

## **Egyszikű és kétszikű fajok szomatikus embriogenezisének összehasonlító vizsgálata bioraktorban, különös tekintettel a tenyésztés fizikai körülményeire**

### **Egyszikű növényvel végzett vizsgálatok**

#### *Embriogén kallusztényészetek létrehozása*

Kísérleteinket, korábbi eredményeinkre alapozva, olyan genotípusokkal kezdtük el, melyekről előre feltételeztük, hogy sikeresen alkalmazhatók a modellrendszer felállításakor. A folyamat, értelemszerűen, a donor növények előállításával, és fitotronban történő felnevelésükkel kezdődött. A kísérletsorozatban 5 búzafajtát (Chinese Spring, CY 15, Mv 16, Szaratovszkaja és Emese), illetve a diploid alakok közül a Pakodi genotípust vizsgáltuk. A felnevelt növények esetében rögzítettük a virágzás időpontját, és minden fajta és genotípus esetében 13 napos éretlen embriót használtunk explantumként. A megfelelő sterilizálást követően az éretlen embriókat a gabona szövettenyésztésben általánosan használt RM 1 táptalajra (1 mg/l 2,4-D, pH: 5,8) oltottuk le, és 28 C-on 3 hétig inkubáltuk. Ezt követően az elsődleges kalluszokat leválasztottuk a szkutellum felületéről, és friss RM 1 táptalajra oltottuk át felszaporítás céljából. Egy hónapos szaporítást követően felvételeztük a kalluszok típusát, és képződött kallusz típusa szerint összehasonlítottuk a különböző vizsgált genotípusokat. Az eredmények azt igazolták, hogy a különböző genotípusok között nagymértékű különbség figyelhető meg, egyes fajták döntően I-es típusú kompakt szerkezetű kalluszokat hoztak létre, míg másoknál nagyobb gyakorisággal fordult elő a II-es típusú morzsalékos szerkezetű kallusz. A búzafajták közül a Chinese Spring és a Szaratovszkaja kalluszainak döntő többsége I-es típusú volt, míg a CY 15 és az Mv 16 kalluszainak döntő többsége morzsalékos szerkezetű volt. Sajnos, a diploid alakok esetében, kizárólag kompakt kalluszok képződtek, ezért ezzel nehezebben tudtunk továbbhaladni. A morzsalékos kalluszok egy része nagyon szép világossárga színűvé alakult, és mint később igazolódott, ezek a kalluszok a legjobbak finom sejtszuspenziók létrehozására.

Mivel a sejtszuspenziók indítására elsősorban a II-es típusú morzsalékos kalluszok alkalmasak leginkább, ettől a lépéstől kezdődően kísérletsorozatunkat két eltérő vonalon folytattuk tovább. Az elsődleges morzsalékos kalluszokból közvetlenül sejtszuspenziókat indítottunk, míg a kompakt kalluszokat más típusú táptalajra oltva megpróbáltuk morzsalékos szerkezetűvé konvertálni. A konverzió céljára BM táptalajt alkalmaztunk, először 1 mg/l 2,4-D koncentrációt alkalmazva, majd 4 hét után a 2,4-D koncentrációt a felére csökkentettük. Ezt a folyamatot követve, a kalluszok, közel 70 %-át sikerült II-es típusúvá konvertálni. Ezt követően az alapanyag egy részét azonos táptalajon fenntartottuk, illetve tovább szaporítottuk, vigyázva arra, hogy időben át legyenek passzálva, mivel eredményeink szerint a túltenyésztés az embriogén képesség elvesztését eredményezi (a tapasztalatok szerint más a 6 hetes azonos táptalajon történő tenyésztés a regeneráció képesség nagymértékű csökkenését eredményezi. A tenyészetek embriogén- és regenerációs képességét hormonmentes regenerációs táptalajon teszteltük gyakorlatilag minden 4 hónapos tenyésztési ciklust követően, és csak azokat a sejtvonalakat tartottuk fenn a továbbiakban, melyeknél intenzív embriogenezis volt megfigyelhető.

