambda-fág és kozmid vektorokkal 20-40 kbázisnyi DNS darabokat is lehet klónozni, ami azt jelenti, hogy sokkal kevesebb klónra van szükség azonos mennyiségű DNS klónozásához. Az előbb említett *E.coli* klóntárához kozmid vektorral 500 telep is elegendő. A lambda-fággal készített klóntáraknál tehát a klónokat tarfoltok formájában kapjuk. A tarfoltokban lévő fágokat összemoszák és ezt a folyadékot hosszú ideig könnyen tárolhatják. A leírt módszerekkel tehát egy olyan baktérium- vagy fágsegregletet kapunk, mely DNS fragmensek formájában tartalmazza a teljes idegen (növényi, állati) genomot. Ez az illető növény vagy állat génbankja, klóntára. Egy teljes eukarióta genom restriktációs enzimmel hasított fragmenseiből készült klóntár nagyon sok klónt tartalmaz.

Jelenleg a génklónozás bakteriális rendszerben történik. Az eukariota szervezetek génjei darabokban vannak, a közéjük ékelődött intronok miatt. Egy prokariota nem rendelkezik azzal az enzimrendszerrel, mely az intronok kivágásához szükséges, ezért az intron nélküli kétfonalas cDNS alkalmasabb arra, hogy vektorba építve baktériumba klónozzuk, így cDNS klóntárat készíthetünk. Másik lehetőség, a géntermék (a fehérje) aminosavsorrendjének meghatározása, szintetikus DNS előállítása és ennek klónozása.

Mind a reverz transzkripcióval előállított cDNS-t, mind a szintetikus DNS-t farkazásos módszerrel építik be a klónozó vektorba.

A kapott klóntárakból megfelelő szűrőmódszerrel, klónszelekcióval ki lehet választani a kívánt gént hordozó klónt. A klónszelekciónak három fő módszere van:

- az immunológiai (antitest-antigén reakció),
- a genetikai (mutánsok géntermékeinek komplementációja),
- a biokémiai (nukleinsav hibridizálás) módszer.

A leggyakrabban a nukleinsav hibridizálást alkalmazzák. Alapja, hogy két különböző származású nukleinsav között, amennyiben komplementer szakaszokat is tartalmaznak, bázispárosodás lehetséges. Hibridizálható DNS és RNS egymással is. Ha az ismert nukleinsav-fragmenset radioaktív izotóppal jelölik, a vele homológ, hibridizáló fragmens autoradiográfia segítségével elkülöníthető a többitől. A hibridizációs klónszelekcióhoz szükségünk van egy ún. hibridizációs próbára.

Próbának nevezzük a keresett génnel homológ szekvenciájú radioaktív foszfor-izotóppal (^{32}P) jelölt mRNS-t vagy cDNS-t vagy *E.coli*-ban klónozott DNS szakaszt.

A klónszelekció legegyszerűbb formája a telephibridizációs módszer. A rekombináns plazmidokat tartalmazó baktériumtelepek (klóntár) Petri csészékben helyezkednek el agartáptalajon. A Petri-csészéket egyenként kell átvizsgálni a következő módon: a Petri csészén levő telepeket egy steril bársonykorong segítségével ugyanolyan mintázatban átvisszük egy nitrocellulóz hátyával borított táptalaj felületére. Inkubálás után ugyanolyan elhelyezkedésben a nitrocellulóz hátyán is kinőnek ugyanazok a baktériumtelepek. A nitrocellulózt ezután lúggal kezelik, ennek során a sejtek elpusztulnak, a DNS denaturálódik egyfonalassá válik. Ez az egyszálalás DNS vákuumszáritó-szekrényben megszáritva megkötődik a nitrocellulózon, tehát a DNS az eredeti telepek elhelyezkedése szerint rögzül a hátyán. A sejtmarmadványokat lemossák, a nitrocellulózt a megfelelő radioaktív mRNS-t tartalmazó oldatba mártják. Megfelelő körülmények között (hőmérséklet, sókoncentráció) a próbához hibridizál az a DNS fragmens, mely vele homológ DNS-t tartalmaz. A nem kötődött radioaktív mRNS-t (vagy cDNS-t) mosással eltávolítják. Röntgenfilmet helyezve a nitrocellulózra, az a radioaktív foltok helyén megfeketedik, ennek alapján az eredeti Petri csészéről visszakereshető az élő baktériumtelep, amely a keresett gént hordozza. Végül ezt a telepet a táptalajlemezről leszedik és elszaporítják.

