

## 8. A növényi szövetek tenyésztése

A biológiai iparban a különféle mikroorganizmusok nagy léptékű alkalmazása széles körben elterjedt a legkülönbözőbb célokra. Kevésbé ismert és alkalmazott, de nagy lehetőségekkel kecsegtető terület a növényi sejtek és szövetek *in vitro* tenyésztése.

A növényi szövettenyésztés céljai túlnyúlnak az ipari termelés szempontjain:

- Biológiai, biokémiai kutatás – sok folyamatot egyszerűbben és hatékonyabban lehet tanulmányozni a teljes növény helyett izolált szöveti és sejtenyészetekben.
- Unikális biokémiai utak lehetősége – a növények biokémiája egészen más evolúciós utat járt be, mint akár a mikroorganizmusoké, akár az állati sejteké. Nagyon sok olyan új enzimet, illetve termék molekulát találhatunk, amely egyedi az élővilágban.
- Vegetatív mikroszaporítás – a mezőgazdaságban korlátot jelent a vegetatív szaporítású kultúrnövényeknél (pl. burgonya, szőlő) az, hogy egy kedvező tulajdonságú egyednek csak korlátozott számú utóda lehet. Laboratóriumban ezerszámra oszthatók a klónok, így szaporítóanyagot biztosítanak a nagyüzemi termeléshez is.
- Szekunder metabolitok előállítása – a növények számos faja termel olyan szekunder metabolitokat, amelyeket az emberiség különböző célokra felhasznál: tartoznak ide illat- és színyanyagok, gyógyhatású anyagok egyaránt. A növényi eredetű gyógyszerhatóanyagok mennyisége az összes, ma ismert és alkalmazott gyógyhatású vegyületek között igen nagyarányú. Közülük sok nem, vagy csak részben állítható elő szintetikusán, de akad olyan eset is, amelyben a mesterséges előállítás módja ugyan ismert, de nem gazdaságos. Más esetekben ezeket a vegyületeket veszélyeztetett, és/vagy lassan növekvő növényfajok termelik. A felsorolt problémákra megoldást jelenthet az *in vitro* növényi sejt- és szövettenyésztés.
- GM növények előállítása – a növényi génmanipuláció jellemzően sejtszinten történik, kihasználva a totipotenciát, a növényeknek azt a tulajdonságát, hogy egyetlen sejtből megfelelő laboratóriumi technikával regenerálható a teljes növény.

Az *in vitro* növényi sejt- és szövettenyésztésnek számos előnye van, hiszen a tenyésztési illetve fermentációs körülmények kontrolláltak, reprodukálhatóak, függetlenek a természetben általunk nem befolyásolható változóktól, mint például az időjárás, az évszakok váltakozása, a talajviszonyok. A steril körülmények között történő szaporítás által a betegségek megjelenése is kiküszöbölhető, a kártevők, konkurensok távol tarthatók. Nem szükséges növényvédő szerek alkalmazása sem. Adott kultúrák a megfelelően optimalizált körülmények között igen nagy termelékenységet és növekedést mutathatnak. Optimalizálni tudunk gyorsan növekedő, sok hatóanyagot akumuláló sejt vonal kiválasztásával, az alkalmazott táptalaj összetételének módosításával, a megvilágítás idejének és intenzitásának változtatásával, és számos más paraméter segítségével.

A számos előny mellett azonban leküzdendő nehézségek is akadnak: a gazdaságos termelés megoldása minden új technológia, új növény, új hatóanyag esetén felmerülő probléma. A termelt hatóanyagoknak egyes esetekben lehet fitotoxikus hatása (pl. podophyllotoxin), és egyes esetekben a termék kinyerése is jelenthet problémát: ha a kérdéses vegyületet a tápközegbe bocsátják ki a sejtek, ez egyszerűbb, ha sejten belül raktározza (pl. vakuólumban), bonyolultabb. Szintén problémát jelenthet a növényi sejt- és szövettenyészetek genetikai instabilitása. A problémák egy részének kiküszöbölésében sokat segíthet a bioszintetikus útvonalak megismerése és megértése, ezek feltérképezésével számos kutatás foglalkozik.

## 8.1. Történeti áttekintés

Minden sejtenyésztés előzményeként meg kell említenünk Schleiden és Schwann munkásságát, ők mondták ki (1838), hogy minden élőlény sejtekből áll, és élő sejt csak élő sejtől keletkezhet.

Az *in vitro* növényi sejtenyésztéssel elsőként Haberlandt (1854–1945) próbálkozott, eredményeit 1902-ben publikálta. A kísérlet mai szemmel nézve sikertelen volt, a sejtek nem voltak képesek a mesterséges környezetben szaporodni. Az osztrák botanikus nem tudta, hogy az intakt növényből vett szövetdaraboknak milyen speciális tápanyag- és hormonális környezeti igényeik vannak, ezért mindössze szervesen sokat tartalmazó táptalajon próbálta azokat tenyészteni. Ezen kívül *in vitro* körülmények között máig nehezen tartható fajokat választott kísérletéhez, s ezek erősen differenciálódott sejtjeit használta fel, melyek eleve kevésbé hajlamosak osztódásra.

Philip White jelentős áttörést ért el a területen az 1930-as években: élesztőkivonatot, szacharózt, és szervesen sokat tartalmazó folyékony tápközegében sikerült paradicsom hajtásrügyéből kultúrát indítania. A kísérlet több mint egy éves időtartama alatt a tenyészetek növekedési sebessége nem csökkent. Eredményei 1939-es publikálását követően hat héten belül Gautheret és Nobécourt francia kutatók hasonló pozitív eredményeket jelentettek meg. Tulecke és Nickell 1959-es publikációja az első, növényi sejtek nagy léptékű szaporításával kapcsolatban megjelent írás. Három évtizeddel később már kifejezetten növényi sejtek számára fejlesztett, akár 75 köbméteres bioreaktorokban folyt a termelés.

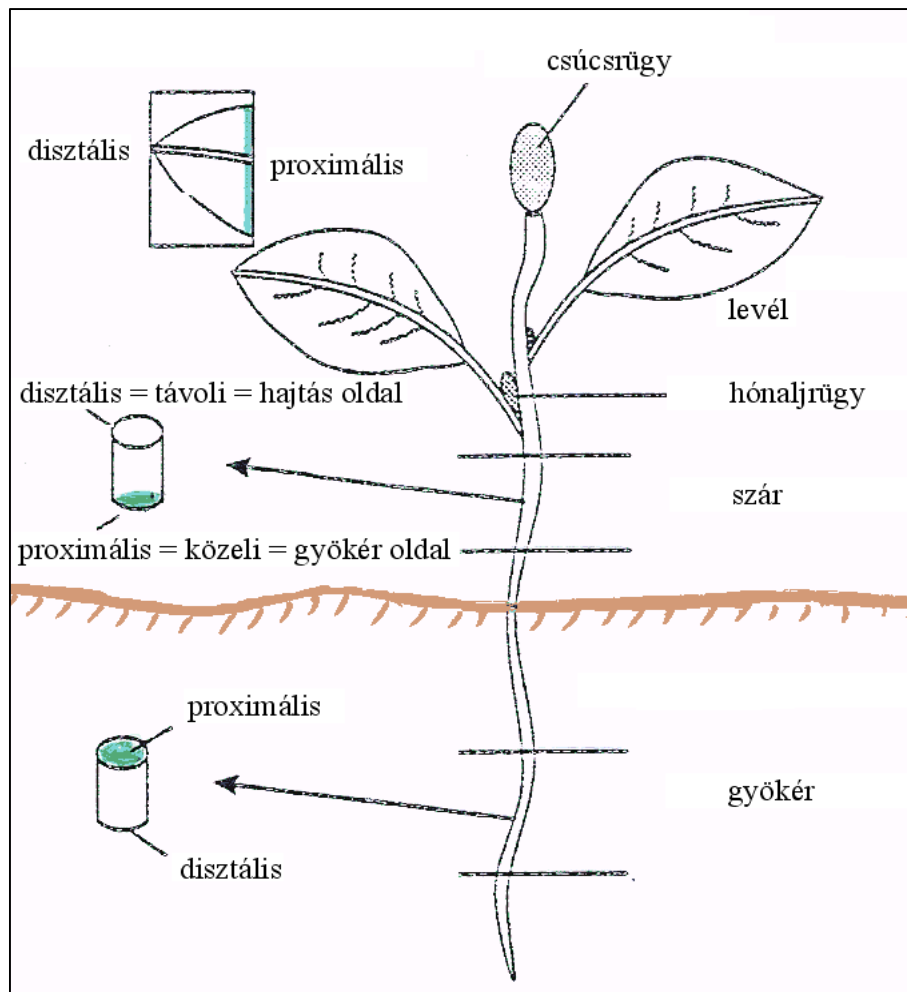
Az első növényi sejtfermentációs technológiával előállított terméket a japán Mitsui Petrochemical Industries hozta kereskedelmi forgalomba. A *Lithospermum erythrorhizon* által termelt sikonin nevű vegyületet Japánban sérülések kezelésére, illetve hagyományos selyemfestékként használják. A japán kozmetikai ipar 1984 óta alkalmazza a *Lithospermum* sejtek által *in vitro* termelt sikonint ajakrúzsok színezésére. Becslések szerint a sikonin termelés esetében az *in vitro* megoldás körülbelül 800-szor hatékonyabb, mint a vegyület szabad földön termesztett növényekből való kinyerése.

