



Szegedi Tudományegyetem
Mezőgazdasági Kar



MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIA

KÉSZÍTETTE:
MONOSTORI TAMÁS
CSIBA ANITA

HÓDMEZŐVÁSÁRHELY
2018

Tananyag elsajátításra vonatkozó információk
Tananyagfejlesztés célja A Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Karának hallgatói számára készített korszerű és modern ismeretanyagot tartalmazó tananyag Mezőgazdasági biotechnológia tantárgyból.
Tanulási eredmények elérése Az EFOP-3.4.3-16-2016-00014 projekt keretében fejlesztett tananyag elsajátításával a Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Karának hallgatói az alábbi tanulási eredményeket érik el:
Tudás Korszerű modern Mezőgazdasági biotechnológiai ismeretek elsajátítása, ezen ismeretek megértéséhez és a szaknyelv használatához szükséges alapfogalmak a mezőgazdasági biotechnológia tudományterületén alkalmazott eljárások, illetve tudománytörténeti ismeretek elsajátítása.
Képesség A korszerű, modern Mezőgazdasági biotechnológia ismeretanyagának tárgykörébe tartozó alapfogalmak, folyamatok és eljárások megértése. Az alapismeretek elsajátítását követően a Mezőgazdasági biotechnológiai területén önálló gondolkodásra, az alapvető összefüggések felismerésére, valamint véleményalkotásra való képesség kialakulása, további autodidakta módon történő ismeretszerzés képességének kialakulása, valamint interdiszciplináris gondolkodásra való képesség fejlesztése.
Attitűd A Hallgató a Mezőgazdasági biotechnológia területén ismeretek megszerzésével érdeklődővé, nyitottá válik a további ismeretszerzésre. Felismerje szakmai ismereteinek folyamatos bővítésére való szükségességét, kialakuljon benne a folyamatos élethosszig tartó tanulás, szakmai fejlődés igénye.
Autonómia A jegyzetben rögzített Mezőgazdasági biotechnológia tananyag elsajátításával a Hallgató képessé válik a szakmai szövegek önálló megértésére, önálló szakmai kommunikációra az adott területen, önálló ismeretszerzésre és fejlődésre az adott tudományterületen.
Tananyag elsajátításának előfeltétele Felsőoktatásban folytatott tanulmányok megkezdésére jogosító sikeres érettségi vizsga. A felsőoktatási tanulmányok során elsajátított alapozó tantárgyak keretében tanult szakmai alapismeretek elsajátítása.

TARTALOMJEGYZÉK

1. A BIOTECHNOLÓGIA FOGALMA ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLETEI	7
2. ÁLTALÁNOS GÉNTÉCHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK.....	9
2.1. Alapfogalmak, a prokarióta és az eukarióta genom és gének felépítése.....	9
2.1.1 A prokarióta genom szerveződése	9
2.1.2. Az eukarióta genom szerveződése	11
2.2. A géntechnológiai beavatkozások alapjai	14
2.2.1. A molekuláris klónozás alapelemei	15
2.3. A génbevitel sikerének igazolása és a transzgénikus sejtek/organizmusok szelekciója	22
2.4. A polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR).....	24
2.5. Nukleinsav és fehérje hibridizálási módszerek	26
2.6. Gén és cDNS könyvtárak	29
3. MIKROBA BIOTECHNOLÓGIA	32
3.1. A mikroorganizmusok anyagcseréjének fő jellemzői	32
3.1.1. A mikrobák táplálkozása	33
3.1.2. A mikrobák anyagcseréjének szabályozása.....	34
3.2. A mikrobák tömegtenyésztése	38
3.2.1. A mikrobák tömegtenyésztésének környezeti feltételei	38
3.2.2. Bioreaktorok.....	40
3.3. Mikroorganizmus termékek	44
3.4. Mikrobák közvetlen hasznosítása a fenntartható mezőgazdasági termelésben	48
3.4.1. A növénykondicionálókban használt legfontosabb mikroba csoportok és szerepük	48
3.4.2. Biotrágyák.....	50
3.4.3. Bioherbicidek	51
3.4.4. Biobaktericidek és biofungicidek	52
3.4.5. Bioinszekticidek	54
3.4.6. A mikrobák további mezőgazdasági alkalmazásai.....	55
3.5. Környezetvédelem és energiatermelés biotechnológiai módszerekkel.....	56
4. ALGA BIOTECHNOLÓGIA	59
5. NÖVÉNYI BIOTECHNOLÓGIA	61
5.1. Növényi sejt- és szövettenyésztés	62
5.1.1. Szomatikus sejttenyésztésen alapuló technikák	62

5.1.2. Az <i>in vitro</i> klónozás biotechnikai	65
5.1.3. A szexuális reprodukció biotechnikai	67
5.2. Növényi géntechnológia	69
5.2.1. A transzgénikus növények előállítása	70
5.3. A GM növények	74
5.3.1. Első generációs transzgénikus növények	74
5.3.2. Második generációs transzgénikus növények	77
5.3.3. Harmadik generációs transzgénikus növények	78
5.4. A transzgénikus növényekkel kapcsolatos rizikófaktorok	80
5.5. A növényi géntechnológia új lehetőségei	85
5.6. A géntechnológia törvényi szabályozása	88
6. BIOTECHNIKA ÉS BIOTECHNOLÓGIA AZ ÁLLATTENYÉSZTÉSBEN	91
6.1. Az állatbiotechnika fogalma	91
6.2. A biotechnika és biotechnológia fogalma	91
6.2.1. Biotechnikai eljárások alkalmazási területei	92
6.2.2. Biotechnikai eljárások	92
6.2.2.1. Hígított, tartósított szaporítóanyag előállítása	93
6.2.2.2. Különböző állatfajok termékenyítő anyagának tartósítása	93
6.2.2.3. Szedimentálás, szexálás	103
6.2.2.4. Mesterséges termékenyítés alkalmazása a különböző állatfajok esetében	104
6.2.2.5. Ivarzás indukálás, ivarzás szinkronizálás	120
6.2.2.6. Embrióátültetés	126
6.3. Biotechnológiai eljárások	129
6.3.1. Makromanipulációs biotechnológiai eljárások	129
6.3.1.1. Embriófelezés, embriódarabolás	129
6.3.1.2. Kiméra előállítás	130
6.3.2. Mikromanipulációs eljárások	131
6.3.2.1. Klónozás	131
6.3.2.2. Génátültetés	137
6.3.2.3. Géntérképezés	138

6.4.A termelés biotechnológiája.....	138
6.4.1. A szaporodóképességet befolyásoló nagyhatású gének.....	139
6.4.2. Hústermelést befolyásoló nagyhatású gének.....	140
6.4.3. Tejtermelést befolyásoló nagyhatású gének.....	143
7. Felhasznált irodalom.....	144

1. A BIOTECHNOLÓGIA FOGALMA ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLETEI

Erekly Károly (1919) szerint:

„Biotechnológia minden munka, amellyel alapanyagokból termékeket állítunk elő élő organizmusok segítségével.”

Általános biotechnológia: az adott ipari termék előállítása élő szervezetekkel, sejtekkel vagy sejtalkotókkal

Mezőgazdasági biotechnológia: a mezőgazdaságban és élelmiszeriparban hasznosított mikroorganizmusok, növények, állatok szaporodásának, genetikai programjának megváltoztatása, a kialakított új képességek technológiai alkalmazása

Szaporodás (reprodukció) biotechnológia: növények és állatok ivaros (szexuális) és ivartalan (aszexuális) szaporodásának módosítása sejtbiológiai és molekuláris biológiai módszerekkel

Géntechnológia: növények (növényi sejtek), állatok (állati sejtek) és mikroorganizmusok (vírusok, baktériumok, eukarióta mikrobák) genetikai programjának megváltoztatása molekuláris genetikai eszközökkel

A biotechnológia egyes alkalmazási területeinek csoportosítása színekkel (az egyes területek között tartalmi átfedések lehetnek):

- Piros biotechnológia (orvosi biotechnológia):
humán gyógyszerek, terápiák előállítása a biotechnológia eszközeivel - védőoltások, rekombináns vakcinák, molekuláris diagnosztika és „omikák”, biológiai terápiák, kutatási technológiák és szolgáltatások
- Zöld biotechnológia (agrár és élelmiszeripari biotechnológia):
növény-, növénytermesztési biotechnológia, állattenyésztési biotechnológia, élelmiszeripari biotechnológia
- Fehér biotechnológia (ipari-környezetvédelmi kérdésekkel foglalkozó biotechnológia):
bioalapú termékek, biofinomítás, bioenergia, bioremediáció

- Kék biotechnológia:
tengeri biotechnológia, szennyvíztisztítás
- Arany biotechnológia (bioinformatika):
szűken vett bioinformatika, biokémiai informatika, egyéb biológiai kísérletek informatikai támogatása
- Sárga biotechnológia:
élelmiszeripari és táplálkozástudományi biotechnológia
- Szürke biotechnológia:
biotechnológia eljárások környezetvédelmi alkalmazása

A mezőgazdasági biotechnológia alkalmazásának legfontosabb területei:

- növény-, állat- és mikrobanemesítés
- növénytermesztési technológiák fejlesztése
- növényvédelmi technológiák (előrejelzés, biológiai védekezés) fejlesztése
- állategészségügyi technológiák (vakcinák, diagnosztizálás) fejlesztése
- mikroorganizmusok, növényi és állati sejtek tömegtenyésztése bioreaktorokban
- vetőmag, szaporítóanyag, oltóanyag és tenyészállat előállítás, fenntartás, szaporítás és megőrzés (pl. *in vitro* mikroszaporítás, krioprezerváció)
- élelmiszeripari, környezet- és talajvédelmi technológiák fejlesztése

2. ÁLTALÁNOS GÉNTÉCHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

2.1. Alapfogalmak, a prokarióta és az eukarióta genom és gének felépítése

Gén:

1. meghatározás: egy tulajdonság kódolásáért felelős DNS szakasz.

A gének többsége fehérjét kódol. A fehérjét nem kódoló génekről az ún. szerkezeti RNS-ek (pl. tRNS, rRNS) szintetizálódnak.

2. meghatározás: a DNS azon szakasza, amely a transzkripció szempontjából szerkezeti és működési egységet alkot.

Transzkripció:

a DNS bázissorrendjében kódolt információ átírása mRNS-re

Transzláció:

a DNS-ről származó, mRNS-re átírt információ lefordítása az adott fehérje aminosav-szekvenciájára.

Transzkripciós startpont:

a templát DNS értelmes szálán a +1 kezdőpont

Transzlációs startpont:

a mRNS-en A(UG), pozíciója kb. +25

Nyílt leolvasási keret (Open Reading Frame – ORF):

a gén polipeptidet kódoló szekvenciája, ami a transzlációs start kodontól a stop kodonig tart; egy vagy több fehérje információját hordozhatja, eukariótákban csak az érett mRNS szekvenciája alapján egyértelmű

2.1.1. A prokarióta genom szerveződése

Kromoszóma (genofor, nukleoid):

- kör alakú (cirkuláris)
- nem kapcsolódnak hozzá hisztonfehérjék (egyéb bázikus fehérjék igen)
- 4-5 Mbp (megabázispár) = 4-5 ezer gén, 90% fehérjét kódol, egykópiás
- operon: több gén átíródása egyetlen transzkripciós egységként
- egynél több replikációs origó

- nincsenek intronok, nincs maghártya, így a transzkripció, transzláció folyamatos, ami a környezeti tényezők változására való gyors reagálást tesz lehetővé

Plazmid:

- kör alakú
- 1000-150000 bp (bázispár)
- (összehadonlításként: transzpozon: 800-30000 bp, profág: 3000-300000 bp)
- önálló replikáció, így általában nagy kópiaszám
- rezisztencia-, virulencia-, toxintermelő képesség stb. génjeinek hordozása (pl. antibiotikum-rezisztencia gének; *Agrobacterium* tumor-indukáló génjei)

A prokarióta gének általános felépítése

Promóter (indító) szakasz:

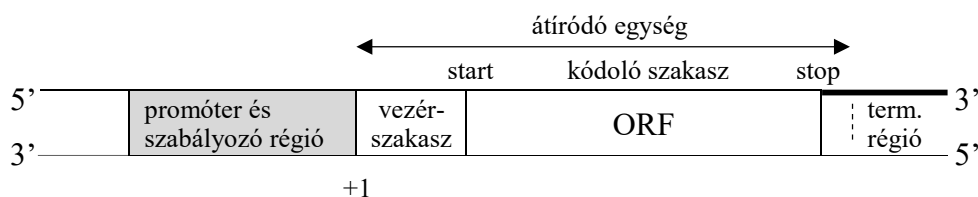
- az átíródo egység előtt, az 5'-vég irányában található
- az RNS átírását végző prokarióta RNS-polimeráz kötődési helyét tartalmazza

Átíródo egység (kódoló régió):

- nyílt leolvasási keret (ORF), ld. fent
- (baktériumokban) az egy folyamatsorban részt vevő fehérjék génjei csoportokba (operon) rendeződnek a kromoszómán, és egy promóter irányítása alatt állnak

Terminációs régió:

- a 3' nem kódoló régióban található
- „hajtű” képződését eredményezi az RNS-en, ami a DNS templátról történő leváláshoz vezet



A prokarióta gén általános felépítése

A prokarióták transzkripciójának jellemzői:

- az operonban csoportosuló gének egy transzkripciós egységet alkotnak, róluk egy közös RNS-átírat keletkezik: policisztronos mRNS (cisztron $\approx$ gén)
- a policisztronos RNS-ről több peptidlánc képződik

2.1.2. Az eukarióta genom szerveződése

Kromoszóma:

- lineáris
- a kettős maghártyával határolt sejtmagban található
- minden kromoszómában egy DNS molekula
- DNS + bázikus hiszton fehérjék: nukleoszóma
- nukleoszóma lánc: kromatin:
 - eukromatin: a kromoszóma gyengén festődő, laza szerkezetű, ismétlődő szekvenciáktól mentes, aktív kódoló szekvenciákat tartalmazó régiója
 - heterokromatin: a kromoszóma erősen festődő, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó, (általában) át nem íródó régiója (konstitutív vagy fakultatív)
- a növényi genom komponensei:
 - nagy számban ismétlődő vagy szatellit DNS (sDNS): 105-106 kópia/genom tandem ismétlődő szekvenciákból (150-160 vagy 350-360 bp) áll általában nem íródik át
 - közepes kópiaszámú ismétlődő DNS: 102-104 kópia/genom rRNS, tRNS, hiszton gének, géncsaládok (pl. snRNS gének)
 - egyedi vagy single copy DNS: 1-102 kópia/genom fehérjét kódoló struktúrgének, egyedi szabályozó és elválasztó szekvenciák magasabbrendű növényekben 10000-30000 db

Mitokondrium:

- cirkuláris DNS (mt DNS)
- szinte minden nukleotid kódol valamit, regulációs helyek alig találhatók
- mérete: 15-2000 kb
- oxidációhoz/energiatermeléshez szükséges fehérjék egy részének génjeit hordozza

- a DNS replikációja a sejtciklus alatt folyamatos
- szaporodása: a DNS replikációját követő hasadás
- működéséhez kb. 3000 gén szükséges, melyek többsége a sejtmagban található

Kloroplasztisz:

- cirkuláris DNS (cp DNS)
- mérete: 100-300 kb
- rRNS, tRNS, riboszomális fehérjék, fotoszisztémák fehérjéi, ATPáz alegységek, elektronszállító lánc fehérjéi egy részének génjeit hordozza
- a DNS replikációja a sejtciklus alatt folyamatos
- szaporodása: a DNS replikációját követő hasadás
- működéséhez több mint 1000 gén szükséges, melyek többsége a sejtmagban található

Az eukarióta sejtmag és organelum genom összehasonlítása (Dudits és Heszky, 2014 nyomán)

	Sejtmag	Kloroplasztisz	Mitokondrium
Jele:	DNS	cp DNS	mt DNS
Organelum száma:	1 db	5-80 db	15-200 db
Szerveződés:	kromoszóma	nukleoid	nukleoid
Szaporodás:	osztódás	hasadás	hasadás
DNS mérete:	1-50 milliárd bp	100-300 kb	15-2000 kb
DNS kópia/organelum:	= a sejt ploidfoka (2-8)	4-15 db	10-30 db
DNS kópia/sejt:	= a sejt ploidfoka (2-8)	20-1200 db	150-10000 db
Kódolt fehérjék:	30-150000 db	100-250 db	5-100 db
DNS alakja:	lineáris	cirkuláris	cirkuláris
Replikáció:	+	+	+
Transzkripció:	+	+	+
Transzláció start:	metionin	formil-metionin	formil-metionin
Intron	+	-(+)	-(+)
Génreguláció:	monocisztronos	policisztronos (operon)	policisztronos (operon)

Az eukarióta gének általános felépítése

Promóter (indító) szakasz:

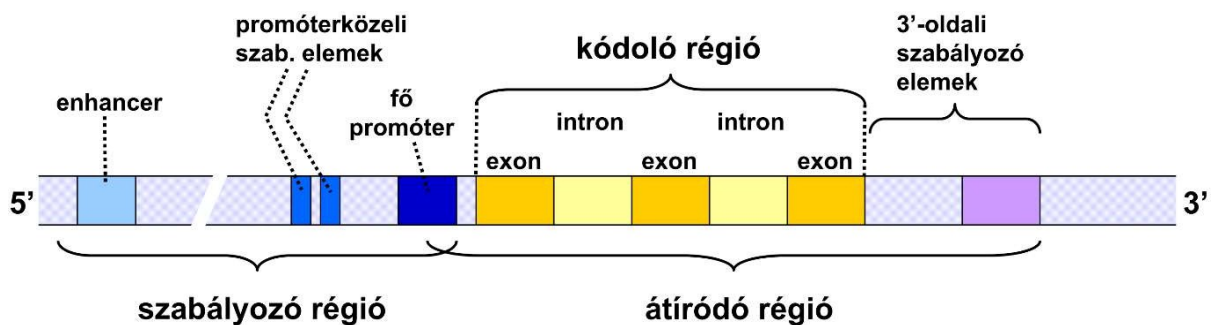
- az átíródo egység előtt, az 5'-vég irányában található
- az RNS átírását végző RNS-polimeráz II kötődési helyét tartalmazza
- szabályozó (regulátor) elemek (sokszor nem a promóter részeként feltüntetve) szerepe a génműködés sebességének, idejének, sejt- és szövet-specifitásának stb. meghatározása

Átíródo egység (kódoló régió):

- az eukarióta gén kódoló régiójában exonok és intronok különíthetők el:
 - exon: szekvenciája a transzkripciót követő transzláció során aminosav-sorrenddé fordítódik le
 - intron: bázissorrendje átíródik mRNS-re, de az éretlen mRNS utófeldolgozása során nukleotidjai kivágódnak (splicing), a transzlációban nem szerepelnek

Terminációs régió:

- a 3' nem kódoló régióban, az ún. poly-A szignál (AATAAA) után kb. 30 bp-ra GC-ben gazdag, fordítottan ismétlődő régió, ami „hajtű” képződését eredményezi az RNS-en
- a „hajtű” a DNS templátról való leváláshoz vezet



Az eukarióta gén általános felépítése

Forrás: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ANovenyiAnyagsere/ch07s04.html>

Az eukarióták transzkripciójának jellemzői

- a transzkripció megindulásához szükséges az ún. iniciációs komplex:
 - templát DNS

- promóter elemek
 - RNS-polimeráz
 - transzkripciós faktorok (fehérjék, melyek a DNS-hez és/vagy a polimerázhoz kötődve módosítják a polimeráz működését).
- az átírás során keletkező éretlen mRNS (pre-mRNS, heteronukleáris RNS) 5'-végéhez sapka (cap – metilált GTP) kapcsolódik: gátolja az RNS lebomlását, nélkülözhetetlen a riboszómához való kapcsolódáshoz.
 - a pre-mRNS-ből az intronok az utófeldolgozás során kivágódnak (splicing), megtörténik az exonok folyamatos szállá történő összeillesztése
 - az utófeldolgozás után a mRNS 3'-végéhez poliA (adenin-nukleotidokban gazdag) vég kapcsolódik: megvédi az mRNS a ribonukleázoktól, serkenti a transzlációt
 - a kódoló szakasz (az érett mRNS-ben a sapka és a poliA vég között, a START kodon és a STOP kodon által határolt régió) a transzláció során aminosav-szekvenciává fordítódik át

2.2. A géntechnológiai beavatkozások alapjai

A géntechnológiai beavatkozások alapja:

- *in vitro* rekombináció
- molekuláris klónozás

***In vitro* rekombináció:**

Rekombináns nukleinsav (általában – de nem kizárólag – DNS) molekulák előállítása.

Lépései:

- a nukleinsav molekula feldarabolása restrikciós endonukleázokkal
- az 1. lépésben kapott nukleinsav darabok egyesítése más nukleinsav szakaszokkal (pl. vektor plazmidba építés), ligázok segítségével

Molekuláris klónozás:

Rekombináns DNS molekula előállítása (pl. plazmid vektor a beépített idegen - felszaporítani kívánt - DNS szakasszal), bejuttatása transzformációval egy gazdaszervezetbe, és ott történő felszaporítása (replikációja)

A molekuláris klónozás lépései:

1. A kívánt nukleinsav szakasz izolálása restrikciós enzimekkel való hasítással vagy mesterséges megsokszorozása (pl. PCR) vagy kémiai szintézissel történő előállítása
2. A DNS szakasz beépítése klónozó vektorba (pl. plazmid)
3. A klónozott DNS szakasz bejuttatása (transzformációval vagy elektroporációval) olyan gazdaszervezetbe (pl. *E.coli* baktérium ún. kompetens sejtek), ahol az replikálódni képes, ezáltal a klónozott DNS szakasz felszaporítása

További, alternatív lépések:

4. Az izolált/megsokszorozott DNS szakasz szekvenciájának (nukleotid sorrendjének) módosítása
5. A klónozó gazdában felszaporított DNS bejuttatása egyéb célszervezetekbe (géntranszfer)

2.2.1. A molekuláris klónozás alapelemei

A molekuláris klónozás alapjául szolgáló fontosabb enzimek:

- Restrikciós endonukleázok:
 - kizárólag baktériumokban és kéalgákban előforduló enzimek
 - eredeti szerepük a sejtidegen DNS (pl. bakteriofág DNS) felismerése és megsemmisítése (kivágása)
 - felfedezésük (1970; Arber, Smith, Nathans - Nobel-díj 1978) tette lehetővé a géntechnológia megszületését
 - a DNS szekvencia meghatározott, általában középpontosan szimmetrikus (palindrom), 4-8 bázispár (bp) hosszú szakaszt nagy pontossággal felismerik, és ezen belül szintén meghatározott két nukleotid között, szimmetrikusan hasítják a DNS mindkét láncát, melynek eredményeként,
 - ha a DNS két szálának elhasítása egymással szemközti foszfodiészter-kötéseknél történik, ún. tompa végek (blunt end),
 - egymáshoz képest elcsúsztatott, néhány bázissal távolabbi helyzetűhasítóhelyek esetén ún. ragadós végek (sticky end) jönnek létre

- restrikciós térképezés: különböző restrikciós enzimek külön-külön, illetve együttes használatával ezek hasítási pozícióinak egymáshoz képest való elrendeződésének felderítése

Néhány gyakran használt restrikciós endonukleáz forrása és hasítóhelye

Enzim	Forrás	Felismerő és hasítóhely	Végek jellege
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	A G ↓ C T T C ↑ G A	tompa vég 'blunt end'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	G ↓ G A T C C C C T A G ↑ G	ragadós vég 'sticky end'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli R factor</i>	G ↓ A A T T C C T T A A ↑ G	ragadós vég 'sticky end'
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus aegyptus</i>	G G ↓ C C C C ↑ G G	tompa vég 'blunt end'
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A ↓ G G ↑ A C G T C	ragadós vég 'sticky end'

Ligáz:

- az enzim által katalizált reakció ATP energiájának felhasználásával helyreállítja a cukor-foszfát gerinc folytonosságát, kovalens foszfodiészter kötést alakít ki

A molekuláris klónozás alapja az összekapcsolni kívánt DNS-szakaszok ugyanazon restrikciós enzimmel történő hasítása, így a ligáció számára egymással komplementer végek kialakítása.

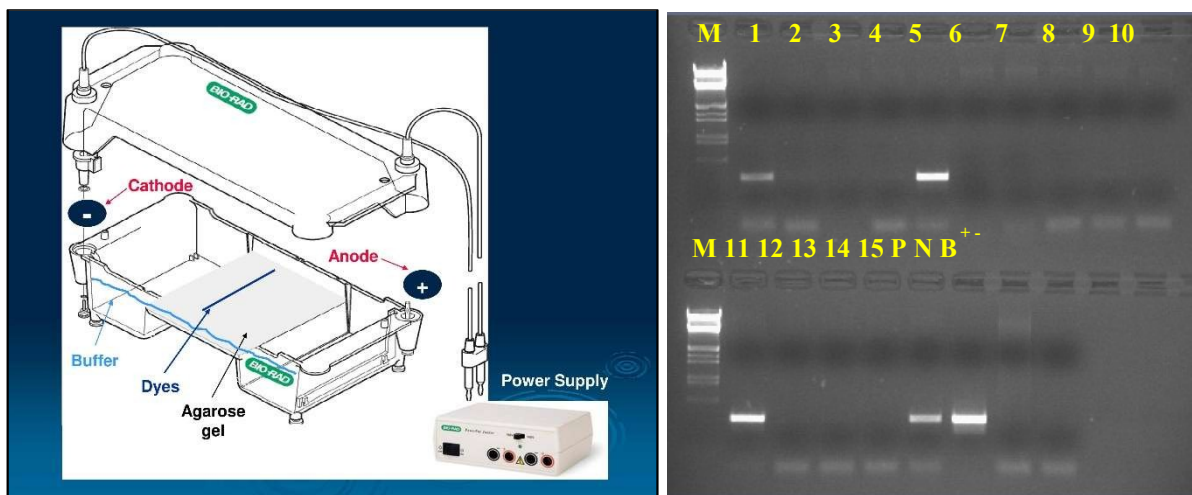
Gélelektroforézis

DNS (illetve itt nem tárgyalt fehérje) fragmentek elválasztására, méretük, esetleg mennyiségük meghatározására szolgáló alapló módszer. Alapelve, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben az ellentétes töltésű elektróda felé vándorolnak – a DNS fragmentek a negatívól a pozitív pólus felé.

A gél alapjául szolgáló polimer a nagy méretű DNS fragmentek esetében természetes (agar) eredetű agaróz, kisebb DNS fragmentek és fehérjék futtatásánál poliakrilamid. Az agaróz gélelektroforézis, általában maximum 10 bp pontosságú elválasztást tesz lehetővé, míg a poliakrilamid gélelektroforézis pontossága elérheti a 3 bp-t.

A futtatás futtató pufferben (a gél is agarózzal/poliakrilammiddal szilárdított puffer) történik. A gél „zsebeibe” töltött, festékekkel jelölt minták mellett egy ismert méretű fragmentekből álló marker egyidejű futtatása szükséges, ami a minta fragmentek méretének meghatározására alkalmas. A kisebb méretű fragmentek a gélben a kiindulási ponttól messzebb haladnak el, a nagyobbak a „zsebhez” közelebb maradnak.

A DNS a gélben egy UV-megvilágításban fluoreszkáló festék, az etídium-bromid segítségével tehető láthatóvá.



A DNS gélelektroforézis vázlata (jobbra) és agaróz gélen futtatott minták (balra)
(M - marker; P+ - pozitív kontroll; N- - negatív kontroll; B - DNS nélküli kontroll)

Források: <http://www.bio-rad.com> és saját

A hagyományos elektroforézis rendszerek mellett, nukleotid fragmentek elválasztására használatos, többek között a puffervesztéses E-Gel technológia (<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/e-gel-precast-agarose-gels-brochure.pdf>), illetve az akár 1 bp pontosságú elválasztást is lehetővé tevő kapilláris gélelektroforézis (Smith és Nelson, 2003).

Vektorok

A klónozandó DNS (inszer) hordozómolekulái, melyek az egyes gazdaszervezetek genetikai (DNS) információjának módosításához használatosak.

Csoportosításuk:

- klónozó vektor: specifikus DNS információ tárolására, sokszorosítására alkalmas; fontos tulajdonságok:

- a gazdaszervezetben önálló replikációra képes (replikon), több kópiában replikálódik
- kis méretű (2-10 kbp)
- egyedi restrikciós helyekkel, ún. klónozó helyekkel rendelkeznek (ált. multiklónozó helyek - Multiple Cloning Site/MCS), melyek a vektorban csak egyszer előfordul, egymás mellett elhelyezkedő különböző restrikciós endonukleáz felismerő helyek
- szelekciós marker (ált. antibiotikum rezisztencia) gént tartalmaz
- expressziós vektor: lehetővé teszi, hogy a benne tárolt DNS információ (inszer) fehérjeként kifejeződjön, expresszáldjon; fontos tulajdonság:
 - a klónozó hely előtt egy promóter régiót tartalmaz, ahonnan a transzkripció elindulhat

Az expressziós vektorokkal itt nem foglalkozunk részletesen, felhasználásuk, felépítésük bemutatása a Növényi biotechnológia fejezetben található.

Klónozó vektorok

Plazmid

- cirkuláris, stabil, így könnyen kezelhető
- kis mérete miatt kivonása, tisztítása, egyéb kezelése egyszerű
- nagy kópiaszáma révén erős expressziót eredményez
- szelekciós marker (pl. antibiotikum-rezisztencia gén) elhelyezésére, kifejezésére alkalmas
- kis méretű (max. 10-15 kbp) DNS szakasz klónozására alkalmas

Bakteriofág

- pl. λ -fág (*E. coli* temperált bakteriofágja), illetve származékai a Charon vektorok (kevesebb restrikciós hely)
- a gazdasejt genomjába profágként beépül, illetve onnan kiszakad
- inszerciós vektor: egyszeres hasítóhelyek felnyitása, DNS beépítése
- helyettesítési vektor: kétszeres hasítóhelyek, DNS beillesztése a kieső szakasz helyére

-

Forrás: [https://www.genscript.com/vector/SD1162-pUC18 plasmid DNA.html](https://www.genscript.com/vector/SD1162-pUC18_plasmid_DNA.html)

Kozmid

- plazmid szekvenciák, a λ -fág genomjának cos szekvenciáival kiegészítve, amik lehetővé teszik a beépülést a fág-fejbe, így transzformáció helyett csak fág-fertőzés szükséges
- 45-50 kbp DNS klónozására alkalmas

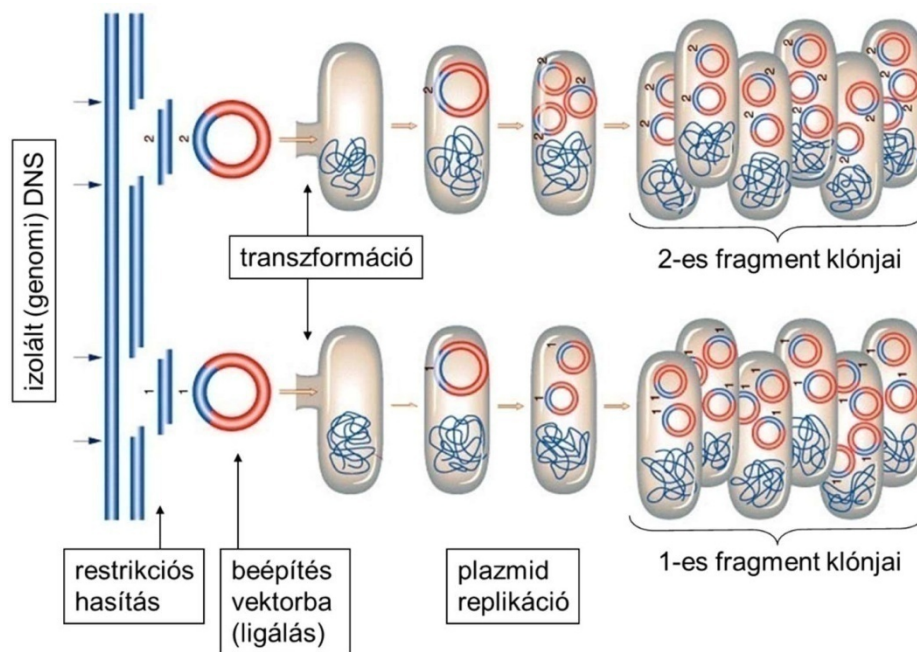
Baktérium eredetű mesterséges kromoszómák (BAC)

- <300 kbp méretű inszertek klónozása (pl. génkönyvtárakban)

- hasonló a standard bakteriális plazmidokhoz
- egy természetes eredetű óriásplazmidból (*E. coli* F-plazmidja) származik
- kis kópiaszám (1-2/sejt)
- a YAC-hoz képest könnyebben kezelhető, gyorsabban szaporítható *E. coli* gazdaszervezettel

Élesztő eredetű mesterséges kromoszómák (YAC)

- 800 kbp-1 Mbp méretű inszertek (pl. eukarióta DNS) klónozása (génkönyvtárak!)
- baktérium plazmid DNS és élesztő DNS hibridje
- szaporítás auxotróf élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) vonalakban
- expressziós vektornak is alkalmas



A hagyományos molekuláris klónozás menete

Forrás: BCE03_Gimilab_Gensebeszet_2

Klónozó gazdaszervezetek

A vektor (egyúttal a klónozni kívánt inszert) befogadására, *in vivo* felszaporítására szolgáló (többnyire mikroorganizmus) sejtek. Szerepe és legfontosabb jellemzői:

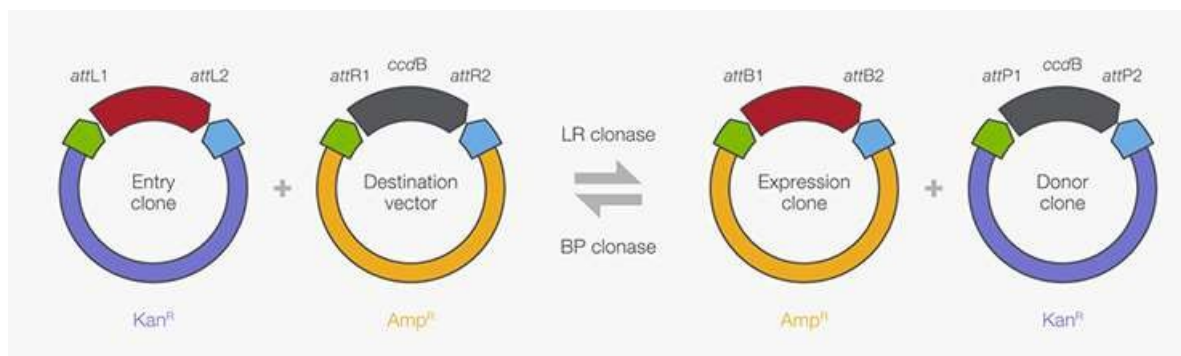
- befogadja a bejuttatott vektorokat (plazmid, fág stb.)
- könnyen és jól tenyésztendő

- genetikai tulajdonsága (és teljes genom-szekvenciája) ismert
- emberre és környezetre nem ártalmas
- képes expressziós gazdaként is működni: az idegen genetikai információ transzkripciójára és transzlációjára, illetve az idegen fehérje kiválasztására is alkalmas
- fontosabb klónozó gazdaszervezetek:
 - prokarióták: *Escherichia coli* (Gram⁻) – a leggyakrabban használt klónozó gazdaszervezet, *Bacillus subtilis* (Gram⁺)
 - eukarióták: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*

Egyéb molekuláris klónozási technológiák

A fent említett, restrikciós hasításon és ligáláson alapuló klónozási alpmódszer mellett, több, a ligálást is esetenként nélkülöző klónozási rendszer ismert. Ezekre alapozva több modern, a kívánt DNS fragment expressziós vektorban történő klónozását egyszerűvé, felhasználóbaráttá tevő vektor-rendszer található a kereskedelmi forgalomban, többnyire egy-egy cég kizárólagos termékeként. Jelen jegyzetnek nem célja ezek részletes bemutatása, az alábbi felsorolásban a fontosabb rendszereket és technológiákat említjük:

- USER® klónozás
(<https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/user-cloning>)
- TA és TOPO TA klónozás
(https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/topo_ta/index.html)
- rekombinációs klónozó rendszerek:
 - GATEWAY klónozási technológia
(https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/recombination/gategat/index.html)
 - In-Fusion klónozás
(<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in%E2%80%90fusion-cloning-faqs>)



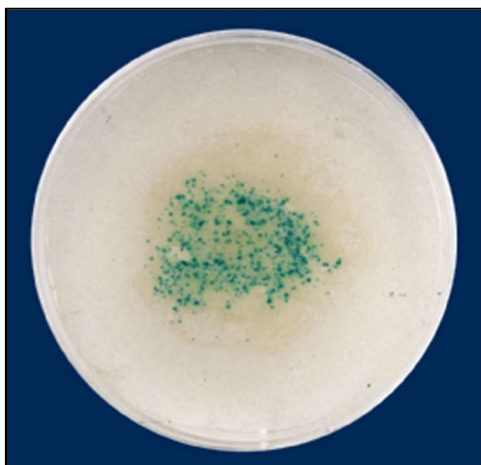
A Gateway klónozási stratégia vázlata

Forrás: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/common-applications-strategies.html>

2.3. A génbevitel sikerének igazolása és a transzgénikus sejtek/organizmusok szelekciója

Riportergén (jelzőgén):

- a sikeres gén-transzfer, transzfekció kimutatására alkalmas
- a génexpresszió (cisz és transz regulátor elemek általi) szabályozásának vizsgálatára alkalmas
- szelekcióra általában nem alkalmas (kimutatása általában a sejt pusztulásával jár)
- pl. β -galaktozidáz (kék-fehér szelekció pro- és eukariótákban); luciferáz; β -glükuronidáz (GUS; elsősorban eukariótákban); zöld fluoreszcens fehérje (GFP; a sejtek életben maradnak a teszt során) génjei



Tranziens GUS expresszió hisztokémiai bizonyítása kukorica szuszpenziós sejtekben (balra) és árpa szkutellumokon (jobbra)

Forrás: saját

Szelekciós markergén:

- a klónozott „fontos” DNS-szakaszhoz kapcsoltan expresszáldók, kifejeződésének mértékéből következtetni lehet a hasznosítani kívánt „idegen” génexpressziójára
- a hagyományos negatív szelekció általában antibiotikum- vagy herbicid- (növényi transzformációnál) rezisztenciagénre épül: az adott antibiotikumot/herbicidet tartalmazó táptalajon csak a markergént és a fontos DNS szakaszt egyaránt(!) tartalmazó transzgénikus organizmusok/sejtek maradnak életben
- pl. ampicillin-, tetraciklin-, higromicin-, kanamicin-rezisztencia (baktérium-tenyészetekben, higromicin- és kanamicin-rezisztencia növényeknél is); foszfinotricin (PPT)-rezisztencia (*bar/pat*-gén kódolja; növényi transzformációknál)
- a pozitív szelekció legelterjedtebb megoldásánál a transzformáns sejtek képesek hasznosítani egyébként nem metabolizált szénhidrát-féleségeket (pl. mannóz, xilóz), ezáltal felszaporodnak az adott tápanyag jelenlétében
- speciális, elsősorban mikrobáknál alkalmazott szelekciós módszerek:
 - auxotrófia-komplementáción alapuló szelekció: az auxotróf (hiánymutáns) gazdasejtben a klónozott DNS-szakaszhoz kapcsoltan expresszáldó gén „kijavítja” a mutációt, így minimál táptalajon csak a transzgénikus sejtek maradnak életben
 - immunológiai módszerekkel történő szelekció: a transzformációt a bevitt gén által termelt fehérje ellen előállított fajlagos antiszérummal végzett kezelés követi, a szelekció az immunreakció alapján történik
 - expressziós klónozás (pl. extracitoplazmás enzimek génjeinek szelekciójára): 1. lépés: expressziós cDNS-könyvtár készítése indukciós körülmények között nyert mRNS populációból (pl. keményítőt tartalmazó táptalajon tenyésztett baktériumsejtekből amiláz mRNS izolálása, azokról amiláz cDNS készítése); 2. lépés: szelekció indukciós (pl. keményítő-tartalmú) táptalajon - a transzgénikus sejtek telepei körül feltisztulási zóna kialakulása

A növényi géntechnológiában az antibiotikum- és herbicid-rezisztencia gének használatával kapcsolatban több, gyakran eltúlzott jelentőségű (elsősorban) társadalmi kifogás merült fel:

- egyes markergének termékei toxikusak vagy allergének lehetnek,
- az antibiotikum-rezisztencia a talaj patogén mikroorganizmusaiba átkerülhet,

- az általánosan használt herbicidekkel szemben rezisztens „szuper gyomok” jöhetnek létre,
- a szelekciós markergént tartalmazó transzgénikus növény nem transzformálható újból ugyanazzal a markergénnel.

