

Fajhibridek – a keresztezés révén nagyobb genetikai változatosság



Zebroid = zebra + ló hibrid

sites.google.com/site/rareanimalspage/zebroids

- Egymáshoz közel álló fajok képesek lehetnek életképes utódot létrehozni.
- Az utód rendelkezhet szüleihez képest előnyös tulajdonságokkal (pl. a ló öszvér szívósabb, ellenállóbb a betegségekkel szemben és tovább él).



Grizzly + jegesmedve hibrid

By Corradox - Own work, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=63796271>

- Viszont a hibridek sokszor nem szaporodóképesek a szülőkétől eltérő kromoszóma szám miatt. (A kromoszóma szám jellemző egy adott fajra.)



„Szamár” öszvér



„Ló” öszvér

Növényi hibridek

a keresztezés révén nagyobb genetikai változatosság



Királybúza [2]

*Varga Frigyes kutató –
nemesítő nevéhez fűződik a
kifejlesztése*

- királybúza – a közönséges búza és a tönkölybúza mesterségesen létrehozott fajhibridje
- A legnagyobb szemű, tömegű és sűrűségű búzafaj [1].
- kedvező tulajdonságok a nagyobb genetikai változatosság révén → heterózis
- **Heterózis:** bizonyos szülői tulajdonságok hatványozott mértékű megjelenése az utódokban. Minél különbözőbbek voltak egymástól a szülők egy adott határon - a szaporíthatóság határán – belül, annál hatványozottabban erősödnek fel a szülői tulajdonságok.

*A keresztezéssel történő hibrid létrehozás hosszadalmas munka, mert meg kell várni, ameddig felnőnek az utódok, és ivaréretté válnak.
(A királybúza 30 éves fejlesztés eredménye.)*

[1] <https://hu.wikipedia.org/wiki/Kir%C3%A1lyb%C3%BAza>

[2] Készítette: Godlikezaza - A feltöltő saját munkája, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50452122>

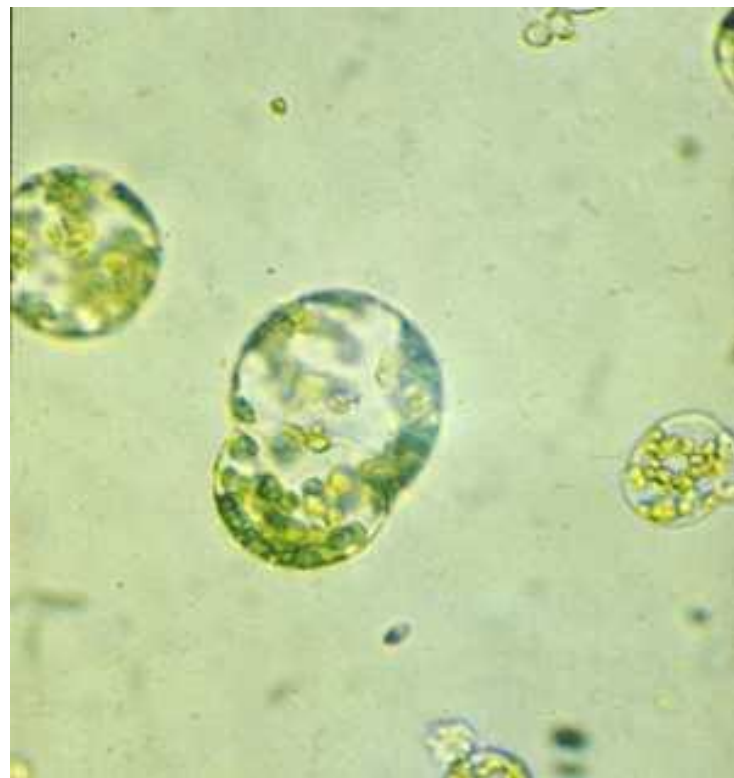
Protoplaszt fúzió (szomatikus fúzió)

- Az ivaros szaporodást “kikerülő” génmódosítás, elősorban növényeken alkalmazható
- **Két testi sejt** (nem ivarsejt!) **mesterséges egyesítését jelenti**
- Célja a faj vagy fajta genetikai megváltoztatása,
- számunkra előnyös tulajdonságok létrehozása érdekében. → **heterózis létrehozása**
- Miért van létjogosultsága a hagyományos növénynemesítés (ivaros szaporítás) mellett?

1. Lerövidíti az idejét.
2. Könnyebben átléphetők a fajok közötti korlátok.
3. A vegetatívan szaporított növények (pl. krumpli) génállományának frissítésére is lehetőséget nyújt.

Mit jelent a protoplaszt kifejezés?

Mi jellemző egy protoplaszt állapotú sejtre?



Protoplaszt fúzió

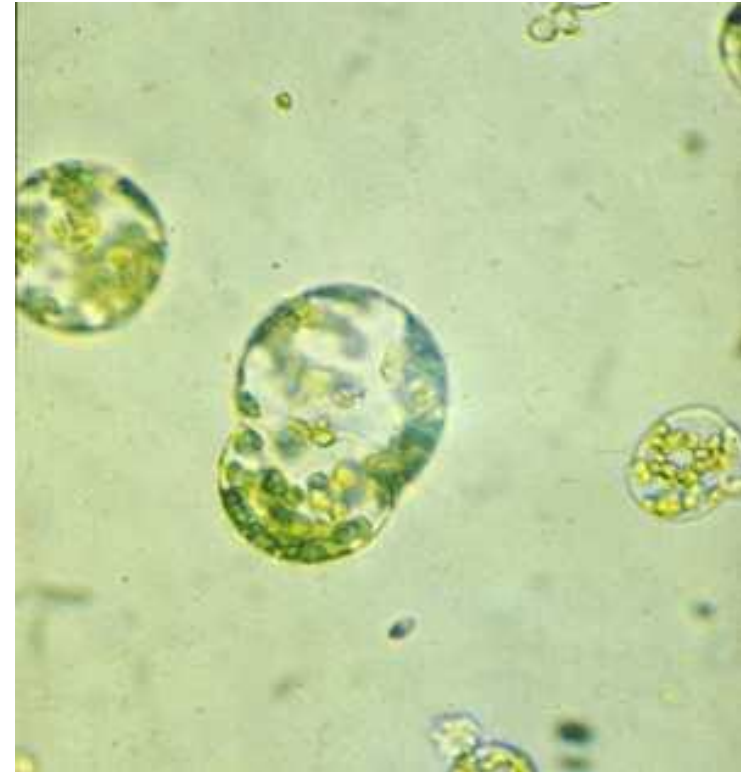
Protoplaszt: Sejtfalától megfosztott, kívülről csak **sejtmembránnal** borított sejt.

