

## A növényi biotechnológia és géntechnológia története

- 1838: két német kutató, a botanikus Schleiden és a biológus Schwann sejtelmélete (minden szervezetet sejtek építenek fel); a soksejtű szervezetek minden egyes differenciálódott sejtje megtartja a kiinduló egyetlen sejtben (megtermékenyített petesejt) jelenlévő információt
- 1870-es évek Wöchtling a *Corydalis solida* gumójának vágásfelületén gyökér- és levélorganizáció



szomatikus sejtek totipotenciájának alap gondolata Haberland 1902

25

## A növényi szövettenyésztés alapjainak megteremtése

Haberland 1902- elsőként próbálkozott a vegetatív sejtek tenyésztésével, intakt növény létrehozására, egyszerű táptalajon; az akkori tenyésztési körülmények miatt nem sikerült

Hannig 1904- retekembriókkal sikeres kísérletek, kipreparált embriókból tápközegben (ásványi sók, szacharóz) növényeket kapott

Laibach 1925- táptalajon hibrid embriókból hibrid növények felnevelése, szervkultúrák fejlődése

26



## A növényi szövettenyésztés alapjainak megteremtése

Robbins (USA), Kotte (Európa) 1920-as évek-  
gyökérmerisztémák növekedéséhez szükséges  
feltételek kialakítása (szervetlen sók, glükóz): izolált  
borsó- és kukorica-gyökércsúcsok intenzíven  
növekedtek táptalajon  $\Rightarrow$  elágazó gyökérré;  
folyamatos tenyésztésük gátja a steril technika  
hiánya

1930-as évek: két szövettenyésztési iskola

White (USA), Gautheret (Franciaország)

27

## A növényi szövettenyésztés alapjainak megteremtése

White

1932-ovulum tenyészetek

1934- paradicsom gyökércsúcsból gyökértenyészet  
(szervetlen sók, szacharóz, élesztőkivonat, később  
B6 vitamin) folyékony táptalajon; hetente kellett  
átoltani oldalgyökerekről; a korlátlan idejű növényi  
szövettenyészet első állomása

1939- *N. glauca* X *N. langsdorffii* hibridből indított  
folyamatosan növekvő kallusz

28



## A növényi szövettenyésztés alapjainak megteremtése

Gautheret

elsőként indukált kalluszt *in vitro*

1939- Nobécourt-ral együtt hathetente folyamatosan átoltható sárgarépa kultúra; a táptalajt agarral szilárdították és a White-féle vitaminokkal (tiamin, piridoxin, niacin) kiegészítették

29

## A növényi biotechnológia és géntechnológia története vázlatosan

- 1940-ig: a steril technika és a legalapvetőbb módszerek kidolgozásának időszaka
- 1950-1980: kül. szervek, merisztémák, haploid és szomatikus sejtek, protoplasztok totipotenciájának bizonyítása ⇒ a szomatikus sejtgenetika kialakulása
- 1980- a növényi géntechnológia előretörése, GM növények köztermelésbe kerülése a 90-es évek közepén

30



**ÖSSZEGEZVE: a növénybiotechnológiai megközelítés**  
a növényi sejtek **totipotenciájának** kihasználásán alapul.

1. **Kezdetek:** 1900-1950: a szövettenyésztés alapjainak megteremtése  
1902-04: **Haberlandt-Hennig:** első sejttenyészetek  
1910-20: steril tenyésztés módszertanának kidolgozása  
(1925: **Laibach:** hibrid embrók nevelése táptalajon)  
1930-40: szövettenyésztési iskolák dohánnyal, sárgaréppával (kalluszok nevelése): **White** (USA), **Gautheret** (Franciaország)
2. A növényi sejtek totipotenciáján alapuló **szomatikus sejtgenetika** kialakulása (1950-80)
3. A növényi **géntechnológia** kialakulásának időszaka (1980- )  
**A restriktív enzimek felfedezésével indult "világhódító" útjára a 70-es évek elején a géntechnológia / génsebészet / génmérnökösködés / génmanipuláció....**

### **Gyógynövény szövettenyészetek hatóanyag képzése**

- Világszerte kiterjedt kutatásokat folytatnak a gyógynövényekből nyert **in vitro kultúrák** segítségével a növényi hatóanyagok előállítására, ellenőrzött és reprodukálható módon. Várható, hogy a gyógyszeripari célra használt természetes anyagok gyártására egyre többször fognak biotechnológiai módszereket alkalmazni.
- Sok nehézséget okoz azonban, hogy a kultúrák gyakran egyáltalán nem, vagy csak igen csekély mértékben szintetizálják az intakt növényre jellemző másodlagos anyagszertermékeket. Pedig az izolált kultúrák morfológiai totipotenciája alapján a fajra jellemző bioszintetikus potenciál is feltételezhető.
- A kérdés csak az, tudjuk-e úgy befolyásolni a potenciálisan minden szintézisre genetikailag kódolt sejteket, hogy olyan biokémiai szintézist végezzenek, mint az intakt növényben.



## OPTIMALIZÁLÁS

A kutatók egyetértenek abban, hogy a **szekunder/speciális anyagcsere-termékek** előállításának fajlagos termelékenysége nem elég ahhoz, hogy az eljárások *ipari méretekben* megállják a helyüket.

A termelékenység növelésének több módszere van, pl.:

- a közeg összetétel beállítása
- a hőmérséklet optimalizálása
- fizikai és kémiai mutatók szabályozása (pl. pH, fény, stb.)

de egyik sem alkalmazható általánosan, vagy külön-külön. Ahhoz, hogy ezeket szabályozni tudjuk, mindenképp előtte meg kell ismernünk azokat részletesen.

- „**totipotencia**” (Haberlandt, 1902)
- **Intakt növénytől eltérő anyagcsere**
- **Növényi szövettenyésztés alapja**
  - **Sterilitás**
  - **Fény**
  - **Hőmérséklet**
  - **Táptalaj**
    - szilárd
    - folyékony
  - **pH**
  - **Makro elemek**
  - **Mikro elemek**
  - **Vitaminok**
  - **Szénforrások**
  - **Nitrogén-forrás**
  - **Hormonok**



# NÖVÉNYI RÉSZEK TENYÉSZTÉSÉNEK FELTÉTELEI I.

## Fizikai tényezők:

1.) **Hőigény:** fajonként változik : + 15 és + 35 °C között. Általában 20 – 30 °C.

A növekedés és anyagszere intenzitását befolyásolja .

(pl.: hőfok emelése növelte a dohány és napraforgószár szövet sejtosztódást ütemét.)

2.) **Fény:** frissen izolált növényi részeket **sötétben és világosban** is inkubálhatjuk.

Az embriók és a hajtásesücs kultúrák pl. világosban növekednek intenzívebben.

Gyökéresücs, szövet és sejtenyészetek világosban és sötétben is.

Ha nem kívánatos a sejtek klorofill képzése, célszerű a kultúrákat sötétben tartani, mert ez egzaktabbult biztosítható és reprodukálható eredményeket ad.

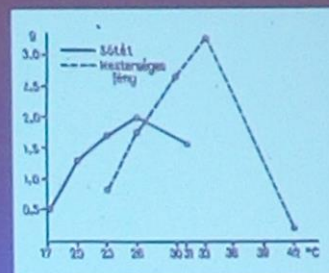
A fény hullámhossza is hat a növényi részek anyagszeréjére (vörös, kék).

**Időtartam:** kísérleti adatok szerint a részleges (napi 8-10 órás) fény a sárgarépa szövet sejtszámát, súlyát gyarapította, ellenben nukleinsav, foszfor és fehérjetartalmát csökkentette.

A hőmérséklet és a fény együttes hatása a sárgarépa kalluszsövetének súlygyarapodására.

Ord.: a szövet növekedése (g), absc.: hőfok (°C).

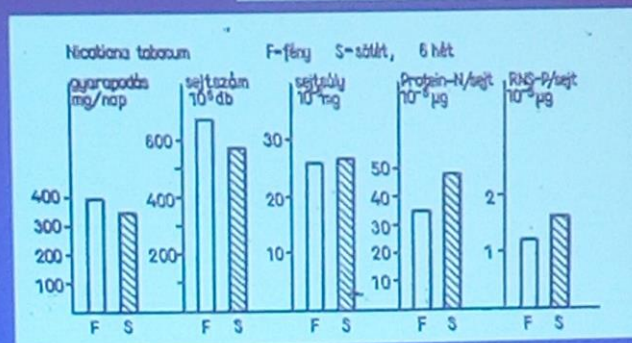
(De Capite 1955b után)



A fény hatása a dohány-szár kallusz súlygyarapodására (mg/nap), sejtszámváltozására, protein-N- és RNS-P-tartalmának alakulására 6 hetes inkubáció után.

Ord.: súlynövekedés (mg/nap), sejtszám (db –  $10^5$ /lombik) sejtsúly ( $10^{-5}$  mg/db), protein-N ( $10^{-5}$  µg/sejt), RNS-P ( $10^{-5}$  µg/sejt).

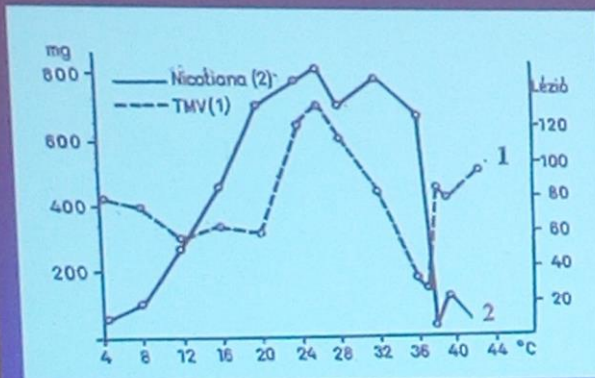
absc.: kezelés (12 órás szórt fény és sötét). (Maróti 1969c)



Fény hatása a *Daucus carota* egyes sejtjeinek anyagtartalmára (Maróti 1964c)

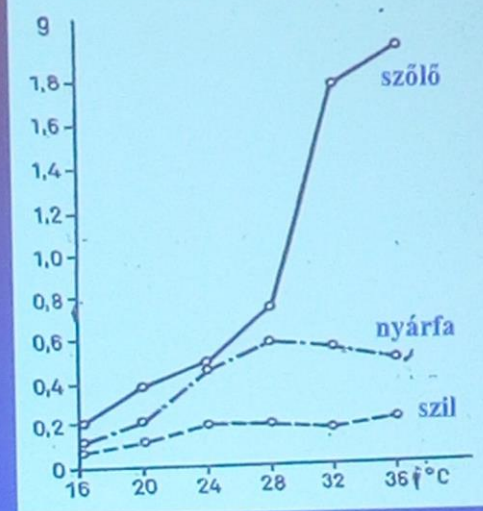
Kezelés	Friss-súly	Szárazsúly	RNS-P	DNS-P	N	Protein-N
	µg - $10^{-4}$ /sejt					





Hőmérséklet hatása a dohány szár mozaik-vírussal (TMV) fertőzött kalluszsövetének súlygyarapodására (2), illetve a szövetből izolált TMV fertőzőképességére (1).

Ord.: a szövet friss-súlya lombikonként (mg), illetve a szövetkivonattal előidézett léziók száma, abszc.: hőfok (°C) (Hildebrandt 1962 után).



Hőmérséklet hatása a szőlő, szilfa és nyárfa kallusz súlygyarapodására.

Ord.: a szövet növekedése lombikonként (g), abszc.: a hőfok (°C) (Hildebrandt 1962 után).

## NÖVÉNYI RÉSZEK TENYÉSZTÉSÉNEK FELTÉTELEI II.

### Fizikai tényezők:

3.) pH: A tápközeget savassága szintén befolyásolja az izolált növényi részek növekedését.

Az optimális pH az izolált növény fajtától és az izolált rész természetétől függ.

Általában: 5,0 – 7,0 közötti savasság a megfelelő.

A növekvő részek megváltoztatják a táptalaj pH-át.

2,5 – 4,5 } között már nem jól növekednek a kultúrák,  
7,5 – 10 } ill. pusztulásukat is okozza.

→ (fermentor – szabályozás fontossága)

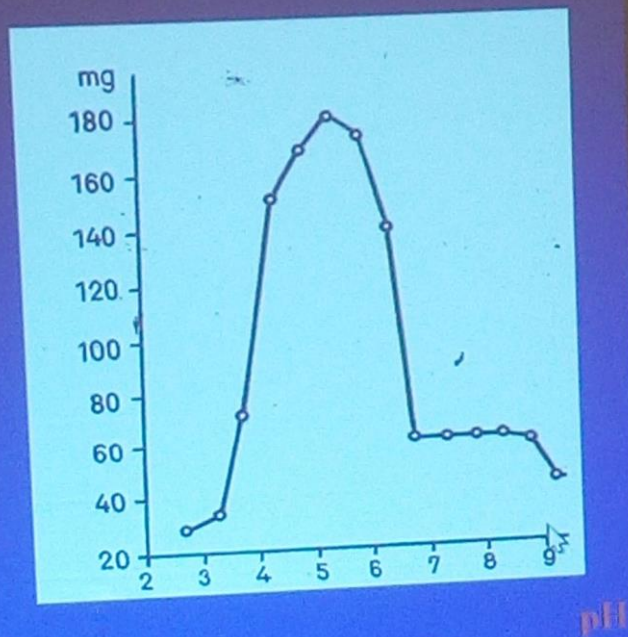


## Dohányszár kalluszsövet súlyváltozása a pH függvényében.

ord.: a szövet növekedése (mg/lombik),

absc.: alkalmazott pH

(Hildebrandt 1962 után).



## NÖVÉNYI RÉSZEK TENYÉSZTÉSÉNEK FELTÉTELEI III.

### Fizikai tényezők:

4.) **Levegő (O<sub>2</sub>) ellátás, légnedvesség:** a növekedő növényi részek a környező légkör oxigén-koncentrációjára és páratartalmára is érzékenyek.

Általában: **50 – 70 %-os relatív légnedvesség** biztosítása célszerű

- folyékony kultúrák (biztosítva)
- szilárd kultúrák (vatta dugó, celofán biztosítja)

A kultúrák légkörében az oxigéntartalomnak 1 % alá történő csökkenése okoz csak növekedés gátlást.

