

Növényi biotechnológiák

A *biotechnológiák* gazdaságilag és gyógyászatilag hasznosítható termékek előállítását célozzák mikroorganizmusok, növényi és állati sejtek felhasználásával. Nagyüzemi szinten való alkalmazásuk a *bioipar* kialakulását tette lehetővé. Az utóbbi évtizedekben a biotechnológiai módszerek sokszínűségét, alkalmazásuk lehetőségeit forradalmasították a genetika és a molekuláris biológia vívmányai. Kétségteljesen, a 21. század a molekuláris biológia és a géntechnológia százada lesz.

Az igen változatos biotechnológiai ágazatok között kiemelkedő szerepet kapnak a gyakorlatban a növényi biotechnológiák is, szem előtt tartva a fokozatos népesség növekedést és – többek között – az ebből adódó élelmezési problémákat (az emberi tápláléknak legnagyobb részét közvetlen vagy közvetett módon növényi eredetű tápanyagok teszik ki).

A korszerű növényi biotechnológiák alappilléreit a *növényi sejt, szövet- és szervtenyészetek* képezik. Ezek a tenyészetek a növényről leválasztott bizonyos sejtek, szövetdarabok és szervrészek életben tartását és növekedését feltételezik a külső környezettől elhatárolt steril (aszéptikus) körülmények között és olyan mesterséges (szintetikus) tápközegeken, melyek tartalmazzák az ép növény fejlődéséhez szükséges szervetlen tápanyagokat, szerves anyagokat, vitaminokat és növényi hormonokat (auxinokat és citokinineket).

Az izolált növényi részek tenyésztése a sejt-kultúrákkal kezdődött. A növényi sejtek fent említett körülmények között történő fenntartását és tenyésztését („*in vitro*” technikák) 1902-ben G. HABERLANDT indította el. A módszer jelentőségét abban látta, hogy a hajtásos növények izolált sejtjeinek megfelelő tenyésztésével olyan eredményeket lehet kapni, amelyekből a soksejtes organizmusokban lejátszódó élettani folyamatokra lehet következtetni. Haberlandt kísérletei azonban sikertelenek maradtak, nem sikerült a növényi sejtek *totipotenciáját* (a növényi sejt rendelkezik az egész egyedre jellemző genetikai adottságokkal, alkalomszerűen újra osztódni képes és ugyanolyan fejlődési potenciával rendelkezik mint az embrió) bizonyítani, mert tenyészteti nagyfokú specializálódott (differenciált) szövetdarabokat tartalmaztak és emiatt sohasem osztódtak. Emellett a használt tápközeg is egyszerű összetételű volt, hiányoztak belőlük a szerves szénforrást biztosító cukrok, a fejlődéshez nélkülözhetetlen fitohormonok (akkoriban még nem ismertek egyetlen növényi hormont sem) és vitaminok. Kezdeményezései azonban nem voltak hiábavalók, mert ösztönzést jelentettek a későbbi hasonló jellegű kutatásokra.

A növényi sejtek totipotenciáját a francia GAUTHERET bizonyította kísérletileg: 1939-ben elsőként indukált steril laboratóriumi körülmények között *kalluszt* sárgarépa gyökeréből (a *kallusz* differenciálatlan, folyamatosan osztódó növényi sejtek tömege). Ettől kezdve rohamos fejlődésnek indultak a különböző szövettenyésztési módszerek, új táptalajokat dolgoztak ki, fitohormonokat izoláltak, és nemcsak a vegetatív szerveket, hanem a generatív szerv, a virág egyes részeit is sikeresen helyezték tenyészetbe. Ma már számos hajtásos növénynek (fás szárúaknak, és páfrányoknak is) minden részét lehet tenyészteni és növekedésük korlátlan idejűnek tekinthető. Az így regenerált és felnevelt növények pedig rövidebb-hosszabb üvegházi *aklimatizációs* periódust követően kiültethetők a szabadba.

