

## Szakmai zárójelentés

az OTKA T046495 AG1 számú,

### Víztakarékos öntözéstechnikával termesztető rizsfajtákra jellemző génexpressziós mintázatok

#### című pályázatáról

#### Összefoglalás

Eltérő vízigényű rizsfajták ("szárazrizsek" és hagyományos fajták) növekedési, termesztési paramétereit határoztuk meg árasztásos ill. csak kiegészítő öntözéses körülmények között annak érdekében, hogy a korlátozott vízellátáshoz jól adaptálódó fajtákra jellemző tulajdonságokat megállapíthassuk. Kidolgoztunk egy olyan kísérleti rendszert, melyben ezeknek a fajtáknak a gyökérnövekedését vizsgálhatjuk, illetve génexpressziós vizsgálatokhoz mintát gyűjthetünk. Transzkript profilok microarray hibridizációs felvételével megállapítottuk, hogy a mélyreható, erőteljes gyökérzet meghatározó jellemzője a száraz körülmények között is jól teljesítő fajtáknak, és több száz olyan gént találtunk, melynek transzkript-szintje vízellátástól függő napszakos változásokat mutat a legnagyobb tűrőképességű Sandora fajta gyökérzetében. Valósídejű kvantitatív PCR-rel ellenőriztük számos gén expressziós mintázatát, ez döntő többségében megerősítette a microarray hibridizációval kapottakat, egyúttal más aszályérzékenységgű rizsfajtákban is meghatároztuk ezen gének expressziós mintázatát.

#### Első év

##### 1. Feladat:

*Szántóföldi és perlitbe ültetett kísérletek beállítása Sandora, Janka és egy később kiválasztandó, csak árasztott termesztésre alkalmas genotípusból, az árasztott, illetve korlátozott vízellátással fejlődő növényminták előállítására.*

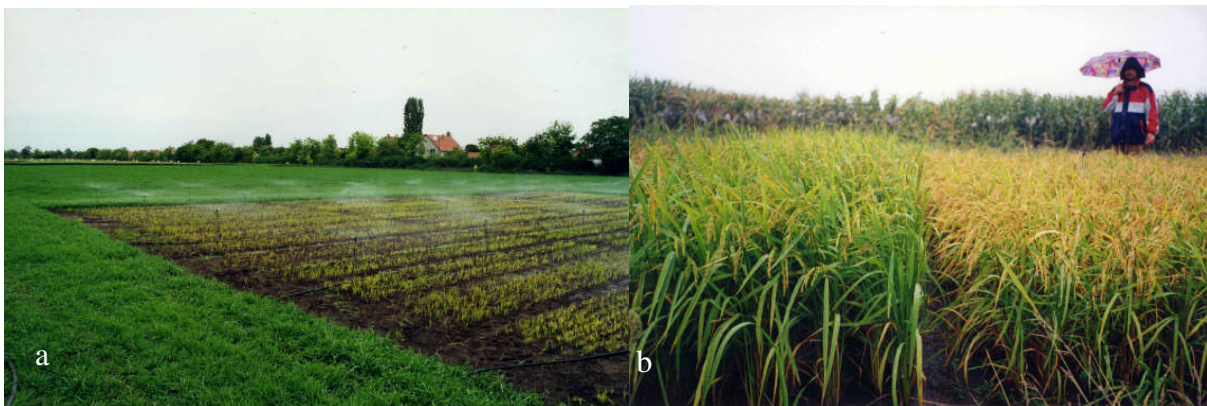
A víztakarékos öntözéssel termesztett rizs első hallásra furcsa tudományos témának tűnik, hiszen a rizsről mindenki arra gondol, hogy ott bőven rendelkezés áll víz, így víztakarékosságról beszélni értelmetlen dolog. Ha figyelembe vesszük az öntözéssel és öntözési rendszerekkel kapcsolatos ökológia hátrányokat, a víz magas árát (vízdíj), azonnal más összefüggésben látjuk a rizs és a víz viszonyát.

Simonné Dr. Kiss Ibolya (pályázatunkban megbízási szerződéssel vesz részt) már évtizedekkel korábban el kezdett foglalkozni a száraztermesztésű rizs hazai technológiáján és

genetikai kutatásán. Esőszerűen öntözött rizstermesztési szabadalmát (SZABADALOM, Simonné K. I. 1992) a kilencvenes évek elején kapta meg. Széleskörű termesztési alkalmazására mind ez ideig nem került sor. Szárazságtűréssel kapcsolatos kutatásunkban, Dudits Dénes akadémikus kezdeményezése alapján, újszerű lehetőséget látunk abban, hogy a szárazrizst, mint egy modellt használjuk az egyszikűek szárazság genetikai kutatásában.

Pályázatunk fő célkitűzése, hogy a víztakarékos öntözéstechnikával termesztethető (röviden szárazrizs) rizsfajták (száraz körülményekhez jól adaptálódott) jellemző génexpressziós mintázatát megismerjük.

A genetikai kísérletek rizsfajtáinak kiválasztásához, az előző évek és a 2004 évi kísérleti adatait használtuk fel. A GK KhT. kecskési tenyészkertjében 2004-ben beállított kísérletben jól látható volt, hogy a tavaszi hűvösebb időben történt kelés után, őszre a fajták szépen beállott parcellákat adtak (1. ábra). A két fénykép felvétel, már önállóan is bizonyítja, hogy a SANORYZA néven szabadalmaztatott technológia hazánkban sikerrel alkalmazható. A 2004 évi kísérletben 9 rizsfajták vizsgáltunk, hogy megállapítsuk szárazság adaptációjukat és közülük kiválasszuk a legjobb adaptációval rendelkező két fajtát. A fajták túlnyomóan a korábbi évek szárazrizs nemesítési programjából kerültek ki. Negatív kontrollként beállítottunk két un. hagyományos (árasztásos fajtát: Marilla, Azsuka 2) rizsfajtát is.



**1. ábra.** A „száraz” és „öntözött” rizsfajtákkal beállított szárazrizs kísérlet Szegeden. a: A kísérlet kelés utáni állapota mutatja, hogy a parcellák jól keltek, a tavaszi hűvösebb időjárás kissé megviselte a növényeket, ezért sárgás színűek (a szegélyben a talaj fedésére, tavasszal vetett őszi búza látható). A mérsékelt vízadagolást esőszerű öntözés biztosította. b: Szeptember elejére, összesen 700 mm természetes és mesterséges öntözést kapott rizs parcellák az aratás előtt szép állományt mutattak.

**1. táblázat.** Száraz rizskísérlet teljesítmény vizsgálata. A fajták rangsora terméseredményük alapján készült. Fajták 1-7.: a szárazrizs nemesítési programban születtek, 8-9.: hagyományos öntözéses nemesítési programból negatív kontrollként került a kísérletbe.

<b>Fajta</b>	<b>t/ha</b>	<b>St%</b>
1. Janka	4,28	106,2
2. Sanpiri	4,17	103,4
3. Sandora (st)	4,03	100,0
4. S-634	3,86	95,8
5. S-633	3,10	76,9
6. Bioryza	2,85	70,7
7. Augusztá	2,82	70,0
8. Marilla	2,64	65,5
9. Azsuka 2	2,07	51,4

Az eredményekből látható, hogy a több év óta standardként használt Sandora fajtát csak két fajta a Janka és a Sanpiri fajta múlta felül. A hagyományos un. árasztásos nemesítési programban születt két fajta, láthatóan a „száraz” körülmények között nagyon alacsony termést mutatott, bizonyítva ezzel, hogy **a szárazrizs termesztési technológia speciális adaptációs képességgel rendelkező genotípusokat igényel.**

Ahhoz, hogy a fajtákat genetikai kísérletbe vonjuk egy év kísérletét nem tartottuk elegendőnek, így a korábbi évek kísérleti adatait is összegyűjtöttük és elemeztük. Arra is figyelmet kívántunk fordítani, hogy 2003-ban volt egy olyan szárazrizs kísérlet, amelyben a takarékos öntözési normát drasztikusan (50%) lecsökkentettük és így provokatív körülmények között figyeltük meg, hogyan alakul a fajták produkciója. A 2. táblázat első oszlopában látható, hogy az első három helyen a Ringola, Sandora és Janka fajták szerepelnek. A Ringola fajtát 2004-re a nemesítő egyéb termesztési problémák miatt már nem javasolta kísérletbe vonni, ezért már 2004-ben ez a fajta nem szerepelt kísérletünkben. Ezzel szemben a Janka és Sandora ebben az évben is kiegyensúlyozottan magas termést produkált száraz termesztési körülmények között.