- folyékony kultúrák (rázatás + keverés, + air-lift)
- szilárd (vatta, celofán O<sub>2</sub> cserét biztosít)

- alufólia elterjedése

- konzervtető

szivacs betéttel  
steril szűrővel



## NÖVÉNYI RÉSZEK TENYÉSZTÉSÉNEK FELTÉTELEI IV.

### Fizikai tényezők:

#### 5.) Tápközegek jellege, szilárdsága:

Folyékony

Szilárd (keményebb lassítja a növekedést)

Általában 0,6 – 1 % -os agar merevítés a jó.

Szilárd táptalajon lassabban indul meg a szövetgyarapodás, lassúbb ütemű, időtartama hosszabb, mint a folyékony tápközegben.

- Agar – agar – különböző (pl. Difco),
- Fitogél


#### 6.) Üvegedények minősége:

- puha üveg
- kemény üveg (egzakt, főleg táplálkozás -  
élettani kísérletekhez)
- műanyag tenyészedények elterjedése

### Kémiai tényezők:

Tápközegek egyes komponenseit soroljuk a tenyésztési feltételek másik csoportjába.

#### Tápközegek alkotói:

- szervetlen sókat  makro elemeket  
mikro elemeket
- nitrogén forrást (nitrátot, vagy aminosavakat)
- szénforrást (cukrokat)
- vitaminokat
- serkentőket (auxinokat)
- növényi kivonatokat (coccus-tej)
- bidesztillált vizet tartalmaznak.

Ma már számtalan tápközeg formula ismeretes, melyek közel néhány változatot bemutatnak, melyek készen is kaphatók.



## Kémiai tényezők I.

### *Szervetlen sók:*

Makro és mikroelemekből célszerű törzsoldatot készíteni és sterilizálni (oldódásra vigyázni, pl.  $MgSO_4$ ).

**Makroelemek koncentrációja: 15-1000 mg/l**

**Mikroelemek koncentrációja: 0,002-1,000 mg/l**

Az egyes vegyületek helyes aránya, vagy az egyes elemek alkalmazási formája (pl. Fe) döntő jelentőségű az explantátumok növekedésére.

## Kémiai tényezők II.

### *Makrotápelemek:*

- Anövényi sejtekben - akár intakt,
- akár izoláltan nőnek,

**a N, a P és a K – esszenciális alkotóelemek.**

Szükséges mennyiségükről és arányukról a tápoldatban, - sokat változott a kutatók véleménye.

A klasszikusnak tekinthető White-féle, táptalajból a Murashige-Skoog (1962) – féle médiumig igen sok összetevő mennyisége változott meg a táptalajokban.

Ugyanez látható a mikroelemek vonatkozásában is a táptalajokban.



## Szervetlen tápanyagok

**Makroelemek:** nitrogén (N), foszfor (P), kálium (K) esszenciálisak, akár csak az intakt növényben, mellettük fontos még a kén (S), kalcium (Ca) és magnézium (Mg).

Sokan vizsgálták hatásukat a tenyészetben, eltérő eredményeket kaptak. Általánosságban az ásványi elemek kezdeti összkoncentrációja (1000 mg/l-től 4-5000 mg/l).

### Makroelemek szerepe (növényélettani kutatások):

**N** – sejtosztódásban, szövetek gyarapodásában, szervképzésben fontos;

**P** – a sejtek energiaforgalmában játszik szerepet;

**K** – a sejtmembránok működéséhez szükséges, fotoszintézishez, légzéshez kell.

### Néhány fontosabb táptalaj összetétele (Makroelemek)

Komponens (mg/l)	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Schenk-Hildebrandt (1972)	Nitsch-Nitsch (1967)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134	-	-	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	720	500	250	250	400	125
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	200	-	-	-	-	-
KCl	-	65	-	1500	750	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-	150	25	75	200	-
$\text{NaNO}_3$	-	-	-	-	600	-	-
$\text{KNO}_3$	1900	80	3000	2000	-	2500	125
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300	-	-	-	-	500
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	-	-	-	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16,5	150	250	125	-	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-	-	300	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-	-	-	125



## Tápközegek összetétele

Összetevők	MS	B5
Makroelemek	Koncentrációk (mg/l)	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134
$\text{KNO}_3$	1900	2500
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	440	150
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	370	250
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	-	150

### Kémiai tényezők

Ha az egyes tápközegek **töménységét**, illetve **ozmotikus szívóerejét** vesszük figyelembe, akkor azt láthatjuk, hogy az ásványi elemek kezdeti **összkoncentrációja** is jelentősen *megnövekedett*:

- a White táptalaj: 1000 mg/l-ről
- Muraskig-Skoog: 4-5000 mg/l-re.

A táptalajok ásványi összetevőinek dúsításával kapcsolatban felmerülhet a kérdés, hogy vajon **felveszi-e** és **beépíti-e** az izolált növényi szövet ezeket a nagy koncentrációjú elemeket?

-Nincs egyértelmű bizonyítás és válasz erre ma sem.

Újabb vizsgálatok igazolták pl. hogy ugyanazon faj szövettenyészetének és sejtenyészetének nem mindig azonos az ásványi só szükséglete.

-Pl. a nagy MS-sókoncentráció

*a szuszpenziót gyakran gátolta a növekedésben,  
míg a mtrát koncentráció növelése serkent.*



## Mikroelemek vagy nyomelemek I.

Élettani szerepére különösen az utóbbi évtizedek kutatásai hívták fel a figyelmet.

- az organizálódás nélküli kultúrák különösen érzékenyek jelenlétükre, fejlődésük leáll nélkülük.

→ Tehát **esszenciálisak**.

**Több tápközeg formula ismeretes !**

**Mikroelemek: enzimek alkotórészei,**

**Fe (vas)** – a sejtek oxidatív metabolizmusában, egyes anyagok szintézisében,

**végeredményben a szövetek gyarapodásában fontos;**

**Cu (réz)** – több oxidáz alkotórésze;

**Mo (molibdén)** – nitrát-reduktáz aktiválásában játszott szerepét ismerték fel;

**Mn (mangán)** – Mn-Mo kölcsönhatás: a mangán gátlólag hatott a paradicsomgyökerek növekedésére molibdén jelenlétében. Mg-Mn arány fontos, a mangán helyettesítheti a magnéziumot;

**B (bór)** – koncentrációja meghatározza az auxinszabályozó rendszerek természetes inhibitorainak szintjét, ami a növekedés regulációjának szempontjából lényeges;

**I (jód)** – növekedéshez szükséges;

**Zn (cink)** – auxinok bioszintézisének serkentése.



## Néhány fontosabb táptalaj összetétele (Mikroelemek)

Komponens (mg/l)	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Schenk-Hildebrandt (1972)	Nitsch-Nitsch (1967)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	-	27,8	-	-	15	27,85
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3	-	37,3	-	-	20	37,25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	7	10	3	0,1	10	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	3	2	0,5	1	0,1	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	0,025	0,025	0,03	0,2	0,025
$\text{H}_2\text{SO}_4$	-	-	-	0,5	-	-	-
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2,5	-	-	-	-	-
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	0,03	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	0,025	-	-	0,1	0,025
$\text{AlCl}_3$	-	-	-	-	0,03	-	-
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	1	-	-
$\text{FeC}_6\text{O}_5\text{H}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	10	-	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,5	0,01	1	-
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	1,5	3	0,5	1	5	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	-	0,25	0,25	-	0,1	0,25

## Tápközegek összetétele - folytatás

Mikroelemek	MS	B5
	Koncentrációk (mg/l)	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3	13,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,6	2
KI	0,83	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,85	-
Fe-kelet	-	28
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37,25	-



## Mikroelemek vagy nyomelemek II.

**Vas** – egyik legfontosabb elem az izolált rész növekedése szempontjából (a sejtosztódás megszűnik). Mennyisége és sóformájának kérdése – ma is aktuális probléma.

A vashiány leblokkolja a nukleuszon belüli RNS-szintézist, ez pedig mind a nukleuszban, mind a citoplazmában csökkent RNS-szintet okoz. Ehhez kapcsolódik még a proteinszintézis megszűnése és a mitózis leállítása. A vas szerepe tehát igen jelentős a sejtek oxidatív metabolizmusában – és ezen keresztül az egyes anyagok szintézisében és a sejtosztódásban, → tehát végeredményben a szövetek gyarapodásában.

*Fontos!* - a vas megfelelő sóformájának alkalmazása.

- Ugyanis ha a kultúrák nagyobb mennyiségű nitrátot vesznek fel pufferoldatban tápközegből → a pH alkalikus irányba eltolódik → kicsapódhatnak a vassók, és ezáltal felvehetetlenek (leáll a növekedés). Ezt újabban szerves vaskomplexek alkalmazásával próbálják kiküszöbölni. Vaskelát és vascitrát – jó eredményt értek el. NA-Fe-EDTA

### A vaskelát és a vas-citrát hatása a *Daucus carota* kalluszsövetének növekedésére (Maróti 1964b)

Inkubációs idő, nap	Vas-forrás	Kezelés	Kezdősúly	Végsúly	Napi növekedés	Relatív növekedési ráta
			mg			
42	vas-citrát	fény	174,2	789,2	14,64	3,53
56	vaskelát	fény	233,4	1058,6	14,73	3,54
42	vas-citrát	sötét	174,2	576,6	9,58	2,31
56	vaskelát	sötét	392,5	1459,4	1459,4	2,72



### Mikroelemek vagy nyomelemek III.

Réz (Cu)

több oxidáznak komponense,

- pl. az - aszkorbinsav – oxidázban
- polifenoloxidázban megtalálható.

Tehát fontos elem a növényi sejtek anyagcseréjében.

Nélkülözhetetlenségét azonban még nem bizonyították eddigi kísérletek.

### Mikroelemek vagy nyomelemek IV.

Mangán és Molibdén

gyakran egymással helyettesíthetők (pl. paradicsom gyökerek növekedésekor)

Nincs még szintén magyarázat arra vonatkozóan, hogy a sejt enzimszisztémát hogyan aktiválja ez a két elem.

A mangán és Mg esetében is kölcsönhatást mutattak (gyökerek növekedésekor)  
- Magas conc. Mn gátló hatását enyhíteni lehet magasabb Mg-conc.-val.

A megfelelő Mg - Mn arány még kis koncentrációk esetében is fontos a növekedés szempontjából.

(Mn hiány következtében → elmarad a sejttágulás → megszakad a szövetek vaszkuláris differenciálódása)



A) KNOP-(1865)-féle makroelemoldat (GAUTHERET 1959 után)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500 mg/1000 ml deszt. víz
$\text{KNO}_3$	125 mg/1000 ml deszt. víz
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125 mg/1000 ml deszt. víz
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	125 mg/1000 ml deszt. víz

B) KNUDSON-(1925)-, illetve STEEVES-SUSSEX (1952)-féle tápoldat (WHITE 1963 után)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000,0 mg/1000 ml deszt. víz
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,0 mg/1000 ml deszt. víz
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500,0 mg/1000 ml deszt. víz
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	250,0 mg/1000 ml deszt. víz
Fe-citrát	2,0 mg/1000 ml deszt. víz
pH	5,2 mg/1000 ml deszt. víz

C) HOAGLAND-(1944, A-Z)-féle mikroelemoldat (FRENYÓ 1959 után)

$\text{H}_3\text{BO}_3$	1100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	700 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{ZnSO}_4$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{TiO}_2$	100 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{LiO}_2$	50 mg/1800 ml deszt. víz
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mg/1800 ml deszt. víz
KJ	50 mg/1800 ml deszt. víz
KBr	50 mg/1800 ml deszt. víz

*A makro- és mikroelemek hiányának letális hatása a sárgarápa (*Daucus carota*) szövettenyészeire*

(Heller 1953 után)

A kultúra elpusztul		A kultúra elpusztul	
N hiány esetén	1 passage után	Zn hiány esetén	3 passage után
K hiány esetén	1-2 passage után	B hiány esetén	3 passage után
P hiány esetén	1-2 passage után	Cu hiány esetén	4 passage után
Ca hiány esetén	2 passage után	Fe hiány esetén	4 passage után
Mg hiány esetén	2 passage után	Mn hiány esetén	4-5 passage után
S hiány esetén	2 passage után		



### Néhány fontosabb táptalaj összetétele – folytatás 3.

Komponens (mg/l)	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1965)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Schenk-Hildebrandt (1972)	Nitsch-Nitsch (1967)
Glükóz	30.000	20.000	20.000	50.000	20.000	30.000	25.000
mezo-inozít	100	-	100	-	-	1000	100
Nikotinsav	0,5	0,5	1	-	-	0,5	5
Piridoxin HCl	0,5	0,1	1	-	-	0,5	0,5
tiamin HCl	0,1-1	0,1	10	1	1	5	0,5
Ca-pantotenát	-	1	-	-	-	-	-
Biotin	-	-	-	-	-	-	0,05
Glicin	2	3	-	-	-	-	2
Cisztein HCl	-	1	-	10	-	-	-
Folsav	-	-	-	-	-	-	0,5

### Különböző szénhidrátok hatása a steril tenyészetek növekedésére

Szénforrás	<i>Daucus corata</i> (1)	<i>Helianthus annuus</i> Gyökérenyagolyva (2)	<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>N. glauca</i> Genetikai tumor (3)	<i>Rumex acetosa</i> vírusos tumor (4)
Glükóz	++++	+++++	++++	+++++
Fruktóz	+++	+++++	+++	++++
Galaktóz	+++	0	0	0
Mannóz	++	0	++	-
Szorbóz	-	-	-	0
Arabinóz	0	0	0	0
Xilóz	0	0	0	0
Ramnóz	-	0	0	0
Ribóz	-	-	0	-
Szacharóz	+++++	+++	+++++	++++
Maltóz	++++	+	+++++	+++
Laktóz	++	+	+	0
Cellobióz	-	+	++++	+++



## Egyéb szénforrások I.

- Alkoholok** önmagukban nem jelentenek szénhidrát-táplálékot. (2 % Szacharóz mellett a kultúrák eltűrik, esetleg némi növekedést is okozhatnak).
  - propanol – minden conc.-ban gátolja a növekedést,
  - butatnolt - pl. a Vinca eltűrte, de növekedést nem mutatott,
  - metanol, etanol – némi növekedést is okoz egyes conc.-ban.
- Szerves savak:** 6,0 pH mellett – szintén igen szegény szénforrások. Szintén csak 2 % - szacharóz mellett hatnak – de gyengén.
  - sztearinsav
  - borostyánkősav
  - almasav
  - borkősav
  - tejsav
  - oxálsav
  - citromsav
  - hangyasav
  - ecetsav
  - propionsav

némi növekedést okoz.

gyenge növekedést okoz

növekedésgátlást okoz

## Egyéb szénforrások II.

### 3. Oldható keményítő:

Különösen a genetikai és vírusos tumorszöveteknél kielégítő szénforrás. Az **inulin** azonban nem okozott növekedést sem szövet, sem szervkultúrában.