Ma a technológia egyik legsikeresebb alkalmazása kétségtelenül a paclitaxel (taxol) gyártása. A vegyület meglehetősen drága gyógyszer, melyet hatékonyan alkalmaznak bizonyos ráktípusok kezelésében. A paclitaxel legfeljebb félszintetikusan előállítható vegyület, prekursorait mindenképp növényi sejtekből (*Taxus* fajok) szükséges kinyerni.

## 8.2. A növényi tenyészetek fajtái

### 8.2.1. Explantátum

Növényi szövettenyésztés indításához először is szükség van explantátumra. Ezek az intakt növényből származó sejtcsoportok illetve szövetdarabok, melyből az *in vitro* tenyésztés megfelelő körülmények között létrejöhet. Az explantátum származhat a növény bármely részéből, beleértve a hajtásokat, leveleket, szárakat, virágot, gyökereket, differenciálódott és differenciálatlan sejteket is, amelyek osztódásra képesek. A növényi részek kivágását szigorúan steril körülmények között kell végrehajtani. A kivágott növény darabot steril táptalaj felületére, vagy steril tápoldatba helyezik. Az életben tartás feltétele, hogy a sejtek számára minél pontosabban reprodukálják az eredeti, a növényben lévő környezetet, a kémiai és fizikai paramétereket.



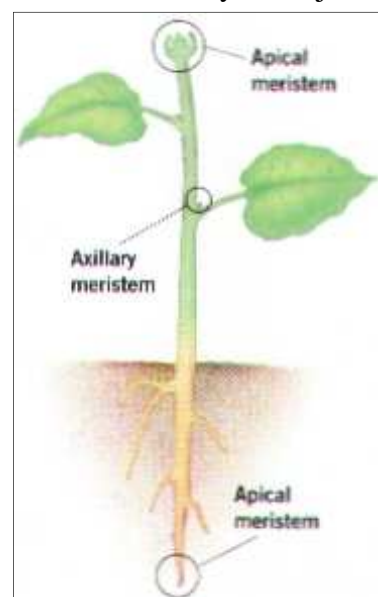
1. ábra Explantátumok polaritása

Sok növényi explantátum **polaritást** mutat. Ez azt jelenti, hogy az adott szerv növekedési iránya meghatározott. Azaz a növénydarab „emlékszik” arra, hogy melyik vége (pólusa) állt a csúcs (növekedő vég) felé és melyik a bázis (rögzítő rész) felé. Az előbbi irányban fejleszt hajtást, az utóbbi irányba pedig gyökérkezdeményeket. Megjegyzendő, hogy a polaritás iránya a talajszintnél megfordul. A talaj feletti részeknél a felső vég a hajtás oldal, a föld alatt viszont az alsó, a gyökércsúcs felé álló vég indul növekedésnek.

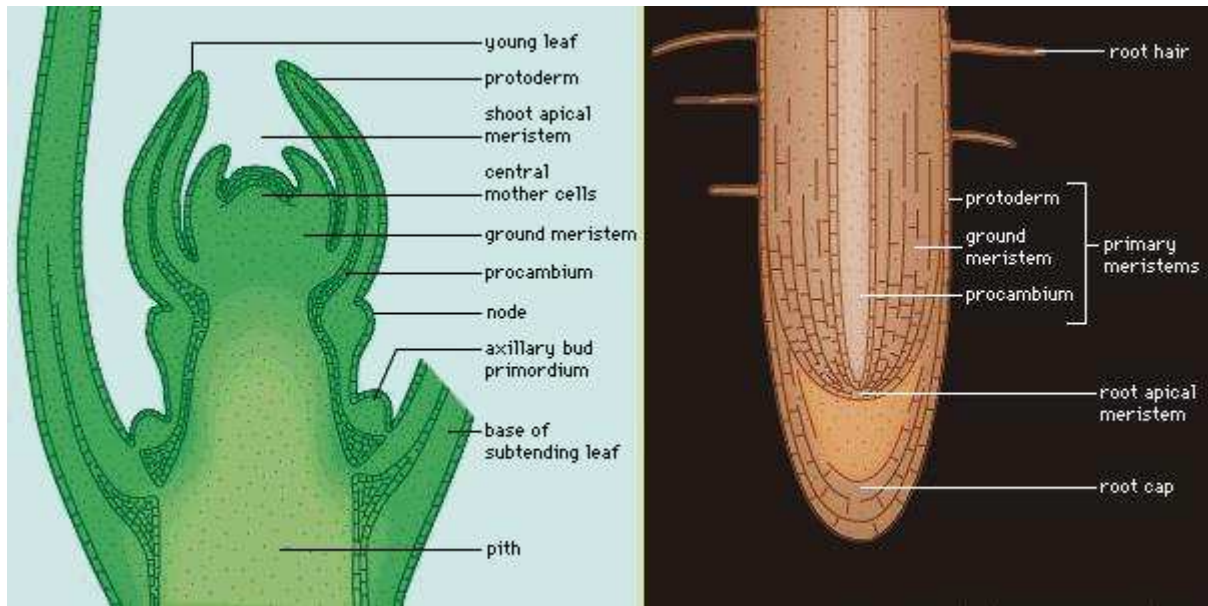
### 8.2.2. Merisztéma

Az explantátum egyedi esete, a növényből speciális, osztódó, még differenciálatlan sejteket tartalmazó szövetet vágnak ki. Ezek az aktívan növekedő hajtás- és gyökércsúcsok belsejében találhatóak, de inaktív állapotban lévő a rügyekből és alvórügyekből is izolálhatók. Ezek a sejtek hasonlóak az állati szervezetek őssejtjeihez, az osztódás után nem mentek át szöveti differenciálódáson, de erre sok irányban is képesek.

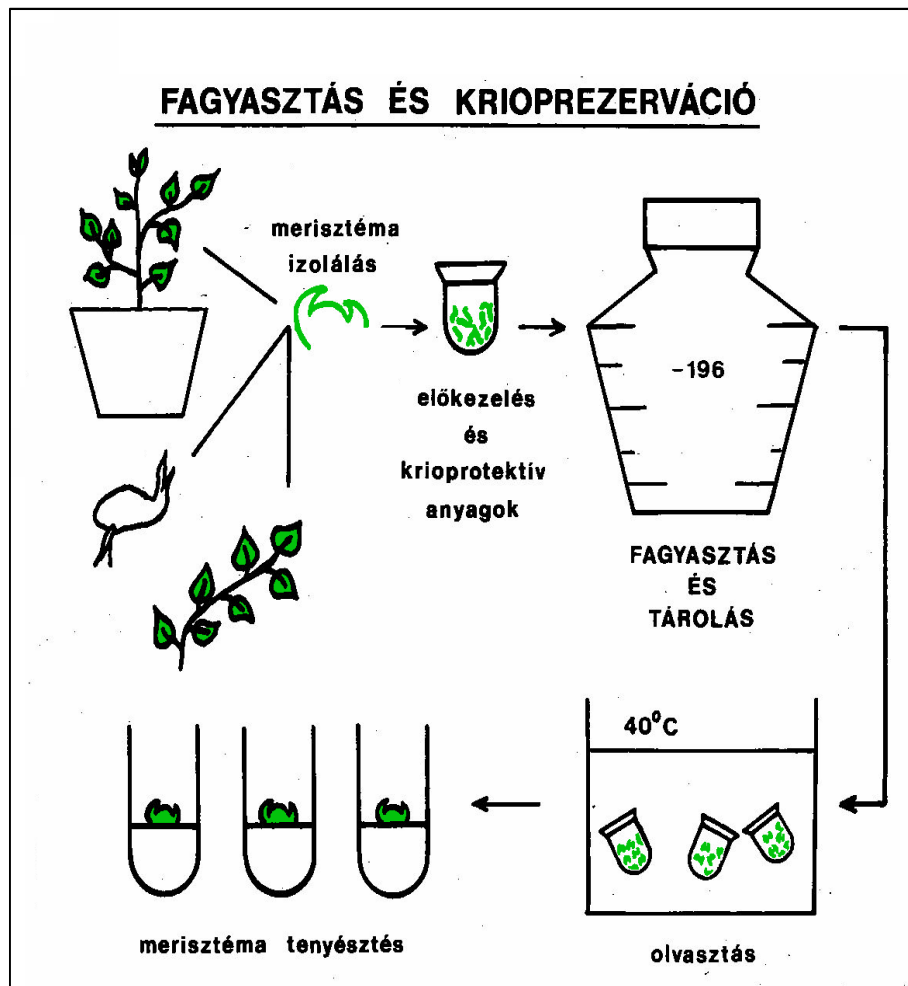
Merisztémából viszonylag könnyen regenerálható az egész növény. Így különösen alkalmasak vegetatív mikroszaporításra.