#### Sejtszuspenziók indítása

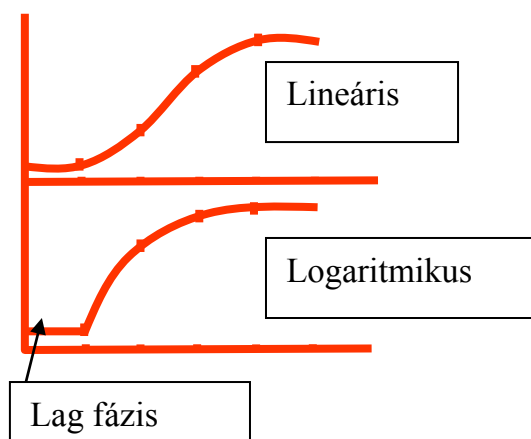
A kapott, morzsalékos kalluszokból indítottuk a folyadékkultúrákat. A tenyészetek indításához első lépésben 0,5 mg/l 2,4-D tartalmú folyékony BM táptalajt alkalmaztunk, melynek pH értékét a szokásos értékre (pH: 5,6) állítottuk be. Az első indításoknál a teljes

morzsalékos kalluszt felhasználtuk a tenyészet indításához, 10% inokulum koncentrációt alkalmazva. Ezek a tenyészetek azonban már az első tenészedőszakban igen heterogénnek bizonyultak, miszerint a kis sejtaggregátumok mellett nagy kallusz “göbcecsek” is létrejöttek a tenyésztés során, ami egy idő után a regenerációs képesség gyors elvesztését eredményezte. Ezért szükségesnek bizonyult egy olyan módszer kidolgozása, mely homogénebb kultúrát eredményez. A tapasztalatok ugyanis azt mutatták, hogy a kallusok igen heterogén sejtekből állnak, melyek mind strukturálisan, mind fiziológiai viselkedésükben eltérnek egymástól. Például a felületi sejtek többnyire vakuolizálódott nagyméretű sejtek, melyek viszonylag könnyen leválnak az aggregátumokról, míg a kompakt kallusz részek alkotják azokat a nagy aggregálódó részeket, melyek már nem embriogének, de nagymértékben szaporodnak a folyadék-kultúrákban. Ezért kidolgoztunk egy olyan módszert, mely alkalmasnak bizonyult a homogén szerkezetű, embriogén sejtek és aggregátumok bekoncentráálására. Számos sikertelen próbálkozást követően, mint pl. a mechanikus homogenizálás, a kallusok szétdörzsölése, stb., eljutottunk egy viszonylag egyszerű módszerig, mely alkalmas az ideális inokulum létrehozására. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy ha a morzsalékos kallusokat egy centrifuga csőben a végleges táptalajban szétrázzuk, akkor a parenchimatikus és vakuolizálódott sejtek a tápoldat felületén úszva koncentráálódnak, míg a kompakt, nagyobb aggregátumok kiülepednek a cső aljára. A számunkra fontos sejtaggregátumok viszont a tápközegben lebegnek, és csak igen lassan ülepednek le. A felső rész leöntésével a vakuolizálódott sejtektől lehet megszabadulni, míg az újrafeltöltött centrifuga csövet jól felrázva, és pár percig ülepítve, megszabadulhatunk a nem szükséges nagyobb aggregátumoktól is. Ezzel a módszerrel már igen gyorsan intenzív növekedésű finom szuszpenziókat tudunk előállítani, egy lépésben. A vizsgált genotípusok esetében azonban jelentős eltérés volt e tekintetben is, ugyanis a diploid *alakor* sejtsuszpenzióinak alapításakor túlságosan kevés inokulum maradt a folyamat végére, ezért ezt jóval kisebb tenyésztő edényben tudtuk csak tovább tenyészteni. A búzafajták közül a Chinese Spring gyakorlatilag alkalmatlannak bizonyult a tenyészet alapítására, míg a szövettenyésztők kedvencének számító CY 15 is csak komoly bekoncentrálást követően adott megfelelő denzitású finom szuszpenziót.

Az alapítást követően elsődleges célunk egy un. optimális embriogén tenyészet létrehozása volt. A szövettenyésztési tapasztalat ugyanis azt mutatja, hogy a sejtsuszpenziók viselkedése egy telítési görbével írható le a legjobban (1. ábra).