A génizolálás tehát történhet a génkönyvtár klónjai közül, de izolálható a kívánt gén a kromoszómából is. A kromoszómából történő génizolálásra nagyon egyszerű megoldást talált ki E.M. Southern. Ezzel a róla elnevezett Southern-féle hibridizációval lehetővé válik egy teljes eukariota genom restrikciós enzimmel hasított DNS tömegből a kívánt gént kiválasztani. Természetesen itt is szükség van a kívánt génnek megfelelő radioaktív mRNS-re

vagy cDNS-re. a Southern-féle lenyomattechnika szerint a nagy molekulatömegű teljes genomiális DNS-t egy vagy több restrikciós enzimmal emésztik. A keletkezett fragmentumokat (számuk milliós nagyságrendű) gélelektroforézissel méretük alapján elválasztják egymástól. A gélt lúgban áztatják, hogy a DNS denaturálódjon, majd ráfektetik egy pufferrel átitatott szűrőpapírral, a gél felületére pedig ráhelyeznek egy nitrocellulóz membránt. Az egészet lefedik szűrőpapírral, mely elkezd szívni a nedvességet. A DNS az oldattal együtt mozog és az egyszálas DNS a nitrocellulóz hátyán rögzül. Így tehát a gélen levő DNS fragmentumokat változatlan mintázatban átvittük a nitrocellulózra. A vizsgált génre specifikus radioaktívan jelölt próbával ezután hibridizáltatják a szűrőn lévő DNS másolatot, replikát. Az autoradiográfiás filmen csak a radioaktív hibrid molekulák láthatók. Ezzel végülis meghatározható, hogy a kívánt gén melyik elektroforetikus sávban található. Az így kiválasztott DNS darabot a gélből ki lehet oldani, klónozni és manipulálni lehet. A klónozáshoz a hordozó vektorba épített DNS-t, a vektorba építéshez felhasznált restrikciós enzimmal, kihasíthatjuk és gélelektroforézissel elválaszthatjuk a keletkezett fragmentektől.

A Southern-technika segítségével fedezték fel eukariotákban az intronok létét, a genomiális DNS-klónok és cDNS-klónok méretkülönbségei alapján. A kívánt gén izolálása és baktériumban (*E.coli*-ban) való felszaporítása, klónozása után a következő lépés a klónozott gén beépítése a megváltoztatni kívánt növény genomjába.

4.6 Növényi sejtek géntranszformációs rendszerei

A növények tulajdonságai nagyrészt a sejtmagban, részben egyes organellekben levő DNS-ben vannak kódolva. Az utóbbiak az ún. extrakromoszómális tulajdonságok hordozói, amelyek *in vivo* anyai úton öröklődnek. Genetikai manipuláció tehát három, egymástól elkülönített helyen, a sejtmag DNS-ben, a kloropasztisz DNS-ben, illetve a mitokondrium DNS-ben történhet.

Genetikai manipulációt növényeknél csak sejtszinten végezhetünk. A merev növényi poliszacharid sejtfalat enzimes kezeléssel le kell emésztetni és az így keletkező protoplasztok transzformálhatók. Transzformációval juttatunk be DNS-klónozáskor donor DNS-t hordozó hibrid plazmidot *E.coli*-ba, mely a plazmiddal együtt replikálódott a baktériumban.

A transzformáció általános genetikai értelmezése szerint azt jelenti, hogy izolált DNS-sel géneket, génrendszereket juttatunk be a recipiens sejtekbe, jelen esetben növényi sejtekbe. A transzformált sejtek felveszik az exogén DNS-t és sikeres transzformációkor az átvitt gén vagy gének integrálódnak a növényi kromoszómális plaztisz vagy mitokondriális DNS-be, replikálódnak a recipiens növényi sejtekben. A transzformáns sejteket ki kell szelektálni a sejtenyészetből és belőlük teljes intakt növényt regenerálni szövettenyésztéssel. A transzformáció akkor eredményes, ha a regenerált növényekben a bevitt gén fenotípusosan megnyilvánul, expresszálódik és ivaros úton öröklődik.

Az idegen gént tartalmazó egyed, transzformáns vagy transzgenikus növénynek nevezzük.

A rekombináns vektor illetve donor DNS bejuttatása növényi sejtbe történhet közvetlen génátviteli módszerekkel vagy közvetett módon, vektor segítségével.

4.6.1 Közvetlen génátviteli rendszerek

A sejtfal nélküli növényi sejtek a protoplasztok PEG (polietilén-glikol) kezeléssel közvetlenül képesek felvenni makromolekulákat, így a donor DNS-t hordozó rekombináns vektort is. A PEG valószínű feloldja a sejtmembránt.

Az elektroporáció elve, hogy rendkívül rövid időtartamú (10^{-6} sec) nagyfeszültségű impulzusok ($0,7 \text{ kV/cm}^2 - 3,0 \text{ kV/cm}^2$) hatására a protoplaszt membránján lyukak keletkeznek, így a donor DNS vagy rekombináns plazmid a protoplasztba juthat. Egy speciális elektromos kamrában van a protoplasztoldat és az oldatban levő rekombináns vektor DNS koncentrációja 50 mikrogramm/ml. A transzformáció valószínűsége kicsi, 10^{-6} - 10^{-7} .