2. ábra Merisztémák elhelyezkedése



3. ábra Merisztéma szövetek elhelyezkedése a növekvő csúcsokban



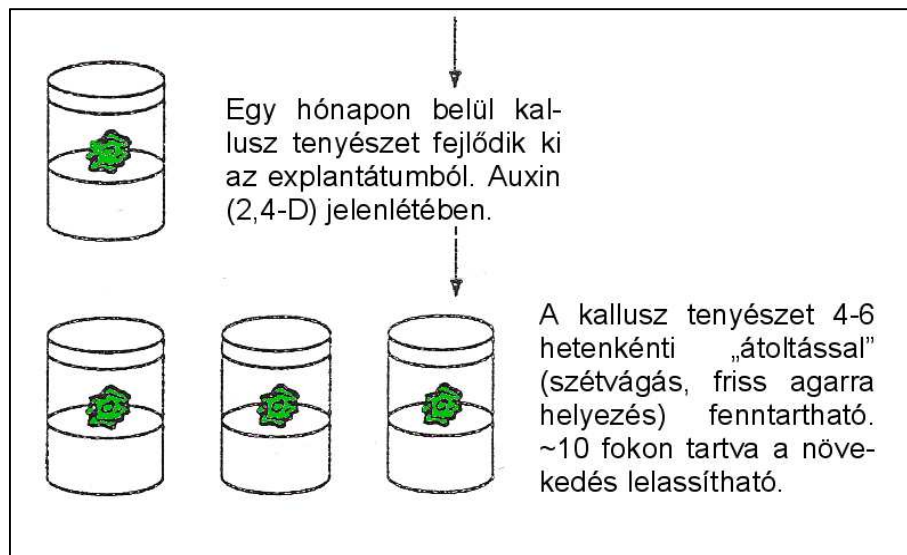
4. ábra Merisztémák tárolása mélyfagyasztással

Merisztéma állapotban a növényi sejt kultúrák mélyhűtve jól tárolhatók, alkalmasak sejtbankok kialakítására. A tárolás előkészítését még a kioperálás előtt meg kell kezdeni.

Célszerű a növényt három napig +4 fokon tartani, így növelhető a túlélés valószínűsége. A kioperálás után a sejteket védőközegbe helyezik. Az oldat a tápanyagokon (szacharóz, ásványi sók) kívül ozmolitikumokat (glicerin, mannit, szorbit) és krioprotektív anyagokat (dimetil-szulfoxid) tartalmaz. A tárolás hőmérséklete  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (cseppfolyós nitrogénben). Fagyasztás sebessége a növénytől függ. A „fokozatos” hűtésnél előbb  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{perc}$  sebességgel lehűtik  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig, majd 30 perc tartás után teszik a folyékony nitrogénbe. A „direkt” fagyasztásnál azonnal belemártják a cseppfolyós nitrogénbe. Ezen a hőmérsékleten a tenyészet évekig eltartható. A felhasználáshoz a kultúrát tartalmazó csövet  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben rázatva felolvasztják, a folyadékot lecserélik, ezáltal eltávolítják a DMSO-t, majd a tenyészetet táptalajra helyezik.

### 8.2.3. Kallusz tenyészet

A kallusz differenciálatlan, illetve különböző mértékben differenciálódott sejtek amorf, burjánzó csoportja. A kalluszon belül a sejtek genetikailag meglehetősen instabilak, a mutációk sokkal gyakoribbak, mint intakt növény esetében. Megfelelő körülmények között megindulhat a sejtek differenciálódása – erre egyes kalluszok hajlamosabbak, míg mások kevésbé – melynek egyes esetekben fontos szerepe lehet a kultúra szekunder metabolit termelésében.



5. ábra Kallusz tenyészetek fenntartása

A kalluszok legtöbb esetben alkalmasak a teljes növény regenerálására is.

Attól függően, hogy adott kallusz milyen növényi szervvé való differenciálódásra mutat nagyobb hajlandóságot, illetve mely szerv irányába indult meg a differenciálódás, megkülönböztetünk különböző kallusztípusokat, így a rooty (gyökér jellegű), shooty (hajtás jellegű), embryonic (embrió jellegű) illetve semleges kalluszokat.

A kallusz kultúrák állaga lehet tömör, vagy törékeny, morzsálódó is. Az első kalluszokból átoltáskor a számunkra kívánatos tulajdonságú darabokat kiválasztva befolyásolható a tenyészet későbbi konzisztenciája. Jellemzően a törékenyebb, lazább szerkezetű kalluszok ideálisak szuszpenziós tenyészetek indítására, mivel ezek sejtjei könnyebben elválhatnak, azokat kevesebb stressznek kitéve hozható létre belőlük a lehetőleg egyenletes sűrűségű szuszpenzió.

Színük különböző lehet, zöld (klorofill tartalom esetén, fotoszintézisre képes kultúrák), fehér (fotoszintézisre nem képes kalluszok), vagy egyéb szín (pigmentek, mint szekunder metabolitok termelése esetén).

Kalluszok létrejöhetnek természetes körülmények között, fertőzések hatására, fizikai sérülés eredményeképp a gyógyulási folyamat részeként, vagy *in vitro* közvetlenül indukálhatók

a kiválasztott növény különböző szomatikus sejtjeiből auxinok és citokininek megfelelő egyensúlyának alkalmazásával, ám mindenképp osztódásra képes, de legalábbis osztódásra képes állapotba hozható sejtek szükségesek az indukcióhoz. Az arányok eltolása az auxinok irányába hajtásszövetek, míg a citokininek arányának növelése a gyökérszövetek kialakulását eredményezi.

Kalluszok in vitro indukálására és fenntartására az ideális a szilárd táptalaj. A kallusz indukcióhoz alkalmazott ideális táptalaj-összetétel, és a legmegfelelőbb kiindulási szövettípus az egyes növényfajoknál más és más. Ugyanakkor elmondható, hogy legtöbb esetben a legjobb eredménnyel járó megoldás szomatikus embrió, vagy a növény levelének felhasználása.

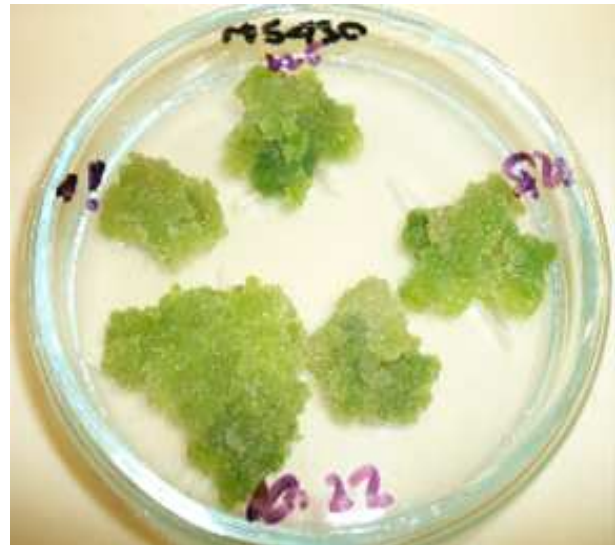
A tenyészetek fenntartásához szükséges az időről időre történő átoltás, mely céltól és növényfajtól függően általában 2-6 hetes periódusokat jelent. A növényi sejtenyészetek által adott növekedési görbék általában igen hasonlóak a mikroorganizmusokéhoz - ugyanúgy megfigyelhető a lag fázis, a gyorsuló növekedés szakasza, az exponenciális növekedés szakasza, a hanyatló és a pusztulási fázis -, azonban szaporodásuk sokkal lassabb azoknál.

Az átoltás mindig steril körülmények között kell, hogy történjen, mivel a növényi szövettenyésztéshez használt táptalajok a legtöbb mikroorganizmus szaporodásához is ideális körülményeket biztosítanak. Befertőzött kultúra a továbbiakban nem használható fel. A tenyészetek tárolásához is szükségesek a steril, jól ellenőrizhető, állandó körülmények, legjobb a légkondicionált helyiség. Megvilágítás nem minden esetben szükséges, ez a kallusz típusától, és a kísérlet céljától függ.

A kallusz genetikailag módosításával az anyanövény tulajdonságai megváltoztathatók. A genetikai módosítás két alapvető eszköze a génpuskával történő génbelövés, illetve az *Agrobacterium tumefaciens* fertőzése révén annak TI-plazmidja segítségével történő génbevitel. *Agrobacterium rhizogenes* plazmidja pedig alkalmas hairy root kultúrák indukálására is.