1. ábra

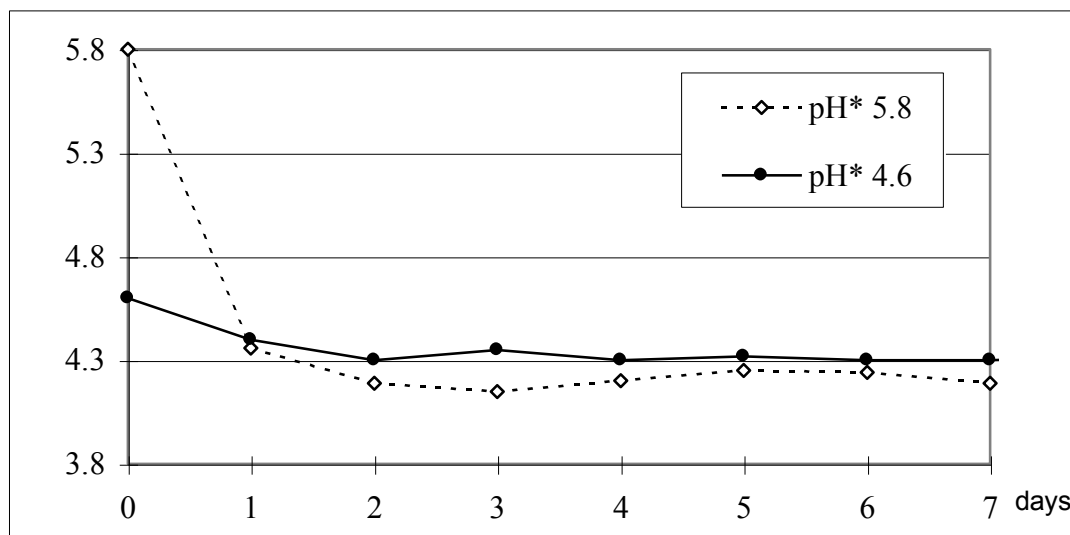
A sejtsuszpenziók növekedésdinamikája



Az ábra jól mutatja, hogy leoltást követően a tenyészetek növekedésében három, egymástól jól elkülöníthető fázis különböztethető meg. Közvetlenül a leoltást követően, egy ún. lag fázissal kezdődik a történet, amikor sejttömeg növekedés nem figyelhető meg. Ezt követi egy exponenciális növekedési szakasz, amikor az állomány igen intenzíven szaporodik, majd végül, a telítési görbe végén, egy telítési fázis kezdődik meg, amikor a sejttömegnövekedés először leáll, majd elkezdődik a differenciáció, és túltenyésztés esetén a rendszer összedől, a tenyészet elpusztul. Kutatási eredményeink azt igazolták, hogy a lag fázis egy igen kritikus szakasza a tenyésztésnek, ugyanis a sejtek komoly aktivitást folytatnak ebben a fázisban. A hagyományos szövettenyésztési elképzelések szerint, a sejtek ilyenkor adaptálódnak, vagyis passzívan alkalmazkodnak a tenyésztési feltételekhez. Amikor ez megtörténik, akkor kezdenek el újra szaporodni. Eredményeink azonban azt igazolják, hogy a sejtek aktívan részt vesznek a tápközeg körülményeinek megváltoztatásában. Erre először az utalt, hogy a lag fázis hossza igen nagy mértékben függött az inokulum mennyiségétől. Ha kevesebb sejtet oltottunk ugyanakkora térfogatba, a folyamat lényegesen lelassult, míg nagyobb sejtdenzitás esetén lerövidült. Sokáig kerestük az okát, módosítva a táptalaj összetételét, a tenyésztés körülményeit, míg végül kiderült, hogy viszonylag egyszerű fizikai paraméterek módosításával a lag fázis gyakorlatilag megszüntethető.

A tenyészeteket közvetlenül kis bioreaktorban indítva, és on-line pH mérést alkalmazva kiderült, hogy a tenyésztési feltételek közül a pH az egyik legkritikusabb tényező. A leoltást követően, a tápközeg kiindulási pH értéke (5,8) rohamosan csökken, és közel egy nap után éri el a 4,3 körüli értéket. Amikor a pH eléri ezt az értéket, a sejtek elkezdnek szaporodni, ami arra utal, hogy ez a relatív alacsony pH érték szükséges a sejtek szaporodásához (2. ábra). Ezt később kísérletesen is sikerült igazolni, hiszen egyszerűen a pH emelésével differenciálásra lehet bírni a sejteket.