Ezekre válaszul, fokozott törekvések folynak a szelekciós markergének nélküli szelekcióra (pl. markergén beépítése nélküli vagy a markergén kivágásán vagy szegregációján alapuló szelekció), marker-mentes transzgénikus növények előállítására, melyekről a Növényi biotechnológia fejezetben esik szó bővebben.

2.4. A polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR)

A polimerázláncreakció (K. Mullis, 1983 – kémiai Nobel-díj, 1993) a DNS enzimatisz amplifikálására (kópiák megsokszorozására) alkalmas molekuláris biológiai technológia. A PCR lehetővé teszi a DNS egy rövid, jól definiált szakaszának megsokszorozását analízis céljából.

A PCR fontosabb felhasználási területei:

- gének/DNS szakaszok klónozása, felszaporítása
- DNS-szekvenciák jelenlétének kimutatása a genomban/mintában (pl. géntérképezés, markerezés)
- polimorfizmusok kimutatása, genetikai ujjlenyomat készítése

A PCR-hez szükséges komponensek:

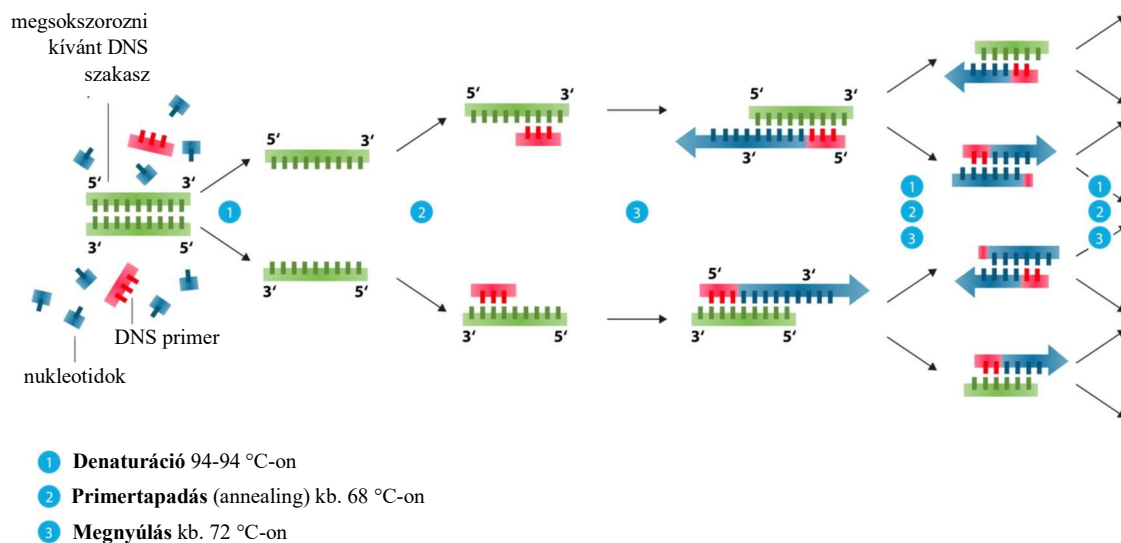
- DNS-templát: tartalmazza az amplifikálandó DNS-szakaszt
- két primer (ált. 18-25bp): meghatározzák az amplifikálandó szakasz elejét és végét (5', forward primer, illetve 3', reverse primer)
- DNS-polimeráz: lemásolja az amplifikálandó szakaszt (pl. hőstabil Taq-polimeráz, Pfu-polimeráz)
- nukleotidok (dNTP): a DNS-polimeráz ezekből építi fel az új DNS-t (adenin-, timin-, citozin-, guanin-nukleotidok; RNS-szakasz amplifikálása esetén timin helyett uracil-nukleotid)
- puffer: biztosítja a DNS-polimeráz számára megfelelő kémiai környezetet

A PCR-reakció egy ciklusának három fő lépése:

- a templát kettős DNS-szál denaturálása két egyszálú fonallá (95 °C)
- a primerek kapcsolódása (annealing) a komplementer célszekvenciákhoz (55-70 °C)
- a templát DNS-sel komplementer szál szintézise (extension) 5'→3' irányban (72-75 °C)

A ciklusok általában 30-35x ismétlődnek a megfelelő mennyiségű termék előállításának céljából.

PCR-rel 50 bp -10 kbp méretű DNS(RNS)-fragmenteket lehet felszaporítani.



A PCR menetének vázlata

Forrás: <http://www.onlinebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-steps-types-application/>

Speciális PCR-technikák és fontosabb PCR-alapú módszerek:

- kvantitatív PCR (qPCR): a célszekvencia mennyiségének (általában valós idejű) meghatározására. Általában a keresett DNS szekvencia jelenlétének és kópiaszámának meghatározására használják. Alkalmanként RT-PCR-nak (real-time PCR, valós idejű PCR) is rövidítik, de azt hivatalosan a reverz transzkripció PCR-re alkalmazandó (ld. lent).
- reverz-transzkripció PCR (RT-PCR): RNS templáton DNS fragment amplifikálására. A reverz-transzkriptáz az RNS-t cDNS-sé írja át, amit azután a PCR amplifikál.

Széleskörben alkalmazzák expressziós profil készítésére, illetve RNS transzkriptek szekvenciájának azonosítására.

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS) analízis: teljes genom PCR-rel történő vizsgálatára. Az analízis során egyetlen rövid primerrel véletlenszerűen szaporítanak fel DNS szekvenciákat. Nem kell ismerni a felszaporítandó szekvenciákat, mivel az alkalmazott rövid (10-15 nukleotid hosszúságú) primer kötődésének valószínűsége nagy. Ha a vizsgált izolátumok polimorfikus (eltérő szekvenciájú) DNS-t tartalmaznak, a gél-elektroforézissel kapott mintázatok is különbözőek lesznek (molekuláris ujjlenyomat), ami elsősorban törzs szintű összehasonlítást tesz lehetővé.
- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - amplifikált fragmentum hosszúság polimorfizmus) analízis: restrikciós enzimes hasítással kapott fragmentumokhoz adaptorokat ligálnak, melyek szelektív amplifikáció alapjául szolgálnak. A gélen elválasztott amplifikátumokat fluoreszcensen jelölik, majd automata lézer szekvenáló berendezéssel poliakrilamid gélen szeparálják. Az eredmény 50-100 sávból álló, jól reprodukálható mintázat(ujjlenyomat).

2.5. Nukleinsav és fehérje hibridizálási módszerek

A hibridizációs módszerekkel biológiai mintákból vagy egy gén-/cDNS-könyvtárból mutatható ki adott DNS vagy RNS szakasz jelenléte. A hibridizáció során a mintához (templát) a bázispárosodás szabályai szerint kapcsolódik (hibridizál) a komplementer próba. A minta lehet DNS vagy RNS, a próba elvileg bármilyen (izotóppal vagy nem-izotópos festékkel) jelölt nukleinsav. Általában a hibridizálási technikák között tárgyalják a fehérjék kimutatására szolgáló Western-blot módszert.

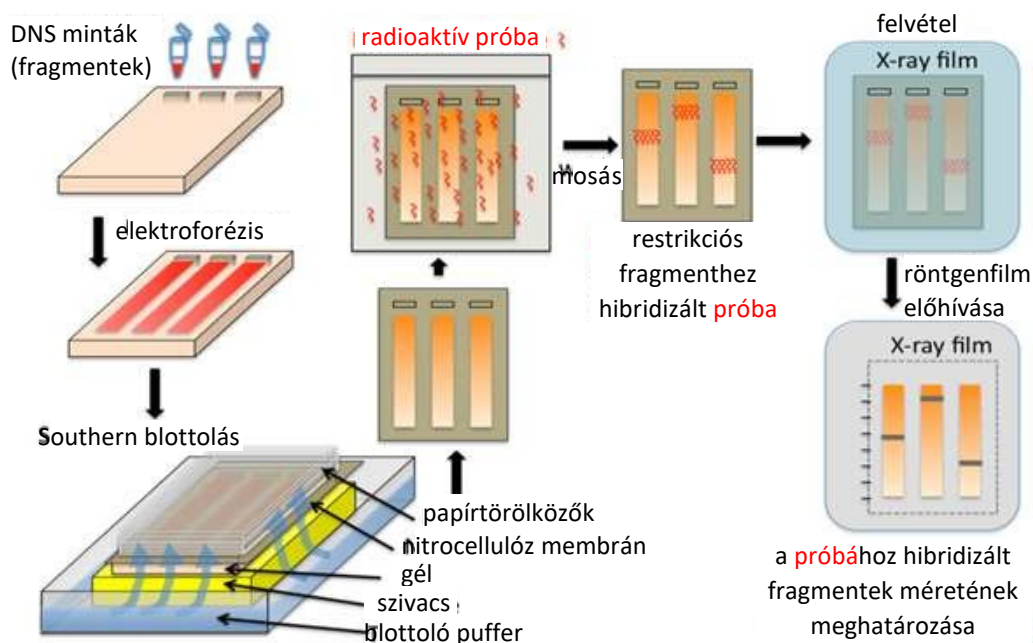
A hibridizációs (blottoláson alapuló) technikák:

- Southern-hibridizáció (Southern-blot):
 - DNS mintán DNS vagy RNS próbával
 - pl. adott DNS-szakasz (fizikai) jelenlétének kimutatása; DNS-ujjlenyomat készítése (restrikciós fragment-hossz polimorfizmus – RFLP)
- Northern-hibridizáció (Northern-blot):

- RNS mintán DNS vagy RNS próbával
- pl. adott gén kifejeződésének kimutatása a transzkripció szintjén
- Western-hibridizáció (Western-blot):
 - fehérje mintán antitest (fehérje-fehérje) kötődés alapján
 - pl. adott gén kifejeződésének kimutatása a transzláció szintjén

A blotolás (Southern- és Northern-blot) főbb lépései:

- a restrikciós enzimekkel emésztett DNS/RNS minta szétválasztása agaróz gélelektroforézissel
- blotolás: a DNS/RNS molekulák átvitele diffúzióval a gélből egy nitrocellulóz- vagy nylonmembránra és ott történő immobilizálása (blottolás nélkül a gélből a DNS diffúzióval az oldatba kerülne a hibridizálás során, illetve a gél törékeny és nehezen kezelhető)
- a DNS/RNS *in situ* denaturálása és rögzítése a lenyomaton (hő vagy UV)
- a rögzített minták hibridizálása egy radioaktív vagy fluoreszcens módon jelölt próbával
- a jelölt minták beazonosítása a hibridizált és jelölt mintákról készült autoradiogram vagy a fluoreszcencia mintázata alapján



A Southern hibridizáció vázlata (magyarázatot lásd a szövegben)

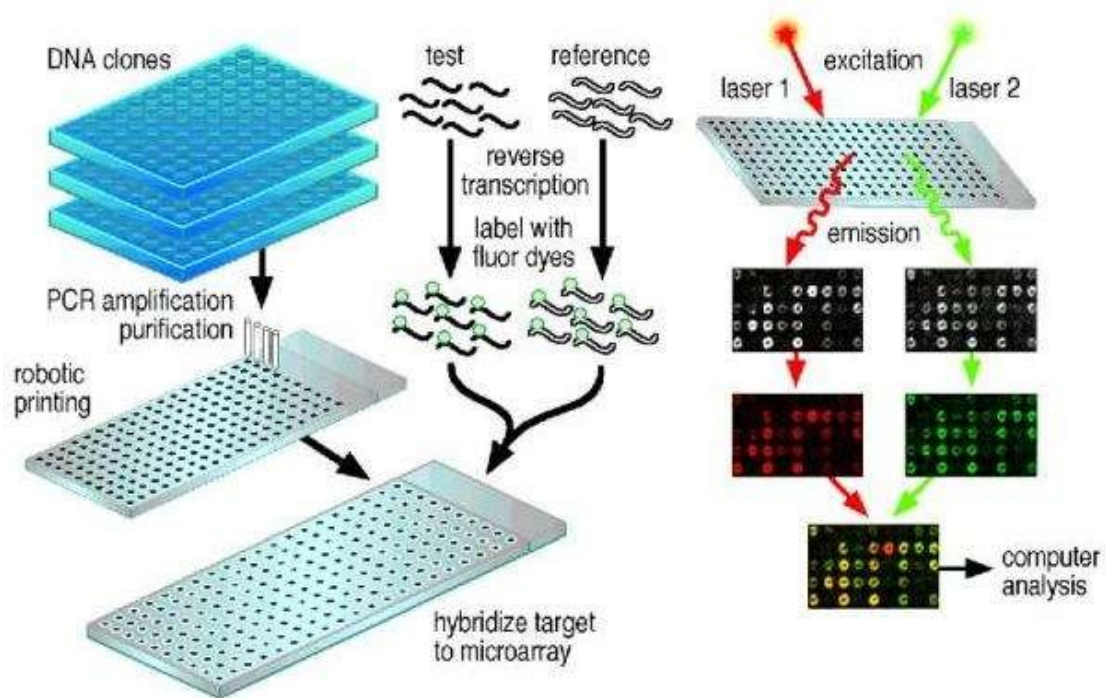
Forrás: [https://bio.libretexts.org/?title=TextMaps/Genetics/Book:_Online_Open_Genetics_\(Nickle_%26_Barrette-Ng\)/08:_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.6:_DNA_Analysis:_Blotting_and_Hybridization](https://bio.libretexts.org/?title=TextMaps/Genetics/Book:_Online_Open_Genetics_(Nickle_%26_Barrette-Ng)/08:_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.6:_DNA_Analysis:_Blotting_and_Hybridization)

A Western-blot főbb lépései:

- natív vagy denaturált (SDS-sel) fehérjék gélelektroforézise
- blottolás (elektroblottal) membránra
- inkubálás a vizsgálandó fehérje ellen termelt, (fluoreszcens) festékkel jelölt ellenanyaggal
- mintázat értékelése

DNS-chip (microarray) technika

A hibridizációs technikák legújabb változata. Kisméretű ($1-2 \text{ cm}^2$) szilárd hordozó (pl. szilikon, üveg) felületére szabályos elrendezésben több 10000 DNS próbát (génekre vagy cDNS-ekre specifikus oligonukleotidok) rögzítenek. A mintákat fluoreszcens módon jelölik. Az értékelés során mikroszkóp segítségével, a mutatott fluoreszcencia alapján detektálják azokat a próbákat a chipen, amelyekkel komplementer DNS vagy RNS jelen van a mintában. Alapvető különbség a klasszikus hibridizációs módszerekhez képest, hogy itt a próbát, míg a fent említett blottoláson alapuló technikáknál a mintát immobilizálják, itt a minták, a blottolásnál a próbák mobilak.



A DNS chip technika vázlatja

Forrás: <http://bme240.eng.uci.edu/students/08s/jentel/Diagnose-hereditary-disease.htm>

A DNS microarray főbb alkalmazási területei:

- a funkcionális genomika
- génexpressziós változások kimutatása
- SNP-k (egypontos nukleotid-polimorfizmusok) detektálása
- teljes genomot átfogó genetikai különbségek analizálása
- alternatív splicing és génfüzió kimutatása

2.6. Gén és cDNS könyvtárak

A rekombináns DNS könyvtárak nagy mennyiségű DNS-ben kódolt információt tartalmaznak.

A rekombináns DNS könyvtárak típusai:

- genomiális könyvtár:
 - egy adott szervezet teljes genetikai anyagát vagy annak egy-egy jól körülhatárolt részét (pl. egy kromoszóma) reprezentáló klónozott DNS szakaszok gyűjteménye
 - a felhasználás célja: egy gén, gén klaszter, teljes genom fizikai térképének elkészítése, új markerek azonosítása és elhelyezése a térképen, a teljes genom szekvenciájának meghatározása
- cDNS (complementary/copy DNS) könyvtár:
 - egy adott sejttípusban egy adott pillanatban kifejeződő fehérjék érett mRNS-éről reverz transzkriptázzal átírt DNS szakaszok, klónok halmaza
 - a felhasználás célja: adott fehérjék kódoló szekvenciájának előállítása; nem alkalmas az egyes gének kifejeződésének, az expresszió szabályozásának vizsgálatára (a gének szabályozó elemei nincsenek jelen)

A könyvtár készítésének első lépése a klónozni kívánt DNS megfelelő méretű fragmentumainak előállítása, majd ezeknek klónozása az adott vektorba.

A könyvtárak szűrése (screening - szkrínelés): a vizsgálni kívánt gént/cDNS-t tartalmazó klón(ok) kiválasztása és elkülönítése a többi klóntól

Gén/cDNSkönyvtár készítésének menete:

1. Genomi DNS feldarabolása egy általánosan használt restrikciós endonukleázzal (pl. *EcoRI*) / Adott körülmények között cDNS-ek izolálása
2. A DNS-fragmentek beépítése klónozó vektorba (átfedő szekvenciák szükségesek)

A rekombináns plazmidok mindegyike más-más genomi DNS / cDNS darabot tartalmaz

3. Bejuttatás és felszaporítás gazdasejtben

A transzformáció során minden gazdasejt (általában baktérium) csak egyetlen plazmidot vesz fel, de a transzformáns baktériumok összessége az egész genomot tartalmazza: ez a génkönyvtár

4. A könyvtár szűrése:

- a klónozó baktériumok kiszélesztése
- különálló kolóniák fejlődése: egy kolónia – egyféle plazmid (= egyféle genomi DNS / cDNS darab)
- kolónia-hibridizáció: a szélesztett kolóniák membránra blottolása, hibridizálás radioaktív/nem-radioaktív jelölt próbával (pl. a géntermék mRNS-t nagymértékben kifejező szövetből; a fehérje szekvenciája alapján készített DNS oligonukleotid; más fajból már ismert homológ DNS szakasz; a fehérje elleni antitest), pozitív kolóniák beazonosítása az eredeti táptalajon

A cDNS:

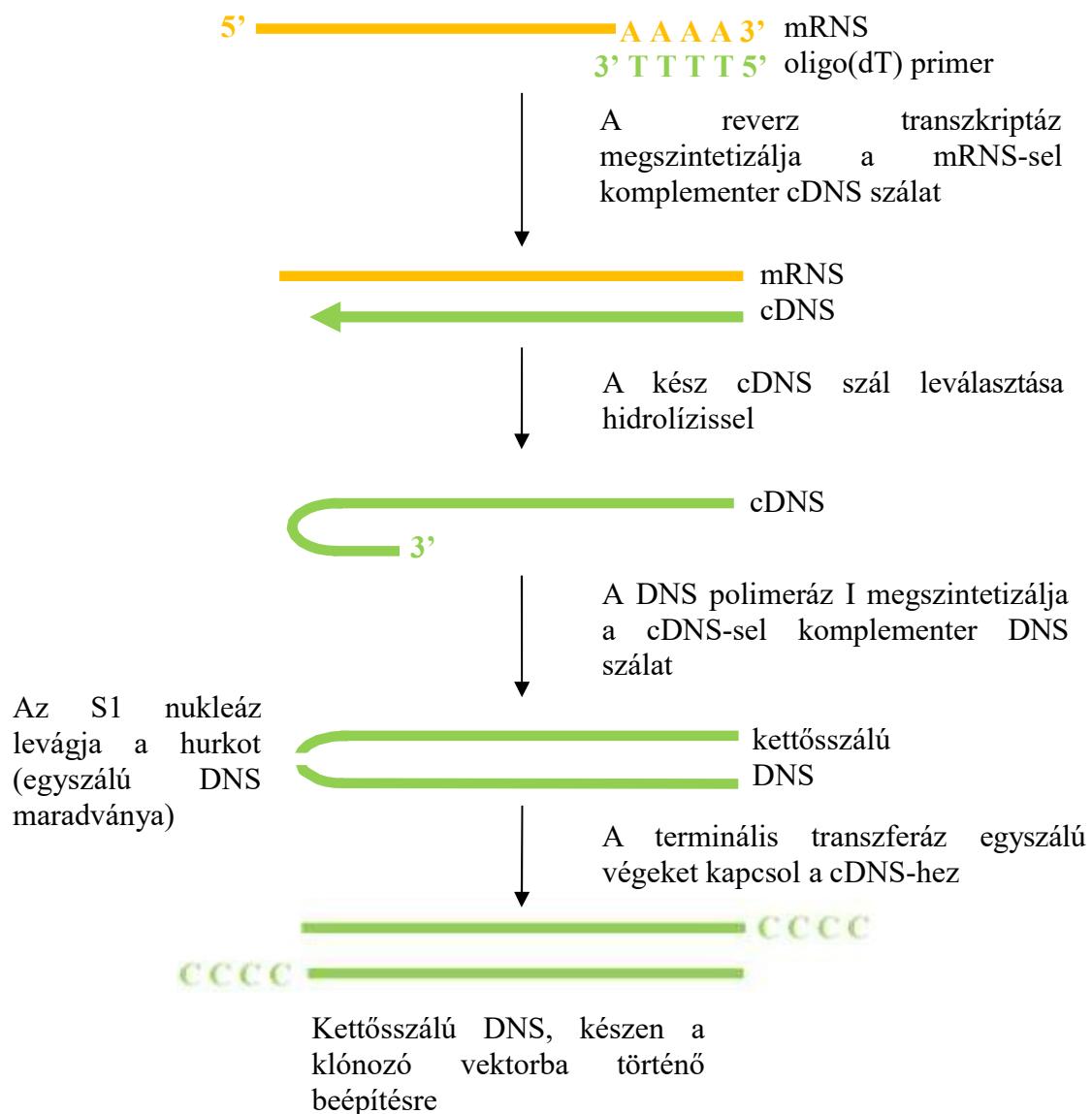
- egyszálú RNS (pl. mRNS) vagy microRNS templátról reverz transzkriptáz enzim által katalizált reakcióban szintetizált duplaszálú DNS,
- csak a működő génekről ad mintát (mRNS-en keresztül),
- nem tartalmaz intronokat → kifejezhető prokariótákban is,
- a génműködés szabályozásáért felelős szekvenciákat nem tartalmazza

A cDNS készítésének főbb lépései:

- annak a sejttípusnak a körütekintő kiválasztása, amelyben a vizsgálni kívánt fehérjék nagy mennyiségben jelen vannak; általában indukciós körülmények biztosítása szükséges
- RNS izolálása
- az érett mRNS 3' poli-A farkához hibridizáló oligo-dT primer (vagy specifikus, esetleg random primer), valamint reverz transzkriptáz enzim felhasználásával az mRNS-sel komplementer DNS (cDNS) szál elkészítése

- az egyszálú cDNS (ss cDNS) leválasztása a mRNS-ről hőkezeléssel vagy lúgos hidrolízissel
- az egyszálú cDNS szálra visszahajló 3' vége ún. hajtút képez, és primerként szolgálhat a második lánc szintéziséhez, illetve egyéb módszerek
- polimerizáció DNS polimeráz I (Klenow fragment) és dNTP-k felhasználásával
- a hajtú levágása S1 nukleázal

az előző lépések alternatívái: RN-áz H és *E. coli* DNS-polimeráz I felhasználásával, vagy terminális transzferáz, oligo-dC farok szintézise és oligo-dG primerrel induló szintézis



A cDNS készítésének vázlata

Forrás: saját

3. MIKROBA BIOTECHNOLÓGIA

Mikroorganizmusok (mikrobák):

mikroszkopikus (szabad szemmel nem látható) élőlények.

Prokarióták:

- maganyagukat (nucleoid) nem határolja membrán
- ide tartozó mikrobák rendszertani kategóriái:
 - Archeae („ősbaktériumok”)
 - Eubacteria (valódi baktériumok)

Eukarióták:

- sejtmagjukat kettős membrán határolja
- ide tartozó mikrobák rendszertani kategóriái:
 - algák
 - mikroszkopikus méretű gombák (pl. Myxo-, Oo-, Chitrodiomycetes)
 - protozoák

3.1. A mikroorganizmusok anyagcseréjének fő jellemzői

A mikroorganizmusok anyagcserefolyamatainak biokémiai háttere, az alapvető bioszintetikus és lebontó folyamatok lefutása megegyezik, illetve analóg a magasabbrendű növényeknél ismertekkel.

Alapfogalmak:

Anabolizmus (bioszintézis): felépítő, energiaigényes folyamat

Katabolizmus: lebontó, energia-felszabadulással járó folyamat

A mikrobasejt anyagcseréjének szakaszai:

1. Primer metabolizmus (trofofázis):

- a tenyészet intenzív gyarapodása
- tápanyagok, fizikai tényezők stb. nem hiányoznak, a mikroorganizmusok növekednek
- primer metabolitok termelése, azok visszkapcsolódása az anyagcserébe

2. Szekunder metabolizmus (idiofázis):

- hiányos életfeltételek, a katabolikus folyamatok felerősödése
- primer metabolitok termelése, a mikrobák létfenntartása
- szekunder metabolitok termelése:
 - nem kapcsolódnak vissza a sejt saját anyagcseréjébe
 - glükóz, lipidek stb. lebontásából (gyakran: acetyl-CoA-ból)
 - szerep a környezethez való alkalmazkodásban (pl. alkaloidok)

3.1.1. A mikrobák táplálkozása

A felhasznált szénforrás alapján:

- autotróf: kizárólag vagy döntően CO_2 hasznosítása
- heterotróf: redukált szerves molekulák (szénhidrogének, szerves savak, lipidek, cukrok, cukoralkoholok, poliszacharidok stb.) hasznosítása

Az energiaforrás alapján:

- fototrófok: fény az energiaforrás
- kemotrófok: szerves (vagy szervetlen) vegyületek oxidációjából nyernek energiát

Az elektronforrás alapján:

- organotróf: szerves vegyületek oxidációja
- litotróf: redukált szervetlen molekulák oxidációja

A prokarióták általában kemolitotrófok és fotoorganotrófok, esetleg fotolitotrófok.

Az eukarióták általában kemoorganotrófok és fotolitotrófok.

A biokémiai folyamatok katalizátorai az enzimek, melyek a mikrobák esetében lehetnek:

- extracitoplazmás („extracelluláris”): a citoplazmán (sejten) kívül aktív
- citoplazmás („citoplazmatikus”): a citoplazmában aktívak

Más szempont szerint, az enzimek lehetnek

- konstitutív: folyamatosan működik
- indukálható: adott inger, indukciós tényező hatására működik

A szerves makromolekulák (polimerek, pl. fehérjék, poliszacharidok, lipidek) bontása általában extracitoplazmás bontóenzimekkel történik.

Fontosabb enzim-típusok a mikrobákban:

- ligáz: kötések létesítése (szintézis, kondenzáció) vízmolekula felszabadításával
- hidroláz: kötések bontása vízmolekula beépítésével
- oxidoreduktáz: redox-folyamatok katalizálása
- transzferáz: funkciós csoport (pl. amino-, metil-csoport, CO₂) átvitele egyik molekuláról a másikra
- izomeráz: molekulán belüli átalakulások katalizálása
- liáz: kettős kötésekhez történő szubsztitúció katalizálása

3.1.2. A mikrobák anyagcseréjének szabályozása

Szabályozás az enzimek szintézise szintjén:

- operon (pl. laktóz-operon):
 - meghatározott anyag feldolgozásához szükséges enzimek génjeinek be-, kikapcsolása egyetlen transzkripció egységként történik
 - a regulátor-, operátor és promoter régiókat, valamint a struktúrgéneket foglalja magába, működését az effektor (nem nukleinsav molekula, ld. lent) is befolyásolja
- katabolit represszió (szén katabolit represszió):

egyres operonokban (pl. *lac* operon) működő génszabályozó rendszer, amely szerint az előnyben részesített, könnyen metabolizálható szén-és energiaforrás (pl. glükóz) jelenlétében egyéb szénhidrátok lebontása gátlás alá esik

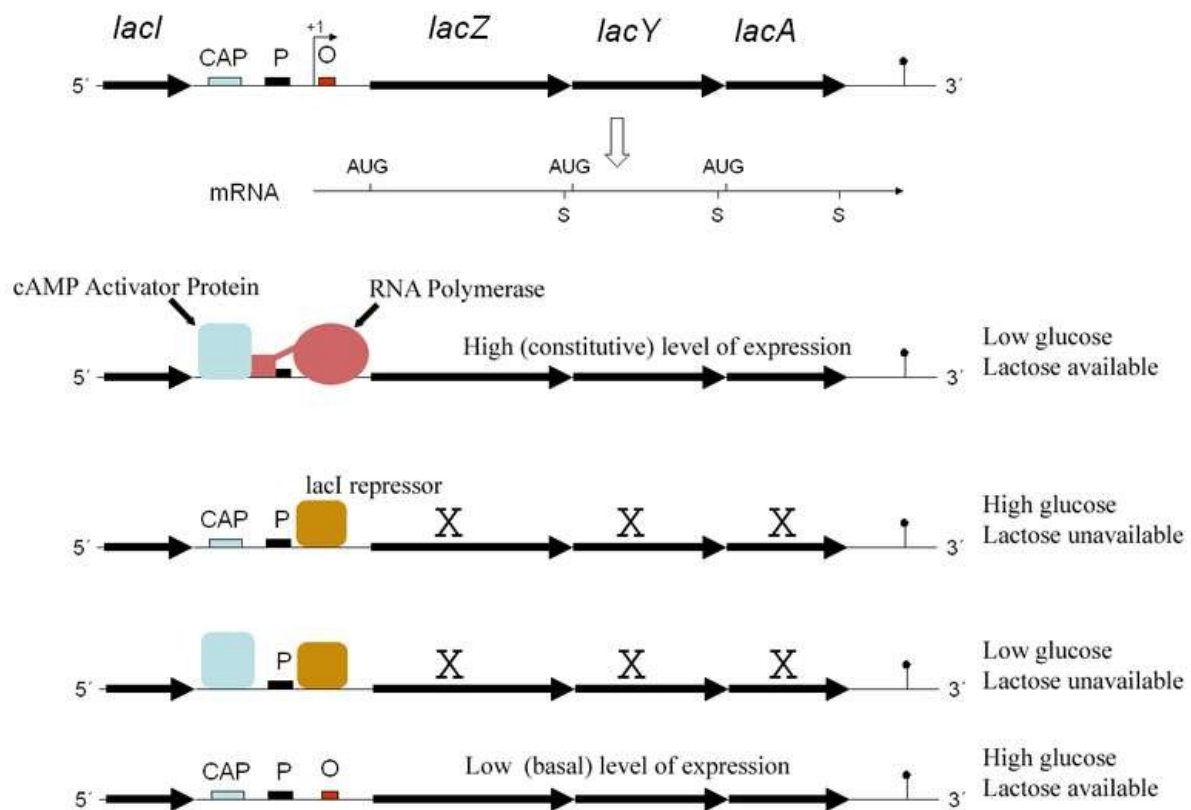
Az operon működésére általános példa a laktóz-operon (*lac*-operon):

- a laktóz hasznosításhoz 3 enzim szükséges, melyek átírását a *lac* promóter irányítja:
 - β -galaktozidáz - a *lacZ* gén terméke
 - permeáz - a *lacY* gén terméke
 - transzacetiláz - a *lacA* gén terméke
- a *lac* promóter után (3' irányban), a szabályozott gének előtt található az operátor régió, a represszor fehérje kapcsolódási helye
- a *lac* promótertől 5' irányban található a represszor fehérje átírási egysége (*lacI*)

- további (itt nem tárgyalt) példák az operon működésére: arabinóz operon (*ara* operon), triptofán operon (*trp* operon)

A laktóz-operon működésének egyszerűsített modellje:

- glükóz jelenlétében, laktóz hiányában a laktóz feldolgozásához szükséges enzimek nem termelődnek, mert a represszor fehérje az operátor régióhoz kapcsolódva meggátolja az RNS polimerázt a struktúrfehérjék átírásában.
- glükóz hiányában, a laktóz mint indukáló molekula (induktor) a represszor fehérjéhez kapcsolódva megakadályozza, hogy az az operátor régióhoz kapcsolódjon, így megindul a laktózt bontó enzimek szintézise.



A laktóz operon és szabályozó elemei (katabolit represszió)

Forrás: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Lac_operon.png

Katabolit represszió a laktóz-operon szabályozásában:

- glükóz és laktóz egyidejű jelenléte esetén nincs erős *lac* expresszió- a glükóz a legjobb szén- és energiaforrás, ezért előbb ezt használja fel a baktérium, nincs szüksége a laktóztmetabolizáló enzimekre
- glükóz jelenléte, laktóz hiánya esetén a cAMP : ATP arány eltolódik az ATP javára, így a katabolit aktivátor fehérje (CAP) kis mennyiségben aktiválódik (kevés cAMP-CAP komplex), a laktóz operon represszált (gátolt)
- glükóz és laktóz egyidejű jelenléte esetén kevesebb ATP és már kevés cAMP is keletkezik, így a laktóz induktor és a kis mennyiségű cAMP-CAP komplex aktiválja a *lac*-operont, alacsony szintű transzkripció kezdődik
- glükóz hiánya, laktóz jelenléte esetén (a sejt "éhezik") kevés ATP és sok cAMP keletkezik, a cAMP-CAP komplex/*lac* promóterhez kapcsolódása maximális szintű transzkripciót eredményez

Szabályozás az enzimek működésének szintjén:

- protein-kinázok:
enzimek foszforilálása, aktiválása
- foszfatázok:
defoszforilálás, aktivitás módosítása/megszüntetése
- kompetitív gátlás:
a szubsztráthoz hasonló vegyület kapcsolódása az enzimhez, így a reakció nem játszódik le (pl. antibiotikumok, gyógy- és növényvédőszeres működési elve)
- visszacsatolós gátlás (feed-backkontroll):
a reakció végterméke a katalizáló enzim felismerő helyéhez kapcsolódik, gátolja annak aktivitását (negatív feed-back)
- allosztérikus gátlás:
az allosztérikus enzim járulékos regulátorhelyéhez effektor molekula (független a katalizált reakciótól) kapcsolódik, így az enzimfehérje harmadlagos szerkezete módosul, az reverzibilisen elveszti aktivitását

Az effektorok szerepe a mikroba anyagcsere szabályozásában

Effektor:

- enzimek regulációs régiójához kapcsolódva az enzim működését serkentő (alloszterikus serkentés) vagy gátló (alloszterikus gátlás), kis méretű szabályozó molekula
- operonokban a regulátor fehérjéhez kapcsolódó molekula, ami a fehérje alloszterikus megváltozását okozza, így működőképességét változtatja meg

A mikrobasejtek effektorai:

- szén- és energiaforrás: glükóz
- nitrogén-anyagcsere: ammónium-ion; glutamin, aszparagin
- kén-anyagcsere: cisztein, metionin

Effektor (a legkönnyebben feldolgozható tápanyag) hiányában felszabadulnak a másodlagos tápanyagokat bontó enzimek, ami számos esetben mikroba ipari felhasználhatóságának alapja.

A mikrobák energiatermelése

A glükóz (mint effektor, ld. fent) lebontása ATP-termeléssel jár. A megtermelt ATP mennyisége függ a glükóz lebontásának folyamatától.