#### 8.2.4. Hajszálgöyökér (hairy root) kultúrák

A hajszálgöyökér kultúrát az *Agrobacterium rhizogenes* fertőzés hozza létre. A törzs RI (root-inducing) plazmidja beépít néhány gént a növény genomjába. Ez nem pusztítja el a növényt azonnal, hanem a működését több ponton megváltoztatja. Egyrészt differenciálódást okoz: hajszálgöyökér jellegű, de rendezetlen sejtek halmaza jön létre, ezek gyakorlatilag rákosnak tekinthető sejtek. A természetben az észlelhető, hogy a fertőzött növény „kiszőrösödik” (Hairy Root Disease). Más részről megváltozik a sejtek anyagcseréje,



6. ábra Több hetes kallusz tenyészetek



7. ábra Hajszálgöyökér tenyészet sárgarépából

megindul az opinok (aminosav származékok) bioszintézise, amelyeket a hordozó *Agrobacterium* használ fel tápanyagként.

A mechanizmus analóg az *Agrobacterium tumefaciens* fertőzéssel. Ez utóbbi a TI (tumor indukáló) plazmidjával visz be egy DNS szakaszt (tDNS) a fertőzött sejt kromoszomális genomjába, megindítja az opin szintézist és tumor formájú sejtburjánzást okoz.

A hajszálgökér tenyészet gyorsan növekszik és nagy a termelékenysége. Előnye még, hogy nincs szükség fitohormonok adagolására, a táptalaj egyszerű szeretlen sókból áll. Hátrány ugyanakkor, hogy makroszkopikus szálas szerkezete miatt sem kevert, sem air lift fermentorokban nem tenyészthető. Emiatt a tenyésztés léptéknövelése igen nehézkes. Nagyobb léptékű alkalmazásról nem tesznek említést, de a benne rejlő potenciál igen nagy.

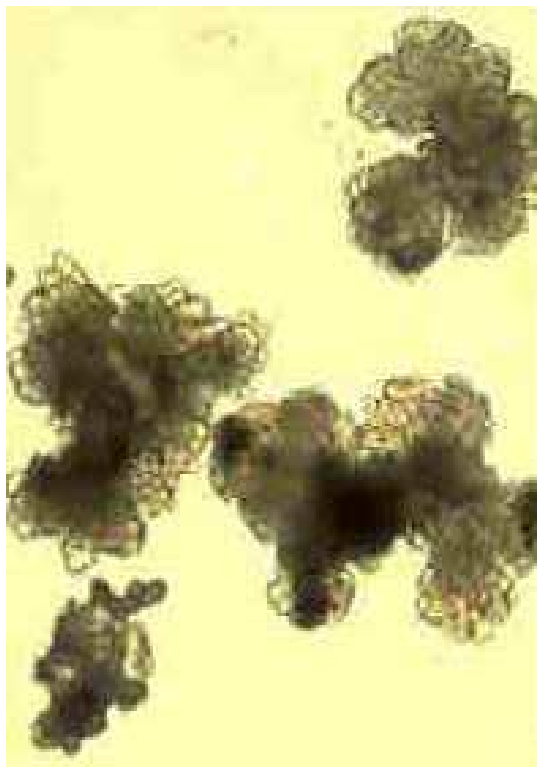


8. ábra Hajszálgökér tenyészet laboratóriumi fermentorban

#### 8.2.5. Szuszpenziós tenyészet

A szuszpenziós kultúrák hasonlítanak legjobban a mikrobákkal végrehajtott fermentációkhoz. Mégis van különbség, a növényi sejtek rendszerint nem különállóan növekednek, hanem sejtsomókat alkotnak (akár 50-100 sejt együtt). E sejtek differenciálatlanok, legtöbb tulajdonságukban igen hasonlóak a kallusz kultúrák sejtjeihez. Előállításuk is legkönnyebben kalluszból történik. A sejtsuszpenzió létrehozásához célszerű törekeny, könnyen széteső kalluszokat kiválasztani. A szövetet sejtfalbontó enzimektel kezelik, ez fellazítja a sejtfall anyagát és ezzel szétválasztja a sejteket. Ugyanakkor a sérült sejtfallú sejtek érzékennyé válnak az ozmózisnyomásra, ezért ozmolitikumot (pl. szorbitot) is kell adni tápoldatba. Auxin hatására a tenyészet osztódása felgyorsul, a kallusznál megszokott 4-6 hetes átoltási ciklus lerövidül kb. két hétre.

Ahhoz, hogy a szuszpendált sejtek növekedni legyenek képesek, szükséges egy kritikus inokulum méret (10-20%) elérése. Ez alatt a növekedés általában meg sem indul, de a kritikus feletti, nagyobb inokulum méret további pozitív hatásokkal is járhat, egyrészt a sejt-, másrészt a szekunder metabolit termelés tekintetében is.



9. ábra Szuszpenziós tenyészet

### 8.2.6. Protoplaszt tenyészet

Maga a **protoplaszt** egy sejtfalától megfosztott sejt. A sejtfal hiányában a citoplazmát csak a sejtmembrán, a lipid kettősréteg borítja. Protoplaszt állapotban a sejt elveszti megszokott formáját, és viszkózus folyadékcséppként viselkedik. A felületi feszültség hatására lekerekített, gömbszerű alakot vesz fel.

Protoplasztok spontán, maguktól nem jönnek létre, a sejtfalat célzottan, enzimes (celluláz + pektináz) kezeléssel emésztik le. Az így létrehozott tenyészet rendkívül érzékeny a külső hatásokra. A citoplazma membrán könnyen szétszakad, ami a sejt pusztulásával jár. Mindenek előtt pontosan be kell állítani a közeg ozmolaritását, hogy ne keletkezzen nyomáskülönbség a sejten belüli és kívüli tér között. Ezt nem-metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit, 10-13%) alkalmazásával célszerű megoldani. A szénforrásként adott szacharóz azért nem megfelelő, mert az az anyagcsere során felhasználódik, és a csökkenő koncentrációval az ozmolaritás is csökken. A védtelen sejteket óvni kell a mechanikai hatásoktól is, a keverés, rázás, áramoltatás nyíróerőket hoz létre, ami elszakíthatja a membránt. Még a pipetázást is lassan, kíméletesen kell végrehajtani, mert a pipetta csúcsában, a szűk csatornában a gyors áramoltatás örvényeket hozhat létre, ami a protoplasztok pusztulását okozhatja.

Ha sikerül a protoplasztokat életben tartani, akkor szinte azonnal megindul a sejtfal re-szintézise. A sejtek néhány hét alatt újraépítik sejtfalukat. Más életfolyamatok is zavartalanul folytatódnak, az anyagcsere, a növekedés, a sejtosztódás működik. A regenerálódó sejtek a tápoldatban előbb sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészetet), szilárd táptalajra helyezve kallusz képződik. Ezekből lehet később a teljes növényt is regenerálni.



10. ábra Növényi protoplasztok

## 8.3. A növényi szövetek tenyésztése

### 8.3.1. Tápoldatok

A biológiai iparban a tenyésztési körülmények közül elsőként a tápoldat összetételét szoktuk említeni. A növények alapvetően fotoautotrófok, azaz a fotoszintézishez szükséges szén-dioxidon és vízen kívül csak szervetlen sókra van szükségük. A fotoszintézis gyakran nem elegendő az anyagcseréhez, ezért gyakran adnak a tápoldatba heterotróf szénforrásként szacharózt. A növényeknél ez az univerzális cukorforrás a sejtek számára, ellentétben az állatvilágban általános glükózzal (=vércukor). Az ásványi sókon kívül kis mennyiségben szükségesek a növényi tenyészetek számára vitamin és hormon jellegű szerves molekulák is. Általánosan elterjedt a Murashige - Skoog (MS) tápoldat. Ezt, illetve ennek módosított változatait használják laboratóriumban és ipari méretben egyaránt. Emellett aktív szén adagolása egyes esetekben elősegíti a gyökéreképződést.