2. ábra A pH érték alakulása a sejtuszpenziós kultúrákban a leoltást követő első héten

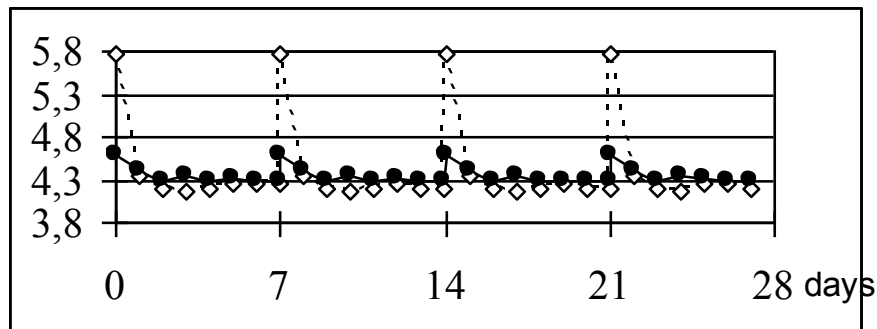


Amennyiben azonban a tápközeg pH értékét már az inokulálást megelőzően alacsony értékre állítjuk be, akkor a sejtek azonnal szaporodni kezdenek, feltéve, ha az átoltás a tenyészet optimális növekedési fázisában történt. Még itt is okozhat zavarokat az az eset, ha olyan tenyészetet kívánunk inokulumként alkalmazni, mely már túl van az exponenciális növekedési fázison, mivel ekkor a tápközeg pH-ja már elkezd növekedni, és a sejtek már átléptek a

differentiációs szakaszba. Ez azt jelenti, hogy már a tenyészet indításakor oda kell figyelni ezekre a paraméterekre, nemcsak a sejtuszupenziók indításánál, hanem már a kalluszindukció fázisától kezdődően. Egyébként abba a helyzetbe kerülünk, amit a 3. ábra mutat.

3. ábra

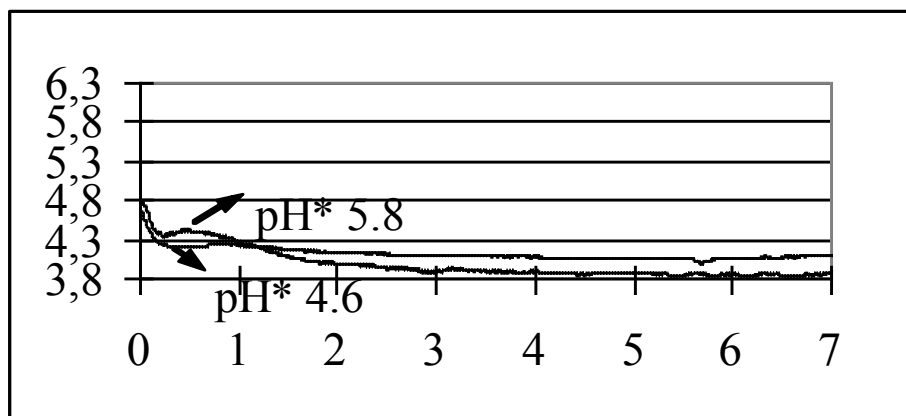
A sejtuszupenziók pH értékének stresszfaktora az átoltások függvényében



Abban az esetben ugyanis, ha a konvencionális szövettenyésztési módszereket rutinszerűen alkalmazzuk, akkor csak azt érzük el, hogy ismételt stressznek tesszük ki a tenyészeinket, ami igen gyorsan a regenerációs vagy embriogén képesség elvesztését eredményezi. Az ismételt magas pH nemcsak a sejtek stressztűrését kezdi ki, hanem folyamatosan különböző fiziológiai állapotba kényszeríti, mely a sejtömeg termelésének csökkenését is eredményezi. Ha azonban a rendszer az elejétől optimalizálva működik, a nagyléptékű tenyésztésnek sem lehetnek elméleti akadályai. Ezt bizonyítják a növekvő léptékű fermentációs eredmények is. A következő ábrán (4. ábra) az 1,5 l-es fermentorból származó eredményeinket mutatjuk be.