A glükóz lebontásának alternatívái:

- 1. Glikolízis (anaerob) – terméke a piroszőlősav
- 2. Citrát-kör (trikarbonsav-ciklus)
- 3. Terminális oxidáció, oxidatív foszforilálás
- aerob- 38 molekula ATP keletkezik
- 1. Glikolízis (anaerob)
- 2. Fermentáció (a piroszőlősav redukciója):
 - alkoholos
 - savas
- anaerob- kevés ATP keletkezik

A fermentáció a mikroorganizmusok közvetlen (biotechnológiai) hasznosítására alkalmas:

- alkoholos italok, tejtermékek, tartósított savanyúságok előállítása

- alkohol, tejsav, ecetsav ipari méretű termelése
- silótakarmányok készítése

3.2. A mikrobák tömegtenyésztése

A mikroba-tenyészet növekedésének kinetikája

A zárt rendszerben tenyésztett mikroorganizmusok növekedési görbéjének szakaszai:

1. Lag-fázis: nem észlelhető a növekedés, az inokulum „alkalmazkodása”
2. Gyorsuló növekedés szakasza (akcelerációs fázis): az adott fajra jellemző osztódási gyakoriság elérése (baktériumok: kb. 20-30 perc)
3. Exponenciális növekedés: maximális ütemű szaporodás, teljes intenzitású anyagcsere
4. Lassuló növekedés szakasza (decelerációs fázis): tápanyagok fogyása, káros anyagcsere-termékek felszaporodása (zárt rendszer!)
5. Megállapodott szakasz (stacionárius fázis): a növekedés megszűnése, a limitáló tápanyag elfogyásával; kitartó képletek hozása, sporuláció
6. Pusztuló szakasz: az elhalt sejtek száma nő, autolízis

Ipari körülmények között általában meghatározott növekedési fázisban képződő termék(ek) előállítása a cél. Fontos az adott fázis minél gyorsabb elérése, és időtartamának meghosszabbítása, akár végtelenítése (pl. ún. kemosztát rendszerek).

3.2.1. A mikrobák tömegtenyésztésének környezeti feltételei

A mikrobák növekedésére ható környezeti tényezők:

- oxigén
obligát/fakultatív aerobok
obligát/aerotoleráns anaerobok
- sugárzás
elektromágneses (UV-, γ -sugárzás), korpuszkuláris (β - vagy katód-sugárzás)
sugárzások mikrobákat károsító hatásúak
- hőmérséklet
optimum: $<15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pszichrofil), $20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pszichrotróf), $20-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mezofil), termofil ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$)

- nyomás
optimum: általában normál légköri nyomás (1 at)
barotoleránsok: 200-300 at-ig, barofilek: 1000 at-ig
- ozmotikus viszonyok
a baktériumok ozmotikus stressz-érzékenysége jóval nagyobb, mint a gombák
érzékenysége
- pH
neutrofil (pH 5-8), acidofil (pH 1-5), alkalofil (pH 8-11)

A mikrobákban (elsősorban baktériumokban) előforduló fontosabb tápelemek:

- makroelemek: C, O, N, H
- mikroelemek: P, S, K, Mg, Ca, Fe
- nyomelemek: Mn, Co, Zn, Cu, Mo

Az átlagos mikrobasejt összetétele (szárazanyagra viszonyítva):

- szén: 48%
- oxigén: 26%
- nitrogén: 14%
- hidrogén: 7%
- foszfor: 3%
- kén: 1%
- egyéb elemek: 1%

Ez a mikrobatenyésztésközege összetételének alapja.

A mikrobák tömegtenyésztésére használt tápanyagforrások:

- szénforrás (szénhidrát-, energiaforrás):
 - melasz (60% szénhidrát, 1-2% nitrogén)
 - malátakivonat (90% szénhidrát, 5% fehérje, vitaminok, nyomelemek stb.)
 - keményítő (forrás: kukorica, burgonya, manióka) - glükóz-, maltóz-, maltotrióz-forrás)
 - cellulóz (forrás: szalma, faforgács stb.)

metabolizálásához lignocellulóz-bontó enzimrendszer szükséges! (a fonalas gombákban található)

- növényi olajok(linolén-, linol-, olajsav-források); energiát is szolgáltatnak!
- etanol (metanol) - pl. ecetsav-előállítás
- tejsavó (1% laktóz, 0,2% fehérje) - tejsav-előállítás
- nitrogénforrás (aminosavak, fehérjék forrása):
 - szervesetlen N-források: ammóniumsók, karbamid
 - pepton (forrás: hús, kazein, növényi részek stb.) - drága
 - élesztőkivonat (forrás: szeszipar) - 70% fehérje, vitaminok, nyomelemek forrása
 - szójaliszt (olaj-kinyerésből) - 50% fehérje
 - kukorica présle (keményítő-gyártásból)
- Nyomelemek:
 - Zn, Co, Mn, Mo, Cu, Fe, sók vagy kelátok formájában
- Különleges adalékok:
 - vitaminok és növekedési faktorok
 - indukáló anyagok (másodlagos anyagcseretermékek termelése)
 - felületaktív anyagok (kiválasztás elősegítése)
 - habosodást gátló szerek
 - szelekciós marker-vegyület (pl. antibiotikum)

3.2.2. Bioreaktorok

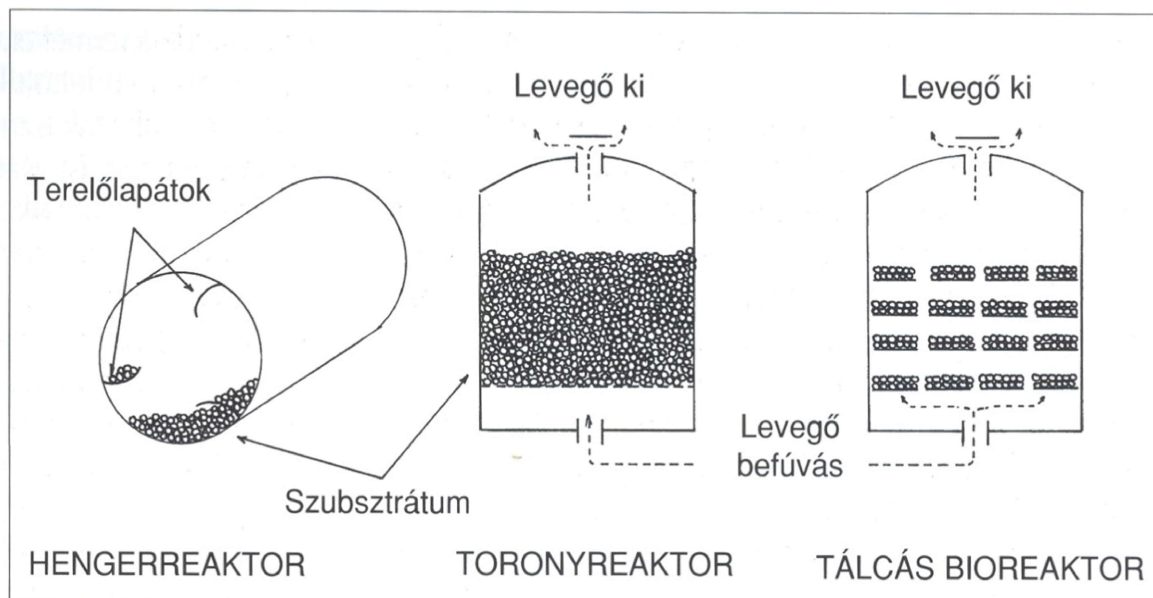
Bioreaktor (korábbi nevén: fermentor):

- a mikrobák tömegtenyésztésére szolgáló berendezés
- tápközeg szilárd vagy folyékony vagy kombinált
- steril (pl. antibiotikumok előállítása) vagy nem-steril (pl. siló, borászat)
- aerob (pl. enzimek, aminosavak, vitaminok, antibiotikumok előállítása) vagy anaerob (pl. etanol, tejsav előállítása)
- méret: 10-100 000 liter űrtartalom

Szilárd fázisú bioreaktorok:

- a tenyésztés tényezői:

- a tápközeg előkészítése (aprítás stb.)
- optimális hőmérséklet biztosítása
- megfelelő nedvességszint biztosítása
- oxigénszint szabályozása
- alaptípusok
 - hengerreaktor (pl. mikrobatömeg előállítása)
 - toronyreaktor (pl. toronysiló)
 - tálcás bioreaktor (pl. enzimek, egzotikus élelmiszerek előállítása)
- alkalmazás: sajtgyártás, szilázskészítés, gombatermesztés, komposztálás stb.



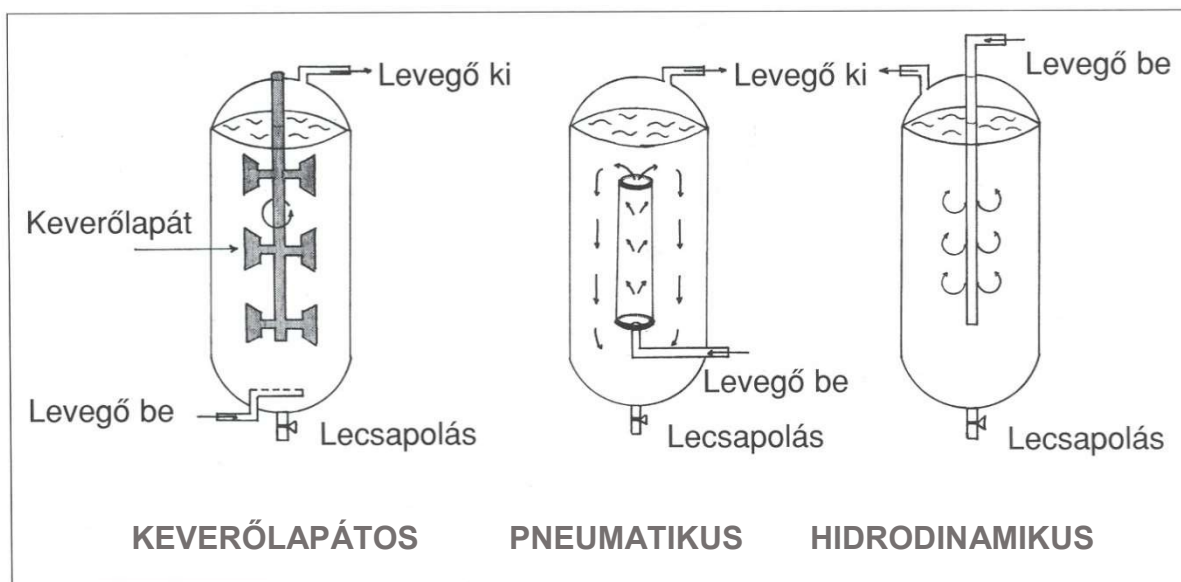
A szilárd fázisú bioreaktorok típusai

Forrás: Heszky és mtsai., 2005

Folyékony fázisú bioreaktorok:

- alaptípusok:
 - keverőlapátos
 - pneumatikus
 - hidrodinamikus
- kádtenyésztés:
 - egyszeri feltöltés

- olcsó, üzembiztos
- kevésbé alkalmas elsődleges anyagcseretermékek előállítására, sok a holtidő (felszaporodás, tisztítás stb.)
- alkalmazás: pl. alkoholtartalmú italok, másodlagos anyagcseretermékek előállítása
- utántöltéses kádtenyésztés
 - általában az exponenciális szakaszban termelt termékek előállítására használt
 - alkalmazás: pl. extracitoplazmás enzimek, szerves savak előállítása
- folyamatos üzemű tenyészetek
 - 50-100 napos folyamatos üzem
 - üzemszervezési szempontból optimális
 - bonyolult, drága
 - nagy sejttömeg, exponenciális szakaszban keletkező termék előállítására használt

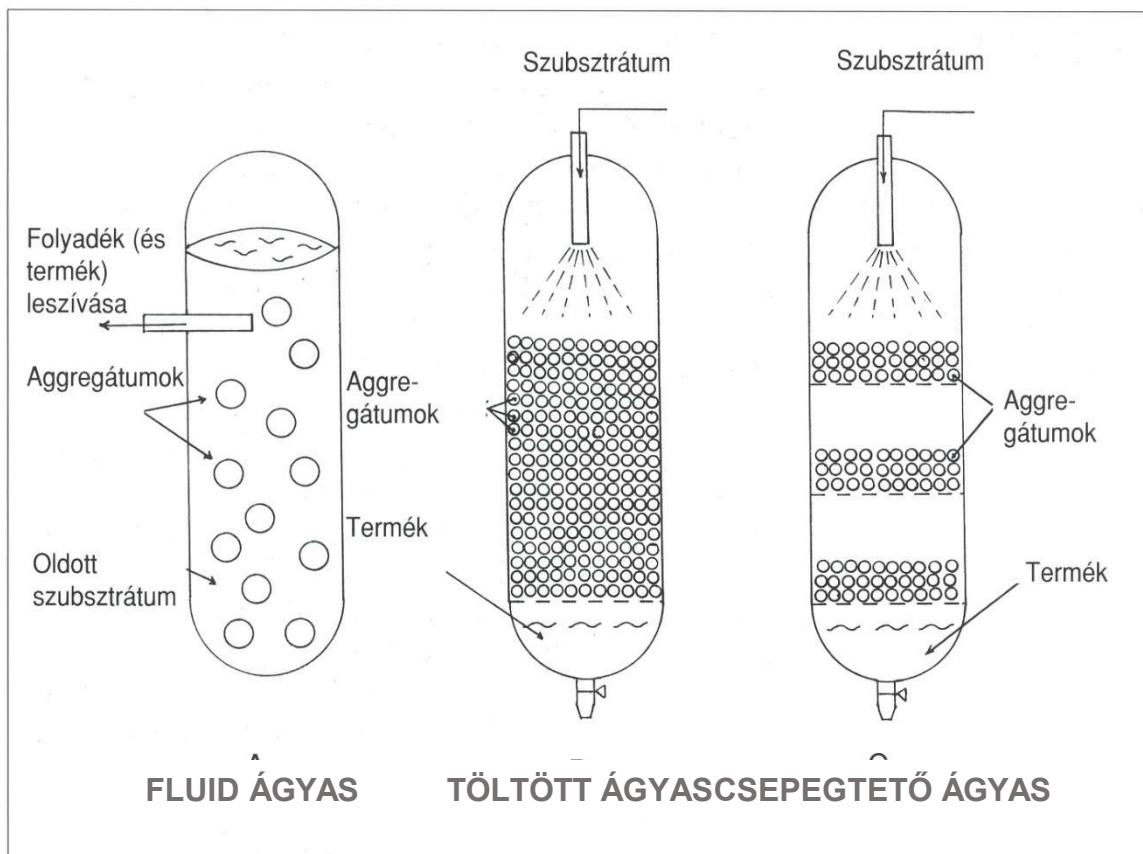


A folyékony fázisú bioreaktorok típusai

Forrás: Heszky és mtsai., 2005

Vegyes fázisú bioreaktorok:

- folyékony fázis: oldott szubsztrátum
- szilárd fázis: aggregátumok - hordozóanyagok, a rajtuk rögzített mikrobákkal, enzimekkel, egyéb biológiailag aktív anyagokkal



A vegyesfázisú bioreaktorok típusai

Forrás: Heszký és mtsai., 2005

A mikroba eredetű termékek feldolgozása:

- rövid és egyszerű lépések szükségesek
- a sejtek feltárása (elsősorban sejten belül keletkező termékek enzimek esetén)
- a termék (mikrobasejt, elsődleges/másodlagos anyagcseretermékek stb.) elkülönítése:
 - centrifugálás
 - szűrés
 - szitálás
- töményítés
- a mikrobiológiai termék kiserelése:
 - antibiotikumok, egyéb gyógyszerkészítmények, egyes élelmiszer adalékok: kristályosítva
 - fehérjék: szuszpenzió, por (+ stabilizátor), hűtött tárolás

- gyógyászati készítmények, diagnosztikumok, élő mikroorganizmusok:
lioofilizálva, tárolás szobahőmérsékleten



Bioreaktorok

Forrás: <http://cotterbrothers.com/envira/bioreactors/bioreactor-4000I/> és <http://phct-biotechnology.ru/novosti-i-press-relizy/infors-ht-predstavlyaet-novyy-nastolnyj-bioreaktor-minifors-2/>

3.3. Mikroorganizmus termékek

A bioreaktorban előállított mikroorganizmus eredetű termékek általában primer metabolitok, szekunder metabolitok, illetve enzimek.

Alkoholok, ketonok:

- etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) - cukornád, cirok, burgonya, manióka, cukorrépa-feldolgozás melléktermékeiből
- korábban: butanol, izopropanol, aceton, glicerin előállítása is

Szerves savak:

- anaerob (glükóz tökéletlen lebomlása) és aerob (a szubsztrát tökéletes oxidációja gátolt) mikrobákkal
- citromsav (*Aspergillus niger*) - keményítő, búzabor, cukorszirup, melasz alapanyagból
- ecetsav (*Acetobacter spp.*)
- glükonsav (*Aspergillus niger*, *Gluconobacter oxydans*)
- tejsav (pl. *Lactobacillus spp.*)

Aminosavak:

- felhasználás: ízjavítók, antioxidánsok, beltartalom, takarmányok feljavítása

- L-glutaminsav (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium divaricatum*)
- lizin (*Corynebacterium glutamicum*)
- triptofán (*E. coli*)

Mikrobaeredetű poliszacharidok, lipidek:

- általános felhasználás: tartalék tápanyag, védő funkció
- xantán (*Xanthomonas campestris*): erős viszkozitás; felhasználás: formajavító polimer, stabilizáló vegyület
- dextránok (*Leuconostoc mesenteroides*): nagymennyiségű víz abszorpciója; felhasználás: vérplazma kiegészítése, sebkezelő kenőcsök stb.
- alginátok (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*): jégkrémek formatartása, gyökerek kiszáradásának gátlása, mesterséges mag bevonata
- gellan (*Pseudomonas elodea*): formatartó gél készítése (kis koncentrációban is)
- pullulán (*Aureobasidium pullulans*): erős rostok, fóliák készítése
- többszörösen telítetlen zsírsavak:
 - felhasználás: gyógyszerek, tápszerek kiegészítése
 - arachidonsav (*Mortierella alpina*)
 - γ -linolénsav (*Mucor circinelloides*)
- poli-hidroxibutirát, PHB (*Ralstonia eutropha*)

Enzimek:

- általános felhasználás: élelmiszeripar, mosószerek, felszintetikus antibiotikumok gyártása, növényi szerves anyagok bontása (környezetvédelem, energiatermelés)
- termeltetés hatékonyan transzformálható, heterológ gazdaszervezetekkel is (az eredeti, nehezen tenyészthető helyett)
- amilázok (pl. *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*): pl. glükóz előállítása keményítőből, erjeszthetőség javítása, ruhák formatartásának javítása, papíripar stb.
- glükóz-izomeráz (pl. *Bacillus coagulans*, *Streptomyces albus*): glükózból fruktóz előállítása (édesebb!)
- proteázok (*Bacillus spp.*): mosószerek, sajtgyártás
- pektinázok (*Aspergillus spp.*): üdítőitalgyártás
- lipázok (*Micrococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*): emésztést segítő adalékok, sajtgyártás
- laktázok (pl. *Aspergillus spp.*): diétás tejkészítmények, takarmány-kiegészítők

- penicillin-acilázok (*E. coli*): félszintetikus antibiotikumok

Hormonhatású anyagok:

- gibberellinek (*Fusarium proliferatum*/*Gibberella fujikuroi*)

Vitaminok:

- aszkorbinsav (*Acetobacter spp.*, *Erwinia spp.*)
- kobalamin, B12-vitamin (*Propionibacterium spp.*)
- riboflavin, B2-vitamin (pl. *Bacillus subtilis*)
- karotinok (*Phaffia rhodozyma*)

Bakteriocinek:

- baktériumok által termelt peptidek, a termelővel közeli rokon fajokra hatnak
- agrocin (*Agrobacterium radiobacter*)
- nizin (*Lactobacillus lactis*)

Alkaloidok:

- általában növények termelik
- anyarozs-alkaloidok (*Claviceps purpurea*): méh-összehúzó hatás, keringési zavarok ellen

Élesztő termelés:

- melasz szénforrás, ammóniumsók, foszforsav, Mg-szulfát (+ biotin); aerob, utántöltéses kádtenyészet
- *Saccharomyces cerevisiae*

Anyagok kemoenzimes szintézise:

- enzimikus szintézis és kémiai eljárások (pl. polimerizáció) kombinációja
- pl. szénhidrátok előállítása

Antibiotikumok:

- penicillinek, ampicillin (*Penicillium spp.*) - felfedező: Fleming (1929)
- cefalosporinok (*Acremonium chrysogenum*)
- peptid- és aminosav-antibiotikumok:
 - cikloszerin (*Streptomyces spp.*)
 - aktinomicinek (*Streptomyces spp.*)
 - bacitracin (*Bacillus licheniformis*)
 - polimixin (*Bacillus polymyxa*)

- bleomicinek (*Streptomyces verticillius*)
- aminoglükozidok:
 - sztreptomycin (*Streptomyces griseus*)
 - kanamicin (*Streptomyces kanamyceticus*)
 - gentamicin (*Micromonospora purpurea*)
- tetraciklinek (*Streptomyces spp.*)
- makrolidek, polién-makrolidek:
 - eritromicin (*Streptomyces hasltedii*)
 - amfotericin B (*Streptomyces nodosus*)
 - nisztatinok (*Streptomyces noursei*)
 - rifampicin

Rekombináns DNS technológiával előállított fehérjék és felhasználásuk
(Heszky és mtsai., 2005 nyomán)

Fehérje	Felhasználás
DNáz	cisztás fibrózis kezelése
epidermisz növekedési faktor	sebek, hámsérülések kezelése
eritropoetin	vérszegénység, vérképzési zavarok kezelése
follikulusz stimuláló hormon (FSH)	szaporodásbiológiai rendellenességek kezelése
hepatitisz B vakcina	hepatitisz elleni védőoltás
interferon (alfa)	hepatitisz, daganatos betegségek terápiája
interferon (béta)	<i>sclerosis multiplex</i> kezelése
interleukinok (1, 2, 3)	immunológiai rendellenességek, daganatos megbetegedések kezelése
inzulin	<i>diabetes</i> kezelése
kanyaró vakcina	védőoltás kanyaró ellen
lizozim	gyulladások megelőzése, kezelése
rabies vírus vakcina	vesztség elleni védőoltás
relaxin	vajúdás segítése
szérum albumin	vérplazma kiegészítése
szomatosztatin	<i>acromegalia</i> kezelése
tumor nekrosis faktor	daganatos betegségek, <i>arthritis</i> kezelése
véralvadási faktor VIII	hemofília kezelése

3.4. Mikrobák közvetlen hasznosítása a fenntartható mezőgazdasági termelésben

A mikrobákat tartalmazó, kereskedelemben is kapható mezőgazdasági felhasználásra előállított készítményeket általában komplex – tápanyag-feltáró/mobilizáló, peszticid stb. – hatással kínálják, gyakran „növénykondicionáló” megnevezéssel. A komposzt és siló oltóanyagok, növényi maradványok lebontását segítő készítmények speciális felhasználási céljuknak megfelelően kerülnek forgalmazásra.

3.4.1. A növénykondicionálóknak használt legfontosabb mikroba csoportok és szerepük

Növényi növekedést serkentő gyökérbaktériumok (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR):

- asszociatív nitrogén-kötés (pl. *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella* spp.)
- szimbióta nitrogénkötés (pl. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* spp.)
- tápanyagok (elsősorban P) oldhatóvá, hozzáférhetővé tétele (pl. *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Rhizobium* spp.)
- mikorrhiza (gomba-növény szimbiózis) funkciók serkentése
- etiléntermelés szabályozása a gyökérben
- növényi hormonok (pl. indol-ecetsav) termelése
- szárazság-, só-, nehézfém-stressz elleni tolerancia javítása
- biopeszticid hatás:
 - közvetlen kompetíció: „védőburok” a gyökérzet körül
 - antibiózis: antibiotikumok, toxinok termelése
 - sziderofórok (Fe^{3+} -kötő kelátképző) termelése, kompetíció a vasért (vas-elvonás)
 - a célszervezet megtámadása ragadozóként
 - a célszervezet parazitálása
 - indukált szisztémikus rezisztencia (ISR) kialakítása (sejtfalak megerősítése; kitináz, peroxidázok, polifenol-oxidáz, fitoalexinek termelése; SRG expressziója stb.)
- a gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott PGPR fajok:
 - *Bacillus subtilis*- antibiotikum termelés, kórtünet-csökkentő hatása (több gombapatogén ellen a növény védettségének fokozása)
 - *Bacillus megaterium*- foszfát-szolubilizálás, auxin-, sziderofór- és antibiotikum-termelő képesség

Növényi növekedést serkentő gombák (Plant Growth Promoting Fungi - PGPF):

- tápanyagok oldhatóvá, illetve hozzáférhetővé tétele
- másodlagos metabolitok (növényi hormonok: auxinok, citokininek, gibberellinek, etilén stb.) termelése
- biopeszticid hatás:
 - antibiózis (antibiotikum termelés)
 - sziderofór termelés
 - mikoparazitizmus (gombafonalak parazitálása)
 - az élettér kolonizálása más (kórokozó) gombák előtt (szaprobionta kompetíció)
 - káros hatású oxidatív anyagok, más mikrobák által termelt toxinok, enzimek közömbösítése, lebontása
 - indukált, szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR- együttműködés a PGPR által indukált ISR-rel), illetve nem specifikus immunválasz kiváltása
- a gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott PGPF nemzetségek:
 - *Aspergillus*
 - *Penicillium*
 - *Fusarium*
 - *Phoma*
 - *Trichoderma*

A PGPR és PGPF biopeszticid alkalmazásának fontosabb kérdései:

- célszervezet-spektrum
- kijuttatás utáni tartós életben maradás
- különböző stratégiájú fajok keverékének alkalmazhatósága
- kompetíció az antagonisták között

Az indukált szisztémikus rezisztencia (ISR) és a szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) közötti különbség:

- ISR: növényi növekedést serkentő, nem patogén PGPR törzsekkel kiváltható szisztémikus (az egész növényre kiterjedő) rezisztencia; közvetítésében elsődleges a jazmonátok és az etilén szerepe

- SAR: indukálható rezisztencia-mechanizmus, amikor egy elsődleges fertőzést (immunizáció) követően a növény (annak nem fertőzött részei is) rezisztenciát mutat a kórokozók széles körével szemben; az indukált rezisztenciával rendelkező növényi szerv fokozott készültségi állapotban („priming”) van: gyorsabban és/vagy nagyobb mértékben képes reagálni egy második fertőzésre; közvetítésében a szalicilsav (SA) szerepe elsődleges

3.4.2. Biotrágyák

A kereskedelembe elterjedt biotrágya készítmények többsége, a tápanyagokat mobilizáló, azok elérhetőségét javító szerep mellett, biopeszticid és általános „növénykondicionáló” hatással is rendelkezik. A biotrágyák, az alkalmazott mikroorganizmusoktól függően, általában a nitrogén-és/vagy a foszfor-ellátottság javításához járulnak hozzá.

Fontosabb, biotrágyaként hasznosítható mikroorganizmusok

Mikroorganizmus	Alkalmazás
Nitrogén biotrágyák	
<i>Rhizobium spp.</i> (szimbióta N-kötő)	hüvelyesek, olajosmagvú hüvelyesek, takarmánypillangósok, fatermetű pillangósok: árvamimóza (<i>Leucaena spp.</i>) (0,026-20 kg N/ha/óra)
<i>Azotobacter spp.</i> (nem szimbióta N-kötő)	búza, kukorica, cirok, rizs, köles, cukornád, gyapot, zöldségfélék
<i>Azospirillum spp.</i> (asszociáció fűfélékkel)	rizs, búza, zöldségfélék, cukornád (10-20 kg N/ha/év)
Cianobaktériumok (kék-zöld algák) (fototrófok)	árasztott rizs (25 kg N/ha/év)
<i>Azolla spp.</i> (moszatpáfrányok) (szimbiózis <i>Anabaena azollae</i> -val)	kizárólag árasztott rizs (30-100 kg N/ha/év)
Foszfát biotrágyák	
Foszfátot oldhatóvá tevő mikroorganizmusok (<i>Pseudomonas, Bacillus, Penicillium, Aspergillus spp.</i>)	minden növényfaj (a talajban kötött P 50-60%-ának oldhatóvá tétele)
Foszfátot mobilizáló mikro-organizmusok (vezikulo-arbuszkulumos mikorrhizák – VAM: <i>Glomus</i> és <i>Gigaspora spp.</i>)	minden növényfaj, különösen mezőgazdasági, erdészeti, kertészeti fajok (a talajban kötött P 60%-ának oldhatóvá tétele)

3.4.3. Bioherbicidek

A bioherbicidek előnyei:

- alacsony költség
- gazdaspecifikus
- nem környezetszennyező
- speciális alkalmazási területek (kémiai herbicidek helyett):
 - dísznövények, zöldségfélék
 - közterületek
 - házikertek
 - vizek
- fenntartható: ökológiai egyensúly a kórokozó és a gazdaszervezet között
- térben magától terjedhet
- kémiai herbicidekhez hasonló kijuttatási módok lehetségesek

A bioherbicidek hátrányai, alkalmazásuk korlátai, kockázatai:

- gazdaspecifikusság miatt nem éri meg a gyártónak megoldás: széles gazdaspektrumú kórokozó nem szaporodó, auxotróf stb. mutánsai (pl. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*)
- biztonságosság tesztelése hosszú, költséges
- speciális tárolási feltételek szükségesek (élő szervezet!)
- technológiába való beilleszthetőség kérdéses
- más herbiciddel együtt való alkalmazhatóság kérdéses
- jelenleg: természetellenesen magas inokulum dózisok megoldás: dózisok csökkentése
- hosszabb idő a várt hatás eléréséig
- hatása erősen függ a környezeti tényezőktől
- horizontális génátvitel a kórokozók között
- virulencia elvesztése
- rezisztens gyom-biotípusok kialakulása

Bioherbicidek és alkalmazásuk

Bioágens	Célnövény, alkalmazás
Baktérium alapú bioherbicidek	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Pueraria lobata</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	<i>Cirsium arvense</i> , <i>Ambrosia artemisiifolia</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poae</i>	<i>Poa annua</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poannua</i>	<i>Poa annua</i> ssp. <i>annua</i>
Gomba alapú bioherbicidek	
<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i> citrus ültetvények (USA)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>	<i>Aeschynomene virginica</i> rizs, szója (USA)
<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>malvae</i>	<i>Malva pusilla</i> búza, len, lencse (Kanada)
<i>Puccinia canaliculata</i>	<i>Cyperus esculentus</i> (USA)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus</i> és <i>Populus</i> spp. újrasarjadzása ellen (Hollandia, Kanada)
<i>Cylindrobasidium laeve</i>	<i>Acacia mearnsii</i> újrasarjadzásának gátlása (Dél- Afrika)
<i>Mycoleptodiscus terrestris</i>	<i>Myriophyllum spicatum</i> csatornák gyommentesítése (USA)
<i>Alternaria cassiae</i>	<i>Cassia obtusifolia</i> , <i>C. occidentalis</i> szója (USA)

3.4.4. Biobaktericidek és biofungicidek

A biobaktericid mikrobatorzsek számos esetben komplex hatással rendelkeznek, a baktériumok mellett gombák és nematódák ellen is hatásosak lehetnek, míg a biofungicideknél is legtöbbször megjelenik a baktericid, és esetleg nematocid hatás. A biopeszticid hatások kiegészülhetnek tápanyagfeltáró és mobilizáló tulajdonságokkal.

Biobaktericid hatású mikrobák (egyéb biopeszticid és biotrágya hatásuk nincs feltüntetve)

Biokontroll szervezet	Célszervezet	Alkalmazás
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84 (K1026)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	gyümölcsfák, díszfák
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	<i>Erwinia amylovora</i>	almatermésűek, csonthéjasok, szamóca
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> , <i>Pectobacterium caratovororum</i>	burgonya, zöldségfélék
<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>P. viridiflava</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>X. fragariae</i> , <i>Erwinia spp.</i>	zöldség-, gyümölcsfélék, gyepfüvek, dísznövények, díszfák
<i>Bacillus subtilis</i> BD170	<i>Erwinia amylovora</i>	almatermésűek

Biofungicid hatású mikrobák (egyéb biopeszticid hatásuk nincs feltüntetve)

Biokontroll szervezet	Célszervezet	Alkalmazás
Baktériumok		
<i>Ampelomyces quisqualis</i> Q-10	lisztharmat	alma-, tökfélék, szőlő, dísznövények, paradicsom
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>	dísznövények (virágos, levél, fásszárú)
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Phomopsis spp.</i> , <i>Botrytis spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i>	szántóföldi, dísz-, zöldségnövények
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	<i>Drechslera spp.</i> , <i>Ustilago spp.</i> , <i>Tilletia caries</i>	árpa, zab, búza
<i>Pseudomonas putida</i> WCS358	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	len
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	reték

<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Phomopsis spp.</i> , <i>Botrytis spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i>	szántóföldi, dísz-, zöldségnövények
Baktériumok		
<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia spp.</i>	napraforgó, repce
<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	<i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Sclerotinia spp.</i> , <i>Thielaviopsis spp.</i>	fák, bokrok, palánták, dísznövények, káposzta, paradicsom
<i>Gliocladium/Trichoderma virens</i> GL -21	<i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>	dísz- és élelmiszer- növények
<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Verticillium dahliae</i>	uborka, paradicsom, egyéb zöldségfélék, cukorrépa
<i>Cryphonectria parasitica</i> hipovirulens törzs	<i>Cryphonectria parasitica</i>	gesztenye

3.4.5. Bioinszekticidek

Bacillus thuringiensis

A bioinszekticidek közül legnagyobb jelentősége a *Bacillus thuringiensis* endotoxinjaira alapozott technológiáknak van. A baktérium spóráit és toxinjait tartalmazó készítmények a biogazdálkodásban használatosak, ugyanakkor a toxin génekkel transzformált és azokat kifejező, rovarrezisztens növények a GMO-k fontos csoportját alkotják (ld. Növényi géntechnológia).

A *Bacillus thuringiensis* által termelt toxincsoportok:

- vízoldékony α -exotoxin (= lecitináz C): nem hőstabil
- β -exotoxin: hőstabil adenin-nukleotid, az RNS-polimeráz gátlója
- δ -endotoxinok (= MVP): Cry toxinok

A Cry toxinok hatásmechanizmusa:

1. parasporális test képződése a sporuláció idején, kristályosodásra képes fehérjékkel
2. kapcsolódás speciális fehérje-receptorokhoz a rovarok közepbelében
3. aktiválódás a gazdaszervezet proteázai által

A természetes eredetű Cry-toxinok

Cry toxin	Aktivitási terület	Nagyság (kDa)
CryI	Lepidoptera	130-140
CryII	Lepidoptera és Diptera	70-73
CryIII	Coleoptera	67-75
CryIV	Diptera	70-140

A Cry toxinok száma meghaladja a 70-et, több közülük transzgénikus eredetű. Néhány transzgénikus törzs (helyspecifikus rekombinációval minden idegen elem eltávolítva, így a „végeredmény” már nem tekinthető transzgénikusnak):

- EG7673: *cry3Bb* és *cry3Aa* gén - burgonyabogár ellen is
- EG7841: mutáns *cryIC* gén - nagyobb toxicitás répamoly (*Spodoptera exygu*a) ellen
- EG7826: kiméra *cryIAc/IF* gén - nagyobb toxicitás őszi moly (*S. frugiperda*) ellen

Beauveria bassiana

A *Beauveria bassiana* hiperparazita talajlakó gomba, ami az ízeltlábúak széles körét támadja meg, fehér mészkor betegséget okozva.

Mezőgazdasági hasznosítása során elsősorban rovarlárvák ritkítására, irtására alkalmazzák, pl. a *B.b.* BB1 (NCAIM 128/2010) törzset. A forgalmazott készítmények a gomba spóráit és micéliumait tartalmazzák.

3.4.6. A mikrobák további mezőgazdasági alkalmazásai

Tarlómaradványok bontása mikrobákkal

A tarlóbontó készítmények mikroba törzsei – egyebek mellett – elősegítik a tarlómaradványban lévő tápanyagok növény számára felvehetővé válását és a humuszképződés folyamatát, ezzel növelve a talaj szervesanyag-tartalmát, a tarlómaradványok elbontása révén csökkentik az azokon áttelelő kórokozók és kártevők mennyiségét

Felhasznált mikrobák: pl. *Bacillus circulans*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium* törzsek optimalizált arányú keveréke

Komposztálás

A komposztálás lényege a szerves hulladékok lebontása, aminek eredménye szén-dioxid-, víz-, hő- és humusztermelés.

A komposztálás három szakasza:

1. mezofil fázis néhány napig
2. termofil fázis (először 80 °C-on baktériumok, gombák, majd 40-60 °C-on gombák), néhány naptól több hónapig
3. több hónapos lehűlés, érés, másodlagos mezofil mikroorganizmusok működése

Siló oltóanyagok

A silók erjedési folyamatába történő beavatkozás tejsavtermelő baktériumokkal történik, ami által a befolyásolható veszteségek (lécsurgás, erjedési hibák, utóerjedés - 20-40%) minimálisra csökkenhetnek.

Az oltóanyagok alkalmazásával, például a kukoricaszilázs többlet energiatartalma megnő azáltal, hogy az erjedési folyamat lerövidítésével kevesebb az energiafelhasználás.

Felhasznált mikrobák: pl. *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*

3.5. Környezetvédelem és energiatermelés biotechnológiai módszerekkel

E két alkalmazási terület csak érintőlegesen tartozik jelen jegyzet témakörei közé, ezért csak vázlatosan tárgyaljuk.