A szövettenyésztés fejlődésének köszönhetően a növényi genetika és a molekuláris biológia között áthidalhatatlannak hitt szakadék megszűnt. Lehetővé vált a genetikai manipulációval, a génszintézissel kapcsolatos kutatások megindítása a gazdaságilag hasznos növényfajoknál.

Az alábbiakban a legismertebb és a gyakorlatban is a legszélesebb körben alkalmazott növényi biotechnológiai eljárásokat mutatjuk be röviden.

Mikroszaporítás

Az egyik legelterjedtebb növénybiotechnológiai eljárás a *mikroszaporítás* („*in vitro*” *klónozás*), melyet az 1960-as évektől sikeresen használnak a nagyüzemi dísznövény-szaporításban.

Ez a növény különböző vegetatív szerveinek, szöveteinek tenyésztését jelenti steril és kontrollált laboratóriumi feltételek között. Elvi lehetőségét az adja, hogy a növények különböző vegetatív és generatív részei (merisztémák, állandósult szöveteket is tartalmazó szervek, valamint izolált sejtek), megfelelő mesterséges feltételek között teljes növény-regenerációra képesek.

A steril vegetatív mikroszaporítás *ivartalan szaporodást* jelent. Ivartalan szaporodáskor az új egyed nem a zigótából, hanem a szomatikus sejtekből alakul ki. Ennek következtében az utódok genetikailag azonosak (ugyanaz a genotípus), elvben sem egymástól, sem az „anyanövénytől” nem különböznek, ezért *klónok*nak tekinthetők.

A mikroszaporítás azonosnak tekinthető a hagyományos vegetatív szaporítási technikákkal. A lényeges különbség viszont abban áll, hogy a szaporításra felhasznált növényi részek olyan kicsik, hogy csak steril körülmények között tarthatók életben (nem képesek még a mikroorganizmusok szaporodását gátló anyagokat termelni) és nevelhetők fel. A mikroszaporítás célja a tenyésztett vegetatív szervekből, szövetekből, illetve sejtekből *időegység alatt a lehető legtöbb növény regenerálása*.

Az utóbbi negyven év során (elsőként a francia MOREL végzett 1960-ban mikroszaporítást), a technikának számos módszere alakult ki. Ezek közül legáltalánosabban alkalmazottak a *merisztéma-* és a *hajtástenyészetek*.

A *merisztématenyésztés* fogalom szinonimájaként újabban a *meriklón* (*meriklónozás*) kifejezés használatos, mely a *merisztéma* és *klón* szavak összevonásából származik. A merisztémák (*merizein_{gör.}-osztódní*) a növények növekedési zónáiban (elsősorban az embrióban, a hajtás- és a gyökércsúcsokon) található szövetrészek, melyek sejtei a növényi élet egész időtartamára megőrzik osztódó képességüket és a növény hosszanti növekedését, az állandósult, különböző funkciók ellátására specializálódott (differenciált) szövetek létrehozását biztosítják. A klón szó pedig egy vagy több sejtől, szövettömből létrejövő új egyedet jelent, amely elszaporodva *azonos genetikai állományú törzset, sejtvonalat* hoz létre. A meriklónozás tehát a gyökér- vagy hajtáscsúcs osztódó sejtjeinek tömegéből történő vegetatív szaporítási eljárást jelent, amelynek segítségével új, *azonos génállományú növények* regenerálhatók. Ugyanakkor a meriklónos szaporítás kiváló módszernek bizonyult kórokozómentes növényi anyag létrehozásához, mivel a hajtáscsúcsok merisztémáinak legfiatalabb részei baktérium-, gomba- és vírusmentesek még akkor is, ha a növény fertőzött.

A *hajtástenyészetek* gyökér nélküli hajtások növekedését és fejlődését jelentik tápközegben, steril és kontrollált feltételek között, illetve új növényegyedek regenerálását.