4. ábra

Bioreaktorban tenyésztett sejtuszupenziók tápközeg pH értékének alakulása konvencionális és alacsony pH értéken történő indítást követően



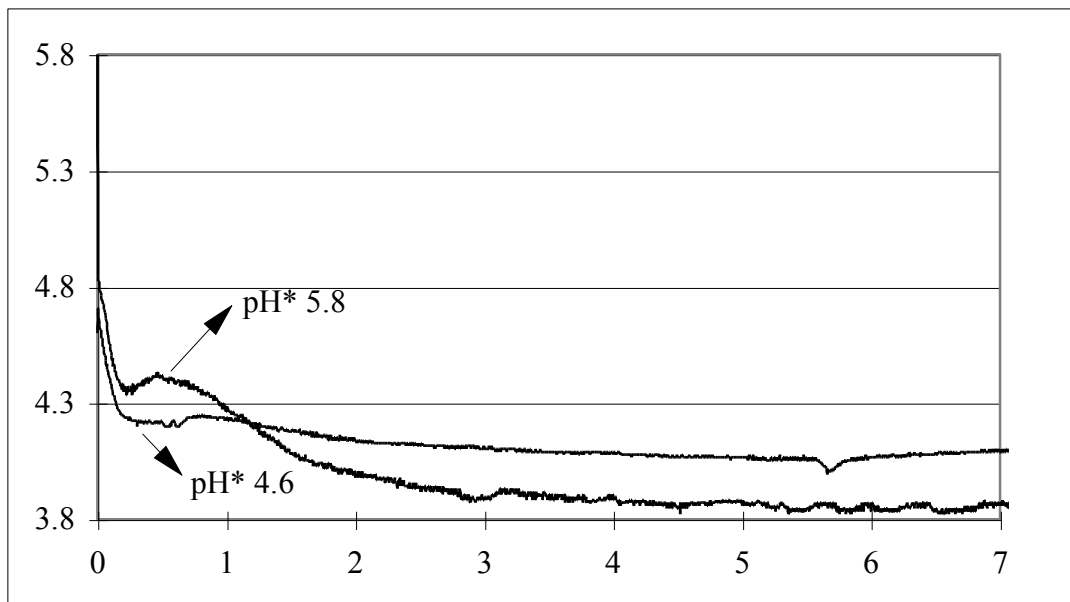
Az ábrán jól látható, hogy a magas pH értékről indított tenyészetek esetében egy hirtelen pH csökkenést követően a rendszer "túlkompenzál". A hirtelen esés a sejtek aktív közreműködésének köszönhetően túlfut a szükséges értéken, ezért egy ellenkező irányú tevékenységet is kell folytatniuk, ami komoly stresszt jelent a sejtek számára. Ez a fluktuáció később kiegyenlítődik, és a folyamatosan és lassan csökkenő értékben nyilvánul meg. A regenerációs vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a 4-es pH érték alatt ugyanúgy csökken a

regenerációs képesség, mint a túl magas értékeke esetében. Így, a hagyományos rendszer nem biztosítja a nagyléptékű tenyészetek létrehozásához szükséges körülményeket. Ezzel szemben az alacsony pH értékről indított, "ideális állapotú tenyészetek igen gyorsan beállnak egy stabil pH értékre, és ezt folyamatosan tartani képesek. A sejttömeg gyarapodási vizsgálatok is azt igazolták, hogy ekkor a tenyészet folyamatosan, lag fázis nélkül exponenciális növekedési fázisban van, és csak akkor történik lényeges változás a rendszerben, ha már telítődött.

Természetesen, minden fermentációs technológia esetében a léptéknövelés kulcsa az, hogy az adott tenyészet tud e alkalmazkoni az un. ipari méretekhez. Technológiai szempontból viszonylag egyszerű dolgozni a kis térfogatú batch reaktorokban, de teljesen más a viselkedése a rendszernek egy nagyobb léptékű airlift reaktorban. Ezért az egész rendszert megismételtük 20 literes airlift reaktorban. A kép megdöbbenően hasonló ahhoz, amit a kis reaktorokban kaptunk (5. ábra). A két rendszer közötti különbség itt még kifejezettebb, és alapvetően igazolja azt, hogy az optimális pH érték beállítása kulcsszerepet tölt be, főleg a nagyléptékű tenyésztés esetében. Meglepő, hogy egy egyszerű fizikai paraméter milyen szintű előrelépést tesz lehetővé.