A növényi explantátumok szénhidrát táplálék nélkül nem növekednek.

Leggyakrabban használt szénforrások: a **cukrok**, azok közül is a

glükóz

fruktóz (autoklávozásnál D-fruktóz szabadul fel)

szacharóz

maltóz

A cukor optimális conc.: 0,5 – 3,0 % között van. Különböző növényfajok – különböző cukorféleségeket hasznosítanak optimálisan. (arabinóz, xilóz, ramnóz – kevésbé hatásos)



## Nitrogén forrás:

A nitrogén szervetlen és szerves alakban is adagolható a tápközeghez.

↓  
nitrát bizonyult a legjobbnak

Szerves nitrogénként: - kazein hidrolizátumot  
- peptont  
- élesztőkivonatot  
- aminosavakat használnak.

Az *aminosavak* általában egymagukban nem stimulánsak, hatásuk más vegyületekkel együtt érvényesül (néha gátolnak).

Leggyakrabban használt aminosavak: glükokoll, aszparaginsav, glutaminsav.

A S tartalmúak közül pedig: cisztin, cisztein.



## Tápközegek összetétele - folytatás

Vitaminok Koncentrációk (mg/l)	MS	B5
Mezo-inozit	100	100
Nikotinsav	0,5	1
Piridoxin	0,5	1
Tiamin	0,1	10
Glükóz	30.000	20.000

## Vitaminok

- Szorosan vett tápanyagokon kívül a tenyészetek növekedéséhez, sőt életben maradásához vitaminok is szükségesek.
- Ezeket egyes izolátumok önmaguk szintetizálják, de sokszor kívülről kell adagolni.

Főleg a következő vitaminok szükségesek:

aneurin (B1)

riboflavin (B2)

0,5 – 1,5 mg/l conc.

nikotinsav (B3)

pantoténsav (B5)

piridoxin (B6)

kobalamin (B12)

folysav (Bc)

aszorbinsav (C)



### Egyes növényfajok izolált szöveteinek vitaminszükséglete I.

Vitamin	A növény faja és a szövet természete		Szerző
Tiamin (B <sub>1</sub> aneurin)	<i>Daucus carota</i>	gyökércallusz	GAUTHERET 1939
	<i>Salix caprea</i> <i>Rumex acetosa</i>	hajtáskallusz vírusos tumor és normál kallusz	GAUTHERET 1948
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	<i>Helianthus annuus</i> <i>Crataegus sp.</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Helianthus annuus</i>	szárcallusz ágkallusz gyökércallusz szárcallusz	NICKELL 1952a HENDERSON és tsai 1952 PARIS 1955 TORREY-SHIGEMURA 1957 HENDERSON és tsai 1952
	<i>Juniperus communis</i> <i>Helianthus annuus</i>	tumorszövet szárcallusz	CONSTABEL 1958 HENDERSON és tsai 1952
Nikotinsav (B <sub>3</sub> niacin)	<i>Juniperus communis</i> <i>Crataegus sp.</i>	tumorszövet ágkallusz	CONSTABEL 1958
Pantoténsav (B <sub>5</sub> )	<i>Salix caprea</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Juniperus communis</i>	hajtáskallusz szárcallusz tumorszövet	MOREL 1948 GAUTHERET 1948 HENDERSON és tsai 1952 CONSTABEL 1958

### Egyes növényfajok izolált szöveteinek vitaminszükséglete II.

Vitamin	A növény faja és a szövet természete		Szerző
Piridoxin (B <sub>6</sub> )	<i>Helianthus annuus</i>	szárcallusz	HILDEBRANDT és tsai 1946
Kobalamin (B <sub>12</sub> )	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Picea glauca</i>	szárcallusz vírusos és normál szövet	HILDEBRANDT és tsai 1946 REINERT-WHITE 1956
	<i>Helianthus annuus</i> <i>Juniperus communis</i>	szárcallusz tumorszövet	HENDERSON és tsai 1952 CONSTABEL 1958
Folsav (B <sub>9</sub> )	<i>Helianthus annuus</i> <i>Juniperus communis</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Helianthus annuus</i>	szárcallusz parenchimaszövet szárcallusz	DE CAPITE 1955a HENDERSON és tsai 1952
p-Amino- benzoe-sav (PABA)	<i>Helianthus annuus</i> <i>Juniperus communis</i>	szárcallusz tumorszövet	HENDERSON és tsai 1952 CONSTABEL 1958
Biotin (H)	<i>Salix caprea</i>	hajtáskallusz	GAUTHERET 1948
Inozit(mezo-)	<i>Helianthus annuus</i> <i>Juniperus communis</i>	szárcallusz tumorszövet	HENDERSON és tsai 1952 CONSTABEL 1958
	<i>Picea glauca</i>	vírusos és normál szövet	REINERT-WHITE 1956
Aszkorbinsav (C)	<i>Juniperus communis</i>	kalluszsövet	HOTSON 1953



## Növekedésszabályozó anyagok

### *Auxinok* (pl. NES, IES, IVS, 2,4-D):

egyaránt lehetnek a szövetekben keletkező természetes vegyületek, valamint szintetikus molekulák is. Hatásuk szerteágazóak, fokozzák pl. egyes enzimek aktivitását, befolyásolják a nitrogén anyagcserét, fokozzák a cukrok felvételét és hasznosítását, valamint morfogenetikus hatásuk is van.

### *Gibberellinek* (GA1-GA32):

hatásuk az auxinokéhoz hasonló, azokkal együttműködve fejtik ki azt. Legismertebb a GA3, melyet gibberellinsavként (GS) ismerünk.

### *Citokininek* (pl. kinetin, adenin, benzil-adenin):

az auxinokhoz hasonlóan egyaránt lehetnek természetes (pl. zeatin) és szintetikus vegyületek. Közös tulajdonságuk, hogy a sejtek osztódását aktiválják. Elősegítik a csírázást, szervek iniciációját és szabályozzák a levelek öregedését is.

## Növekedésszabályozó anyagok

### **Közös tulajdonságuk:**

- Kis koncentrációban hatnak
- Hatásuk egy-egy sejt típusra specifikus
- Egymással egyensúlyban vannak, arányuk meghatározó
- Nagyobb koncentrációban gyakran növekedésgátlók

### **Növekedésszabályozással kapcsolatos tulajdonságaik**

- Fenntartják a növényi anyagcserét
- Kiváltják a sejtek osztódását,
- hosszanti növekedését
- Megindítják a gyökér és/vagy a rügyképződést



## Serkentők (auxinok) I.:

Kis mennyiségben nagy hatást kiváltó anyagok közül a serkentők, az auxinok a legfontosabbak a növényi részek tenyésztéséhez.

Ezeket a növényi részek vagy *maguk szintetizálják*, vagy *kívülről* kell pótolni.

- a.) Így pl. egyes izolátumok, mint a sárgarépa kalluszszevete külső auxinok nélkül is jól gyarapodnak.
- b.) Más explantátumok, pl. dohány szárszevete csak külsőleg adagolt auxinnal gyarapszik.
- c.) Egyes növényi szövetek az izolálás első heteiben külső auxinra szorulnak, később anélkül is gyarapodni tudnak már. Ezek az u.n. auxin-habituált szövetek. Ilyen pl. a szőlőszár kallusza. A vírusok által okozott tumoros szövetek is ilyenek auxin szempontjából.

## Serkentők (auxinok) II.:

A különböző eredetű (gyökér, szár) explantátumok nem egyformán érzékenyek ugyanazon auxin-concentrációra, ami a serkentésen és a gátláson túl *morfogenetikus hatásban* is megnyilvánulhat.

Pl.: 1. IES a csicsóka kallusz szövetén:

- |                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| $10^{-7}$ g/ml conc.-ban | - sejtburjánzást,              |
| $10^{-6}$ g/ml conc.-ban | - gyökérregenerációt,          |
| $10^{-5}$ g/ml conc.-ban | - sejtnövekedést,              |
| $10^{-4}$ g/ml conc.-ban | - óriássejt képződést okozott. |

2. A cikória gyökérszövetén a NES  $10^{-7}$  g/ml conc.-ban hajtásokat regenerált;  
ha ehhez JES-t adtak a rügyképzés elmaradt és kalluszszevet képződött.

Általában: az alacsony auxin szintek: *rügyképződést*

a magas auxin szintek: *gyökérképződést* okoznak.



Skoog és Miller (1957) vizsgálatai szerint a kinetin és IES különböző koncentrációja, variációja is alkalmas a morfogenetikus hatás kiváltására.

KINETIN ÉS IES MORFOGENETIKUS HATÁSA A DOHÁNYKALLUSZ-SZÖVETÉRE (SKOOG ÉS MILLER UTÁN)

IES (mg/l)	KINETIN (mg/l)			
	0	0,02	0,2	0,5 – 1,0
2	nekrózis	gyökér	kallusz	hajtás

### A kinetin (6-furfuril-amino-purin)

Hatásmechanizmusát csak napjainkban ismerték meg.

A különböző növényi szervek fehérje és nukleinsav szintjét tartja fenn azért, hogy az RNS szintézist szabályozza.

A sejtosztódásra csak a IES jelenlétében hat. Hatására a sejtek gyorsan osztódnak, de alig növekednek.

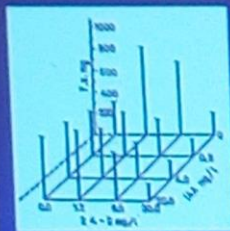
a.) - Az endogén citokininnek 1950 óta ismertek, két alapvegyületük a zeatin (a csemege kukorica tejes magvából izolálták) és az izopentenil-adenin. Szintetikus citokinin a benzil-adenin és a kinetin.

(A növényekben a citokinin szintézise a fiatal levelekben, az auxinoké a gyökerekben megy végbe.)



b.) - A giberellinek szintén az 1950-es évek elején fedezték fel; mára több mint 50 vegyületet azonosítottak a csoportból. Leggyakrabban használt vegyülete a (G3) gombából *Giberella fufikuroi* kivont giberellinsav. A giberellinek elsősorban a hosszirányú növekedésre hatnak (a sejtek tágulása és osztódása mellett)

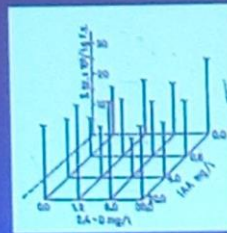
Feltehető, hogy a három növekedésszabályozó csoport a hatását az anyagcserére olyan kulcsfolyamatán keresztül fejt ki, mint amilyen az RNS-szintézis, minthogy a közöttük kialakuló arány, illetve egyensúly az ami meghatározza a sejtek osztódását, tágulását, differenciálódását, továbbá az egész *hisztogenetikus* és *organogenetikus* differenciációt, amelynek eredménye a szervképződés, vagy intakt növényé alakulás.



A 2,4-D és az IES (IAA) különböző koncentrációinak együttes hatása a dohány kalluszsövetének súlygyarapodására.

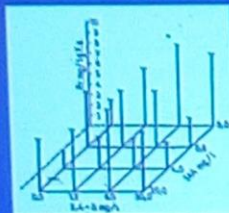
Ord.: a szövet friss-súlya (F.s. mg), absc.: az alkalmazott koncentrációk (mg/l).

(Sziráki 1970 után)



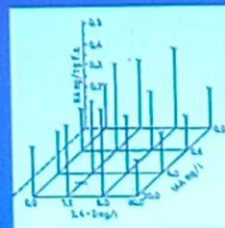
A 2,4-D és az IES (IAA) különböző koncentrációinak együttes hatása a dohány kalluszsövetének sejtszámváltozására.

Ord.: a sejtszám (S.sz.)  $10^5$  db/g friss-súly (F.s.), absc.: az alkalmazott koncentrációk (mg/l). (Sziráki 1970 után)



A 2,4-D és az IES (IAA) különböző koncentrációinak együttes hatása a dohány kalluszsövet proteintartalmának változására.

Ord.: protein (Pr.) mg/g friss-súly (F.s.), absc.: az alkalmazott koncentrációk (mg/l). (Sziráki-Maróti 1973)



A 2,4-D és az IES (IAA) különböző koncentrációinak együttes hatása a dohány - kalluszsövet nukleinsav-tartalmának változására.

Ord.: nukleinsav (NA) mg/g friss-súly (F.s.), absc.: az alkalmazott koncentrációk (mg/l). (Sziráki-Maróti 1973)



Tápközeg	Sárgarépa kallusz			Csicsóka kallusz		
	Friss súly (mg)	Sejtszám db · 10 <sup>3</sup>	Sejtszám /μg	Friss súly (mg)	Sejtszám db · 10 <sup>3</sup>	Sejtszám /μg
Alaptápközeg	3,3	34,7	10,5	3,2	10,0	3,2
Alap + kazein-hidrolizátum	10,3	33,2	3,2	6,5	7,1	1,1
Alap+kókusz-tej	1046,3	4590,4	4,4	22,1	70,5	3,2
Alap+kazein-hidrolizátum + 2benz-tiazotill oxlécet-sav	59,1	225,5	3,8	114,5	1084,1	9,5

## NÖVÉNYI KIVONATOK

Egyes növényi kivonatok is növesztőleg hatnak a növényi tenyészetekre. Ezek rendszerint nem esszenciális feltételei a normális növekedésnek, hanem annak intenzitására, időtartamára hatnak.

Hatásosnak bizonyult a kókusztej és a kókuszdió szilárd endospermiumának vizes kivonata élesztő és maláta kivonat, kazein-hidrolizátum, paradicsomlé, vadgesztenye, kukorica folyékony endospermiuma stb. Ezeknél részint a bennük található auxin-természetű anyagokra, vagy vitaminokra, aminosavakra és egyéb még nem tisztázott, ismeretlen hatóanyagokra vezethető vissza a serkentő hatás.