Figyelemre méltó a 2. táblázat második oszlopában szereplő adatsor. A drasztikus vízmegvonás a fajták termés teljesítményét alapvetően befolyásolta. Kísérleti megfigyelésünk alapján nagyon pozitív adatnak látszik, hogy a Janka fajta ebben a provokációs kísérletben is kiemelkedően szerepelt. A Sandora viszont stresszelt körülmények között nagyon szenvedett, így a legalacsonyabb termést adta a 12 fajta között. Ez az adat indított bennünket később arra, hogy a genetikai kísérletben toleráns fajtaként ne ezt a genotípust használjuk.

A hagyományos rizstermesztési technológiára nemesített fajták (Marilla, Azsuka) mindkét adatsor esetében a gyengén teljesítő fajták közé sorolódtak, újra bizonyítva ezzel a korábbi

megállapításunkat, miszerint a száraz körülmények speciálisan adaptálódott un. száraz fajtákat igényelnek.

**2. táblázat.** Szárazrizs kísérlet 2003, Szeged. Az első oszlopban szereplő adatok a szárazrizs termesztési technológiával nyert adatokból származnak. A második oszlopban szereplő adatok 50% vízmegvonással nyert kísérleti technológiából születtek (stresszelt kísérlet). A fajták sorrendjét mindkét esetben a fajták termés teljesítménye határozta meg.

<b>Fajta</b>	<b>t/ha</b>	<b>Fajta</b>	<b>t/ha</b>
		<b>S t r e s s z e l t</b>	
1. Ringola	4,24	1. Agusztá	2,81
2. Sandora	3,70	2. Janka	2,76
3. Janka	3,42	3. Ringola	2,70
4. Bioryza	3,30	4. S-634	2,67
5. Karmina	3,23	5. Karmina	2,36
6. Agusztá	3,21	6. Azsuka	2,29
7. S-634	3,12	7. Bioryza	2,26
8. Ábel	3,08	8. Ábel	2,22
9. Altol	2,98	9. Altol	1,92
10. Azsuka	3,21	10. S-633	1,58
11. S-633	2,03	11. Marilla	0,96
12. Marilla	1,19	12. Sandora	0,28

A fajták kiválasztásánál nem kívántunk csak a termés teljesítményre alapozni, mivel a kora tavaszi kelés utáni beállottság, vagy a betakarítás előtti buga/m<sup>2</sup> mindkettő olyan fontos adat, amely a fajták tenyészidőben korai, majd késői adaptív képességét fejezi ki. Bár mind a két adat összefügg közvetve a termésmennyiséggel, de döntésünket mégis más aspektusból erősítik ezek az adatok. 2003-ban egy szarvasi kísérletben az említett adatokat külön felvételeztük, amelyeket a 3. táblázat foglal össze. Ebben a kísérletben a Janka fajta és az Ábel nevű, új fajta szerepelt a legjobban. Ezek közül az adatok közül kiemelkedő, hogy a Janka nevű fajta ebben a kísérletben is jól szerepelt. A jó adaptációt mutatja, hogy az Ábel nevű fajta a buga/m<sup>2</sup> adatban kiemelkedő teljesítményt mutatott. Valószínű, hogy alacsonyabb termését más terméskialakító tényező eredményezi. Kiváló száraz adaptációját viszont a tavaszi beállottság és a buga/m<sup>2</sup> adat kiválóan bizonyítja.

Ezek után elegendő adat állt rendelkezésünkre, hogy a génexpressziós vizsgálathoz kiválasszuk a két legjobb száraz adaptációval rendelkező rizsfajtát a további kísérletekhez. Az eddig ismert adatok alapján a **Janka** és az **Ábel** fajta mellett döntöttünk, mint a száraz termesztési technológiához legjobban adaptálódott genotípusok. A negatív kontrollok esetében az adatok sokkal kisebb mérlegelése is elég volt, hogy a **Marilla** és **Azsuka** fajtát használjuk. Szinte minden kísérletünkben látható volt, hogy a két hagyományos termesztési körülményekre nemesített fajta

bizonyította, hogy nem rendelkeznek a száraztermesztéshez szükséges adaptációval, genetikai mintázattal.

A fenti adatokkal bizonyítottunk láttuk, hogy génexpressziós vizsgálatainkat helyes irányba indítottuk el, amikor a száraz termesztéshez speciálisan adaptálódott rizsfajtákat vontuk be a szárazságtűrési kísérleteinkhez.

**3. táblázat.** A szárazrizs kísérletekbe vont fajták kora tavaszi beállottsága és a buga/m<sup>2</sup> adata aratás előtt, 2003 Szarvas. A fajták a beállottság eredmények sorrendjében kerültek besorolásra.

<u>Fajta</u>	<u>Beállottság</u>	<u>buga/m<sup>2</sup></u>
Janka	3,9	325
Ábel	3,8	343
HSC-2	3,6	278
Ringola	3,5	305
Sandora	3,5	288
Bioryza	3,5	205
Oryzella	3,3	313
Karmina	3,3	235
Marilla	2,8	305
Japonka	2,8	310
Augusztá	2,5	310
<u>Azsuka-1</u>	<u>1,8</u>	<u>293</u>

## **2. Feladat**

*Mintavételezés 30-40-napos korban, szárazsággal még nem sújtott állapotban, valamint 50-70 nap között, amikor az árasztás nélkül nevelt érzékeny fajtán az első stressz-tünetek megjelennek.*

Mintavételezésre kihasználtuk a tenyészkerti kísérlet utolsó (4. sorozatában) sorozatában mesterségesen teremtett stresszelt körülményeket. Bugázás idején az utolsó szórófejet a szükséges öntözés alkalmával lekapcsoltuk és a génexpressziós vizsgálathoz innen szedtük a négy kiválasztott fajtából (Janka, Ábel száraz fajták, Marilla Azsuka öntözött fajták) a növénymintát (fiatal gyökér, központi merisztéma, fiatal buga) az RNS izoláláshoz. A kontroll mintákat a kísérlet első sorozatából vettük, ahol a technológiának megfelelően ideális öntözővíz kiadagolás történt.



**2. ábra.** A mintagyűjtéshez tenyészkertben létrehozott provokatív száraz körülmények. A parcella végén jól látható az erős szárazságtűnet, az utolsó öntöző szórófej lekapcsolását követően. A száraz mintákat ebből a parcellarészből vettük.

A minták üvegházi begyűjtéséhez perlit és később homokkal telt cserepekbe (PVC tasakkal kibélelt) vetettük a kiválasztott rizsfajtákat (négy fajta). A fajtákat az első 40 napban ideális tápoldat mennyiséggel öntöztük és a 40. napon mintákat vettünk. Ettől a naptól a fajtákat két csoportra osztottuk. Az első csoportot (a növények 50%-a) változatlan tápoldatos vízmennyiséggel neveltük tovább, míg a második csoportnál a növényi élet minimumára csökkentettük a tápoldatos víz mennyiségét. A mintavételt újabb 40 nap után megismételtük.

### **3. feladat:**

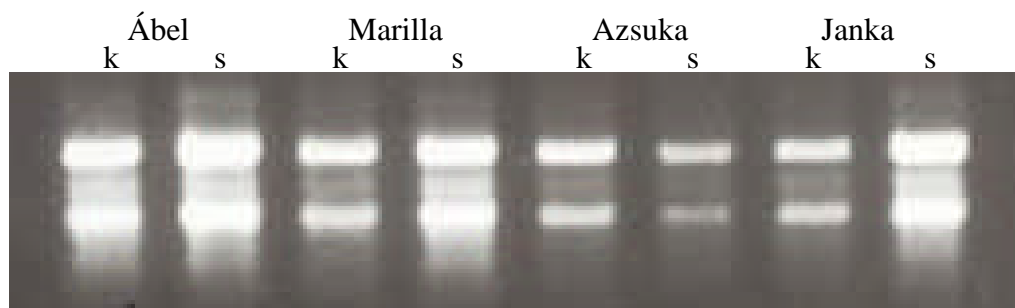
*RNS tisztítás négy fajta gyökérből, leveléből és a fejlődő bugákból.*

A szabadföldi és üvegházi növények lefagyasztott mintáiból ún. Trizolos módszerrel RNS mintát tisztítottunk. Ennek eredményeként az esetek zömében 50-100  $\mu\text{g}$  mennyiségű, elektroforézis képe alapján megfelelő minőségű, ép teljes celluláris RNS mintákat kaptunk. Mivel mind real-time PCR-hez, mind DNS-chip hibridizációhoz 3-10  $\mu\text{g}$  szükséges, a 2. évben sor kerülhet e minták felhasználásával az expressziós vizsgálatokra.