#### 5. ábra

A tenyésztési feltételek alakulása 20 l-es airlift reaktorban



Az embriogén szuszpenziók tenyésztésének kidolgozása azonban csak alap ahhoz, hogy gyakorlati haszonnal kecsegtető terméket hozzunk létre a folyamat végére. Bár köztudott, hogy az embriók igen gazdagok bioaktív és egészségvédő vegyületekben, de ennek tételes igazolása széles körű analitikai vizsgálatokat igényel. Ennek érdekében, a nagyléptékű fermentáció eredményeként létrejött biomassza egy részét "leszűreteltük, és liofilizáltuk további vizsgálatok céljára. Sajnos eddig tételes vizsgálatokat nem végezhattünk idő hiányában, de a fermentációval előállított anyagok mellett vizsgáltuk a tesztelt genotípusok embrióinak összetételét, annak érdekében, hogy konkrétan tudjuk keresni azokat a komponenseket, melyek termelése célja lehet az in vitro rendszereknek. Ezek közül kiemelkednek a zsírolható antioxidánsok, különösen a tokolok és a tokotriolok, melyek elsősorban az *alakorban* vannak igen kiugró mértékben jelen. Előkísérleteink azt igazolják, hogy ezek, a bioreaktorban szaporított embriogén sejttömegben is igen nagy mennyiségben vannak jelen, és koncentrációjuk növelhető az elicitálás okozta shockkal.

## Kétszikú növényvel végzett vizsgálatok

A kétszikú modell növényünk, a szamóca (*Fragaria x ananassa*), esetében az elsődleges kísérleti cél olyan tenyészetek létrehozása, melyek szomatikus embriogenezisen keresztül regenerálódnak. Ehhez ismernünk kell a regeneráció morfogenezisét és meg határozni azokat a feltétel rendszereket, melyek segítségével olyan embriogén kallusz állítható elő, mely jól szaporítható és hosszú ideig megőrzi regenerációs képességét.

A tenyészeteket mikroszaporított növények fiatal level szegmenseiből indítottuk módosított MS táptalajon, amely thidiazuron (citokinin) hormont tartalmazott. Ez a hormon jelentős a szomatikus embriogenezis és általában a növényregeneráció szempontjából. A levelek, levélnyéllel és anélkül, valamint abaxiális és adaxiális oldalukkal lefelé, kerültek a megfelelő indukciós tápközegre. A regeneráció lépéseit naponkénti mintavétellel ellenőriztük a kezdetektől egészen az első kis hajtások megjelenéséig, összesen 3 hetes időtartományban. Az eredmények azt igazolták, hogy a szamóca esetében az uralkodó regenerációs folyamat a direkt embriogenezis. Gyakori jelenség az organogenezisen keresztüli növényregeneráció, viszont a kalluszindukción keresztüli embriogenezis viszonylag ritkán fordul elő.

A scanning elektronmikroszkópos felvételek is azt igazolják, hogy a növénykék döntően kétféle úton regenerálódtak: szomatikus embriogenezissel és organogenezissel. Az adott tápközegen mindkét esetben a direkt regeneráció volt inkább jellemző a levél szöveteiből, és ritkábban fordult elő a kalluszképzés, mint közbülső fázis. A regeneráció gyakoriságát nem befolyásolta az, hogy a levél melyik oldalával érintette a táptalajt. Ezzel kapcsolatos publikáció 2006-ban jelent meg. (Acta Horticulturae 725: 221-225)

Embriogén kalluszok nagy tömegben való előállításához két fontos kritériumnak kell teljesülnie: 1, megfelelő szaporodóképesség, 2, növényregenerációs képesség. Ennek érdekében 2,4-D-t tartalmazó közegen (LS, B5) intenzíven növekvő kallusz kultúrákat hoztunk létre. Ezt követően, a szekunder kalluszokat különböző hormonösszetételű közegekre helyeztük át abból a célból, hogy differenciációra kompetens sejtek keletkezzenek. A 2,4-D-t tartalmazó közegeken továbbra is homogén kallusz kultúrák fejlődtek, míg az IAA, NAA és kinetin-tartalmú MS, MSA valamint G-D közegeken a tenyészetek már bizonyos fokú differenciálódást mutattak, és a szaporodási erélyük sem csökkent még. A differenciálódási folyamat ezeken a táptalajokon azonban inkább a gyökéreképződés irányába tolódott el, ami az MSA közegen különösen megnyilvánult.

Ezek a gyökerek azonban egy idő után maguk is elkalluszosodtak. Nyilvánvalóan, a szomatikus embriogenezis, és/vagy hajtás típusú organogenezis szempontjából, ez a differenciáció indukció, zsákutca. A sikert a thidiazuront (citokinin) tartalmazó tápközeg hozta meg. Nagyrészt gyökereket is fejlesztő, fényen zöld hajtások képződtek. Ezen eredmények birtokában, valamennyi hormonvariációs kísérletet folyékony tápközegben is megismételtünk. A kultúrák sejtjeit fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Figyeltük a sejtek alakját, méretét, aggregálódási hajlamát és természetesen a tenyészet szaporodási erélyét is. Vajon megfigyelhetőek-e a várt embriogén sejtek ezekben a sejt tenyészetekben?