A kísérletek általában azt bizonyítják, hogy a növényi részek gyarapodását – amely akár sejtosztódásra, akár sejttágulásra vezethető vissza – nem egy vegyület, hanem többnek a kölcsönhatása okozza. Ezért azután együtt alkalmazzák más vegyületekkel, amelyek *szinergizmusba*, vagy *autagonizmusba* (egymást támogató, vagy ellentétes hatásba) is kerülhetnek, ezért egyedi hatásmechanizmusuk részben még ismeretlen.



A kókusztejet öt-hat különböző hatású frakcióra bontottak eddig. Az egyik hatásos frakciónak az 1:3 difenilurea bizonyult, de leukoantocianineket is találtak benne. (Ez utóbbi a vadgesztenye folyékony endo-spermiumában is megtalálható).

**A kókusztej koncentrációjának hatása Rumex vírusos tumorszövetének növekedésére (Nickell 1950 után)**

Koncentráció	A növekedés mértéke: végsúly/kezdősúly	
	Friss kókusztej	Autoklávozott kókusztej
Kontroll	5,3	5,3
10 %	5,6	8,6
20 %	6,8	9,6
30 %	6,8	11,1

**A kókusztej hatása különböző növényfajból származó szövetek növekedésére (Duhamet 1949, 1950 után)**

Koncentráció	Friss-súly, mg	
	<i>Helianthus tuberosus</i> -gumó normális kallusza	<i>Scorzonera hispanica</i> -gyökér tumoros szövete
Kontroll	135	51
2 %	-	83
5 %	2030	88
10 %	-	110
20 %	-	121
100 %	4780	-



A kókusztej és a gesztenye (*Aesculus woerlitzensis*) folyékony endospermiumának hatása a sárgarépa kalluszsövetének gyarapodására, kazeinhidrolizátummal és anélkül.

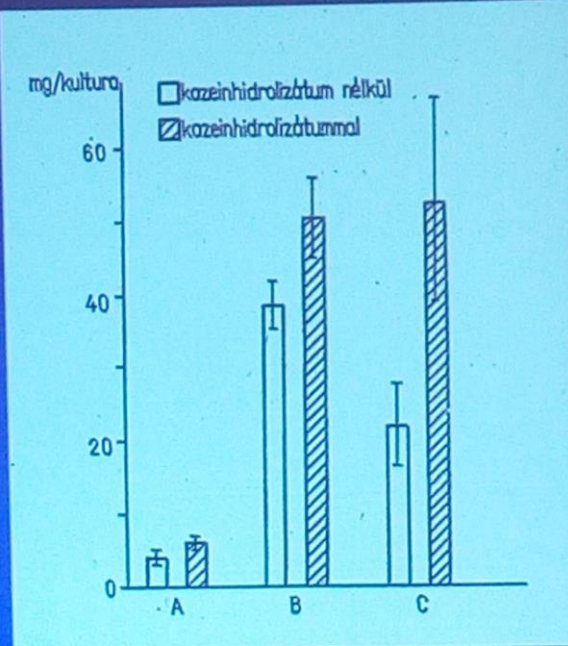
A = alaptápközeg

B = alaptápközeg + kókusztej (10 %)

C = alaptápközeg + gesztenye endospermium (0,032 %).

Ord.: a szövet növekedése (mg/kultúra),

Absc.: tápközegek.



(Steward-Shantz 1956 után)

## KÓKUSZTEJ

Tenyésztéséhez használt kivonatok közül a leghatásosabbnak eddig a kókusztej bizonyult.

Egymagában is szövetgyarapodást idéz, de auxinokkal együtt adva növesztő hatása szembetűnő. Aránylag tömény (10-30 %)-os oldatban fejt ki hatását.

Növekedésre ható anyagai **hőstabilak** (tárolása így könnyű)  
- autoklávozva aktívabbak.

A kókusztej elsősorban a sejtosztódásra fejt ki hatását → kezelt anyagok sejteinek a súlya és térfogata csökken.

(Auxinok a sejttágulásra hatnak, így jól kiegészítik egymást.)



A kukorica folyékony endo-spermiumában pedig főleg indolil-ecetsavas arabinozidot találtak, de nukleinsavszármazékok is előfordulnak benne, amelyek növekedést serkentő hatását magyarázzák. Egyes növényi kivonatok serkentő hatását jól szemléltetik Steward (1956) eredményei a következő táblázatban.

Az élesztőkivonat növesztő hatását is már régen ismerik. Gyakran más stimuláló anyagokkal (pl. 2,4-D) szinergizmusba lép, és a növekedést fokozza.

Általában 1 G/L conc.-ban hatásos Pepton-nak – is hasonló hatását mutatták ki.

A malátakivonat – pl. fenyőkultúrák növekedését fokozza.

A paradicsomlé serkentő hatását a benne lévő aszparaginra vezetik vissza.

## ANTIBIOTIKUMOK

Az antibiotikumok nagy része hatástalan, vagy gátolja a szövetek növekedését.

Néhány azonban – conc. függvényében – serkentette a növekedést.

Antibiotikum	Koncentráció ppm	A növény faja és a szövet természete		
		<i>Ginkgo</i> pollen	<i>Ilex</i> szár	<i>Rosa</i> szár
Tiolutin	1	0	0	0
Sztreptomycin	10	0	+	+
Neomicin	1	+	+++++	+
Terramicin	5	0	+++++	+++++
Bacitracin	50	+++++	+++++	+
Oleandomicin	20	+++++	+++++	+++++
Penicillin	20	+++++	+++++	+++++

\*\*\*\*\* növekedési üteme egyenlő a kontrolléval; + gyenge gátlás; 0 inhibitor hatás



## GÁTLÓK

A növényi izolatumok növekedésének szabályozásában gátlókat is felhasználnak. Elsősorban azért, hogy az egyes vegyületek pl. fehérjék, nukleinsavak, enzimek bioszintézisének mechanizmusát tanulmányozzák (pl. kumarinok, klorogénsav).

**Jellegzetes inhibitorok:**

- Abszcizinsav hatása közül a legfontosabb, hogy a rügyek, hajtások, termések, virágok, levelek **leválásait** idézi elő. Hatása – ellentétes az auxinokkal és gibberellinével, ezek működését kompetitíve gátolja (tehát a levelek leválását IES, vagy gibberellin előkezeléssel meg lehet gátolni).

- Etilén: újabban nagy jelentőséget tulajdonítanak a gáznemű etilén-nek a növekedés szabályozásában. Ilyen etilénkészítmény az „etherl”, amely bizonyos conc.-ban 2-klór-etil-foszforsavat (CEPA) tartalmaz → és ebből kémiai degradáció útján folyamatosan szabadul fel az etilén.

Új fitohormonként kezelik, bár régóta ismert, hogy az érő gyümölcsökben nagy mennyiség keletkezik → **elősegíti a gyors érést**.

## Auxinok hatása *Nicotiana tabacum* sejt sejt kultúrák alkaloid képzésére

Auxin (ppm)	Alkaloid tartalom %	Irodalom
2,1 β-IES	0,002 – 0,006 Nikotin	<i>Ders, H-Yamamoto, - Hiraoka, Phytochem.</i>
0,2 2,4-D	0 nikotin	
2,0 2,4-D	0 nikotin	
1,0 β-IES	0,01 Anabasin, nikotin	<i>Furuya et al. Phytochem. 1971.</i>
1,0 2,4-D	0 alkaloid	
1,0 β-IES	0,19	} <b>Nikotin</b>
10,0 β-IES	0,25	
100,0 β-IES	-	
0,1 α-NES	0,33	
1,0 α-NES	0,12	
10,0 α-NES	-	
0,01 2,4-D	0,23	
0,1 2,4-D	0,10	
1,0 2,4-D	-	



**A különböző tápközégek hatása a növekedésre és a szerpentin  
 produkcióra a *Catharanthus roseus* szuszpenziós kultúrában**  
 (Forrás: Zenk, M.H., et al., Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application  
 p.27(1977), Springer-Verland, Berlin, Heidelberg)

<b>Basal Medium*</b>	<b>Sejthozam g száraztömeg/l</b>	<b>Szerpentin mg/l</b>	<b>Szerpentin tartalom % száraztömeg</b>
Blaydes	7,6	4,4	0,06
Gamborg – B5; + 2,4 - D: 1 mg/l	4,6	0,3	0,01
Gamborg + 2,4 - D: 2 mg/l	5,2	0	0
Gamborg + NAA: 1,86 mg/l	7,6	1,2	0,02
Gamborg	5,1	0	0
Heller + IAA:0.175;BA:1,13 mg/l	5,4	6,6	0,12
Linsmaier and Skoog	9,3	0	0
Murashige and Skoog	8,9	10,4	0,12
Nitsch and Nitsch	2,3	2,0	0,09
Velicky and Martin	5,0	0	0
White	0,8	0	0



## Gyógynövény sejt-, szövettenyészetek hatóanyag képzése

Várható, hogy a gyógyszeripari célra használt természetes anyagok gyártására is egyre többször fognak biotechnológiai módszereket alkalmazni.

Világszerte kiterjedt kutatásokat folytatnak a gyógynövényekből nyert *in vitro* kultúrák segítségével a **növényi hatóanyagok** előállítására, ellenőrzött és reprodukálható módon.

Nem kétséges, hogy a **sejtszuspenziós kultúrák** iparszerű felhasználása a biológiailag aktív, elsősorban gyógyászati szempontból fontos anyagok gyártásával kapcsolatban jogosan merült fel.

### SEJTTENYÉSZTÉS

Úttörő jelentőségűek voltak Hildebrandt és munkatársainak az 50-es években végzett kutatásai. Sikerült folyékony táptalajban olyan sejtszuspenziót létrehozni, amely különálló sejtekből és néhány sejtből álló aggregátumokból állt.

A sejtszuspenzió tenyésztés módszertanát Melchers és Bergman 1959-ben tökéletesítette.

Napjainkban a növényi sejtszuspenziók alkalmazása mind az alap kutatásban, mind az alkalmazott kutatásban széleskörűen elterjedt.



A növényi sejt- és szövettenyésztési módszerek utóbbi években tapasztalt elterjedésével előtérbe került a növényi sejtek és szövetek **hatóanyagtermeltetésre való felhasználása.**

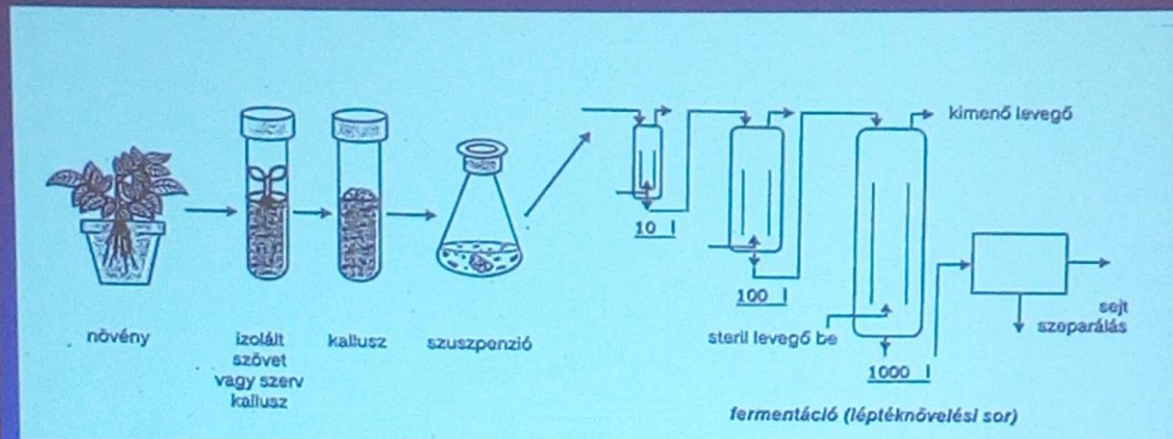
A kutatásokból ismertté vált, hogy az intakt növény által termelt hatóanyagok a laboratóriumban előállított *in vitro* sejt- és szövetkultúrákban is képződnek. Ez azért lehetséges, mert a soksejtű növény minden élő sejtje teljes értékű, totipotens, vagyis teljes génkészlettel, genetikai és biokémiai potenciállal rendelkezik és megfelelő körülmények mellett képes lehet önálló fejlődésre. Ezek az ismeretek teremtették meg a biológiai alapot ahhoz, hogy a bioreaktorban történő növényi sejtenyésztéshez szükséges szuszpenziós kultúrákkal kapcsolatos kutatások elkezdődhessenek.

### **Növényi fermentációs technológia: növényi sejtgyárak a gyógyhatású anyagok termeltetésére**

Az Európai Unió Kutatási és Technológiafejlesztési Keretprogramjának is egyik prioritása a **növényi sejtgyár (plant cell factory)**, más szóval a növényi sejtfermentáció technológiájának kidolgozása biológiailag aktív, elsősorban gyógyhatású anyagok termeltetésére. A növényi sejtfermentáció tudományos és gazdasági jelentősége óriási.

Közismert, hogy a növényvilág egyedüli forrása számos, az **iparban, mezőgazdaságban és a gyógyászatban felhasználásra kerülő szervesanyagnak.** Felismerve ennek rendkívüli jelentőségét **a gyógyászatilag fontos biológiailag aktív anyagok,** a kozmetikai- és élelmiszeriparban felhasználásra kerülő íz-, illat-, aroma és színezékek, a mezőgazdaságban fontos természetes herbicidek és inszekticidek növényekkel történő termeltetése iránt világszerte megnőtt az érdeklődés.





A növénytől a bioreaktoros tenyésztésig történő folyamat vázlata.  
Közbülső lépésként helyezkednek el a kallusz és rázatott sejtuszpenziós kultúrák

## LÉPTÉKNÖVELÉS

A metil-digoxin hozama 0,5-0,8 g/l

(megközelíti a növényi anyagokból való előállítás rentabilitását)

*Az eljárás a következő lépéseket tartalmazza:*

- 1 db l-es Erlenmayer lombikban 300 ml tápoldatban tenyésztik a sejteket
- 10-20 db lombik tartalmát 30 literes reaktorba töltik.
- kb. 10 nap alatt a sejtek elszaporodnak
- átszivattyúzzák egy 200 literes fermentorba, a biotranszformálás lebonyolításához.