**4. táblázat** Tisztított rizs teljes RNS minták koncentrációi ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), a minták térfogata 100  $\mu\text{l}$

<b>Szabadszabó</b>	hajtás		gyökér	
	kontroll	stresszelt	kontroll	stresszelt
<i>Ábel</i>	2,24	1,07	0,97	0,87
<i>Janka</i>	0,37	0,92	0,23	0,81
<i>Marilla</i>	1,30	2,43	0,27	0,86
<i>Azsuka</i>	1,24	2,02	0,75	0,34

<b>Üvegházi</b>	hajtás			gyökér		
	0.időpont	6.hét		0.időpont	6.hét	
		öntözött	stresszelt		öntözött	stresszelt
<i>Ábel</i>	0,42	0,86	0,45	0,05	0,81	0,64
<i>Janka</i>	0,44	1,27	0,57	0,15	0,56	0,31
<i>Marilla</i>	0,69	1,03	0,24	0,10	0,58	0,45
<i>Azsuka</i>	0,81	0,58	0,45	0,17	0,20	0,34



3. ábra Szabadszabó rizs növények hajtásaiból tisztított teljes RNS minták agaróz gélelektroforézis képe. **k**: öntözött kontroll növények; **s**: vízhiánnyal stresszelt növények.

**Második év**

**4. feladat**

*Microarray hibridizáció szabadszabó hajtás minták RNS mintáival*

A kísérletekhez szükséges DNS-chipek beszerzése késedelmet szenvedett, mivel a felhasználni tervezett cDNS chip készítését Hans Bohnert laboratóriuma beszüntette. Ezzel párhuzamosan elkezdődött egy oligonukleotid-chip feljesztése (<http://www.ricearray.org/>), azonban ezeknek a chipeknek az elkészülte és szállítása csúszott. Végeredményben a 2004 végére rendelt chip-ek szállítása 2005 március közepén történt meg, ugyanakkor ez a chip a kísérleteink céljaira sokkal alkalmasabb volt, mivel génspecifikus oligonukleotidokat hordoz. Ezen több mint 20 ezer rizs génre

specifikus 50-70 nukleotid hosszúságú oligonukleotid mintát helyeztek el, használatának módja, hibridizációjának körülményei hasonlóak a korábban használatos cDNS-chipek használatához.

A DNS-microarray-ek hibridizációjához az Ábel (mérsékelt vízigényű) és a Marilla (hagyományos termesztésű) fajták szabadföldi hajtásainak RNS-ét használtuk fel, mind az öntözött, mind az öntözésmegvonással stresszelt mintákból származókat. Kettős jelölésekkel, nyolc chipen, összesen tizenhat hibridizációt végeztünk. A kiértékelés során az öntözött és az öntözésmegvonással stresszelt minták közötti összehasonlítást végeztük el minkét fajta esetében.

Az Ábelnél 46 szignifikáns változást mutató transzkriptumot találtunk. A legnagyobb mRNS-szint emelkedést egy GST génje esetében tapasztaltuk, mintegy hétszeres növekedést, és összesen 25 gén mutatott kétszeres körüli, vagy azt meghaladó növekedést. Ebből 18 ismeretlen funkciójú, a hét ismert közül csak a GST génjéről ismert, hogy stressz-válaszban szerepel.

A megemelkedett génekkel összemérhető számban – 21 génnél – tapasztaltunk mRNS-szint csökkenést, ezek harmada, hét gén teljesen ismeretlen funkciójú fehérjét kódol. A legnagyobb visszaesést az Ábelben – mintegy ötszöröset – egy lipáz gén mRNS-e mutatta.

A Marillában jelentősen kevesebb szignifikáns változás volt kimutatható. Mindössze 17 ilyen esetet találtunk, melyek egyetlen kivétellel RNS-szint csökkenésben nyilvánultak meg. Az esetek felében, köztük az egyetlen – kevesebb, mint kétszeres – növekedést mutató mRNS esetében a gén ismeretlen funkciójú.

A közös, mindkét fajtában eltérést mutató gének: egy hipotetikus fehérje, egy leucinban gazdag ismétlődést hordozó fehérje és egy MYB-szerű feltételezett transzkripciós faktor génjei esetében tapasztaltunk mindkét fajtában mRNS-szint csökkenést az öntözés megvonásának hatására, ezek mértéke is hasonló, 2-2,5-szeres volt.

Eddigi tapasztalataink több száz változást vártunk, azonban a kapott eredmények – többszörös ismétlésben – erre rácsáfoltak. Feltételezzük, hogy az öntözött területről származó – kontrollnak szánt – minták sem reprezentáltak viszonylag stresszmentes állapotú növényeket egyik fajta esetében sem, így a felvett transzkriptóma profilok különböző erősséggel, de minden esetben aszály-stresszelt állapotokat mutatnak. Ennek fényében az is jól értelmezhető, hogy a vízhiányt jobban toleráló Ábel fajta esetében nagyobb számban találtunk változást, növekedést és csökkenést egyaránt, míg a termesztési tapasztalatok alapján vízhiányra sokkal érzékenyebb Marilla fajtában szinte kizárólag transzkriptum szint csökkenés volt megfigyelhető. A toleránsabb fajta az öntözésmegvonásra még képes volt további adaptációra, mely gének – például az adaptációban bizonyítottan szerepet játszó glutation-S-transzferáz – fokozottabb működésében is megnyilvánult. Ezzel szemben az érzékenyebb fajta adaptációjának további fokozására már nem volt képes, csak a fokozott vízhiány életműködéseket erősebben gátló hatása nyilvánult meg néhány gén transzkripciójának csökkenésében.



## **5. feladat**

*Az első évi szabadföldi és teryéskerti termesztési kísérletek ismétlése.*

Az első év eredményei alapján, szabadföldön és teryéskertben megismételtük a SANORYZA víztakarékos rendszerrel végzett kísérletet. Szarvason a liziméter kísérleti telepen állítottuk be, Simonné Dr. Kiss Ibolya irányításával, telepített csepegtető öntözőberendezéssel, hat fajttal („száraz” fajták: Janka, Ábel, Sandora, mint kontroll; hagyományos fajták: Azsuka, Marilla, és a Bioryza H). A modell fajtákra alapozott kísérletet Szegeden üvegházban végeztük provokálva a száraz és beállítva az ideális vízellátási körülményeket.

A teryésziidőszak (5 hónap alatt) során a száraz kísérleti körülmények között tizenegyszer öntöztük a rizst, ezzel 410 mm vízpótlást adtunk. 352 mm eső hullott, így összesen 762 mm vizet kaptak növényeink a teljes kísérlet alatt. Ez a hagyományos termesztési rendszerben adott vízmennyiségnek kb. 50 %-a.

A szabadföldi kísérletben a termés rangsorban az Ábel (4.1 t/ha) és a Bioryza (3.7 t/ha) fajta szignifikánsan ( $P=5\%$ ) felül múlta a többi fajtát. Emellett a Janka (3.6 t/ha) és a Sandora (3.5 tr/ha) fajták is szignifikánsan felül múlták a két hagyományos fajtát az Azsukát (1.6 t/ha) és a Marillát (1.3 t/ha). Az eredményből látható, hogy a „száraz” rizsfajtaként kísérletbe állított genotípusok (Ábel, Janka, Sandora) ebben az évben is bizonyították, hogy a száraz termesztéshez egyértelműen adaptálódott genotípusok. Örömteli, hogy egy újabb genotípust (Bioryza H) is találtunk. A hagyományos fajták lényeges termésdepressziója, statisztikailag értékelt kísérletben jól mutatta, hogy a száraz termesztéshez adaptálódott fajták, milyen jelentős terméstöbbletet (megközelítőleg 3x-os) tudnak elérni öntözött körülmények között kiváló fajtákkal szemben, **száraz kísérleti körülmények között**. A teryéskerti kísérleti adatok megerősítették korábbi eredményeinket.