Makrokomponensek, g/l		Mikrokomponensek, mg/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65	KI	0,83
KNO <sub>3</sub>	1,9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,44	MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22,3
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,37	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,6
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25
Vitaminok (mg/l)		CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,025
mio-inozitol	100	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025
nikotinsav	0,5		
piridoxin-HCl	0,5	Vas, kelát formában	
tiamin-HCl	0,5	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27,8
glycin	2	Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	37,3

1. táblázat A Murashige-Skoog tápoldat összetétele

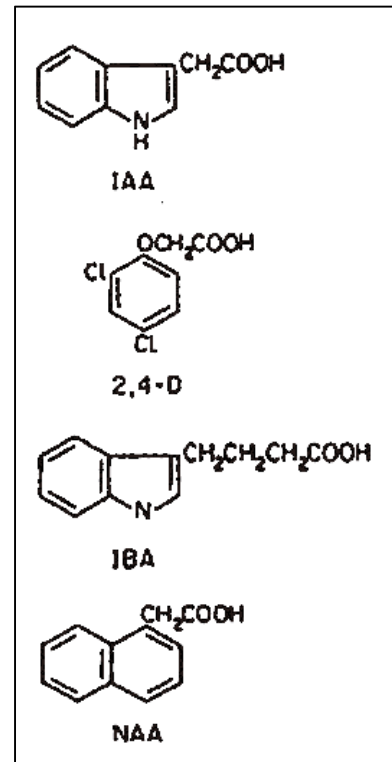
A táptalajba adagolt növényi hormonok kémiaiilag és hatástanilag egészen más jellegű anyagok, mint az állati hormonok. Fő csoportjaik:

- Auxinok
- Citokininek
- Gibberellinek

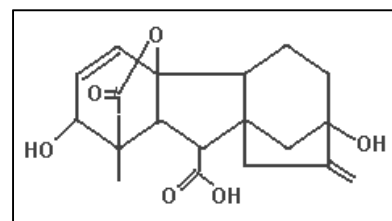
A tápközeghez adott növényi hormonok általában mesterséges auxinok és citokininek: e növényi hormonként alkalmazott vegyületek többsége a természetben nem található meg, de hatásuk közelítőleg megfelel a természetes anyagokénak, továbbá egyes esetekben stabilabbak, és sokszor hatékonyabbak azoknál.

Az **auxinok** a sejtsztódást és a lineáris növekedést serkentik, ezzel a gyökér, szár, virág, a gyümölcs növekedését szabályozzák. Kémiaiilag az auxinok aromás karbonsav származékok. A természetben előforduló molekula az indol-ecetsav (IAA). Ez szintetikus is előállítható, de az a hátránya, hogy bomlékony, a sterilizésnél, illetve a hosszú tenyésztési idő során átalakul. Ezért kerestek hasonló hatású szintetikus analógokat. Elterjedt a nagyon stabil 2,4-diklór-fenoxiecetsav (2,4-D), valamint az indol-vajsav (IBA) és a naftil-ecetsav (NAA) használata.

A **gibberellinek** elsősorban a lineáris növekedést, csírázást, virágzást, gyümölcstermést fokozó hormonok. Az anyagcserében nagyon sokféle gibberellin származék keletkezik, de ezek közül csak néhánynak van tényleges hormon hatása. A táptalajokba a fermentációsán is előállítható GA3 molekulát adagolják.



11. ábra Auxinok



12. ábra Gibberellinsav

A **citokininek** az auxin hatását moderálják. Valójában nem is az egyes hormonok koncentrációja határozza meg a hatást, hanem a két típus aránya. Együtt a sejtosztódást stimulálják, de a citokininek visszafogják az auxin által kiváltott szármegnyúlást. A növényregenerálásnál az auxin/citokinin arány szabályozza, hogy a kallusból szár vagy gyökér lesz. Több auxin a hajtások kialakulásának kedvez, míg az auxin elvételével a gyökeresedés indul meg.

Kémiaileg a citokininek adenin származékok, az aminos-csoporthoz kapcsolódik egy nagyobb méretű apoláris oldallánc.

A szükséges **vitaminok** között találunk olyanokat, amelyek az állati/emberi szervezet számára is nélkülözhetetlenek (nikotinsav, piridoxin, tiamin), de emellett vannak a csak a növények számára fontos anyagok (inozit, glicin) is.

### 8.3.2. Tenyésztési körülmények

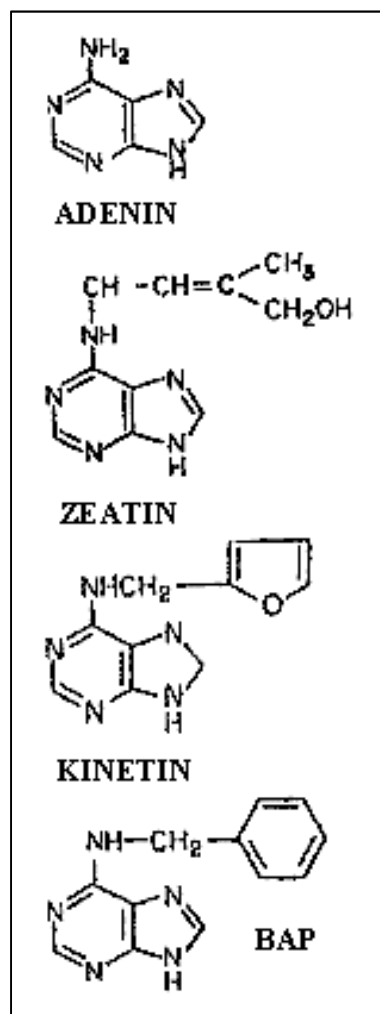
A növényi szövetek tenyésztése kapcsán már említettük a szükséges sterilítást. A lassan növekvő növényi kultúrákat igen gyorsan túlnövik a konkurens mikroorganizmusok. A fertőzés lehet specifikus, a növényt a természetben is megbetegítő kártevő mikrobák (baktériumok, gombák, vírusok) jelenhetnek meg. Lehet emellett általános is, a táptalajon jól növekvő mikroorganizmusok a növény jelenlététől függetlenül is elszaporodhatnak. A növényi szövetek manipulációját a mikrobiológiai laborokban megszokott sterilitás fenntartásával kell elvégezni, sterilizált táptalajokon, zárt, sterilizált edényekben, melyeket csak steril légtérben (sterilfülke, laminár box) szabad felnyitni.

A növényi tenyészetek növekedésének és a termékképzésnek is megvan az optimális hőmérséklete. Ez igen széles határok között mozoghat, akár 15 és 32 °C között, célszerű mindenképpen kísérletesen meghatározni.

A tápanyagok között nem említettük a fotoszintézishez szükséges szén-dioxidot. Az esetek nagy részében elegendő az atmoszférában található 0,02-0,03% CO<sub>2</sub>, de egyes tenyészetek serkenthetők a gáztérbe adagolt 1-5% CO<sub>2</sub>-dal. A növényeket körülvevő gáztér páratartalma magas, a laboratóriumi edényeken belül közel 100%.

A mikrobák szaporításához képest eltérést jelent a növények fényigénye. A növényi laboratóriumok felszereléséhez hozzá tartozik a szabályozható fényasztal, manapság már ledes fényforrásokkal. Az elsődleges paraméter a fény intenzitása. Ennek mértéke is széles határok között mozog, 1-2 ezer luxos megvilágítástól egészen 8000 luxos fényerőig terjedhet. Hatással van a növényi szövetekre a fény hullámhossza is. A kék fény a hajtás, a vörös fény a gyökérszét fejlődését segíti elő.

Befolyásoló tényező a világos-sötét periódusok hossza is. Ez a természetben is változó érték. Az egyenlítő közelében gyakorlatilag állandó a napéjgyenlőség (12+12 óra), a mi mérsékelt égövünkön a nyári vegetációs időszakban a 16+8 óra jellemző, a sarkköri zónában pedig a megvilágítás akár a 20-24 órát is elérheti.



13. ábra Citokininek

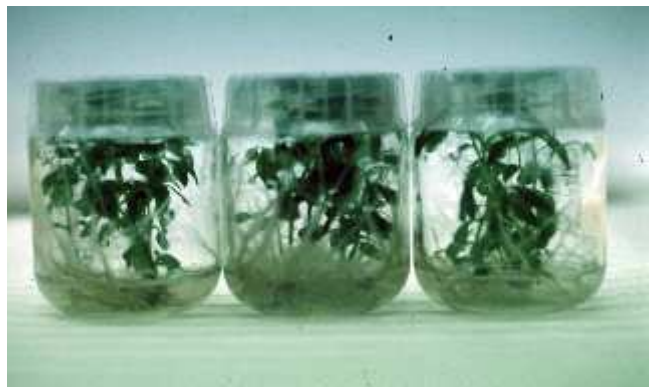
#### 8.3.4. Laboratóriumi edények, eszközök

A növényi sejtek, szövetek tenyésztéséhez használatos edények hasonlítanak a mikrobiológiai laborokban megszokottakhoz, de mivel a növények fölfelé, a táptalajból kiemelkedve is nőnek, az edények belmagasságát meg kell növelni, hogy elférjenek benne a növények. Az edények anyaga hagyományosan üveg, ezek ismételten felhasználhatók, mivel hővel sterilizálhatók, autoklávozhatók. Manapság elterjedtek az egyszer használatos műanyag eszközök is, amelyeket sterilen szállítanak, és felhasználás után a hulladékba kerülnek. Kis növénykések esetén megfelelő a kémcső, hiszen abban bőven van felső légtér. Ebből viszont nehéz a növényt sértetlenül kiemelni. A Petri csészék viszont már csak sejtes tenyészetek, esetleg kallusok nevelésére alkalmasak. A Petri csésze klasszikus megfelelője a növényeknél a konzerviparban használatos befőttes üveg. Az alja megfelel a Petri csésze méretének, e fölött van viszont 10-15 cm szabad tér a hajtások növekedéséhez. Emellett olcsó, könnyen beszerezhető, anyaga hőálló, hiszen a konzerveket is autoklávban sterilizálják. Átlátszó, így a fotoszintézishez szükséges fény bejuthat a növényhez. Az egyedüli változtatás, hogy a csavarzáras kupakon egy kis lyukat ütnek, amelybe egy kis szivacs dugót helyeznek. Ez lehetővé teszi a légcserét a külső légtérrel, de megszüri a levegőt, így nem fertőződik be a tenyészet. A műanyag edények esetén már nem ragaszkodnak a hengeres alakhoz, a négyzetes forma jobb helykihasználást tesz lehetővé.