A 2,4-D alapú közegekben (LS, B5) hosszú, kifli alakú egyedi sejtek találhatóak, a sejtpopuláció homogén. Sejttaggregáció nem jellemző, maximum kettős sejtek figyelhetők meg. Elmondható, hogy itt tipikusan nem differenciált, parenchima típusú, egyedi, sejtek vannak jelen.



2. ábra Thidiazuront tartalmazó folyékony tápközeg sejtenyésztése (a: apró, gömbölyű sejtek, b: nagy méretű, ovális sejtek, c: gömbölyű sejtekből álló aggregátum)

Az IAA, NAA és kinetin kombináció esetén, (MS, MSA, G-D közegek), a sejtpopuláció heterogénné válik. A tipikusan kifli alakú sejtek mellett kisméretű gömbölyded sejtek is megjelennek. Ezek a kisméretű gömbölyded sejtek aggregátumokat is képeznek. Előfordulnak igen hosszú, több sejtől álló fonalszerű szerkezetek is. Az említett három közeg sejtenyésztésében, a hasonló hormonösszetételből fakadóan, jelentős különbségek nincsenek. Fontos megjegyezni, hogy e tenyésztetek szaporodási erélye még igen jó.

A thidiazuront, jelentős mennyiségben, tartalmazó (MSTDZ) közegben nagy méretű, közel gömbszerű sejtek, illetve ezek aggregátumai fordulnak elő (**2.ábra**). Ezek proembriogén sejteknek foghatók fel, melyekben szomatikus embriók, esetleg hajtást létrehozó organogenezisre hajlamos sejtek, vannak jelen. Tipikusan kallusz sejtek nem figyelhetők meg. E sejtenyésztet szaporodási rátája kismértékben csökken az előzőekben említett tenyésztetekhez képest.

A folyékony kultúrákat szilárd közegre szélesztve, visszakapjuk, a kiindulási kallusztényesztetekkel megegyező, struktúrákat, vagyis a sejtek differenciáltsági állapota stabil.

Felvetődik a kérdés, hogy folyékony kultúrában, hogyan lehet fenntartani a proembriogén állapotot, vagyis, hogy az embriogenezis folyamata ne fejeződjön be? Ezt a tápközeg pH-jának alacsony szinten (pH 4,5) tartásával lehet biztosítani. A fermentorban történő embriogén sejtek v. organogén aggregátumok szaporításának az egyik fontos eleme ez. A tudomány mai állása szerint a sejtdifferenciáció nem más, mint stabilizálódó génexpresszió, amely morfológiai és biokémiai szinten egyaránt megnyilvánul. A sejtdifferenciáció mértéke nemcsak morfológiai tulajdonságokban nyilvánul meg, hanem élettani, biokémiai sajátosságokban is. Ez, valamint a szamóca szomatikus embriók felhasználhatóságának igénye, vezetett oda, hogy a szamóca egyik igen jellemző anyagcsere termékét, az ellágsavat (fenolsav), sejtdifferenciációs markernek használjuk. Az ellágsav biológiailag aktív molekula, rákellenes és szabadgyökfogó hatását már igazolták. A vizsgálathoz, a fermentorban vagy lombik tenyészetben felszaporított, sejteket összegyűjtve liofilizáltuk, majd a fenolokat, egy új technológiával, a szuperkritikus fluid extrakcióval vontuk ki. A kivonat minőségi és mennyiségi analízise HPLC segítségével történt.

Az említett *in vitro* kultúrákon túl mértük a szabadföldről begyűjtött, valamint mikroszaporított szamóca levelek ellágsav tartalmát is. A mérésekből egyértelműen kitűnik, hogy az ellágsavtartalom szoros összefüggést mutat a differenciáltsági fokkal. A fermentációs vizsgálatok kimutatták, a fény serkenti az ellágsav akkumulációt, ami szintén a differenciációval van összefüggésben.

Az ellágsavtartalom és a sejtdifferenciáció összefüggésével kapcsolatos eredményeinket az International Journal of Horticultural Science c. folyóiratban tervezzük a közeljövőben publikálni.