Mesterségesen hozzuk létre a sejtfal eltávolításával.

Elveszti az alakját, gömbölyű citoplazma cseppé válik. (A felületi feszültség gömb alakúra rántja össze.)

Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

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

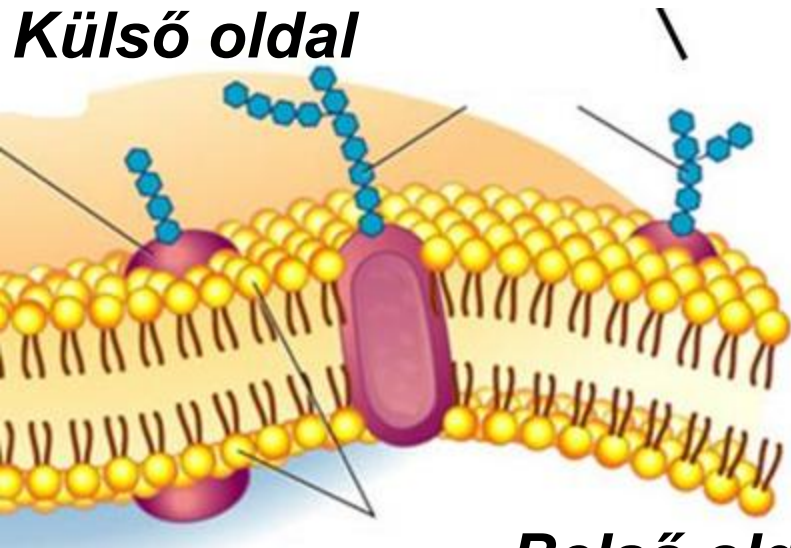


Sejtfal, sejtembrán, ozmózis...

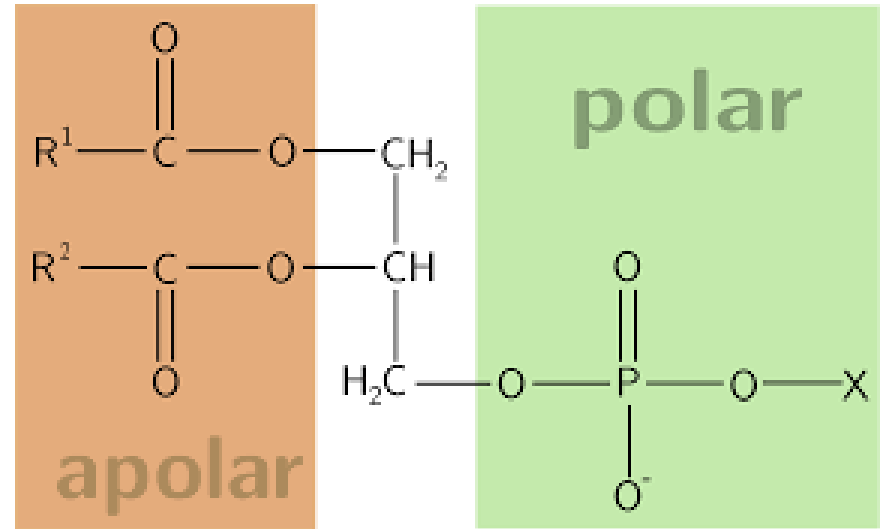


Sejtmembrán (sejthártya)

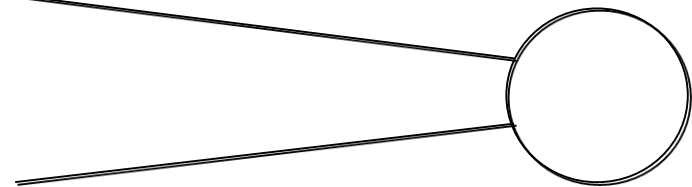
Külső oldal



Belső oldal



Egy lipid molekula szerkezete



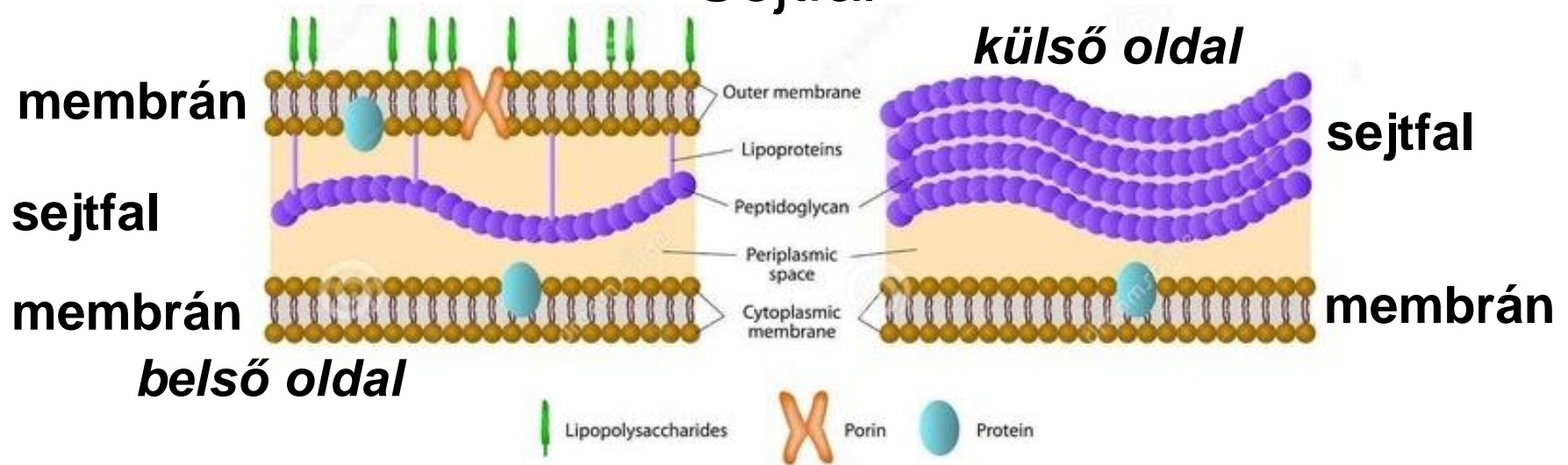
Hosszú apoláris szénlánc

Rövid poláris csoport

- zsírszerű anyagok = lipidek (sárga)
- Membránfehérjék (lila)
- felszíni cukor egységek (kék)
- **Apoláris** lánc és **poláris** „fej”
- Membrán nélkül a sejt elpusztul
- mert „egyensúlyba kerül” a környezetével.
- A membrán tehát egy határoló felület.
- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló felület.