Ipari méretekben általában szuszpenziós tenyészeteket szaporítanak fermentorszerű készülékekben. Legtöbbször keverő nélküli, air lift megoldásokat alkalmaznak.



14. ábra Hajtástenyészetek kémcsőben



15. ábra Növények „befőttes” üvegben



16. ábra Műanyag nevelő doboz

### 8.3.5. *A léptéknövelés lépései*

Növényi sejt- illetve szövetkultúrák esetén a léptéknövelés egyik nehézsége, hogy annak során a laboratóriumi körülmények között termelt, számunkra lényeges produktumok termelése sok esetben megszűnik. A sikeresség fokmérője a produktivitás: amennyiben az a reaktorban megegyező vagy nagyobb, mint a rázatott lombikokban, a művelet sikeresnek tekinthető.

A léptéknövelési folyamat során első lépésben az intakt növényből izolált szövetekből indítunk kallusz kultúrát. Ez a fázis a legalkalmasabb alapvető mérések elvégzésére, mint a növekedési görbék felvétele, illetve az egyes sejtvonalak termelékenységének folyamatos monitorozása, amely alapján kiválaszthatjuk a továbbiakban célunknak legmegfelelőbb sejtvonalat.

Ez után következik a szuszpenziós fázis. Célszerű a növekedés mértékét továbbra is ellenőrizni, egyúttal általában a léptéknövelésnek ebben a szakaszában végzik a legtöbb optimalizációt, a korábban szelektált sejtvonallal produktivitásának további növelésének érdekében.

A következő fázist a különböző méretű bioreaktorok jelentik, fokozatosan növekedve a laboratóriumtól a félüzemig át az ipari léptékig. A rázatott kultúrák bioreaktorba való áthelyezésével a legnagyobb probléma, amely már a tápközeg optimalizációjánál is felmerült: az egyes körülmények kölcsönhatásai igen bonyolultak lehetnek, közel sem biztos, hogy a lehetőség szerint azonos körülmények fenntartása mellett a termelékenység nem változik. Ekkor (újra) optimalizálandók a kultúra körülményei, figyelembe véve az eddig is jelenlévő körülmények mellett – tápközeg összetétele, hőmérséklet, pH, stb. – azokat a faktorokat is, amelyek kisebb léptékű termelésnél még nem voltak jelen – így a keverés és levegőztetés megoldásának a kérdése, stb. Ekkor dönthető el, milyen lesz az optimális üzemeltetési mód: folyamatos üzemeltetésű, rátáplálásos, félfolyamatos vagy szakaszos. A kisebb reaktoroktól a nagyobbak irányába történő léptéknövelésnél folyamatosan figyelemmel kell kísérni valamennyi paraméter változását, és szükség esetén beavatkozni a folyamatba.

A léptéknövelés során fontos határ a megvilágítás lehetőségének megszűnése. Kisméretű üveg-, vagy ablakkal ellátott fermentorokban még lehetséges a fotoszintézis fenntartása. Bizonyos méret fölött viszont már technikailag nem valósítható meg a megfelelő világítás. Százliteres nagyságrendben, illetve e fölött már fém készülékekben, világítás nélkül teljesen heterotróf anyagcserét folytatnak a sejtek.

### 8.3.6. *Növekedés, sejtaggregáció, falnövekedés*

Növényi sejtszuszenziók esetén sokszor megfigyelhető a falnövekedés és az aggregátumképzés. Az aggregátumok képződésének oka többnyire a sejtek osztódás utáni szétválásának sikertelensége, vagy extracellulárisan kiválasztott poliszacharidok jelenléte. Az aggregáció mértéke különböző lehet, a finom szuszpenziótól akár 500 µm-es, vagy milliméteres mérettartományig is, nagyságrendileg több száz sejt összetapadása által. Az aggregátumok képződése függ a kultúra korától, körülményeitől, és a sejtvonaltól is, tehát célszerű a léptéknövelés folyamán figyelemmel kísérni a morfológiai változások trendjét.

Az aggregátumok jelenléte technológiai problémákat vet fel: mivel ülepedésre hajlamosak, szükséges a megfelelő intenzitású kevertetés biztosítása, amely azonban a sejtek sérülését eredményezheti. Problémák léphetnek fel a homogenitás terén is: az aggregátumok belsejében elhelyezkedő sejtekhez nehezebben jut el az oxigén, illetve a tápanyag, a biokémiai reakciók diffúziólimitálttá válhatnak, amelynek hatása megjósolhatatlan.

Mind a falnövekedés, mint a túl nagy aggregátumok problémájára megoldást jelenhet például a pektináz enzim adagolása. A sejtek bizonyos mértékű összetapadása ugyanakkor elkerülhetetlen, és számos folyamathoz elengedhetetlen a sejt-sejt kapcsolat fennállása.

### 8.3.7. *Levegőztetés*

A növényi sejt kultúrák oxigénigénye azok lassú növekedése miatt általában kisebb, mint az aerob mikroorganizmusoké vagy az emlőssejteké, ám a növényi sejtek többnyire aggregátumokat képeznek, amelyek környezetében az oxigénigény magas. A túl magas oxigénkoncentráció viszont esetenként akár toxikus is lehet. Az átlagos oxigénfogyasztás nagyságrendje növényi sejt kultúrák esetén 3-4 mg/g sejt/óra. A tervezés során vizsgálandó paraméterek a keverés intenzitása, a buborékok mérete és eloszlása, a tápközeg oxigénfelvevő-képessége, és a hidrodinamikai stressz mértéke. Ez utóbbi a pektinázzal fellazított sejt falú sejtek számára veszélyes lehet.

A szükséges mértékű anyagátadás biztosításához a reaktorokban turbulens áramlást hoznak létre. A megfelelő intenzitású kevertetés feltétlenül szükséges a sejtek megfelelő oxigén- és tápanyagellátásához, de ügyelni kell a hidrodinamikai feszültségekre: a növényi sejtek a nyírófeszültségekkel szemben sokkal kevésbé ellenállóak.

Nagy termelékenységhez sűrűbb sejt szuszpenzió létrehozása szükséges, ennek azonban a nagyobb az oxigén-szükséglete, és nehezebb a megfelelő anyagátadás biztosítása a sejtek károsítása nélkül. A nagy sejt sűrűség és a sejt aggregáció nagy viszkozitást eredményezhet, ezek a sűrű szuszpenziók a newtonitól eltérő viselkedést mutatnak. A sejtek az alkalmazott szénforrástól illetve fajtól és sejt vonaltól függően a fermentáció későbbi szakaszában poliszacharidokat is kiválaszthatnak, ami a viszkozitás hirtelen megugrását eredményezheti.

A túlzott levegőztetés habzást okozhat a bioreaktorban, de szerepe van a lé fehérjekoncentrációjának is. A habképződés számos vegyület alkalmazásával csökkenthető, amelyek azonban befolyásolhatják a sejtek növekedését és életképességét, ezért alkalmazásuk előtt további kísérletek végzendők, a habképzés csökkentése melletti további hatások vizsgálatára.

## 8.4. **Bioreaktorok**

Az első próbálkozások mikrobiológiai sejt fermentációs technológiákban alkalmazott reaktortípusok átvételével történtek. Sokáig azt gondolták, hogy növényi sejt fermentáció céljára csak az airlift típusú bioreaktorok lesznek hatékonyan alkalmazhatók a növényi sejtek a nyírásérzékenysége miatt, erre azonban ellenpélda a világ egyik jelenleg legnagyobb növényi sejt kultúraüzeme Németországban, Ahrensburgban, ahol 5 db kevert, 75 m<sup>3</sup>-es tartályreaktort alkalmaznak kaszkádrendszerben, Paclitaxel termelésére.

### 8.4.1. *Keverős tartályreaktorok*

A mikroorganizmusoknál rendszerint általánosan alkalmazható keverős tartályreaktorok növényi sejt kultúrák esetében csak kellő körültekintéssel használhatók, azok nyírásérzékenysége miatt. A keverőlapátok tervezése, illetve kiválasztása során arra kell törekedni, hogy azok minél kisebb hidrodinamikai feszültséget keltsenek a közegben, így nagyobb keverési intenzitás esetén is a lehető legkevesebb kárt okozzák a sejtekben. A fellépő nyírófeszültségek mellett hátrányt jelent még a nagy energiaigény. Ennek ellenére ez ma a gyakorlatban legelterjedtebb reaktortípus a növényi sejt fermentáció terén, mivel a léptéknövelés könnyen megvalósítható. A költsége sem túl magas, és igen sok féle keverő választható, amellyel nagyban befolyásolható a sejteket érő stressz mértéke, könnyen megvalósítható a megfelelő kevertetés.