## **6. feladat**

*Ellenőrzött vízellátású teryészedényes üvegházi kísérletek beállítása*

Üvegházi kísérletben megkezdttük a fajták agrobotanikai tulajdonságainak mérését provokatívan beállított száraz és nedves, azaz ideális kísérleti körülmények között (két vízellátási kezelés, négy sorozatban, négy genotípussal). A száraz provokáció 70%-kal kevesebb vízadagolást jelentett az ideális nevelési körülményhez képest. Az 50 %-kal csökkentett vízmegvonás még okozott szignifikáns hatást a száraz genotípusok esetében. 70% vízmegvonás viszont, szignifikáns hatást mutatott a növények növekedési paramétereiben. A száraz körülmények a növények hossznövekedésére a kísérlet kezdetétől (két héttel a kelés után) számítva egyre fokozódóan depresszíven hatott. Bokrosodás idején az érzékeny fajták (Azsuka, Marilla) magassága már 30 % - kal csökkent. Ez a csökkenés az érés idejére már kis híján elérte az 50 %-ot. Pontosan 47 % volt, a száraz (Ábel, Janka) fajtákhoz viszonyítva. A száraz fajták ezzel szemben a száraz körülmények

között csak tíz százalék körül csökkentették hossznövekedésüket. Különösen jól adaptálódott az Ábel, amely csupán 1-2 cm-rel csökkentette magasságát a kontroll körülményekhez képest. Az Ábel esetében meg kell jegyeznünk, hogy koraisága (10 nappal korábbi a Jankánál) is segíti a száraz körülmények „elviselésében”.

### **Harmadik év**

A vízhiány növényekre gyakorolt hatásának vizsgálatára indított kísérletek első két évében (2004, 2005) jelentős különbségeket tapasztaltunk az egyes genotípusok között. A kapott eredmények alapján 2006-ban újabb összehasonlító kísérletet állítottunk be Szarvason a liziméter kísérleti telepen a SANORYZA öntözővíz takarékos rizstermesztési rendszerben, illetve ezzel párhuzamosan a Galambosi rizskísérleti telepen hagyományos, árasztott körülmények között. Az összehasonlításban öt fajta teljesítményét vetettük össze, ezek közül a Janka, az Ábel és a Sandora az ún. „száraz” fajták, a Bioryza H 2005-ben jó eredményeket mutatott aerob körülmények között is, míg a Marilla vízmegvonásra érzékeny fajta. A szabadföldi kísérletek mellett Szegeden, üvegházi környezetben laboratóriumi kísérleteket végeztünk a gyökér és szárazságtűrés kapcsolatának feltárására.

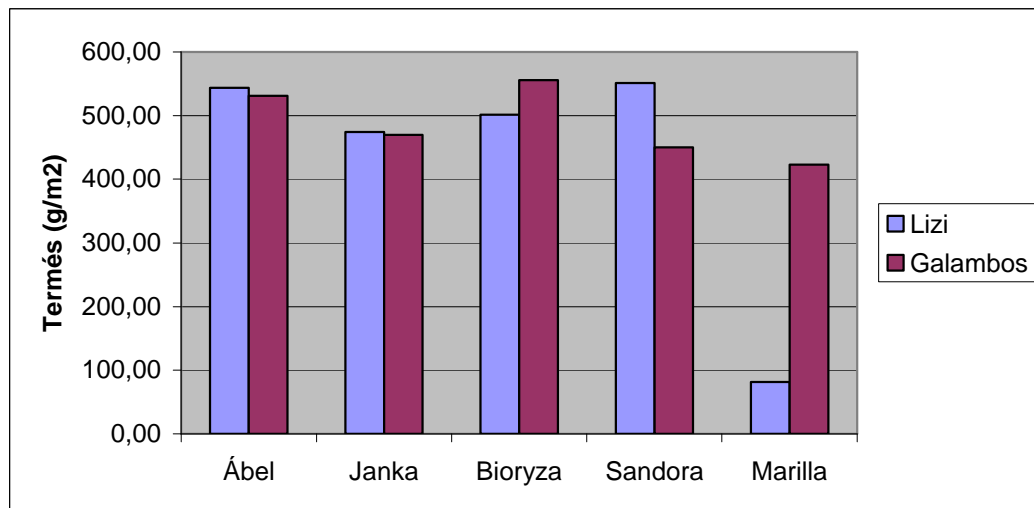
### **7. feladat**

*A korábbi eredmények alapján kiválasztott 5 fajta véletlen elrendezésű, négyismétléses szabadföldi kísérlete.*

A SANORYZA rendszerben a növények vízellátását telepített csepegtető öntözőberendezéssel oldottuk meg, míg az árasztott területen a tenyészidő alatt folyamatos vízborítást alkalmaztunk. Mindkét telepen a vízforrás a szarvasi Holt-Körös volt. A természetes csapadék mennyisége a két területen a telepek közelsége miatt (<1 km) megegyezett, ez a május elejétől augusztus végéig tartó időszakban 318 mm volt. Az időjáráshoz alkalmazkodva 9 alkalommal öntöztük a kísérleti állományt összesen 235 mm vízzel. Ezzel a tenyészidőszakban 553 mm vizet kaptak a víztakarékos rendszerben nevelt növényeink, míg az árasztott körülmények között 1200 mm-nek megfelelő árasztóvizet juttatunk ki. Így a vízmegtakarítás a két termesztési technológia között közel 55%-os volt.

A kiválasztott öt genotípust 4 ismétléses, véletlen elrendezésű kísérletben vetettük el a szántóföldön, a sortávolság 25 cm volt. Az aratásra szeptember 16. és 18-án került sor. A teljes növényállományt betakarítottuk, majd a Galambosi telep növényfeldolgozójában laboratóriumi berendezésekkel (Wintersteiger BL-350 cséplőgép, Satake laborhántoló) értékeltük az egyes parcellákat.

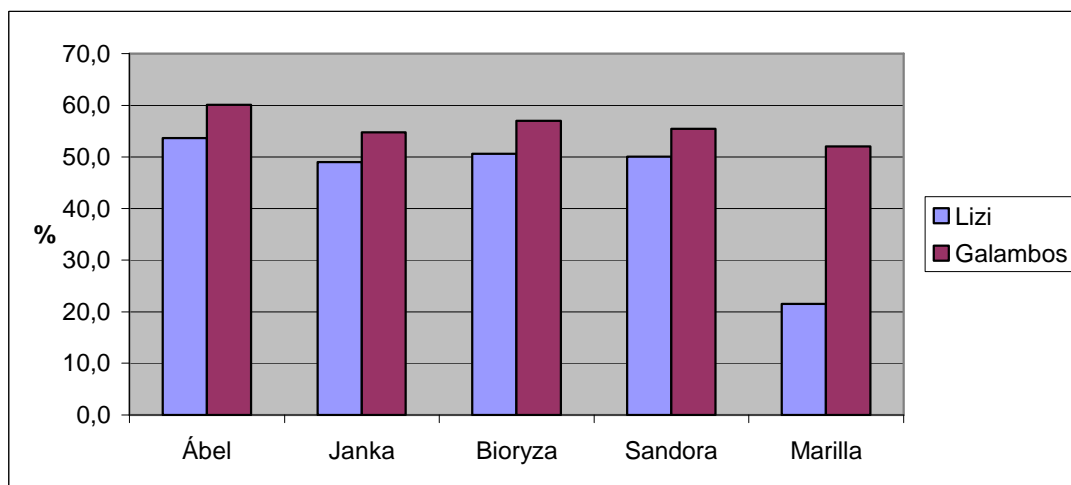
A 4. ábrán összehasonlítottuk a hagyományos és a víztakarékos rendszerben nevelt fajták termését. Az árasztott körülmények között (Galambos) a termésmennyiségek a korábbi vizsgálatoknak megfelelően viszonyultak egymáshoz. Az OMMI teljesítményvizsgálataiban standard fajtaként szereplő Sandora lett a negyedik (4,5 t/ha) a Marilla előtt (4,2 t/ha). A legnagyobb termést a Bioryza H (5,6 t/ha) és az Ábel (5,3 t/ha) esetében kaptuk, míg a Janka termése 4,7 t/ha volt. Látható, hogy az első két fajtán kívül a termésmennyiségek között nincs számottevő különbség.



**4. ábra** Rizsfajták terméshozamának összehasonlítása hagyományos (Galambos) és SANORYZA víztakarékos (Liziméter telep) termesztésben

Az aerob körülmények között nevelt parcellák termései alapján azonban megváltozott a fajták közötti sorrend. A „száraz” fajták fölénye figyelhető meg a lizitelepi eredményeket áttekintve. A változás különösen szembetűnő a Sandora fajta esetében, amely az összehasonlításban az élre ugrott (5,5 t/ha), ezzel is bizonyítva a szárazságstresszel szemben mutatott kitűnő toleranciáját. Az Ábel (5,4 t/ha) és a Janka (4,7 t/ha) ugyancsak jól szerepelt az öntözött környezetben. Kiemelendő továbbá, hogy a korábban hagyományos fajtának számító, de 2005-ben jól teljesítő Bioryza H 2006-ban is a legjobbak között szerepelt.

