



Ledóné Dr. Darázi Hajnalka
Főiskolai docens

Nemesítés és fajtahasználat

Biotechnológiai módszerek alkalmazása a növénynemesítésben

Jelen tananyag a Szegei Tudományegyetemen készült az Európai
Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Olvasási idő 30 perc

Összefoglalás

A növényi biotechnológia a növények szaporodásának (reprodukciós technikák), valamint genetikai programjának (géntechnológia) megváltoztatása és az így kialakított új vagy módosított növényfajták képességeinek technológiai alkalmazását jelenti. A biotechnológia módszerei kiegészítik és támogatják a növénynemesítés és fajta-előállítás alapvető technikáit a nemesítéshez használt genotípusok és új tulajdonságkombinációk előállításában, a szelekcióban, a fajtajelölt gyors felszaporításában és kórokozómentesítésében. A reprodukciós technikák rövid ismertetésére kerül sor.

Tartalom

- A biotechnológia fogalma
- Növényi sejtszövettenyésztés és
- Ivaros szaporodás biotechnikái
- Ivartalan szaporodás biotechnikái
- Biotechnológiai módszerek nemesítési vonatkozásai

A biotechnológia fogalma

A **biotechnológia** szó és tudományág megteremtője a magyar **Erekly Károly** (1878-1952) volt, aki [1918-ban használta először](#) dokumentáltan a fogalmat. Az Erekly -féle *biotechnológia fogalom* röviden így hangzik: *a biotechnológia olyan munkaszervezési tudomány, amely élő szervezetekkel, más szóval biotechnológiai munkagépekkel foglalkozik.*

Az új fajták előállítására és termesztése területén a **klasszikus növénynevelési módszerek kiegészítése,**

- in vitro sejt-/szövettenyésztési technikákkal,
- molekuláris módszerek, markerek alkalmazása.
- transzgenikus fajtaelőállítás.

A **klasszikus- és molekuláris módszerek együttesen kerülnek alkalmazásra,** annak megfelelően, hogyan lehet a leggyorsabban és leghatékonyabban eljutni a kívánt fajtához. A növényi biotechnológia magában foglalja tehát a megfelelő fajták előállításának molekuláris biológiai módszereit, valamint ezen fajták technológiai szintű alkalmazását.

Sejttenyésztés a sejtek fenntartását jelenti *in vitro* körülmények között. A **szövettenyésztés** a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehetővé teszi a sejtek differenciálódását ill. a struktúra és/vagy funkció megőrzését.

A növényi sejt- és szövettenyésztés kialakulása és **eddig elért eredményei három tényezőre** vezethetők vissza:

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

A növényi sejt- és szövettenyésztések egyik lehetséges **csoportosítási** módja az **izolátum eredete szerinti** klasszifikáció. E szerint megkülönböztetünk:

- **embriókultúrát**
- **generatív szervek kultúráit** (portok, pollen, ovárium, ovulum, endospermium, stb.)
- **vegetatív szervek kultúráit** (merisztéma, gyökér, hajtás, levél, hagyma, gumó, stb.)
- **szomatikus sejt kultúrákat** (kallusz, szuszpenzió, protoplaszt, mesterséges mag, stb.)
- **sejtgenetikát** (szomaklónok, mutánsok, protoplasztfúzió, cibridizáció, stb.)
- **géntechnológiát** (génizolálás, DNS-szintézis, vektorok, transzformáció, transzgenikus növényregenerálás.

Embriókultúra

A módszer **gyakorlati jelentőségét** az adja, hogy olyan esetekben is kaphatunk növényeket, amikor *in vivo* az embriógeneszisnek valamilyen akadálya van, pl.

inkompatibilitás. Végeredményben olyan új faj- és nemzetséghibrideket tudunk előállítani, amely a fellépő inkompatibilitás miatt a természetben nem jöhetnek létre. Az embriókultúra szempontjából az embriogenezis stádiumai azért fontosak, mert az izolált embriók fejlettsége alapján az embriótenyésztést két stádiumra osztják. Az egyik a **proembrió** (pregerminal) kultúra:

- Fajkeresztezés
- Nemezetségkeresztezés
- Bulbosum technika
- Minden olyan esetben amikor a normális embriogenezisnek valamilyen akadálya van

A másik pedig a **fejlett embrió** (postgerminal) kultúra.

A fejlett-embrió tenyészetek célja az izolált, részben vagy teljesen kifejlett **embriók csírázásának indukálása és a növények felnevelése:**

- a mag hosszú érési idejének lerövidítése és ezzel a generációváltás gyorsítása
- csíryanugalom megszüntetése és ezzel a generációváltás meggyorsítása
- steril magfejlődés megakadályozása
- minden olyan eset, amikor a normális csírázásnak *in situ* akadálya van.

E módszer segítségével kukoricából évente 2 generációt, gabonafélékből 2-3 generációt is felnevelhetünk. Ennek **nagy jelentősége van a növénynemesítésekben** azoknál a módszereknél, melyek sok generáció felnevelését igénylik (pl. single seed descent módszer, backcross módszer, transzgen átvitele egyik fajtából a másikba).

Generatív szervek kultúrái (Izd. poliploidok olvasólecke)

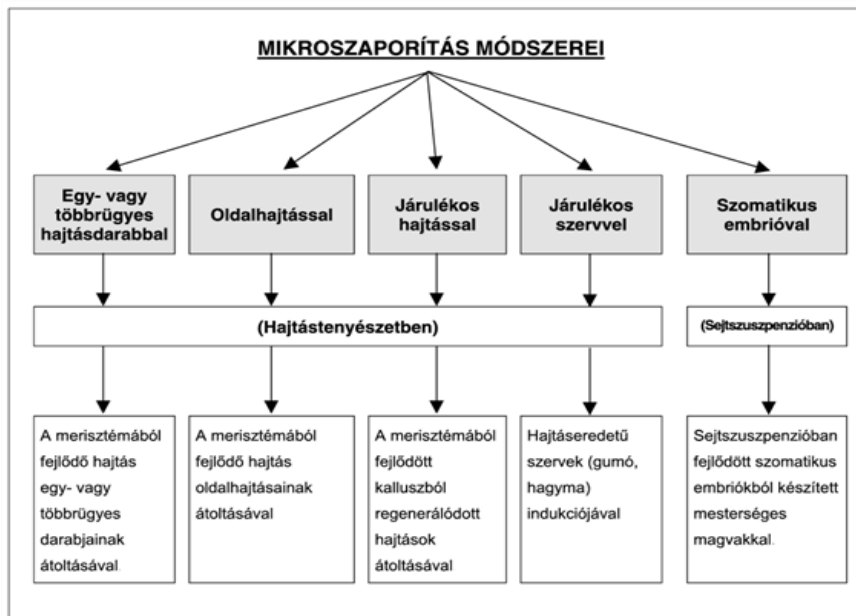
Vegetatív szervek kultúrái

A vegetatív szervek tenyészetei közül **legnagyobb jelentősége a merisztéma és hajtáskultúrájának van.** (1. ábra)

A növényeknek a rügyekben, hajtáscsúcsokban van egy sajátos differenciálatlan sejtekből álló szövete, a **merisztéma**, amely a növény élete során megtartja osztódóképességét. Az *in vitro* kultúrák kiváló feltételeket teremtenek a **vírusmentesítés** és vírusdiagnosztizálás új módszereinek

felhasználásához, ugyanis a folyamatosan osztódó csúcs-merisztéma bizonyos sejtrétegei még kórokozómentesek, és ha az izolálás csak ebből a részből történik, a regenerált növények is patogénmentesek lesznek. A vegetatív úton szaporított növények **génbankban**, változatlan formában **történő tartós tárolása** a hajtástenyészetekben megoldható.

A **hajtástenyészet** általában **gyökér nélküli hajtások növekedését és fejlődését** jelenti táptalajon, steril és kontrollált feltételek között.

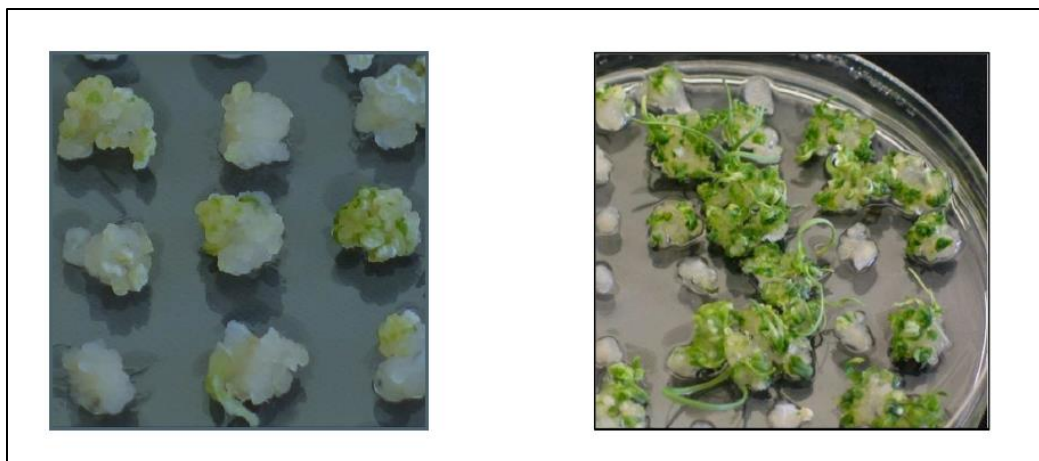


1. ábra A mikroszaporítás módszereinek csoportosítása a szaporításra használt izolátum alapján [1]

Szomatikus sejt kultúrák

Kallusz és sejtenyészetek, *in vitro* variabilitás

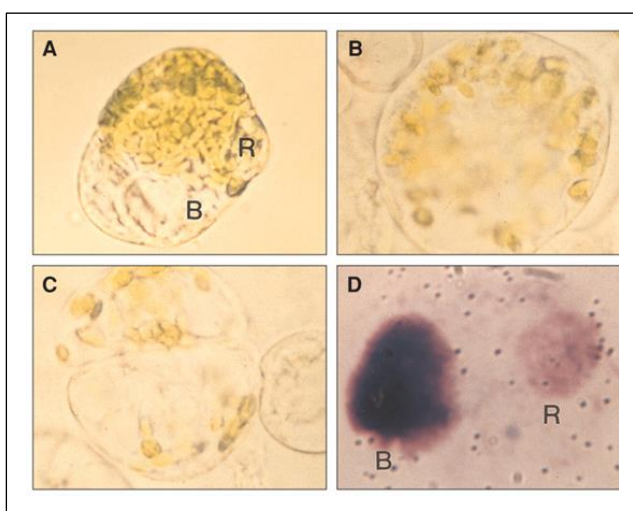
A **növényi biotechnológia** és a sejt- és növény rendszer **két alapttechnikája a kallusztenyésztés és a sejtenyésztés**. A **kallusz differenciálatlan sejtek** halmaza. Ezekben csak az osztódáshoz és az alapvető anyagcsere folyamatokhoz szükséges gének működnek. Potenciálisan tehát a sejtek bármivé differenciálódhatnak. A **kalluszosodás** természetes és szintetikus **citokininekkal és auxinokkal váltható ki**. A kallusz folyékony tápközegbe helyezése és folyamatos rázatásával elérhető a sejtek leválása, elkülönülése, majd a sejtszuszenzió kialakulása. A **kalluszsejtek intenzív osztódása együtt jár a tenyészetek, illetve a belőlük regenerált növények genetikailag determinált variabilitásával (szomaklonális variabilitás)**. A szomaklonok említéskor mindig a tenyészetekből (kallusz, sejtszuszenzió, protoplaszt) regenerált növényekre gondolunk. A kultúrákban hosszú ideig fenntartható a differenciálatlan fázis és **a gyakori sejtosztódás miatt a genetikai változások valószínűsége nagy**. A felhalmozódó változások következményeként a genetikailag heterogénné vált tenyészetekből a redifferenciálódás indukciójával **a sejtszintű variabilitás növény szintre hozható**. Az *in vitro* variabilitás okai lehetnek **kariotípus (kromoszómaszám változás, átrendeződés) vagy molekuláris változások**. (2. ábra) A kallusz és sejtenyészetek felhasználása mutánsok izolálására is alkalmas. (Isd. mutációs nemesítés olvasólecke)



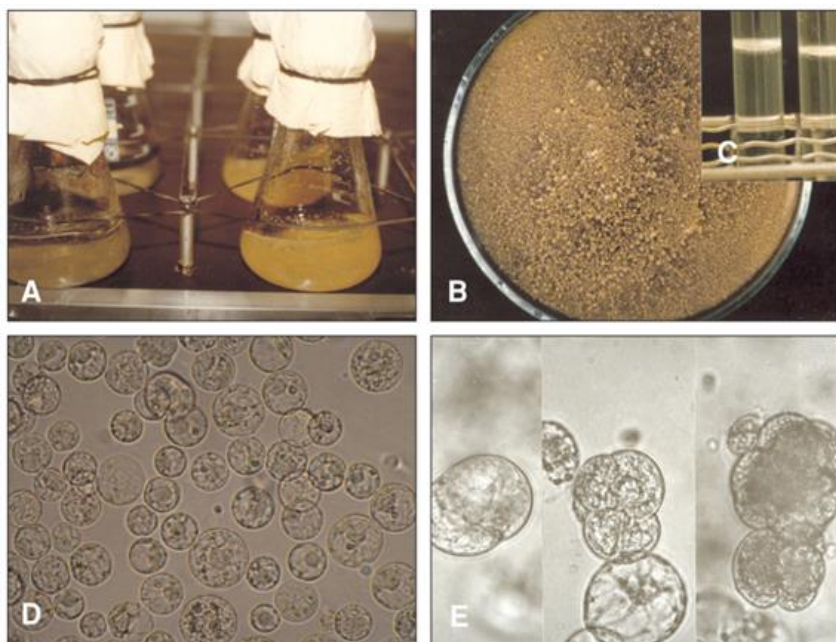
2. ábra Búza kalluszok és embrioidok és regenerálódó növények [2]

Protoplasztkultúrák

A poliszacharid sejtfa cellulózból, hemicellózból és pektinázból álló enzimkeverékkel lebontható a sejtenyészetekben. A kezelést követően kapott **sejtfa nélküli növényi sejtek** a **protoplasztok**. Protoplasztokat izolálhatunk szomatikus és haploid sejtekből, a növények szöveteiből, illetve sejtenyészetekből. A frissen izolált protoplasztok **alkalmasak a genetikai manipulációra**, majd táptalajon a falregenerálódást követően **tovább tenyészthetők és a sejtenyészetekhez hasonlóan növények nevelhetők fel**. A **protoplasztfúzió** megteremti a feltételeket annak, hogy **különböző fajok sejtmagjai egyetlen sejtbe kerüljenek** (heterokarionok). A **protoplasztfúzió** egyik **speciális területe a citoplazmás örökítőanyag megváltoztatása** (kombinálása vagy cseréje), ami általában anyai ágon a petesejttel öröklődik. Ezt a technikát **cibridizációnak** nevezzük, és segítségével a citoplazmás sejtalkotók kicserélhetők (mitokondrium és/vagy kloroplasztisz). (3., 4. ábra)



3. ábra Polietilén-glikol- (PEG) kezeléssel előidézett fúzió búza- (*Triticum monococcum*) és rizs- (*Oryza sativa*) protoplasztok között A) a rizs- (R) és a búza- (B) protoplasztok összetapadása és fúziója, B) a sejtfa regenerációja a heteroplazmás sejtben, C) a fúziós termék első osztódása, D) búza- (B) és rizs- (R) sejtmagot egyaránt tartalmazó heterokarion [1]



4. ábra Fertilis búzánövények felnevelése protoplasztokból A) Rázott tenyészetben búza sejtszuspenziós kultúra, B) Protoplasztok izolálása sejtfalbontó enzimekkel, C) A protoplasztok tisztítása felfugálással, D) Frissen izolált protoplasztok, E) Sejtfal regeneráció után a sejtek osztódása mikrokolóniák kialakulásához vezet (Pauk János kísérlete, GKI, Szeged) [1]

Nemesítési problémák megoldása biotechnológiai módszerekkel

Az összes klasszikus nemesítési módszer alkalmazza a szelekciót a kívánt fenotípusú (genotípusú) egyedek kiválasztásához. *Milyen problémák merülhetnek fel a szelekciós nemesítés során:*

- túl nagy a vizsgálandó populáció pl. több százezer növényt kellene előállítani és szelektálni a keresett genotípus kiszűréséhez,
- a vizsgált tulajdonságot rejtett betegségek módosíthatják (pl. ha a törpe növekedést vírusos megbetegedés okozza),
- nehéz a keresett tulajdonság (fenotípus) nyomon követése (pl. a környezettől, fejlődési állapottól stb. függő),
- a megfelelő egyedszám előállítása rendkívül időigényes lehet.

A szelekciós nehézségek megoldása lehet az *in vitro* szelekciós módszerek alkalmazása.

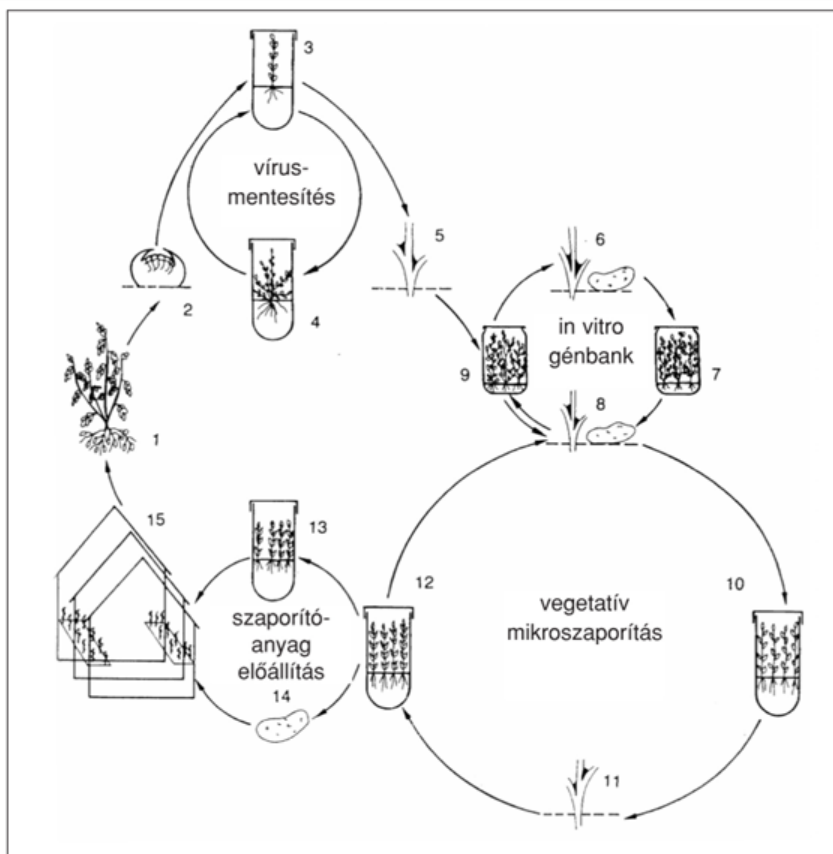
Milyen előnyökkel járhat az *in vitro* körülmények használata:

- nagyszámú növény indítása kis felületen (akár több ezer egyed/m²),
- lehetőséget adhat olyan tulajdonságok tesztelésére, amelyeket természetes körülmények között nagyon nehéz vizsgálni (pl. szárazságtűrés bizonyos elemei fás növényeknél, fertőzés karantén kártevőkkel stb.).

Figyelembe kell venni a korlátozó tényezőket: gyakran a mesterséges körülmények között tapasztalt ellenálló képesség vagy tolerancia nem a kívánt mértékben nyilvánul meg természetes körülmények között.

A mikroszaporítás az *in vitro* szaporításhoz képest néhány új lehetőséget rejt magában a szelekció problémáinak kiküszöbölésére. A mikroszaporítást felhasználhatjuk kórokozó-mentesítésre, a fajta felszaporítása is stb. (5. ábra)

A sejtszintű szelekció kiváló lehetőség a szelekció hatékonyságának növelésére, a mikroszaporítás az egy sejtől történő regenerációs rendszerekkel lehetőséget ad a mutációk azonosításához.



5. ábra Merisztéma és hajtástenyészetek felhasználásának vázlata a burgonya vírusmentesítésben, a genetikai tartalékok tárolásában és a szaporítóanyag-előállításban

Vírusmentesítés: a merisztéma izolálás (2) célja, kórokozómentes tenyészetek előállítása (3–4). In vitro génbank: a kórokozómentes anyagok hajtástenyészetekben évente 1–2-szeri átváltással egyrügyes hajtásdarabbal, vagy mikrogumóval (6–8) a visszafertőződés veszélye nélkül korlátlan ideig tárolhatók (7–9). Vegetatív mikroszaporítás: steril szaporítás (10–12) a hajtástenyészetek nodális szegmenteivel (8, 11). Szaporítóanyag-előállítás: a mikroszaporítás utolsó lépése, amely magában foglalja az in vitro növények, mikrogumók edzését (13, 14), kiültetését üvegházba és fóliasátorba (15), valamint forgalmazását és szállítását [1]

Növényi sejt- és szövettenyésztés főbb lépései

Az *in vitro* növényi sejt- és szövettenyésztés során sterilizált növényi részek (sejtek, szövetek, szervek stb.) tenyésztése történik **steril körülmények** (táptalaj, tenyészedény stb.) között, melynek eredménye – a tenyészet jellegétől függően – egész növények, növényi szervek regenerációja, szövetek, sejtek (tömegének) előállítása.

A növényi sejt- és szövettenyésztési tevékenység magában foglalja

- a steril szilárd vagy folyékony **táptalaj készítését**, steril üveg vagy műanyag tenyészedénybe töltését,
- a kiinduló növényi **sejt/szövet** (elnevezése: inokulum/explantátum/izolátum) **kipreparálását**, **sterilizálását** és **táptalajra helyezését** (a sterilizálás történhet a preparálás előtt és/vagy után)
- a táptalajon lévő explantátum **kontrollált körülmények** (fény, hőmérséklet stb.) között történő tenyésztését, illetve a fejlődő sejtek/szövetek/szervek **rendszeres áthelyezését** friss vagy más összetételű (pl. regeneráló) táptalajra.

A steril *in vitro* tenyésztés végén az előállított sejt, szövet, szerv vagy növény **további**

felhasználásra kerül, legtöbb esetben már **nem steril körülmények között**. Legjellemzőbb a regenerált növények kiültetése, melynek során szükséges

egy **akklimatizációs szakasz** beiktatása, a párával teli tenyészedényből kikerülő, párologtatás elleni védelemmel nem rendelkező növény fokozatos (1-2 hét) szoktatása a „szabad” levegőhöz.

Ajánlott olvasmányok

Ereky Károly víziója

<https://www.youtube.com/watch?v=idJs1pPtgHo>

Monostori T.- Csiba A. (2018): Mezőgazdasági biotechnológia. http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP_34316201600014_jegyzet_Monostori_Mg_Biotech_20190405.pdf

Források

[1] Dudits Dénes-Heszky László: Növényi biotechnológia és géntechnológia https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_533_NovenyiBiotechnologia/ch02.html

[2] Monostori T.- Csiba A. (2018): Mezőgazdasági biotechnológia. http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP_34316201600014_jegyzet_Monostori_Mg_Biotech_20190405.pdf

[3] Pepó Pál (2011): Növénynevelés. DE, NyME, PE. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Prez_07-Novenynemesites/adatok.html

Ellenőrző kérdések

1. *Ismertesse a biotechnológia fogalmát!*
2. *Csoportosítsa a növényi sejt- és szövettenyésztési módszereket!*
3. *Milyen szerepe van az embriokultúrának a növénynevelésben?*
4. *Foglalja össze a szomatikus sejt kultúrák jelentőségét a növénynevelésben!*
5. *Sorolja fel a növényi sejt -és szövettenyésztés biotechnológia főbb lépéseit!*