## Sejtszuszpenziós kultúrák

Totipotencia alapján logikusnak tűnik, hogy a sejtszuszpenziós kultúrák mennyiségileg és minőségileg hasonló produkcióra képesek mint az intakt növény, amelyből származnak. Ez abból is fakad, hogy elvileg tartalmazzák mindazon enzimeket, melyek az intakt növényben kimutathatók.

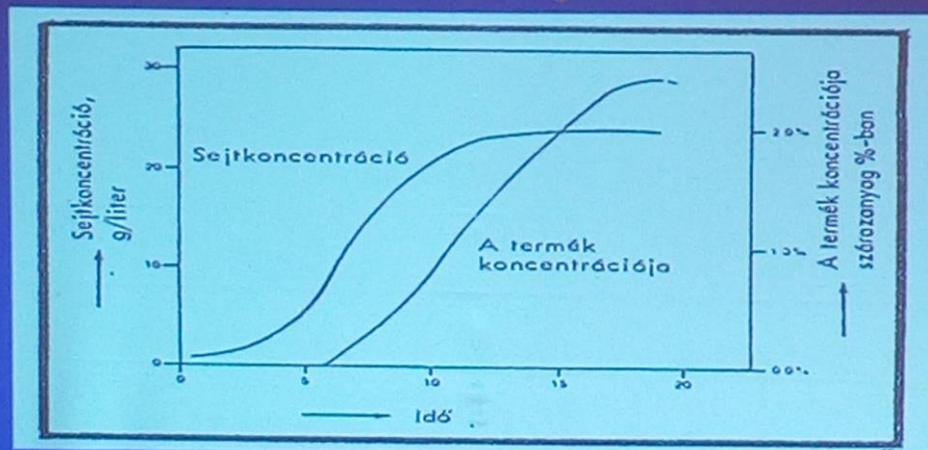
A sejtszuszpenziós kultúrák nagyszámú új vegyület szintézisére is képesek, melyek részben biológiailag aktívak és melyek az intakt növényekben nem mutathatók ki. Ez nem meglepő, hiszen *in vitro* rendszerben a sejteket erős stresszhatás éri, melyre a sejtek génexpressziójuk megváltozásával válaszolnak.

Szabály értékűnek látszik az a megfigyelés, hogy a növényi sejt hatóanyagtermelésre az osztódást követő differenciáció után képes, vagyis ahol a replikáció már kisebb jelentőségű.

### Sejtkultúrák

A növényi produktumok szintézise többnyire a sejtosztódástól független, sőt, bizonyos esetekben a fokozott osztódási ütem kifejezetten elvonja a sejt energiáit a kívánt metabolit szintézisétől.

A hatóanyag termelés maximumát a sejtosztódás leállása után éri el.



Az osztódási ütemtől nem függő termék termelésének kinetikája a fermentorban



## SEJTSZUSZPENZIÓK

A növényi sejtek a fermentorban két fejlődési (tenyésztési) fázison mennek keresztül.

- Az első szakaszban a DNS replikáció és az intenzív sejtosztódás a jellemző. Ekkor a hatóanyagok szintézise minimális.

- A második szakaszban lassul az osztódások üteme és a differenciálódási folyamatok válnak dominálóvá. A speciális anyagcsere termékének képződése ebben a szakaszban lesz meghatározó.

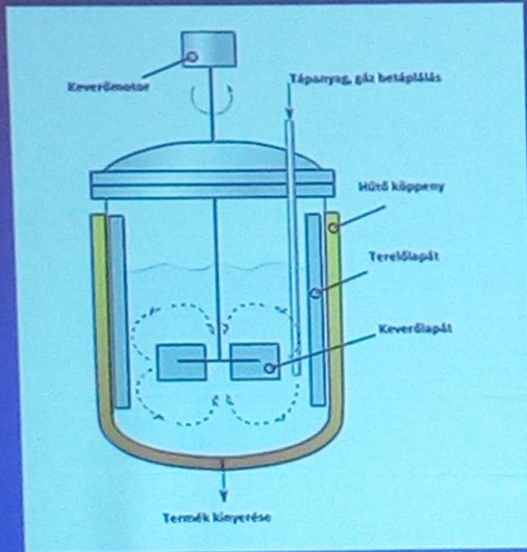
Ideális esetben az első szakasz gyors, míg a második, termelő szakasz a kiterjedtebb.

## BIOREAKTORBAN

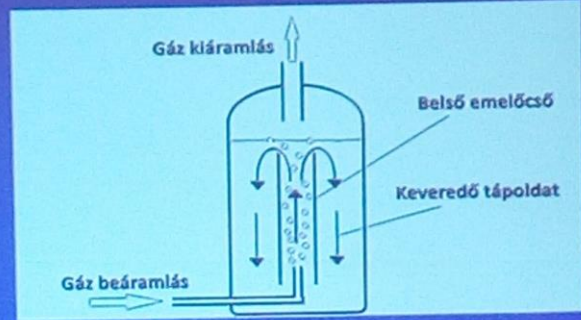
- tápközeg lecserélhető
- prekursor folyamatosan adagolható,
- rendszer biokonverzióra alkalmas,
- folyamatos tenyésztés



# Fermentor alaptípusok



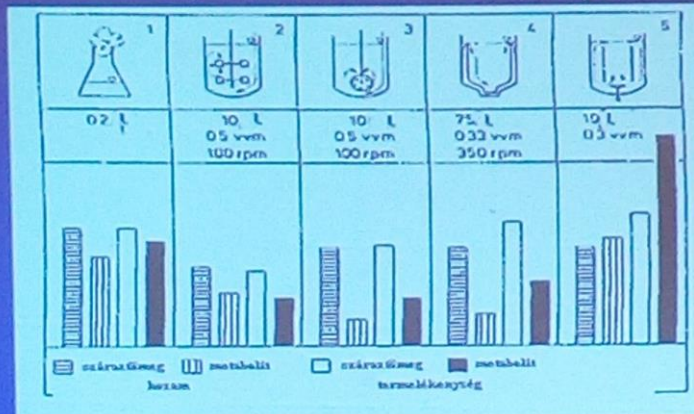
Mechanikusan kevert fermentor



Air-lift fermentor

## KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ FERMENTOROK

Wagner és munkatársai különböző rázó- és levegőztetőrendszerekkel felszerelt fermentorokat hasonlítottak össze, *Morinda citrifolia* különböző méretű sejtömegeinek felhasználásával. Ajánlásuk szerint a levegőáramlásos (air-lift) fermentor használata a legmegfelelőbb az antrakinon termelésre.



Air-lift

Forrás: Wagner, F. In „Plant Tissue Culture and Its Bio-technological application” Ed. Barz, W. et al., 250 oldal (1977), Springer-Verlag

1. Rázott lombik; 2. flat blade turbine; 3. perforated disk impeller; 4. draft tube reactor with kaplan turbine; 5. airlift



## A mikrobiális és növényi sejtek jellemzői a fermentációval kapcsolatban

JELLEMZŐK	MIKROORGANIZMUS	NÖVÉNYI SEJT
méret	2 $\mu$	> 10 $\mu$
deformálódási hajlam	nem érzékeny	érzékeny nyíróerőre
víztartalom	75 %	> 90 %
kettőződési idő	> 1 óra	napok
levegőztetés	1-2 vvm	0.3 vvm
fermentációs idő	napok	hetek
termékfelhalmozódás	közepes	vakuólum
mutáció	lehetséges	haploidok szükségesek
átlagár (\$) (MS medium)	8-9/m	65-70/m

(Forrás: Zenk, M.H., Plant Cell Culture Conference, Oyez Sci, Tech. Serv. (1982))

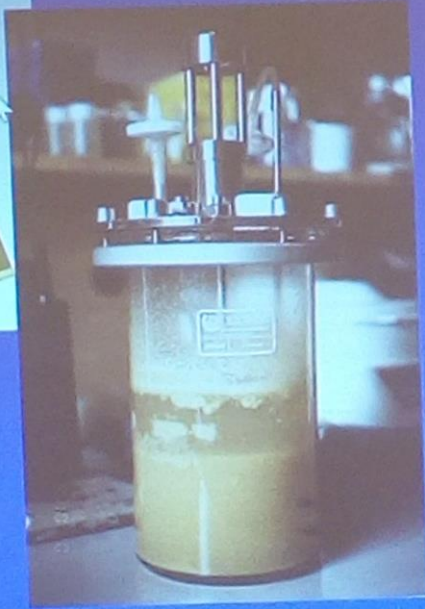
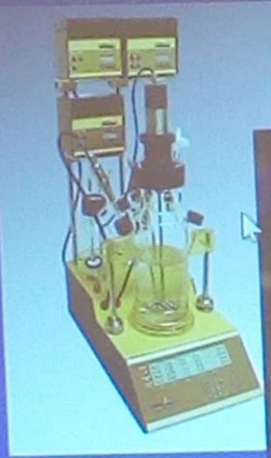
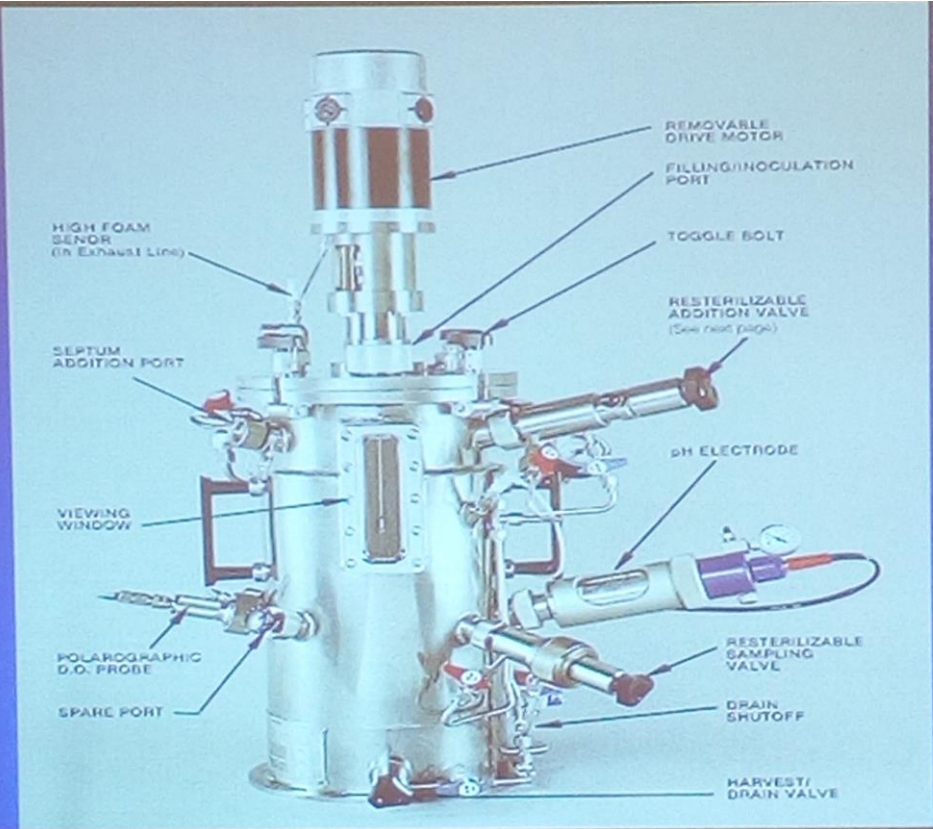
A fenti, fermentációs technológiával kapcsolatban felmerült problémákon túl jelentős akadályokat kell legyőzni biokémiai szinten is. A két legfontosabb ezek közül a termékek gyenge kifejeződése és a sejtvonalak instabilitása.

## A fermentáció ökonómiai viszonyai: összehasonlítás a mikrobiális és a növényi rendszer között

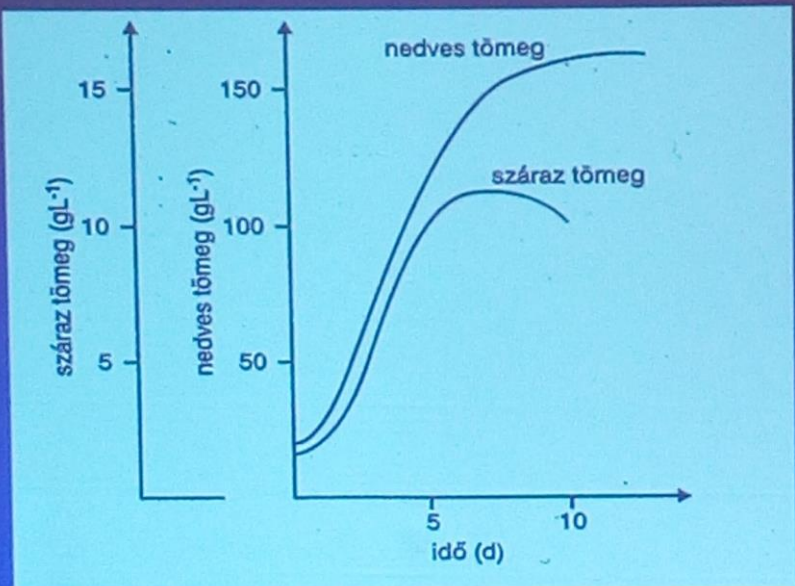
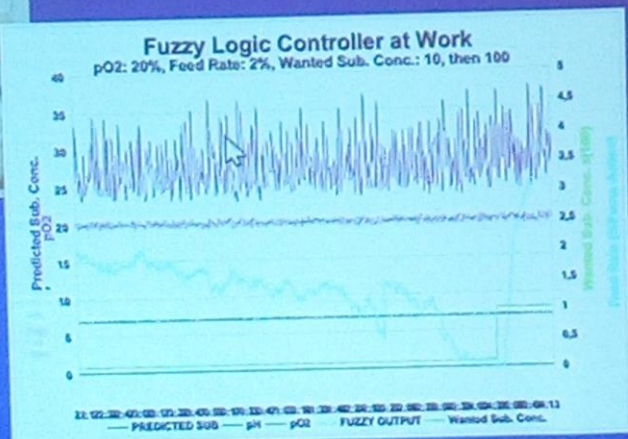
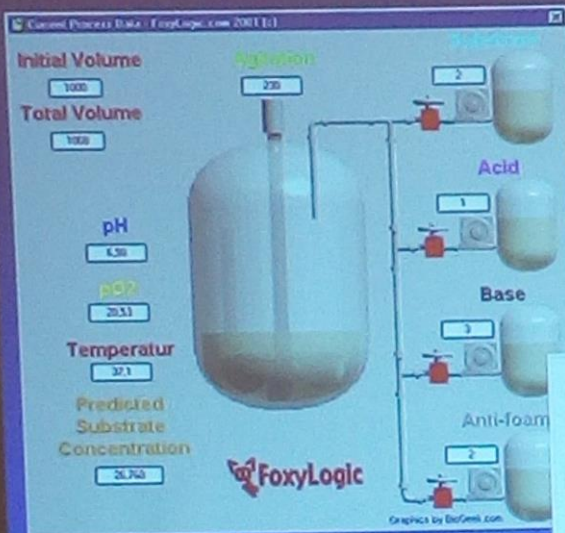
Termék	Ár dollár/kg	Forgalom kg/év	Fermentációs ciklus, napokban	Hozam g/liter
Penicillin-G	41,60	1,25 millió	7	10-15
Glutamát	2,00	22 millió	1,5	80-100
Citromsav	1,36	180 millió	4-5	120-150
Dioszgenin	674,00	200 000	15-16	0,43

Az ökonómiai jellemzők alapján, a növényi tenyészetekben ma elérhető hozamokat figyelembe véve, az ipari hasznosításra a nagy értékű, közepes vagy alacsony volumenben forgalmazott termékek látszanak alkalmasnak. Ilyen volt a japán Mitsui Chemicals által a világon először ilyen módszerrel gyártott szikonin, melynek ára 4500 dollár/kg.