Az eredményből látható, hogy a „száraz” rizsfajtaként kísérletbe állított genotípusok (Ábel, Janka, Sandora) ebben az évben is bizonyították, hogy a száraz termesztéshez egyértelműen adaptálódott genotípusok.



**5. ábra** Rizsfajták harvest index változása a hagyományos (Galambos) és a SANORYZA víztakarékos (Liziméter telep) termesztésben

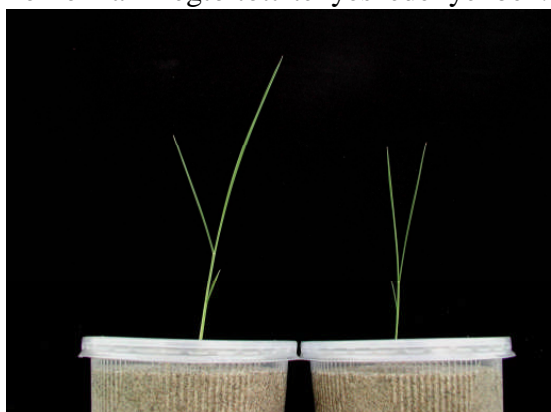
A növények teljesítményének másik fontos értékmérője az ún. harvest index (HI), amely a szemtermés és a teljes növény arányát mutatja meg. Az 5. ábrán jól látható, hogy a rizsfajták HI értékei árasztott körülmények között nem mutatnak nagyobb eltéréseket a legjobb Ábel (60 %) és a legalacsonyabb Marilla (52 %) között sem. A „száraz” termesztésben az összes fajta HI értéke csökkent, azonban az adaptálódott rizsfajták esetében ez a csökkenés néhány százalékos (Ábel 54 %, Sandora 50 %, Janka 49 %, Bioryza H 51 %) volt. A kisebb HI érték mögött alapvetően a kisebb szemtömeg és a megnövekedett sterilitás áll. A érzékeny Marilla fajta esetében azonban a HI érték drasztikus csökkenését figyelhettük meg (21 %).

A Marilla hagyományos (árasztott) fajta lényeges termésdepressziója a kísérletben jól mutatta, hogy a száraz termesztéshez adaptálódott fajták (Ábel, Janka, Sandora) **száraz kísérleti körülmények között** jelentős terméstöbbletet (megközelítőleg 4-5x) tudnak elérni az öntözött körülmények között jól teljesítő fajtákkal szemben.

## **8. feladat**

*Ellenőrzött vízellátású tenyészedényes üvegházi kísérletek RNS mintavételhez.*

A szántóföldi eredmények és a korábbi vizsgálatok alapján 2006-ban is 6 fajtát vizsgáltunk üvegházban (Ábel, Janka, Sandora, Bioryza H, Marilla, Azsuka), különböző vízellátottságú homokkal megtöltött tenyészedényekben. A kísérletek alapvető célja az volt, hogy a szántóföldi

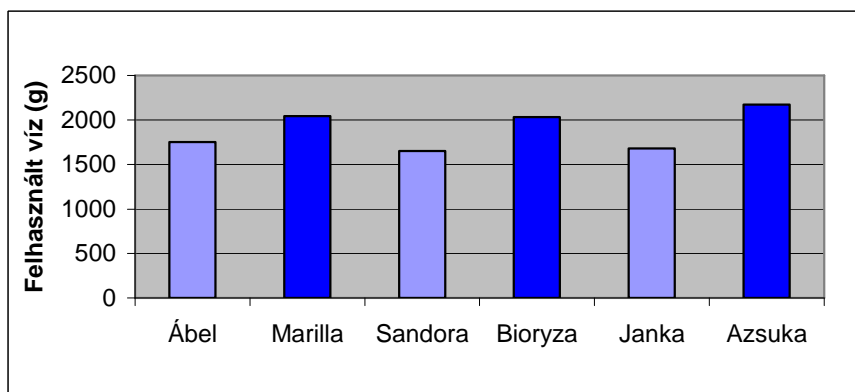


eredményekkel összhangban olyan jól definiálható kísérleti rendszert hoztunk létre, amely lehetővé teszi a genotípusok korai, nagy mennyiségű tesztelését. Ehhez a kereskedelemben kapható 250 ml-es lezárható fedelű

**6. ábra** Fiatalkori szárazságstressznek kitett növények fejlődési különbsége edényes kísérletben (balra Sandora, jobbra Marilla)

műanyag edényeket használtunk fel. Az 5 ismétlésben beállított kísérletekben az ideális vízellátottságot a vízkapacitása 60%-áig (13,5 m/m%) feltöltött homok jelentette, míg a szárazságstressz kiváltására az edényekben lévő homokot a teljes vízkapacitás mindössze 20%-ára (4,5 m/m%) állítottuk be. A növények fejlődését folyamatosan nyomon követtük addig, amíg a szárazságstressz tünetei vizuálisan is érzékelhetővé váltak (3. ábra). A kezdeti eredmények alapján a kísérleti rendszer adatai jól követik a szántóföldi eredményeket, a felnevelt növények paramétereit közül mértük a hajtás- és gyökérhosszt, a hajtás- és gyökér nedvestömeget, valamint a szárazanyagtartalmat és a vízfelhasználást.

A korábbi évek üvegházi kísérletei alapján újabb, nagyobb tenyészedényes (1600ml) kísérleteket is indítottunk, a növényeket a kelés után 45 és 60 nappal vizsgáltuk meg. A növényneveléshez homok és perlit 2:1 arányú (térfogat) keverékét alkalmaztuk, a tápanyagellátást Osmocote™ tartós hatású műtrágyával oldottuk meg. Az első két hét után a növényeket stresszelt (vízkapacitás 20%-a), 60%-os vízkapacitású és teljesen elárasztott csoportra osztottuk. A kapott eredmények alapján szembetűnő, hogy a kifejezetten „száraz” termesztésre adaptált fajták használták fel a legkevesebb öntözővizet egységnyi szárazanyag előállításához (7. ábra).



**7. ábra** Rizsfajták által 1 g szárazanyag előállításához felhasznált víz mennyisége (g) (20%-os kezelés)

Az alkalmazott talajkeverék tulajdonságai miatt lehetőség volt a növények gyökereinek vizsgálatára is, a SANORYZA rendszerben legeredményesebb Sandora esetében a hagyományos fajtákkal összehasonlítva szembetűnő volt a stresszelt körülmények között a gyökérrendszer jóval erősebb fejlettsége (8. ábra).



**8. ábra** Stresszelt körülmények között, azonos idő alatt fejlesztett gyökérszövetek összehasonlítása (balról-jobbra: 1. Azsuka, 2. Bioryza H, 3. Sandora, 4. Marilla)

A kísérleteket tovább folytatjuk, a fajták produkciós paramétereinek meghatározására és a kísérleti rendszer további optimalizálására.

### Negyedik év

#### 9. feladat

*Microarray hibridizáció tenyészedényes növények gyökér RNS-eivel*

Az élettani kísérletekben összességében kiemelkedő eredményt mutató Sandora fajta gyökérszövetéből származó RNS-ekkel végeztünk oligonukleotid-chip hibridizációt, vízhiányos (20%-os) és a teljesen árasztott mintákat összevetve. Egy 21 ezer gént reprezentáló chipet hibridizálva, összességében közel 600 gén mutatott legalább 2x-es változást, ezek közül 371 volt indukált és 214 represszált a vízhiányos mintában. Mindkét csoport osztályozása során hasonló arányban találtunk a különböző (génexpresszió, jelátvitel, stresszválasz stb.) osztályokba tartozó géneket, kivéve az alapvető anyagcseregéneket, melyek 25%-os arányban fordultak elő az indukáltak között, és csak 16%-ban a represszáltak között, és az ismeretlen funkciójú géneket, melyek az indukáltak 38%-át, a represszáltaknak viszont közel felét (48%) adták.

Ugyanakkor feltűnően nagy arányban fordultak elő a 10-20x-os indukciót mutató gének között is ismeretlen funkciójúak: az első 10 génből 8 ismeretlen, a további 2 feltételezett protein kinázt és LEA fehérjét kódol. Ezzel ellentétben a 10-20x-os repressziót mutató gének között mindössze 1

ismeretlen funkciójú, a többi anyagcsere-enzim, transzkripció faktor, membránfehérjék, regulátor fehérjék és egy feltételezett stressz-fehérje génje.