Környezetvédelem biotechnológiai módszerekkel

Szennyvíztisztítás

- a szennyvíz másodlagos kezelése, anaerob és/vagy aerob lebontás útján

Bioremediáció

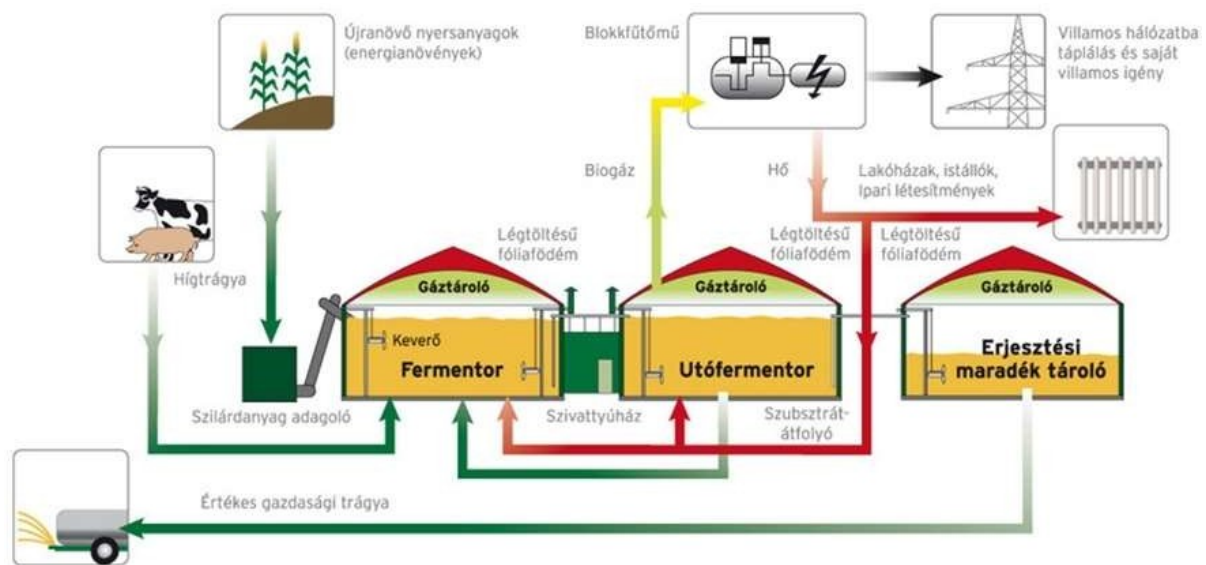
- radioaktív hulladék, kőolajszármazékok, növényvédőszer okozta szennyezések közömbösítése

Energiatermelés biotechnológiai módszerekkel

Biogáz termelés

A biogáz-előállítás főbb lépései:

- alapanyag: hígtrágya, szennyvíz, mezőgazdasági hulladékok stb.
- vegyes mikroflóra: polimerek aprítása hidrolízissel
- acetogén aerob baktériumok: ecetsav előállítása
- acetotróf baktériumok (*Methanosarcina spp.*, *Methanothrix spp.*): metán előállítása
- termék: metán



A biogáz előállítás folyamata

Forrás: <http://www.biogazunio.hu/a-biogaz-jelentosege-es-felhasznalasi-lehetosege/>

A biogáz termelés alapanyagai: állati trágyák, mezőgazdasági melléktermékek, szennyvíziszap, kommunális hulladék stb.

A biogáz termelés hatékonysága: 40-60 m³/tonna alapanyag

A biogáz összetétele: 55-60% metán, 40-45 % széndioxid

Bioetanol előállítása (etanol fermentáció)

A bioetanol-előállítás főbb lépései:

- keményítő magvas vagy gumós terményekből (keményítő gélesítése, enzimes lebontása), illetve lignocellulóz (lignin lebontása aerob úton, oxidációval, utána a cellulóz bontása) –termék: egyszerű cukrok

- egyszerű cukrok kád- vagy folyamatos fermentációja (*Saccharomyces cerevisiae*) –
termék: etanol (9-11%)
- desztillálás – termék: etanol >95%

4. ALGA BIOTECHNOLÓGIA

Az alga biotechnológia a mikroalgák felhasználásán alapul. A mikroalga megnevezés mögött adott esetben a mikroszkópikus méretű eukarióta algák és az oxigéntermelő, fotoszintetikus baktériumok, a cianobaktériumok egyaránt értendők. A mikroalgáktöbbnyire vízben élnek, de a biotechnológia szempontjából figyelemre méltóak a különböző talajtípusok felszínén megtalálható talajalgák is. Utóbbiak, a vízi mikroalgákéhoz képest szélsőségesebb és gyorsanváltozó környezet kínálja állandó stresszhelyzethez anyagcseréjükkel alkalmazkodnak vagy bioaktív anyagok termelésével válaszolnak, így a biotechnológia számára értékesebbek lehetnek, mint a vízi mikroalgák. A biotechnológiai hasznosítás alapját jelenti, hogy a mikroalgák szaporodásuk lassuló szakaszában másodlagos anyagcseretermékeket, többek között szerves savakat, szénhidrátokat, aminosavakat, peptideket, vitaminokat, növekedés-szabályozó anyagokat, antibiotikumokat, enzimeket és toxikus vegyületeket termelnek.

Az alga biotechnológiában napjainkban leggyakrabban alkalmazott fajok:

- *Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Chlamydomonas* spp., *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis oculata*



Alga bioreaktor egysejt fehérje (SCP) előállítására

Forrás: <http://www.treehugger.com/20090514-algae-bioreactor.jpg>

Az algák biotechnológiai jellegű hasznosításának fontosabb területei:

- növény-kondicionálás: hormontermelés, biopeszticid hatások (elicitor, közvetlen károsítás stb.), tápanyag-ellátás
- többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), poliszacharidok, antioxidánsok, természetes színyanyagok, biológiailag aktív anyagok, valamint kozmetikai, élelmiszeripari és gyógyszeripari alapanyagok
- CO₂-megkötésre alapozott biomassza-produkció: 100 t/év CO₂ megkötésével kb. 50 t sz.a./ha/év termelése, ebből 10-15 t bioüzemanyag és 20-30% fehérjetartalmú biomassza maradék kinyerése
- biodízel (20-30%), biogáz előállítás

5. NÖVÉNYI BIOTECHNOLÓGIA

Növényi biotechnológia:

- a növények szaporodásának (reprodukció biotechnikái), valamint genetikai programjának (géntechnológia) megváltoztatása és az így kialakított új vagy módosított növényfajták képességeinek technológiai alkalmazása

Biológiai oldal:

- szaporodásbiológiai és/vagy genetikai módosítás

Módszerei, technikái:

- növényi sejt- és szövettenyésztés
- ivaros szaporodás biotechnikái
- ivartalan szaporodás biotechnikái
- molekuláris genetikai és genomikai módszerek
- molekuláris növénynemesítés módszerei
- molekuláris transzformáció módszerei (génsebészet, géntechnológia)
- transzgénikus növények, géntechnológiai stratégiák

Technológiai oldal:

- új fajták előállítása és termesztése

Módszerei, technikái:

- *in vitro* növénynemesítés:
 - klasszikus növénynemesítés + *in vitro* sejt-/szövettenyésztési technikák
- transzgénikus növénynemesítés:
 - hagyományos fajta módosítása géntechnológiai módszerekkel
- molekuláris növénynemesítés:
 - klasszikus nemesítés + molekuláris módszerek, markerek

A növényi biotechnológia eredményeinek további felhasználási területei:

- vetőmag és szaporítóanyag előállítás
- növénytermelés

- növényvédelem
- növényi sejtfermentáció

5.1. Növényi sejt- és szövettenyésztés

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.

A kiinduló növényanyagtól és a tenyésztés céljától függően a növényi sejt- és szövettenyészeteknek számos formája ismert, melyek három fő kategóriába sorolhatók.

5.1.1. Szomatikus sejttenyésztésen alapuló technikák

Az élővilágban (szinte) egyedülállóan, a növények esetében lehetséges egyetlen sejtből intakt szervezet regenerálása. Ehhez általában szükséges a kiinduló explantátum sejtjeiben (vagy a merisztémák által létrehozott utódsejtekben) a totipotencia visszaállítása, ami alapját jelenti a sejtek, szövetek, szervek fokozatosan végbemenő differenciálódásának.

A szomatikus sejtenyészetek alapja egy növény - sejt - növény rendszer kialakítása:

1. Sejtkultúrák létesítése

Az izolált, merisztémát tartalmazó növényi szövet (pl. éretlen embrió, levélnyél, levélalap) differenciálódott sejtjei totipotenssé válnak (dedifferenciálódnak) az indukciós táptalajban lévő növényi hormonok (auxinok, citokininok stb.; leggyakrabban: auxin-hatású 2,4-D) hatására, kialakul a kallusz (osztódó differenciálatlan sejtek tömege).

A kalluszok folyékony tápoldatban történő rázatásával különálló totipotens sejtekből, sejtaggregátumokból álló sejtszuspenzió jön létre. A következő pontban említett protoplasztok mellett, a mesterséges mag-előállítás és a növényi bioreaktorok alapját jelentik.

A szuszpenziós sejtek sejtfalának eltávolítása (enzimes emésztés: celluláz, pektináz) eredményeként jönnek létre a protoplasztok. Protoplasztok előállíthatók más úton is, például levél mezofillum sejtek falának leemésztésével. A protoplasztokkal kapcsolatos általános probléma a gyakran nehézkes növényregenerálás.

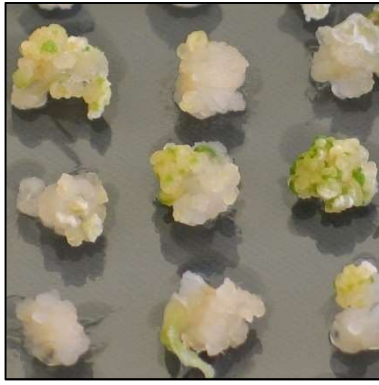
2. Sejt- és molekuláris genetikai beavatkozások (ld. lent)

3. Növényregeneráció/Szerv-regeneráció

A sejtek újra-differenciálódásának (és így az egyedfejlődésnek) indukciója a hormon(ok) fokozatos megvonásával, ami alacsonyabb hormon-koncentrációjú táptalaj(ok)ra történő áthelyezéssel érhető el.

Az *in vitro* morfogenezis alternatív útjai:

- organogenezis: szervek (pl. leveles hajtás) differenciálódása; hajtás regenerációja esetén gyökereztető (pl. naftil-ecetsavat vagy indol-vajsavat tartalmazó) táptalajra helyezve teljes növényregenerálható; gyökerek regenerációja esetén hajtásfejlődés általában nem indukálható
- embriogenezis: a tenyésztett sejtek zigótához hasonló osztódásának eredményeként
 - a kallusz felületén általában porcelánfehér, kemény struktúraként megfigyelhető, felépítésükben a zigóta-eredetű embriókhoz hasonló - szomatikus embriók jönnek létre; a szomatikus embriók (embrioidok) regeneráló táptalajon történő „csíráztatásával” intakt növények regenerálhatók



Búza kallusok, embrioidok és regenerálódó növények

Forrás: saját



Növényi bioreaktorok

(Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, Castelo Branco, Portugália)

Forrás: saját

A sejt- és molekuláris genetikai beavatkozások fontosabb lehetőségei szomatikus sejttenyészetekben:

- szomaklón sejtek izolálása, szomaklón növények előállítása
 - szomaklonális variabilitás: a növény testi sejtjeiből létesített *in vitro* kultúrákból regenerált növények ivaros utódai (szomaklónok) közötti (genetikailag determinált) különbség
- mutáns sejtek izolálása, mutáns növények előállítása
 - a mutagenézis *in vivo* és *in vitro*s történhet, a mutáns sejtek izolálása, a keresett mutánsok jellegének megfelelő szelekciós körülmények biztosítása mellett, *in vitro* történik
- protoplasztok izolálása (ld. fent), protoklón (protoplaszt-eredetű szomaklón) növények előállítása
 - a protoplaszt-alapú módszerek gyakorlati jelentősége az utóbbi évtizedekben rendkívüli mértékben lecsökkent, részben a módszer kidolgozatlanságai és

nehézségei (pl. regeneráció), de elsősorban a géntechnológia előtörése és rutinszerűvé válása miatt

- protoplasztok fúziója, hibrid sejtek, szomatikus hibrid növények előállítása
 - általában valamilyen biotikus vagy abiotikus rezisztencia tulajdonság átvitelére alkalmazták, a géntechnológia elterjedését megelőző időkben; alkalmazhatósága korlátozott, azon fajok körére terjed ki, ahol a protoplaszt – növény rendszer jól működik (pl. *Nicotiana*, *Brassica*, *Solanum* fajok)
 - speciális esetet jelentenek a cibridek, melyek az egyik fúziós partner sejtmagjával és a partnerek kevert citoplazmájával, vagy a másik szülő citoplazmájával rendelkeznek; előállításuk célja a citoplazmában kódolt tulajdonságok (pl. herbicid rezisztencia, citoplazmás hímszterilitás) átvitele (volt)
- szomatikus embriogenezis indukciója sejtszuspenzióban, szomatikusembriók, mesterséges magvak előállítása
 - a szomatikus embriogenezis sejtszuspenzióban nagy hatásfokkal indukálható, szinkronizált tenyészetekben lehetséges azonos fejlettségű embrioidok tömeges előállítása, melyek mesterséges magként kapszulázhatók (pl. Na-algináttal, Gelrite-tal), vetőszalagra is helyezhetők, üzemben ún. folyékony vetéssel is vethetők
- géntranszfer a szomatikus sejtekbe, transzgénikus növények előállítása
 - napjainkban a szomatikus sejt- és szövettenyészetek alkalmazásának egyik legjellemzőbb területe, részletes ismertetését ld. a növényi géntechnológia fejezetben
- szomatikus sejtek, embriók krioprezervációja, genetikai tartalékok megőrzése (genetikai változás nélkül)

5.1.2. Az *in vitro* klónozás biotechnikái

Az *in vitro* klónozás ivartalan szaporítást jelent – az új egyed nem zigótából, hanem testi (szomatikus) sejtekből alakul ki. Az utódok így genetikailag azonosak (klónok), egymástól és a kiinduló növénytől sem különböznek.

In vitro mikroszaporítás:

- a növény vegetatív szerveinek, szöveteinek, sejtjeinek tenyésztése steril, kontrollált körülmények között

- a kiinduló növényanyag (pl. hajtások hónaljtrügyei) merisztémáinak osztódása (megfelelő összetételű táptalajon) és a további tenyésztés eredményeként járulékos hajtások, illetve növények regenerálhatók
- a regeneránsok továbbosztatásával és tenyésztésével a kiinduló anyag gyakorlatilag korlátlan mértékű felszaporítása (klónozása) lehetséges, *in vitro* körülmények között

A mikroszaporítás főbb módszerei:

- hajtástenyészet:
merisztémák izolálása és tenyésztése, továbbszaporítás az *in vitro* fejlődő hajtásokkal, illetve hónaljtrügyeikkel
- járulékos hajtástenyészet:
kallusztenyészet kialakítása, továbbszaporítás a differenciálódó hajtásokkal vagy oldalhajtásokkal
- járulékos szervtenyészet:
primer hajtástenyészetben a szaporításban részt vevő járulékos szervek (pl. hagyma, gumó) differenciálódása
- szomatikus sejtszuspenzió:
szaporítás a sejtszuspenzióban kialakult szomatikus embriókkal (ld. fent)



***Cereus jamacaru* járulékos hajtásfejlődése és kiültetett regeneránsok**

Forrás: saját



Édesburgonya (*Ipomoea batatas*) járulékos hajtásfejlődése

Forrás: saját

Fő alkalmazási területek:

- Hagyományosan vegetatív úton szaporított növények nagy mennyiségben történő felszaporítása:
- Olyan, hagyományos vegetatív úton nehezen szaporítható genotípusok klónozása, melyeknél fontos a genetikai változások kizárása (pl. különleges dísnövény változatok).
- Kórokozó- (általában vírus-) mentes szaporítóanyag előállítása (pl. burgonya, gerbera). A kórokozó-mentesítés történhet *in vivo*, a tenyészetek indítása előtt, illetve az *in vitro* szakaszban
- *In vitro* génbank, vegetatív úton szaporított növények kórokozó-mentesített tenyészeiből.

5.1.3. A szexuális reprodukció biotechnikai

A szexuális reprodukció biotechnikái azok a sejt- és szövettenyésztési módszerek, melyekkel a növények ivaros szaporodási folyamatai befolyásolhatók vagy módosíthatók.

Ivarszervekre és szövetekre alapozott technikák:

- portok kultúra
- embrió tenyésztés
- ovárium (magház) kultúra

- ovulum (magkezdemény) kultúra
- virág kultúra
- endospermium kultúra
- nucellus tenyésztés
- *in vitro* megporzás/megtermékenyítés

Ivarsejtekre alapozott technikák:

- mikrospóra/pollen kultúra
- izolált gaméták tenyésztése
- ivarsejtek *in vitro* fúziója

A felsorolt módszerek közül a gyakorlatban az *in vitro* androgenezisen alapuló portok és mikrospóra/pollen tenyészeteknek van a legnagyobb jelentősége.

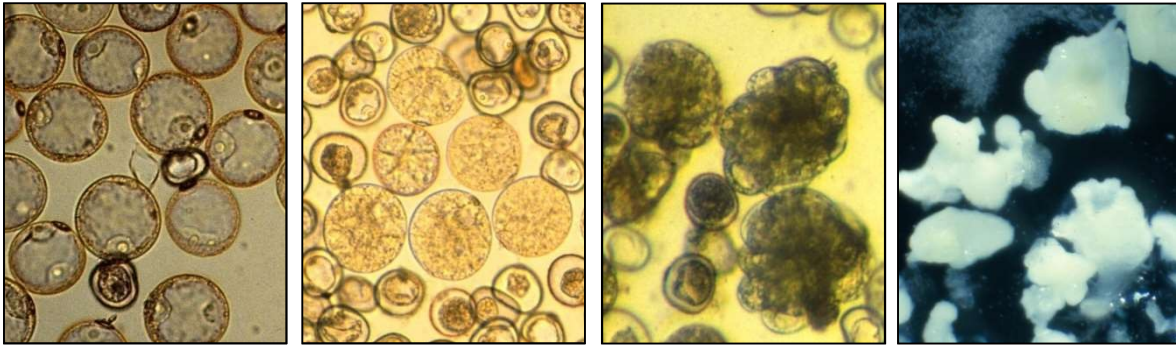
Androgenezis:

- az éretlen pollen (1 vagy 2 sejtmagvas mikrospóra) fejlődése nem a hímivarsejtek kialakulása, majd a pollentömlő hajtása felé halad tovább, hanem embriogenezis útján haploid embriók (embrioidok), majd intakt növények kialakulásához vezet; röviden: új egyed kifejlődése hím ivarsejtből
- a jelenség alapja:
 - a mikrosporogenezis meghatározott szakaszában (pázsitfűféléknél általában az egy sejtmagvas, vakuólumos, illetve a korai két sejtmagvas állapotban), a mikrospórák továbbfejlődése még nem determinált, meghatározott stresszek (hő, hormon, só, éheztetés stb.) hatására a gametofitáról a sporofita fejlődésre átállítható
 - androgenezis indukciója esetén a mikrospóra aszimmetrikus, míg a természetes gametofita fejlődés esetén szimmetrikus további osztódást mutat

Az androgenezissel vagy egyéb eljárásokkal (pl. bulbosum technika) történő haploid-előállítás menete, és felhasználása a nemesítésben:

- egy hasadó nemesítési anyag (F₂, illetve későbbi generációk) kiválasztott vonalaiban haploidok előállítása - a heterozigóta allélpárokból vagy csak a domináns vagy csak a recesszív allél lesz jelen adott lokuszon
- a kromoszómaszám spontán vagy kolchicin-kezelésre történő megduplázódása homozigóta megkettőzött haploid (doubled haploid, DH) vonalakat eredményez
- szelekció és a (hagyományos)növénynemesítés további lépései

- az egy nemzedék alatt homozigótává tett nemesítési anyagban a hasadás -elvileg - megszűnik, így a szelekció leegyszerűsödik, a fajtaelőállítás hagyományosan hosszú (kb. 10 év) folyamata kb. 3-4 évvel lerövidül



A tritikále androgenesis főbb fázisai mikrospóra tenyészetben
 Balról jobbra: frissen izoláltmikrospórák; osztódó mikrospórák a 7. napon;
 sejtaggregátumok a 14. napon; embrioidok a 35. napon

Forrás: saját

A nemesítői gyakorlatban szintén jelentőséggel bírnak az embrió tenyészetek:

- proembriókultúrák: általában távoli (faj-, nemzetség- stb.) keresztezések után a fejlődésnek induló, de egyéb okok (pl. endospermium hiánya) miatt kifejlődésre képtelen, elhaló zigotikus proembriók izolálása, komplex, a további fejlődést biztosító táptalajon való inkubálása
- érett-embrió kultúrák: teljesen kifejlett embriók izolálása a mag/termés beérése előtt, ezzel a generációváltás meggyorsítása, a csíryanugalom megszüntetése

5.2. Növényi géntechnológia

„A géntechnológia az örökítő anyag közvetlen molekuláris módosítását teszi lehetővé, a molekuláris biológia, sejtgenetika és szövettenyésztés különböző módszereit alkalmazza, melyek lehetővé teszik: a/ az egyestulajdonságokért felelős gének izolálását, jellemzését és felszaporítását (klónozását); aa/ a gazdaságilag jelentősgén olyan vektorba építését, mellyel lehetővé válhat a gén átvitele a recipiens sejtbe, biztosítja továbbá agenomba való integrációját és működését; aaa/ a genetikailag módosított sejtekből a kifejlett szervezet(transzgénikus növény) előállítását (regenerációját)” (Dudits és Heszy, 2014).

5.2.1. A transzgénikus növények előállítása

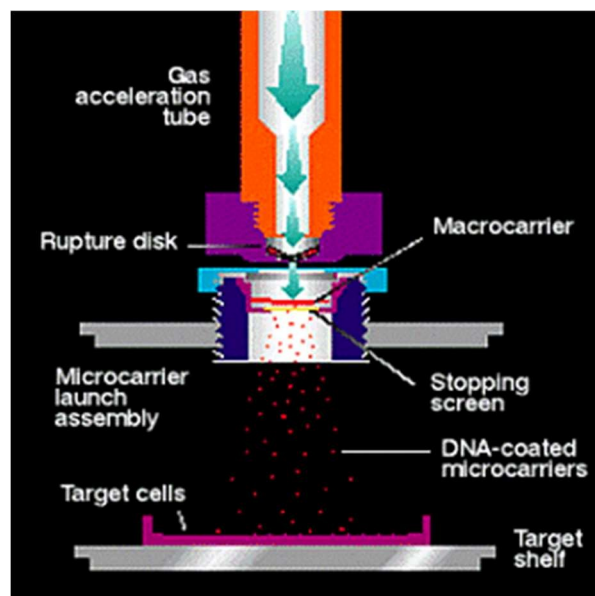
Az idegen gén bevitelének módszerei:

- direkt génbevitel

- az idegen gént tartalmazó konstrukciót (általában plazmid-vektor) közvetlenül a célszövet sejtjeibe juttatják be, stabil transzformáció esetén az beépül a sejtmag (esetleg kloroplasztisz, mitokondrium) DNS-ébe

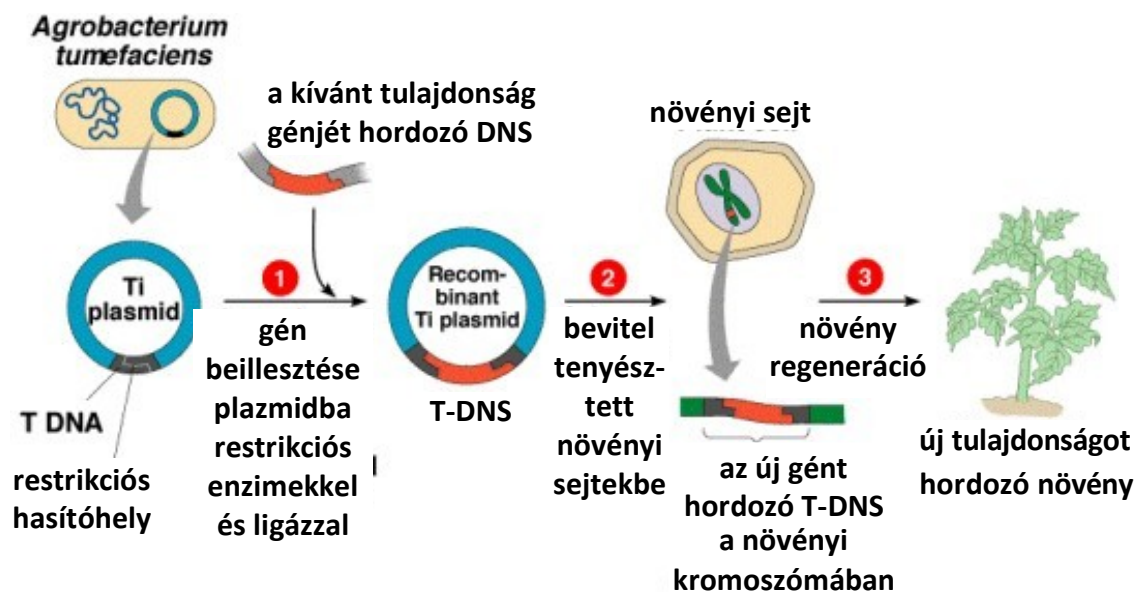
Módszerek:

- protoplastok transzformációja:
polietilén-glikol (PEG) kezelés vagy elektroporáció; a génpuska elterjedése előtt az egyszikűeknél alkalmazott módszer arra az ismeretre alapozva, hogy természetes körülmények között az *Agrobacterium* nem fertőzi az egyszikűeket
- génbevitel génpuskával (biolisztikus géntranszfer)
makrohordozóra felvitt arany (korábban volfram) részecskék (mikrohordozók) felületére rögzített vektor-konstrukciók felgyorsítása hélium (esetleg nitrogén) gáz makrohordozóra gyakorolt nyomásával, belövésük a vákuummal kitöltött térben elhelyezett célszövetbe; nem igényli speciális sejt- és szövettenyésztési rendszerek kidolgozását, az idegen gén akár intakt növényi szövetek, szervek sejtjeibe is belőhető



A PDS-1000/He génpuska és a biolisztikus génbevitel vázlata

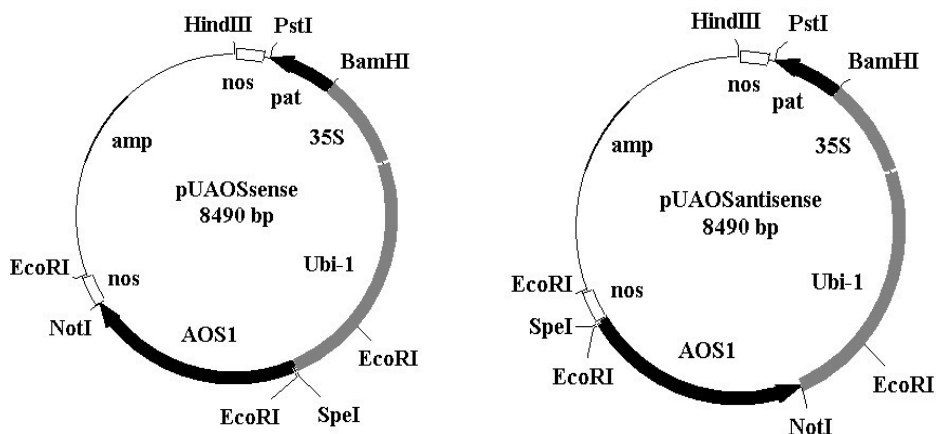
Forrás: saját és http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf



Az *Agrobacterium* által közvetített génbevitel vázlata

Forrás: <http://www.anselm.edu/>

- indirekt génbevitel (*Agrobacterium* által közvetített génbevitel):
 - az *Agrobacterium tumefaciens* tumort indukáló (Ti-) plazmidjába beépített génkonstrukció bevitele a (sok esetben intakt növényt jelentő) célszövetbe, az *Agrobacterium*-mal történő mesterséges fertőzés útján
 - a Ti-plazmid transzfer T-DNS-e (a határszekvenciái közé foglalt génkonstrukcióval) bejut a növényi sejtbe, és beépül a sejtmag DNS-ébe
 - az *Agrobacterium* által közvetített transzformáció napjainkban az egy- és kétszikűeknél egyaránt a legelterjedtebb módszer a gyakorlati GMO-előállításban



Árpa és búza tanszformációjában használt szensz (jobbra) és antiszensz (balra) vektorok

Forrás: saját

A transzformációs vektorkonstrukciókban felhasznált promóterek főbb típusai:

- konstitutív

folyamatosan kifejeződő gének promóterei

- általános

a szervezet minden sejtjében kifejeződik (pl. alapanyagcsere gének promóterei)

- specifikus

sejt- és szövetspecifikusan kifejeződő gének promóterei

- induktív

adott külső hatásra (pl. biotikus, abiotikus stresszek, hormonok) bekapcsoló gének promóterei

- általános, ld. fent
- specifikus, ld. fent

A növényi transzformáció során használt (gazdaságilag jelentős) gének csoportosítása:

- származás

- prokarióta - baktérium; vírus
- eukarióta - növény; állat (rovar, emlős stb.); gomba; ember

- típus

- vad típusú gén
- mutáns gén
- antiszensz gén

fordított helyzetű gén vagy annak egy részlete, adott gén „kikapcsolására” alkalmas: mRNS terméke a célszervezetben történt átírás után hibridizál a normál, szensz helyzetű génről átírt mRNS-sel, a kettős szálú mRNS nem tud részt venni a transzlációban, nem termelődik meg az adott fehérje

- szintetikus gén

-eredet

- DNS (genomiális DNS)
- RNS (cDNS)
- fehérje (szintetikus DNS)

Egy transzgénikus (GM) növényfajta előállításának főbb lépései és módszerei a gén izolálásától a köztermesztésbe kerülésig (Dudits és Heszky, 2014 nyomán)

1.	Gén/cDNS izolálása:	Az idegen gén eredete: mikroorganizmus, gomba, növény, állat, ember, szintetikus
2.	Transzformációs vektorba építés:	A transzformációs vektor alapja: általában plazmid A transzformációs konstrukció legfontosabb részei: - promóter (+ célbajuttató szekvenciák) - idegen gén - terminátor szekvencia További elemek: - szelekciós markergén (promóterrel és terminátorral) - riportergén
3.	Géntranszfer	A transzformációs vektor bejuttatása a kívánt genotípus sejtjeibe: - direkt vagy indirekt génbevitel
4.	Transzformáns sejtek szelekciója	A szelekciós marker (általában antibiotikum-vagy herbicid rezisztencia) alapján történik.
5.	Transzgénikus növények regenerálása	
6.	A transzformáció sikerének molekuláris és <i>in situ</i> bizonyítása a növényben	Integráció: PCR, Southern hibridizáció Expresszió: RT-PCR, Northern hibridizáció, Western hibridizáció Öröklődés: markergén, transzgén
7.	Transzgénikus növények szántóföldi tesztelése, nemesítése	Környezeti rizikófaktorok felmérése, jogi szabályozás, engedélyezési kötelezettség figyelembevétele.
8.	Transzgénikus növényfajták minősítése	Jogi szabályozás alapján.
9.	Transzgénikus növényfajták köztermesztésbe kerülése	Jogi szabályozás alapján.

5.3. A GM növények

Az EU (2001/18/EG) és a géntechnológiai tevékenységről szóló törvény (XXVII./1998.) szerint...

- a GMO-k olyan élő szervezetek, amelyekben a genetikai örökítőanyagot (DNS) olyan módon változtatták meg, ami a természetben nem fordul elő a kereszteződés és a természetes rekombináció során.
- GMO-k előállítását eredményező módszerek, géntechnológiai módosításnak tekintendő tevékenységek:
 - rekombináns nukleinsav technikák,
 - olyan technikák, amelyek magukban foglalják olyan öröklődő anyag közvetlen bejuttatását egy szervezetbe, amelyet a szervezeten kívül állítottak elő
 - a sejtfúziós vagy hibridizálási technikák egy része

Az első genetikailag módosított (GM) növények a köztermesztésben

1994 - GM 'Flavr Savr' paradicsom: puhulás gátlása (termesztésben 1997-ig)

1995 - GM Bt kukorica: rovarrezisztencia

1996 - GM 'Roundup Ready' szója: herbicid (glifozát)-tolerancia

A különböző gazdasági célok alapján való csoportosításnál hagyományosnak mondható a GM növények generációkba sorolása (sajátos módon a Flavr-Savr paradicsom rögtön második generációsnek tekinthető).

5.3.1. Első generációs transzgénikus növények

Stratégia:

- a mezőgazdasági termelés, az agrotechnika fejlesztése
- biotikus és abiotikus stressz-rezisztencia

Vírusrezisztens transzgénikus növények:

- vírus köpenyfehérje génjének kifejeztetése
- pl. papaya gyűrűsfoltosság vírus (PRSV), szilvahimlő vírus (PPV), burgonya Y mozaik vírus (PVY) ellen



Papaya gyűrűsfoltosság vírus ellen rezisztens és fogékony növényállományok

Forrás: <http://www.agbioforum.org/v7n12/v7n12a07-gonsalves.htm#F3>

Fotó: S. Ferreira

Rovarrezisztens transzgénikus növények:

- *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Bt toxin) génjének bevitele:
Cry gének - Cry1: Lepidoptera ellen, Cry3: Coleoptera ellen
- pl. Bt kukorica, gyapot, burgonya, rizs, szója



Kukoricamoly-kártétel és csőfuzárium hagyományos (bal) és Bt (jobb) hibridekben

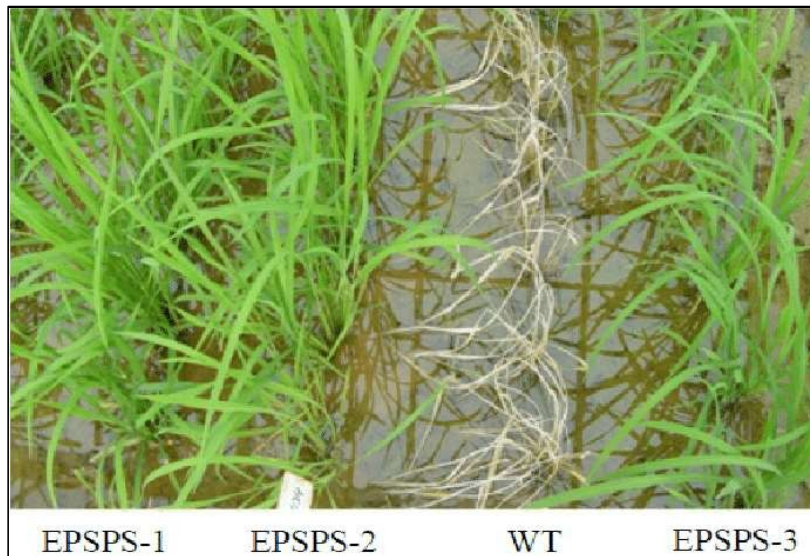
Forrás: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/ManagementStrategies.aspx>

Herbicidek toleráns transzgénikus növények:

A különböző herbicidek hatóanyagok elleni tolerancia kialakítására különböző stratégiák használatosak.

- a herbicidek által károsított enzim mutáns változatának termeltetése:

- glifozát tolerancia: mutáns enol-piruvil-sikiminsav-5-foszfátszintáz (EPSPS) gén kifejeztetése
- pl. Roundup Ready (RR) szója, repce, kukorica, cukorrépa
- szulfonilurea tolerancia: herbicid toleráns acetolaktát-szintáz (ALS) enzim termeltetése
- pl. szulfonilurea toleráns szegfű
- a herbicid hatóanyagát hatástalanító, detoxifikáló gén:
 - glüfozinát (PPT: a glutamin szintáz kompetitív inhibitora) tolerancia;*bar/pat* gén kifejeztetése
 - pl. Liberty Link repce, kukorica, szója, gyapot
- a herbicid aktivitás megszüntetése
 - oxynil herbicidek (pl. bromoxynil) elleni tolerancia; *bxn* gén bevitele, nitriláz enzim termeltetése
 - pl. gyapot, dohány, repce

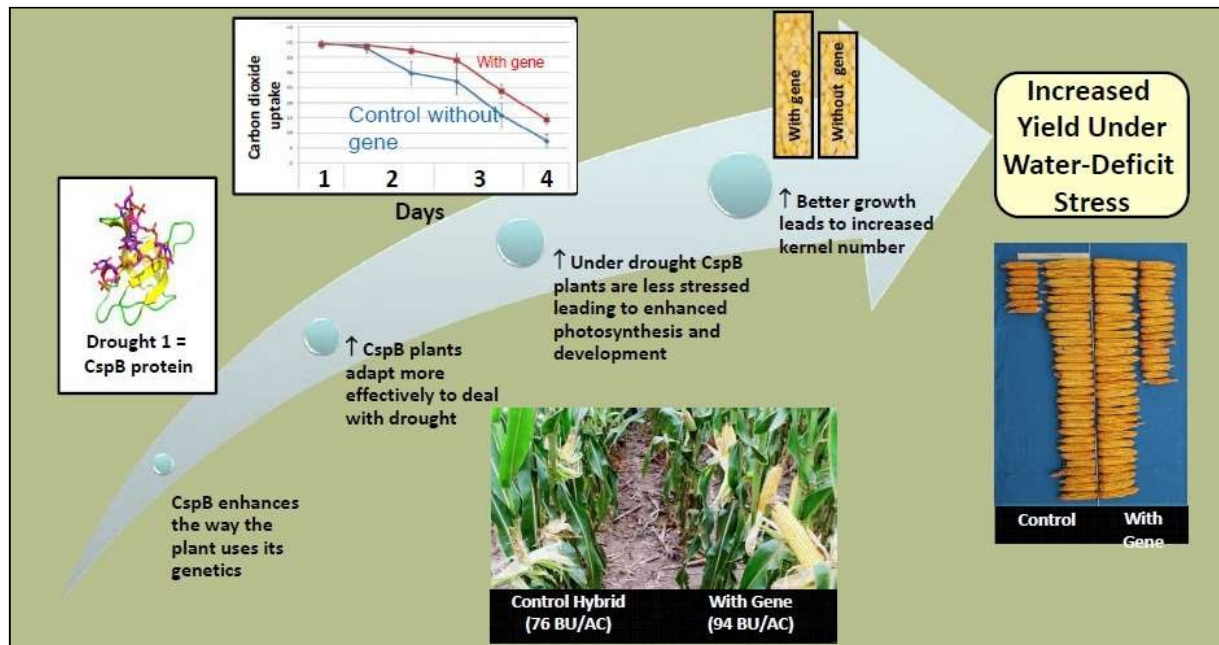


Glifozát toleráns (EPSPS-1,2,3) és vad típusú (WT) rizs növények Roundup-kezelés után

Forrás: https://www.researchgate.net/publication/274548563_Overproduction_of_5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate_synthase_EPSPS_confers_resistance_to_the_herbicide_glyphosate_in_transgenic_rice/figures?lo=1

Szárazságtűrés:

- hidegsokk fehérje (cold shock protein B - *cspB*) gén (*Bacillus subtilis*-ből) kifejeztetése
- szárazságtűrő kukorica



Szárazságtűrő kukorica

Forrás: Monsanto

5.3.2. Második generációs transzgénikus növények

Stratégia:

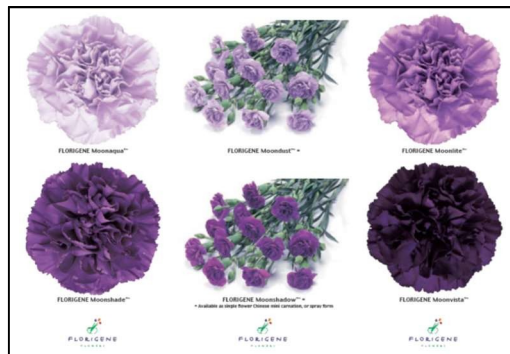
- speciális minőség előállítása
- fogyasztói és élelmiszeripari igények kielégítése
- az anyagcsere és a fejlődés módosítása

Anyagcsere módosítása:

- laurinsav (C12:0) tartalom növelése az olajban
 - *Umbellularia californica* tioészteráz génjének bevitele
 - pl. nagy laurinsav tartalmú (45%) repce
- fitáz termelése
 - fitáz enzim (*Aspergillus niger* var. *van TieghemphyA*) gén kifejeztetése
 - pl. fitázt termelő repce - a foszfort megkötő növényi fitinsav lebontása, foszfor hozzáférhetővé tétele egygyomrú állatok számára
- keményítő-összetétel módosítása
 - antizsensz GBSS (szemcséhez kötött keményítő szintáz) gén kifejeztetése
 - 100% amilopektint tartalmazó burgonya ('Amflora') - a feldolgozás megkönnyítés

- virágszín (antocián bioszintézis) módosítása

- 1. lépés: rózsza (vörös/narancssárga színért felelős) dihidroflavonol reduktáz (DFR) gén kikapcsolása RNS interferencia (RNAi) módszerrel
- 2. lépés: árvácska delfinidin (dihidrokempferol - DHK) gén bevitele
- 3. lépés: írisz/petúnia DFR gén bevitele és kifejeztetése pl. kék rózsza és szegfű



Transzgénikus kék rózsza és szegfű

Forrás: Florigene Ltd. és Suntory Ltd.