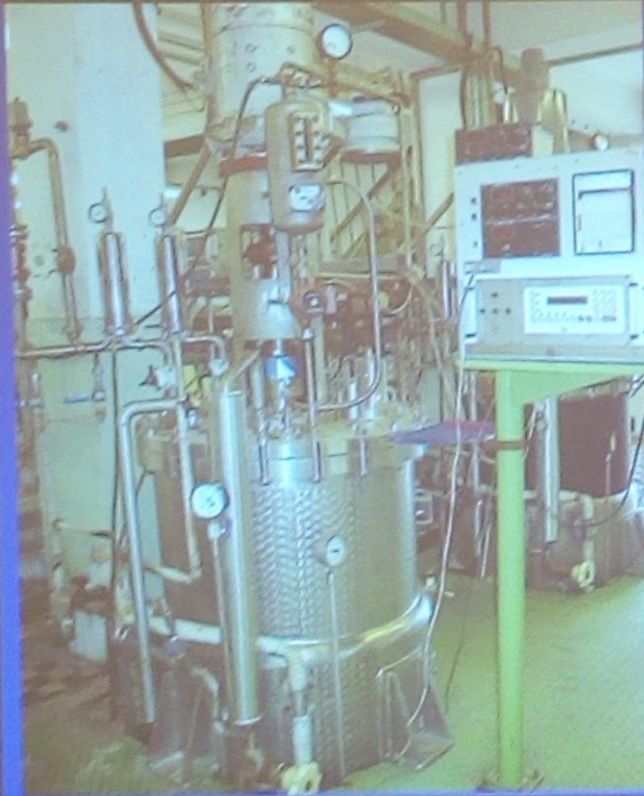






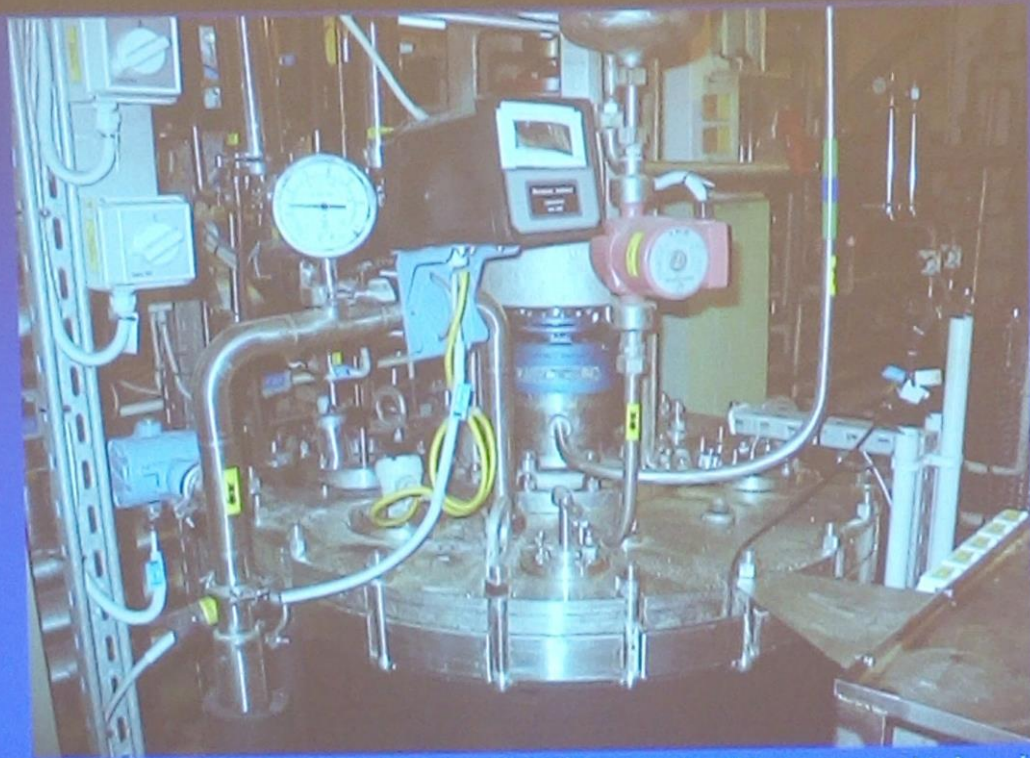
Növényi sejtuszuszenzió növekedési görbéje fermentorban  
(Seragg, 1992 nyomán)





## 1 m<sup>3</sup>-es FERMENTOR

←  
Jól látszik a fermentor közepéből kiálló keverőtengely, amelynek szimeringgyűrűs, vízzáras tömítése (kék gyűrű) biztosítja a steril kapcsolatot a fermentorfejjel.

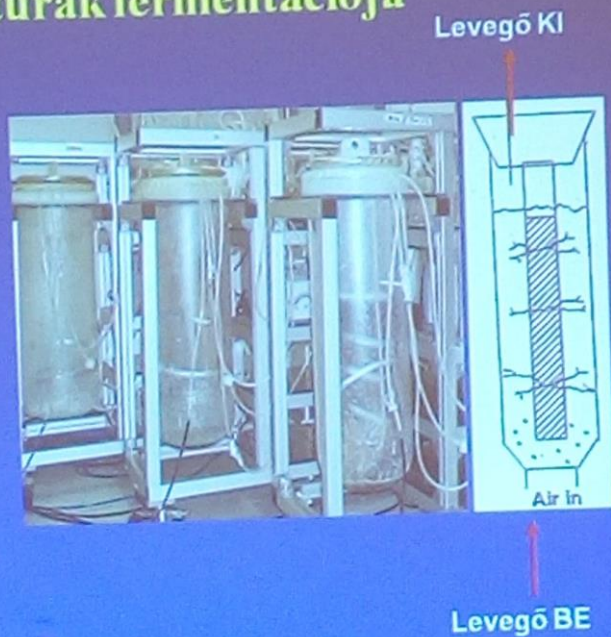


A modern 1 köbméteres fermentor feje bonyolult csövezéssel és szenzorparkkal rendelkezik.



## Hairy-root kultúrák fermentációja

- **Sejtszuszpenziós kultúrában** nem nagyon termelődnek tropánvázis alkaloidok (sejtek dedifferenciálódása miatt)
- **Hairy-root kultúrák** felhasználásával, módosított (belső mátrix-szal rendelkező) bioreaktorokban
- Cél a bioszintézis során speciális enzim tevékenység fokozása, így a **szkopolamin** mennyiségének növelése.
- **Elicitorok:** jazmonsav,  $AlCl_3$



Bioreaktor	Térfogat	Növényfaj	Speciális metabolit	Megjegyzés
Légporlasztásos	880 ml	<i>Nicotiana rustica</i>	Nikotin	
Keverőtartályos	330 ml	<i>Armoracia rusticana</i>	Nincs adat	
Keverőtartályos	1000 ml	<i>Atropa belladonna</i>	Tropán alkaloidok	
Keverőtartályos	1000 ml	<i>Calystegia sepium</i>	Tropán alkaloidok	
Keverőtartályos	1000 ml	<i>Atropa belladonna</i>	Tropán alkaloidok	A keverőlapát elválasztása hálóval
Keverőtartályos	12000 ml	<i>Datura stramonium</i>	Tropán alkaloidok	A keverőlapát elválasztása hálóval
Keverőtartályos	1000 ml	<i>Duboisia leichhardtii</i>	Indol alkaloidok	keverőlapát elválasztás hálóval
Air lift	300 ml	<i>Armoracia rusticana</i>	Nincs adat	Rogznes polimeranhobon
Air lift	9000 ml	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Dioszgenin	



## FERMENTÁCIÓ

- első szakaszban: DNS-replikáció intenzív sejtosztódás
- második szakaszban: differenciálódási folyamat (hatóanyag produkció)

→ Két fázisú tenyésztés

- sejt kultúrák - genetikailag instabilak  
(2,4 - D hatására a kromoszóma aberrációk száma nő)

### *Fokozott hatóanyagprodukció*

- *Olyan vegyületek előállítása, amelyek az intakt növényben nem fordulnak elő*
- *a kémiai szintézisük- drága, vagy nem megoldott, vagy kis kitermelésű*

## ELICITÁLÁS

A hatóanyagtermelést növelő tényezők kutatása elvezet az elicitálás fogalmához. Közismert, hogy a növényi kórokozók (pl.: vírus, baktérium, gomba stb.) hatására **válaszreakcióként** a növényi sejtben speciális anyagok (pl. flavonoidok) képződnek.

A kutatások bizonyítják, hogy a flavonoidok, de a legtöbb másodlagos anyagcsere termék fokozza a növény általános *fitness*-ét. A fentiekből fakad az emberi felhasználás lehetősége is.

Ennek stratégiája a védekezési patogén reakció mesterséges kiváltása a kérdéses hatóanyagtermelés fokozása érdekében (elicitálás). Ezzel a sejt hatóanyagtermelése akár **százszorosára** is fokozható.

Az elicitálás hátterében így egyaránt tudományos és gazdasági érdekek húzódnak meg.



## BIOREAKTORBAN

A hatóanyag termeltetést tovább lehet fokozni

**immobilizációval**

(pl. *alginát-gél*)



**Többszörösére emelhető a metabolitok mennyisége**

*(pl. 5 l-es, mikroporózus anyagot tartalmazó fixágyas reaktor  
50-100 l-es szuszpenziós reaktornak felel meg)*

## IMMOBILIZÁCIÓ

A sejteket valamilyen nagy felületű hordozó közegen kötjük meg .

*Az eljárás előnyei:*

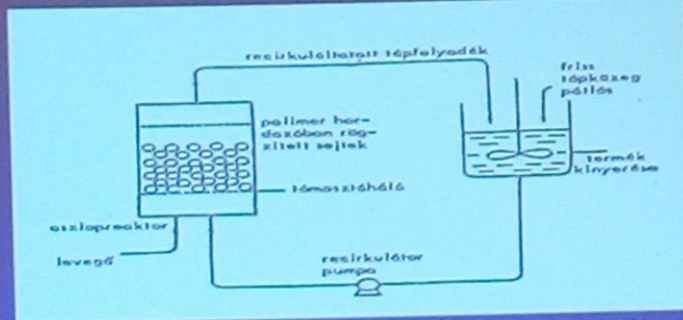
- többszörösére emelhető a metabolitok mennyisége,
- a tápközeg bármikor módosítható és lecserélhető sejtvesztés nélkül,
- a prekursor folyamatosan adagolható,
- a végtermék folyamatosan eltávolítható a táptalajból,
- a rendszer biokonverzióra alkalmas,
- a sejtek hosszú időn át megőrzik életképességüket,
- nagy sejtdenzitás érhető el

*(pl. 5 l-es, mikroporózus anyagot tartalmazó fixágyas reaktor  
50-100 l-es szuszpenziós reaktornak felel meg),*

- valódi folyamatos tenyésztés is megvalósítható.



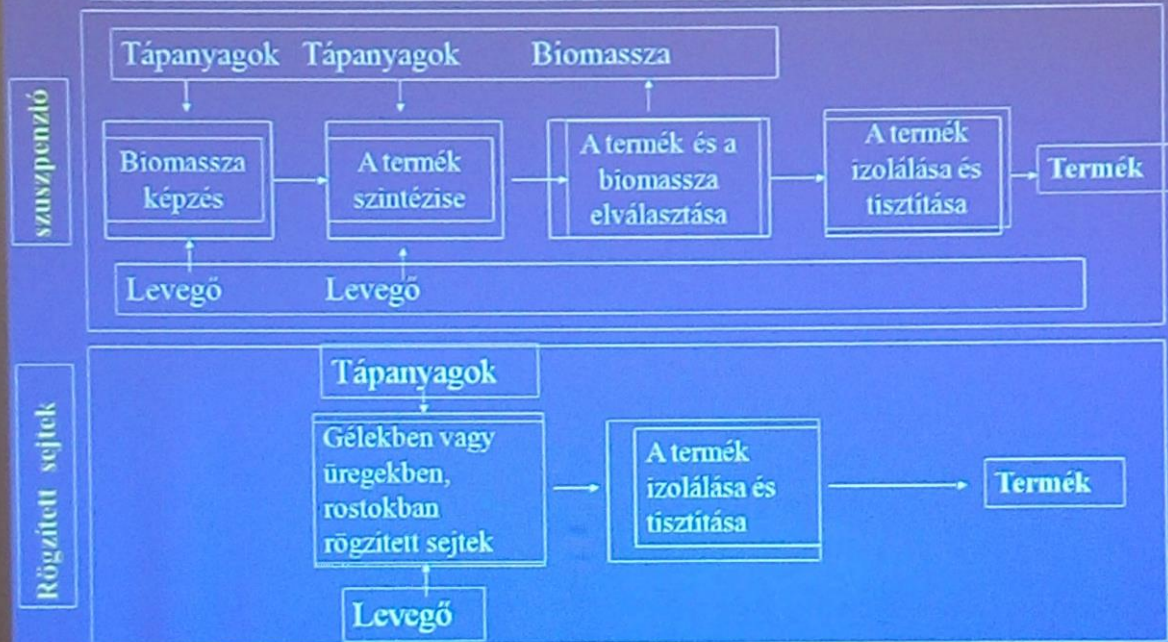
## Immobilizált növényi sejtreaktor vázlata



Az immobilizált sejtreakciók ökonómiai tulajdonságait az alábbi fontosabb paraméterek befolyásolják:

- rögzített sejtek stabilitása (életideje);
- a hordozóból kialakított egységek (pl. agarözgöngyök) mérete, ill. a hordozó szövet sűrűsége;
- az egyes hordozó egységeken (göngyökökön) belül kialakított sejtsűrűség;
- a termék koncentrációja a tározó közegben, ami az átáramoltatási sebességgel is szoros kapcsolatban van a folytonos üzemi reaktorokban;
- a sejtek specifikus aktivitása;
- az egységnyi bevitt szénforrásra jutó hozam.