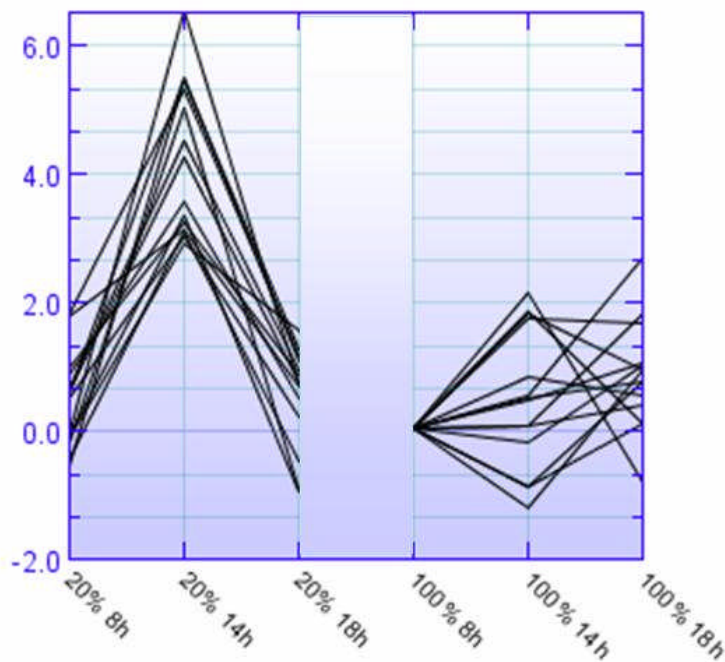
Ahogy az élettani kísérletekből kitűnt, hogy a szárazság-stresszelt (20% vízkapacitáson tartott) növények a nap második felére rendszeresen lankadást mutatnak, majd másnapra többé-kevésbé visszanyerik turgorukat. Ezért célszerűnek láttuk a korábban végzett chip hibridizációkat újabbakkal kiegészíteni, melyeknek eredményeit az ésszerűségi megfontolásból elnapolt részfeladat helyett itt szeretnénk jelenteni.

Ehhez olyan RNS-mintákat gyűjtöttünk, melyek a szárazság-stressz során fellépő napi ingadozásokat tárhatják fel. A chip hibridizációhoz a stresszelt körülmények között legerősebb gyökérzetet fejlesztő Sandora fajta gyökér mintáit használtuk fel, a 20% és a 100%-os víztelítettség mellett nőtt növényeket 8, 14 és 18 órákor arattuk le.

Mind a hat mintával elvégezve a hibridizációt a 22 ezer oligót tartalmazó rizs chipen, a kapott eredményeken klaszter-analízis végeztünk.

A következő ábrákon a vízhiányos és kontroll állapotok között markáns különbséget mutató klaszterek láthatók, alattuk táblázatokban a klaszterbe tartozó gének annotációja: (feltételezett) funkciója és azonosítója.

Az ábrákon a 100%-os, reggel 8-órás kontrollhoz viszonyított log<sub>2</sub> alapú relatív transzkript-szint változást ábrázoltuk.

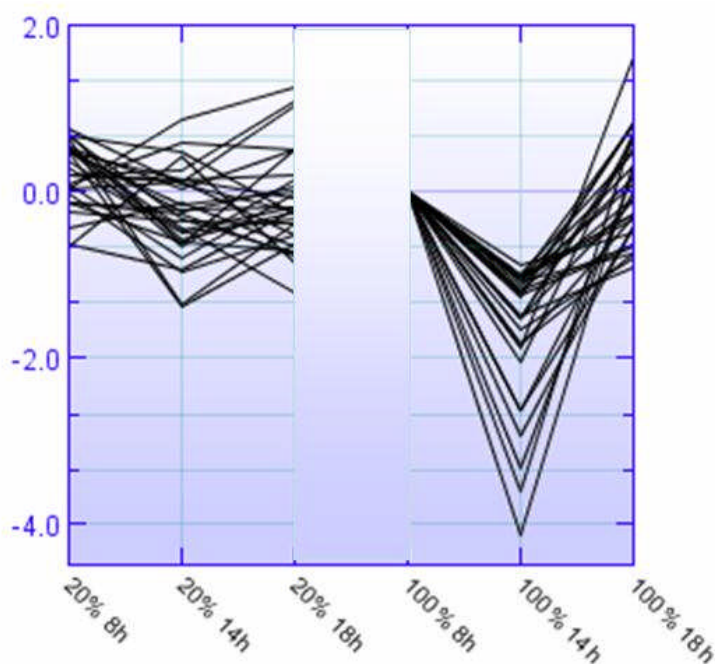


**9. ábra** Azon gének csoportja melyek a vízhiányos mintában jelentős napi indukciót mutatnak, míg a kontrollban ilyen nincs, vagy sokkal mérsékeltebb.

Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
F-box domain, putative	11682.m04419
oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	11670.m04026
AT5g64600/MUB3_12	11686.m00842
jmjC domain, putative	11668.m04545
putative chelatase subunit	11669.m03601
Protein kinase domain, putative	11686.m00607
Similar to C-x8-C-x5-C-x3-H type Zinc finger protein, putative	11669.m01922

Továbbá 7 azonosítatlan fehérje génje.



**10. ábra** Ebbe a csoportba olyan gének kerültek melyek a vízhiányos állapotban mérsékelt változást mutatnak, noha a kezeletlen mintában jelentős napközbeni repressziójuk figyelhető meg.

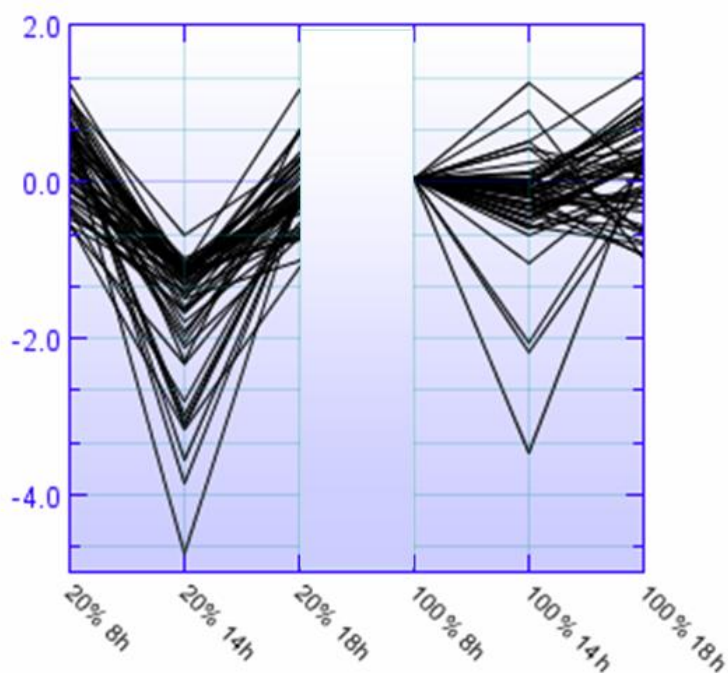
Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
AP2 domain, putative	11667.m01001
1,3-beta-glucan synthase component, putative	11669.m00295
probable kinesin light chain [imported] - Arabidopsis thaliana	11668.m05692
DNA-3-methyladenine glycosylase I; 14940-15720, putative	11669.m00965
Protein kinase domain, putative	11667.m05323
uridylate kinase, putative	11667.m07376
U-box domain, putative	11680.m00591
CXC domain containing TSO1-like protein 1	11682.m04920
embryonic flower 1-like protein	11667.m01264



B3 DNA binding domain, putative	11667.m00397
NB-ARC domain, putative	11687.m00275
No apical meristem (NAM) protein, putative	11674.m00035
Similar to NBS-LRR disease resistance protein homologue	11687.m01149
Protein kinase domain, putative	11673.m00296
putative transposase	11669.m02908
XPG I-region, putative	11674.m00013
Putative tRNA binding domain	11670.m02215

Továbbá 13 azonosítatlan fehérje génje.