Fejlődés módosítása:

- Az érés módosítása:
 - antizsensz (fordított helyzetű) poligalakturonázgén bevitele
 - későn puhuló gyümölcsök, pl. Flavr Savr paradicsom
 - antizsensz ACC-oxidáz/-szintáz/-deamináz gén bevitele, etiléntermelés, érés gátlása
 - későn érő gyümölcsök, pl. Endless Summer som, paradicsom
- Transzgénikus hímsterilitás és hibrid előállítás:
 - *Bacillus amyloliquefaciens* barnase ribonukleáz (*barnase*) és barnase inhibitor (*barstar*) gén
 - hibridelőállítás: NMS (TA29-barnase) x Rf (TA29-barstar)
 - pl. hibrid olajrepce, cikória, kukorica

5.3.3. Harmadik generációs transzgénikus növények

Stratégia:

- GM növények, mint bioreaktorok speciális molekulák előállítására a gyógyszer-, műanyag- és takarmányipar számára

- mérnökileg tervezett és bioreaktor GM növények

Diagnosztikumok termeltetése GM növényekkel:

- avidin termelés kukoricában (raktári rovarkártevők ellen)
- β -glükoronidáz termelés kukoricában

Ehető vakcinák termeltetése GM növényekkel:

- Hepatitis B vírus felületi antigén (HBsAg) termeltetése burgonyában, kukoricában
- bakteriális (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*) enterotoxinok (LT, LT-B, CT, NVCP) és kolera toxinok termeltetése burgonyában, paradicsomban, banánban
- Norwalk vírus köpenyfehérje termeltetése burgonyában, dohányban

Gyógyszerek termeltetése GM növényekkel (PMP):

- Gaucher-kór enzim-helyettesítéses kezeléséhez fehérje (glükocerebrozidáz) termeltetése sárgarépa sejt kultúrában

β -karotint (A provitamin) termelő rizs („Arany Rizs” - Golden Rice, Golden Rice 2):

- Golden Rice: nárcisz fitoén szintáz (*psy*) és *Pantoea ananatis* karotin deszaturáz (*crtI*) gén bevitele; 1,6 g összes karotenoid/g sz.a.
- Golden Rice 2: kukorica fitoén szintáz (*psy*) és *Pantoea ananatis* karotindeszaturáz (*crtI*) gén bevitele; 37 g összes karotenoid/g sz.a.



Normál rizs (balra lent), Golden Rice (balra fent) és Golden Rice 2 (jobbra)

Forrás: ©2006 Thomson Higher Education

Az utóbbi évtized során előállított GM növényeknél a különböző géntechnológiai úton kialakított tulajdonságok rendszerint „halmozottan” jelennek meg (‘stacked traits’), ami a

felhasználók számára nagymértékű rugalmasságot jelent. Adott genotípusban egyszerre, akár különböző típusú herbicidekkel szembeni tolerancia, különböző kártevőkkel szembeni rezisztencia és egyéb tulajdonságok génjei is megtalálhatók. Előállításuk leggyakoribb módja a külön-külön GM vonalakban rögzített tulajdonságok kombinálása hagyományos keresztezéssel, de több példa található a különböző idegen gének egyidejű bevitelére is.

5.4. A transzgénikus növényekkel kapcsolatos rizikófaktorok

A növényi géntechnológiai tevékenységekkel kapcsolatos legfontosabb rizikófaktorok biológiai és gazdasági tényezőkként csoportosíthatók.

Biológiai (ökológiai) rizikófaktorok:

- A transzgén hatása

A transzgének felépítése, beépülése a genomba és működése a növényi szervezetben teljes mértékben megegyezik a természetes eredetű génekével. A növények elfogyasztása során az emésztőrendszerben a géneket alkotó DNS teljes mértékben elbomlik, minden egyéb eredetű (állati, mikrobiális) génhez hasonlóan. Ez alapvetően meghatározza a potenciális rizikófaktorok jelentőségét.

- Antibiotikum-rezisztencia kialakulása

Egészségügyi kockázattal járna, ha a bélben élő baktériumok, a GM táplálékból felvéve az antibiotikum rezisztencia (ABR) géneket, maguk is rezisztensekké válva lehetetlenné tennék a kezelést egy későbbi fertőzés során. Napjainkig, azonban egyetlen közvetlen bizonyíték sincs e jelenség lejátszódására. Bár az antibiotikum rezisztencia baktériumokba való sikeres átvitelének valószínűsége rendkívül kicsi (1:1013 - 1:1027), a markergénként leggyakrabban alkalmazott kanamycin és ampicillin rezisztenciagének napjainkra már széles körben elterjedtek mind a kórokozó mind a talajlakó baktériumok körében. A GMO-kból történő átvitel csak jelentéktelen mértékben növelné meg arányukat.

Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) GMO Paneljének szakértői 2004-es jelentésükben sürgősségként tartották az ABR markergének használatának általános betiltását, ugyanakkor kiemelték az egyedi elbírálás

jelentőségét: egyesek teljes tiltását, mások korlátozott alkalmazását tartották követendő stratégiának.

Az ABR gének alkalmazásával kapcsolatos problémák kiküszöbölésére több alternatív szelekciós rendszer áll rendelkezésre (ld. ott).

- A transzgén megszökése pollennel, maggal, vegetatív részekkel

A transzgént tartalmazó pollen szél, rovarok közvetítésével vagy egyéb úton megtermékenyíthet a GM növényvel azonos fajú nem GM termesztett genotípusokat, illetve annak rokonsági körébe tartozó vadon élő fajokat.

Előbbi esetben komoly gazdasági károk jelentkeznek a nem transzgénikus fajtát termelő gazdánál, akinek GM-mentes terméséből kimutatják az idegen gén jelenlétét. Itt az élelmiszerbiztonsági kockázat is nagy a transzgénnek az élelmiszerláncba való nem kívánt bekerülése miatt.

A herbicid-toleranciát kódoló gének kikerülése a rokon gyomfajok közé felgyorsítja a herbicidrezisztens gyomvonalak - hagyományos termesztéstechnológia esetén is tapasztalható - megjelenését. A herbicidrezisztens gyomok más hatóanyagú készítménnyel gond nélkül kiirthatók.

Legnagyobb problémát a transzgén maggal történő kijutása jelenti, a gyakran kiszámíthatatlan „emberi tényező” miatt. A transzgénikus mag a vető-, illetve a betakarítógép nem megfelelő tisztításakor, illetve transzgénikus (pl. takarmány) magtétel szándékolt vagy véletlen, nem GM-ként történő elvetésével okozhat keveredést. Bár a minőség-ellenőrzés adott pontján a transzgénikus jelleg kimutatható, a megtörtént keveredés teljes kiszűrése általában már nem lehetséges. Ez alapvető, de bizonyos keretek között kezelhető problémát jelent a koegzisztencia bevezetése esetén.

- Új vírustörzsek megjelenése

A GM növényekbe bevitt vírus-eredetű nukleinsav szekvenciák (pl. burokfehérje gének) elméletileg rekombinálódhatnak a növényt fertőző vírusok RNS-ével, ami új vírusformák keletkezését eredményezheti. Ennek valószínűsége rendkívül kicsi, ennek ellenére jelentős mértékben hátráltatja a vírusrezisztens GM növények elterjedését a világban.

- A géntermék (fehérje) hatása

- Környezeti hatások: a környezet növény és állatvilágára gyakorolt hatás, rezisztens gyomok, kórokozók, kártevők megjelenése

Az első generációs GM növények közé tartozó Bt kukoricák körében számos szempontból vizsgálták a nem célzott környezeti hatásokat. A Cry1 gén konstitutív promóter általi szabályozása miatt a Bt toxin a növény minden szervében, így a pollenben is megtermelődik. A kukorica genotípustól függő pollentermelése 20-120 kg/ha, a Bt kukoricák pollenje pedig 40-160 ng/g toxint tartalmaz. Ez 1-20 g/ha dózissal felel meg, ami jóval magasabb lehet a Dipel inszekticid 5 g/ha vegyes Cry-toxin dózisánál. Mivel a pollendózis a táblától 20 m-re már jelentős mértékben csökken, a mérgezés a táblában vagy az azt szegélyező lágyszárúakon élő lepkefajokat érinti. Hazai viszonylatban a csalánféléken élő tarkalepkék (Nymphelidae) a leginkább veszélyeztetettek. A védett pompás királylepke (*Danaus plexippus*) hernyóinak nagyfokú mortalitását tapasztalható a Bt-kukorica pollenjének fogyasztását követően, ami bekövetkezhet ha a szél átfújja a Bt-kukorica pollenjét a királylepke kizárólagos táplálékát jelentő selyemkóró fajok levelére. Hasonló a hazai tapasztalatok a nappali pávaszem (*Inachis io*) és a c-betűs lepke (*Polygonia c-album*) esetében.

A probléma elsődleges oka, hogy ezek az első generációs GM növények az alkalmazott konstitutív promóter miatt pollenjükben is termelik a Bt toxint. Ez körülbelül 60 méteres körzetben terjed át a szomszédos növényekre.

A Bt kukoricák (MON810 Cry1) környezeti hatásának magyarországi vizsgálatai számos nem célzott hatást mutattak ki. A növényi maradványok lebontásában szerepet játszó ugróvillások felismerték a Cry1 toxint tartalmazó növényi maradványokat és a nem transzgénikus izogén vonalakat választották. Ez is hozzájárult a dekompozíciós tendencia lassulásához a hagyományos kukoricákhoz képest.

A kukoricabogár ellen ható Cry3Bb1toxint tartalmazó vonalak dekompozíciójának vizsgálatakor, ugyanakkor, az egyes növényrészekre vonatkozóan nem, csak a lebontás sebességében volt különbség az izogén nem-GM vonalakkal összehasonlítva. Az ugróvillások és egyéb talajlakó állatfajok táplálék-preferenciája

változó volt, de általában nem volt jelentős különbség a GM és nem-GM anyagok között.

Pozitív nem célzott hatásként értékelhető, hogy mivel a csőpenész megjelenése általában a kukoricamoly lárvák kártételének következménye, a Bt kukoricákban a fuzárium fertőzés alacsonyabb szintje együtt jár a fuzárium-toxinok (fumonizin, DON, ZEA) szintjének jelentős csökkenésével. A Bt-hibrideknél az *Aspergillus*-ok által termelt aflatoxinok szintjének csökkenése is megfigyelhető. Ezek alapján, a Bt kukoricák jelentősége nem kizárólag célzottan kialakított új tulajdonságukban, a kukoricamoly-rezisztenciában rejlik, hanem a mikotoxin-szint csökkentésében.

A herbicid-toleráns GM növények termesztése rezisztens gyomok kialakulásához járul hozzá. A glifozát-toleráns GM gazdasági növények 1996-os bevezetése óta számos gyomnövény fajnál írták le a herbiciddel szembeni rezisztenciát. Tény, azonban, hogy a rezisztencia hagyományos technológia alkalmazása esetén is bizonyíthatóan kialakulhat. A gyomirtószer-rezisztencia kialakulása ellen hatékony eszköz a vetésváltás alkalmazása, a talajművelés, többek között szántás rendszeres alkalmazása, a gyomirtószeres váltakozó használata, hiszen pont ezek elhanyagolása, a teljes mértékben a glifozátra épülő monokultúra vezetett a probléma kialakulásához.

- Élelmiszerként kifejtett hatások: toxicitás, allergén hatás

A GM növényekkel és a belőlük készült termékekkel kapcsolatban a mai napig nem mutattak ki egyértelműen a transzgén vagy terméke által okozott toxikus vagy allergizáló hatást. A kritikák fókuszában, élelmezési és takarmányozási jelentősége miatt egyaránt a szója áll. Számos vizsgálat kimutatta, azonban, hogy a transzgénikus szója genotípusokban nem nőtt az allergizáló faktorok száma.

A GM élelmiszereket az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (European Food Safety Authority, EFSA) független szakértőkből álló bizottsága, a GMO Panel vizsgálja élelmiszerbiztonsági szempontból. A 2002-ben alapított, párizsi székhelyű EFSA az (EG) 178/2002 élelmiszer törvényre vonatkozó szabályozásának megfelelően két fő területen fejt ki tevékenységét: az élelmiszer- és takarmánybiztonsággal kapcsolatos minden kérdés tudományos rizikó-elemzése, illetve a nagyközönség tájékoztatása, veszélyhelyzetek bejelentése. Minden új GM anyag felhasználásra, termesztésre való

engedélyezését széleskörű hatásvizsgálat előzi meg, ami kiterjed az allergén-hatásokra is.

Engedélyt kizárólag potenciális allergén-rizikót nem jelentő GM anyagok kaphatnak. Az allergia vizsgálat során alkalmazott legfontosabb tesztek: ismert allergének aminosav-szekvenciájához való hasonlóság mértéke, a fehérje stabilitása az emésztés során, allergiás személyek vérérumával végzett teszt, állatokkal végzett tesztek. Az új allergének potenciális forrásai nem csak GM növények lehetnek.

A hagyományos nemesítés által létrehozott kombinációk, új feldolgozási technológiák is okozhatnak változásokat a fehérjeszerkezetben, ami allergén-forrás lehet, illetve az újonnan behozott egzotikus gyümölcsök is számos, eddig nem ismert allergént hordozhatnak. A géntechnológiai módosítás, ugyanakkor mindig csak néhány új gén bevitelét jelenti, melyek beépülése és várható hatása nagymértékben előre látható és jól nyomon követhető. Sok esetben (pl. antiszensz és RNS-interferencia technikák) nincs is új gén beviteléről szó, hanem az eredeti gének transzkripciójának-transzlációjának gátlása történik (ld. érésben gátolt paradicsom).

Gazdasági (szociális) rizikófaktorok:

- Genetikai gyarmatosítás és globalizáció

A (multinacionális) vállalatok más országok vad- és kultúrflórájából származó géneket szereznek meg és használnak fel géntechnológiai célokra az adott ország kizárásával.

Gazdasági konfliktusok a globális és a helyi, hagyományos módszereket alkalmazó nemesítő és vetőmag cégek között, ami általában utóbbiak tönkremeneteléhez vezet.

A géntechnológiai szabadalmak monopol-helyzetével való visszaélés eredményezheti, hogy akár hagyományos termesztés esetén is licenszdíj fizetésére kötelezzenek egy őshonos növényfajt termesztő gazdálkodót. (A GMO-kat ellenző kampányok állításaival szemben, állítólag, ez még nem történt meg.)

- Nem célzott gazdasági hatások

Piacvesztést eredményez, amikor más, általában fejlődő országok fontos bevételi forrását jelentő termékek megtermelése a genetikai módosítás (alkalmazkodóképesség javítása) következtében lehetővé válik a korábbi importőr országokban.

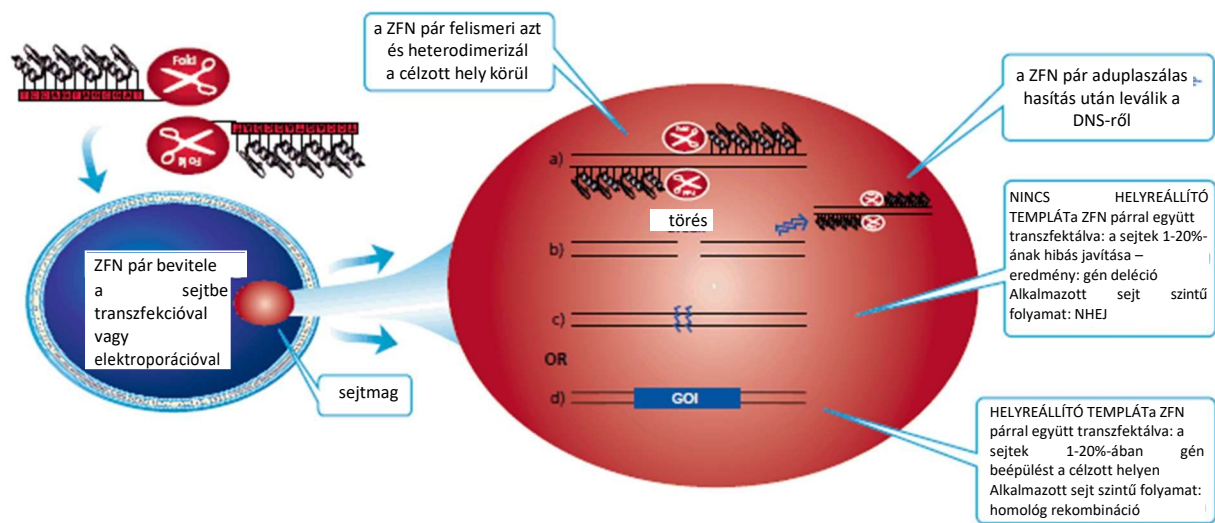
A GM növények termesztői, a hagyományos (kemikáliákat is alkalmazó), illetve az ökológiai szemléletű (vegyszermentes) gazdálkodást folytatók érdekeinek ütközése, illetve azok egyeztetése (koegzisztencia) hosszan tartó konfliktusok forrása lehet, ami törvényi szabályozással kezelhető.

5.5. A növényi géntechnológia új lehetőségei

A GM növényekkel kapcsolatos biológiai rizikófaktorok technológiai alapjai jelentős mértékben kiküszöbölhetők lehetnek azokkal az új növénynemesítési módszerekkel, melyeket Lusser és mtsai. (2011) foglaltak össze:

- cink-ujj nukleáz (ZFN) technológia (ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3)
- oligonukleotid által irányított mutagenézis (ODM)
- ciszgenezis és intragenezis
- RNS-függő DNS-metiláció (RdDM)
- oltás (GM alanyra)
- fordított nemesítés
- *Agrobacterium*-infiltráció (agro-infiltráció “sensu stricto”, agro-inokuláció, virágzat bemeztetés)
- szintetikus genomika

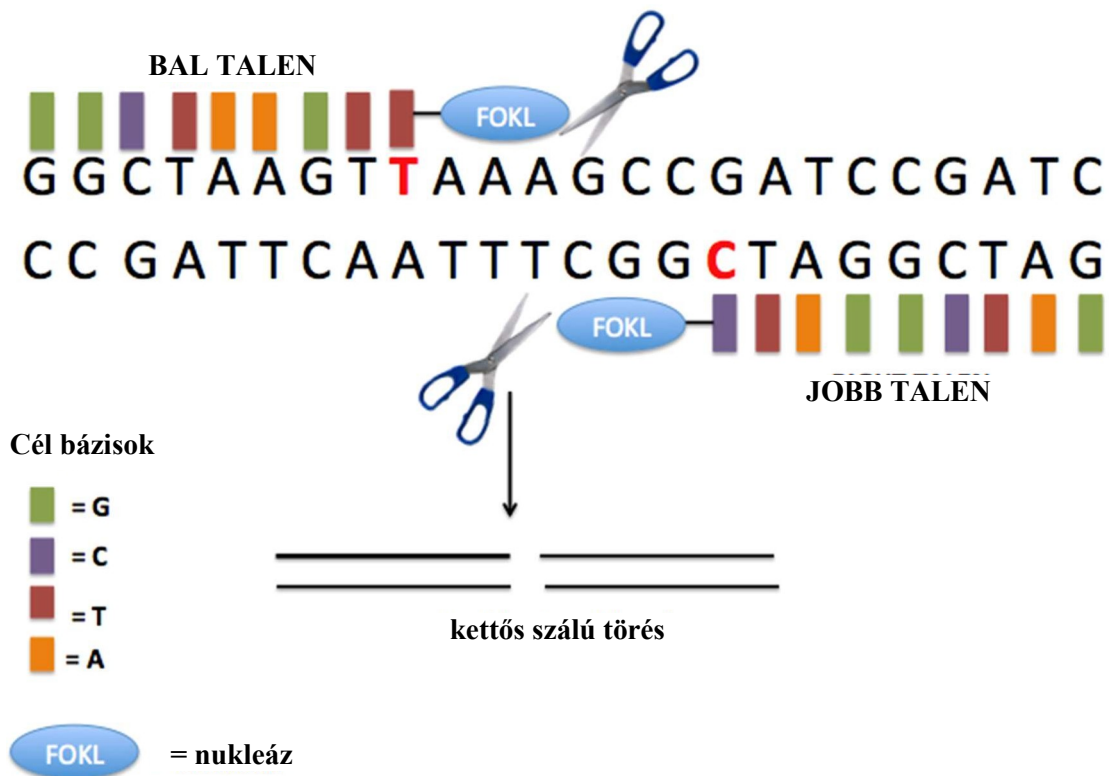
Napjainkra a genetikai transzformáció alternatívájaként fokozott figyelem irányul a genom-szerkesztésre ('genome engineering'), ami általában nem igényli idegen gén bevitelét, így az ilyen típusú módosítással létrehozott szervezetek GMO-ként tárgyalása már a törvényi szabályozás szintjén is kérdésessé vált. Viszonylagos egyszerűsége, sokoldalúsága (és kisebb költségei) miatt legperspektivikusabbnak a CRISPR/Cas9 rendszer (CRISPR – halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések) látszik, de ide tartozik a TALEN-ek (transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleázok) alkalmazása, illetve egyes szerzők a cink-ujj nukleázokon alapuló helyspecifikus transzformációt is ide sorolják.



A cink-ujj nukleázokon alapuló genomszerjesztés vázlata

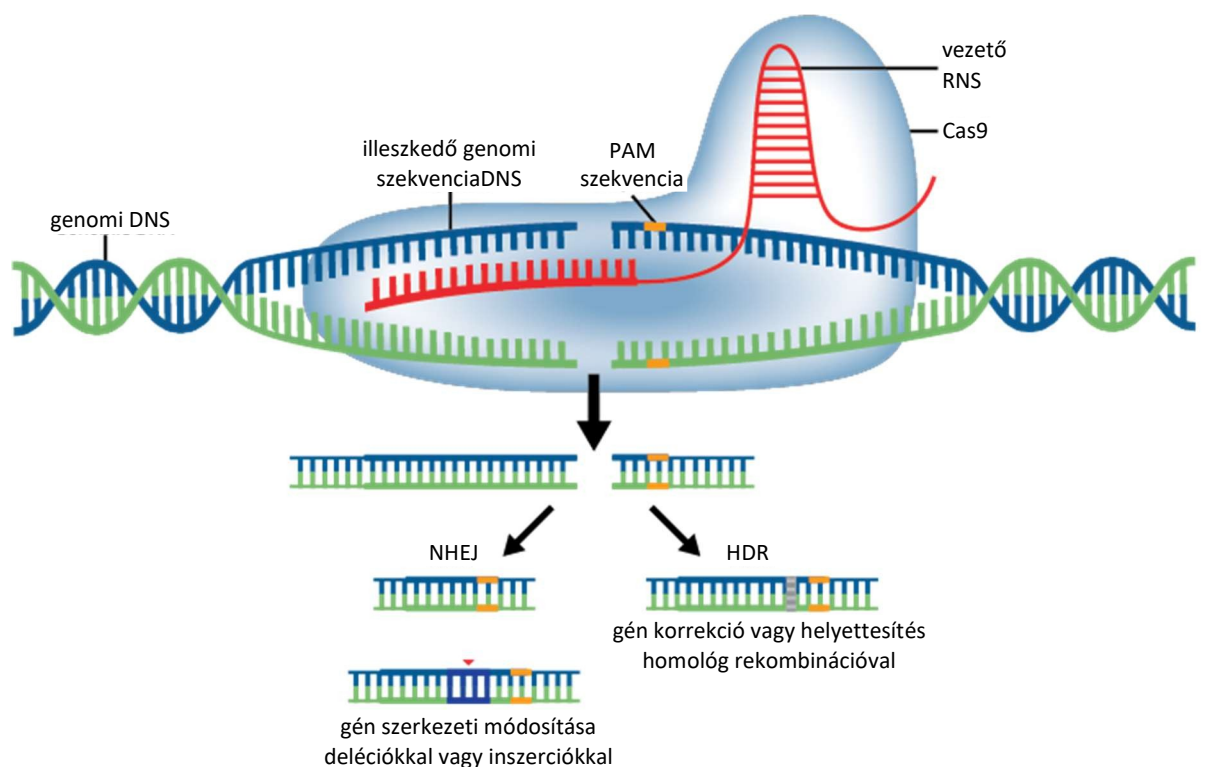
ZFN: cink-ujj nukleáz; GOI: fontos gén (gene of interest)

Forrás: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/life-science-innovations/targeted-genome-editing.html>



A TALEN genomszerkesztési módszer vázlata

Forrás: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overview_of_TALENs.png



©2016 Rockland Immunochemicals, Inc.

A CRISPR/Cas9 genomszerkesztési módszer vázlata

PAM: protospacer-associated motif; NHEJ: nonhomologous end joining;

HDR: homology-directed repair

Forrás: <https://rockland-inc.com/crispr-gene-editing.aspx>
Charpentier és Doudna, 2013 alapján

Speciális területet jelentenek a ciszgénikus növények, melyekbe saját fajú vagy vele keresztezhető donor növényből származó gén(ek)e)t ültettek be géntechnológiai módszerekkel. A gén(ek) általában az intronokat és a természetes promóter- és terminátor régiókat is tartalmazzák. E növények esetében teljes mértékben megvalósul a genetikai transzformáció azon előnye, hogy a hagyományos keresztezéssel szemben, itt csak a fontos tulajdonságot kódoló gén(ek) átvitele valósul meg. Napjainkig a legtöbb ciszgénikus növényt burgonyában állították elő, különböző *Solanum* fajokból *Phytophthora infestans* elleni rezisztanciagének bevitelével.

A napjainkban köztermesztésben lévő GM növények többségének előállítása során szelekciós markergének stabil beépítésére is sor került. Ezek mikrobiális eredete, illetve a kifejeződésük által megjelenő tulajdonság (pl. antibiotikum-rezisztencia) folyamatosan alapot szolgáltat a GMO-k kritikusai számára. Fokozott figyelmet érdemelnek, tehát azok a módszerek, melyek

markermentes szelekciót, a markerek és egyéb idegen szekvenciák eltávolítását teszik lehetővé:

- szelekció markergén beépítése nélkül
 - olyan fajoknál, ahol magas transzformációs ráta várható
 - szelekció PCR alapú technikákkal
- nem antibiotikum- vagy herbicid-rezisztenciát adó markergén
 - ún. pozitív szelekciós rendszerek
 - pl. foszfomannóz izomeráz; xilóz izomeráz, *ipt* gén beépítése
- a markergén kivágása vagy szegregációja
 - kotranszformáció
a fontos transzgén és a markergén külön vektoron
pl. pCLEAN, pGreen/pSoup rendszerek
 - helyspecifikus rekombináázok
pl. Cre/*loxP*, FLP/*FRT*, R/*RS*
rekombinááz-aktivátorok (pl. dexamethasone) használata
 - transzpozon alapú rendszerek
pl. Ac-transzpozon
 - kromoszómán belüli rekombináció
rekombinációs helyek (pl. attP, attB) beépítése, de rekombinááz nem szükséges

5.6. A géntechnológia törvényi szabályozása

2017-ben a világon 189,8 millió hektáron termesztettek GM növényeket, ami növekedést jelent a 2016 évi 185,1 millió hektárhoz képest. Az összes terület több mint 50%-án szóját termeltek. A négy legfontosabb GM növényfaj esetében a GM – nem-GM területi arányok a következőképp alakultak 2017-ben:

- a szója vetésterület 77%-án,
- a gyapot vetésterület 80%-án,
- a kukorica vetésterület 32%-án,
- a repce vetésterület 30%-án termesztettek GM növényeket.

GM növények az EU-ban:

- EC 1829/2003 szabályozás:
 - a GM terményekre vonatkozó hatéves tilalom feloldása
 - szigorú engedélyezési és címkézési szabályok meghatározása
- 2010. július 13. Európai Bizottság ajánlása:
a tagállamok szabadon dönthessenek arról, hogy a területük egészen vagy egy részén korlátozzák, illetve megtiltják-e a GMO-k termesztését
- 2015. március 11. Az Európai Parlament és a Tanács 2015/412 irányelve:
a tagállamok maguk döntenek a GM fajták felhasználásáról; a termesztés elutasításának okai lehetnek (26b. (3) cikk): környezetpolitikai célok, város és vidéki területrendezés, földhasználat, társadalmi és gazdasági hatások, más termékek szennyezése, agrárpolitikai célok, közrend
- 2018. július 25. Az Európai Bíróság a C-528/16. sz. ügyben hozott döntése:
a mutagenézis technikái, illetve módszerei útján nyert szervezeteket géntechnológiával módosított szervezeteknek kell tekinteni (ezek szerint, a genomszerkesztés és a géntechnológia között nincs lényegi különbség)

Az EU-ban jelenleg termesztésre engedélyezett GM növények:

- kukorica: kukoricamoly-rezisztens (Bt) hibridek a MON 810 génkonstrukcióval

Korábban engedélyezve volt:

- burgonya (módosított keményítő-összetétel): 'Amflora' (2013. márciusában a BASF visszavonta, és géntechnológiai tevékenységével kivonult Európából)

Magyarországon, az EU irányelvekhez igazodva, a géntechnológiai tevékenységről szóló XXVII./1998. számú törvény (GMO-törvény) szabályozza

- a természetes szervezetek géntechnológiával való módosítását, valamint
- a géntechnológiával módosított szervezetek és az azokból előállított termékek zárt rendszerben történő felhasználását, a környezetbe való kibocsátását és forgalomba hozatalát, az országba történő behozatalát, külföldre történő kivitelét és szállítását.

Géntechnológiai módosításnak tekintendő tevékenységek:

- rekombináns nukleinsav technikák;

- olyan technikák, amelyek magukban foglalják olyan öröklődő anyag közvetlen bejuttatását egy szervezetbe, amelyet a szervezeten kívül állítottak elő;
- a sejtfúziós vagy hibridizálási technikák egy része.

A géntechnológiai laboratóriumok létrehozásához, géntechnológiai tevékenység végzéséhez, a GMO-k felhasználásához, kibocsátásához, forgalmazásához, exportjához és importjához szükséges engedélyeket a Géntechnológiai Bizottság állásfoglalása alapján a Géntechnológiai Hatóságok adják meg.

A koegzisztencia szabályozása

Európai Unió, 2003. július 23. (2003/556/EC ajánlás), a koegzisztencia-elv bevezetése:

- a konvencionális,
- az ökológiai (bio) és
- a GM növénytermelési rendszerek együttélése

Magyarország:

- a géntechnológiai tevékenységről szóló 1998. évi XXVII. törvény módosítása: a „koegzisztencia törvény” (MK 2006/150. (XII. 7.))

A GM tartalmú élelmiszerekre vonatkozó szabályozás

1829/2003 EK rendelet 12. cikke:

azokat az élelmiszereket, amelyek

- GMO-kat tartalmaznak, vagy azokból állnak; vagy
- azokat GMO-kból állították elő, vagy GMO-kból előállított összetevőket tartalmaznak jelölni kell!

Jelölés (1830/2003 Rendelet 4. cikk B rész, 6. A), B) pont):

- "Ez a termék géntechnológiával módosított szervezetet/[szervezet(ek) neve]-t tartalmaz"

Az EU-ban forgalmazásra engedélyezett GM-oknál, ha a GMO mennyisége <0,9%, nem kell jelölés.

Nem engedélyezett GMO esetén a termék nem hozható forgalomba!

6. BIOTECHNIKA ÉS BIOTECHNOLÓGIA AZ ÁLLATTENYÉSZTÉSBEN

6.1. Az állatbiotechnika fogalma

A biotechnikai eljárások lényege, hogy az állati szervezet működésébe avatkozunk be biológiai módszerekkel valamely olyan gazdasági cél elérése érdekében, mint például a termelési eredmények, vagy a szaporodási mutatók javítása.

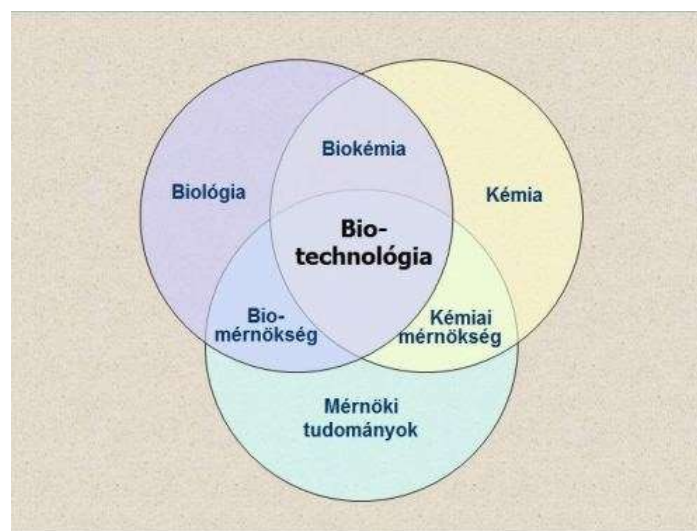
A beavatkozás makromanipulációs eljárások esetében a szervezet szintjén, mikromanipulációs eljárás esetében sejtszinten történik.

Abban az esetben azonban, hogy ha a biológiai módszerekkel történő beavatkozás során megváltoztatjuk az öröklésmenetet az örökítő anyag összetételének megváltoztatásával, akkor már biotechnológiai eljárásról beszélünk.

Ezen eljárások lényege, hogy ez már a sejtek szintjén a sejten belüli örökítőanyag manipulációjával történik.

6.2. A biotechnika és biotechnológia fogalma

Tágabb értelemben minden, az alap és alkalmazott biológiai tudományágban használatostechnikát, technológiát biotechnikának, illetve biotechnológiának neveznek.



Biotechnológia

Forrás: <http://users.atw.hu/gmora/alkalmazas.html>

A biotechnikai és biotechnológiai eljárások alkalmazása nagyon sok esetben együttesen történik.

Pl.: Egy biotechnológiai eljárással előállított kimérát, vagy klónozással előállított embriót laparoszkópos biotechnikai eljárással ültetnek be az anyaállatba. (Tehén esetében vértelen úton katéterrel is megoldható a beültetés, juh esetében viszont félsebészeti laparoszkópos, vagy sebészeti eljárással az embriót a petevezetőbe juttatják.)

Cél

Az állatbiotechnikai és biotechnológiai eljárások mindig valamely konkrét gazdasági cél elérése érdekében történnek.

Gazdasági haszonállataink termelési eredményeinek fokozását, optimalizálását szolgáló eljárások.

Az állatbiotechnika/technológia alkalmazási területei

- Termelés biotechnológia
- A szaporítás biotechnológiája
- Az állatnemesítést szolgáló biotechnológiai eljárások
- Az állategészségügyet szolgáló biotechnológiai eljárások
- A gyógyszeripar igényeit kiszolgáló biotechnológiai eljárások
- A környezetvédelmet szolgáló biotechnológiai eljárások

6.2.1. Biotechnikai eljárások alkalmazási területei

- Az egyik legkorábban alkalmazott biotechnikai eljárás a mesterséges termékenyítés volt.
- A sperma és embrió mélyhűtés története is a régmúlta nyúlik vissza.
- Kezdetben az állattenyésztők idegenkedtek ezektől az eljárásoktól, azonban ma már az orvostudomány területén is alkalmazzák.

6.2.2. Biotechnikai eljárások

- Szaporítóanyag mélyhűtés
- Mesterséges termékenyítés
- Embrió mélyhűtés
- Embrió átültetés
- Embrió darabolás

6.2.2.1. Hígított, tartósított szaporítóanyag előállítása

A mesterséges termékenyítéshez az eljárás alapanyagául szolgáló megfelelő mennyiségű, minőségű, eltartható termékenyítőanyagra van szükség.

Az eltarthatóság nagyban függ a tenyészállatoktól vett ejakulátumok minőségétől, a hígítás módjától, az alkalmazott hűtési eljárástól, a mélyhűtésre való előkészítéstől, az előhűtés és a mélyhűtés alkalmazott módszerétől, a tárolás, visszaolvasztás, termékenyítési módszer helyes megválasztásától és alkalmazásától, illetve a termékenyítés időpontjának helyes megválasztásától.

6.2.2.2. Különböző állatfajok termékenyítő anyagának tartósítása sertés, szarvasmarha, juh fajok esetében

- A szarvasmarha szaporítóanyaga az alacsony hőmérséklet tűrése szempontjából a legellenállóbb, ezért is terjedhetett el olyan széles körben a -196°C -on folyékony nitrogénben való tárolása, valamint ezen szaporítóanyag felhasználása.
- A sertés szaporítóanyagának hűtőtárolása 16°C -os hőmérsékleten 2-4 napig lehetséges.
- A kossperma esetében megfelelő minőségű hígító használata mellett a hűtőtárolás $2-4^{\circ}\text{C}$ -on történik. Ezen a hőmérsékleten akár 4-5 napig is tárolható.