A mikroinjektálás során a rekombináns vektor DNS oldatból nagyon kis mennyiséget (10^{-6} mikroliter) injektálunk be a protoplaszt citoplazmájába vagy a sejtmagba. Ez a DNS oldat mennyiség kb. 1000-10 000 kópiáját tartalmazza a bevinni kívánt génnek. Az injektálás invert-mikroszkópra szerelt mikroinjektáló berendezéssel történik. A több ezer donor DNS kópiából mikroinjektáláskor 1-2 az integrálódott kópiák száma. Tehát a transzformációs ráta meglehetősen kicsi. A mikroinjektálás egy elég drasztikus beavatkozás, hisz a bekerülő idegen DNS mutagén hatású, véletlenszerűen integrálódik a recipiens növényi sejt genomjába, megszüntetve egyes génfunkciókat. Az állati sejtekbe (hímivarsejtek, petesejtek, zigóták, embrionális sejtek) történő géntranszfert ugyanezzel a módszerrel végzik.

4.6.2 Közvetett génátviteli rendszerek

A közvetett génátviteli rendszerekben a DNS-t vektorral juttatjuk be a növényi sejtbe. Első lépés a klónozott gén beépítése a transzformációs vektorba.

Jelenleg leginkább természetes vektorrendszereket használnak: az *Agrobacterium tumefaciens* baktérium *Ti*-plazmidját és növényi vírusokat (dohány-mozaik-vírus, kariolmozaik-vírus).

A legjobb eredményeket az *A. tumefaciens*-re alapozott génátvitellel érték el. Az *Agrobacterium tumefaciens* egy talajbaktérium, mely a kétszikű növényeken gyökérdaganatot okoz. A daganatképzés előfeltétele, hogy a növény megsérüljön. A sebreakció közben hatolnak be a baktériumok a szervezetbe és arra készítetik a növényt, hogy különleges aminosavakat, opionokat termeljen. A baktérium *Ti* (tumor indukáló) plazmidja fertőzéskor bejut a sejtbe. A *Ti*-plazmidnak egy kis régiója az ún. T-DNS (transzformáló DNS) képes bejutni a sejtmagba és beépül, integrálódik a növényi DNS-be. A T-régió a talajban élő baktériumban „néma”, nem fejeződik ki, de beépülve a növényi kromoszómába átíródik mRNS-sé és a növényrel opionokat termeltet, melyek a baktériumok számára tápanyagforrást jelentenek.

Mind az opionokat kódoló gének, mind a daganatképzést kiváltó gének a T-régióon belül helyezkednek el.

A Southern-féle hibridizációval vizsgálva a tumoros sejtek DNS-ét bebizonyították, hogy a T-DNS valóban a sejtmagi DNS-be épül be, véletlenszerűen, random módon. Sosem épül be mitokondriális és kloroplasztisz DNS-be.

A T-DNS, ha már beépült a kromoszómába, a növény génjeként viselkedik és a Mendel-szabályoknak megfelelően öröklődik. A beépülést a T-DNS két végén elhelyezkedő határ vagy border szekvenciák teszik lehetővé. A *Ti*-plazmidnak ezt a természet adta transzport mechanizmusát használják fel a donor átviteléhez.

A T-régióból restriktációs enzimmel kivágják a nemkívánatos tulajdonságokat, mint pl. a tumorképző géneket és beviszik helyükre az *E.coli*-ban klónozott idegen DNS-t, melyet ugyanazzal az enzimmel hasítottak. A donor DNS bevitele a T-régióba mikrobiológiai fogásokkal történik, homológ rekombináció eredményeként. A létrejött, most már a donor DNS-t tartalmazó *Ti*-hibrid plazmidot visszaviszik *A.tumefaciens*-be.

Ezzel a rekombináns *Agrobacterium*-mal fertőzik a megsebzett növényt (belekenik a növény szárán ejtett sebbe) és a daganatsejtekből növényt reagálnak.

Másik lehetőség, ha a módosított *Agrobacterium*-ot 2-4 napig növényi protoplastokkal együtt tenyésztik, amikor is a T-régió és vele együtt az idegen gén is bejut a növénybe. Az eljárás neve co-culture, együttes tenyésztés. Az együttes tenyésztéssel nemcsak protoplastok, hanem steril levélszegmentek, illetve sérült növényi részek is transzformálhatók. Pl. sérült lucernaszárdarabokat táptalajban rekombináns *A.tumefaciens*-sel néhány napig rázatva értek el leghatásosabb transzformációt.