Sejtfal

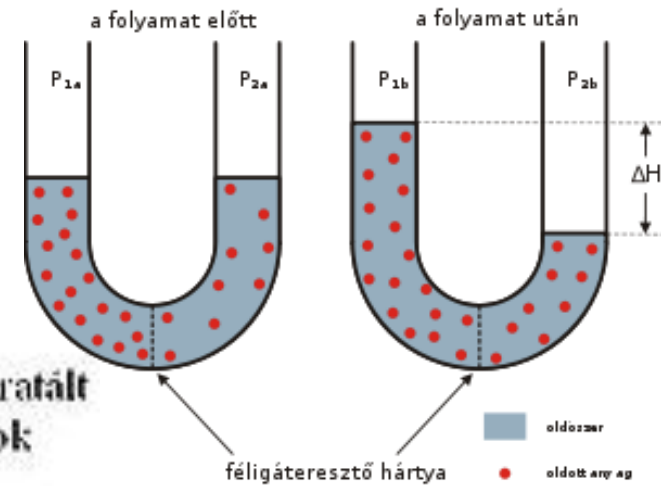
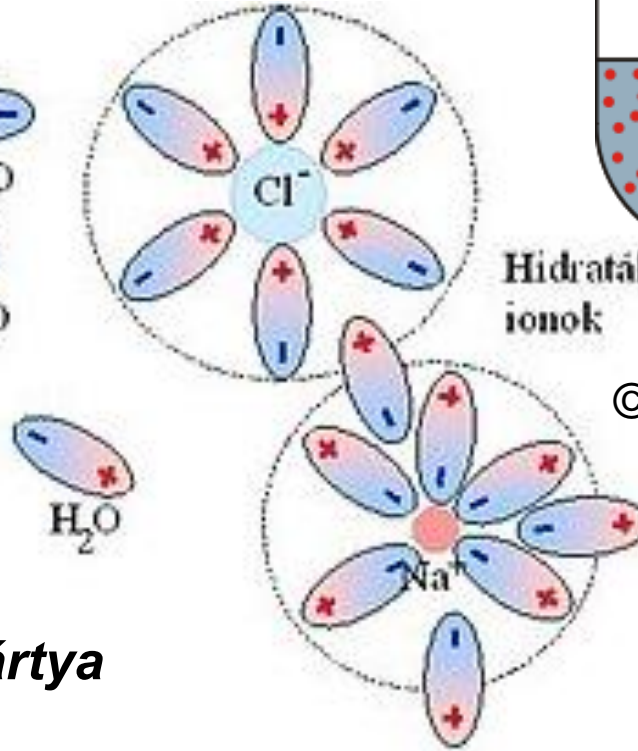
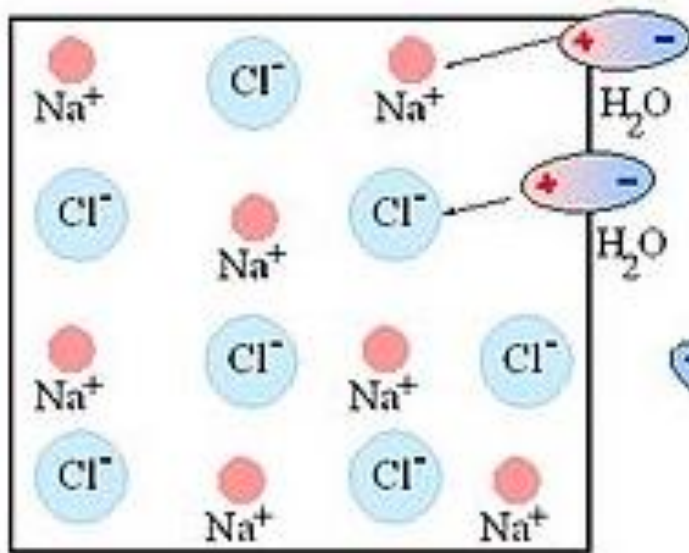


Gram-negatív (balra) és gram-pozitív (jobbra) baktériumok sejtfala

- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló felület.
- Felépülhet pl. szén-hidrát polimerekből vagy cukor-aminosav óriásmolekulákból.
- Növényeknek, gombáknak, a legtöbb baktériumnak, algáknak van...
- De az állatoknak és állati egysejtűeknek (protista-k) nincsen sejtfaluk.
- Szilárdít, mechanikai védelmet ad, durva szűrőként működik,
- Véd az **ozmotikus stressz** ellen. → sejt+sejtfal ~ „nyomástartó edény”



Az ozmózis



© Hans Hillewaert, osmosis, wikipedia.org

$$P_{\text{ozmózis}} = \rho \cdot g \cdot \Delta H$$

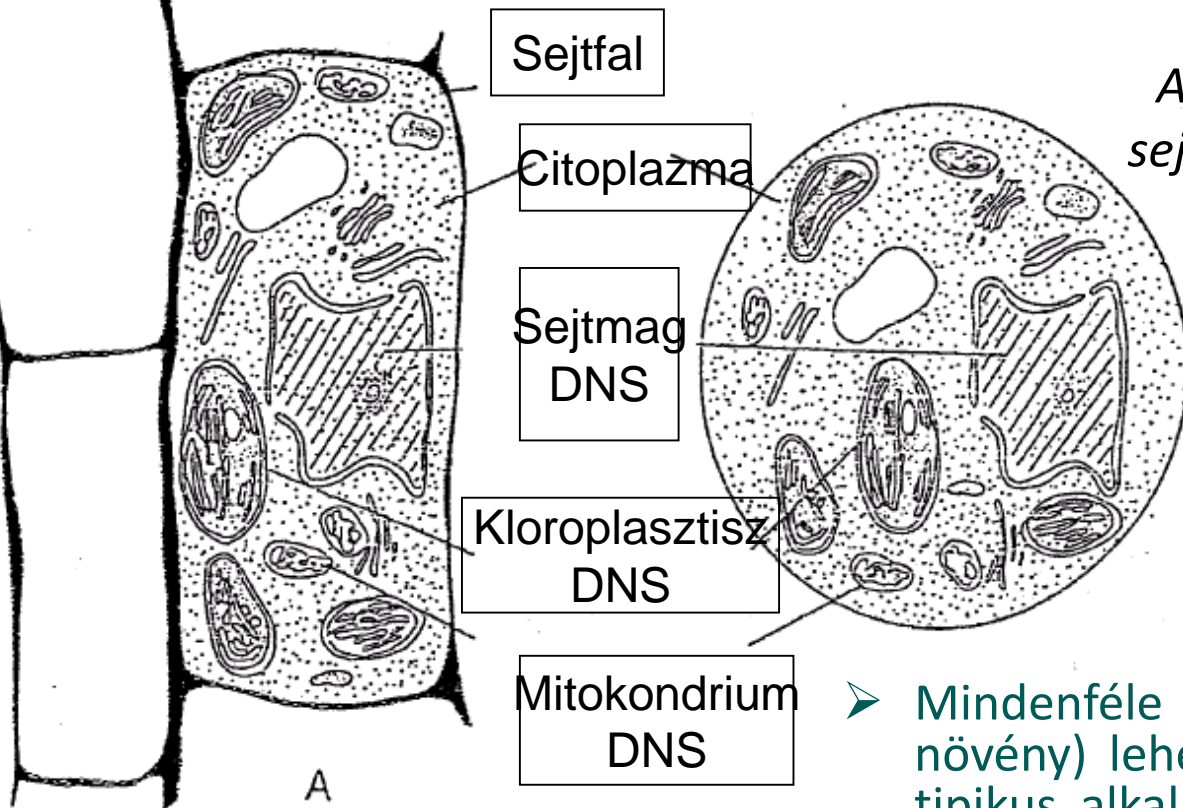
Négyzet: féligáteresztő hártya (pl. sejthártya)