Spermiumsejtek mélyhűtése

A mélyhűtés az ivarsejtekben zajló folyamatokat átmenetileg szünetelteti. A hatékony mélyhűtési technológia kialakítása elősegíti az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazását, a gyorsabb genetikai előrehaladást az állattenyésztésben, valamint lehetővé teszi a különleges genetikai, biológiai anyag ritka fajok, fajták genetikai anyagának tartós tárolását, megőrzését (Cseh, 2009).

Az ivarsejtek és embriók mélyhűtésének gyakorlati előnyei a genetikai anyag termékenyítési szempontból előnyös tulajdonságainak cseréje egymástól távol eső kontinensek, országok, farmok között (Cseh, 2009).

A modern kori kriobiológia kezdete

A glicerín védőhatását Chris Polge és mtsai 1949-ben publikálták először. 1972-ben Willadsen és munkatársai publikálták az ún. „rövid protokoll”-t. Fahy és munkatársai 1984-ben számos mélyhűtési protokollt fejlesztettek ki és több emlős faj ivarsejtjét, embrióját fagyasztották sikeresen vitrifikációs eljárással, beleértve emberét is.

Az ivarsejtek/embriók mélyhűtésének elméleti alapjai

Cseh 2009 szerint a sejt ozmotikus reakciója/amikor behelyezzük az intracelluláris krioprotektív anyagot tartalmazó fagyasztó oldatba. A fagyasztó oldat koncentrációjának növelése, amikor elkezdjük a hőmérséklet csökkentését és megkezdődik a vízmolekulák kilépése az oldatból a jégkristályok képződése, növekedése extracellulárisan. A sejt ozmotikus vízvesztése, dehidratációja, az extracelluláris terület koncentrációjának emelkedése.

A sejtek túlélését meghatározó tényezők

- Hűtési sebesség
- Tárolási hőmérséklet, és tárolás alatti kezelés (körültekintő, biztonságos)
- Felmelegítési sebesség
- A sejt ozmotikus válasza a krioprotektív anyag kivonása (rehidratálás) (Cseh, 2009/b)

Az ivarsejtek/embriók mélyhűtési technológiájának lépései

Első fázis: előkészítés és hűtés

- A sejtek gyűjtése és minősítése
- A sejtek equilibrálása a krioprotektív anyagot tartalmazó hígító oldatban
- A sejtek mélyhűtése (-196°C)

Második fázis: Tárolás a LN₂ hőmérsékleten (-196°C)

Harmadik fázis: Felmelegítés és előkészítés a felhasználásra.

- A sejtek felmelegítése ellenőrzött körülmények között.
- A krioprotektív anyagok kivonása a sejtekből.
- Visszatérés a fiziológiai körülményekhez, állapotokhoz.

A mélyhűtés típusai

Equilibrium hűtés

A krioprotektív anyag alacsony koncentrációban van jelen ($C < 10\%$; 1,5 M)

Lassú sebességgel hűtünk ($0,3^{\circ}\text{C} - 2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Nem equilibrium hűtés

Több krioprotektív anyag és nagy koncentrációban van jelen ($> 40\%$; 6-8M)

Rövid equilibrálási idő

Nagy sebességgel hűtünk ($> 500^{\circ}\text{C}/\text{perc}$; $15.000^{\circ}\text{C}/\text{perc}$) (Cseh, 2009/b)

Mélyhűtés története

Az első feljegyzések szerint Breinstein és Petropavlovsky 1937-ben sikeresen alkalmaztak 1M-os 9,2%-os glicerines oldatot nyúl, tengerimalac, kos, bika, vaddisznó, csődör és kacsaspermiumok tárolására

Szmirnov 1949-50-ben és 1947-ben illetve 1950-ben vitrifikáció nélkül glicerinnel kiskiszerelésben 0,05-0,1 ml mélyhűtött kos, illetve bika spermával végzett termékenyítési kísérleteket. 1949-ben 19 anyajuh háromszori termékenyítésben 15 percen át fagyasztott spermát használtak fel. A termékenyítések eredményeként 7 anyajuhtól 11 bárány született. Az 1951-ben végzett mesterséges termékenyítések eredményeképpen a kísérlet során termékenyített 11 tehéntől 5 borjú született. Bebizonyosodott tehát, hogy a vizsgálatok során használt hígító krioprotektív tulajdonságát a glicerinn okozta.

Az 1950-es években jelentős kísérlet zajlott a fagyasztva tárolásra vonatkozóan. Kezdetben a bikasperma mélyhűtéséhez használt hígítóval történt kossperma mélyhűtés eredményei, nem voltak megfelelőek. Az ezzel az anyaggal végzett termékenyítések csupán 5%-os termékenyítési eredményeket mutattak. 5%-os termékenyítési eredményeket mutatott. Blackshaw és Emens, 1953, Dauizer, 1956 kutatási eredményei nyilvánvalóvá tették, hogy a bika spermára alkalmazott módszer nem működik a kossperma esetében. Az évek során rengeteg kutatás zajlott, amelyek során rengeteg információ gyűlt össze a kossperma mélyhűtésével, tárolásával kapcsolatban, mind a különböző hígítók, krioprotektív anyagok, az előkészítés, feldolgozás, mélyhűtés területén, valamint a mélyhűtés során keletkezett károk és a kos spermiumok termékenyítő képességére vonatkozóan.



Pelletben történő mélyhűtés



Műszalmában történő mélyhűtés

Hígítás

A kossperma tartósítására használt hígító esetében szükséges a megfelelő pH, pufferkapacitás, ozmotikus nyomás és spermiumok védelme a legfontosabb követelmények, melyeknek egy hígítónak mindenképpen meg kell felelnie.

Laktóz alapú hígítók

A laktóz, mint a hígítók fő szénhidrát összetevője, a bika sperma esetében jól bevált, ezért alkalmazzák a kosspermánál. A kezdeti in vitro vizsgálatoknál, ahol laktóz alapú

hígítószerket alkalmaztak ellentmondásos eredmények jöttek ki és a termékenyítési tesztek sem hoztak meggyőző eredményt. Az ezt követő vizsgálatok ellési eredményei alacsonyak 29%-os, illetve 40-50% közepes eredményűek voltak a laktózt és tojássárgáját tartalmazó hígítók esetében. Laktóz és tojássárgáját használták glicerinnel dúsított és glicerin nélküli közegben, vagy glicerines INRA közegben egyaránt.

Diszacharidok közül laktózt és szacharózt találták hatékonynak, amelyek megfelelő mértékben csökkentik a kristályosodási hőmérsékletet a mélyhűtés alatt, mint a monoszacharidok. Ennek hatékonyságát növelte az EDTA-Na és dietil-amin hozzáadása. (Platov, 1988)

Platov (1977) egy komplex poliszacharid, a gumiarábikum és a laktóz alapú hígítók hatását vizsgálta. A gumiarábikum egy nagy molekulatömegű komplex poliszacharid. Az anyagot az akác növények szekretálják 1,5-15%-os koncentrációban. A gumiarábikum használata azért is előnyös a hígítókban, mert jól tolerálják a spermiumok és extracelluláris krioprotektív tulajdonsággal is rendelkezik.

A Platov (1977) által végzett vizsgálatok a spermát 2 lépésben hígítják a begyűjtés után először nem glicerinezett laktózt és tojássárgáját tartalmazó hígítót, majd összekeverés után a laktóz-gumiarábikum-tojássárgája-glicerin, vagy laktóz-tojássárgája-EDTA-Na-dietil-amin-gumiarábikum-glicerin összetételű hígítót adnak a hígítandó szaporító anyaghoz.

A további vizsgálatokban a gyakran alkalmazták a Platov és munkatársai (1988) által kidolgozott az orosz Lesnie Poljaniról elnevezett Állattudományi Kutatóintézet által kossperma feldolgozásra és fagyasztásra ajánlott rendszert. E rendszer szerint a spermát 2 lépésben kell hígítani első 1,5-2-szeres hígítás glicerinmentes hígítóval, a második a 2-szeres hígítást alkalmaztak glicerines közegben. Az 1. kísérlet során használt hígító mindkét lépésben az alábbi anyagokat tartalmazata: 9%-dextrán, 5% EDTA-Na, 0,105 – 0,135 % trisz-tojássárgája, 20% antibiotikum, 14% glicerin. A második kísérlet során használt 1-es hígító 12% laktózt, 20% tojássárgáját tartalmazott, a második lépésben hozzáadott hígító egy glicerintartalmú hígító, amelynek összetétele: 17% laktóz, 14,5% gumiarábikum, 6% trisz, 0,6% citrát, 0,27% tojássárgája, 20% antibiotikum. Az equilibráltatási idő 1 óra. Majd 0,2 ml kiszerezésben granulálták szárazjéggel, vagy polimer lemezzel. A termékenységi vizsgálatok összehasonlításakor a hígító összetételének megváltoztatása hatására a Platov vizsgálatai során kapott ellési % eredmények 26%-ról 60%-ra változtak (Platov, 1988).

Zeltobjuk és mtsai. (1981) megállapították, hogy 5-6% poliglukin, illetve a nagy molekulatömegű 10% recpolyglukine glükóz polimereket tartalmazó tojássárgája alapú hígító nem ad jobb eredményt, mint a Platov féle hígító. Azonban a fagyasztott spermával való termékenyítés esetében a laktóz-dextrán alapú oldószerek használata hozott elfogadható eredményt.

Glicerín, mint krioprotektív anyag

A glicerín a hígítókban leggyakrabban használt védőanyag, amelyet kossperma mélyhűtésére használnak. A kutatók megállapították, hogy fagyasztott sperma hagyományos lassú mélyhűtési módszerek használata mellett az optimális glicerín koncentráció 6-8%-os tartományban van. A lefagyasztott spermiumsejtek pelletált formában 3-4%-os glicerín koncentráció mellett élnek túl legnagyobb eséllyel a mélyhűtést.

Graham és mtsai szerint (1978) a glicerín 6%-nál magasabb koncentrációban káros a felolvasztás utáni túlélés szempontjából. Az ezen eljárás során alkalmazott glicerín koncentráció attól függ, hogy a mélyhűtésre szánt szaporító anyag bikasperma, vagy kossperma, ugyanis a kos spermiumsejtjeibe a glicerín könnyebben behatol.

Fahy (1986) szerint a hozzáadott glicerín mennyisége és a hozzáadás módja függ a hűtés fagyasztás sebességétől, a hígító összetételétől, a hozzáadott glicerín mennyiségétől és a hozzáadás módjától. A vizsgálat együttes hatását a glicerín koncentráció (0-8%) és a hűtés sebessége határozzák meg a pelletálás során. Ezt követően a száraz jégen, folyékony nitrogénben történő hűtés.

Visser és Salamon (1974c) 0-16%-os krioprotektív anyag koncentráció mellett a 1-100°C/min hűtési sebességgel történő mélyhűtést alkalmazták.

Fisher és Fairful 1984-ben kimutatták, hogy a magasabb hűtési sebesség és az optimális glicerín koncentráció csökkentése mutat a legjobb a felolvasztás után élősejtszámot. Vizsgálataik során 4-6% glicerín koncentrációt és 10-100°C/min hűtési sebességet alkalmaztak.

Voltak azonban olyan kísérletek is, ahol a kutatók, mint például Varnvskij és Varnavszkaja, (1976), Milovanov és mtsai (1985) viszonylag kis 2,0-3,5%-os glicerín koncentrációval dolgoztak. A glicerintartalmú hígító az előkészítés során egy-, illetve kétlépéses módszerrel adható az ejakulátumhoz a mélyhűtésre történő előkészítés során. Kezdetben a

glicerintartalmú hígítót 29°C-on, majd 5°C-on adták az ejakulátumhoz a mélyhűtésre történő előkészítés során. A vizsgálatok során egyértelműen az 5°C-on történő hozzáadást találták legalkalmasabbnak.

Francia kutatók Colas és Brice (1975) megállapították, hogy a laktóz és tojássárgája tartalmú hígítóban az INRA glicerol (analitikai tisztaságú glicerol) használata őrzi meg legjobban az ejakulátum termékenyítő képességét. A 4% glicerol hozzáadásának, pedig 4 és nem 30°C-on kell történnie. Vizsgálataik során azt találták, hogy a kétlépéses hígítás során hozzáadott glicerines rész egy lépésben történő hozzáadása legalább ugyanolyan, vagy még jobb eredményeket adott, mint a glicerintartalmú hígító több lépésben történő hozzáadása esetén. (Colas és Brice, 1975)

Salamon (1968), illetve Salamon és Lightfoot (1969) kutatási eredményeik alapján arról számoltak be, hogy az egy lépésben történő hígítás során kapott eredmények is voltak olyan jók, mint a kétlépéses hígítás során kapott eredmények, de a korábbi hígítási módszer hatékonysága függ a hígítóban használt szénhidrát komponensektől.

Lopatko (1976), valamint Abdelhakeam és mtsai. (1991) vizsgálataik során, 26%, 52% ellési % eredményeket kaptak a glicerol nélküli hígítóval történő mélyhűtésre történő előkészítéssel, 3 órával a spermavétel után történő 5°C-on 25-30%-os tojássárgáját, puffert, illetve 10% maltózt tartalmazó hígítóval végzett hígítást utáni mélyhűtésből származó szaporítóanyaggal történő termékenyítés eredményeként. A glicerint mellett számos egyéb hígító alapanyagául szolgáló szert is megvizsgáltak. Krioprotektív anyagként például dimetil, DMSO, etilén-glikol, albumin, kis molekulatömegű poliolok, polimer vegyületek, felületaktív anyagok, a cukrok magas koncentrációja, különböző típusú kompatibilis oldott anyagok, mint például a prolin, glicin-betain, taurin és fagyálló fehérjék. Azonban egyik vizsgált szer sem bizonyult jobbnak, mint a glicerol (Salamon és Maxwell, 1995).

Tojássárgája, mint összetevő

A tojássárgája gyakori alkotórésze a sperma hígítóknak, mivel védi a spermiumokat a mélyhűtés és visszamelegítés hatására bekövetkező sokk ellen védi a sejtmembránokat. A korai kutatások során 30-50%-ot használtak, a későbbi vizsgálatok legtöbbször azonban ennél alacsonyabb koncentrációt alkalmaztak a hígítóknak. Az ampullás fagyasztás során 3-6%-nyi mennyiséget alkalmaztak, a pelletben történő fagyasztásra azonban 15%-os

menyiség volt az optimális bár a hatás függ a hígító összetételétől is. (Salamon és Lightfoot, 1969)

Abdelhakeam és mtsai (1991) szerint a kossperma glicerín nélküli fagyasztása esetén a tojássárgája 25-30%-os koncentrációra történő növelése válik szükségessé a plazma membrán védelme.

A mélyhűtés és felolvasztás

A mélyhűtés előtti hígításra kezdetben a kutatók 11-26-szoros, a későbbiekben viszont 2-6-szoros hígítási arányokat alkalmaztak. Mivel a hígítót nem igazították a különböző mértékű hígítás hatását nem lehetett meghatározni. Manapság 2-5-szörös hígítási arányokat alkalmaznak a mélyhűtés során és a hígító készítmény korrigált mértékét Salamon (1976), Evans és Maxwell (1987) határozták meg. A hígítás után a sperma hőmérsékletét 0°C körüli hőmérsékletre hűtötték ezzel csökkentve a metabolizmust. A mélyhűtés előtt a cél egy kiegyensúlyozott intra- és extracelluláris koncentráció. A kétlépéses partner bizonyos hígítási partnerhez. Optimális esetben a glicerín hozzáadása 2-5 °C-on történik. Azonban, ha a hígítás egy lépésben történik akkor 30°C-on kell végezni. Mindkét módszernél az egyensúlytalanság időtartama 1-3 óra között változik.

Raffinóztartalmú hígító esetében 1-2,5 egyensúlytalansági idő az optimális. Salamon (1976), Evans és Maxwell (1987) egy lépésben és glicerines tápközegben történő hígítást és 1,5-2 óra egyensúlytalansági időt javasol.

A hűtés mértéke jelentősen befolyásolja a hígított sperma fagyasztás utáni túlélését. Az ampullákban mélyhűtött sperma hűtése lassú hagyományos módszerrel történik. Ezt a módszert ritkán használják PVC minitube és pellet formában történő mélyhűtésre. (Salamon, 2000)

Colas és mtsai (1975) a műszalmában történő mélyhűtést folyékony nitrogén gőzben végezték. A hűtés sebességét a nitrogén gőztől való távolsággal szabályozták. Ha a műszalmákat a nitrogéngőz felett felfüggesztve előhűtést végeztek, akkor a nitrogéngőz csökkentette a túlélő spermiumok arányát. (Colas, 1975)

Visser és Salamon (1974), Fisher és Fairfull (1984) vizsgálataik eredményeképpen arra jutottak, hogy a hűtési sebesség összefüggésében van a glicerín koncentrációval. 10-100°C/min hűtési sebesség esetén a túlélés aránya csökkent.

A műszalmában történő mélyhűtés szempontjából a hőmérsékleti görbe alakja is fontos lehet. A hőmérsékleti görbe lineáris csökkenése helyett egy parabola alakú görbe, ami elérhető. (Salamon, 2000)

Rey (1957) megfigyelései szerint, ha a folyékony spermát közvetlen folyékony nitrogénbe helyezték, az azt eredményezte, hogy az összes spermiumsejt elpusztult. Ennek oka, hogy a folyékony nitrogénbe merítés esetén nagyon gyors a mélyhűtés sebessége.

Azonban amikor szárazjég felületére hígított sperma cseppeket pipettáztak, vagy fiolába töltött hígított spermát 5-7s-re folyékony nitrogénbe merítenek ezután néhány percig folyékony nitrogén gőzben tartották, végül folyékony nitrogénben került mélyhűtésre. A kutatók azt tapasztalták, hogy így a felolvasztás után a sperma motilitása és termékenyítési eredményei megfelelőek voltak (Visser és Salamon, 1974).

A mélyhűtött sperma felolvasztása

A mélyhűtés-visszaolvasztási eljárás és inkubálás fázisa egyaránt fontosak a túlélés szempontjából. A spermiumoknak, amelyek túléltek a -196°C -ot még mindig meg kell küzdenie a kiolvasztás során a számára kedvezőtlen hőmérséklettel.

A hűtési sebesség és felolvasztás egyaránt negatív hatást fejtenek ki a spermiumok túlélésére (Mazur, 1985). A hatás attól függ, hogy a hűtési sebesség már elég, az intracelluláris fagyasztáshoz, vagy elég alacsony ahhoz, hogy a sejt kiszáradjon a mélyhűtés során. Az előbbi eset a gyors felolvasztás megakadályozása érdekében kötelező, ha jelen van az átkristályosodás a spermiumok belsejében. A spermiumok gyors ütemben történő felengedése esetén szükség van a egy krioprotektív anyagra, amely jelen esetben a glicerint.

A korai kutatók között nem volt egyetértés az optimális visszaolvasztási hőmérséklet tekintetében. Néhány kutató úgy látja, hogy az ampullákban történő mélyhűtés a bikáknál alkalmazott módszer alkalmazása a jobb megoldás. Ebben az esetben a visszaolvasztás $40-43^{\circ}\text{C}$ -on történik. Más kutatók a felengedett ampullákat jeges -, $2-5^{\circ}\text{C}$ -os, illetve $6-8^{\circ}\text{C}$ -os vízben, vagy szobahőmérsékleten $18-20^{\circ}\text{C}$ javasolják. A legtöbb kutatásról szóló publikációban a gyorsfagyasztott 37°C -os vízfürdőben felolvasztott kossperma eredményei szerepelnek. A mélyhűtött kosspermát $38-42^{\circ}\text{C}$ -on engedik fel. Egyes kutatók ennél magasabb hőmérsékleten történő felolvasztást javasolnak. Véleményük szerint a $60-75^{\circ}\text{C}$ -on felolvasztott kossperma eredményei hasonlóak voltak a $38-42^{\circ}\text{C}$ -on történő felolvasztás után

kapott motilitási, akroszóma integritási és termékenyítési eredményekhez. A pelletben mélyhűtött sperma felolvasztása történhet akár nedves, vagy száraz kiolvasztással is. Előbbi esetben nem csupán a jelenlét, hanem a készítmény felolvasztását az oldat összetétele befolyásolta. A spermiumok motilitása nagyban függ a hígító összetételétől. A szacharóz-citrát-tojássárgája összetételű hígító inozit-citrát, glükóz és fruktóz oldatok a legjobbak. Visszaolvasztási hőmérsékletként 37°C javasolható. (Salamon és Maxwell, 2000)

Salamon és Visser (1972) szerint nincs összefüggés a mélyhűtés előtti hígításhoz használt hígító összetétele és a száraz, vagy nedves visszaolvasztás között. A különböző kutatók által alkalmazott visszamelegítési hőmérséklet a nedves és száraz felolvasztás esetén egyaránt a 37°C és 75°C közötti hőmérséklet.

Spermiumsejtek károsodása a mélyhűtés utáni felolvasztást követően

Mélyhűtés utáni visszamelegítést követően a spermiumsejtek 40-60%-a őrzi meg motilitását, ezen sejtek 20-30%-a, amely biológiai értelemben (funkcionálisan) is sértetlen marad. Ha a spermium motilis, de biológiai értelemben sérült, akkor kétséges, hogy alkalmas-e a petesejt megtermékenyítésére.

Kérdéses, hogy a spermiumok motilitása és szerkezeti változásai milyen mértékben érintettek a termékenyítőképesség szempontjából és hogy a változások egyidejűleg, vagy a mélyhűtés-visszaolvasztás mely szakaszaiban történtek.

A mélyhűtés során elszenvedett kriogén károsodás strukturális fizikai, vagy biokémiai és funkcionális. Strukturális kár keletkezhet a sejtplazmában (plazmamembránban), az akroszómában, vagy a mitokondriumban. A mélyhűtés során elszenvedett strukturális kár a kossperma esetében általában súlyosabb, mint a bikaspermánál. Mind az alacsony, mind a magas hűtési sebességgel mélyhűtött kossperma jobban megőrizte motilitását és morfológiai integritását. A spermiumsejt plazmamembránja és akroszómája sokkal érzékenyebben, mint a sejtmag és a farokrész közepdarabja. A külső membrán és az akroszóma sokkal sérülékenyebbek, mint a sejt belső membránrendszere. Megfigyelték, hogy a mitokondrium károsodott a mélyhűtés-felolvasztás során, azonban a farokrészben nem mutatkozott jelentős változás (Salamon és Maxwell, 2000).

A mélyhűtés során elszenvedett strukturális károsodást biokémiai változások (károsodások) is kísérik. A változások során a glutamin, oxálcetsav, transzamiláz, valamint lipoprotein,

aminosav veszteség következik be a sejtekben, csökken a foszfatáz aktivitás, illetve a koleszterin, amely növeli a nátrium és kálium tartalom csökkenését, inaktiválja a hialuronidáz és akrozin enzimeket, a sejt elveszíti prosztaglandin tartalmát, csökken az ATP és ADP szintézis, valamint az akroszóma proteolitikus aktivitása (Salamon és Maxwell, 1995).

A változások között említendő, hogy a mélyhűtés során a DNS denaturációja is előfordulhat, ami a kromatin szerkezetének változásában nyilvánul meg. Ezt a fajta változást bika, vaddisznó, macska, ember, valamint kos spermiumok esetében is észlelték (Maxwell, 1999). A fentiekben említett mélyhűtés hatására bekövetkező strukturális, illetve biokémiai változások a spermiumok női nemi utakban spermiumtranszport során való túlélési arány csökkenéséért, a funkcionális működési zavarokért, valamint termékenyítő képesség csökkenéséért felelősek. (Salamon és Maxwell, 2000)

Mélyhűtés és visszaolvasztás következtében bekövetkező motilitás csökkenés

A spermiumok életképességét és termékenyítőképességét a női nemi utakban számos kutató vizsgálta. Az általuk kapott eredmények és megfigyelések széleskörű áttekintését, összegzését és értékelését Salamon és Maxwell (1995b) végezte el. Közös munkájuk eredményeképpen megállapították, hogy a mélyhűtés után felmelegített spermiumsejtek esetében csökkent az életképesség. Az anyajuhok genitális traktusába jutva ugyanis nincs megfelelő motilitásuk, amely cervikális termékenyítés esetén a termékenyítési eredmények jelentős csökkenéséhez vezet. Cervikális termékenyítés esetén ugyanis a mélyhűtés után visszaolvasztott spermiumok pusztulása nagyobb arányú, mint a friss spermiumok esetében (Maxwell és Gillian, 1999).

Amikor azonban a mélyhűtés után felolvasztott spermiumokat közvetlenül a méhszarvakba, vagy a petevezetőbe helyezik, akkor akár 85-95%-os termékenyítési eredményeket is elérhetnek, ez azt mutatja, hogy a biológiailag ép spermiumok megőrzik termékenyítő képességüket a mélyhűtés-felolvasztás során (Salamon, Maxwell, 2000).

6.2.2.3. Szedimentálás, szexálás

A különböző nemek örökítéséért felelős kromoszómákat tartalmazó spermiumsejtek szétválasztását jelenti, így elősegíti, hogy az utódok nemének aránya megfelelő legyen. Gazdasági állatok esetében ugyanis a nőivarú állatok „előállítás” nagyobb arányban szükséges, mint a hímivarú állatoké. Hímivarú állatokból kisebb létszám szükséges. Ez a

különböző nemi kromoszómákat tartalmazó spermiumsejtek szétválasztásával, úgynevezett szedimentálással lehetséges.

A mesterségesen biotechnikai eljárással előállított embriók nemének előzetes meghatározása is lehetséges. Ezt az eljárást embrió szexálásnak nevezzük. Segítségével a kívánt nemű embriók ültethetők be a vemhességet kihordó recipiens anyaállatba.

A szedimentálás hagyományos módszere

A módszer lényege, hogy a spermiumsejteket 2-4°C-ra hűtik leállítva ezzel a mozgásukat. Ennek következtében a nagyobb fajsúllyal rendelkező X kromoszómát tartalmazó spermiumsejtek leülepednek, így az alsó fázisban nagyobb számban lesznek jelen, amennyiben ezt az alsó fázist használjuk mesterséges termékenyítésre, akkor nagyobb arányban fogunk nőivarú utódokat kapni. (nőivarú utódok aránya kb. 60-63%). A módszer hatékonysága termékenyítési eredmények nélkül a különböző nemi kromoszómákat továbbörökítő spermiumsejtek festésével is ellenőrizhető. (Ez esetben a zöld színűre festődött Y kromoszómával rendelkező, hím ivari jelleget továbbörökítő spermiumsejtek, valamint a piros színűre festődő X kromoszómával rendelkező nőivari jelleget továbbörökítő spermiumsejtek aránya meghatározható a szedimentáció segítségével.) Az ülepítést követően a felső fázisban a fajsúlyuknál fogva a hímivart továbbörökítő nemi kromoszómával rendelkező spermiumsejtek kerülnek túlsúlyba. A középső fázis az indifferens fázis. Az alsó fázis pedig a termékenyítésre alkalmas fázis, amelyben a nőivart továbbörökítő X kromoszómával rendelkező hímivarsejteket tartalmazza nagyobb arányban.

Szexálás, szedimentálás flow-citometer segítségével

Néhány faj spermiumsejtjeinek ivari dimorfizmusa lehetővé teszi azt is, hogy flow-citometriás módszerekkel a különböző spermiumsejtek méreteit, valamint DNS tartalmát kontrollálják és ezek alapján szelektáljon a gép. Gondot okozhat, hogy ezen eljárás során a spermiumsejtek egy része megsérül.

6.2.2.4. Mesterséges termékenyítés alkalmazása a különböző állatfajok esetében

- Szarvasmarhánál és sertésnél a legelterjedtebb.
- Hideghatást a szarvasmarha spermiumsejtjei tűrik legjobban, a sertésé a legkevésbé.

- A ló és a kiskérődzők esetében ez a tolerancia a kettő között helyezkedik el.
- Kiskérődzők esetében a mélyhűtés helyes technológiájának kidolgozása még sok feladatot állít a kutatók elé.

Mesterséges termékenyítés

A kifejezés a II. világháború után jelent meg. Valószínűleg maga a elnevezés eredményezte a módszertől való idegenkedést. A második világháború után számos mesterséges anyag jelent meg az ipar fejlődésének következményeként. Ez okozta az idegenkedést a mesterséges termékenyítés kifejezéstől. Lényege, hogy a hímivarsejteket a megfelelő időben irányítottan juttassák a női nemi utakba és közelebb juttassák a megtermékenyítés helyéhez. A módszer állatfajonként változó és függ a termékenyítő anyag minőségétől is. Amennyiben a módszer természetes ivarzásban alkalmazzák, akkor csak a termékenyítő anyag női nemi utakba juttatásában tér el a természetes pároztatástól.

Különböző módszerekkel tartósított mélyhűtött szaporítóanyag cervikouterinális termékenyítéssel történő felhasználás eredményei

Salamon és Maxwell 1995-ben írt „Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination” című cikkében számos kutató kossperma mélyhűtési és termékenyítési eredményeit foglalta össze. Az alábbi táblázatban feltüntetett szerzők kossperma mélyhűtési kísérleteik során laktóz és tojássárgája alapú hígítót használtak. Ehhez majdnem minden esetben, kisebb-nagyobb arányban krioprotektív anyagként glicerolt, illetve INRA-glicerolt adtak. Az előkészítés során nem mindegy azonban a hígítás aránya és az, hogy a glicerinnel történő hígítás egy-, illetve két-, vagy akár több lépésben történik-e, illetve hány °C-on kerül hozzáadásra.

A szerzők között előfordulnak még olyanok is nevezetesen Colas és Guérin (1981), akik a mélyhűtés utáni visszaolvasztást követően centrifugálást és fölözött tejjel történő újrahígítást, majd ezt követően ismételt műszalmába töltést javasolnak. A fenti procedura után a szaporítóanyagot termékenyítés előtt 2-6 órán keresztül 15°C-on tárolták. Eredményül azt kapták, hogy a centrifugált, majd újra hígított kossperma jobb eredményeket mutatott, mint a kontrol minta. A termékenyítési eredmények függenek a spermavétel és termékenyítés idejétől is. Ez utóbbi főleg természetes ivarzásban történő termékenyítés esetén meghatározó

tényező. A termékenyítő anyag kezelésén túl a termékenyítés módja, a természetes ivarzásban történő, illetve prosztoglandin, PMSG, valamint FGA kezelés mellett történő termékenyítés eredményességébe már az anyai hatás is beleszól.

A termékenyítési kísérletek során nem elég ugyanis a termékenyítőanyag minőségének vizsgálata. Az ellési %-ba és a non-return indexbe már az anyai hatás is beleszól. A két mutató közül természetesen az ellési % a megbízhatóbb, mivel a non-return indexet torzíthatják a cikluszavaros, nem időben visszaivarzó anyák és a vetélések.

Természetesen a valódi termékenyítések mellett a Volkov (1968) által végzett in vitro kísérletek is megjelennek. Ezek eredményei még a non-return indexnél is rosszabb hatásfokúak. Ez azonban az anyai hatást zárja ki elsősorban, mert ez esetben a beágyazódás, illetve az 5 hónapos vemhesség teljes mértékben kimarad a vizsgálati eredményekből.

**Mélyhűtött szaporítóanyag előállítás szakirodalomban előforduló módszerei és
a termékenyítő anyaggal végzetttermékenyítés eredményei**

Hígító	Mélyhűtés módszere	Motilis spermiumok száma az inszemináláskor (X10 ⁶), vagy motilis sejtek aránya 1ml-ben	Inszeminálások száma	Inszeminált jerek/anya-juhok	Fertilitási % (bárányozás, visszaivarzás)	Egyéb megjegyzés
laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	56	21,4	A kosok nem kaptak szőjzsírtatakmányban
laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	61	34,4	A kosok kaptak szőjzsírt a takarmányban
laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	30	33,3	A kosok kaptak szőjzsírt a takarmányban
laktóz (13,3%)-tojássárgája	Pelletben, gyors mélyhűtés (20s)-150°C és -160°C közötti hőmérsékleten	150-180	2	29	38	Az ejakulátum tisztítva volt a hígítás előtt
laktóz-tojássárgája+ laktóz glicerol	műszalmában	180	2	23	35	30°C-on hozzáadott glicerines hígító (4% glicerinkoncentráció)
laktóz-tojássárgája+ laktóz glicerol	műszalmában	180	2	23	46	4°C-on hozzáadott glicerines hígító (4% glicerinkoncentráció)
laktóz-tojássárgája+ laktóz glicerol	műszalmában	180	2	91	34	Hígítási arány 900x10 ⁶ ml ⁻¹
laktóz-tojássárgája+ laktóz glicerol	műszalmában	180	2	101	25	Hígítási arány 1:4
laktóz-tojássárgája+ laktóz glicerol	műszalmában	180	2	91	38,5	A végleges hígítás 2% glicerolt tartalmaz.
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	79	55,7	A végleges hígítás 4% glicerolt tartalmaz.
laktóz-tojássárgája + laktóz glicerol	műszalmában	180	2	34	73,5	A végleges hígítás 4% glicerolt tartalmaz.
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	45	42,2	A végleges hígítás 4% glicerolt tartalmaz.
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	60	68,3	Termékenyítés természetes ivarzásban, a végleges hígításban 4%-os glicerol koncentráció
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	94	75	Termékenyítés ivarzás szinkronizált állatoknál, a végleges hígításban 4% glicerol koncentráció
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	131	20,6	Progesztagénal szinkronizált állatok termékenyítése, amelyek PMSG-t nem kaptak.
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	133	43,6	Progesztagénal kezelt állatok termékenyítése, amelyek a kezelést követően 400 NE PMSG-t kaptak.
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	145	59,2	Termékenyítési szezonban indukált ivarzás (FGA+PMSG)
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	108	53,7	Anösztrozusban indukált ivarzás (FGA+PMSG)
laktóz-tojássárgája + glicerol	műszalmában	180	2	99	34,3	FGA-val indukált ösztroz + PMSG
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	71	63,4	FGA-val indukált ösztroz + PMSG
laktóz-tojássárgája+ laktóz- tojássárgája-glicerol	műszalmában	180	2	45	42,2	2 lépésben történő hígítás
laktóz-tojássárgája + INRA glicerol	műszalmában	180	2	35	73,5	2 lépésben történő hígítás
laktóz-tojássárgája+ tris- glicerol	műszalmában	180	2	15	33,3	2 lépésben történő hígítás
laktóz és tojássárgája	pellet	NS	1		15,2	30 napos non-return index
laktóz-tojássárgája + INRA-glicerol	műszalmában	800	2	56	41	Spermium mélyhűtés tavasszal, termékenyítés ősszel.

Juh mélyhűtött termékenyítő anyagának gyakorlatban végzett előállítás és ellenőrzési módszerei

Ondóvétel

A törzstenyészetekben, ahol szaporító anyag tartósítást (2-4°C-on végzett hűtést, illetve -196°C-on végzett mélyhűtést) végeznek a szezonálisan poliösztuszos juhok esetében, mivel a hímvivarú állatoknál isi megfigyelhető egyfajta szezonális az ondóvételt elsősorban az őszi főszezonban, másodsorban pedig a tavaszi pótszezonban végzik. A szaporítóanyag feldolgozása (előkészítése, hígítása) a későbbi felhasználás módjától függ. Lehetséges ugyanis a frissen vett hígított ondóval, illetve a néhány napig 2-4°C-on hűtött, valamint a -196°C-on mélyhűtést követően visszaolvasztott szaporítóanyaggal való termékenyítés.

Az őszi fő, illetve tavaszi pótszezon előtti időszakban a szaporítóanyag termelése céljából tartott tenyészkosokat felkészítik az intenzív szaporítóanyagtermelés időszakára, annak érdekében, hogy ebben az időszakban a lehető legjobb minőségű és elegendő mennyiségű szaporítóanyagot termeljenek. Erre az energiában és fehérjében gazdag lucerna és abraktakarmányok, valamint az ezek mellé adagolt vitamin és ásványi anyag kiegészítők alkalmasak. Mindemellett a tenyészkosok számára ajánlott kiegészítéséként naponta egy tyúktojást is adni, amely kiváló fehérjeforrásként szolgál.

A tenyészkosokat nemcsak takarmányozással kell felkészíteni. Az aktív ondóvételi időszak előtt minimum 2 héttel 2-3 naponta ugratni kell őket, a megfelelő szaporító anyag minőség eléréséhez. Ennek az a célja, hogy a feldolgozásra, illetve felhasználásra szánt ejakulátumokba már megfelelően érett és nem előregedett spermiumsejtek kerüljenek, illetve az állatok ugratásra, műhüvelyre szoktatása is fontos.

Az ondóvételnél szükséges eszközök az alábbiak:

Termosztát (kb.40 °C-ra beállítva)

Műhüvely (39°C)

Vazelin

Duplafalú spermavételi pohár (39°C)

Kaloda

Kos, vagy ivarzó anyajuh (amelyre ugratnak)

Alkoholos filettoll

Az eszközöket már előző nap esete elő kell készíteni. A termosztátot és benne a tisztított fertőtlenített, vízzel feltöltött műhüvelyeket pedig elő kell melegíteni.

Előkészítésésondóvételmenete

- Az ondóvételt megelőző napon az előkészített spermavételi pohárral felszerelt vízzel feltöltött műhüvelyeket 40 °C-os termosztátba helyezzük.
- Másnap reggel a kalodába befogunk egy kost, vagy ivarzó anyát.
- Kivisszük a tálcán a műhüvelyeket és egy alkoholos filctollat
- Sorban leugratjuk a kosokat
- A leugratást követően szétszedjük a műhüvelyt
- Alkoholos filctollal ráírjuk a spermavételi pohárra a kos fűlszámát és a dátumot
- A spermavételi pohár oldalán leolvassuk az ejakulátum mennyiségét
- Szemrevételezzük az ejakulátumot, hogy nincs e benne szennyeződés, vér, genny, színe, szaga rendben van-e
- Ha rendben, akkor azonnal vigyük a laborba
- Majd következhet az újabb spermavétel a következő tenyészkostól

Vizsgálatok módszere

Fénymikroszkópos vizsgálat alkalmazása

A fénymikroszkópos vizsgálatok kiskérődzők szaporító anyagát előállító törzstenyészetekben alkalmazott rutinszerűen alkalmazott ellenőrző vizsgálatok, amelynek során a levett minták sűrűségét, tömegmozgását, illetve a hígított szaporítóanyagban az élő és szabályosan mozgó sejtek arányát határozzák meg. Ezen előzetes bírálat során dől el az, hogy a vizsgált ejakulátum alkalmas- e további feldolgozásra, tartósításra, termékenyítésre. A vizsgálat adatait a spermavételi naplóba negatíveredmény esetében is a helyszínen rögzítjük.

