

III/2. Protoplaszt fúzió

Protoplaszt: Sejtfalától megfosztott, kívül l csak sejtmembránnal borított sejt.
 Mesterségesen hozzuk létre a sejtfal eltávolításával. Elveszti az alakját, gömböly citoplazma cseppé válik.
 Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

- mechanikai hatásokra (keverés, rázás, pipettázás)
- ozmózis nyomásra (csak tömény cukoroldatokban tartható)

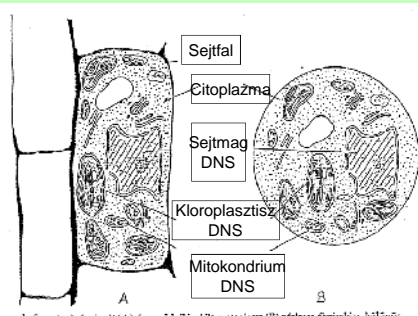


1

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Protoplasztok

Mindenféle sejt l (baktérium, éleszt , növény) lehet protoplasztot csinálni, de a tipikus alkalmazása a növények genetikai manipulációja.



1. Képn. A növényi sejt (A) és az abból levált protoplaszt (B) részletes ábrázolása, különös tekintettel az örökítő (genetikai) anyag felállítására.

2

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Protoplaszt izolálás, el állítás

Sejtfal lebontása:

1. *A megfelelő sejt kiválasztása*
 Elvileg bármely sejt l el állítható, de a legegyszer bb laboratóriumban nevelt növényi szövetenyészetb l.
2. *Steril körülmények biztosítása:*
 Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)
 Manipuláció steril leveg j térben
3. *A sejtfal leemésztése megfelelő enzimekkel.*


3

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Protoplaszt izolálás, el állítás

4. Kíméletes körülmények:
 a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipetázás, centrifugálás, keverés, rázás során vigyázni

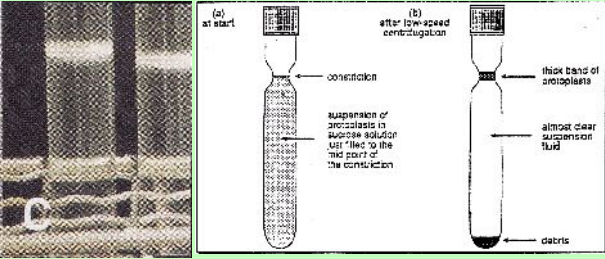

5. Ozmotikus védelem:
 Plazmolitikumok - nem metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit) használata (10-13%).
 A glükóz vagy szacharóz erre nem jó, mert a sejtek elfogyasztják, ettől csökken a közeg ozmózisnyomása – elpusztulhat a sejt. Ezért csak a tápláláshoz adnak egy keveset.



4

Protoplaszt el állítás

Centrifugálás: BABCOCK-CS BEN, „felfugálás”
 A protoplasztok sűrűsége kisebb, mint a cukor oldaté, ezért feljönnek felszínre. A növényi maradék pedig leülepszik.

5

Protoplasztok tenyésztése

A protoplasztot a sejtfal hiánya nem akadályozza a növekedésben és az osztódásban.


Szénhidrátok:

- bontható cukrok – tápanyag (glükóz, szacharóz, maltóz v. ezek keveréke) 1-2%
- nem bontható cukoralkoholok – 10-13%

Tápanyagok: ásványi sók

Növényi hormonok

Módszer: mikroszkóp alatt, tárgylemezen, néhány cseppnyi folyadékban



6

Protoplaszt fúzió

Protoplaszt fúzió: két protoplaszt beltartalmának egyesítése, fúziója. Eukarióták esetében a hibridnek két különböző sejtmagja lesz (heterokarion), és tartalmazza mindkét fél kloroplasztjait és mitokondriumait is (amelyek szintén tartalmaznak DNS-t).

A fúzió után a hibrid sejt a következő osztódások során a fölös számú kromoszómák nagy részét elveszti, és valamelyik szülő félhez válik hasonlóvá, csak néhány új gén/tulajdonság stabilizálódik. Ez a génmanipulációs módszer sem célzott, irányított, a létrejövő utódok tulajdonságai véletlenszerűen alakulnak ki. → szelekció



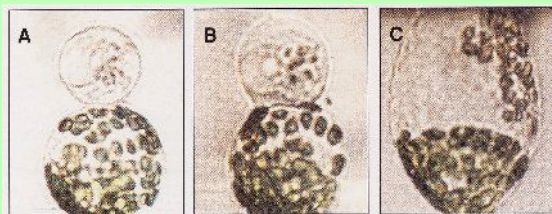
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Protoplaszt fúziós módszerek

Mikroszkóp alatt, speciális tárgylemezen, folyadékban (elektromos és/vagy vegyszeres technikák)

Burgonya PP elektrofúziója:



8



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Növények regenerálása protoplasztból

Az növényi sejtek különleges tulajdonsága a totipotencia = egyetlen sejtből regenerálható a teljes növény, ami azután kiültethető, szaporítható. →

Egy megváltoztatott tulajdonságú sejtből teljes, életképes növényt fejleszthetünk, amelynek minden sejtje hordozza az új géneket. Az ivarsejtek is, azaz a változás öröklik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Protoplaszt tenyésztés, regenerálás


A regenerálás első lépése a sejtfal újraképzése. A falszintézis a protoplaszt létrejöttének pillanatától megindul. Ezt a természetes folyamatot meg lehet gyorsítani, egyrészt hormonálisan, másrészt a közeg ozmózisnyomásának fokozatos csökkentésével.

Pl.: a kiindulásnál 9 %-nyi mannitot a hetenkénti áttöltésnél 6, majd 3 %-ra csökkentik.

A regenerálódó sejtek előbb sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kalluszt** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.

Ebből aztán teljes növényt lehet regenerálni.

10



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Protoplasztból növényregenerálás

Az első protoplasztból regenerált növény a dohány volt (Takabe 1971). Lépések:

protoplasts

↓

cell wall formation

↓

cell division

↓


rapidly dividing cell colony

high osmotic buffering containing auxin and cytokinin to promote division

↓

reduce osmotic buffering gradually by decreasing mannitol content

11



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztokból






A: PP eredet többsejtes kolónia

B: Mikrokolóniák kialakulása agarra ágyazott sejtekből

C: kallusz tenyészet

D: PP eredetű termékeny búzanövény

12



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Keresztezés és protoplaszt fúzió összehasonlítása

Keresztezés: két különböző tulajdonságú egyed gén-állományának egyesítése ivaros szaporítással. Régi nemesítési módszer – kulcsszerepe (volt) az új fajták el állításában

Fajon belüli fajták keresztezése: néhány tulajdonság változik

De: nem lehet mindent keresztezni mindennel. Csak rokon fajták, fajok között m ködik.

A rendszertani távolság növeli az inkompatibilitást.

A megtermékenyítés szabályozása (anatómiai és egyéb) rendszerint kizárja az idegen pollennel való beporzást, csak a fajon belül termékenyül.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

13

Keresztezés és protoplaszt fúzió

→ ezért el nyös keresztezés helyett protoplasztokat egyesíteni, ez megkerüli az ivaros szaporodás akadályait.

A fúzió nagyon különböző fajok között is lehetséges!

„Mindent mindennel lehet fuzionáltatni” – a protoplasztok szintjén – de azután jönnek a problémák.

A fuzionált sejtek osztódnak, de a növény-regeneráció csak ritkán valósítható meg.

Sejtvonalként fenntarthatók, de nem regenerálhatók:

sárgarépa-árpa, szója-repce, kukorica-borsó,

szója-Drosophila: mindkét sejtmag osztódik

petúnia-egér: osztódás, sejtfal és hemoglobin szintézis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

14

Protoplaszt fúzió, aszimmetrikus hibridek

Ha sikerül is növényt nevelni, akkor legtöbbször rendellenes morfológiájú és steril alakok jönnek létre.

Hosszú (több éves) sejtenyésztés során valamelyik partner génei fokozatosan elt nnek, és csak néhány kromoszóma marad = aszimmetrikus hibrid

Ezekb l lehet élet- és szaporodóképes növényt regenerálni, ami a domináns eredeti partnerhez képest csak egy-két új tulajdonságot hordoz.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

15

Cibridizáció

= citoplazmatikus hibridizáció

Nem a sejtmagban lévő kromoszómák átvitelére irányul, hanem a sejt szerkezetekben (kloroplaszt, mitokondrium) lévő DNS bevitelére.

A hibrid sejtben az egyik félből származik a sejtmag, a másiktól kloroplasztok → új kombinációk → új tulajdonságok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

16

Protoplaszt fúzió - eredmények

Vírus-rezisztens burgonya fajták előállítására:

Solanum tuberosum (étkezési burgonya) és
Solanum brevidens (perui, vírusálló fajta) fúziója →

A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

17

Protoplaszt fúzió - értékelés

Ez sem célzott, irányított változtatás. Nem lehet előre tudni, hogy milyen tulajdonságok stabilizálódnak végül. Lassú módszer, hónapokig, évekig tart. A kiszámíthatatlansága miatt hátrányos tulajdonságok is átkerülhetnek.

~40 éve megkezdtek, klasszikus technika.

Veszélyessége kicsi, mert:

- A hibridek általában kevésbé életképesek, mint a vad törzsek – a természetbe kikerülve nem versenyképesek
- A természetben jelen lévő gének a saját környezetükkel együtt kerülnek át más sejtbe.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

18