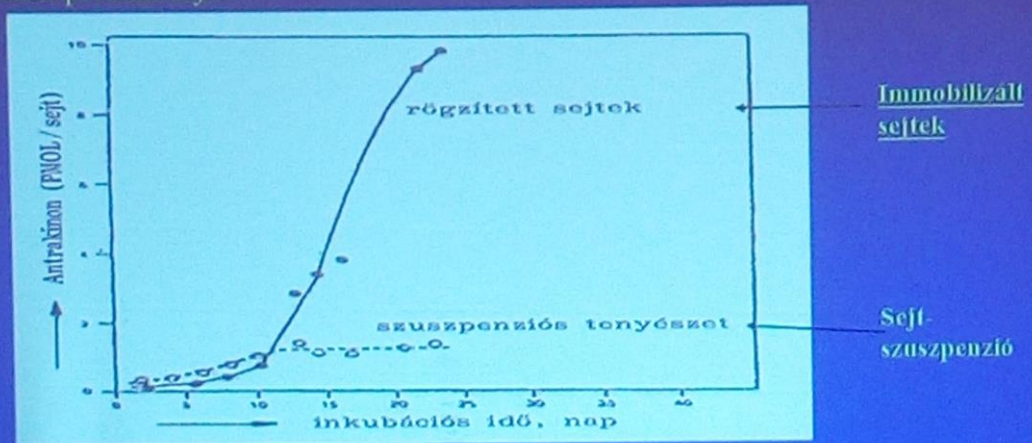
## Növényi sejtreaktorok folyamatábrái (Szuszpenziós és immobilizált kultúrák)





A késői stacioner fázisban levő kultúrát megfelelő mátrixban rögzítve, folyamatos üzemű, átáramoltatott közegű reaktorban termeltethetjük a kívánt hatóanyagot.

Az immobilizált sejtek sok esetben messze felülműlják a szuszpenziós kultúrák produktívóját.



Antraquinon termelés a *Marinoda citrifolia* szuszpenziós és immobilizált (alginát-gél) sejt-kultúráiban



## FERMENTACIÓ - folytatás

### Növényi sejt-kultúrák által magas koncentrációban előállított speciális anyagcseretermékek

Vegyület	Növényfaj	Hozam (% szárazsúly)		Kultúra Típusa
		Kultúra	Növény	
Sikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1,5	S
Ginzenozid	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	C
Antrakinonok	<i>Morinda citrifolia</i>	18	0,3	S
Ajmalicin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,0	0,3	S
Rozmaringsav	<i>Coleus blumei</i>	15	3	S
Ubiquinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,036	0,003	S
Dioszgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	2	2	S
Benzilzokinin alk	<i>Coptis japonica</i>	11	5, 10	S
Berberin	<i>Thalictrum minus</i>	10	0,01	S
Berberin	<i>Coptis japonica</i>	10	2-4	S
Antrakinonok	<i>Galium verum</i>	5,4	1,2	S
Antrakinonok	<i>Galium aparine</i>	3,8	0,2	S
Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	3,4	2,0	C
Bizoklaurin	<i>Stephania cepharantha</i>	2,3	0,8	S
Triptolid	<i>Tripterygium wilfordii</i>	0,05	0,001	S

\* S = sejt-szuszpenziós kultúra, C = kallasz-tenyésztés



## AJMALICIN TARTALMÚ BIOMASSZA TERMELÉSI KÖLTSÉGEINEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

*(Catharanthus roseus)*

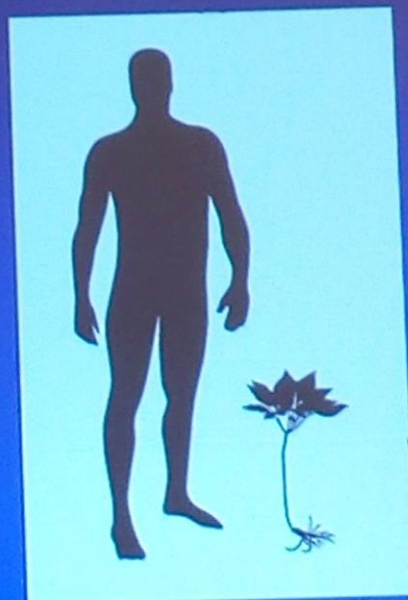
Eljárás	Ajmalicin	Idő	USD/kg ajmalicin
<b>Sejtszuszpenzió</b>			
-régi technológia	0,6 %	23 nap	3215
-új technológia	6,0 %	6 nap	608
Gyökér (Indiából importált)	0,3 %		619

1985. évi adatok szerint a *növényi sejternyészetekkel* előállított termék  
minimális költsége **500 USD/kg**

Csökkenthető folytonos technológiák *kidolgozásával* és *immobilizált sejtek*  
többszöri felhasználásával **25 USD/kg**



Ginseng





A ginzengnet hazájában, Kínában, Koreában igen széles körben alkalmazzák. Teák, krémek, fogkrémek, szappanok és üdítőitalok alkotórészét is képezi. A ginzeng-gyökerek alkalmazása tabletták és tonikok kiegészítőjeként a legelterjedtebb.

#### A ginzeng hatóanyagai

A ginzeng-gyökér fő hatóanyagát a szaponinok csoportjába tartozó ginzenozidok adják. Eddig összesen 31 féle ginzenozidot izoláltak, melyek kémiai felépítésük alapján két csoportra különülnek. Az egyik csoport tagjai, melyek nagyobb részben a mellékgyökerekben találhatóak, jellemzően szedatív (nyugtató) hatásúak, míg a másik csoport tagjai, melyek inkább a főgyökérből izolálhatók, stimuláló (élénkítő) hatást mutatnak.

A ginzeng-gyökér a szaponinokon kívül számos tápanyagot, E és B vitamint, ásványi anyagokat (mangán, réz, cink) és poliszacharidokat, cserzőanyagokat, szterineket, flavonoidokat, illóolajokat tartalmaz.

Dipertén származékokat tartalmaz a  
*Glinko biloba* levele



ginkgolidok – dilakton

bilobalidok – szeszkviterpén tip. (trilakton)

Hatáshoz nagymértékben hozzájárulnak a

flavonoidok közül a flavon glikozidok – hidroxifavénsav-észterei  
és a

biflavonoidok – agyi vérkeringésnövelő,  
lipidperoxidáció gátló.





## ANYAROZS

**Előfordulásuk, jelentőségük:** Az anyarozs nevű tömlősgomba (*Claviceps purpurea*) példája jól illusztrálja, hogy egy gomba egyszerre lehet veszélyes megbetegedéseket okozó és ugyanakkor a modern gyógyászat egyik legfontosabb farmakológiailag hasznosított gombafaja is.

Az anyarozs növényi kórokozó (fitopatogén) gomba, amely a gabonafélék (elsősorban a rozs) virágait fertőzi meg, elpusztítva a termőt. Ősszel a kalászban a fertőzött virágok helyén a 2–5 cm hosszú, görbült, fekete "varjúköröm" alakul ki, amely a gomba vegetatív szaporító szerve, ún. szkleróciuma. A szklerócium több mint száz biológiailag aktív vegyületet, elsősorban alkaloidokat tartalmaz, amelyek között toxikusak is vannak.

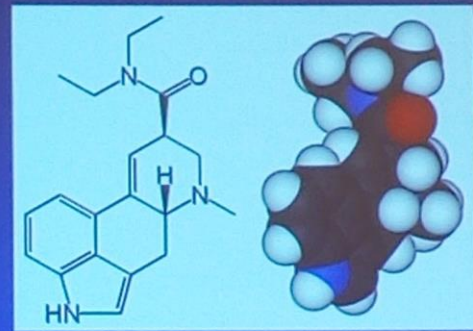
### *Secale cornutum* - hatóanyagok:

Az anyarozs egyes hatóanyagai a) ergolin b) lizergsav c) ergotamin

Már a középkorban ismertek voltak azok a tömeges megbetegedések, amelyeket a fertőzött, varjúkörmöt tartalmazó rozsból őrölt liszt fogyasztása okozott. Ez az *ergotizmusnak* nevezett betegség (valójában mérgezés) egyes vidékeken olyan gyakori volt, hogy járványosnak tekintették és külön szerzetesrend foglalkozott a gyógyításával.

Először Adam Lonitzer 1582-ben kiadott Fűvészkönyve említi, hogy a gombának gyógyító hatása is van. A gyógyszerkönyvekben azóta mint *Secale cornutum* szerepel. Csak a múlt század elején sikerült azonban az egyik anyarozs-alkaloidot tiszta formában is kinyerni.





Az LSD - lizergsav-dietilamid szerkezete

*Claviceps purpurea*

### *Anyarozs alkaloidok*

Az anyarozs alkaloidokat a *Claviceps purpurea* gomba állítja elő. A gomba hatóanyagainak egy része simaizom-összehúzó hatású. Ezeket elsősorban a centrális és periferiális vérzések csillapítására és a szülészeti gyakorlatban méhösszehúzó hatása miatt alkalmazzák.

További jelentősége van a migrén és a Parkinson-kór kezelésében.

Terápiás jelentősége miatt az anyarozst mesterségesen fertőzött rozstáblákon termesztették, mert mint obligát parazita, táptalajon nem volt tenyészhető, de ma már fermentációval és szintetikus módon ezek az alkaloidok előállíthatók.



### Szaprofita *Claviceps* törzsek fermentációs tenyésztése

Terápiás jelentősége miatt az anyarozst mesterségesen fertőzött rozstáblákon termesztik, mert mint obligát parazita, fermentációs tenyésztése nehézkes.

Az **alfa-hidroxi-etil-lizerg-amid** (D-lizergsav) előállítását szaprofita *Claviceps paspali*, *C. fusiformis*, *C. purpurea* fajjal végzik, az előállított terméket **félszintetikus alkaloidok** előállítására használják (pl. **lizergsav-dietil-amid**, LSD).

**Problémák:** a főfermentáció 8-12 napos, így nagy sterilítási és stabilitási körülményeket kell biztosítani a tenyészetnek, mint fonalas gombák igen érzékenyek a keverés miatt fellépő nyíró erőkre (a gombafonalak elszakadnak), ugyanakkor átlagos oxigénigényűek.

Az **alfa-hidroxi-etil-lizerg-amid**, a lizergsav előállításához a táptalajnak tartalmaznia kell **mannitot** vagy **szukcinátot**, az ergotaminhoz **szacharózt** vagy **citrátot**. **A glükóz represszálja az alkaloid előállítást**, ugyanakkor **triptofán** adagolással a **gombatenyészet szekunder metabolizmusa**, így az **alkaloid szintézis indukálható**. A szubmerz fermentáció kezdetén a trikarbonsav ciklus uralkodó szerepű, ezért is fontos a ciklus valamilyen szerves savát adagolni. A *Claviceps* törzsek fenntartása szintén problematikus, mivel az egyes átoltások során a törzsek termelőképessége gyorsan csökken. Itt nagy fontosságú az egyes termőképes izolátumok fagyasztással vagy liofilizálással való tartósítása.

A gomba fő hatóanyagai, az indol-alkaloidok közé tartoznak. Alapvázuk a tertaciklusos ergolin. A vegyületek két fő csoportba oszthatók: a **lizergsav-származékokéba** (pl. ergopeptin, ergotamin, ergopeptámok) és a **clavin-alkaloidokéba** (pl. clavin, agroclavin, elymoclavin). Az alkaloidokon kívül az anyarozs még egy sor, különböző szerkezetű hatóanyagot tartalmaz, mint pl. kéntartalmú hisztidinszármazékokat (pl. ergithionein), különleges zsírsavakat, indolditerpéneket, antrakinon-karbonsavakat és pigmenteket, amelyeket ergochromoknak neveznek. A gomba hatóanyagainak egy része vajúdat elősegítő, simaizom-összehúzó hatású. Ezeket elsősorban a centrális és perifériális vérzések csillapítására és a szülészeti gyakorlatban méhösszehúzó hatása miatt alkalmazzák. További jelentősége van a migrén és a Parkinson-kór kezelésében is.

Anyarozs alkaloidok és hatásaik: **ERGOMETRIN:** az amin-csoport miatt sóképzésre hajlamos, tartarát (ERGAM), vagy maleát formájában hozzák forgalomba. A szabad bázis vízben rosszul oldódik, etilacetáttal extrahálható,  $\text{CCl}_4$ -dal együtt kristályosodik. Hatása: **oxitocin** jellegű, a méhizomzat összehúzódását okozza. A szülés megindítására, gyorsítására és a kapcsolatos vérzések csökkentésére használják. **Érösszehúzó** hatása miatt migrénes rohamok kezelésére is jó. Adagja: 0,3 mg (kicsi) Ellenjavallat: terhesség. Az Ergometrin önmagában is gyógyszer, de a lizergsav és más származékok kiindulási anyaga is lehet. **ERGOTAMIN:** másik típus, itt az alapvázon több-gyűrűs tripeptid lóg. A különböző aminosavak beépülése révén több hasonló molekula. Apoláros aminosav oldalláncok - rosszabb vízoldhatóság. Erős érösszehúzó hatású, ezzel a vérnyomást emeli. Elimoklavin, lizergol, lizergsav, LSD (kábitószert).