Vizsgálati adatok rögzítése

A spermavételi naplóba az alábbi adatokat kell feljegyezni:

- spermavétel dátuma
- kos fűlszáma
- ejakulátum mennyisége

- Tömegmozgás
- Sűrűség
- Hígítás aránya
- Hígított szaporítóanyag mennyisége
- Hígított szaporítóanyag minősége (tömegmozgás, sűrűség, élő és jól mozgó sejtek aránya 60-90%-ig változhat)
- Mélyhűtés esetén pelletek, vagy műszalmák száma, tárolás helye
- Ha gyenge minőségű volt a szaporító anyag és kidobtuk, akkor a feljegyzett adatokat át kell húzni.

A fénymikroszkópos vizsgálatok menete

A vizsgálatok során első lépésként fénymikroszkóp segítségével a friss ejakulátum tömegmozgását 5 M – 4 M -3 M- 2 M – 1 M jelzéssel osztályozzuk.

Az ejakulátum sűrűségét ugyancsak kis nagyítással bíráljuk, 5 S - 4 S - 3 S – 2 S -1 S jelzéssel osztályozzuk.

Az egyes ejakulátumok tömegmozgásának és sűrűségének bírálata így összbenyomás alapján kb. 6-10 másodperc időt vesz igénybe. (Gergácz, 2007)

Sűrűség fénymikroszkópos meghatározása és az ejakulátum mennyiségének meghatározása után a hígítás következik.

Majd a visszaolvasztás utáni élősejtszám meghatározás.



Fénymikroszkóp



Vízfürdő

Tartósításra, termékenyítésre való előkészítés

A tartósításra, termékenyítésre való előkészítése során, illetve a mélyhűtést követő különböző összetételű oldatokban történő visszaolvasztás során történő fluoreszcens festési eljárással

történő ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása is elvégezhető Olympus BHS mikroszkóppal és Hamupipőke nevű sejtszámláló program segítségével.

Pelletben mélyhűtésre való előkészítés menete

A mélyhűtésre való előkészítéshez kétféle hígítót kell alkalmazni. Az első hígító, melyet spermavételt követően rövid időn belül hozzá kell adni a spermiumsejtek hidratálását, táplálását és védelmét biztosítja, a második hígító az úgynevezett krioprotektív, azaz fagyásvédő anyagokat tartalmazó hígító, amelyet a 2-4°C-ra való lehűtést követően kell szakaszosan a szaporítóanyaghoz adagolni. Ezt követően az úgynevezett equilibráltatási idő következik, amely során a spermiumsejtek felveszik a krioprotektív anyagot tartalmazó hígítót, amely a mélyhűtés során megvédi a spermiumsejtek külső, illetve belső sejthártyáit a fagyás során keletkező jégkristályok okozta sérülések ellen.

A pelletben történő mélyhűtés esetén a hígítás 2 lépésben történik

- I. hígító: laktóz- tojássárgája
- II. hígító: laktóz-tojássárgája-glicerín (5 °C-on hozzáadva, szakaszosan adagolva)

Előhűtés, előkészítés, mélyhűtés fázisai:

- Testhőmérsékleten hígítás I-es hígítóval
- 20 °C-ra hűtés 1 óra alatt
- 5 °C-ra hűtés 1,5 óra alatt
- II-es hígító hozzáadása
- Equilibráltatás (1-2 óra)



2-4°C-ra történő hűtés

-Pelletálás szárazjégen



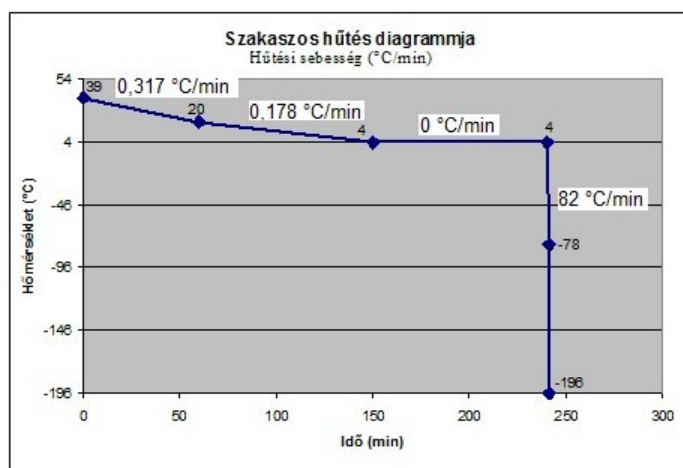
Szárazjég a felületébe vájt mélyedésekkel

-Folyékony N₂-be helyezés



Folyékony N₂-t tartalmazó tartály

Hűtési sebesség



Hűtési sebesség változása a mélyhűtésre való előkészítés során

A fentiek alapján megállapítható, hogy az átlagos hűtési sebesség: kb. 1 °C/min körüli.

A mélyhűtést követően a pelletek visszaolvasztása többféle összetételű oldatban lehetséges

- PBS oldatban (foszfát puffer oldat)
- PBS + spermaplazma (dekapacitáló faktorokat tartalmazó foszfát puffer oldat)
- PBS + vérsavó (dekapacitáló faktorokat tartalmazó foszfát puffer oldat)

Kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása CTC fluoreszcens festési eljárással

A klór-tetraciklin-hidroklorid (CTC) fluoreszcens festési eljárással végzett eljárás megmutatja a sejtmembrán és akroszóma azon elváltozásait, amelyek a termékenyítés során annak különböző szakaszaiban természetes úton is bekövetkeznek, mindezen elváltozások feltétlenül szükségesek a termékenyítés végbemeneteléhez, azonban a szaporítóanyag, vagy hígító nem megfelelő minősége, vagy akár a mélyhűtési és visszaolvasztási procedura következtében idő előtti bekövetkezésükkel az érett petesejtet elérve a spermiumsejtek már termékenyítőképtelenné válnak. Amennyiben ezen változásokon (kapacitációszerű elváltozás, akroszóma-reakció) átesett sejtek aránya túl magas a termékenyítésre szánt szaporítóanyagban akkor minősége nem megfelelő, termékenyítésre nem, vagy csak korlátozottan (laparoszkópos termékenyítéssel a méhszarvba juttatva) alkalmas.

A CTC fluoreszcens festési eljárás menete

A spermiumsejtek akroszóma reakciójának és kapacitációszerű elváltozásának meghatározására a Gillian és munkatársai (1997) által publikált festési eljárás az alábbiak szerint zajlik:

Gillian és mtsai. (1997) tanulmányában a CTC fluoreszcens festési eljárást alkalmazták a kos sperma kapacitációs állapotának meghatározására. A módszert már 1979-ben Sailing és Storey publikálták, 1984-ben Wand és Storey specializálták egér spermára.

A CTC festési eljáráshoz frissen elkészített festékoldat szükséges. A festékoldat 750 μmol CTC-HCl-t tartalmazott. Egy adag puffer Trist, NaCl-t, alfa-ciszteint is tartalmazott, amely szűréshez 0,2 mikrométeres szűrő(filtert) használtak és a pH-ját 7,8-ra állították be. Az oldatot 4°C-on tárolták.

Szobahőmérsékleten 45 mikroliter hígított spermamintát fénytől védett küvettába helyezték, majd ugyanannyi térfogatú CTC festő oldatot adtak hozzá. Ezután 30s alatt tökéletesen összerázták. Végül 10 mikroliter glualdehidet adtak hozzá.

A 10 mikroliter homogenizált szuszpenziót tiszta mikroszkóp tárgylemezre helyezték és 10 mikroliter 1,4-diazabicyclo-oktánt oldottak glicerinben sótartalmú foszfát puffer jelenlétében (1:9 arányban, 0°C alatt tárolva), hogy megvédje a fény káros hatásától. Végül fedőlemezeket helyeztek a mintára, a felesleges folyadék a tárgylemez és fedőlemez összenyomásával eltávolítható és a fedőlemez szélét színtelen lakkal lezárták. Az összes tárgylemezen 3 cseppet helyeztek el. A vizsgálatokat 4-szer ismételték meg. Tárgylemezenként összesen 200 spermiumsejt membrán és akroszóma állapotát határozták meg. A vizsgálatot 100-szoros nagyítással fluoreszcens fényforrással ellátott Olympus BHS mikroszkóp alatt végezték.

A bírálat során a spermiumsejteket 3 kategóriába sorolták:

- „F”: azonos fej fluoreszkálás, amely a nem kapacitált, sértetlen akroszómájú spermiumsejtekre jellemző
- „B”: halványan fluoreszkáló fej és a rendhagyó sáv mintázat a kapacitációszerű változáson átesett sejtekre jellemző
- „AR”: fluoreszkáló akroszóma az akroszóma-reakción átesett spermiumsejtekre jellemző

A spermiumsejt középső része bármely kategóriában megtartja fényesen fluoreszkáló (világító) képességét.

Az alábbiakban a CTC fluoreszcens festési eljárás segítségével elkülöníthető 3 kategória látható.



Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek



Kapacitációszerű elváltozáson átesett spermiumsejtek



Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek

Mélyhűtés során, valamint a női nemi utakban bekövetkező változások

Mélyhűtés hatására a spermiumok egy része átesik a kapacitációszerű elváltozáson és az akroszóma-reakción, amelynek idő előtti (a nőivarú állatok ivarútjaiba kerülése előtti) elváltozása kedvezőtlen hatást gyakorol azok termékenyítő képességére. A kapacitációszerű reakció egy a visszaolvasztás során dekapacitáló faktorokkal visszafordítható folyamat, az akroszóma-reakció viszont visszafordíthatatlan. Természetesen a két folyamat elengedhetetlenül szükséges a megtermékenyítéshez, de fontos, hogy azok megfelelő helyen és időben történjenek, ezért szükséges a mélyhűtési eljárás során a kapacitációszerű elváltozás és akroszóma-reakció lehető legkisebb mértékűre csökkentése, illetve a visszaolvasztást követően a dekapacitáló oldatok használata, hogy ennek segítségével a kapacitációszerű elváltozásokat visszafordíthassuk.

Kapacitáció

A kapacitáció folyamata a női ivarutakban történik. Időtartama 5 – 8 óra. Összetett folyamat, mely elengedhetetlen a spermiumok megtermékenyítő képességének kialakulásához.

Kapacitáció hiányában az akroszóma-reakció nem váltható ki. A kapacitáció egy reverzibilis folyamat. A spermium plazmamembránját maszkírozó glikoprotein, az ún. antikapacitációs faktor eltávolítása. A sejtbe hidrogénkarbonát ionok vándorolnak, s aktiválják az adenilciklázt. A plazmamembrán lipid- és glikoprotein összetétele módosul, hiperpolarizálódik. Fokozódik a sejt anyagcseréje, és mozgékonyága (hipermotilitás); hiperpolarizálódik. (Dobozy, 2007)



Ép membránnal rendelkező sejtek Kapacitációszerű változásos átesett sejtek

Akroszóma-reakció

A zona pellucida ZP3 molekulája (az ún. spermium-receptor) felelős az azonos fajú spermiumok megkötődéséért, és ezzel az akroszóma-reakció kiváltásáért. A spermium a plazmamembránjában található galaktozil-transzferázzal kapcsolódik a ZP3-hoz. Az akroszóma-reakciót a spermiumsejtek a ZP3-hoz való kötődése váltja ki. A kapcsolat hatására a spermium sejten belüli Ca^{2+} -koncentrációja megnő (a Ca^{2+} -ionok részben a sejten belüli raktárakból szabadulnak fel, részben pedig az extracelluláris térből áramlanak a sejtbe). A Ca^{2+} -koncentráció növekedése kiváltja az akroszóma vezikulum exocitózisát. Az akroszómából különböző enzimek, elsősorban proteázok szabadulnak fel, melyek a zona pellucida anyagait elbontják, lehetővé téve ezzel, hogy a spermium közelebb kerüljön a petesejt plazmamembránjához. Az akroszóma-reakció révén az akroszóma eredeti belső membránfelszíne a sejt felszínére kerül, ezzel új membránfehérjék válnak hozzáférhetővé. Az így felszínre került membránfehérjék specifikusan kapcsolódnak a zona pellucida ZP2 glikoproteinjéhez. Ez a kapcsolat előfeltétele a petesejt és a spermium plazmamembránja közötti fúciónak (Dobozy, 2007).



Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek

A kapacitáció és az akroszóma-reakció szerepe a megtermékenyítés folyamatában

Dobozy (2007) szerint

A megtermékenyítés folyamata

- 1.) A spermiumok kapacitációja
- 2.) Áthatolás a corona radiátán
- 3.) A spermium kapcsolódása a petesejt zona pellucidájához.
- 4.) Az akroszóma-reakció kialakulása
- 5.) A spermium áthaladása a zona pellucidán
- 6.) A spermium és a petesejt plazmamembránjának fúziója.
- 7.) Polispermia (többszörös megtermékenyítés) gátlása (Dobozy, 2007)

A mélyhűtés hatására különböző elváltozáson átesett sejtek arányának meghatározása Hamupipőke számláló program segítségével

A CTC fluoreszcens festési eljárással festett különböző elváltozásokon átesett sejtek (ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek számlálásához a Hamupipőke számlálóprogrammal lehetséges. A programot egyébként mikroszkópos számlálás megkönnyítése érdekében hozták létre. Amikor egy adott időben több kategóriába kell besorolni a mikroszkópos képen látott sejteket, mint például a Kovács-Foote festés esetén (amely hét festődési kategóriát különböztet meg az akroszóma, illetve a sejt élő/holt állapota alapján) a számlálást jelentősen megkönnyíti, a sejtszámláló berendezés használata. A program alkalmas a CTC fluoreszcens festési eljárással festett 3 kategóriába sorolható spermiumsejtek számlálására is. A program a klaviatúra Num Pad billentyűinek

paraméterezésével teszik lehetővé a festés értékelésénél a kategóriánkénti manuális adatbevitelt. A számítógép minden kategória esetén a billentyű lenyomásakor más és más hangot ad, így a számlálás alatt az operátor folyamatosan végezheti a mikroszkópos megfigyelést. A program számára a futtatás előtt meghatározható, hogy adott sejtszámot rendezzen-e a kategóriákba (ez esetben az adott sejtszám elérésekor a számlálás befejeződik), vagy az operátor állítsa-e le a számlálást. Az ismétlések száma szintén előre megadható. Az adatbevitel a képernyőn megfigyelhető, a számlálók minden egyes adat bevitele esetén kategóriánként változnak. A számlálás befejeztével a program a kategóriák szerinti átlageredményeket százalékban a szórással együtt olyan output formában menti el, ami az Excel táblázatkezelő program számára könnyen konvertálható, és lehetővé teszi a további statisztikai elemzést.

Mélyhűtött szaporítóanyag előállításának módszerei és méhszarkba történő mesterséges termékenyítéshez történő felhasználás során kapott termékenyítés eredményei

Salamon és Maxwell (1995) „Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement” című összefoglaló tudományos munkájában kiemelten foglalkozik a sebészeti, vagy félsebészeti úton méhszarkba történő mesterséges termékenyítéshez felhasználható mélyhűtött kossperma előkészítésével, mélyhűtésével, termékenyítés előtti kezelésével, illetve a szaporítóanyag adagolásával.

Mindezen paraméterek hatékonyságát a termékenyítési eredményeken keresztül értékelik a szerzők. Az említett szerzők közül a cikk Maxwell munkásságával foglalkozik a legrészletesebben. Maxwell jelen tudományos munkájában az inszeminálás utáni vemhesülést, illetve az ellési %-ot vizsgálta a mélyhűtött spermával sebészeti, illetve félsebészeti eljárással történő méhszarkba végzett termékenyítés esetében.

Az eredmények értékelésekor el kell azonban különíteni a termékenyült állatok-, illetve a ténylegesen ellett állatok arányát, azaz az ellési %-ot. Hozzá kell azonban azt is tenni, hogy ez esetben már az anyai hatás is erősen közrejátszik. Egyes eredmények esetében megfigyelhető, hogy a termékenyített anyajuhok a termékenyítést követően, 100 nap múlva vágásra kerültek.

Ez azt jelenti, hogy a kísérletben selejtes, vagy előregedett állományt használtak. Jelen körülmény szintén nem a legoptimálisabb. Erősen torzíthatja az eredmények alakulását.

Az esetben, ha nem selejtes, illetve előregedett állományról van szó az anyai hatás tényezői a fentiekben már említett szabálytalan ciklus, késői visszaivarzás, ivarzás elmaradása (főleg a szezon végén végzett termékenyítéseknél), valamint a vetélések, amelyek torzíthatják az eredményeket. Azonban hozzá kell tenni azt is, hogy ha normál korú és átlagosan termékenyíthető állományról van szó akkor ezzel a hatással normális esetben is számolni kell a felhasználás során. Lehetőség szerint ehhez kell igazodni és anyai oldalról is kell javítani a termékenyítési eredményeket.

Termékenyítési eredmények: A termékenyítési eredményekre jellemző, hogy akár 70% feletti eredmények is elérhetőek. Ez lenne az optimális, annak érdekében, hogy az ellési % is megfelelő legyen.

Ellési %: Az ellési % értékei általában alacsonyabbak az elfogadható értékek 55-60%-os eredmények voltak. Azonban előfordulnak kimagasló 60, sőt 70% feletti eredmények is. A legmagasabb érték, még a termékenyítési eredmények 76%-os eredményénél is magasabb 76,8%.

Ezek az eredmények jónak mondhatóak, azonban a sebészeti, illetve félsebészeti méhszarvakba történő termékenyítés költséges és bonyolult és munkaigényes, így kizárólag kutatási célból, vagy kimondottan értékes tenyészállatok szaporításához, illetve értékes tulajdonságok továbbörökítéséhez, illetve génmegőrzés céljából alkalmazható. A folyamat egyszerűsítésének okán a valódi cél olyan minőségű mélyhűtött kossperma előállítás, amely alkalmas cervikouterinális termékenyítésre és a fenti eredményekhez hasonló eredményt hoz. A mélyhűtött sperma javítható ugyanis a hígítás-, előkészítés módszerének javításával, optimális hűtési sebesség meghatározásával, krioprotektív anyagok hozzáadásával, visszamelegítés hőmérsékletével és körülményeivel, dekapacitáló faktorok használatával stb. További szerzők eredményeiről és munkásságáról az alábbiakban számolok be.

Quintana Casares és munkatársai (1990) 50 napos NR indexet vizsgáltak, melynek során 40,5-58,1%-os termékenyítési eredményeket kaptak.

Findlater és mtsai (1991) az ejakulátum különböző hígítási arányaival (2-4-szeres hígítás), illetve a termékenyítő anyag különböző adagokban történő használatával (40-160µl) kísérleteztek. Arra a következtetésre jutottak, hogy a nagyobb inszemináló adag, kisebb

hígítás összességében jobb eredményeket ad, mivel nagyobb a termékenyítés során használt motilis spermiumok száma. Következtetesként levonhatjuk, hogy a spermaadag módosításával (növelésével) növekszik a termékenyítés hatékonysága.

Jabbour és Avans (1991) a termékenyítési aránnyal foglalkoztak szuperovuláltatott állatok esetében. Eredményeik nagy szórást mutatnak 26,1% - 98,2%.

Mélyhűtött szaporítóanyag méhszarkvakba történő termékenyítésre előállított szaporító anyag és azzal végzett termékenyítés eredményei

Szerző	Hígító	Hígítás aránya	Mélyhűtés módszere	Motilis spermiumok száma amely inszeminálás-kor a 2 méhszarvba kerül (X10 ⁶)	Inszeminált jerek/anya-juhok	Fertilitási % (báranyozás, visszavárzás)	Egyéb megjegyzés	
Maxwell (1984)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	pelletben	40	837	50,7	A termékenyítéseket 17 különböző nyájban végezték.	
Maxwell és Buttler (1984)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	40	365	52,9	Vemhesülés és ellési %	
Maxwell és mtsai. (1984a)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	40	61	8,8-25,9	Anyajuhok termékenyítésre alkalmas petesejtekkel (2-3 nap) A vemhes anyajuhok 100 nappal a termékenyítés után vágóhídra kerültek.	
					56	17,6-54,4		
					59	50,0-68,0		
					60	54,3-76,0		
Eppleston és Roberts (1986)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	50	41	31,7	MAP spongya	Az összes termékenyített anyajuhra eső ellési% adat a legkisebb négyzetek összegében értendő/került megadásra.
					39	61,5		
					36	37	FGA spongya	
					31	51,2		
Maxwell és Barnes (1986)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	20	40	39,5	Az ivarzás szinkronizálás vaginális spongyával történt.	
					56	62,5		
Maxwell (1986a)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	20	50	54	* Inszeminálásonként termékenyített anyajuhok aránya (%) * Inszeminálásonként ellött anyajuhok aránya (%)	
					50	60		
					7	71,4*		
					41	70,7*		
					111	45,9		
					18	72,4*		
					107	55,1		
					6	33,3*		
					115	57,4		
					61	39,3		
Maxwell (1986b)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	20	75	29,3*	*Az inszeminált állatokra vetített ellési %.	
					5	164		
					10	85	Inszeminálás csak az egyik méhszarvba.	
					20	86		
					25	87	Inszeminálás mindkét méhszarvba.	
					50	103		
					75	44,9*		
					20	69	76,6*	
					23,3	37	40,5	
					Quintana Casares és munkatársai (1990)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	200-400x10 ⁶ spermium ml ⁻¹	Műszalmában
58,6	68	57,1						
77,1	66	57,4						
104,3	31	58,1						
Findlater és mtsai (1991)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	Pelletben	10,4	44	52	A sperma hígítása 4-szeres, inszemináló adag 80µl	
				20,8	44	53	A sperma hígítása 2-szeres, inszemináló adag 80µl	
				41,6	44	56	A sperma hígítása 3-szoros, inszemináló adag 80µl	
				83,2	44	67	A sperma hígítása 3-szoros, inszemináló adag 160µl	
				23		54	A spermadag módosításával növekszik a termékenyítés hatékonysága (Adagolás 40-160µl)	
				62,2	összesen 929	99		
104,3		61						
41,6	35	95						
Jabbour és Evans (1991)	Tris-glükóz-tojássárgája-glicerín	3	pelletben	41,6	36	65	Megtermékenyítési arány a szuperovuláltatott állatok esetében	
				41,6	35	46		
				52,2	35	57		
				62,2		85		
				52,2	összesen 999	98		
				62,2		82		

6.2.2.5. Ivarzás indukálás, ivarzás szinkronizálás

Ivarzás startoltatás

A gyakorlatban több állatfaj esetében alkalmazzák. Leggyakoribb alkalmazási területe a sertésstenyésztésben a kocák tenyésztésbe vételénél történik, illetve a leellett kocák újra termékenyítése előtt, amennyiben a kocák spontán ivarzása nem történik meg a leválasztást követő 10. napig, abban az esetben ivarzásstartoltatás céljából hormonkezelést alkalmaznak.

Juhok esetében az eljárást decemberi pecsenyebarány előállítás esetében alkalmazzák a gyakorlatban, amikor májusi anösztruszban végzett ivarzásstartoltatást végeznek.

Ivarzásindukálás

Ez esetben az állatok ivarzását egy előzetes hormonkezeléssel váltják ki, majd ezt követően, amennyiben az állatok ivarzni kezdenek, történik a termékenyítés.

Ivarzásszinkronizálás

Egy állatállományt, vagy állatcsoportot azonos időben történő ivarzásra készítetnek. Célja az ivarzások egy időszakra időzítése, annak érdekében, hogy a kezelt csoport termékenyítése és ellése időzíthető legyen egy adott időszakra. Az eljárás alkalmazásának előnyei között szerepelnek a munkaszervezési, és gazdasági szempontok (időben, jó áron értékesíthető, homogén állomány), sajátteljesítmény vizsgálatok végzése, illetve a kutatási célú kísérletek beállításának lehetősége.

Ellés szinkronizálás

Posztglandin F2-alfa hormon injekcióban való beadása segítségével biztosítható, hogy az ellések 2 napon belül beinduljanak. Ezzel szinkronizálható egy időszakra hozható a vemhes anyajuhok ellésének időpontja. Ez munkaszervezési, értékesítési, valamint kutatási szempontból lehet fontos.

A mesterséges termékenyítés története

Az eljárást kezdetben lovaknál alkalmazták, majd később szarvasmarhánál, juhnál, végül sertésnél. Dél-Nyugat Európa, majd Kelet-Európa után végül Közép-Európában, így Magyarországon is bevált eljárás lett elsősorban a szarvasmarha- és sertés fajok esetében elterjedt. Lovak esetében a mesterséges termékenyítést kezdetben a tenyésztők konzervatívizmusa miatt kétkedve fogadták. A lóállomány hirtelen csökkenése miatt a mesterséges termékenyítések száma visszaesett. Napjainkban azonban az ágazat államilag támogatottá vált és ismételten kezd előtérbe kerülni. A sertések mesterséges termékenyítését az 1970-es évek elején kezdték el a nagyüzemekben, majd ezt követően központi

spermaellátással az ország egész területén. A nagyüzemek egy részénél kezdetben csak rapszódikusan alkalmazták.

A mesterséges termékenyítés létjogosultságát elsősorban a vágóállat előállításban elért sikerek bizonyították. A kiváló minőségű vágóállat előállítás érdekében ugyanis lehetővé vált olyan tenyészkánok használata, amelyek segítségével hústermelés szempontjából a húsipar számára kiváló minőségű vágóállatok állíthatók elő.

A juhok mesterséges termékenyítését az 1950-es években nagy arányban kezdték meg. Sajnálatos módon ezt követően a mesterséges termékenyítés alkalmazása visszaszorult.

A mesterséges termékenyítés első magyarországi alkalmazásának évfordulója

2017-ben már a magyarországi mesterséges termékenyítés 70. évfordulóját ünnepeltük, amelynek az Állatorvostudományi-Egyetem adott otthont.

A mesterséges termékenyítés alkalmazásának főbb okai

Három csoportra oszthatók:

- Állategészségügyi okok
- Tenyésztési okok
- Gazdasági okok

Állategészségügyi szempontok

- Megszakítható a pároztatással történő betegségek fertőzési lánc
- Apaállatok állandó állatorvosi felügyelet alá kerülnek
- Az egyes apaállatok által termelt termékenyítőanyag rendszeres ellenőrzésre kerül, a kapott eredményeket regisztrálják
- termékenyítésre szánt nőivarú állatok ivari működését szakemberek ellenőrzik

Tenyésztési szempontok

- Termékenyítő anyag hosszú időre tárolhatóvá válik. (Génmegőrzés szempontjából nagyon előnyös.)
- A termékenyítő anyag szállítása és földrajzi korlátok nélküli felhasználása is lehetővé válik.

- Tenyésztés szempontjából egy gyorsabb genetikai előrehaladás érhető el
- Tenyésztési cél rövidebb idő alatt elérhető
- Az egy kedvező tulajdonságú apaállattól származó utódok száma magasabb.
- Termékenyítési adatok pontos regisztrálása válik lehetővé.
- Kiszűrhetővé válnak a genetikai terheltségek
- Folyamatos tenyésztéshigiéniai ellenőrzés

Gazdasági okok

- Kevesebb apaállatot kell felnevelni, felvásárolni, tartani, takarmányozni
- Gyorsan igazíthatóvá válik az állomány a piaci igények változásához
- A javító hatású apaállatok termékenyítő anyaga a világ bármely pontjára értékesíthető

Mesterséges termékenyítés

A mesterséges termékenyítés lényege a fertilis termékenyítőanyagot közel optimális időben kell a nemi utakba juttatni, a jobb helyre, mint ejakulátumát természetes pároztatásra a hímivarú állat juttatja. Ezt célozzák a termékenyítési technológiák állatfajonként különböző módszerei (Gergátz, 1998).

Termékenyítési technológiák

Ló esetében alkalmazott termékenyítési technológia

Lovak mesterséges termékenyítésének kezdete

Magyarországon a mesterséges termékenyítés a kancák vemhesítésével kezdődött. Kezdetben az állatorvosok később a kiképzett inszeminátorok a termékenyítő katétert a hüvelybe vezetett kézfejük segítségével a nyitott méhszájon, majd a nyakcsatornán keresztül a méhtestbe vezették. Így a hígított sperma ugyanúgy a méhtestbe jutott, mint az ejakulátum a csődör fedezésekor (Gergátz, 1998).

Szarvasmarha esetében alkalmazott termékenyítési technológia

A szarvasmarha-inszeminálást végző szakember a méh nyakcsatornáját a végbélbe vezetett kezével rögzíti, a spermát tartalmazó katétert a hüvely felső fala mellett a külső méhszájig (nyakcsatorna bejáratáig) vezeti. Megkeresi a méhszájat, majd ezt követően finom mozdulatokkal a termékenyítő katétert a külső méhszájon át a méh nyakcsatornájának elülső

harmadába, vagy a méhtestbe esetleg méhszarvba vezeti és e felületre fecskendezi a folyékony hígított spermát. A műszalmában mélyhűtött sperma bejuttatására az inszeminátor egy speciális katétert, úgynevezett „inszemináló pisztolyt” használ, amellyel a mélyhűtés után felolvasztott hígított spermát a megfelelő helyre a női nemi utakba vezeti (Gergátz, 1998).

A származás igazolása céljából a feliratozott műszalmát a termékenyítési jegyhez tűzik. A műszalmán feltüntetett adatok az alábbiak:

- bika neve
- fülszáma
- spermavétel ideje
- a termékenyítőanyagot feldolgozó laboratórium neve.

Sertés esetében alkalmazott termékenyítés technológia

A sertések mesterséges termékenyítésekor is természetes módon történő termékenyítéshez hasonlóan járnak el. A nyakcsatornába vezetett műanyag, vagy gumikatéteren át nagy mennyiségű, 50-80 ml hígított spermát juttatnak a méhtest üregébe. Az ivarzó koca méhszája gyakorlatilag nyitott így a katéter bevezetése viszonylag könnyen kivitelezhető. A kocák mesterséges termékenyítéséhez használt katéter vége speciális formára alakított. A termékenyítéshez használt hígított kanspermát 16°C-on tárolják, mivel az érzékeny az alacsonyabb hőmérsékletre (Gergátz, 1998).

Juh mesterséges termékenyítése

A juhok termékenyítésére sok helyen hígítatlan, vagy fölözött tejjel hígított spermát használtak. Ezen hagyományosnak mondható termékenyítési módszer alkalmazása során a katéterrel a külső méhszájra nyomták a termékenyítő anyagot (Gergátz, 1998).

Juh fajnál alkalmazott cervikouterinális termékenyítés

A cervikouterinális termékenyítés során a szaporítóanyag külső méhszájon keresztül nyakcsatornába minél mélyebbre történő bejuttatása a cél. Az eljáráshoz a nyakcsatornába juttatható Milovanov-katétert használnak, amely elősegíti a termékenyítőanyag nyakcsatornába való lehető legmélyebbre történő bejuttatását. A bejuttathatóság mélysége

függ az nőivarú állat ciklusától, az ellések számától, valamint a külső méhszáj alakjától, amely a juh fajnál négy kategóriába sorolható. (kacsacsőr, rozetta, vitorla, spirális) Szabados és mtsai. 2008-ban publikált eredményei szerint a rozetta formával rendelkező külső méhszáj a legoptimálisabb, a kacsacsőr pedig a legkedvezőtlenebb mkülső méhszáj alakulás a katéter bejuttathatósága szempontjából. Szabados (2005) és Gergátz (2007) kutatásai azt is bizonyították, hogy a katéter penetrációjának mélysége és a fogamzási eredmények között pozitív korreláció volt kimutatható. Tehát a termékenyítő anyag lehetséges legmélyebbre juttatása javítja a fertilitási eredményeket. Optimális esetben, amennyiben a felhasznált termékenyítő anyag 60% feletti élősejtszámmal rendelkezik a cervikouterinális termékenyítési eljárás sikeresen alkalmazható.



Cervikouterinális termékenyítés bemutatása

Laparoszkópos termékenyítés

Amennyiben azonban az élő és jól mozgó sejtek aránya ennél alacsonyabb (30-45%), abban az esetben a laparoszkópos termékenyítési eljárás javasolható, amelyet az alábbiak szerint végeznek. A műtőágyon fixált juh hasfalán három helyen metszést ejtenek. Az egyik nyíláson levegőt, vagy CO₂-t fújnak a hasüregbe, a másik nyíláson a fogót vezetik be, míg a harmadikon a száloptika fényforrásait, valamint a hígított spermát bejuttató katétert. Az eljárás során lehetőleg mindkét méhszarv falát átszúrva a hígított termékenyítőanyagot a méhszarvak lumenébe juttatják (Gergátz, 1998).

6.2.2.6.Embrióátültetés

Az embrióátültetés három munkafolyamatot foglal magában, melyek az alábbiak embriótermelés, embriógyűjtés és bírálát, beültetés recipiens állatba.

Az embriodonor állatnál hormonkezeléssel szuperovulációt váltanak ki. Ezen kezelés hatására az állat petefészkein egyszerre több tüsző érik meg. Ezáltal több érett petesejt termelődik. Az in vivo módszer alkalmazása során a donor állat megtermékenyítése a tüszőrepedés előtt történik. Ezt követően néhány nap várakozási idő következik, amikor a fejlődő zigóták már megfelelő érettségi és fejlettségi állapotba kerülnek. Ekkor már embrióknak nevezzük őket.

Következő lépésként kimossák őket a petevezetőből és a méhszarvakból. Az embriókat az adott fajnak megfelelő módszerrel összegyűjtik.

Juhembrió kinyerése (embriómosás)

Juh fajnál az embriómosás során a petevezetőbe egy steril katétert vezetnek a méhszarvba pedig fecskendő segítségével egy ún. PBS (foszfátpuffer oldatot) fecskendeznek. A petevezetőbe vezetett vékony katéter végén ülepítőcsészét helyeznek el, amelybe a méhszarvak végének belfogóval történő lefogását, majd PBS (foszfátpuffer oldat) befecskendezését követően kimossák az embriókat. Az embriógyűjtés (embriómosás) végezhető laparoszkópos, félsebészeti, vagy sebészeti eljárással.



Embriómosás a mosonmagyaróvári Pharmagene-Farm Kft. biotechnikai állomásán

Az embriógyűjtést (embriómosást) megelőzően az ülepítő csészéket termosztátba helyezik, majd ott testhőmérsékletűre melegítik, a szennyeződések elkerülése végett pedig parafilmmel fedik. Az embriómosást követően az ülepítő csészéket megjelölik, parafilmmel fedik, majd visszahelyezik a termosztátba.

A termosztátos inkubálást követően az embriók egy steril szobába kerülnek, ahol mikromanipulátorral felszerelt mikroszkóppal bírálják őket.



Olympus IX71 inverz mikroszkóp és Narishige mikromanipulátorok

Mikromanipulátorral felszerelt mikroszkóp

A megfelelő fejlettségi állapotú, ép embriókat fagyásvédő oldattal együtt előre feliratozott műszalmába szívják fel. Egy műszalmába két embrió kerül. Ezt követően az embriók mélyhűtését -196°C -os folyékony nitrogénben végzik vitrifikátor segítségével. A tárolás ugyanezen a hőmérsékleten folyékony nitrogénnel töltött tartályokban történik.



Juhembriók tárolására alkalmas 0,25 ml-es műszalmák és -196°C-on végzett folyékony nitrogénben történő tárolásra alkalmas tartályok

Ezt követően az embrióbeültetés során az embriókat egy előzetes hormonkezelésen átesett recipiens anyaállatba ültetik át a legtöbb esetben laparoszkópos eljárással. Azonban mindez műtéti, sebészeti eljárással is lehetséges.

Sertésembrió kinyerése

Setés faj esetében a méhszarv és a petevezető a juh fajnál alkalmazott előzőekben leírt módszerrel a sertés anatómiai felépítése miatt nem kivitelezhető. Ez esetben a katétert a méhszarv falán keresztül juttatjuk át annak lumenébe. Ezen a katéteren keresztül juttatjuk be az embriómosáshoz használt folyadékot, illetve ezen keresztül történik az embriók leszívása is.

Szarvasmarha embriók kinyerése

Szarvasmarhák esetében erre a célra egy kettős, vagy hármalfalú katétert alkalmaznak, amelyet a hüvelyen, külső méhszájon, nyakcsatornán, méhtesten át vezetnek be a méhszarvakba. A bevezetett katéter végétől 8-12 cm-re lévő vékony falú gumigyűrűbe levegőt préselnek, úgy hogy a méhtest felé elzárja a méhszarv lumenét, majd ezt követően a méhszarvakat a katéteren keresztül bejuttatott speciális folyadékkal átöblítik. A katéter másik járatán visszafolyó embriókat tartalmazó folyadékot felfogják.

Embrióbeültetés

Az embrióbeültetési módszerek sebészeti, vagy félsebészeti módszerekkel juh, kecske, sertés embriók esetében lehetséges, melynek során az embriót katéterrel a hasfalon keresztül, vagy a hüvely falán keresztül ejtett nyíláson keresztül a méhszarv falát átszúrva annak üregébe injektálják, ezzel közvetlenül a méhnyálkahártya felületére helyezik.

Szarvasmarhák esetében a módszer ennél egyszerűbb. Az embrióbeültetési eljárás során az embriót tartalmazó folyadékot egy inszemináló katéter segítségével a méhszarv üregébe, a közvetlenül a nyálkahártya felületére helyezik. A fentiekben ismertetett eljárás a szarvasmarha esetében olyan egyszerű, hogy inszeminátor, vagy akár maga az állattartó gazda is elvégezheti (Gergátz, 1998).