### 8.4.2. *Airlift reaktorok*

Az airlift reaktorok általános előnyei érvényesülnek (kisebb nyírófeszültség, nincs mozgó alkatrész, kisebb energiaigény). Hátránya viszont, hogy nagy sűrűségű szuszpenziók esetén jelentősen csökken a reaktortípus hatékonysága.

#### 8.4.3. Perfúziós bioreaktorok

Ezeket eredetileg emlős sejtek szaporítására fejlesztették ki, lényegük, hogy a reaktorteret két részre osztják egy membrán vagy szita segítségével, amely az oxigént átengedi, de a sejteket nem. Az oxigén oldott állapotban a membránon keresztül éri el a sejteket, így azok nem találkoznak buborékokkal.

### 8.5. Fermentációs technikák

A szakaszos üzemeltetési módot a kísérleti fázisban általánosan alkalmazzák, és a léptéknövelésnél ezt nagyítják fel, azután térnek át más technikára. Szakaszos üzemben mind primer, mind szekunder metabolitok előállíthatók. A szubsztrát fogyása és a sejt-tömeg gyarapodása miatt a körülmények folyamatosan változnak. Mérésekkel követve a folyamatot kvantitatív információt szerezhetünk az anyagcsere működéséről. Ugyanakkor a változó körülmények miatt csak a folyamat egy szakaszában működik optimálisan a rendszer, így nem mindig ez a leghatékonyabb megoldás.

Rátáplálás fermentációt akkor célszerű választanunk, ha a termelékenységre jelentős hatást gyakorol a nagy induló szubsztrát koncentráció. Rátáplálás esetén is optimálni kell az adagolást, mert a fellépő ozmotikus sokk kárt tehet a sejtekben.

A félfolytonos eljárást olyan esetben célszerű választani, ha a termékképzés a növekedéshez kötött. Ellenkező esetben, szekunder metabolitoknál kétlépcsős szakaszos, vagy kétlépcsős folytonos termelést érdemes megvalósítani. Ekkor az első lépés egy növekedési környezet létrehozása, melyben a növényi sejteket felszaporítjuk, majd második lépésként azokat új környezetbe, eltérő összetételű tápközegbe helyezve megindítjuk, illetve fokozzuk az általunk kinyerni kívánt szekunder metabolit termelését.

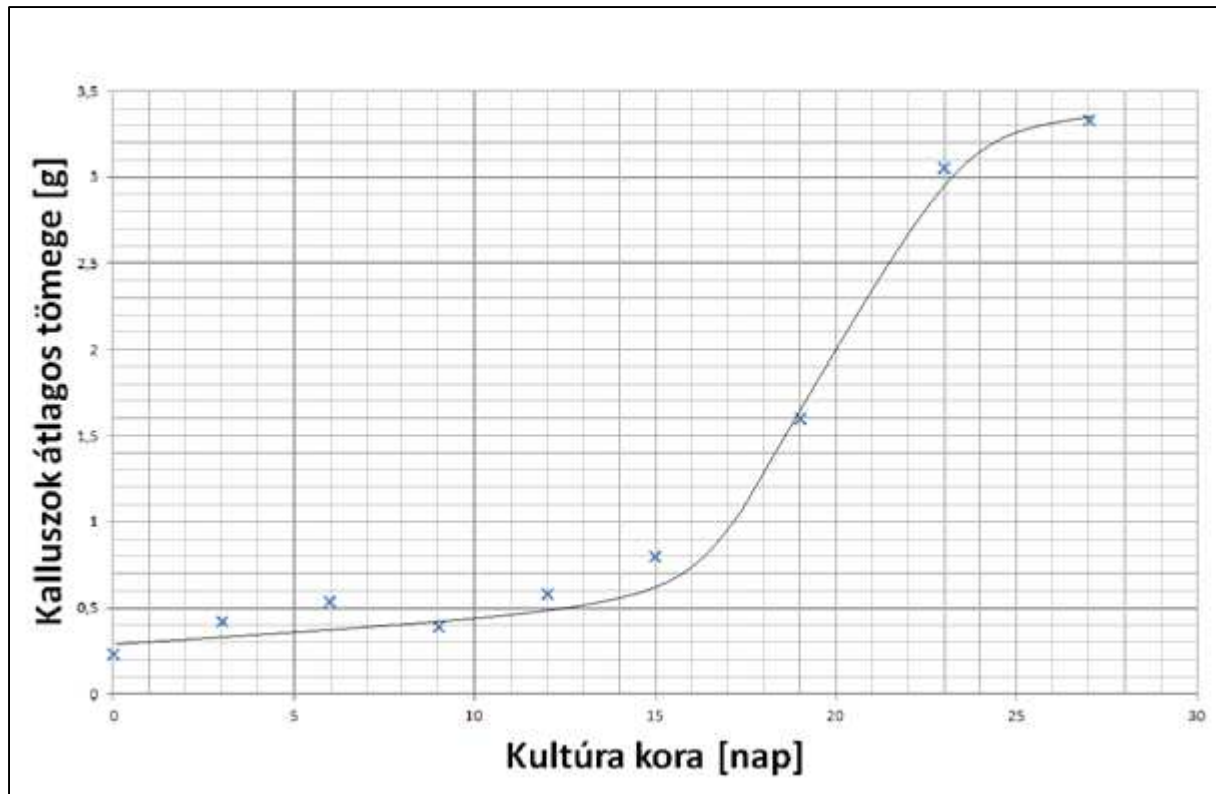
Folyamatos fermentáció alkalmazása általában a növekedéshez kapcsolódóan termelődő metabolitok esetében célszerű, de az esetlegesen fellépő termék-inhibíciót is ki lehet vele küszöbölni. Sejtviisszatartás alkalmazásával még további javulás is elérhető, mind sejt-, mind termék-hozamban.

Napjainkra a legtöbb növényfaj laboratóriumi *in vitro* kultivációja már megoldott, ezért a kutatások és fejlesztések fókuszba folyamatosan eltolódott a termelékenység növelése és a léptéknövelés, az ipari léptékű *in vitro* növényi sejtfermentáció megvalósításának irányába. Míg mikrobiális sejtfermentációs technológiák esetén a megfelelő bioreaktorok tervezése és üzemeltetése napjainkra szinte rutinfeladat, növényi sejtenyészetek esetében ez jóval bonyolultabb, kevesebb ismeret halmozódott fel.

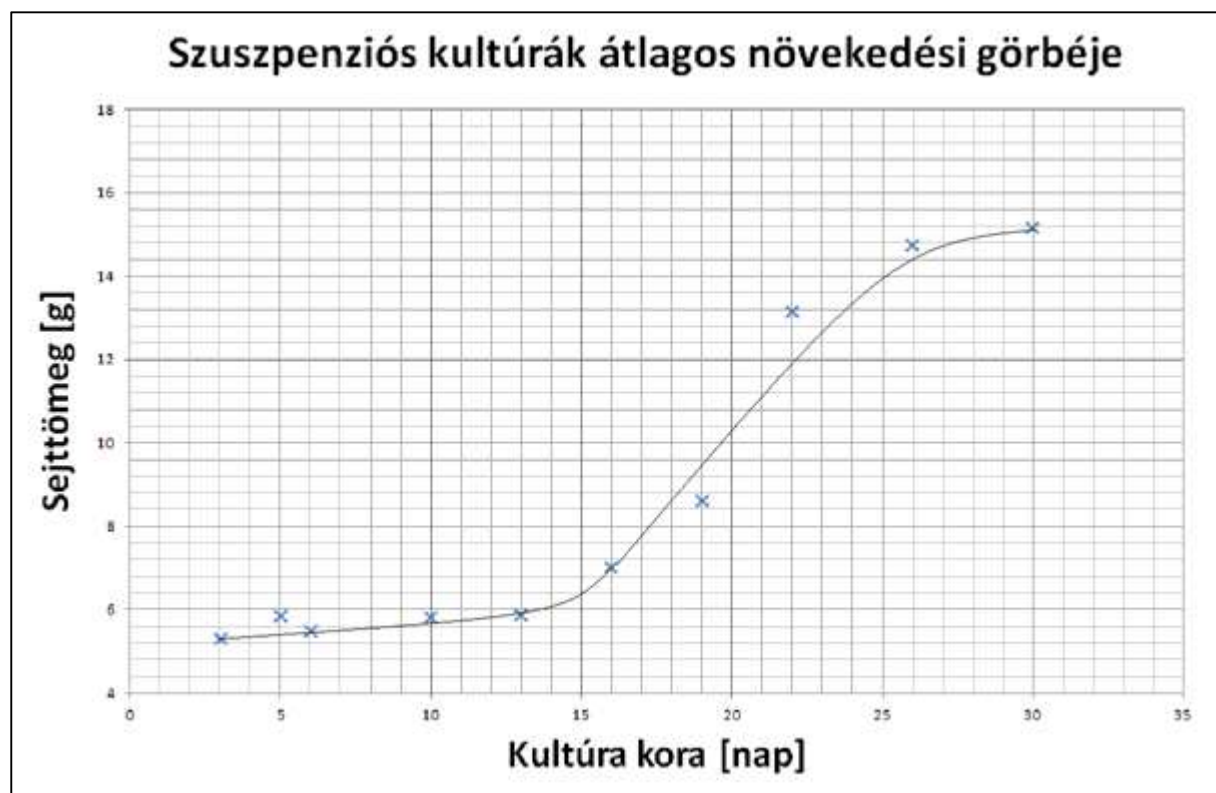
### 8.6. A tenyészet jellemzése: sejt-tömeg mérés

A tenyészetek növekedésének mérése nehezebb, mint a mikrobáknál. A szilárd táptalajon nevelt kultúrák zöldtömegének mérése csak kiemeléssel, azaz a szövetek károsításával lehetséges. A folyadékban szaporodó sejtek mérése is kissé eltér a mikrobiális sejtszuszpenzióktól. A protoplaszt kultúrák megszámolhatók mikroszkóp alatt Bürker kamrában, vagy akár citométerrel is. Az ipari léptékben is használt szuszpenziós tenyészetek viszont a sejtek csomósodása miatt nehezen mérhetők. Lemérhetjük a biomassza nedves és száraz súlyát, centrifugálással üleptítve a térfogatát. Ezek nem igazán pontos és nagy felbontású mérések, nem különböztetik meg az élő és elpusztult sejteket, így csak tendenciák meghatározására alkalmasak. Alkalmazhatunk közvetett méréseket, mérhetjük a minta klorofill-, fehérje- vagy DNS tartalmát. A sejteket teljesen szétválasztani csak roncsoló kezeléssel lehet, például króm-trioxidos melegítéssel. Az így elpusztított sejteket azután megszámolhatjuk a szokásos módszerekkel, mikroszkóp alatt, sejtszámlálóval vagy áramlási citométerrel.

Még egy egyszerű nedves súly méréssel is jól követhető, hogy a tenyészetek a mikrobákhoz hasonlóan szigmoid görbe szerint növekednek. A növekedési görbe alakulása, fázisai mind a kalluszoknál, mind a szuszpenziós tenyészeteknél jól követhetők.



17. ábra Kallusz tenyészet növekedése



18. ábra Szuszpenziós tenyészet növekedése

## 8.7. Növényregenerálás

A növényi genetikai manipuláció változatos módszereire itt nem térünk ki. Valamennyinek közös eleme viszont, hogy a módosítás sejtszinten történik, majd a klónok minőségi és mennyiségi szelekciója után a kiválasztott sejtekből a totipotenciát kihasználva szöveteket, illetve egész növényt regenerálnak. A növény-regenerációnak alapvetően két útja van:

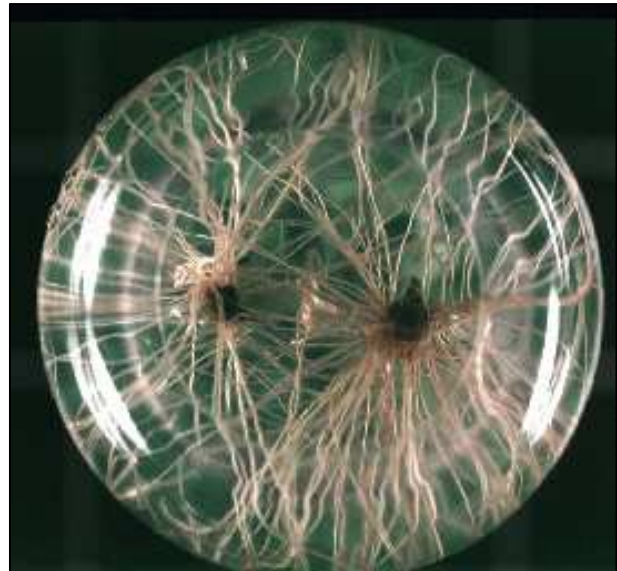
**Organogenezis:** egy növényi szerv regenerálódik (hajtás, gyökér, hagyma, gumó), ebből alakítjuk ki az egész növényt

**Embriogenezis:** a manipulált sejtől egy embrió jön létre (van sziklevele, gyökere) és ebből lesz a növény.

A növényregenerálás többféle tenyészetből is kiindulhat (protoplaszt, kallusz, merisztéma), de más-más lépések célszerűek.

Merisztémából az organogenezis indítható meg könnyebben. A létrehozott növényi részek azután kiválóan alkalmasak a vegetatív mikroszaporításra.

Protoplasztok esetében a sejttal regenerálás után kallusz tenyészet alakítható ki. Ebből auxinok (pl. 2,4-D) adagolásával megindítható az embriogenezis. Az auxin és kék fény hatására erőteljes hajtásképződés indul meg. Steril körülmények között, kiegészített MS tápoldaton, 3-5 hét alatt létrehozható egy minimális gyökérzetű növényke. Ennek energiaellátása kettős. Felhasználja egyrészt a tápoldathoz adott szacharózt, másrészt megindul a fotoszintézis is. Ennek elősegítésére, a zöld színtestek számának növelése érdekében nagy fényerőt biztosítanak, ami elérheti a 8000 luxot is. A megvilágítási ciklus 16+8 óra. A hajtás kifejlődése után kerül sor a gyökereztetésre. Az addig fejletlen gyökérzet növekedésnek indul, ha a táptalajban megváltoztatják a hormonok arányát, csökkentik az auxin arányát a citokininekhez viszonyítva. Emellett a kék fény helyett vörös fényre váltanak. Néhány hét alatt kifejlődik a gyökérzet is. A növényke teljes, minden része kialakult, elvileg életképes a szabad természetben. Gyakorlatban azonban még nagyon érzékeny a környezeti hatásokra. Emiatt csak egy fokozatos szoktatási folyamat után lehet mezőgazdasági termesztésbe venni.



19. ábra Gyökerezített tenyészet (alulnézetben)

### 8.7.1. Edzés, kiültetés

Az edényből kivett növényt speciális talajba ültetik, majd először fitotronba helyezik. Itt a fény, a hőmérséklet szabályozott, de nagyobb légtérben, kisebb páratartalom mellett adaptálódik. A következő lépés az üvegház, a fóliasátor, amit később a nappali órákra kinyitnak. A szoktatás eredményeként a növény ugyanúgy kezelhető, mint a természetben élő egyedek. Növekszik, virágot, termést hoz, ivarosán szaporítható, kellő elszaporítás után termesztethető.

Erre a hosszadalmas eljárásra elsősorban a kialakulatlan vízháztartás miatt van szükség. Alapesetben a növény a gyökerein keresztül folyamatosan vizet vesz fel, ez feláramlik a levelekbe, ahol a légzőnyílásokon keresztül elpárolog. Erre a tenyésztőedényen belül 100% pára-



tartalom mellett nincs se szükség, se lehetőség. A légző nyílások állandóan nyitottak, nem zárulnak a körülményeknek megfelelően. A gyökérzet és a levélfelület nagysága nem hangolódott össze, ha pedig a levelek többet párologtatnak, mint amennyit a gyökerek felvesznek, akkor a növény elfonnyad és kiszárad. Emellett a kültakaró sem erősödött meg kellőképpen, hiányzik a viaszos védőréteg is. Így védtelen a kártevőkkel, kórokozókval, mechanikai sérülésekkel szemben.

## Tartalom

<b>8. A növényi szövetek tenyésztése</b> .....	1
8.1. Történeti áttekintés .....	2
8.2. A növényi tenyészetek fajtái .....	2
8.2.1. Explantátum .....	2
8.2.2. Merisztéma.....	3
8.2.3. Kallusztenyészet .....	5
8.2.4. Hajszálgökér (hairy root) kultúrák.....	6
8.2.5. Szuszpenziós tenyészet .....	7
8.2.6. Protoplaszt tenyészet.....	8
8.3. A növényi szövetek tenyésztése .....	8
8.3.1. Tápoldatok .....	8
8.3.2. Tenyésztési körülmények .....	10
8.3.4. Laboratóriumi edények, eszközök .....	11
8.3.5. A léptéknövelés lépései.....	12
8.3.6. Növekedés, sejtaggregáció, falnövekedés .....	12
8.3.7. Levegőztetés .....	13
8.4. Bioreaktorok .....	13
8.4.1. Keverős tartályreaktorok.....	13
8.4.2. Airlift reaktorok .....	13
8.4.3. Perfúziós bioreaktorok .....	14
8.5. Fermentációs technikák .....	14
8.6. A tenyészet jellemzése: sejttömeg mérés.....	14
8.7. Növényregenerálás.....	16
8.7.1. Edzés, kiültetés .....	16