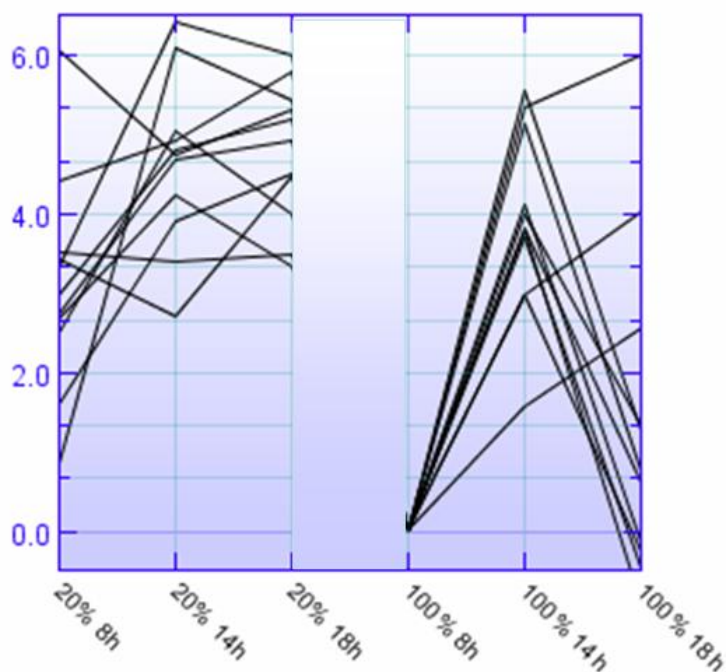
**11. ábra** A vízhiányra erős napközbeni represszióval reagáló gének klasztere. Lefutásuk a kezeletlen állapotban változó, de ha kivételesen represszáltak, akkor sem olyan mértékben, mint a vízhiány során.

Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
Hpt domain, putative	11674.m04480
Af10-protein	11667.m05271
putative reductase	11669.m05442
O-methyltransferase, putative	11670.m00047
UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	11673.m03060
Similar to GMFP5	11676.m02628
profilin a	11676.m01466
hypothetical protein, (thylakoid membrane phosphoprotein 14 kda, chloroplast precursor, putative, expressed )	11667.m05484
expressed protein, (putrescine-binding periplasmic protein, putative, expressed )	11670.m05010

putative transport protein particle component	11669.m02901
pectate lyase precursor (ec 4.2.2.2)	11668.m01124
putative oxidase	11669.m03600
receptor-like protein kinase, putative	11674.m01711
Exostosin family, putative	11668.m00865
Similar to CDC5 protein	11670.m02652
ribosomal protein S17, putative	11674.m01012
Sigma-70 region 2, putative	11674.m00596
Exostosin family, putative	11667.m00081
Ubiquitin-conjugating enzyme	11676.m02689

Továbbá 35 azonosítatlan fehérje génje.

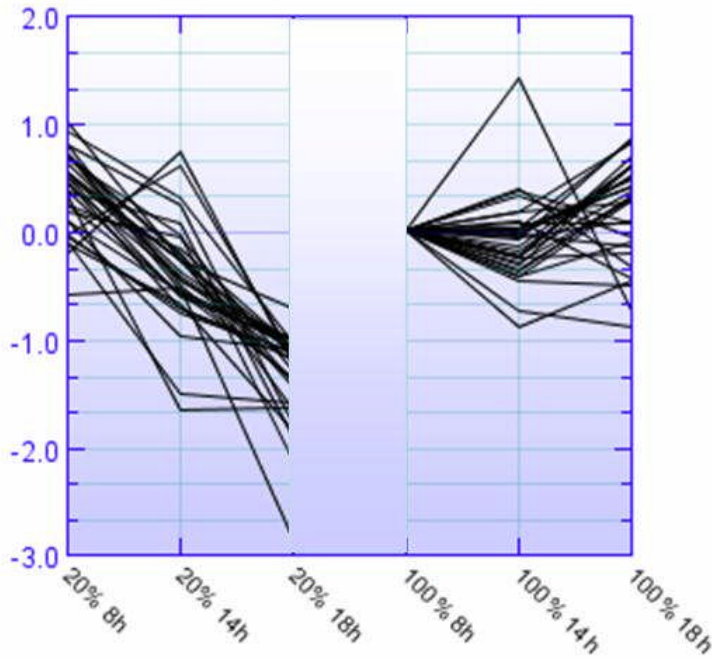


**12. ábra** Azon gének csoportja melyek a vízhiányos mintában magas szinten fejeződnek ki a kezeletlen reggeli kontrollhoz képest, míg a kezeletlen mintában jelentős napközbeni indukciójuk figyelhető meg.

Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
Protein kinase domain, putative	11667.m02013
IQ calmodulin-binding motif, putative	11667.m00939
putative WRKY DNA-binding protein	11669.m05923
expressed protein, (Cucumisin precursor, putative, expressed)	11670.m00204

Továbbá 6 azonosítatlan fehérje génje.

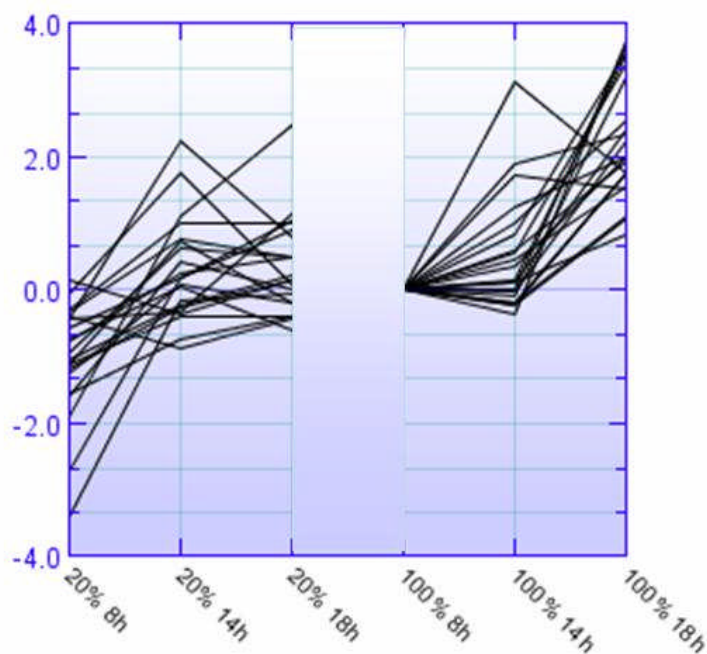


**13. ábra** A vízhiányra estig tartó csökkenéssel reagáló gének klasztere. Lefutásuk a kezeletlen állapotban változó, de ha kivételesen represszáltak, akkor sem olyan mértékben, mint a vízhiány során.

Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
phosphatidate cytidyltransferase	11670.m05684
Zinc finger, C2H2 type, putative	11670.m04680
VQ motif, putative	11667.m05358
Histone deacetylase family, putative	11667.m03884
Similar to At1g09280/T12M4_1	11686.m03702
C2 domain, putative	11668.m00194
Dynein light chain type 1, putative	11667.m01523
DHHC zinc finger domain, putative	11676.m01616
TPR Domain, putative	11668.m03574
putative glucose-6-phosphate/phosphate-translocator	11676.m02994
Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain, putative	11667.m00592
AP2 domain, putative	11673.m04734
mitochondrial processing peptidase alpha-chain precursor	11667.m00916
Got1-like family, putative	11676.m01617
putative serine/threonine kinase	11676.m02800
sorbitol transporter	11669.m00953
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	11668.m05438
Dihydrodipicolinate reductase, C-terminus, putative	11669.m01392
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	11680.m00316
Helix-loop-helix DNA-binding domain, putative	11669.m01258

Továbbá 12 azonosítatlan fehérje génje.



**14. ábra** Ebbe a csoportba olyan gének kerültek melyek a vízhiányos állapotban alacsonyabb szinten expresszálódnak, mint a kezeletlenben, míg ez utóbbi állapotban emelkedő tendenciát mutatnak a nap folyamán.