© Dr. Báder Imre, ozmózis, wikipedia.hu

- Az oldószer (itt a víz) átjut a sejthártyán
- De a nagyobb molekulák (pl. fehérjék, RNS) nem tudnak kilépni
- Hajtóerő a belső és külső kémiai potenciál (~ a koncentrációkülönbség) kiegyenlítésére.
- Ozmózis nyomás fogalma



Milyen sejtekből lehet protoplasztot csinálni?



A sejtfaluktól megfosztott sejtek gömb alakúak, mert a felületi feszültség összehúzza őket.

1. ábra. A növényi sejt (A) és az abból izolált protoplaszt (B) váz tekintettel az örökítő- (genetikai) anyag lokalizálására

➤ Mindenféle sejtől (baktérium, élesztő, növény) lehet protoplasztot csinálni, de a tipikus alkalmazása a **növények genetikai manipulációja**.

- Ennek az az oka, hogy a növényi sejtekre jellemző a **totipotencia**, vagyis egyetlen növényi sejtől lehetőség van egy egész növényt regenerálni.
- Megj.: állati sejtekből nem szükséges protoplasztot csinálni, mert az állati sejteknek nincs vagy csak alig van sejtfaluk.
- Másrészt az állati sejtek nem totipotensek, belőlük jelenlegi tudásunk szerint nem regenerálható egy teljes, élő állat.

A protoplaszt előállítás (izolálás) lépései

Sejtfal lebontása:

1. *A megfelelő sejt kiválasztása*

Elvileg bármely sejtől előállítható, de a legegyszerűbb laboratóriumban nevelt növényi szövetanyagból.

2. ***Steril körülmények biztosítása:***

Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)
Manipuláció steril levegőjű térben

3. *A sejtfal leemésztése megfelelő enzimekkel.*

pl. celluláz – a cellulózt bontó enzim



A protoplaszt előállítás (izolálás) lépései

4. *Kíméletes körülmények:*

a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipetázás, centrifugálás, keverés, rázás során vigyázni

5. *Ozmotikus védelem:*

Plazmolitikumok - nem metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit) használata (10-13%).

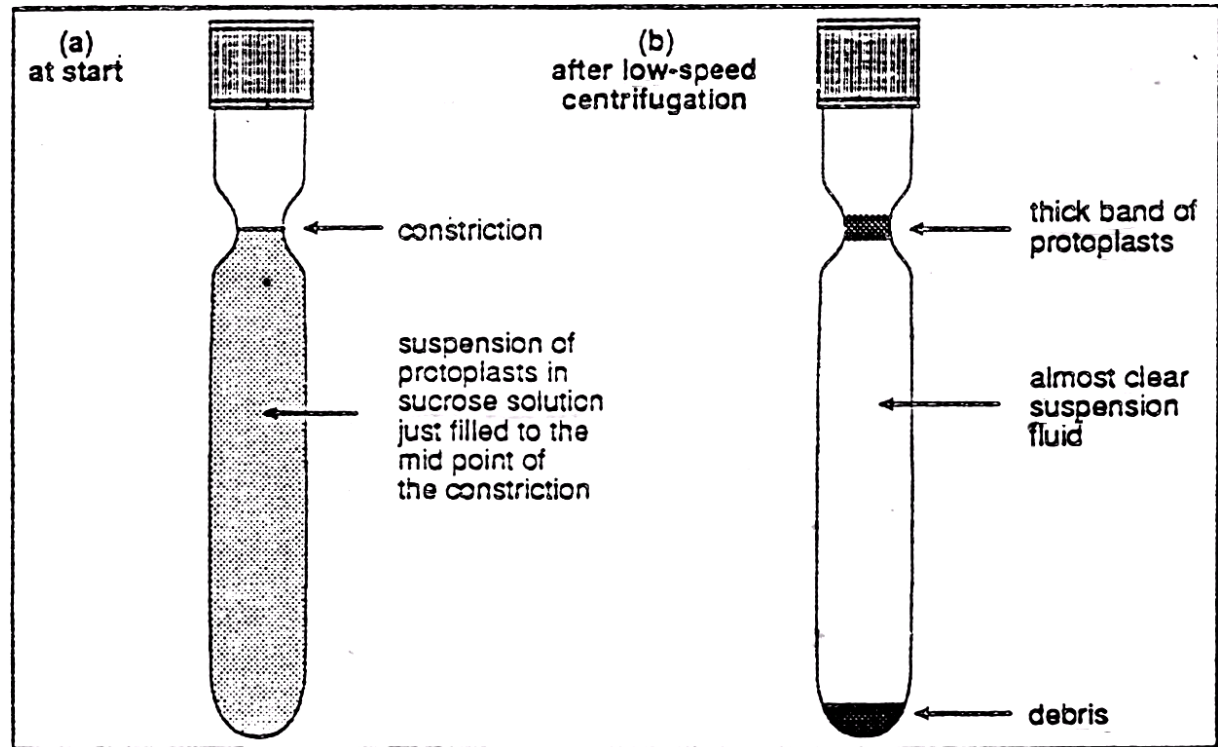
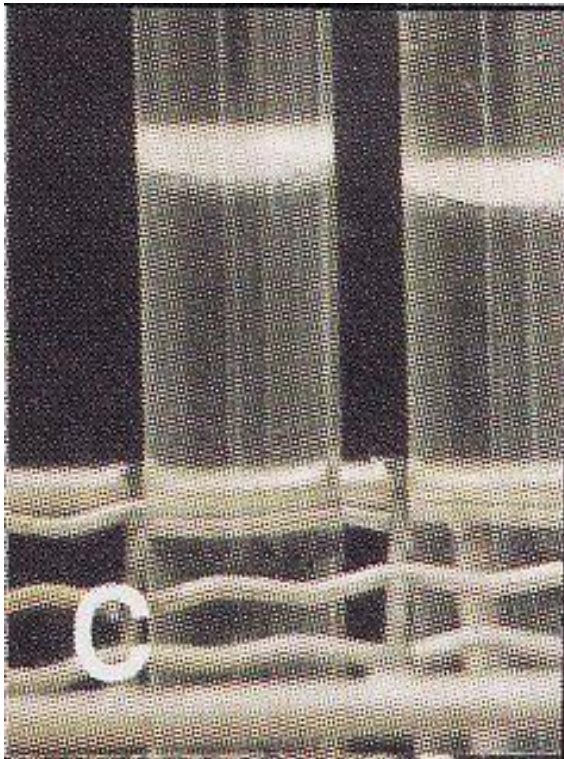
A glükóz vagy szacharóz erre nem jó, mert a sejtek elfogyasztják, ettől csökken a közeg ozmózisnyomása – elpusztulhat a sejt. Ezért csak a tápláláshoz adnak egy keveset.