A hajtástenyészeteket merisztémát tartalmazó növényi szervdarabokból (embrió, mag, hajtáscsúcs, szárcsomó) indítják. Növekedési ütemük az izolált darab nagyságától, a tápközeg összetételétől és a tenyésztés fizikai körülményeitől függ. Minél fiatalabbak ezek a szervek, annál könnyebb a szervdifferenciálódás indukciója. A hajtástenyészetek hosszú időtartamú tenyésztés során is megtartják regenerálódó képességüket.

A felszaporított hajtásokat a kiültetés előtt gyökeresíteni kell, mert a hajtásfejlődéshez szükséges tápközegi kiegészítők általában gátolják a gyökerek kialakulását és fejlődését.

A szervtenyészetek közül a *gyökértenyészet*ekkel értek el legelőször sikereket; a gyökér a legkönnyebben tenyésztendő szerv, és ennek tulajdoníthatóan sok növényfaj gyökerét sikerült tenyésztetben fenntartani.

Az izolált gyökerek növekedésének és fejlődésének szabályozásában a tápanyagokon és a hormonális faktorokon kívül a fizikai feltételek és egyéb tényezők is szerepet játszanak. Számos megfigyelés szerint a fény gátolja az oldalgyökerek kezdeményeinek kialakulását, ezért a *gyökérkultúrákat rendszerint sötétben tartják*.

Lomblevelek tenyésztésére szintén már régen történtek kezdeményező kísérletek. Az első eredményes levéltenyészeteket páfrányok, elsősorban az *Osmunda cinnamomea* királpáfrány leveleivel valósították meg. A leválasztott levélrészeket hosszú időn át életben lehet tartani.

Kallusztenyészetek

A *kallusztenyészeteket* tekinthetjük a szoros értelemben vett *szövettenyészeteknek*. Ezek differenciálatlan, folyamatosan osztódó merisztematikus sejtek tömegei.

Kallusztenyészetek származhatnak szárból, gyökérből, embrióból, levélből vagy virágrészből. Gyakran növényi daganatból, gubacsokból, termések „húsa”-ból vagy fás növények kéreg alatti részéből nyernek kallusz-kultúrákat 2,4-D (2,4-diklórfenoxi-ecetsav) vagy IES (indol-ecetsav) és citokinin tartalmú táptalajon. Az izolált növényi részek nem állandósult, osztódásra (proliferációra) alkalmas sejteket kell tartalmaznia. Ezek rendszerint merisztémás zónák közelében vannak.

A *sejttenyészet*eket tápoldatban való rázatással, kalluszból hozzák létre.

Szomatikus embriogenezis

Szomatikus embriogenezisnek nevezzük azt a folyamatot, melynek során nem a zigótából, hanem a kifejlett növény testi (szomatikus) sejtjeiből képződik az embrió. A jelenséget elsőnek STEWARD (1958), majd REINERT (1959) figyelte meg sárgarépa sejt-kultúráiban. Létrejöttében jelentős szerepet játszottak a tápközegbe juttatott kókusztejben található természetes citokininnek.

Elvileg bármely növényi sejtől fejlődhet szomatikus embrió, 2,4-D illetve citokinin tartalmú táptalajon. Mindössze kb. 150 virágos növényfajnál sikerült szomatikus embriogenezis indukálása.

A szomatikus embriók fejlődésük során a zigotikus embrió morfológiai és fejlődési stádiumait követik nyomon, majd belőlük hajtással és gyökérrel rendelkező növények fejlődnek. Ezáltal egyetlen szár- vagy levéldarabból mesterséges körülmények között szomatikus embriogenezis indukálásával nagyon sok növényegyed nyerhető, amelyek a génállomány szempontjából azonosak az anyanövénnyel és annak fenotipikus tulajdonságaival rendelkeznek (klónok). Az így keletkezett szomatikus embriókból, melyek genetikai szempontból igen stabilak (nem mutatható ki változás az örökletes anyagban), megfelelő összetételű tápközegen ún. mesterséges magvak („*in vitro*” magvak) nyerhetők.

Protoplasztizálás és protoplasztok fúziója

A korszerű növényi biotechnológiákban a szomatikus és reprodukció sejtkeiből izolált *protoplasztokat* használják. A protoplasztok sejtfauktól megfosztott növényi sejtek. Ezek kultúrában sok tekintetben úgy viselkednek, mint a tenyésztett állati sejtek, megfelelő mesterséges feltételek között növekszenek és osztódnak, homogén sejt vonalakat –klónokat – hoznak létre, a sejtfa hiánya pedig lehetővé teszi a génszétválasztási technikák alkalmazását (vírus DNS vagy RNS és baktérium plazmidok bevitel/ beépítése a növényi genomba, genetikailag transzformált – *transzgenikus* – növényi organizmusok létrehozása, stb.).

Növényi protoplasztok a szövetekből mechanikai vagy enzimes módszerekkel izolálhatók. Mechanikai izolálásuk úgy oldható meg, hogy először a sejteket valamilyen hipertóniás oldatban *plazmolizálják*, utána pedig mikrosebészeti eljárásokkal óvatosan szétvágják a sejtfalet. Ezt a módszert *vakuum* (bizonyos növényi sejtek jellegzetes sejtszervecskéje, mely sejtnedvet, esetenként raktározott tápanyagokat tartalmaz) nélküli sejteknél (pl. merisztémák) nem lehet felhasználni. Ilyen esetben a protoplasztizolálás enzimes módszerét alkalmazzák. Ehhez azokat az enzimeket használják, amelyek a sejtfalet komponenseit bontják. Leggyakrabban a *pektináz* és a *celluláz* használatos egymást követően vagy keverékben együtt alkalmazva. Izolálás után a protoplasztokat olyan folyékony tápközegben kell tartani, amelynek ozmotikus nyomása a protoplasztéval megközelítőleg azonos, ellenkező esetben a protoplasztok szétpukkannak vagy összezsugorodnak.

A steril protoplaszt tenyészeteket rendkívül sokféle kutatási célra lehet felhasználni. A legizgalmasabb azonban a különböző származású protoplasztok sikeres egyesítése (fuzionáltatása - *szomatikus hibridizáció*). Protoplasztok fúziójával sikerült a megtermékenyítésből adódó, különböző fajok közötti természetes inkompatibilitás legyőzése. Megfelelő módszerek ismeretese a fuzionált protoplasztokból teljes növény regeneráltatására.

Transzgenikus növények létrehozására, DNS szakaszok bevitelére a növényi genomba, közvetítőként mikroorganizmusokat, leggyakrabban az *Agrobacterium tumefaciens* és *A. rhizogenes* növénypatogén baktériumokat használják.

Az első izolált protoplasztokat 1960-ban nyerték, ezt követően CARLSON az A.E.Á.-ban 1972-ben sikerrel fuzionálta két dohányfaj, a *Nicotiana glauca* és *N. langsdorfii* protoplasztjait, és a hibridsejtekből sikerült új növényt, az első *szomatikus hibridet* regenerálnia. 1978-ban a burgonya (*Solanum tuberosum*) és a paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) protoplasztjait fuzionáltatták és ezzel megnyílt a különböző fajokhoz, de hasonló családokhoz és nemzetségekhez tartozó növények hibridizációjának lehetősége.

Az első transzgenikus növényeket 1986-ban állították elő.

Haploid növények előállítása

Egyszeres kromoszóma-szerelvényű (*haploid*) növények előállítását célozzák a generatív szervből, a virág szaporító részeiből létesült kultúrák, a *portok* és *ovárium tenyészetek*.

A portokok meiotikus (redukciós) sejtosztódásban lévő sejtjeiből és a pollenszemcsékből mesterséges táptalajon haploid növények regenerálhatók. A folyamatot *androgenézisnek* nevezzük. Ha a haploid növényregeneráció az embriózsák haploid sejtjeiből vagy a megtermékenyítetlen petesejtéből történik, *gynogenézisről* beszélünk.

A növényi biotechnológiák alkalmazási területei

Az izolált növényi tenyészetek gyakorlati alkalmazása igen széles körű. Napjainkban leginkább a szomatikus hibridek, intra- és interspecifikus hibridek, illetve a DNS transzformációval létrehozott transzgenikus növények gazdasági célokra történő felhasználására kerül a hangsúly.

A meriklonos növény szaporítás gyakorlati felhasználására a kertészetben, dísnövény-nemesítésben és természetben kerül sor. A kedvelt orchideák és egyéb dísnövények vegetatív szaporítását szinte forradalmasította a meriklonos módszer. Hatása a vágott virág piacán érezhető. A hagyományos vegetatív szaporítással ellentétben a meriklonozás révén rövid idő alatt valamely jó fenotípusú egyed vagy fajta

egyetlen példányából nagy mennyiségű növényi anyaghoz juthatunk. E szaporítási módszer bevezetésével, amely az üzemi technológiák részévé is vált, megnyílt a tervszerű előállítás lehetősége. Határidőre egységes minőségű, egyidőben virágzó anyag kerülhet a piacra. A növények felnevelési ideje is csökken a magvetéssel történő szaporításhoz képest.

Manapság a meriklónozás nemcsak a dísznövények, hanem a fő tápláléknövények (burgonya, manióka, sárgarépa stb.), a gyümölcsfák, díszcserjék és egyéb vadon élő fásszárú növények szaporítására is elterjedt módszer. Ez biztosítja a patogénmentes, egészséges növények felnevelését, mivel a hajtáscsúcsokban levő sejtek részben a levelek borítása, részben a fertőzés helyétől való távolságuk miatt még a mikroorganizmusoktól mentesek. Ennek megvalósítása igen hasznos lépés, mivel a különböző vírusok, baktériumok és patogén gombák kártétele igen jelentős. WEISE szerint a muskátlik merisztémakultúrái (a muskátlit a *Xantomonas pelargonii* baktériumfaj nagymértékben károsítja) baktériummentes muskátli előállítására „ma már nem játékszer, hanem természeti szükségszerűség”.

A növényi biotechnológia alkalmazásának leglátványosabb és legtöbb gazdasági hasznot ígérő területe a genetikai manipulációval, génszűrésrel megvalósuló növénynemesítés. A molekuláris beavatkozást szenvedett és ezt követően regenerált növényeket viszont nem lehet közvetlenül felhasználni a gyakorlatban. Ezen a téren jelenleg is heves viták folynak az Egyesült Államok és a gazdaságilag fejlett európai országok között. Az európaiak amellet érvelnek, hogy nem lehet tudni hogyan „viselkednek” a természetes környezetben a genetikailag módosított fajták és változatok; feltételezhető, természetvédelmi- és egészségügyi szempontból veszélyes mutánsok keletkezése. Elméletileg tehát a mezőgazdaságban csak olyan változatokat lehet termeszteni, amelyek az állami fajtaminősítés 3–5 éves kísérleteiben megfelelő teljesítményt nyújtottak, megfelelnek az előírásoknak és felülmúlják a köztermesztésben levő fajtákat. E téren viszont további alkalmazott kísérleteket kell végezni.

A növénynemesítés mellett várhatóan a növényvédelem lesz az a terület, melyben a biotechnológia nagy gazdasági eredményeket fog elérni. A modern génszűrészi technikák felhasználásával gyomirtó szerekkel szemben rezisztens, vírusrezisztens és rovarrezisztens transzgenikus növények létrehozását célozzák. Ez utóbbi esetben a *Bacillus thuringiensis* inszekticid hatású fehérjezárványaiért felelős gén átvitelével próbálkoznak a növényi genomban.

A fent ismertetett területek mellett a növényi szövettenyészeteket sikeresen alkalmazzák:

- növényélettani kísérletekben táplálkozási, egyedfejlődési és anyagcsere problémák tisztázására,
- fitohormonok szabályozó hatásának tanulmányozására, a hatásmechanizmusaik felderítésére,
- alkaloidok és gyógyszeralapanyagok ipari mennyiségű kivonására,
- a természet jelenlegi genetikai változatosságának megőrzésére (biodiverzitás megőrzése), ritka és kipusztulással veszélyeztetett növényfajok fenntartására génbankokban, szükségszerű újratelepítések céljából.

A növényi sejt-, szövet- és szervtenyészetek átoltással több évig (de nem végtelen ideig) életben tarthatók anélkül, hogy a sejtek genetikai állománya lényeges változásokat (mutációkat) szenvedne. Kimutatták, hogy a mutációs ráta nem nagyobb mint magvak tárolásánál, azaz nem éri el az 5%-ot. A mutációs ráta további csökkentésére, a szövettenyészetek genetikai stabilitásának növelésére 1974 óta a növényi anyag mélyhűtéses tárolását alkalmazzák. Fagyasztáskor a sejtek anyagcseréje leáll, így az örökletes anyagban bekövetkező változások is ki vannak zárva. A növényi anyag

károsodását úgy akadályozzák meg, hogy fagyvédő anyagokat (*krioprotektív anyagok*) alkalmaznak a sejtekben esetlegesen bekövetkező káros jégkristályok kialakulásának megelőzésére. „*In vitro*” génbankok létrehozására a sejtszuszpenziós kultúrák és a szövettenyészetek a legalkalmasabbak.

Génbankok már léteznek a világon és ezek koordinálásával különböző programok keretében nemzetközi szervezet, az *I.B.P.G.R. (International Board for Plant Genetic Resources)* foglalkozik.

Felhasznált szakirodalom

- 1] I. Cachiñá-Cosma, D., Sand, C., *Biotehnologie Vegetalã*, Ed. “Mira Design” Sibiu, 2000
- 2] Dudits, D., Heszky, L., *Növényi Biotechnológia és Géntechnológia*, Agroiinformatika, Budapest, 2000
- 3] Frink, J.P., Halmágyi, A., *Természetes és mesterséges auxinok és citokininek hatása a szegfü in vitro vegetatív fejlődésére*, Múzeumi Füzetek, Új Sorozat, 8, p. 87-93, 1999
- 4] Frink, J.P., *Sajátos biomolekulák: a növényi hormonok*, Firka, p.147-152, 4/2001-2002
- 5] Gamborg, O. L., Phillips, G. C., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1995
- 6] Maróti, M., *A Növényi Szövettenyésztés Alapjai*, Akad. Kiadó, Budapest, 1976

Frink József-Pál



KATEDRA

Aktív és csoportos oktatási eljárások

1. rész

A Firka 2001-2002. évfolyamának 6. számában leközöltünk egy sor aktív oktatási eljárást, amelyek a kritikai gondolkodás stratégiájának keretében alkalmazhatók. A Firka 2002-2003. évfolyamának számaiban egy sor olyan további eljárást kívánunk bemutatni, amelyek az aktív és a csoportos oktatást segíthetik elő. Ezek alkalmazása révén várható, hogy a szakismeretek megszerzésén túl szakmai jártasságok, ún. kompetenciák alakíthatók ki a tanulóknál.

I. Szövegfeldolgozási eljárások

Szójegyzék. A szójegyzék fontosabb szavak és szakkifejezések listája, a jelenségek és az összefüggések szóbeli leírásának elősegítésére szolgál. A szójegyzéket leggyakrabban a fogalmak lépésről lépésre történő bevezetése és leírása érdekében állítjuk össze. A szójegyzék az összefoglalás és az ismétlés során is hasznos. A szójegyzék különösen alkalmas a képek, tárgyak, készülékek és kísérletek leírására.

Megvalósításmód: Kép (rajz, grafikon stb.) különböző elemei mellett számok találhatóak. A hozzátartozó szójegyzékben található szavak melletti zárójelbe a képnek megfelelő számokat kell beírni.