## IPARI MÉRETEKBEN GYÁRTOTT

- növényi sejtműködésen alapuló – első biotechnológiai termékek

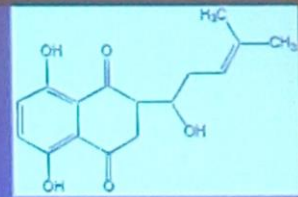
- **STIKONIN** (Mitsui Petrochemicals, Japán)
- **ECOSZTEREOLIN** (Bethesda Kutató Labor, USA)
- USA-ról 1990-ben :
  - **BIKBERIN** gyártásnak megindítása
  - **SZANGUINARIN** gyártásának engedélyeztetése is gyógyhatású fogkrémekhez
- Angliában 1990 után: **KAPSZATIN** kereskedelmi előállítására
- Californiai (*Escagenetics* cég) növényi sejtek által termelt **VANILLIN** forgalmazását jelezte „*Phytovanilla*” márkaneven.

## ZENK TECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSA

1. **Kvantitatív** analitikai eljárás kidolgozása a keresett természetes anyagra
2. Azon **egyedek kiválasztása**, amelyek a keresett vegyületet nagy mennyiségben tartalmazzák.
3. A kiválasztott növényekből kiinduló **szilvaszpenzios kultúrák** kialakítása.
4. Olyan **tápközeg** kifejlesztése
  - amely a sejtek intenzív **növekedését** lehetővé teszi.
  - amely a keresett anyag maximális mértékű **előállíthatóságát** garantálja.
5. Olyan **kolóniák előállítás**, amelyekben a sec. a. cs. termékek tartalma nagyobb.
6. A kiválasztott kolóniák **tenyésztése**
  - először a növekedést biztosító,
  - majd a **termelést** szolgáló közegben.
7. **Ellenőrzése** annak, hogy a kiválasztott klónok képesek-e a keresett anyagot előállítani.



## FESTÉKEK



- **Sikonin** (naftokinon származék)

- eredetileg a homoki pirosító gyökértörzsének kérgéből állították elő

ELSŐ IPARI ELJÁRÁS!!! (Mitsui - cég)

- Ma fermentorban termeltetik : 20% (4500 USA dollár/kg)

*Lithospermum erythrorhizon*

(gyökérben 5-7 év után 1-2% sikanin)

- Japánban gyökerét régóta használják **antibiotikumként és gyulladáscsökkentőként**
- bíbiorvörös színe miatt **színezékként** kozmetikumokban

(bíborús- első 2 hónapban: 1.320.000 db / á: 13 dollár.

Összesen: 17 millió USA dollár

## FESTÉKEK

- **kartamin-t,**

a sáfrány sárga pigmentjét, ma már *sejttenyészetben* állítják elő.

Eredetileg: **1 kg** porzóból

**4 g** festéket nyertek

- **γ - linolénsav**

Eredetileg mécsvirág olajából nyerték, ma bioreaktorban termeltetik.



## AROMAANYAGOK

- L-mentol állítható elő:

(D,L-mentiszukcináton keresztül hexánban, 40 °C)

*Rhodotorula minuta*

poliuretánba ágyazott sejtjeivel (immobilizáció).

A „fixágyas reaktorok” alkalmazása (makroporózus hordozóanyaggal)

lehetővé teszi a tér- és idő-kihasználás növelését:

5 l-es fixágyas reaktor megfelel

50-100 l-es szuszpenziós reaktorok

- Geraniol és citronellol-észter reverz észteráz reakciók alkalmazásával.
- Mosusz-lakton termelhető palmitinsav

*Torulopsis bombicola* jelenlétében végzett fermentálással.

## Daganatellenes szerek

Magasabbrendű növényekben számtalan daganatellenes vegyület fordul elő, de  
rendkívül kis koncentrációban



- kimutatásuk is nehézségekbe ütközik
- számos biológiai módszert dolgoztak ki  
(pl. tumor-sejt kultúrákra kifejtett citotoxikus hatást vizsgálják)

1980-ban egy felmérés során az USA-ban:

pl. 114.000 különböző növényi kivonatból



4,3% bizonyult hatásosnak

**Hatásosak:** változatos kémiai szerkezetűek voltak

(pl. tanninok, terpének, lignánok, flavonoidok, szaponinok,  
alkaloidok, proteinek, stb.)



## Magasabb rendű növényekben előforduló néhány tumorgátló vegyület

Tumorgátló vegyületek	Mennyisége a növényben (% szárazsúlyra vonatkoztatva)
Baccharin	$2,0 \times 10^{-2}$
Bruceantin	$1,0 \times 10^{-2}$
Kamptothecin	$5,0 \times 10^{-3}$
Ellipticin	$3,2 \times 10^{-5}$
Homoharringtonin	$1,8 \times 10^{-5}$
Maytanzin	$2,0 \times 10^{-5}$
Podophyllotoxin	$6,4 \times 10^{-1}$
Taxol	$5,0 \times 10^{-1}$
Tripdiolid	$1,0 \times 10^{-3}$
Vinblasztin, vinkrisztin	$5,0 \times 10^{-3}$

## RÁKTERÁPIÁBAN ALKALMAZOTT SZEREK

Általánosan jellemző, hogy a **daganatgátló terápiában felhasználható anyagok**, mint pl.

*artigenin, trachelogenin,  
TAXOL,  
vinkrisztin, vinblasztin*

a növényekben rendkívül alacsony – rendszerint mikromolos koncentrációban – nehezen kinyerhető állapotban vannak, kivonásuk körülményes és ettől költséges.

Így e hatóanyagok *biofermentációs* előállítása nagy eredményekkel kecsegtet.



(*Catharantus roseus* folyt.)

A **VINBLASZTIN** – 2 monomer alkaloidból épül fel:

**katarantin** (kevesebb)

+

**vindolin** (0,2 % intakt növényben – olcsóbb)

*C. rosens* sejtszuspenziós kultúrák táptalaj optimalizálása:

**katarantin: 150 mg/l** → **230 mg/l**

100 l-es air-lift fermentorban *átalakítják*

(*C. rosens* sejtekből előállított – **enzim** + **vindolin** alkalmazásának segítségével)

→ **3'4' anhidroviblasztinná,**

amely a **vinblasztin** közvetlen prekursora

**Japánok** – szervesen sók adagolásával optimalizálták az *anhidroviblasztin*  
→ *vinblasztin* (enzimatis) átalakítást (50 %-os hozam)

### *Taxol – Taxus brevifolia*

**Taxus** – nemzetség (8 faj + 2 hibrid)

- 1960-as években – megállapították, hogy a kéreg kivonata citotoxikus hatású a leukémia sejtekben és gátolja számos tumor növekedését
- 1971-ben amerikai kutatók izolálták a hatásáért felelős: *taxolt*

A **Taxol** (toxikus diterpén)

- gátolja a sejtosztódást (a G2/M-fázisban)
- *klinikai vizsgálatok*: nőgyógyászati és emlődaganatok  
(továbbá: tüdő, fej, nyaki daganatok)  
kezelésében aktívnak bizonyult.

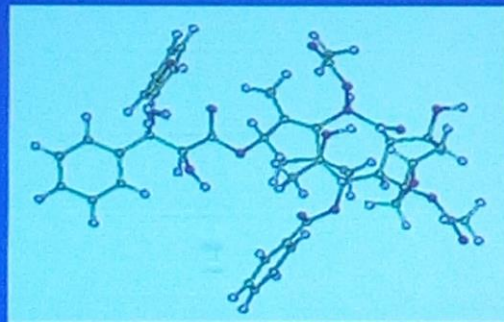
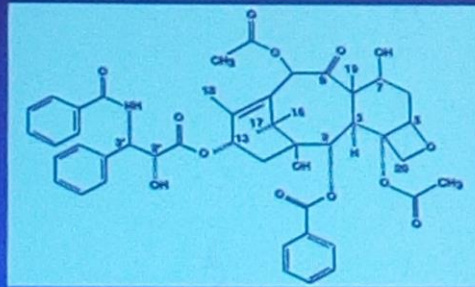
- 1994-ig csupán a növény kérgéből állították elő (*Taxus brevifolia*)  
5-10.000 kg kéreg → 1 kg taxol  
500 beteg kezelésére elegendő.

1 g taxol előállításához 2-3 öreg fát döntenek ki → 10 évre elég a Taxus-állomány!

Alacsony taxol-szint + lassú növekedés miatt a *biotechnológiai módszerek jelentősége*



# TAXOL



## TAXOL

ráke terápiaiban (mellrák II. fázis) alkalmazott diterpén pseudoalkaloid

Nézetek megoszlottak:

- szintetizálják-e, vagy
- a természetes forrását használják ki,
- sejt kultúrákban termeltessék,
- gyökér-hidro kultúrában

2 x magasabb, mint az ágkéregben és a gyökerek intenzíven nőttek.

*Taxus brevifolia* kérge:

7200 kg-ra van szükség —> 1 kg taxol kinyerésére!

1 g taxol előállításához —> 2-3 öreg fát kell kidönteni

Jelenlegi állomány : 5-10 évre elégtené ki a szükségletet



### Megjegyzés:

- 1994-ben sikerült megoldani a taxol totál-szintézisét, de

- eddig nem gazdaságos, mert

- a.) a folyamat bonyolult

- b.) viszonylag alacsony hozamú

- Jelenleg ígéretesebb megoldásnak látszik:

- a taxol *prekurzorokból* történő *szemiszintézise*

- növényi sejt/szövet kultúrák alkalmazása

- Immobilizált kultúrákkal (üvegszál-mátrixba zárt *T. cuspidata* sejtek) sikerült a taxol tartalmat (0,012 %)-t megemelni.

Előny, hogy a tápközegbe választja ki a taxolt (1-3 mg/l), ahonnan könnyen kinyerhető.

- Gyökér hidrokultúrák (gyökérben 2x magasabb, mint az ágakéregben, jól nő!).

## ARTEMIZININ

Bioreaktorban fed-batch tenyésztett *A. annua hairy roots* kultúrákban a tenyésztési idő során *számítógépes stimulációs modellel* elemezve az artemizinin termelést, a kísérleti adatok összehasonlítása segítette a hatóanyagtartalom fokozását. Elicitorok alkalmazásával tovább fokozódott a malária ellenes hatóanyag bioszintézise a géntranszformált kultúrákban. Cerebricid elicitor (kombinálva nátrium nitroprussziddal) jelentősen növelte az *A. annua hairy root* artemizinin tartalmát és produkcióját.



## *Pharming for Pharmaceuticals / „Molecular farming”* Kloroplasztisz-transzformált GM növények

- A kloroplasztisz transzformációnak a jövőben óriási jelentősége lesz a bioreaktor transzgénikus növények előállításában.
- Az első gyógyászati célra használható fehérjét (emberi növekedési hormont) termelő GM dohányt 1986-ban állították elő.
- Napjainkra több ezer tudományos közlemény jelent meg több mint 100 gyógyításban használható molekula előállításáról (hormonok, immunoglobulin, interferon, interleukin, vírus és baktérium elleni antigének).
- A kloroplasztisz transzformált növényben termelt fehérjék közül sokat klinikai vizsgálatokban is ellenőriztek, s az eredmények nagyon biztatóak.

### *Plant molecular farming (PMF) / Plant-made pharmaceutical (PMP)*

Gyógyszergyártás területén egyre nagyobb teret hódít

Jelenleg három gyógyszerfehérje engedélyezett piaci gyártásra, melyeket növényi biotechnológiával állítanak elő

- Transzgénikus dohányból előállított fogszuvasodás elleni antitest (CaroRx™), melynek gyártója a Planet Biotechnology.
- Szintén transzgénikus dohányból előállított newcastle vírus alegység vakcina, gyártója a DowAgro.
- Transzgénikus répából előállított humán- $\beta$ -glükocerebrozidáz enzim rekombináns formája a Gaucher-kór kezelésére használt taligluceráz alfa (ELELYSO™), amelynek gyártója a Protalix már fejleszti az orálisan alkalmazható formáját is (Kwon and

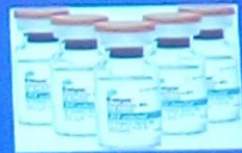


Glükocerebrozidáz enzim előállítása sárgarépa sejtuszpenzióval  
(egy örökletes anyagcserezavar, a Gaucher-betegség gyógyítására)

Fermentációs rendszer, ahol  
sárgarépa GM  
sejtuszpenziókat  
tenyésztnek  
plasztikzacskókban  
(Protalix Biopharmaceuticals)



Az ebben a betegségben szenvedők máj- és csontproblémáik kezelésére  
kéthetente kapnak injekciót, amelynek éves költsége 200 000 USD.  
A növényben előállított enzim nemcsak olcsóbb, hanem hosszabb ideig  
aktív a véráramban, így ritkábban van szükség az injekciózásra



## *A mesterséges mag*

A fermentorok alkalmazásának egy új felhasználási  
területe, a XXI. században forradalmasítja a  
gyógynövény szaporítást és termesztést.

A mesterséges mag, pontosabban a fermentorokban  
folyamatosan, milliárd számra előállítható  
szomatikus embriókkal végzett vetés és palántázás  
már gyakorlati alkalmazást nyert.

Az utóbbi évek eredményei alapján joggal  
feltételezzük, hogy a XXI. században már számos  
faj szaporítóanyagát klónozással, automatizált  
fermentor rendszerekben fogják előállítani.



A zárt fermentor rendszerek miatt lehetővé válhat:

- a teljes termés hasznosítása (nincs vetőgumó, vetőmag előállítás);
- a genetikai manipulációval előállított GM növények gyors felszaporítása;
- az előállítás helyének és idejének független az évszakoktól, az égtől és az adott faj termesztési területétől.

Gazdasági jelentőségét bizonyítja:

10 l-es fermentorban 1 hónap alatt 1 milliárd embrió állítható elő (1 ml = 100 000 sejt)

Az embriómennyiség megfelel:

150-200 ha búzavetőmagnak, vagy  
25000 ha burgonya vetőgumónak.

A fenti adatok is alátámasztják, hogy a mesterséges mag alkalmazása a XXI. szd. egyik legjelentősebb, várhatóan egyik legnagyobb gazdasági jelentőségű növényi biotechnológiai eljárás lesz.