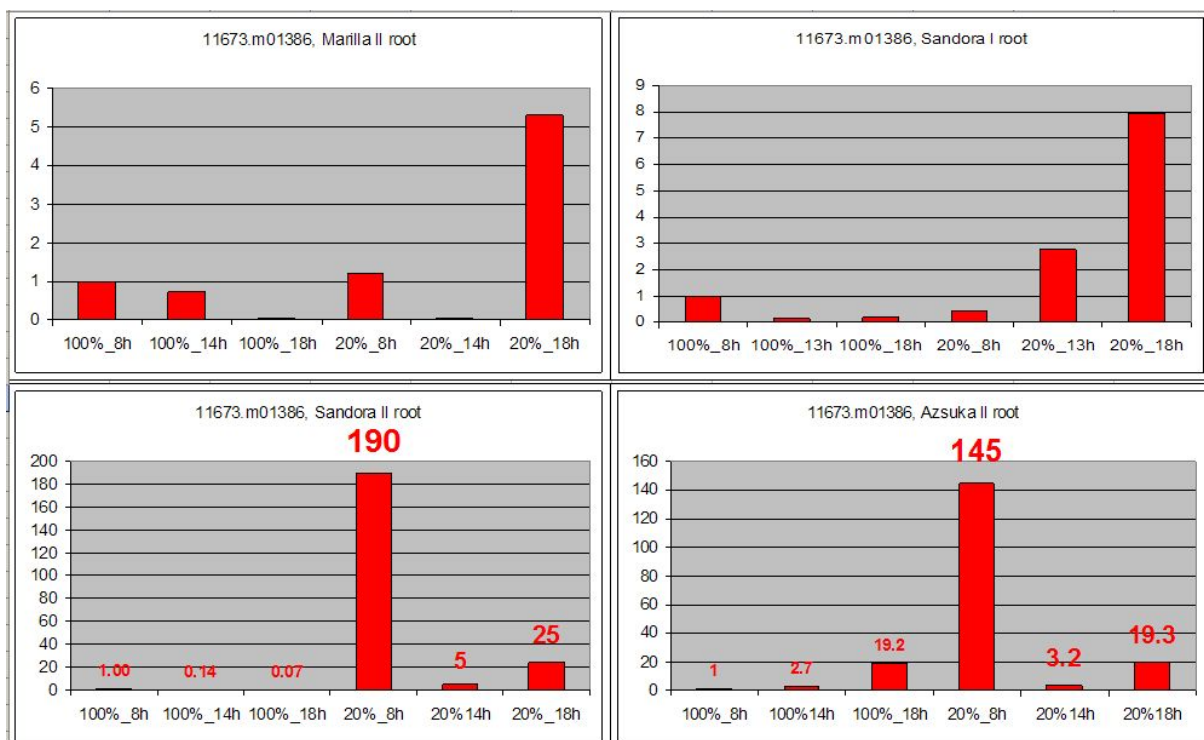
Az alábbi gének tartoznak a klaszterbe:

Info 1	Info 2
phosphoglycerate mutase family, putative	11687.m00445
expressed protein, (root cap protein 2, putative, expressed)	11670.m03222
Similar to FKBP	11687.m00427
heavy metal-associated domain, putative	11670.m03055
endo-1,4-beta-D-glucanase	11669.m02172
HIT domain, putative	11686.m01281
Endomembrane protein 70	11669.m01305
putative dioxygenase	11676.m03756
dTDP-glucose 4-6-dehydratase-like protein	11669.m01740
AY045615 At1g68660/F24J5_4	11674.m03318
cation channel family protein, putative	11667.m01094
psbD, photosystem II 44 kDa protein, chloroplast	11562.m00007
Similar to TPD1	11686.m02784
IQ calmodulin-binding motif, putative	11682.m00927
expressed protein, (enzyme of the cupin superfamily, putative, expressed )	11670.m04158
No apical meristem (NAM) protein, putative	11670.m03672

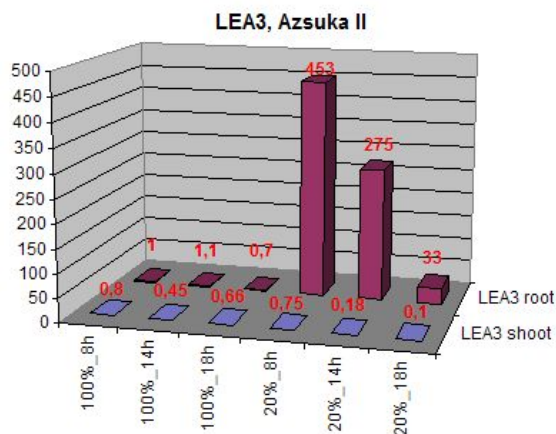
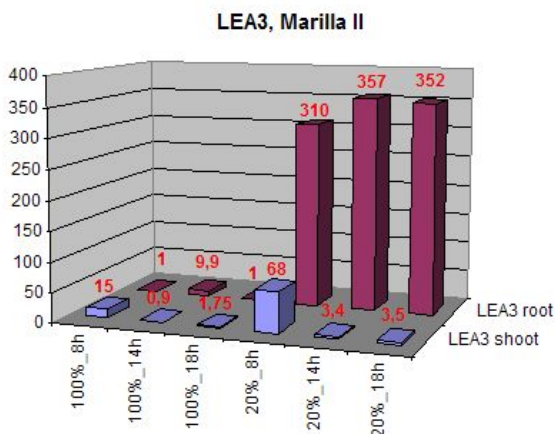
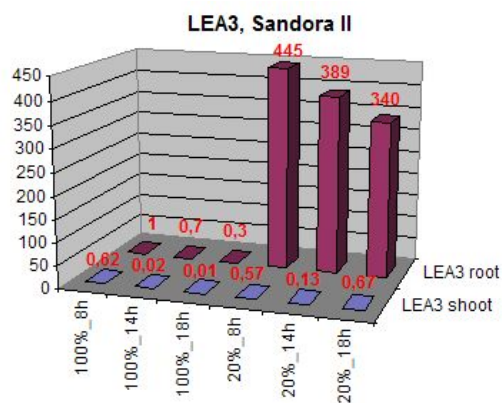
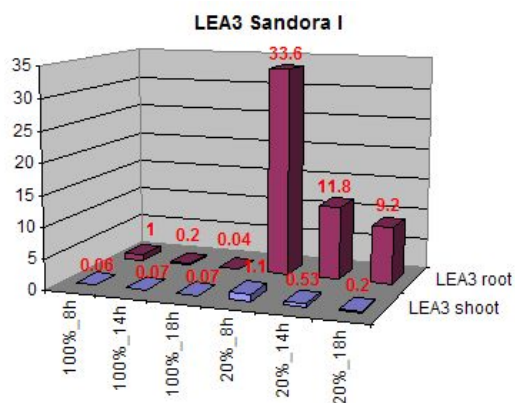
Továbbá 5 azonosítatlan fehérje génje.

További részletes vizsgálatra tartjuk érdemesnek mindazokat a géneket, melyek a vízhiány függvényében mutatnak napi ingadozást mind pozitív, mind negatív irányban. Bár ezekre a transzkript-profil vizsgálatokra a pályázat tervezésekor még nem gondoltunk, az eredmények alapján érdekes kutatási iránynak ígérkezik a vízhiányos állapot napi ingadozásával összefüggően változó kifejeződési szintű gének vizsgálata.

Kvantitatív real-time PCR-rel elvégeztük számos gén ellenőrzését. Összegezve elmondható, hogy a nagyobb érzékenységu és megbízhatóbb real-time PCR-ek megerősítették a Sandora fajtán kapott transzkript profiling eredményeket, továbbá néhány gén esetében meghatároztuk az expressziós mintázatot más rizsfajtákból is, illetve mérsékelt stresszhatás mellett is. A Sandora I ill. Sandora II mintasorokhoz ugyanolyan 100%-os víztelítettségű kontroll és 20% víztelítettségű vízhiányos stresszelt mintákat használtunk, azonban a II.-es kísérletben a növények erős napsütésnek és magasabb, 30 fok körüli hőmérsékletnek voltak kitéve, így a vízhiány és lankadás is erőteljesebben jelentkezett.



**15. ábra** Egy ismeretlen funkciójú, vízhiányra indukálódó gén mRNS szintjeinek napi ingadozása Marilla, Sandora (két független kísérlet) és Azsuka fajták gyökérzetében.



**16. ábra** Egy gyökér-specifikus és stressz-indukálható LEA gén transzkript szintjének napi változása Sandora (két független kísérlet), Marilla és Azsuka fajták gyökérében és hajtásában vízhiány hatására.

Jelenleg folytatjuk a megtalált új gének részletes expressziós analízisét, valamint promótereik összehasonlítását. A pályázat támogatásával végzett munkáról három kézirat készül: Jancsó Mihály és mtsai kézírata az összehasonlító termesztési kísérletek eredményeiről, Zombori Zoltán és mtsai kézírata a vízhiány hatására napi ciklizálást mutató gének jellemzéséről. Cserháti Mátyás és mtsai kézírata a stressz-indukálható rizs promóterek analíziséről beküldés alatt áll (Mátyás Cserháti, Sándor Pongor, Miklós Cserző, Dénes Dudits, János Györgyey: Finding the lost brotherhood: enumeration methods for promoter analysis of abiotic stress induced *Arabidopsis* and rice genes to discover new members).