Protoplaszt előállítás

Centrifugálás: BABCOCK-CSÖBEN, „felfugálás”

A protoplasztok sűrűsége kisebb, mint a cukor oldaté, ezért feljönnek felszínre. A növényi maradék pedig leülepszik.



A protoplasztok tenyésztése

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

A sikeres tenyésztéshez kellenek →

Szénhidrátok:

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

Tápanyagok: ásványi sók

Növényi hormonok

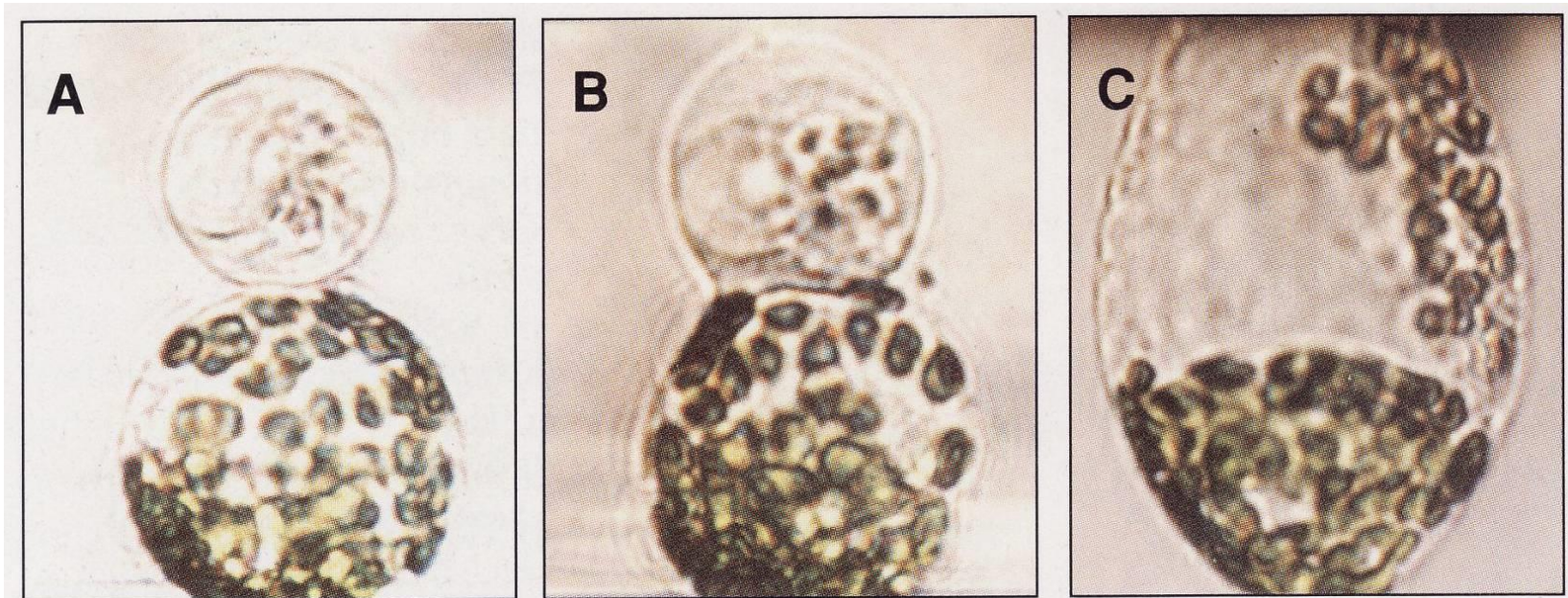
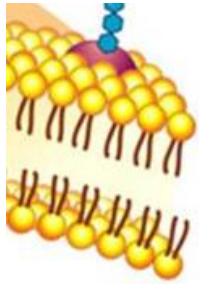
Módszer: mikroszkóp alatt, tárgylemezen, néhány cseppnyi folyadékban



Hogyan vehetünk rá két testi sejtet, hogy egyesüljenek?

Protoplaszt fúziós módszerek

- Elektromos és/vagy vegyszeres technikák állnak rendelkezésre.
- Mikroszkóp alatt, speciális tárgylemezen, folyadékban végzik.
- A sejtmembrán felépítése az egymástól távol álló fajokban is alapvetően azonos. Ha megzavarjuk a lipid molekulák egymással kialakított kölcsönhatásait, azok rávehetők, hogy egymással egyesüljenek.
- Megj.: ha egymásnak fújunk két szappanbuborékot, azok időnként összeolvadnak egyetlen nagy buborékká.



De mi lesz a hibrid sejttel a fúziót követően?

- A protoplaszt fúzió során két protoplaszt beltartalma egyesül, fuzionál.
- Eukarióták esetében a hibridnek két különböző sejtmagja lesz (**heterokarion**), és tartalmazza mindkét fél színtestjeit és mitokondriumait is (amelyek szintén tartalmaznak DNS-t).
- Egy idő után a protoplaszton belül a sejtmagok is találkozhatnak és fuzionálhatnak.
- A fúzió után a hibrid sejt a következő osztódások során a fölös számú kromoszómák nagy részét elveszti, és valamelyik szülő félhez válik hasonlóvá, csak néhány új gén/tulajdonság stabilizálódik.
- Ez a génmanipulációs módszer sem célzott, irányított, a létrejövő utódok tulajdonságai véletlenszerűen alakulnak ki.
- Emiatt mesterséges szelekcióval kell az életképesnek bizonyuló hibrid génállományú sejtek közül a számunkra ígéretes tulajdonságokkal rendelkezőket kiválasztani.

Heterokarion: (átmenetileg) egynél több sejtmagot tartalmazó sejt



Növények regenerálása protoplasztból

Mai tudásunk szerint az állati sejtek nem totipotensek, így állatot nem tudunk “regenerálni” (klónozni) protoplasztból.

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

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

A megfelelő növényi hormonok megfelelő időben történő adagolásának segítségével tudjuk a totipotens sejteket a szöveti differenciálódás (**szövetté fejlődés**) irányába terelni.

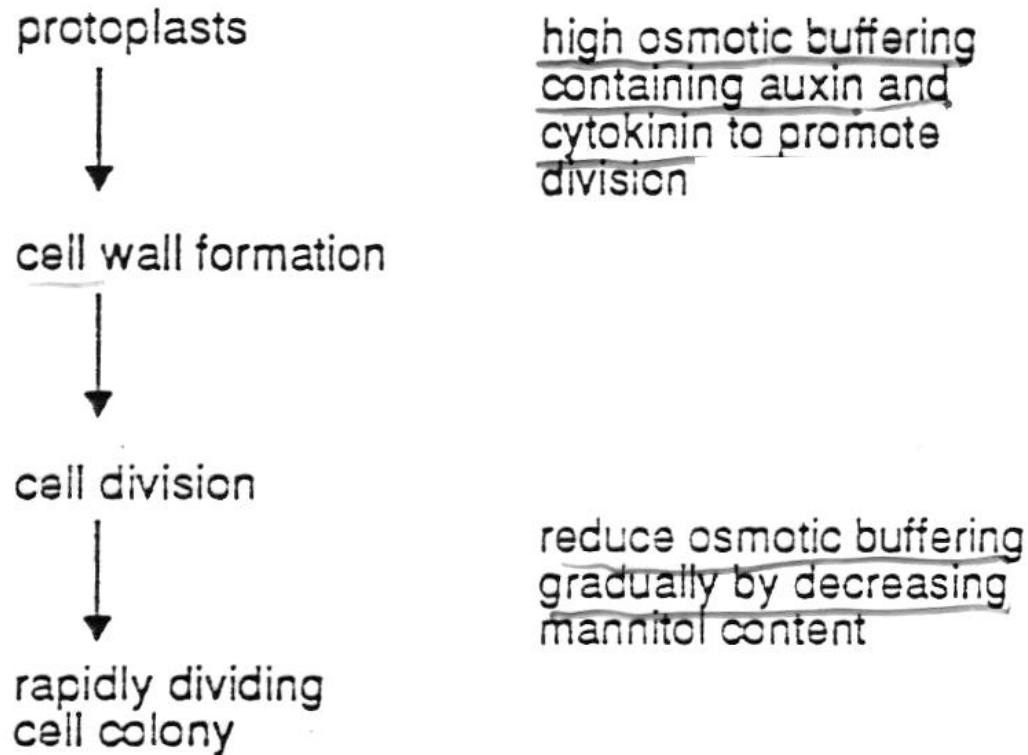


Protoplaszt tenyésztés, növény regenerálás

- A regenerálás első lépése a sejtfa újraképzése.
- A falszintézis a protoplaszt létrejöttének pillanatától megindul. Ezt a természetes folyamatot meg lehet gyorsítani, egyrészt hormonálisan, másrészt a közeg ozmózisnyomásának fokozatos csökkentésével.
- Pl.: a kiindulásnál 9 %-nyi mannitot a hetenkénti átoltásnál 6, majd 3 %-ra csökkentik.
- A regenerálódó sejtek előbb sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kalluszt** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.
- A megfelelő növényi hormonokkal való kezelés nemcsak a sejtfa szintézisét segíti elő, hanem a totipotens sejtek megfelelő irányba történő szöveti elköteleződését is elősegíti.
- A megfelelő növényi hormonál kezelt kallusz tenyészetből aztán teljes növényt lehet regenerálni.



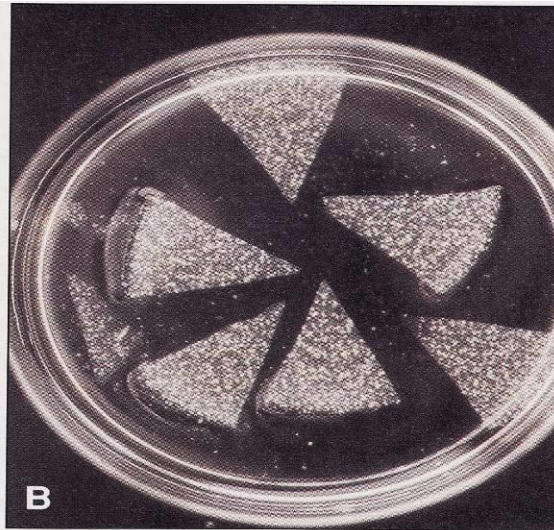
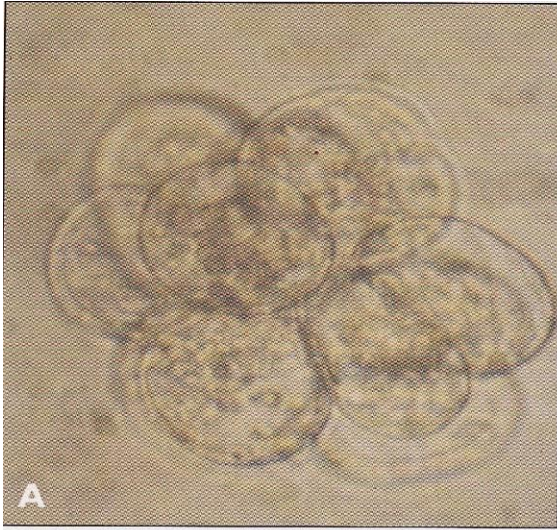
A protoplasztból történő növényregenerálás lépései sematikusán



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

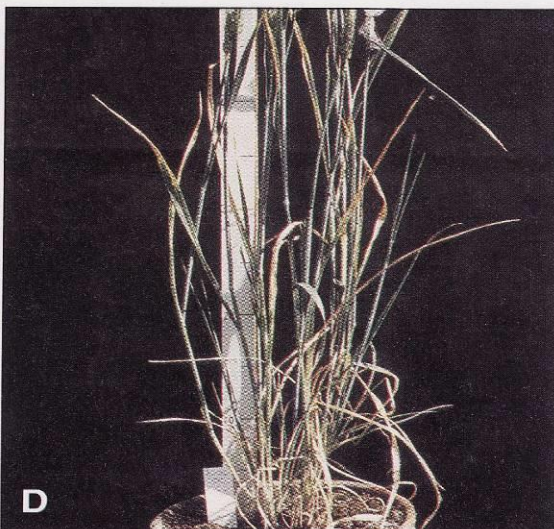
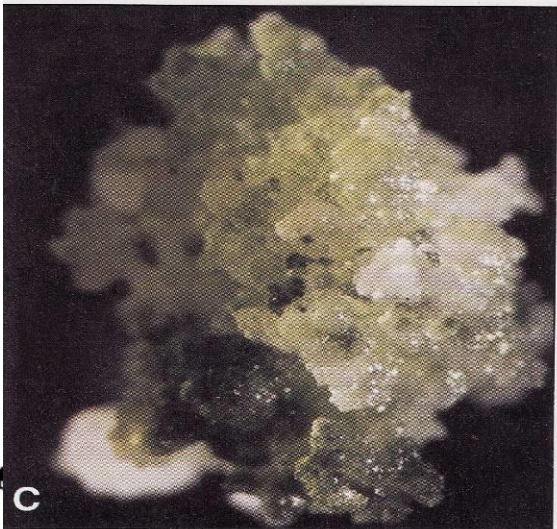


Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztokból



A: protoplaszt eredetű többsejtes kolónia

B: mikrokolóniák kialakulása agarba ágyazott sejtekből



C: kallusz tenyészet

D: protoplaszt eredetű termékeny búzanövény

A keresztezés és protoplaszt fúzió összehasonlítása

- Keresztezés: két különböző tulajdonságú egyed génállományának egyesítése ivaros szaporítással. Régi nemesítési módszer – kulcsszerepe (volt) az új fajták előállításában
- Fajon belüli fajták keresztezése: néhány tulajdonság változik
- De: nem lehet mindent keresztezni mindennel. Csak rokon fajták, fajok között működik.
- A rendszertani távolság növeli az inkompatibilitást.
- A megtermékenyítés szabályozása (anatómiai és egyéb) rendszerint kizárja az idegen pollennel való beporzást, csak a fajon belül termékenyül.
- Ezért előnyös keresztezés helyett protoplasztokat egyesíteni, ez megkerüli az ivaros szaporodás akadályait.



A protoplaszt fúzió különböző fajok között is elképzelhető (Ló + darázs = lódarázs? 😊)

A fúzió nagyon különböző fajok között is lehetséges!

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

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

Sejtvonalként fenntarthatók, de nem regenerálhatók:
sárgarépa-árpa, szója-repce, kukorica-borsó,

szója-*Drosophila*: mindkét sejtmag osztódik

petúnia-egér: osztódás, sejtfal és hemoglobin szintézis



A protoplaszt fúzió során létrejövő növények rendszerint aszimmetrikus hibridek

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

Vö. a fajhibrid állatokkal, akik legtöbbször nem szaporodóképesek.

Hosszú (több éves) sejtenyésztés során valamelyik partner génjei fokozatosan eltűnnek, és csak néhány kromoszóma marad = aszimmetrikus hibrid.

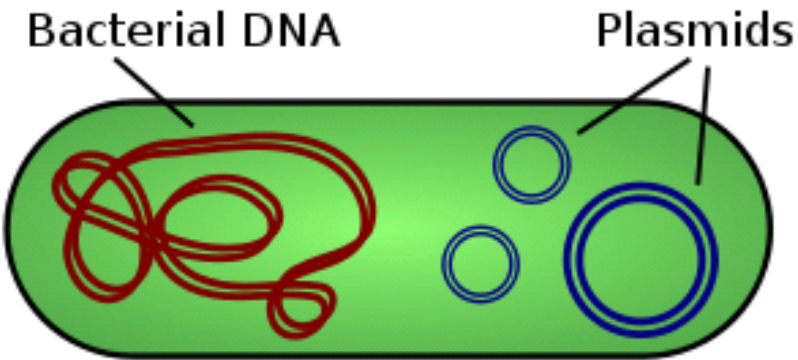
Ezekből lehet élet- és szaporodóképes növényt regenerálni, ami a domináns eredeti partnerhez képest csak egy-két új tulajdonságot hordoz.

Megjegyzés: az öszvérek sem szimmetrikus hibridek, mindig az anya állatra hasonlítanak jobban. (Ezért tesznek különbséget ló-öszvér és szamár-öszvér között.)



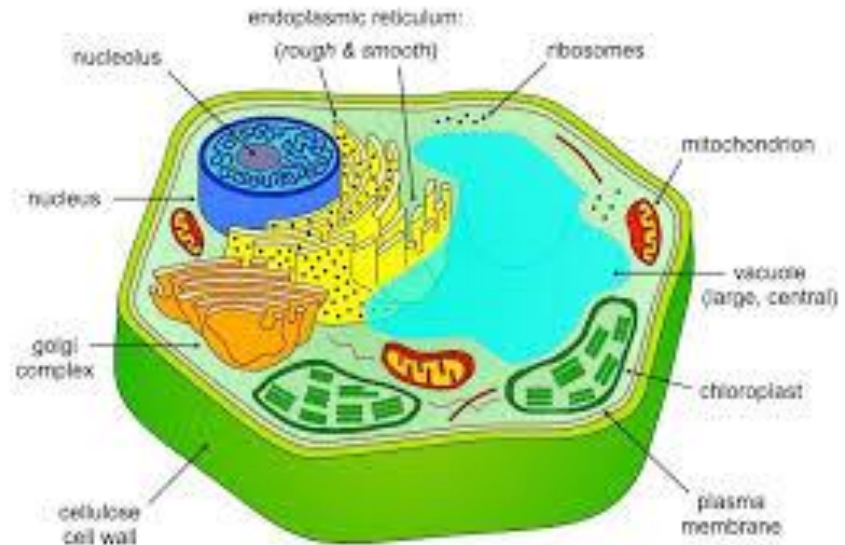
Hol találhatóunk DNS-t egy sejtben?

* **endoszimbionta elmélet**



Prokarióták:

- **Genomi DNS**
- **Lehetnek jelen plazmidok**



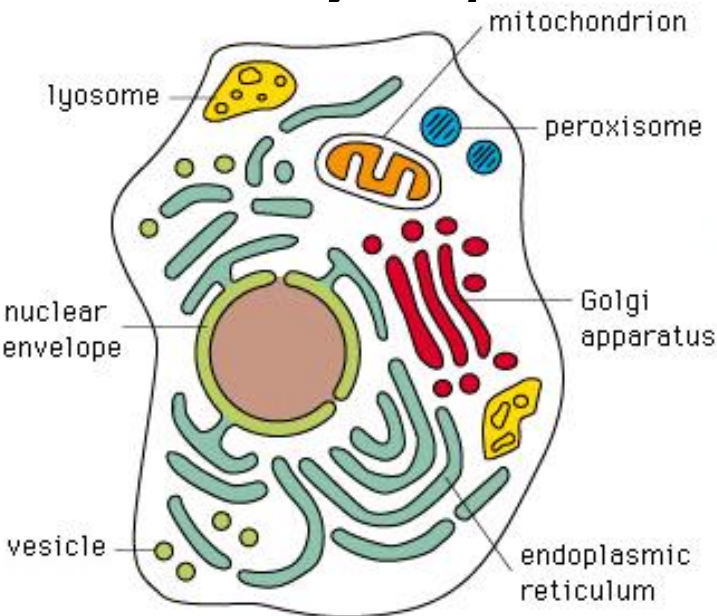
Forrás: bioninja.com.au

Növényi eukarióták:

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS***
- **Színtest DNS***
- **Esetenként plazmidok**

Nem növényi eukarióták:

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS***
- **Gombákban létezhetnek plazmidok**



Citoplazmikus hibridizáció = cibridizáció

- Nem a sejtmagban lévő kromoszómák átvitelére irányul, hanem a sejtszervekben (színtest, mitokondrium) lévő DNS bevitelére.
- A hibrid sejtben az egyik félből származik a sejtmag, a másiktól kloroplasztok → új kombinációk → új tulajdonságok
- Pl. a mitokondriális DNS betegségek vizsgálatára használnak citoplazmikus hibrid sejteket (ρ_0 -s sejtvonala)



Protoplaszt fúzió - eredmények

- Sikeresen alkalmazzák vegetatívan szaporított növény fajok génfrissítésére.
- A vegetatív szaporítás (pl. a krumplit a gumójáról szaporítják, tehát lényegében az anyanövényt klónozzák) nem ad lehetőséget az ivaros szaporodás során megfigyelhető génetikai információ cseréire.
- A vegetatív szaporítás során ráadásul a vírusok is átkerülnek az új növénybe. Ez történt az étkezési burgonya esetében is.
- Ezért vírus-rezisztens burgonya fajták előállítását kísérelték sikeresen meg.
- Minél közelebb áll egymáshoz genetikailag a két sejt, annál nagyobb esélye van annak, hogy a hibrid sejtből később életképes növényt nevelhetnek.

Solanum tuberosum (étkezési burgonya) és *Solanum brevidens* (perui, vírusálló fajta) fúziója → A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



Protoplaszt fúzió - értékelés

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

~40 éve művelik, klasszikus technika.

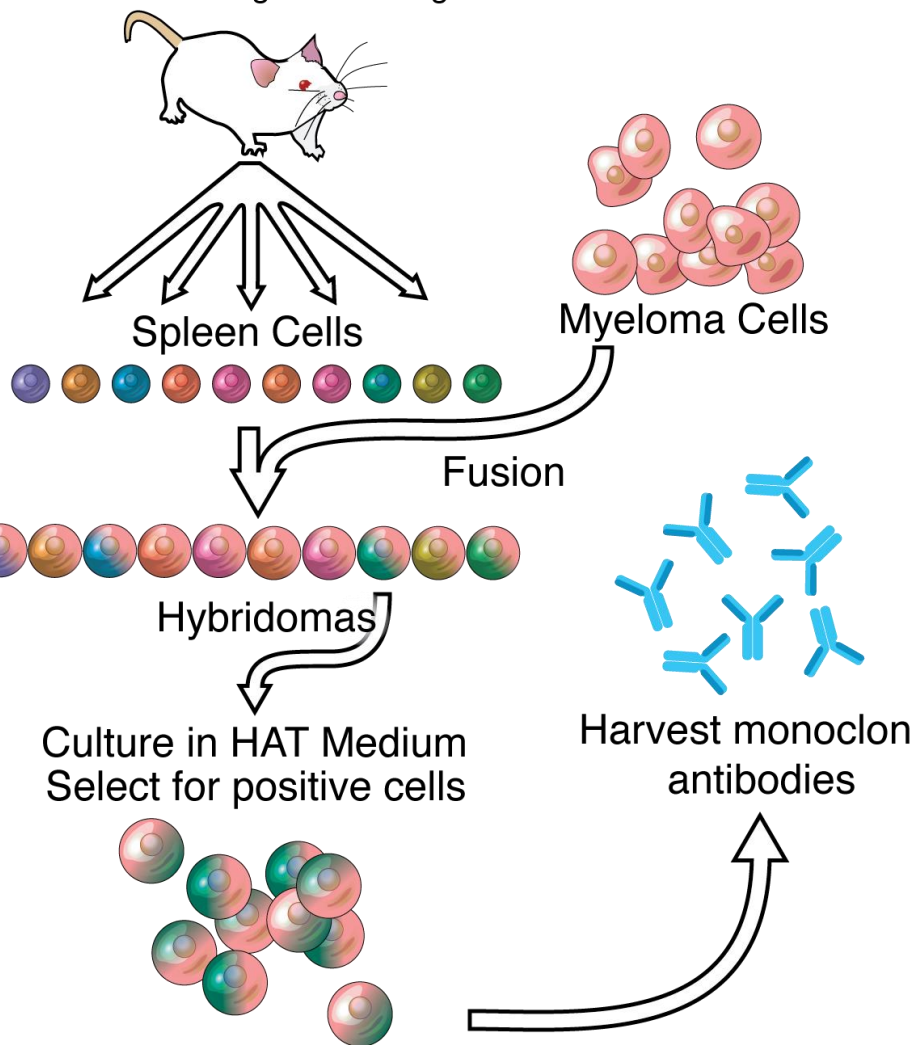
Veszélyessége kicsi, mert:

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



Állati protoplasztok – hibridóma sejtek

Mouse challenged with antigen



- **monoklonális antitestek (mAB-ok)** előállítására használják őket.
- Ezek azonos immunsejtek klónjai által termelt ellenanyagok, amelyek azonos molekuláris célpontot ismernek fel.
- A molekuláris célpontok olyan molekulák, amelyek aktiválják az immunrendszert (sejtek vagy vírusok felszínén található ún. antigének, allergia esetén akár pollenek, autoimmun betegségek esetén a szervezet egy saját molekulája).
- Lehetséges mAB-ot előállítani elméletileg bármilyen sejtfelszíni vagy sejten kívüli molekula ellen, amit egy adott szervezet (példánkban a fehér egér) immunsejtjei idegenként felismerni képesek.
- Példa: rákellenes gyógyszer mAB-ok