6.3.Biotechnológiai eljárások

Biotechnológiai eljárásokról akkor beszélhetünk, ha a sejtszinten elvégzett beavatkozással megváltoztatják az öröklésmenetet, és/vagy az örökítőanyag összetételét. A sejtszinten végzett biotechnológiai eljárással előállított, vagy kezelt sejtekből egy új állatot, vagy genetikai anyagukban módosított sejtpopulációt állítanak elő és azt ültetik be más szervezetekbe.

6.3.1.Makromanipulációs biotechnológiai eljárások

A sejtcsoportok manipulációja, például az embriómanipuláció esetében is megkülönböztetünk sejtmembránon kívüli fizikális beavatkozásokat, amelyeket makromanipulációs eljárásoknak nevezünk. Ilyen eljárások az embriófelezés, embriódarabolás, valamint az ezzel a módszerrel létrehozott monoizotikus, identikus ikrek létrehozása, illetve a kiméra előállítás.

6.3.1.1.Embriófelezés, embriódarabolás

Az embriófelezés, vagy embriódarabolás hasonlóan zajlik az egyetűjű, monoizotikus, identikus ikrek természetes úton történő kifejlődéséhez, amely során az zona pellucidával körülvett expandált blasztociszta sejtjei (barázdálódási golyói) osztódásuk során egyre jobban felszaporodnak. A felszaporodott sejtek (barázdálódási golyók) egy része az embriót körülvevő fényes sejthártyát, az ún. zona pellucidát átszakítva kibújik a zona pellucidán kívüli területre. Ez a folyamat az úgynevezett hatching, azaz kibújás. Az embrió ezen fejlődési

fázisában előfordulhat, hogy a zona pellucida repedésén keresztül kibújt sejtcsoport lehasad és abból egy külön élőlény fejlődik ki, amelynek genetikai állománya megegyezik a zona pellucidán belül marad sejtekből kifejlődött élőlényével. Természetes úton így jönnek létre az úgynevezett egypetűjű, másnéven monozigotikus, identikus ikerk.

Az embriófelezést, embriódarabolást az embrió expandálódott blasztociszta hatching, azaz kibújás szakaszában végzik. Ezen eljárás során a sejtosztódás eredményeképpen kirepedt falú zona pellucidán kívülre került sejtcsoportot mikrokéssel leválasztják, majd egy másik erre a célra előkészített „üres” zona pellucidába csomagolják. A két különválasztott embriófelet speciális erre a célra kifejlesztett folyadékban tárolják, majd ezt követően recipiens anyaállatba ültetik be.

Az embriódarabolás során azonban az embriók sérülnek, egyes barázdálódási golyók funkcióképtelenné válhatnak, sok el is pusztul közülük. Így ezen eljárásról elmondható, hogy jelentős veszteségekkel jár.

Szarvasmarhák esetében az embriódarabolás során már nemcsak felezést, hanem negyedelést is végeztek, melynek eredményeképpen négy identikus ikerborjú született, amelyből egy az ellést követően rövid időn belül elpusztult. További három viszont életben maradt.

6.3.1.2. Kiméra előállítás

Kiméra állatok előállításakor két (akár külön fajhoz tartozó) egyed embrionális sejtjeit összekeverve állítanak elő egy ivadékot, amely mindkét fajta sejtet tartalmazza. A gyakorlati felhasználás szempontjából a legfontosabb az, hogy az ivarsejtek esetében melyik (esetleg mindkét) egyed genetikai anyaga öröklődik tovább. Hazánkban juh- és kecskesejtek keverésével „*juhkecs*” utódot hoztak létre.

Dr. Gergátz Elemér 1986-ban munkatársaival Mosonmagyaróváron juh- és kecskeembrió részeket egyesített, amelyeket recipiens anyajuhba ültettek be. Az egyik utódbárány mekegett, és bizonyos külső jegyeiben (fej, lábak) is kecskére emlékeztetett. A kecske–birka kiméra az úgynevezett „*jukecs*” fertilis, hímivarú állat volt. Két és fél év múlva tüdőgyulladásban pusztult el, utódai juhok lettek.



„Juhkecs” kiméra embriófelezéssel hozták létre 1986-ban

6.3.2. Mikromanipulációs biotechnológiai eljárások

Mikromanipulációs biotechnológiai eljárásoknak, azon sejten belüli beavatkozásokat nevezzük, amelyek megváltoztatják az öröklésmenetet.

A mikromanipulációs eljárások során bizonyos anyagokat távolítanak el a sejt belsejéből, illetve idegen anyagokat juttatnak be, amely által megváltoztatjuk annak genetikai anyagát és működését. (pl. fehérjeszintézist)

Ilyen eljárások a klónozás és a génátültetés, amelyek lényege az alábbi fejezetek, illetve képek segítségével kerül bemutatásra.

6.3.2.1. Klónozás

A klónozás története

Csaknem 90 évvel ezelőtt kezdtek el foglalkozni a tudósok a klónozással. Először a német Hans Spemann hajtott végre sikeres sejtmagátültetést 1928-ban - ezért Nobel-díjat is kapott. De ez a sejt egy kétéltű sejtje volt. Ezek a kísérletek sikeresek is voltak, de az emlősökön végzett próbálkozások rendre kudarcot vallottak. (HTML1)

Elsőként 1986-ban sikerült emlőst klónozni. Steen Willadsen dán kutató Cambridge-ben juhembriók sejtmagjának átültetésével hozott létre új egyedeket. Az Edinburghi Egyetem állatkutatásokra specializálódott Roslin Intézetében az ő módszerének alkalmazásával jött világra 1995-ben Megan és Morag, két embrionális sejtenyészetből sejtmagátültetéssel létrehozott juh.

A kezdeti sikereket követően a Roslin Intézetben folytatott klónozási kísérletsorozat egy következő szintre lépett. Ian Wilmut kutatócsoportja egy 26 napos embrióból kinyert sejtek

magjával végzett klónozással folytatta kísérleteit, amelynek során szerzett tapasztalatok segítségével sikerült egy következő szintre lépniük és sikerült megvalósítaniuk a szomatikus sejtekből nyert sejtmagok genetikai anyagával végzett klónozást (HTML1).

Dolly bárány a világ első sikeresen szomatikus sejtek genetikai anyagából sejtmagátültetéssel klónozott emlőse

Később Ian Wilmut és Keith Campbell vezetésével a legszigorúbb titoktartás mellett folytatott kutatások 1996-ban hoztak áttörést. Július 5-én megszületett az első felnőtt egyed testi sejtjéből sejtmagátültetéssel létrehozott, genetikailag azonos utód, Dolly bárány, azonban a hírt csak később, 1997. február 22-én hozták nyilvánosságra (HTML1).



Forrás: Science Photo Library/Mopic



Forrás: Colin McPherson / AFP

(Forrás:<https://mno.hu/tudomany/husz-eve-ismertuk-meg-dolly-t-a-klonozot-baranyt1387406>)

Dolly klónozása

Ahhoz, hogy Dollyt megalkossák, három anyajuhra volt szükség. A klónozni kívánt, finn dorset fajtájú nőtény házi juh emlőmirigyéből kivett sejt magját egy másik nőtény sejtmagjától megfosztott, nem megtermékenyített, de érett petesejtjébe juttatták. A petesejtet egy skót blackface juhtól vették, hogy a laikusok számára is szemmel látható legyen majd a klónozás eredménye. A petesejt természetes megtermékenyítéskor megfigyelhető energiaváltozást elektromos áramlökéssel szimulálták. Az osztódásnak indult petesejtből

fejlődött embrió egy harmadik anyajuh méhében ültették be, amely kihordta a vemhességet (HTML1).

Dolly élete és utódai

Dollyt egy anyajuh tőgyének sejtjeiből vett sejtmag felhasználásával állították elő a skóciai Roslin Intézetben. Ian Wilmut és munkatársai e testi sejt (a tőgy egyik sejtje) genetikai anyagát egy kiüresített petesejtbe juttatták (nukleáris transzfer, azaz „maganyag-átviteli” technológia), s ebből indult fejlődésnek az embrió. A sikeres embrió 276 csődöt mondott társa előzte meg, ám így is óriási lépést jelentett a biotechnológiában. Dolly születését követően az egész életét a Roslin Intézetben töltötte (HTML1).



Dolly a Roslin Intézetben Ian Wilmuttal

(Forrás: https://index.hu/tudomany/2016/07/05/dolly_birka_klon/)

1998 és 2001 között hat utódot hozott a világra, 1998 áprilisában Bonnie-t, utána ikreket, majd hármas ikreket ellett (HTML1).

Egészségi állapota

2003 februárjában Dollyt elaltatták, hogy megszabadítsák azoktól a szenvedésektől, amelyeket egy előrehaladott, birkáknál gyakori tüdőbetegség okozott nála, mindemellett ízületi gyulladásban is szenvedett. Dolly összesen 6,5 évet élt (HTML1).

Dolly a múzeumban

Dolly testét tartósították, majd a Roslin Intézet átadta a Skót Nemzeti Múzeumnak. A klónozásban mérföldkövet jelentő állat így őrizték meg a jövő generációi számára.

Dolly egyik „elődje”, egy Morag nevű, 2000-ben elpusztult birka mellett kapott helyet. Moragot embrionális sejtéből klónozták – ugyancsak a Roslin Intézetben -, s az itt használt technikák nyitották meg az utat a felnőtt testi sejtéből történő klónozás felé (HTML1).



A kitömött Dolly

Forrás: [https://hu.wikipedia.org/wiki/Dolly_\(birka\)](https://hu.wikipedia.org/wiki/Dolly_(birka))

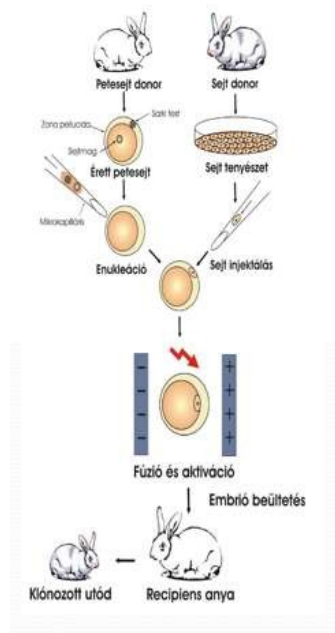
A klónozás módszerei

A klónozás legegyszerűbb módja a korai stádiumban lévő embriók darabolása, embriófelezés, amellyel tulajdonképpen genetikailag tökéletesen megegyező, monozigotikus identikus ikreket, valódi klónokat hozunk létre. Gergátz (1998) szerint a valódi klón alatt ugyanis az egyetlen sejtéből, a megtermékenyített petesejtéből létrehozott állatok csoportját értjük.

A klónozás ennél fejlettebb módszere a kimérikus klónozás, amelynek során létrehozott embriódarabok blasztomerjeit fiatalabb embriókba ültetését végzik. Ezen eljárás következtében az idősebb embriódarab barázdálódási golyói fejlődnek tovább. A fiatalabb embrió sejtjeiből csupán magzatburkok fejlődnek ki. ezzel a módszerrel sikerült öt bárányklónt létrehozni.

Az ennél fejlettebb klónozási technikák a sejtmagátültetési klónozási technológiák, melynek során kétféle sejtéből lehetséges klónok létrehozása. Az egyszerűbb módszer szerint 8-16 sejtés embrióbarázdálódási golyóit, a fejlettebb módszer szerint pedig szomatikus testi sejtek

sejtmagját ültetik át sejtmagjától megfosztott érett petesejtek citoplazmájába. A beültetési eljárást megelőzően a petesejtek citoplazmáját enzimekkel kezelik annak érdekében, hogy a sejtmag citoplazma fúziója végbemehessen. A mikromanipuláción átesett petesejtek sejtosztódását és fejlődését az örökítő anyagot tartalmazó sejtmag átültetését követően elektromos impulzussal indítják be. Ezt követően tápoldatban tenyésztik (amelynek során végbemennek a sejtosztódási és érési folyamatok), majd a kész embriókat vemhességet kihordó recipiens anyaállatokba ültetik be.



Sejtmagátültetéssel végzett klónozás sematikus ábrája

Forrás: Polgár, 2012

Magyarországon végzett klónozási kísérletek

Gazdasági állatokkal végzett klónozási kísérletek Magyarországon

Magyarországon is végeztek gazdasági állatok klónozását célzó kutatásokat. Az első ilyen kutatást Magyarországon 1983-ban a mosonmagyaróvári agrártudományi egyetem biotechnikai állomáson végezték. A kutatócsoportban résztvevő további intézmények a budapesti, valamint a bécsi állatorvostudományi egyetemek. A kísérletsorozat eredményeként embriófelezéssel létrehozott monozigotikus, identikus ikerbárányok születtek, amelyek egymás tökéletes klónjai voltak. 1992-1994 között számos sejtmaggal és karioplasztal végzett klónozási kísérletet végeztek a mosonmagyaróvári biotechnológiai állomáson. A

kísérletsorozat egyik legfontosabb eredményeként 1993 márciusában született meg az első 8-16 sejtes embrióból kinyert embrionális sejtek maganyagával végzett klónozás eredményeként létrehozott klónozott bárány.

Kísérleti állatokkal végzett klónozási kísérletek Magyarországon

Hazánkban elsőként sikerrel állított elő testi sejtől klónozott állatot egy gödöllői kutatócsoport. A kutatások során a petesejt magját egy másik egyed petesejtje körül található, úgynevezett kumulusz sejtől származó sejtmaggal helyettesítve új egér született. A Dinnyés András által vezetett kutatócsoport az első testi sejtekből előállított klónozott egeret Klonilla névre keresztelte. Az egér 2006. november 6-án látta meg a napvilágot. Ő volt az első hazánkban klónozás útján fogant és életben maradt állat (MTI, 2006).

Ez az eredmény a professzor elmondása szerint fontos lépés a mesterséges úton, sorozatban "gyártható" transzgenikus egerek, nyulak és más állatfajok előállítása technológiai rendszerének kimunkálására, amely nagy segítségül szolgálhat az orvostudománynak a különféle betegségek gyógyítása érdekében végzett kutatómunkához. A kísérleti alanyként felhasznált klónozott állatok sokaságánál egy-egy gén célzott megváltoztatásával a kutatók közelebb kerülhetnek a különféle betegségeket kiváltó genetikai okok jobb megértéséhez - mutatott rá Dinnyés András. A gödöllői intézet kutatócsoportja tervbe vette, hogy 2008-ig klónozott nyulat is előállít. A továbbiakban esetleg patkány, sertés, vagy szarvasmarha klónozására is kiterjed majd a tudományos munka, és a klónozás a veszélyeztetett fajok megmentésében is szerepet játszhat (MTI, 2006).



Klonilla a képen látható fekete egér

Forrás: www.index.hu



Klonillának 2009. január 16-án 8 utóda született.

Forrás: www.index.hu

6.3.2.2. Génátültetés

A génátültetési technika nagyon sokféle, gyors változáson megy át. Eredményes alkalmazásához alapvetően szükséges a kívánt gén azonosítása, identifikálása, klónozása. A génnek valamilyen alkalmas vektorhoz (vivőanyaghoz) kapcsolása úgy, hogy a gén a sejtbe bejuthasson, illetve, hogy bevihető legyen. Ehhez megfelelő beviteli módszert kell találni, majd ezt követően biztosítani a gén beépülését a kromoszómába. A beépülésen túl a kívánt hatás a gén működése is elengedhetetlenül szükséges. A gén beviteléhez alkalmazhatóak olyan különböző vektorok, mint például vírusok, bakteriofágok, amelyek bejuttatják a gént az adott sejtbe. A későbbiekben a génbevitelhez plazmid vektorokat alkalmaztak. A génbeviteli technológiák közül a mikroinjektációs technika bizonyult a legalkalmasabbnak. Ezzel a módszerrel lehetőség szerint a zigóta egyik előmagjába kell bevinni a gént. A génbeültetés sikeressége többféle módszerrel ellenőrizhető. Egyik ilyen módszer, hogy a bevinni kívánt génre úgynevezett jelzőgént építenek, amely például egyszerű színreakcióval kimutatja az átültetni kívánt gén beépülését.

A génbeültetés sikeressége az úgynevezett PCR-al is ellenőrizhető, azonban az így kapott pozitív eredmény még nem jelenti azt, hogy a bevitt gén funkcionál is. A génbevitellel elérni kívánt hatás kiváltása szolgálhat ennek bizonyítékául.

Génátültetést embrióba, vagy akár testi sejtbe is végezhetünk. Az előbbi eljárás szerepe, hogy az így létrehozott születendő utód, valamely kedvező tulajdonsággal rendelkezzen, utóbbi eljárásnak pedig például a génterápiában van szerepe.

Génátültetési kísérletek

A skóciai Roslin Intézetben 1997 nyarán létrehoztak egy Polly névre hallgató transzgénikus búranyit, amelynél az emberi IX. véralvadási faktor génje működik, s tejébe is ezt a fehérjét választja ki. A génátültetés és a klónozás segítségével tehát számos humán betegség kezelésére alkalmas gyógyszert lehet az eddiginél jóval olcsóbban előállítani. (Gergátz, 2003)

6.3.2.3. Géntérképezés

Az állatok és az ember géntérképének elkészítése e század genetikai kutatásai közö alapvető jelentőségű.

Miért van szükség géntérképekre?

- A kromoszómák megismerése után a kutatók egyszerűen tudni akarták, hogy az egyes tulajdonságokat kódoló gének melyik kromoszómán és hol helyezkednek el.
- A géntérképek elkészítésével tanulmányozni akarták a kromoszómák evolúcióját.
- E módszer segítségével szeretnék megbecsülni a genetikai távolságot a fajok és fajták között.
- Vannak olyan jelzőgének, amelyek fontos mennyiségi tulajdonságokat kódoló génekhez kötöttek. Ezek megismerése, majd jelentése alapján bizonyos szelekciót lehet végezni, a géntérképezés adataira egzakt tenyésztési programot lehet felépíteni.
- Fel akarják ismerni a genetikai defektusokért felelős géneket ugyanúgy, mint pl. vírusos betegségek elleni ún. rezisztenciagéneket.
- Meg akarják oldani a géntérképen alapuló klónozást. (Gergátz, 1998)

6.4. A termelés biotechnológiája

A gazdasági állatok nemesítését szolgáló módszerek fejlődésével az új biotechnológiai eljárások „forradalmi” lehetőségeket nyitnak meg a tenyésztők számára, lehetővé téve a termék-előállítás hatékonyságának további fokozását. A jövő állattenyésztői számára

meghatározó a módszerek lényegének megértéséhez szükséges biotechnológiai és molekuláris biológiai alapismeretek elsajátítása (Szabó és mtsai., 2004).

A mezőgazdasági, ezen belül az állattenyésztési biotechnológiai módszerek világszerte nagyon gyors ütemben fejlődnek, a gyakorlati felhasználásban azonban a transzgenikus haszonállatok termékei még csak nagyon kis számban vannak jelen. Véralvadási faktort és más orvosi fehérjéket már termelnek tejben, de a szabályozások szigorúsága és a technikai nehézségek lassítják a további előrelépést és a reprodukció területén, illetve a táplálkozási láncban való felhasználásokat. A forradalmian új módszerek elterjedése a XXI. században már nem csak gazdasági kérdés. A közvélemény és a média a törvényalkotókra gyakran a gazdasági lobbiknál is erősebb nyomást gyakorol. A biotechnológia társadalmi fogadtatása vegyes. Miközben a közvélemény jelentős része aggódik a Föld túlnépesedése, a genetikai betegségek terjedése és a környezetszennyezés miatt, ugyanezen emberek félelemmel tekintenek a „nem természetes” módon előállított növények, állatok, élelmiszerek megjelenésére, az új terápiás módszerekre, és gyakran a környezetszennyezést is csökkentő új technológiákra (Szabó és mtsai., 2004).

A biotechnológiai módszerek gyakorlatba történő fokozatos, átgondolt és biztonságos bevezetése jogos igény (amely számos „hagyományos” tenyésztési módszer esetében is hasznos lett volna). Más ellenérvek, gyakran a közvélemény és média hiányos ismereteit kihasználva, az új módszereket követni nem tudó, és így leszakadásra kárhoztatott érdekcsoportoktól származnak, a változások elodázását remélve. Hosszú távon azonban nem kétséges, hogy a módszerek többsége gyakorlati jelentőségű lesz, mivel csak így érhető el a termelést magas szinten biztosító, egyben környezeti terhelést csökkentő, a mainál jóval több ember ellátását biztosító, fenntartható mezőgazdasági rendszer (Szabó és mtsai., 2004).

6.4.1. A szaporodóképességet befolyásoló nagyhatású gének

Zöldág (2008) szerint az emlős háziállatokban feltárt fontosabb genetikai háttér szaporasági gének és ezek markerei. A lóban, elsősorban egyes telivér kancavonalakban öröklődik az ikererellés. A lótenyésztésben azonban ez nem kívánatos, kóros jellegnek minősül. A szarvasmarha ikerellése a húsmarha előállításban gazdaságilag hatékony értékmérő lehet. Az ovulációs rátára végzett szelekció ezért eredményes, és a módszerrel az állományok ikerelési gyakorisága akár 35%-ra is növelhető. Szarvasmarhában, több kromoszómán is (BTA1,

BTA5, BTA7, BTA9, BTA10, BTA11, BTA12, BTA15, BTA19, BTA23), génműködések (IGF1 lokusz polimorf alléljai) és mikroszatellitákat lokalizáltak az ikerovulációval és a szaporasággal kapcsolatban. Juhokban az iker és a többes ellésekért autoszomális (6-os kromoszómán) és X-hez kötött öröklődésű nagyhatású polimorf génmutációk (BMP15, BMPR-1B) a felelősek. A szaporasági géneket eredményesen alkalmazzák az új szapora juhtípusok és fajták előállításában. Sertésben az alomszám sokgénés mennyiségi jelleg, amelyre a gyenge öröklődhetőség miatt a szelekció csak kis hatékonysággal működik. A sertés számos kromoszómáján a nagyobb alomszámmal összefüggésben több DNS-markert (SSC4, SSC8, SSC13, SSC15) és nagyhatású szaporasági gént (ösztrogén-ESR, prolaktin-PRLR, GnRHR receptor, eritropoetinlokuszokat, SSC1, SSC16) mutattak ki (Zöldág, 2008). Zöldág (2008) szerint X-kromoszómához kötött szaporasági gének (Fec^X , BMP15, vagy GDF9B, growth differentiation factor). Szapora romney juhajtától származó inverdale állományban (Fec^X) figyeltek fel először a különleges szaporaságra, ahol a heterozigóták szaporák (mintegy 0,6-tal több bérány), a homozigóták a tüsszőfejlődés teljes blokkolásával, negatív dózishatás miatt terméketlenek és ovariális meddőek (10, 18). Más ír és új-zélandi juhajták (ír belclare és galway, új-zealandi inverdale, romney és hanna) szaporaságának és ikerellési hajlamának vizsgálatakor kiderült, hogy az X-hez kötött BMP15 génnek a Fec^X mellett, további alternatív mutánsai (Fec^{XB} , Fec^{XG} , Fec^{XH} allélek) is léteznek, amelyek hasonló módon fejtik ki hatásukat. A BMP15-ös génre kezdetben 80-90%-ban megbízható markerteszteket, majd 100%-os pontosságú közvetlen DNS-teszteket dolgoztak ki. A mutáns allélek kombinációi alapján a „kettős heterozigóták” is meddőek. A BMP15-ös és a BMPR-1^B génkombinációjú, két eltérő génhelyen valódi kettős heterozigóta anyajuhok viszont nagyon jó szaporaságot, négy fölötti ovulációs számot mutatnak (Davis, 2005, Hanrahan és mtsai., 2004, Zöldág, 2008).

6.4.2. Hústermelést befolyásoló nagyhatású gének juh és szarvasmarha fajban

A callipyge gén (CLPG)

1983-ban egy farmon az Amerikai Egyesült Államok Oklahoma államában született egy rendkívüli izmoltságot mutató dorset fajtájú kosbérány. Az izom hipertrófia különösen a farizmok esetén volt szembetűnő, de kisebb mértékben a hátizmokban is. Amikor a kossal normális izomzatú anyajuhokat termékenyítettek, az izomhipertrófia számos ivadékból

kimutatható volt. Később igazolták ebben egyetlen autoszomális gén szerepét. Az izomhipertrófia kialakításában szerepet játszó gén elnevezése callipyge (calli = (csoda)szép, pyge = far), jelölése CLPG. A gén két allélja a CLPG (mutáns) és a clpg (normális). (Szabó és mtsai., 2004)

COCKETT és mtsai. (1994) a CLPG gént a juh 18. kromoszóma telometriás szakaszára (a terminális régióhoz közel) lokalizálták a szarvasmarha 21. kromoszómáján található mikroszatellitek segítségével.

COCKETT és mtsai. (1996) a CLPG gén öröklődését tovább vizsgálva juh és szarvasmarha mikroszatellitek felhasználásával négy genotípus, illetve két fenotípus létezését igazolták:

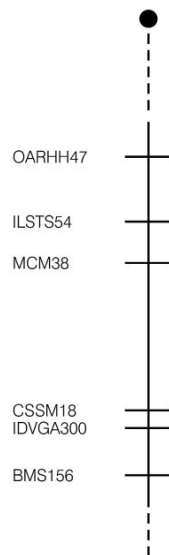
genotípus	fenotípus	
CLPGP/clpgM	(CN)	callipyge
CLPGP/CLPGM	(CC)	normális
clpgP/clpgM	(NN)	
clpgP/CLPGM	(NC)	
P = apai allél, M = anyai allél, C = mutáns allél, N = normális allél		

(Cockett és mtsai., 1996)

Az anyai (*M*) mutáns allél (*CLPGM*) inaktív, jelenlétében az apai mutáns allél (*CLPGP*) is inaktíválódik. Ez a jelenség a poláris overdominancia. (Cockett és mtsai., 1996)

A feltételezett *CLPG* gén eddig nem került azonosításra, így I. típusú marker sem áll rendelkezésre a könnyű és gyors in vitro diagnosztizálás céljára (génteszt), ami a gén tenyésztési felhasználását megkönnyítené. A 18. kromoszómán a *CLPG* gén feltételezett pozíciójához közepes területen az elmúlt évek során számos szarvasmarha és juh mikroszatellitot lokalizáltak. (Szabó és mtsai., 2004)

Legújabbban, az eddigi eredményeket is felhasználva, LIEN és mtsai. (1999) publikálták a juh 18. kromoszóma érintett területének kapcsoltsági térképét, amely magába foglalja a *CLPG* gént is. A bemutatott kapcsoltsági térkép birtokában a *CLPG* génhordozó juhok azonosíthatók, de nem 100%-os pontossággal. További, a *CLPG* génhez közelebbi markerekre van szükség a lókuszt pontos lokalizálásához és a *PCRRFLP* génteszt kidolgozásához. (Szabó és mtsai., 2004)



A 18. juhkromoszóma callipyge szakaszának kapcsoltsági térképe. A térképen hat mikroszatellit lókuszt látható (LIEN és mtsai. nyomán, 1998)

A far és a hosszú hátizom hipertrófiája eredményeként a callipyge fenotípussal rendelkező juhok hústermelési mutatói lényegesen jobbak, mint normális társaiké. Callipyge fenotípusú bárányok vágott testében a combizmok mennyisége átlagosan mintegy 15%-kal, a karaj és lapocka mennyisége pedig mintegy 5, illetve 3%-kal nagyobb. A vágott felek zsírtartalma kb. 4 százalékkal kisebb. A vágási hozam átlagosan 5%-kal jobb. (Szabó és mtsai., 2004)

6.4.3. Tejtermelést befolyásoló nagyhatású gének juh fajban

Tejtermelőképeség	Lokalizáció, hatás	DNS
TEJMENNYISÉG	QTL-ek különböző kromoszómán térképezve, kutatási stádium	NINCS
TEJFEHÉRJE GÉNEK		
Kappa-kazein	3 különböző pontmutáció, egyik sem befolyásolja a fehérjeszerkezetet; alacsony a mutánsok gyakorisága, nem egyértelmű hatás	Van
α 1-kazein	5 allél (A, B, C, D, E) - a D allél negatív hatással van a tejfehérje, tejszír tartalomra, és sajtkihozatalra) – hazánkban nagyon ritka az előfordulása, csak merinóban találtak D allélt - CC genotípusúak esetén nagyobb a tej kazein tartalma	Van
α 2-kazein	- 3 allél (A, B, C), nincsenek egyértelmű eredmények a tejtermelésre, tejbeltartalomra vonatkozóan	Van
β -kazein	- 3 allélja ismert (A, B, C); a C allél gyakorisága nagyon kicsi - hatása a tejhozamra, tejösszetételre és sajtglyártásra nem egyértelmű	Van

(Forrás: www.coursehero.hu)

Tejtermelést befolyásoló nagyhatású gének juh fajban

Tejtermelőképeség	Lokalizáció, hatás	DNS teszt
α -laktalbumin	- a 3-as kromoszómán található, két allélja ismert (A, B)	Van
β -laktoglobulin gén	- 3 allélja ismert (A, B, C); a C allél gyakorisága nagyon kicsi - hatása a tejhozamra, tejösszetételre és sajtglyártásra nem egyértelmű	Van

(Forrás: www.coursehero.hu)

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., Vazquez, I. A. (1991): Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen semen: fertility trials and effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology* 28: 36-42.
- Bakonyi G., Kassai K. (2011): DAS-59122 jelű Bt-kukorica vonal dekompozíciója szántóföldi körülmények között. In: Darvas B. (szerk.) Abs. I. Ökotoxikológiai Konferencia. Pp. 6-7.
- Balázs E., Dudits D., Sági L. (szerk.) (2011): Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében - Magyar Fehér Könyv. Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, Dudits Dénes, Szeged. 138 p.
- Bernstein, A.D., Petropavlovsky, V.V. (1993): Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 3(1): 41-43. (in Russian)
- Blackshaw, A. W., Emmens, C. W. (1995): Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. *Vet. Rec.* 65, 872.
- Blackshaw, A.W. (1954): The prevention of temperature shock of bull and ram semen. – *Aust. J. biol. Sci.* 7: 573-582.
- Charpentier, E., Doudna, J.A. (2013): Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* 495:50–51.
- Colas, G. (1975): Effect of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution on the survival and freezing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.*, 42: 277-285.
- Cseh S. (2009): Az ivarsejtek és embriók fagyasztásának elméleti alapjai és technikai vonatkozásai című a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Továbbképző Intézete által szervezett előadás – Válogatott fejezetek az andragógia és az asszisztált reprodukció című PhD tanfolyamon elhangzott előadás 2009.03.30 – 04.02.
- Csóti A., Peregovits L., Ronkay L., Darvas B. (2003): Adatok a Bt-kukoricapollen – érzékeny lepkelárvák rizikóanalíziséhez. In: Kuroli G. és mtsai. (szerk.): Abs. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok. Pp. 44.
- Darvas B., Kincses J., Vajdics Gy., Polgár A. L., Juracsek J., Ernst A., Székács A. (2003): A DK-440 BTY (YIELDGARD) Bt-kukorica pollenjének hatása a nappali pávaszem, *Inachis io* lárvákra (Nymphalidae). In: Kuroli G. és mtsai. (szerk.): Abs. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok. Pp. 45.
- Dauzier, L. (1956): Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. In: *Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. E. I., Cambridge* vol. 3 pp. 12-14.
- Davis, G.H. (2005): Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37: 11–23.
- Dobozi, O. (2007): A megtermékenyítés – Semmelweis Egyetem Genetikai Sejt- és Immunbiológiai Intézete 2007. február 7-én elhangzott előadás
- Dudits D., Györgyey J. (2013): Zöld GMO-k. Akadémiai Kiadó, Budapest. 146 p.
- Dudits D., Heszky L. (2014): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Educatio. 337 p.

- Erekly K. (1919): Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst. Paul Parey, Berlin. 84 p.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987): Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats Butterworths, Sydney, 194 pp.
- Fahy, G. M. (1986): The relevance of cryopreservation toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 23 1-13.
- Fisher, P.S., Fairfull, R.W. (1984): The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21: 542-551.
- Fodor Ferenc (szerk.) (2013): A növényi anyagcsere élettana. ELTE, Budapest. 371 p.
- Gergátz E. (1998): Biotechnológiai lehetőségek az állattenyésztésben In: Glatz Ferenc (1998): Biotechnológia: Lépéstartás Európával – Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 1998. pp. 70-96.
- Gergátz E. (2003): Állati embrió klónozása In: Hídvégi Egon (2003): A genom – Széphalom Könyvműhely, Budapest. pp. 243-250.
- Gergátz E. (2007): A juhok mesterséges termékenyítése In: Pécsi Tamás (2007): Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. pp. 335-367.
- Gillian, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 9: 481-487.
- Graham, E.F., Crabo, B.G., Pace, M.M. (1978): Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 47 (Suppl. 2): 80-119.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M. és mtsai (2004): Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70: 900–909.
- Heszky L. (2009): A koegzisztencia lehetetlensége. *Biokultúra* 4: 10-12.
- Heszky L. (2017): Transzgénikus (GMO) növények - elmélet és gyakorlat. Agrofórum Kiadó, Budapest. 352 p.
- Heszky L., Fésűs L., Hornok L. (szerk.) (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest. 366 p.
- ISAAA's GM Approval Database. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>
- Lopatko, M.I. (1976): A method of freezing animal semen in media without glycerol and egg yolk. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Crakow vol 4.* pp. 830-833.
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodríguez-Cerezo, E. (2011): New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC, European Union. 184 p.
- Maxwell, W.M.C. (1986a): Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. I. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 301-308.

- Maxwell, W.M.C. (1986b): Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. Effect of dose of spermatozoa and site of insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 309-316.
- Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillian, L., Gellatly, C.A. (1999): Normal fertility after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplement with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 11: 123-126.
- Mazur, P. (1985): Basic concepts in freezing cells. In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), *Deep Freezing of Boar Semen. Proc. 1st Int. Conf. Deep Freez. Boar Semen* Swedish Univ. Agr. Sciences, Uppsala, pp. 91-111.
- Milovanov, V.K., Varnavskaja, V.A., Shajdullin, I.N. (1985): Medium for deep freezing of semen. *Zhivotnovodstvo* No. 7: 39-41. (in Russian)
- Monostori T. (2015): A genetikailag módosított növények termesztésének élelmiszerbiztonsági kérdései. In: Monostori T., Benkő-Kiss Á. (szerk.): *A növénytermesztési technológiák élelmiszerbiztonsági kérdései.* SZTE MGK, Hódmezővásárhely. pp. 94-113.
- Nyitrai László (szerk.) (2013): *Géntechnológia és fehérjemérnökség.* ELTE, Budapest. 254 p.
- Ördög Vince (2014): *Mikroalgák biotechnológiai alkalmazása anóvénytermesztésben és növényvédelemben.* Doktori értekezés. NYME, Mosonmagyaróvár. 172 p.
- Platov, E.M. (1977): Study on freezing ram semen. *Ovtsevodstvo* 9: 35-37. (in Russian)
- Platov, E.M. (1988): Cryopreservation of ram spermatozoa. *Cryopreservation of Spermatozoa of Farm Animals. Agropromizdat, Leningrad*, pp. 161-195- (in Russian)
- Polgár Zsuzsanna (2012): *Nyúlembriók előállítása in vitro és mikromanipulációs módszerekkel, valamint embrió mélyhűtés fejlesztése az előbbi eljárás támogatására – doktori értekezés – Szent István Egyetem Állattudományi Doktori Iskola, Gödöllő, 2012*
- Rey, L.R. (1957): Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblast. *Proc R. Soc. Lond. Ser. B* 147: 460-466.
- Salamon, S. (1968): Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 355-360.
- Salamon, S., Lightfoot, R.J. (1969): Freezing of ram spermatozoa by the pellet method. I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 1527-1546.
- Salamon, S., Maxwell W.M.C. (1995): Frozen storage of ram semen II. Courses of low fertility after cervical insemination methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* In Press.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995): Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37: 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (2000): Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.
- Salamon, S., Visser D. (1976): Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 6058-618.

Smith, A., Nelson, R.J. (2003): Capillary electrophoresis of DNA. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 13: 10.9.1-10.9.16. doi:10.1002/0471142700.nc1009s13

Szabados, T., Gergátz, E., Gyökér, E., Csiba, A., Gyimóthy, G., Németh, A., Mihályfi, S. (2008): A külső méhszáj alakulások és a termékenyítő katéter bejuttathatóságának vizsgálata lacaune juhállományban. Állattenyésztés és Takarmányozás 57(1): 55-64.

Szabados, T., Gergátz, E., Vittinger, E., Tasi, Zs., Gyökér, E. (2005): Lambing rate as a function of artificial insemination depth in ewe lambs, primiparous and multiparous ewes. Acta Agraria Kaposváriensis 9: 41-49.

Szabó Ferenc (2004): Általános állattenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest

Szmirnov, I.V. (1949): Storage of semen of farm animals by deep-freezing. Sov. Zootech. 4: 63-65. (in Russian)

Szmirnov, I.V. (1950): Deep freezing of semen of farm animals. Zh. Obshch. Biol. 3: 185-197. (in Russian).

Varnavskij, A.N., Varnavskaja, V.A. (1976): Results of artificial insemination with frozen semen. Ovtsevodstvo 9: 19-20. (in Russian)

Velich I. (szerk.) (2001): Növénygenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 552 p.

Visser, D., Salamon, S. (1974): The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. S. Afr. J. Anim. Sci. 4: 157-163.

Wunderlich Lívius (2014): Molekuláris biológiai technikák. Typotex Kiadó, Budapest. 231 o. ISBN 978 963 279 174 6

Zheltobryuk, N.A., Ivakhnenko, V.K., Ajbasov, M.M. (1981): Freezing of ram semen in dextran containing diluents. Breeding of Sheep and Goats and Wool Production. All-Union Research Institute for Sheep and Goat Breeding, Stavropol, pp. 56-60. (in Russian)

Zöldág L. (2008): A szaporodás genetikai alapjai emlős háziállatokban. AWET Különszám 4., Gödöllő.

Internetes források

HTML1: <http://www.origo.hu/tudomany/20160703-dolly-klonozas-genetika-sejt.html>

HTML 2: www.coursehero.hu

HTML 3: www.index.hu

HTML 4: <http://nol.hu/archivum/archiv-424593-234709>

HTML 5: <http://users.atw.hu/gmora/alkalmazas.html>

HTML6: <https://mno.hu/tudomany/husz-eve-ismertuk-meg-dolly-t-a-klonozott-baranyt1387406>

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

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

SZÉCHENYI

2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE