

**A martonvásári agrárkutatások hetedik évtizede
(2009-2018)**

Lektorálta:
Árendás Tamás
Molnár Dénes

ISBN:
978-963-8351-47-0

Kiadja:
Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet

Felelős kiadó:
Balázs Ervin

Felelős szerkesztő:
Veisz Ottó

Technikai szerkesztő:
Nagy Gabriella

Borító:
Vécsy Attila

A martonvásári
agrárkutatások
hetedik évtizede
2009-2018



Martonvásár, 2019





Tartalomjegyzék

BALÁZS ERVIN: <i>Sic itur ad astra</i>	7
VEISZ OTTÓ: <i>Agrárkutatás és innováció Martonvásáron</i>	8
SOÓS VILMOS ÉS GELL GYÖNGYVÉR: <i>Gluténérzékenység és strigolaktonok: nem allergén búza genotípusok és egy ősi jelátviteli út nyomában</i>	19
KOCSY GÁBOR, VÁGÚJFALVI ATTILA, DÓCZI RÓBERT ÉS GALIBA GÁBOR: <i>A molekuláris biológiától a rendszerbiológiáig a stresszválasz felderítéséért</i>	34
JANDA TIBOR, SZALAI GABRIELLA, PÁL MAGDA ÉS DARKÓ ÉVA: <i>Abiotikus stresszorokra adott fiziológiai és molekuláris válaszreakciók gabonafélékben</i>	50
JÄGER KATALIN, BAKOS FERENC, BARNABÁS BEÁTA, DARKÓ ÉVA, DEÁK CSILLA, DÓCZI RÓBERT, DÖRY MAGDALÉNA, ÉRCZ DÓRA, FÁBIÁN ATTILA LÁSZLÓ, FÖLDESNÉ FÜREDI PETRA KATALIN, JAMPOH ASANTE EMMANUEL, MARGLNÉ AMBRUS HELGA MÁRTA, MIHÓK EDIT, NÁDAI TÍMEA VIRÁG, POLGÁRI DÁVID, SÁGI LÁSZLÓ, SÁFRÁN ESZTER LUCA, SEPSI ADÉL, SZABÓ-EITEL GABRIELLA ÉS SZENZENSTEIN ANDREA: <i>Alkalmazkodás a változó környezethez: fókuszban a gabonafélék ivaros szaporodása</i>	65
SZAKÁCS ÉVA, CSEH ANDRÁS, FARKAS ANDRÁS, GAÁL ESZTER, IVANIZS LÁSZLÓ, KOVÁCS GÉZA†, KRUPPA KLAUDIA, LENYKÓ-THEGZE ANDREA, LINC GABRIELLA, MAKAI DIÁNA, MEGYERI MÁRIA, MIKÓ PÉTER, MOLNÁR ISTVÁN, SCHNEIDER ANNAMÁRIA, SEPSI ADÉL, SZŐKÉNÉ PÁZSI KITTI, TÜRKÖSI EDINA, LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA ÉS HEGEDŰS ATTILA: <i>Búzával rokon fajok genetikai diverzitásának kiaknázása a nemesítés számára</i>	82
KARSAI ILDIKÓ, BALLA KRISZTINA, CSEH ANDRÁS, KISS TIBOR, BERKI ZITA ÉS HORVÁTH ÁDÁM: <i>Molekuláris genetika alkalmazása a klasszikus növénynemesítésben</i>	99
VIDA GYULA, BÁNYAI JUDIT, BEDŐ ZOLTÁN, CSÉPLŐ MÓNICA, KUTI CSABA, LÁNG LÁSZLÓ, MAYER MARIANNA, MEGYERI MÁRIA, MÉSZÁROS KLÁRA, MIKÓ PÉTER, PUSKÁS KATALIN, RAKSZEGI MARIANNA, TÓTH VIOLA, TREMMEL-BEDE KAROLINA, VARGA BALÁZS, VARGA-LÁSZLÓ EMESE ÉS VEISZ OTTÓ: <i>A martonvásári kalászos gabona nemesítési program genetikai bázisa, céljai és eszközei</i>	116
MARTON L. CSABA, PINTÉR JÁNOS, SPITKÓ TAMÁS, SZŐKE CSABA, TÓTHNÉ ZSUBORI ZSUZSANNA ÉS BERZY TAMÁS: <i>FAO 150-650 tenyészidejű, stressztoleráns kukoricahibridek szelekciója</i>	132



FODOR NÁNDOR, ÁRENDÁS TAMÁS, BERZSENYI ZOLTÁN, BÓNIS PÉTER, MARTON TIBOR, SÁNDOR RENÁTA, SUGÁR ESZTER ÉS SZELEPCSÉNYI ZOLTÁN: <i>Útban a digitális mezőgazdaság felé: tartamkísérletektől a modellalapú döntéstámogató rendszerekig</i>	149
---	-----

INTÉZETÜNK AZ EURÓPAI UNIÓ KUTATÁSI KERETPROGRAMJAIBAN	164
ADATOK A HETEDIK ÉVTIZEDRŐL	169

AZ MTA AGRÁRTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT MEZŐGAZDASÁGI INTÉZETÉNEK MUNKATÁRSAI	171
AZ MTA AGRÁRTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT MEZŐGAZDASÁGI INTÉZET SZERVEZETI FELÉPÍTÉSE ÉS KUTATÓI (2019. 06. 30.).....	172
MTA AGRÁRTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT KÖZPONTI SZERVEZETI EGYSÉGEI ÉS VEZETŐI (2019. JÚNIUS 30.)	177
AZ INTÉZET KUTATÓINAK TUDOMÁNYOS FOKOZATAI	178
AZ INTÉZET EGYKORI ÉS JELENLEGI MUNKATÁRSAINAK TUDOMÁNYOS FOKOZATA ÉS MEGVÉDÉSÜK IDŐPONTJA (1949-2019)	184
MUNKATÁRSAINK TEVÉKENYSÉGE A FELSŐOKTATÁSBAN (2009-2018). 189	
TÖRZSTAGSÁG DOKTORI ISKOLÁBAN.....	189
OKTATÁS DOKTORI ISKOLÁBAN	190
OKTATÁS EGYETEMEN	192
ELISMERÉSEK KITÜNTETÉSEK (2009-2018)	196
A KUTATÓK KITÜNTETÉSEI, DÍJAI.....	196
AZ INTÉZET KITÜNTETÉSEI, DÍJAI	197
NYUGÁLLOMÁNYBA VONULT INTÉZETI MUNKATÁRSOK (2009-2018)	198
EGYKORI MUNKATÁRSAINK, AKIKRE KEGYELETTTEL EMLÉKEZÜNK	200

AZ MTA AGRÁRTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT MEZŐGAZDASÁGI INTÉZET EREDMÉNYEI (2009-2018)	203
HAZAI ÁLLAMI MINŐSÍTÉSBN RÉSZESÜLT KALÁSZOS GABONAFAJTÁK (2009-2018).....	204
KÜLFÖLDI ÁLLAMI MINŐSÍTÉSBN RÉSZESÜLT KALÁSZOS GABONAFAJTÁK (2009-2018).....	205
HAZAI ÁLLAMI MINŐSÍTÉSBN RÉSZESÜLT KUKORICA-HIBRIDEK (2009-2018)	206
KÜLFÖLDI ÁLLAMI MINŐSÍTÉSBN RÉSZESÜLT KUKORICA-HIBRIDEK (2009-2018).....	206
VÉGLEGES SZABADALMI OLTALOMBAN RÉSZESÜLT SZOLGÁLATI TALÁLMÁNYOK (2009-2018)	208
AZ INTÉZET PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE (2009-2018).....	211
TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (2009-2018).....	212
TUDÁSTRANSZFER SZAK- ÉS KÖZÉLETI KIADVÁNYOKBAN (2009-2018) ..	322

SIC ITUR AD ASTRA

Nemes hagyománya a martonvásári Mezőgazdasági Intézetnek, hogy dekádonként számvetést tesz az elmúlt évtized eredményeiről. Egy ilyen kötetet tart most a kezében az Olvasó – a hetedik évtized visszatekintését. Bár a könyv az elmúlt tíz év tudományos eredményeit foglalja össze, mégis kortörténeti dokumentumként épít az előző évtizedek értékeire, főként meghatározó nemesítőinek és kutatóinak sikereit méltatva. Külön erénye, hogy méltóképp hajt főt az elhunytak emléke előtt is. A Mezőgazdasági Intézet mindenkori vezetőit a Brunszvik család szellemiségének tisztelete, hagyományainak ápolása jellemezte, kapcsolódva a család reformkori eszmeiségéhez, mely napjaink munkatársainak elkötelezettségében is jelen van a magyar agrárium fejlődésének érdekében. A mezőgazdasági gyakorlatba került versenyképes, és európai oltalmat kapott gabona fajtáink értékét jól reprezentálja a 2018. évi Agrár Innovációs Díj elnyerése. A kötetben megjelenő közleménylista, a nemzetközi tudományos folyóiratokban – egyre jelentősebb számban – napvilágot látott tudományos publikációk is önmagukért beszélnek. Az intézet alapításának hetvenedik éve alkalmából rendezett nemzetközi tudományos konferencia meghívott előadói, a kutatóinkkal – az ebben az évtizedben, vagy már korábban is – együttműködő külföldi tudósok előadásai az intézet nemzetközi beágyazódásának szép példáit mutatták be. A hetedik dekádban az intézet munkatársainak egész világra kiterjedő, igen színvonalas kutatási együttműködései megerősödtek, és japán, kínai, vietnami, indiai, egyiptomi, izraeli tudományos partnerekkel bővültek. Ebben őket a már jól kiépült európai kapcsolatrendszereink mintái segítették. A 7. évtized utolsó éveiben jelentős számban elnyert GINOP pályázatok már a következő évtized kutatásainak infrastrukturális megalapozását szolgálják. Az eddig méltán elismert, ikonikus fitotron-rendszer mellett új jelképként jelenik meg a metabolomikai platform, valamint a szabadföldi széndioxid parcella, melyek nagymértékben hozzájárulhatnak a klímaváltozás kihívásainak hiteles, tudományos válaszokra épülő megoldásaihoz. Ezen kutatások előfutárai már azok az elismert, újonnan nemesített gabonáink is, melyeket méltán tartunk klíma-adaptív fajtáknak.

Napjaink szervezeti változása, az Agrártudományi Kutatóközpont, s így a Mezőgazdasági Intézet elválásztása a Magyar Tudományos Akadémiától továbbra is arra biztatja az intézet munkatársait, hogy – megőrizve az MTA szellemiségét, s az elmúlt hetven év értékeit – a következő évtizedben is szolgálják a magyar mezőgazdasági kutatások, fejlesztések nemes céljait.

Martonvásár, 2019. augusztus
Balázs Ervin, főigazgató
az MTA rendes tagja

ALKALMAZKODÁS A VÁLTOZÓ KÖRNYEZETHEZ: FÓKUSZBAN A GABONAFÉLÉK IVAROS SZAPORODÁSA

JÄGER KATALIN, BAKOS FERENC, BARNABÁS BEÁTA,
DARKÓ ÉVA, DEÁK CSILLA, DÓCZI RÓBERT, DÖRY MAGDALÉNA,
ÉRCZ DÓRA, FÁBIÁN ATTILA LÁSZLÓ,
FÖLDESZNÉ FÜREDI PETRA KATALIN,
JAMPOH ASANTE EMMANUEL,
MARGLNÉ AMBRUS HELGA MÁRTA, MIHÓK EDIT,
NÁDAI TÍMEA VIRÁG, POLGÁRI DÁVID, SÁGI LÁSZLÓ,
SÁFRÁN ESZTER LUCA, SEPSI ADÉL,
SZABÓ-EITEL GABRIELLA ÉS SZENZENSTEIN ANDREA
Növényi Sejtbiológiai Osztály

BEVEZETÉS

ANövényi Sejtbiológia Osztályon 2009-2018 között folytatott kutatómunka az alábbi területekre koncentrálódott:

1. A növények ivaros folyamatainak tanulmányozása és biotechnológiai célú alkalmazása.
2. Az *Arabidopsis thaliana* és a búza szárazság és szimultán hő- és szárazságstresszel szembeni toleranciájának jellemzése.
3. A búza ivarsejteket kialakító meiotikus sejtosztódás vizsgálata.
4. Búza \times árpa hibridek előállítása és jellemzése.

Az elmúlt évtized kutatási irányának kialakítása során elsődleges szempontnak tartottuk, hogy alapkutatási témáinkat az ivaros szaporodás biotechnológiája mellett a nemzetközi trendekhez és a társadalom aktuális elvárásaihoz kapcsolódó kutatási fókuszpontok köré rendezzük, integrálva az élvonalbeli sejt- és molekuláris biológiai módszereket. Fontos szempont volt, hogy elért eredményeink a növénynemesítési gyakorlatban is alkalmazhatóak legyenek.

1. A növények ivaros folyamatainak tanulmányozása és biotechnológiai célú alkalmazása

A haploid nemesítési technikák a gaméták *in vitro* manipulálását célozzák egészséges és szaporodóképes homozigóta növények előállítása céljából. Ezen módszerek előnye a nemesítés időtartamának rövidülése, így a változó termelői

igényekhez való rugalmas alkalmazkodás. Azonosítottuk az árpa mikrspórák embriogenetikus átmenetében szerepet játszó HvPG1 és ECA1 géneket. Paraquatot tartalmazó tápközegen indukált, megnövelt oxidatív stressztoleranciájú és antioxidáns kapacitású dihaploid kukorica vonalakat szelektáltunk. Alacsony hőmérsékletre és szárazságra toleráns kukorica vonalakat állítottunk elő. Sikeresen alkalmaztunk magas növényi hormon tartalmú édesvízi algatörzseket a kukorica portokkultúrák indukciós és regenerációs hatékonyságának növelésére (Jäger és mtsai, 2015). Specifikus *in vivo* kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatás kimutatására alkalmas próbát dolgoztunk ki (Dőry és mtsai, 2016). Megállapítottuk, hogy a környezeti stressz hatások a PIN6 auxin transzporter transzlokációján keresztül befolyásolják a virágzati tengely fejlődését (Dőry és mtsai, 2019). Kidolgoztuk a búza petesejtek fagyasztva tárolásának módszerét. Búza petesejt és zigóta specifikus géneket határoztunk meg.

2. Az *A. thaliana* és a búza szárazságstresszel, valamint szimultán hő- és szárazságstresszel szembeni toleranciájának jellemzése

A hazánkban termesztett gabonafélék teméshozama és minősége a környezeti stresszorok hatására nagymértékű ingadozást mutatott az utóbbi 15 évben. A hagyományos növénynemesítéssel a jövőben részben kompenzálható a globális CO₂ kibocsátásra alapozott klímamodellek által az évszázad végéig prediktált 1,7-4,8°C-os átlaghőmérséklet emelkedés és az ezzel együtt járó gyakori, változó amplitúdójú szélsőséges időjárási események termés-csökkentő hatása. Ehhez azonban előbb meg kell ismerni a stresszorokkal szemben ellenálló fajták adaptációs mechanizmusainak biológiai alapjait és meg kell határozni a tolerancia markereket. Ennek érdekében komplex megközelítéssel tanulmányoztuk az ivaros fejlődési szakasz különböző fázisai során (spóra anyasejtek meiózisa, gamétafejlődés és megtermékenyülés, szemfejlődés) előforduló vízhiánynak (teljes vízmegvonás), illetve az azzal párosuló hőstressznek (32°C/24°C max/min) a vegetatív szövetekre, az ivarsejtek funkcióképességére, a megtermékenyülésre és a szemtermés fejlődésére gyakorolt hatását, ötvözve a morfológia (nano- és mikroszkópia), sejtbiológia, szövettan, szaporodásbiológia, növényfiziológia, metabolomika, proteomika, transzkriptomika és bioinformatika eszköztárát.

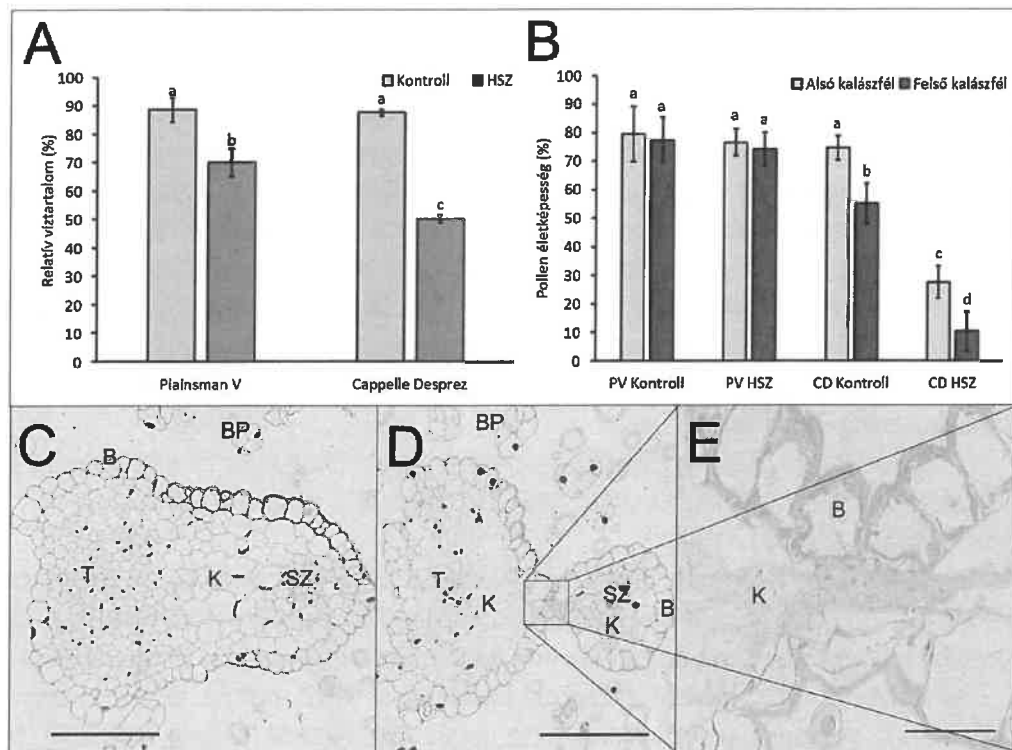
A vad típusú és a szárazságtűrő ABA hiperszenzitív *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* epidermiszét összehasonlítva megállapítottuk, hogy a mutáns vastagabb kutikulával borított epidermiszében nagyobb számú gázcsere nyílás és levélszőr található. Feltételezzük, hogy ezek a morfológiai sajátosságok hozzájárulnak a *cbp20* lúdfü genotípus szárazságtűréséhez (Jäger és mtsai, 2011). A vizsgálat eredményei ösztönöztek arra, hogy jellemezzük négy eltérő szárazságtűrésű őszi búza fajta (Plainsman V, Mv Emese, GK Élet és Cappelle Desprez) bőrszövetét, keresve a kapcsolatot a morfológia és a

funkció között. A kétszikű lúdfüvel ellentétben a búzával negatívan korrelált a sztómaszám és -méret a szárazságtolerancia mértékével (Jäger és mtsai, 2014).

A Plainsman V és Cappelle Desprez őszi búza fajtákat vizsgálva megállapítottuk, hogy a meiózis idején alkalmazott szárazság hatására a 3 sejtmagvú, keményítőt nagy mennyiségben felhalmozó pollen aránya mindkét genotípusnál szignifikánsan lecsökkent, ugyanakkor a fejlődésben lemaradt egy- és kétmagvas mikrospórák, valamint a keményítőben szegény három sejtmagvas pollensejtek a toleráns Plainsman V portokjaiban kisebb arányban fordultak elő. A szimultán hő- és szárazságstressz (HSZ) hatására az érzékeny Cappelle Desprez fajta portokjaiban a szárazságstressznél megfigyeltek mellett súlyos fejlődésbeni rendellenességek is kialakultak.

A gamétafejlődés idején HSZ stressznek kitett Plainsman V és Cappelle Desprez őszi búza növények relatív nedvességtartalma szignifikánsan lecsökkent (1A. ábra).

A stresszérzékeny Cappelle Desprez búzafajta termékenyülése és pollenjének életképessége vésszesen alacsony volt (1B. ábra). A bibepapilla sejtek reaktív gyök termelése szignifikánsan megemelkedett a HSZ kezelés hatására. Meghatároztuk a Plainsman V és Cappelle Desprez fajtáknál a HSZ pollen életképességre (1B. ábra), valamint a terméselemekre gyakorolt hatását a kalászok alsó és felső felére vonatkoztatva. A kezelés nem volt hatással sem a portokok, sem az embriózsákot magába foglaló magház méretére, azonban a bibék mindkét fajtánál szignifikánsan rövidebbek voltak a stressznek kitett termőkben. Megfigyeltük, hogy a kezelés hatására a stresszérzékeny Cappelle Desprez fajta bibepapilla sejtjeiben a sejtmagok és a citoplazma fragmentálódott. Ellentétben a kontroll bibeszálakkal (1C. ábra) a bibeszálak kéreg sejtjeinek és továbbító sejtjeinek nagyfokú degenerációját figyeltük meg a HSZ-stressz kezelt növények termőiben (1D., 1E. ábra). Míg a HSZ-kezelés a Plainsman V termékenyülésére nem gyakorolt szignifikáns hatást, addig a Cappelle Desprez fertilitása az alsó és felső kalászfélben jelentősen, mintegy 39 és 56%-kal lecsökkent. Megállapítottuk, hogy a termékenyülésbeni kiesést a Cappelle Desprez fajtánál 34%-ban a bibe, 66%-ban a pollen funkcióvesztése okozta (Fábián és mtsai, 2019).

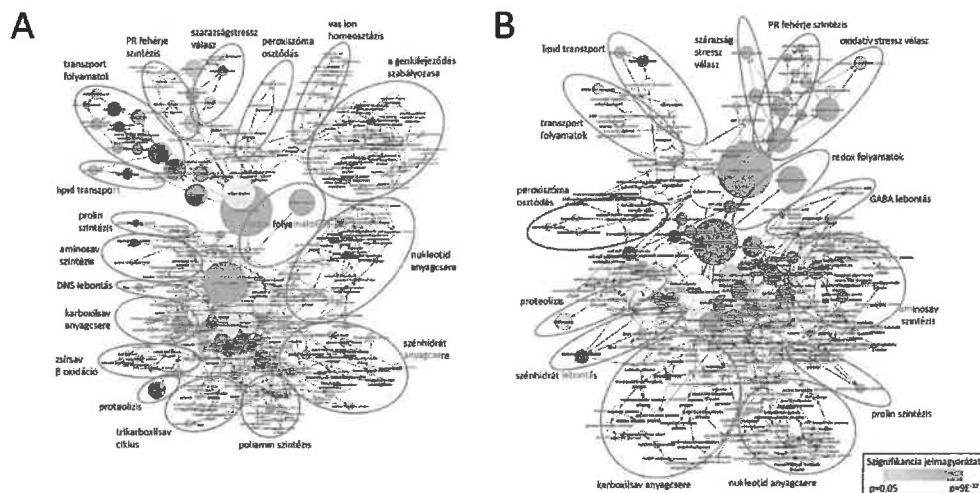


1. ábra. A gamétafejlődés idején fellépő szimultán hő- és vízmegvonás hatása a Plainsman V és Cappelle Desprez búzafajták zászlós leveleinek relatív víztartalmára (A), a pollen életképességére (B), valamint a kontroll (C) és kezelt bibeszálak (D, E) anatómiájára. B: bőrszövet; CD: Cappelle Desprez; BP: bibepapilla sejtek; HSZ: szimultán hő- és szárazságstressz; K: kéreg sejt; PV: Plainsman V; SZ: szállítószöveti nyáláb; T: továbbító sejt. Mércse = 100 μ m (C, D); 50 μ m (E)

Megfigyeltük, hogy a korai szemfejlődés során alkalmazott vízmegvonás hatására a Plainsman V és a Cappelle Desprez fajtánál egyaránt szignifikánsan megnőtt az abortált szemtermékek száma. A kontroll-lal összehasonlítva a kezelt szemtermékekben differenciálódó embriók és az A-típusú keményítő szemcsék kisebbek voltak, az érzékeny fajta endospermiumában kevesebb B-típusú keményítő szemcse volt megfigyelhető. A vízmegvonás felgyorsította a szemtermékek fejlődését, ugyanakkor 10 nappal lerövidítette az érési időt mindkét fajtánál. Ennek hatására a kezelt növények ezerszemtömege és kalásonkénti szemtömege elmaradt a kontrolltól. Összehasonlítva a Plainsman V genotípussal, a vízmegvonás markánsabb hatást gyakorolt a szárazságra érzékeny Cappelle Desprez fajta terméselemeire, anatómiájára és génkifejeződésére (Fábián és mtsai, 2011; Szűcs és mtsai, 2010).

A szimultán hő- és szárazságstressz hatása a búza génkifejeződésére

A gén ontológia feldúsulás analízis eredményei szerint a vizsgált szövetek közül a zászlóslevélben történt a legnagyobb mértékű gén aktiváció, mely a Cappelle Desprez-ben volt kifejezettebb (2. ábra). A HSZ-stressz hatására mindkét fajtában emelkedő expressziót mutató folyamatok a szárazságstressz válasz, a prolin szintézis, a redox folyamatok, a PR (pathogen related) fehérjék szintézise, a transzport folyamatok (főként ion- és lipid-transzport), a glioxálsav ciklus, a proteolízis, valamint a peroxiszóma képződés voltak. Ezek a folyamatok tehát az őszi búza zászlósleveleiben az egyidőben ható hő- és szárazságstresszre adott válasz alapjainak tekinthetők. A zsírsav β -oxidáció, a vas ion homeosztázis, a redox homeosztázis, a génkifejeződés szabályozás, a poliamin szintézis, a trikarboxilsav ciklus, a szénhidrát anyagcsere, a DNS lebontás és az aszparagin szintézis génjeinek expressziója csak az érzékeny fajtában emelkedett meg (2A. ábra). Ezzel szemben az oxidatív stresszre adott válaszban szerepet játszó gének csak a stressztűrő Plainsman V fajtában mutattak erősödő kifejeződést. Ennek alapján feltételezhető, hogy az alkalmazott stresszkezelések által a zászlóslevél szöveteiben okozott károsodások kivédésében a stressztoleráns Plainsman V jelentős mértékben támaszkodik az oxidatív stressz ellen védő gének emelkedett expressziójára (2B. ábra). Ugyanakkor meglepő módon a hőstressz válaszban szerepet játszó folyamatok génjeinek kifejeződése egyik fajta zászlóslevelében sem erősödött fel. Egyik fajta portokjaiban sem volt értékelhető stresszválasz kimutatható, a Cappelle Desprez-ben a transzlációval kapcsolatos, míg a Plainsman V-ben a lizin bioszintézissel és a vas-kén komplex kialakításával kapcsolatos gének expressziója emelkedett meg. A búza bibék transzkriptomikai elemzése során a zászlóslevelekhez hasonló eredményeket kaptunk: a HSZ-stressz hatására mindkét fajtában felerősödött a szárazságstressz válasz, a prolin szintézis, a redox- és a transzport-folyamatokban szerepet játszó gének expressziója. A Cappelle Desprez genotípussal összehasonlítva a kezelt Plainsman V-ben kevesebb folyamatban szerepet játszó gén expressziója mutatott erősödést a HSZ-stressz hatására, köztük a csak erre a genotípusra jellemzően fokozottan kifejeződő gének a hőstressz válaszban és a fehérjék natív konformációjának fenntartásában és a hibajavításban vesznek részt. Megállapítottuk, hogy az érzékeny fajta bibéiben jóval nagyobb, a stressztűrőhöz viszonyítva mintegy tízszeres volt a szignifikáns expresszió emelkedést mutató gének száma.



2. ábra. A Cappelle Desprez (A) és Plainsman V (B) őszi búzafajták zászlósleveleiben kombinált szárazság- és hőstressz hatására emelkedő expressziót mutató gének gén ontológia feldúsulás analízisének vizualizációja

3. A búza ivarsejteket kialakító meiotikus sejtosztódás vizsgálata kedvező és szupraoptimális hőmérsékleti viszonyok között

Az ivarsejteket kialakító számfelező sejtosztódás alapvető a szülői genomok megfelelő továbbörökítéséhez, az örökítő anyag sokféleségének fenntartásához és az ivarsejtek funkcióképességének kialakulásához. Ahhoz, hogy a kedvezőtlen éghajlati viszonyok között megfelelő mennyiségű termést állítsunk elő, fontos feltárni a környezeti változások hatását az ivarsejteket kialakító meiotikus sejtosztódásra. Ehhez pontosan ismernünk kell a meiózis molekuláris folyamatait, így elsődleges célunk volt ezek feltárása. A kromoszómák megfelelő továbbörökítésének feltétele, hogy az apai és az anyai homológ kromoszómák párt alkossanak a szinaptonémás komplex segítségével teljes hosszukban össze-kapcsolódjanak (szinapszis) majd a rekombináció során egyes részeit kicserélik egymással. Ezen folyamatok sikertelensége kromoszóma kieséshez, az ivarsejtek funkcióvesztéséhez és végül terméketlenséghez vezet. A kenyérbúza meiózisének részletes feltárását nehezíti, hogy genomja rendkívül nagy (17 Gb), amely három különböző al-genomból (A, B, D) tevődik össze. A különböző al-genomok a meiózis során áldiploidként viselkednek. Az eltérő al-genomhoz tartozó hasonló kromoszómák (homeológok) egymással nem, csak szigorúan a saját al-genomból származó párjukkal (homológok) alkotnak szinapszist, és kizárólag vele rekombinálódnak. Ez a párosodási forma gátat szab a különböző genom közötti átépüléseknek és lehetővé teszi az egyes al-genomok azonosságának megőrzését.

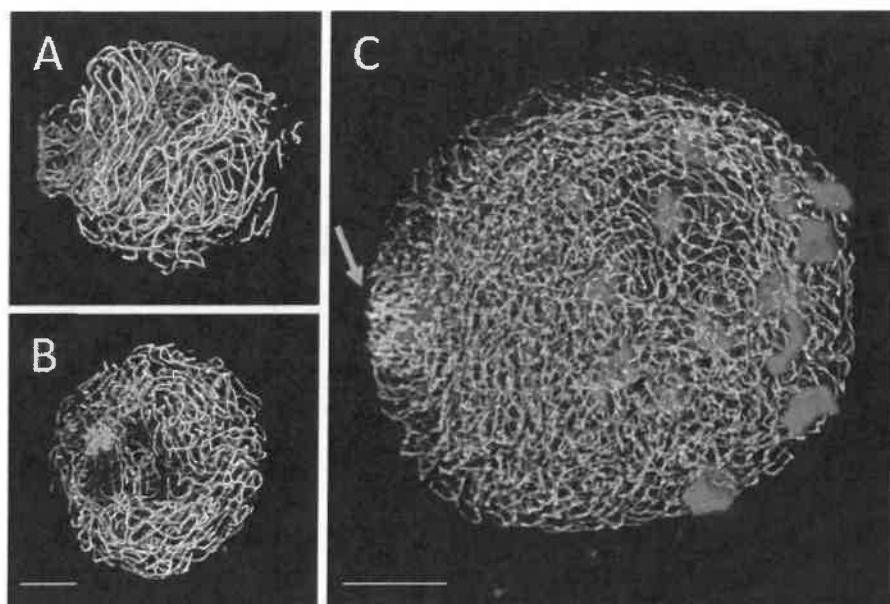
Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogyan hat a meiózis időszakában bekövetkező hőstressz az ivarsejtek kialakulására és funkcióképességére. A meiotikus sejtosztódásban szerepet játszó legfontosabb fehérjéket vizsgáltuk a legkorszerűbb sejtbiológiai módszerekkel. Azonosítjuk a magas hőmérsékletre érzékeny kulcsfolyamatokat, majd ezt olyan stratégiák kidolgozására használjuk, amelyek védelmet nyújtanak a magas hőmérséklet káros hatásaival szemben.

Búza meiotikus programjának részletes leírása modern sejtbiológiai módszerekkel

Amagasabbrendű növények meiózisában szerepet játszó alapvető géneket az utóbbi 15 év kutatásai során azonosították. Ennek köszönhetően a meiózisban részt vevő fehérjék kimutathatók és konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével nagy felbontásban vizsgálhatók a növényi sejtmagon belül. Osztályunkon a modell növények vizsgálata során alkalmazott sejtbiológiai módszereket úgy alakítottuk át, hogy azok alkalmasak legyenek a búza meiotikus sejtmagjainak vizsgálatára. Sikeresen ötvöztük a saját fejlesztésű fluoreszcens immunohisztokémiai és molekuláris citológiai (*in situ* hibridizáció, ISH) vizsgálati módszereket a nagy felbontású lézerpásztázó mikroszkópiával, amely során egyidőben több meiotikus fehérjét és kromoszóma régiót jelenítünk meg a búza sejtmagján belül, majd térbeli rekonstrukció segítségével vizsgáltuk a kromoszómák párosodását és öröklődését (3. ábra). Leírtuk, hogy a búza genomja két lépésben alkot szinapszist, amelyben elsőként a szubtelomérikus régiók ismerik fel egymást és párosodnak, majd második lépésben a géngazdagabb kromoszómakárok kapcsolódnak össze. A sejtosztódás vizsgálata során hangsúlyt fektettünk a húzófonalak kapcsolódási pontjaként szolgáló aktív centromérák nyomon követésére. Megállapítottuk, hogy a sejtciklus során e régiók folyamatos aktivitást mutatnak és meghatározott program szerint a meiózis elején dinamikusan összekapcsolódnak a maghártya felszínén, majd szétválnak és a sejtmag belsejébe húzódnak. Összefüggést fedeztünk fel a centromérák perifériáról történő leválása és a szinapszis második lépése között. Megfigyeléseink rámutattak arra, hogy a kromoszómakárok között mindaddig nem indul be a szinapszis, míg a centromérák a maghártya közelében csoportosulnak. A centromérák és a sejtmag ellentétes pólusán elhelyezkedő telomérák kifeszítik a kromoszómákat mindaddig, míg a telomérák irányából megtörténik a homológ kromoszóma végek szinapszisa. A centromérák ezt követően egyenként leválnak a sejtmag perifériájáról, és ez a fellazult szerkezet lehetővé teszi a kromoszómakárok szinapszisének hosszabbodását, amely a genom több pontjáról egyidőben indul be. A kromoszómák tengelye között végzett méréseink azt mutatták, hogy a szinapszist megelőző (homológia felismeréssel egybeeső) időszakban a sejtmag rendkívül tömör, amelyben az egyes kromoszóma tengelyek közötti távolság 300 nm alá esik. Ez a sejtmag szerkezet a

telomérikus szinapszis beindulását és a centromérák leválását követően fellazul. A kromoszómák tengelyei eltávolodnak egymástól, jelezve hogy a homológ szekvenciák kölcsönös felismerése megtörtént, és a továbbiakban a szinapszis hosszabbodása várható.

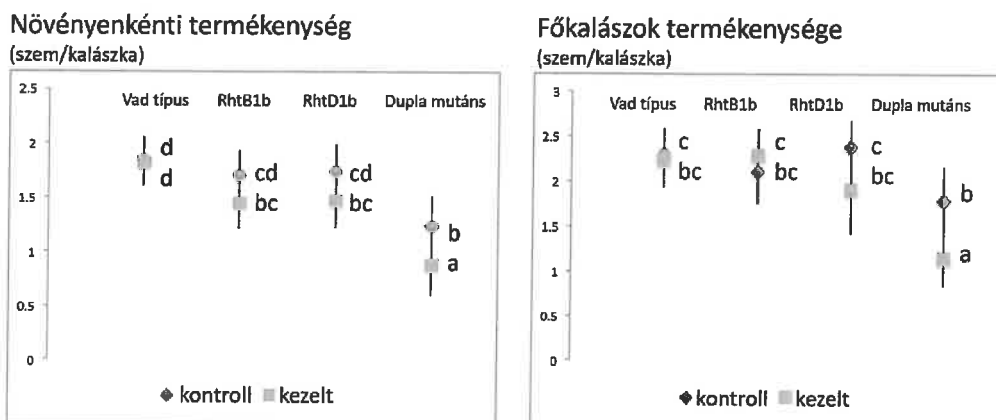
A centromérák működése alapvető a kromoszómák vándorlásában és öröklésében, hiszen mind a mitózis, mind a meiózis metafázisa során a húzófonalak kapcsolódási pontjaként szolgálnak. Kutatásaink megmutatták, hogy a centromérák szerepe a meiózis során ennél szélesebb körű, hiszen további mechanikai szabályozó feladatokat látnak el: szinkronizálják a kromoszóma párok szinapszist (Sepsi és mtsai, 2017, 2018). A centromérák szerepének további tisztázása olyan akadályokat oldhat meg a búzanemesítés számára, mint a centromérák közelében megfigyelt alacsony rekombinációs gyakoriság, amely megakadályozza a centroméra közeli gének egymástól független öröklődését.



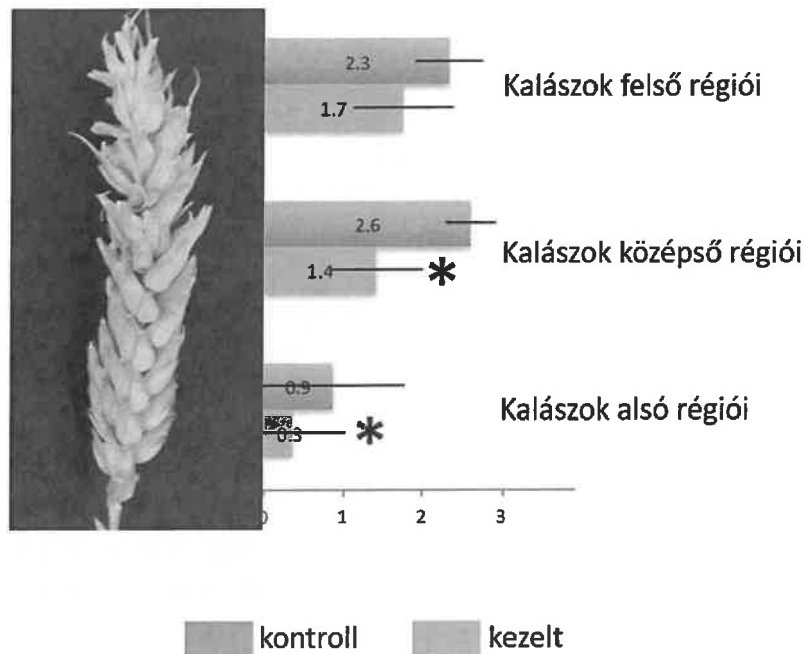
3. ábra. Meiotikus fehérjék és egyes DNS szekvenciák kimutatása ImmunoFISH módszerrel. Az örökítőanyag hosszanti fonalakba (kromoszómák) rendeződött. A kromoszómák tengelyét az ASY1 fehérje (fehér fonalak), míg az osztódásban szerepet játszó aktív centromérákat a CENH3 fehérje (vörös jel) immunjelölésével tettük láthatóvá. A telomérákat *in situ* hibridizáció segítségével jelöltük (zöld jel). A: teloméra csokor a tetraploid árpa korai meiotikus sejtmagjában (oldalnézet); B: teloméra csokor a tetraploid árpa korai meiotikus sejtmagjában (frontális nézet); C: centromérák asszociációi a kenyérbúza korai meiózisában. A teloméra csokor a centromérákkal ellentétes oldalon látható (narancssárga nyíl). Mércse = 5 μ m

A meiózis idején alkalmazott magas hőmérsékleti stressz hatása a törpe növekedésű búzák termékenységére

A kenyérbúza törpeségét módosult (mutáns) *rht* allélok okozzák, amelyek mára szinte valamennyi búzafajtában fellelhetőek. Korábbi üvegházi kísérletek azonban arra hívták fel a figyelmet, hogy a mutáns *rht* allélokat hordozó búzák érzékenyebbek a környezeti stresszre, különösen a generatív fázis korai szakaszában jelentkező hőstressz okozhat nagyfokú terméketlenséget. Vizsgálataink célja az volt, hogy felfedjük, miként hat a korai állapotban alkalmazott magas hőmérsékleti stressz a magas és a törpe növekedésű búzák termékenységére. Megállapítottuk, hogy a meiózist megelőzően alkalmazott rövid idejű magas hőmérséklet szignifikánsan csökkentette a mindkét mutáns *rht* allélt hordozó (*rhtB1b+rhtD1b* dupla mutáns) növények termékenységét (4. ábra). A fertilitás csökkenése mind a főkalászkok, mind a teljes növény esetében megfigyelhető volt. A terméketlenség a kalászkok középső régióit sújtotta leginkább, amelyekben az ivarsejtek a 30°C-os kezelés kezdetén meiotikus interfázisban voltak (5. ábra). A növények szemszáma nem változott a magas hőmérsékleti kezelés hatására, amely annak volt köszönhető, hogy a dupla mutáns növények kalászszáma megemelkedett a kontroll növényekéhez képest. A több kalász sikeresen ellensúlyozta a mutáns kalászkok terméketlenségét.



4. ábra. A Maris Huntsman búzafajta vad típusú, féltörpe és törpe növekedésű közel izogén vonalainak termékenysége magas hőmérsékleti kezelés hatására. Az ábrán a szignifikáns különbségeket ($P \leq 0,05$) különböző betűkkel jelöltük



5. ábra. A magas hőmérséklet hatása a Maris Huntsman dupla mutáns kalászkok régiónkénti fertilitására. *-al jelölt a kontrolltól szignifikánsan eltérő adat

A továbbiakban a hőstressznek kitett növények meiózisének sejtbiológiai vizsgálatát kívánjuk elvégezni az általunk kidolgozott immunohisztokémiai és citológiai módszerek segítségével. Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a terméketlenség hátterébe, szeretnénk feltárni, milyen meiotikus aberrációkat okoz a magas hőmérséklet a különböző vonalakban. Célunk olyan növényi anyagok kiválogatása, amelyek kalászaik a magas hőmérsékleti kezelés esetén is megőrzik termékenységüket és képesek a kontroll körülmények között nevelt növényeket megközelítő termés kialakítására.

4. Búza × árpa hibridek előállítása és jellemzése

A növénygenetikusok és a nemesítők régi vágya, hogy a mérsékelt égöv két legjelentősebb gabonaféléjének, a búzának és az árpának több évezred során kiválogatott előnyös tulajdonságait – a tritikálé mintájára – egy „szupergabonában” egyesítse, a mai napig is csak álom maradt. Az 1970-es évek kezdeti sikerei után nagyjából egy évtizedig tartott annak felismerése, hogy a keresztezés két lehetséges iránya közül az árpa ♀ × búza ♂ aligha járható, mert – feltehetően az alloplazmás inkompatibilitás miatt – a sorozatos búza visszakeresztezők nagyfokú (hím)sterilitást okoztak. Ez a zsákutca csak tetézte azt a jelenleg is megoldatlan nehézséget, hogy egyik keresztezési irányban sem sikerült az elsődleges (F1) hibridekből amfiploidokat előállítani.

Hatásfok és gyakoriság

A fent leírt nehézségek közös gyökere a keresztezések során kapott hibrid embriók és a belőlük regenerált növények alacsony gyakorisága, ami a megporzott virágok számára vetítve általában nem haladja meg az 1-2 százalékot. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy 100 elsődleges hibrid növény előállításához mintegy 500 kalászt (10 000 virágot) kell kasztrálni és megporozni. Jól látható, hogy a keresztezések hatásfokának, eredményességének jelentős növelése az egyik legfontosabb feladat.

Korábbi megfigyelések alapján a búza árpával való keresztezhetősége viszonylag jó egyezést mutat a rozssal való keresztezhetőséggel, ami viszont tapasztalatilag és genetikailag is jól leírt tulajdonság. Az eddig ismert hat keresztezhetőségi (*Kr*) gén recesszív, előnyös alléljai döntő többségben távolkeleti tavaszi búzában fordulnak elő, ezért többnyire ezeket (mintegy húsz fajtát) használták az árpa keresztezések során. Elgondolásunk szerint újabb, a rozssal jól kereszteződő búza genotípusok bevonásával a búza × árpa hibrid előállítás hatásfoka jó eséllyel jelentősen javítható. Néhány ígéretes tavaszi búza tesztelésével gyorsan azonosítottuk a martonvásári génbank Szecsuan nevű tételét, ami rozssal és árpával egyaránt kiváló keresztezési reakciót mutatott. Erre alapozva dolgoztuk ki jelenlegi módszerünket, amellyel sikerült a világon a legjobb búza × árpa hibrid növény kihozatalt elérni, és azt több éven át reprodukálni (1. táblázat). Mint látható, ezzel a kombinációval a technológia hatásfoka többszörösen meghaladja a szakirodalomban általánosan közölt 1-2 százalékos értéket, és megfelelő ráfordítással már a gyakorlati célú alkalmazás is elérhető közelségbe kerül.

1. táblázat. A Szecsuan és Chinese Spring búza genotípusok virágainak Morex tavaszi árpával végzett megporzása során kapott embrió és növény kihozatalok

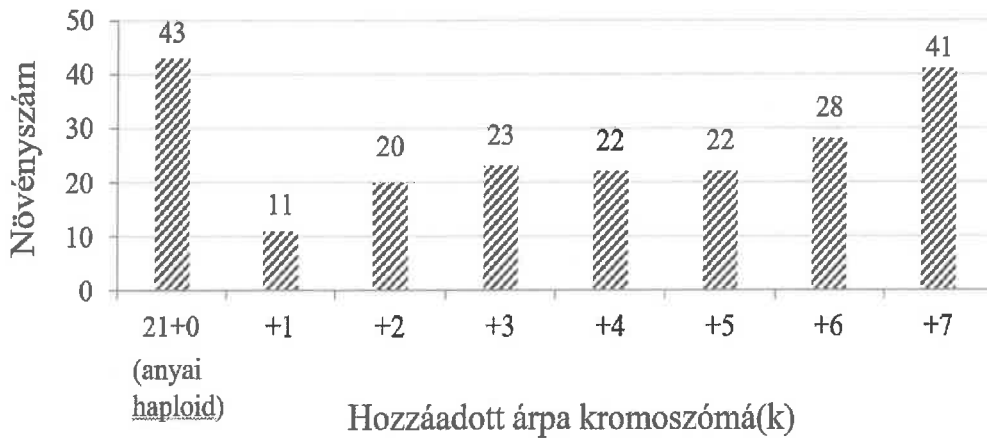
Búza genotípus (♀)	Polgári et al. (2019)			Polgári et al. (2014)		
	Virág, db	Embrió, db (%)	Növény, db (%)	Virág, db	Embrió, db (%)	Növény, db (%)
Szecsuan	1717	269 (15,7*)	199 (11,6*)	285	45 (15,8*)	40 (14,0*)
Chinese Spring	836	48 (5,7)	19 (2,3)	810	47 (5,8)	32 (4,0)
Összesen	2553	317 (12,4)	218 (8,5)	1095	92 (8,4)	72 (6,6)

* Szignifikáns ($p < 0,001$) eltérés a Chinese Spring-től a vonatkozó paraméterre kétmintás, kétoldali z-próba és Khi-négyzet próba alapján.

A kromoszóma kiesés véletlenszerűsége

A jelenlegi távoli hibridizációs rendszereknek van egy rejtett szépséghibája: nem minden regenerált, elsődleges hibrid növény tartalmazza az összes szülői kromoszómát, mert ezek – elsősorban az apai (esetünkben az árpa) kromoszómák – a korai embriófejlődés mitotikus osztódásai során teljesen vagy részlegesen elveszhetnek. Ennél fogva a kapott növényeknek csak egy része lesz teljes hibrid, a többség részleges hibrid (hipoaneuploid) vagy anyai haploid.

A különböző típusok előfordulásának jellemzésére állítottunk elő egy minden eddiginél nagyobb, 210 növényből álló hibrid populációt, amelyben kromoszóma-specifikus molekuláris markerekkel és citogenetikai módszerekkel megvizsgáltuk a populáció egyedeinek árpa kromoszóma-összetételét (6. ábra).



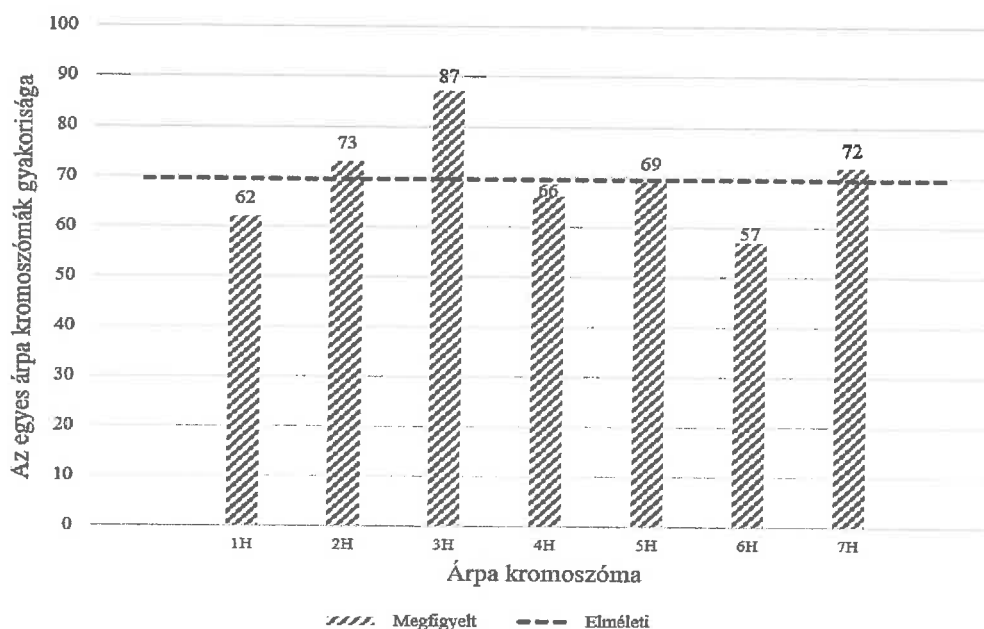
6. ábra. Egy 210 egyedből álló búza × árpa hibrid populáció kromoszóma-összetétele. A populációban megfigyelhető kromoszómaszámok a csak búzagenomot tartalmazó anyai haploidokétól ($n=21$) a teljes hibridekéig ($n=21+7=28$) terjednek

Az adatokból egy bimodális eloszlás rajzolódik ki, amelyben a kiindulási (teljes hibrid) és a végső (anyai haploid) állapot hasonló, nagyobb gyakorisággal fordul elő, míg a köztes állapotot képviselő részleges hibrid típusok közel hasonló számban vannak képviselve. Az így leírt eloszlás ugyan logikus rendszert alkot, de az függhet az aktuális genotípus kombinációtól is, ezért további megerősítésre lehet szükség.

Érdeemes közvetőleg megjegyezni, hogy az apai genom-elimináció következtében kapott anyai haploidok semmiképpen sem tekintendők haszontalan mellékterméknek, mivel ezek a növények pusztán létükkel igazolják, hogy jó keresztezhetőségi allélkombinációkat hordoznak genomjukban. Kihasználva azt, hogy az árpa genom korán és teljesen elveszik, a kromoszómaszám

megkettőzésével ezek az allélok homozigóta állapotba hozhatók. Ezen a módon eddig 30 dihaploid búza vonalat állítottunk elő, amelyek közül az eredeti Szecsuan genotípusnál még jobban kereszteződő és kedvezőbb agronómiai tulajdonságú vonalakat válogattunk ki, majd a továbbiakban ezeket használjuk anyai partnerként.

A fent leírt hibrid populáció már elég nagy léptékű ahhoz, hogy statisztikailag is kielégítően vizsgálhassuk, vajon az egyes árpa kromoszómák kiesése véletlenszerű-e vagy sem (7. ábra).

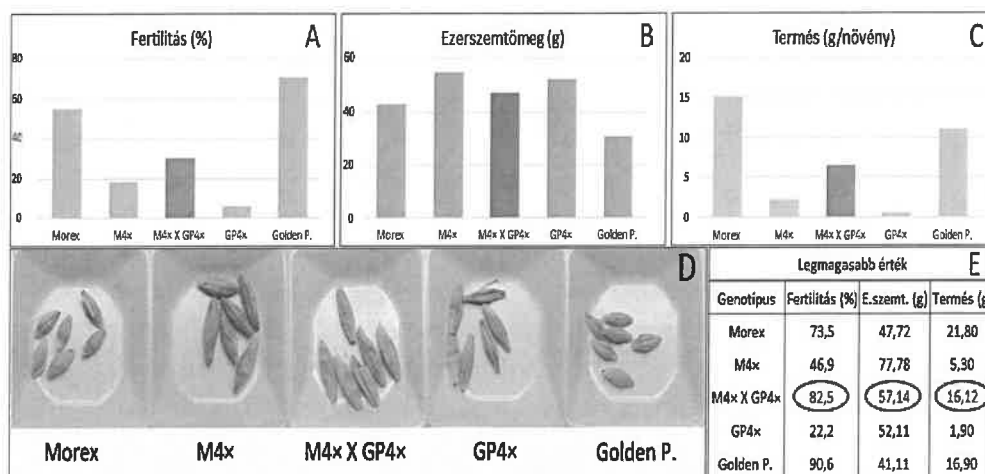


7. ábra. Az egyes árpa kromoszómák (1H-7H) megfigyelt gyakorisága 126 részleges búza × árpa hibrid növényben. A szaggatott vonal a torzítatlan, egyenletes eloszlás elméleti gyakoriságát ($69,43=486/7$) mutatja az összesen 486 árpa kromoszómát tartalmazó részleges hibrid (hipoaneuploid) populációban

A Khi-négyzet próba illeszkedésvizsgálatának eredményeként [$\chi^2 = 7,918$; $p = 0,244$ ($df = 6$; $n = 486$)] statisztikailag nem igazolható, hogy bármely kromoszóma preferenciálisan esett volna ki a teljes hipoaneuploid populációban. Levonható tehát a következtetés, hogy az árpa genom (és kromoszómák) kiesése véletlenszerű a kezdeti fejlődés során. Megfordítva: minden árpa kromoszóma (közel) azonos eséllyel marad benn az elsődleges hibrid növények genomjában a meiózis kezdetéig.

Szintet lépni autopoliploidokkal

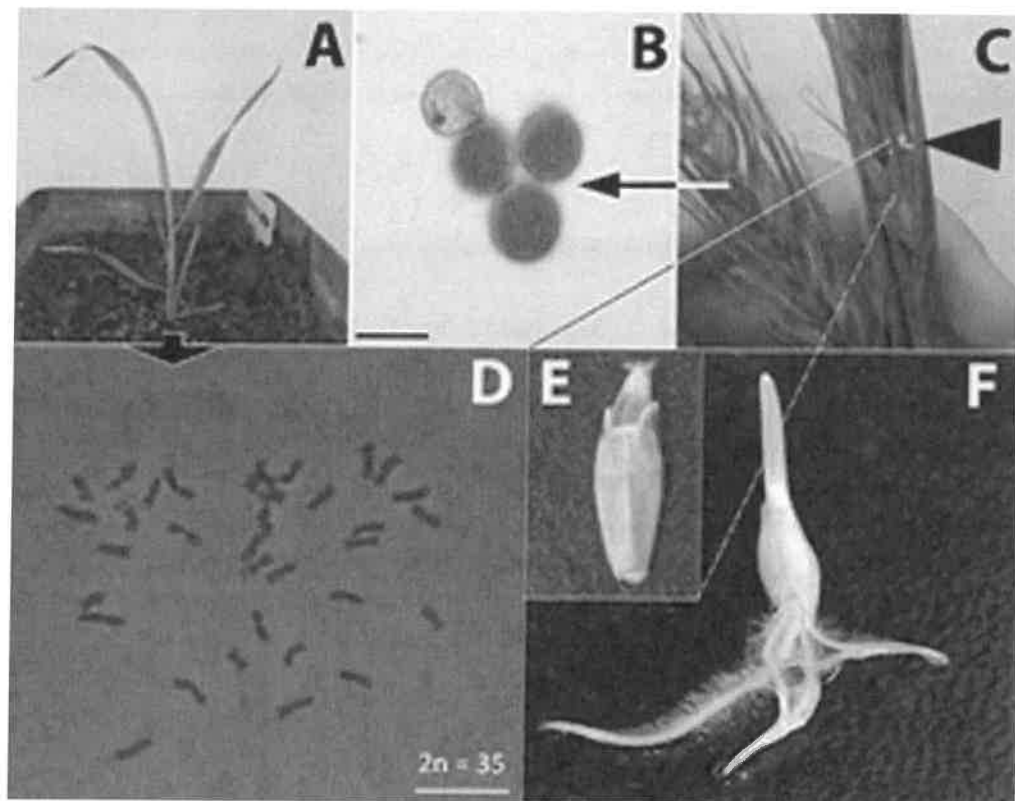
Búza × árpa amfiploidot eddig még senkinek sem sikerült előállítania. Az amfiploidizáció során meg kell kettőzni az elsődleges teljes hibrid kromoszómakészletét, hogy mindkét szülői genom kromoszómái önmaguk másolataival párosodni tudjanak a meiózis első profázisában, és a hibrid termékeny utódokat hozhasson. A probléma megoldásához egy hipotézist dolgoztunk ki, amelynek lényege, hogy a szülői genomok előzetes megkettőzésével előállított autopoliploidok keresztezéséből származó hibrid várhatóan már termékeny lesz. Ehhez azonban előbb azt a problémát kell leküzdeni, hogy az autopoliploidok termékenysége a meiózis anomáliái miatt általában messze elmarad a kiindulási diploidokétól. Az autotetraploid árpánál sincs ez másként, pedig a pollenadó szülőnél a keresztezések ismertett alacsony hatásfoka miatt különösen fontos a sok életképes virágpor. Felfedeztük azonban, hogy két alacsony fertilitású autotetraploid szülő keresztezésével a termékenység helyreállítható. Ráadásul a tetraploid árpa hibridek ezerszemtömege jelentősen meghaladta a diploid szülőkéét, miközben a termésük is szignifikánsan javult az autotetraploidokéhoz képest (8. ábra).



8. ábra. Két diploid tavaszi árpafajta (Morex és Golden Promise) és tetraploid változataik (M4x és GP4x), valamint ezek hibridjének (M4x X GP4x) fertilitása és terméselemei. A: átlagos fertilitás, B: átlagos ezerszemtömeg, C: átlagos növényenkénti termés, D: a szemtermések morfológiája, E: az egyes fajták és változatok legjobb eredményei (a hibridéi vörössel kiemelve); $n = 25$ növény

A fertilis tetraploid árpa hibrid előállítása lehetővé tette olyan, eddig ismeretlen kombináció tesztelését, amikor a diploid gamétát ($n=2x=14$) biztosító tetraploid árpát ($2n=4x=28$) ráporoztuk a három pár homeológ genomot hordozó

allohexaploid búzára ($2n=6x=42$). A regenerált növények gyökércsúcsaiban a mitotikus kromoszómaszám a teljes hibridekre jellemző $2n=5x=35$ volt (9D. ábra). Meglepetésünkre a felnevelt növények zöme öntermékenynek bizonyult: a portokok életképes pollent tartalmaztak (9B-C. ábra), és az izolált kalászokban normális (endospermiumot tartalmazó) és átmeneti morfológiájú szemek fejlődtek (9E. ábra). Az ezekből csíráztatott (9F. ábra) és öntermékeny növények molekuláris-citológiai jellemzése jelenleg is folyamatban van.



9. ábra. Öntermékeny búza \times árpa hibridnövény előállítása és jellemzése. A: fiatal, embriókultúrából regenerált növény, B: érett, csíráképes pollenszemek, C: fejlődő szemkezdemény, D: mitotikus kromoszóma preparátum ($2n=5x=35$), E: érett szemtermés, F: csírázó utódnövény. Mércse = 50 μ m (B); 30 μ m (D)

Az általunk kidolgozott új módszerekkel és keresztezési kombinációkkal hidat verhetünk a búza és az árpa evolúciója során elszigetelődött genomok közé. Ez megnyithatja az utat a két faj közötti horizontális génátvitel előtt, és elérhető közelségbe hozhatja a keresett kevert genomú és tulajdonságú búza \times árpa hibrideket. A jövő két kulcskérdése, hogy a technológia sikeresen kiterjeszthető-e az őszi búzára (ideértve a korszerű hazai fajtákat is), és rutinszerűen alkalmazható-e

a gyakorlatban is? Egy termékeny búza × árpa nemzetség hibrid új szint vihet a nemesítésbe és a gabonatermesztésbe, de alapkutatói szempontból is érdekes azoknak a folyamatoknak a megismerése, amelyek egyben tartanak két igen eltérő, az ivaros keresztezhetőség határán álló genomot. Ezekkel az ismeretekkel akár eddig ismeretlen, elképzelhetetlen keresztezések is végrehajthatóak lennének – természetes úton.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Békné Kapral Emesének, Fodor Szilviának, Gondos Erikának, Krárné Péntek Barbarának és Rinyu Ibolyának a 10 év során elkötelezetten és lelkiismeretesen végzett munkájukért.

Megjelent publikációk

- Fábián, A., Sáfrán, E., Szabó-Eitel, G., Barnabás, B., Jäger, K. (2019): Stigma functionality and fertility are reduced by heat and drought co-stress in wheat. *Frontiers in Plant Science* 10, 244.
- Polgári, D., Mihók, E., Sági, L. (2019): Composition and random elimination of paternal chromosomes in a large population of wheat × barley (*Triticum aestivum* L. × *Hordeum vulgare* L.) hybrids. *Plant Cell Reports* 38, 767-775.
- Dőry, M., Hatzimasoura, E., Kállai, B.M., Nagy, S.K., Jäger, K., Darula, Z., Nádai, T.V., Mészáros, T., Juez, E.L., Barnabás, B., Palme, K., Bögre, L., Ditegou, F.A., Dóczy, R. (2018): Coevolving MAPK and PID phosphosites indicate an ancient environmental control of PIN auxin transporters in land plants. *FEBS Letters* 592, 89-102.
- Sepsi, A., Fábián, A., Jäger, K., Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2018): ImmunoFISH: Simultaneous visualisation of proteins and DNA sequences gives insight into meiotic processes in nuclei of grasses. *Frontiers in Plant Science* 9, 1193.
- Sepsi, A., Higgins, J.D., Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2017): CENH3 morphogenesis reveals dynamic centromere associations during synaptonemal complex formation and the progression through male meiosis in hexaploid wheat. *Plant Journal* 89, 235-249.
- Dőry, M., Doleschall, Z., Nagy, S.K., Ambrus, H., Mészáros, T., Barnabás, B., Dóczy, R. (2016): Kinase-Associated Phosphoisoform Assay: a novel candidate-based method to detect specific kinase-substrate phosphorylation interactions in vivo. *BMC Plant Biology* 16, 204.
- Fábián, A., Földesiné Füredi, P.K., Ambrus, H., Jäger, K., Szabó, L., Barnabás, B. (2015): Effect of *n*-butanol and cold pretreatment on the cytoskeleton and the ultrastructure of maize microspores when cultured in vitro. *Plant Tissue and Organ Culture* 123, 257-271.
- Jäger, K., Fábián, A., Eitel, G., Szabó, L., Deák, C., Barnabás, B., Papp, I. (2014): A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology* 171, 1256-1266.
- Polgári, D., Cseh, A., Szakács, É., Jäger, K., Molnár-Láng, M., Sági, L. (2014): High-frequency

- generation and characterization of intergeneric hybrids and haploids from new wheat-barley crosses. *Plant Cell Reports* 33, 1323-1331.
- Fábián, A., Jäger, K., Rakszegi, M., Barnabás, B. (2011): Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Reports* 30, 551-563.
- Jäger, K., Fábián, A., Tompa, G., Deák, C., Höhn, M., Olmedilla, A., Barnabás, B., Papp, I. (2011): New phenotypes of the drought tolerant *cbp20 Arabidopsis thaliana* mutant have changed epidermal morphology. *Plant Biology* 13, 78-84.
- Szűcs, A., Jäger, K., Jurca, M.E., Fábián, A., Bottka, S., Zvara, A., Barnabás, B., Fehér, A. (2010): Histological and microarray analysis of the direct effect of water shortage alone or combined with heat on early grain development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum* 140, 174-188.