Az *A.tumefaciens*-re alapozott transzformációs rendszerek hátránya, hogy a baktérium csak a kétszikű növényeket fertőzi. Fontos kultúrnövényeink, mint a kukorica, búza, rizs, stb. nem transzformálhatók *A.tumefaciens*-sel.

Egyszikű növényeknél vagy a közvetlen génbeviteli módszereket vagy növényi vírusokat használnak természetes vektorként. Erre azok a vírusok alkalmasak, melyeknek növényben is működő szabályzó szekvenciái vannak (promoter, terminátor). Ilyen pl. a karfiolmozaik vírus (CaMV), dohánymozaik-vírus.

Az előzőekben leírt transzformációs módszerekkel nem tudjuk pontosan irányítani, hogy a kívánt gén a recipiens DNS mely szakaszába épüljön be, a beépülés véletlenszerű, random génbevétel történik.

Igazi genetikai mérnökségről, „genetic engineering”-ről növényeknél majd akkor beszélhetünk, ha *in vitro* helyspecifikus transzformációt tudunk létrehozni. Ha irányítani tudjuk, hogy a donor DNS a genom egy kijelölt helyére épüljön be és előre tudjuk, hogy az egyedfejlődés mely szakaszában, mely szervben, szövetben fog megnyilvánulni. Az utóbbiakhoz jobban meg kell ismernünk az eukarióta gének szabályzó régióinak működését. Erre vonatkozóan is vannak már biztató eredmények. A konstitutív (állandóan működő) promótereken kívül már ismertek ún. szövetspecifikus promóterek, melyek a kívánt gént a növény egy bizonyos szövetében (gyökér, szár, stb.) működtetik. Ismert már olyan növényi gén is, a *Rubisco* nevű promóter, mely csak fény hatására kapcsolja be a hozzá kapcsolt donor gént. A *Rubisco* egy CO₂ fixálásában résztvevő enzim génje.

A helyspecifikus génbevétel megvalósítására növényeknél ígéretesnek mutatkoznak a transzpozábilis elemek, transzpozonok felhasználása. Az 1950-es évek elején Barbara

McClintock kukoricával kapcsolatos munkái során fedezte fel, hogy léteznek „ugráló” genetikai elemek (ma már bizonyos, hogy minden élőlényben), melyek a genom különböző helyére beépülhetnek, kikapcsolva a génműködést, illetve kiválhatnak, így a gén újra kifejeződik. A beépülés véletlenszerű, random. Ezek az „ugráló” inszerciós elemek, IS-elemek magukkal vihetnek közbeékelődött géneket, köztük rezisztenciát kódoló gént.

Az IS-elemekkel határolt DNS szakaszokat transzpozonoknak nevezzük, melyek 3-12 kbázispár nagyságúak és antibiotikum-rezisztenciagént hordoznak. A transzpozon illegitim (nem homológ) rekombinációval bárhova beépülhet a genomba vagy plazmidba, cserélgetheti helyét, mutációt okozhat. A beépülés statisztikus valószínűségű. A transzpozonok előnye, hogy a rezisztencia alapján nyomon lehet követni, helyét endonukleázos emésztéssel s fragmens eloszlásból meg lehet határozni.

A rekombináns DNS-technikákban a transzpozonok szerepe egyre nagyobb lesz, segítségükkel rezisztencia markergéneket juttatnak be vektor illetve donor DNS-be. B. McClintock felfedezésének jelentőségét csak napjainkban ismerték el, 1983-ban kapott Nobel-díjat.

A transzpozon beépülése helyspecifikussá tehető, a genom meghatározott részébe, egy kiválasztott génbe építhető. Ilyenkor a megváltoztatni kívánt klónozott génbe kell a transzpozont „átugratni”, ez *E.coli*-ban történik, egy plazmidról. A transzpozont hordozó klónt kell a kezelendő sejtbe vinni, ahol homológ rekombinációval a transzpozon oda épül be a kiválasztott genomiális génbe, ahol a klónozott génben volt, mutációt okozva. Ezzel a helyspecifikus transzpozonos mutagenézissel növényi sejtben is géneket, DNS darabokat tudunk behatárolni funkciójuk szerint, megismerhetjük a szabályozószekvenciákat.

4.6.3 A donor gén integrációjának és expressziójának kimutatása

A transzformáció után, olyan kevert sejtenyészetet, populációt kapunk, melyekből a transzformáns sejteket ki kell szelektálnunk. Gyakran az átvitt tulajdonságra sejt szinten nem tudunk szelektálni. Ezért a donor DNS-hez vagy a vektorba antibiotikum rezisztencia géneket építenek és rezisztenciára szelektálnak. A szelektált tenyészetekben, illetve a szövet-tenyésztéssel regenerált növényekben a bevitt gén integrációját és expresszióját a következő módszerekkel mutathatjuk ki.

Ha a gén integrálódik, a kromoszómába, az izotóppal jelölt donor DNS hibridizálni fog a transzformáns sejt megfelelő restrikciós enzimmel hasított, a kérdéses gént tartalmazó DNS fragmentumával.

Szintén sikeres integráció bizonyítható, ha a recipiens illetve transzformáns genomot ugyanazzal a restrikciós enzimmel hasítjuk és a nukleinsav-fragmenseket gélelektroforézissel elválasztjuk. Az integrációval a fragmensek mérete és száma megváltozik.

A sikeres expressziót összefehérje elektroforézissel mutathatjuk ki. A donor gén expressziója a recipiens számára ugyanis egy új fehérje szintézisét jelenti és ez új elektroforetikus fehérjecsík megjelenéséhez vezet.

Az immunológiai módszerrel szintén a sikeres expressziót bizonyíthatjuk. A donor gén expressziója során keletkező fehérje a növény számára antigén. Tehát ha rendelkezünk az

antigénre specifikus antitesttel: monoklonális ellenanyaggal, akkor az antigén-antitest reakció alapján a növény présnedvében az expressziót bizonyító géntermék, az antigén kimutatható.

Leggyakrabban markergéneket használnak az expresszió és integráció együttes bizonyítására. A donor DNS-hez antibiotikum-rezisztenciagéneket kapcsolnak. Pl. kanamicin rezisztenciagént használnak az *Agrobacterium*-mal történő géntranszfernél. Sikeres transzformációkor túlélő rezisztens sejtek illetve növények keletkeznek.

Genetikai tesztek segítségével a donor DNS növény szintű fenotípusos megnyilvánulását bizonyíthatjuk, melynek ivaros úton öröklődnie kell.

4.7 Sikeres növényi géntranszformációk

A növényi géntechnológiában eddig olyan tulajdonságokat manipuláltak eredményesen, melyeket egy gén kódol. Pl. raktározó fehérjék, betegségekkel, kórokozókkal szembeni rezisztencia, herbicid-, peszticid-rezisztencia, stresszhatások (sótűrés, hidegtűrés).

A növényi géntechnológia első sikeres eredményéről 1983-ban számoltak be, amikor bab *phaseolin* génjét sikerült napraforgóba átvinni. Később szója *glicinin*, kukorica *zein* génjét expresszáltatták szintén napraforgóban *Agrobacterium* transzformációs rendszerben.

Napjainkig talán a legnagyobb jelentőségű géntranszfer, a *Bacillus thuringiensis* baktérium rovartoxin génjének bevitele dohány plasztisz DNS-ébe. A transzgénikus dohány növény termelte a rovarok pusztulását okozó toxint, vagyis rezisztens lett. A technikai módszereket a Monsanto cég titkosan őrzi. 1986-ban Belgiumban számoltak be erről az első sikeres prokariota-eukariota géntranszferről. Sikerült ezt a toxin-gént már repcébe is transzformálni.

A *B.thuringiensis* által termelt toxin fehérje jellegű és a rovarok emésztését gátolja, emberre hatástalan.

Már elvégezték azt a manipulációt is, hogy a fény indukálta *Rubisco* promótert kapcsolták a toxin gén elé, így a gén csak fény jelenlétében expresszálódik, csak nappal termeli a rovartoxint, mikor a rovarok táplálkoznak.

Ugyancsak növényvédelmi eredmény a dohány mozaik-vírus burokfehérjét kódoló génjének bevitele dohány protoplasztba. A kialakult rezisztencia azzal magyarázható, hogy a dohánysejtekben termelődő vírus burokfehérjébe a fertőzéskor a sejtbe jutó vírus genomok bepakolódnak, így hatástalanok lesznek. A gyomirtószerekkel szembeni rezisztenciagének bevitele jelentős gazdasági haszonnal jár. Az atrazin rezisztenciagént *Amaranthus* növényből sikerült átvinni szója protoplasztokba. A glifozát-rezisztenciagént tífusz baktérium törzsből izolálták és dohányba építették, mely rezisztenciát mutatott a glifozát hatóanyag tartalmú gyomirtókkal szemben. Egy belga társaság kutatói *Streptomyces* baktériumból izolált foszfinotricin herbicid rezisztenciagént az *Agrobacterium* Ti-plazmidjába építették. A transzformáns baktériumot együtt tenyésztve cukorrépa sejtjeivel (co-culture), a növényi sejtek felvették a herbicid rezisztencia génjét. Hét évig tartott, míg a herbicidtűrő cukorrépát előállították.

Az egyszikű kukoricát nem fertőző *A.tumefaciens* helyett CaMV(karfiolmozaik-vírus)-re alapozott transzformációs vektorral, elektroporációval sikerült a kanamicin rezisztenciáért

felelős gént sikeresen bejuttatni kukorica-protoplasztokba és a transzformáns sejtekből rezisztens növényeket regenerálni.

Az egyik legérdekesebb eredmény, melyet 1986-ban közöltek az USA-ban, hogy egy észak-amerikai szentjánosbogárfaj *luciferáz* enzimjének génjét, sikeresen juttatták be elektroporációval dohány protoplasztba. Fluoreszkáló dohány növényt tudtak regenerálni.

Hazánkban a Szegedi Biológiai Központban próbálkoztak az ovalbumin tojásfehérje génjét *Agrobacterium*-os transzformációval lucernába bevenni. A transzformáns növény a *chicken* nevet kapta.

4.8 Irodalomjegyzék

Bowler C.-Gilmartin P.M. (szerk.)(2002): Molecular Plant Biotechnology. Vol. 1-2. Molecular Plant Biology. Oxford University Press, Oxford.

Clark M.S. (szerk.)(1997): Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Dornell J.E. (1985): Az RNS. Tudomány (Scientific American)4, p.34-45.

Dudits D. (1986): Növények génebézsze. Tudomány (Scientific American)7, p.84-87.

Felsenfeld G. (1985): A DNS. Tudomány (Scientific American)4, p.24-33.

Heszky L. (1987): Genetika. Egyetemi jegyzet, Gödöllő, p.118-138.

Heszky L. (1987): Génebézsze magasabb rendű növényekben. Folia Biotechnologica 17, OMIKK és az OMFB közös kiadványa, p.17-41.

Howell S.H. (1982): Plant molecular vehicles: Potential vectors for introducing foreign DNS into plants. Ann.Rev.Plan.Physiol. 33, p.609-650.

Kiss E. (1999): Növényi molekuláris genetika I. GATE, egyetemi jegyzet, Gödöllő.

Márton L. (1979): A transzformáció lehetőségei növényi rendszerekben. Biológiai Tanulmányok 7, Akadémiai Kiadó, Bp. p.87-99.

Sain B.-Erdei S. (1985): Génebézsze. Gondolat Kiadó, Bp. p.9-131.

Watson J.D.-Tooze J.-Kurtz D.T. (1988): A rekombináns DNS. Mezőgazdasági Kiadó, Bp. p.141-148.

5. Szakkifejezések

Androgenezis: a megtermékenyülés nélkül bekövetkező embriogenezis egyik típusa, amely során az embrió a mikrospóra egyik sejtjének osztódása révén alakul ki.

Aneuploid: a fajra jellemző kromoszómaszámtól eltérő, annál egy vagy több kromoszómával kevesebbet vagy többet tartalmazó sejt vagy egyed.

Antigén: fajidegen anyag (általában fehérje), amely a vérkeringésbe jutva ellenanyagot (antitest) képződését váltja ki.

Antitest: az antigén bejutása után a szervezet immunrendszere által termelt immunoglobulin (fehérje), mely az antigénnel reagálva, azt megsemmisíteni igyekszik. Az antigénre specifikus ellenanyag.

Apikális: csúcsi.

Bázispárosodás: a kétfonalas nukleinsavban (DNS) a két egymásra tekeredő szálon az egyik szál bázisösszetétele meghatározza a másikat, a két szál komplementer. Az átellenben elhelyezkedő bázisok között (guaninnal szemben mindig citozin, adeninnal szemben mindig timin helyezkedik el) gyenge elektrosztatikus kölcsönhatás, hidrogénhíd jön létre. Ez az erő tartja össze a DNS két szálát. Nukleinsav-hibridizáláskor a hibrid molekulában az RNS-ben található uracil a DNS adeninjével párosodik.

cDNS: (komplementer) biokémiai szintetizált DNS molekula, melyet reverz transzkriptáz enzimmel RNS templátról készítenek.

Dedifferenciáció: a differenciálódással ellentétes irányú folyamat, melynek során a speciális feladatot ellátó sejtek, szövetek elvesztik sajátos tulajdonságaikat, funkcióikat.

Differenciálódás: az a folyamat, amelynek során a génaktivitásbeli változások eredményeként eltérő feladatot ellátó sejtek, szervek képződnek.

Diploid: olyan sejt vagy szerkezet, amely teljes számú kromoszóma készlettel rendelkezik.

Embriogenezis: az embrióképződés és embriófejlődés folyamata.

Endogén: belső.

Enzim: biokatalizátor. A szervezet biokémiai folyamatait katalizáló fehérje. Tisztított enzimekkel, sejtmentes rendszerben számos biológiai folyamat elvégezhető kémcsőben. Pl. transzlációs kitekkel egy mRNS-ről fehérje készíthető.

Exogén: külső.

Exon: a gén mRNS-sé átíródó szakaszai, melyeket egymástól közbeékelts DNS szakaszok (intronok) választanak el.

Expresszió: a gén fenotípusos megnyilvánulása, kifejeződése.

Extranukleáris DNS: (extrakromoszómális DNS) a sejttagon kívül található genetikai elemek: mitokondriális DNS, kloroplasztisz DNS. Az általuk kódolt tulajdonságok anyai úton öröklődnek. Valószínűleg prokarióta eredetűek.

Fág: vírus, mely baktériumokat fertőz. Örökítő anyaguk lehet egy- vagy kétfonalas DNS, vagy egyfonalas RNS. Csak a gazdasejten belül életképesek, felhasználva a sejt enzimeit.

Fenotípus: az egyed megjelenése, melyet a genotípus és a környezet kölcsönhatása együttesen határoz meg.

Gametofiton: a növények nemzedékváltozásának haploid szakasza, fejlődése spórából (mikro, makro) vagy azzal homológ sejtéből indul.

Genom: egy élőlény teljes genetikai állománya, azaz a gének összessége, a sejt összes DNS-e.

Genotípus: az élőlényben meglevő genetikai információk összessége, mely a környezettel kölcsönhatásban többféle fenotípust alakíthat ki.

Gélelektroforézis: nagy felbontóképességű elválasztástechnika nukleinsav fragmentek és fehérjék elválasztására. Nagyfeszültségű elektromos erőterben a gélre (agaróz, keményítő,

poliakrilamid) vitt molekulák mobilitás szerint szétválnak. Az elektródák megfelelő pufferbe merülnek, közöttük a gél vezeti az elektromos áramot.

Gén: egyetlen tulajdonságot meghatározó DNS darab. Az intronok felfedezésével a gén molekuláris genetikában eddig elfogadott fogalma (egy gén = egy polipeptid) megváltozott. A gént a jövőben, mint az átírás és működés funkcionális egységét kell tekintenünk, mely közvetve vagy közvetlenül hatással van a szintetizálódó mRNS felépítésére, működésére és megnyilvánulására. A génbe ma már beleértjük a szabályzó részeket is. A fehérjét kódoló génszakasz a struktúrgén.

Haploid: olyan sejt vagy szervezet, amely redukált (gamétális) számú kromoszómakészlettel rendelkezik.

Heterozigóta: diploid állapot, amelyben homológ kromoszómák egy adott gén különböző alléljait hordozzák.

Hibridizáció: populációgenetikában: keresztezés két genetikailag eltérő szülő egyedtől származó utód létrehozása. Szomatikus sejthibridizáció: sejtfúziós technikával létrehozott, egyesített szomatikus sejt. Molekuláris nukleinsav-hibridizáció: DNS-DNS vagy DNS-RNS hibridek előállítása genom-homológia alapján, mely a bázispárosodást lehetővé teszi.

Hibridóma: egy mielómasejtet (ráksejtet) és egy lépsejtet fúzionáltatva nyert antigénre specifikus (monoklonális) antitesteket termelő sejt.

Homozigóta: diploid állapot, melyben a homológ kromoszómák egy adott gén azonos alléljait hordozzák.

Iniciátor kodon: a transzláció folyamatában a polipeptidlánc szintézisének kezdetét jelző kodon: AUG, metionint kódol.

Inkompatibilitás: (összeférhetetlenség) az ivaros megtermékenyülés szelektivitását biztosító gát, amely akár az öntermékenyülést, akár a nemrokon növények közötti hibridizációt megakadályozhatja.

Intakt: ép, sértetlen, teljes sejt, szövet, szerv vagy növény.

Intron: az eukarióták génjeiben elhelyezkedő DNS szakaszok neve, melyek nem informatív jellegűek, fehérjévé nem fordítódnak le. Még a sejtmagban kivágódnak az élő- vagy heteronukleáris RNS-ből. Az intronok szerepéről még keveset tudunk.

In vitro: az élő szervezeten kívüli kísérleti rendszer, amelyben a sejteket, szerveket, szöveteket a szervezetből eltávolítva mesterséges körülmények között tartják életben és tanulmányozzák.

In vivo: az élő szervezetben lezajló biológiai folyamatok vizsgálatát célzó kísérleti rendszer.

IS-elemek: inszerciós elemek. Általában 2000 bázispárnál rövidebb DNS darabok, melyek a genomba bárhol beépülhetnek.

Klón: egyetlen szülői sejttől vagy szervezettől ivartalan úton származó utódok csoportja. Genetikai anyaguk a szülőével megegyező, homogén.

Kodon: a mRNS bázis- illetve nukleotidtripletjei, amelyek egy polipeptidlánc kezdésre (iniciátor kodon), aminosav beépítésére vagy befejezésre (terminátor kodon) vonatkozó információt tartalmaznak. A nukleotidbázisok sorrendje 5' → 3' irányú.

Komplementer: (kiegészítő) egy adott bázissorrendhez a bázispárosodás szabályai szerint hozzárendelhető kiegészítő nukleinsavszál. Ez a DNS megkettőződéséhez (replikáció) nagyon fontos.

Konstitutív gén: a sejtben folyamatosan, nem szabályozottan expresszáldó gén. Fehérjetermékének szintje sejtben állandó.

Kromoszóma: a genetikai információt tároló strukturális egység, a benne elhelyezkedő gének kapcsolódási csoportja.

Mikrosporogenezis: a pollen(mikrospóra) képződés folyamata.

Morfogenezis: a növény egyedfejlődése során lejátszódó differenciálódás és növekedés.

Mutagének: fizikai és kémiai hatások, melyek következtében a sejtben (szervezetben) mutációk jönnek létre.

Mutáció: a nukleotidok sorrendjének vagy számának megváltozása, amely öröklődik, de nem rekombinációval jön létre.

Organogenezis: a növényi szervek (gyökérzet, hajtásrendszer) kialakulásának folyamata.

Ozmózis: a víznek vagy más anyagnak fizikai erő mozgatta átjutása valamely hártyaszerű képleten (pl. sejthártya).

Partenogenezis: a megtermékenyülés nélkül bekövetkező embriogenezis egyik típusa, amelynek során az embrió a petesejtből fejlődik ki.

Plazmolízis: a növényi sejtek plazmájának összehúzódása és a plazmatömlő elválása a sejtfaltól hipertóniás, magas ozmotikus értékű oldatban.

Poliploid: olyan genomváltozás, amelynek eredményeként a sejt vagy szervezet kromoszómakészlete részben vagy egészben megsokszorozódik.

Primordium: szervkezdemény.

Promoter: (elősegítő) a DNS-nek az a szakasza, amelyhez az RNS-polimeráz enzim kapcsolódik. Ezen a szakaszon kezdődik a transzkripció, vagyis a mRNS szintézise.

Redifferenciáció: a sejtek, a szövetek és a szervek meghatározott funkcióinak ismételt megnyilvánulása egy dedifferenciált állapot után.

Rediploidizáció: a haploid sejtek, növények kromoszómakészletének megkettőzésével visszaáll a szomatikus sejtre jellemző diploid kromoszómaszám.

Rekombináció: egyes DNS szakaszok cseréje két DNS molekula között, melynek révén a gének kombinációja megváltozik. Egymással homológ DNS molekulák közötti rekombinációt homológ rekombinációnak nevezzük. A homológ szakaszok hosszának növekedésével arányosan nő a rekombináció valószínűsége is. A nem homológ szakaszok közötti rekombináció az illegitim (törvénytelen) rekombináció.

Restrikciós enzim: a DNS-t meghatározott nukleotidszekvencia részeknél bontó endonukleáz.

Reverz transzkripció: (fordítva átírás) az RNS-tumorvírusokból kivont reverz transzkriptáz enzimmal történő RNS → DNS átírás.

Rezisztens: valamivel szemben ellenálló mutáns egyed.

Splicing: olyan összeillesztés, mint pl. a filmszalagok összeragasztása, amelynek során a vágás helye nem ismerhető fel, az összeillesztett darabok értelmes információt adnak.

Sporofiton: a növényi nemzedékváltakozás ivartalan szakasza, a zigótából fejlődik ki, diploid.

Szomaklonális variabilitás: a növény testi (szomatikus) szövetei *in vitro* kultúráiból (kallusz, protoplaszt, sejtszuspenzió) regenerált növények között kimutatható (genetikailag determinált) különbségek.

Szomatikus: testi.

Terminátor kodon: stop kód. A mRNS-ben a transláció végét jelző kodon. Három ilyen kitüntetett kodon van: ochre (UAA), amber (UAG), opal (UGA) kodonok. A mitokondriális DNS-ben már felfedeztek ezektől eltérő stop kodonokat.

Totipotencia: a növényi sejt azon képessége, hogy megfelelő feltételek között teljes növénné fejlődik és a fajára jellemző anyagokat szintetizálja.

Transzpozon: olyan IS-elemekkel határolt DNS szakasz, amely a genomból történt kivágódás után illegitim rekombinációval beépülhet a genom más helyeire. A beépüléshez és kivágódáshoz szükséges szekvenciákon kívül más géneket (általában antibiotikum-rezisztenciagént) hordoznak. Nagyságuk 3-12 kilobázispár.

Vektor: (hordozó) a molekuláris genetikának olyan DNS szakasza, mely a gazdasajtban önálló replikációra képes, rendelkezik restrikciós enzimek hasítóhelyével és bizonyos markerekkel, melyre szelektálni lehet az őt hordozó sejteket. Vektor lehet plazmid DNS, vírus DNS vagy kozmid.