

A vízmegvonás szemfejlődésre gyakorolt hatásának szövettani vizsgálata különböző stressztoleranciával rendelkező búza genotípusok esetében

Fábián Attila, Jäger Katalin, Barnabás Beáta

MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Növényi Sejtbiológia Osztály, Martonvásár

Összefoglalás

A globális klímaváltozás által okozott szárazság egyre fokozódó negatív hatással van a mezőgazdaságra, ezért a szárazságstressz-rezisztenciával rendelkező genotípusok jelentősége a jövőben egyre nő. A vízmegvonással szemben toleráns fajták stresszválaszának megértése hozzájárulhat a magasabb szintű stresszrezisztenciával rendelkező genotípusok nemesítéséhez.

Munkánk célja volt, hogy felfedjük a búza ivaros folyamatai során alkalmazott, terméscsökkenést okozó szárazságstressz által a fejlődő szemtermésekben előidézt szövettani változásokat. Ennek érdekében vizsgáltuk a meiózis, az antézis és a korai szemfejlődés idején teljes vízmegvonással kiváltott szárazságstressz hatását a szárazság érzékeny Cappelle Desprez valamint a vízmegvonással szemben toleráns Plainsman V őszi búzafajták (*Triticum aestivum* L.) termésmennyiségére, fertilitására és szemterméseinek morfológiájára.

Szövettani módszerekkel vizsgáltuk a fejlődő embriók, a keményítő endospermium sejtek és az azokat körülvevő anyai sejtrétegek morfológiáját érintő változásokat. Sztereológiai módszerekkel határoztuk meg a fejlődő endospermium sejteinek számát, valamint a bennük felhalmozódó tartalék tápanyagok mennyiségét, meghatároztuk az A valamint a B típusú keményítőszemcsék sejtenkénti számát valamint a sejtekben a fehérjeraktár funkcióját betöltő fehérjetestek mennyiségét is.

A meiózis és az antézis idején alkalmazott kezelések hatására mindkét fajta fertilitása, szemkötése és termése csökkent, szemtermés fejlődése lelassult. Ezzel szemben a sejtalkotók számában nem volt kimutatható változás. A korai szemfejlődés idején alkalmazott vízmegvonás hatására csökkenés következett be az endospermiumban található B típusú keményítőszemcsék számában, míg az aleuron sejtek fejlődése, valamint az ovulumot körülvevő sejtrétegek degradációja mindkét genotípus esetében jelentősen felgyorsult. A korai szemfejlődés idején a vízmegvonás felgyorsította a szemtelítődés ütemét, lerövidítette az érési időt, valamint jelentősen lecsökkentette a termés mennyiségét. Az érett embriók mérete jelentős mértékben elmaradt a kontrolltól az érzékeny Cappelle Desprez esetében, a fajta endospermiumának sejtjei pedig a toleráns Plainsman V- tel összehasonlítva szignifikánsan kevesebb B típusú keményítőt halmoztak fel. A toleráns genotípus kezelt szemterméseiben a fehérjetestek száma jelentősen meghaladta a kontrollra jellemző értéket. Figyelembe véve a vegetatív szövetek regenerációját, a szemkötést valamint a termést, a szárazság toleráns Plainsman V stresszreakciója szignifikánsan jobb volt, mint az érzékeny genotípusé.

Kulcsszavak: embrió, endospermium, keményítő, őszi búza, szárazságstressz

Bevezetés

A globális klímaváltozás okozta gyakori extrém száraz időszakok az utóbbi évtizedekben egyre negatívabb hatással bírnak a mezőgazdaságra. A változást leíró modellek az elérhető vízbázisok csökkenését jelzik előre (Arnell 1999), tehát a jövőben a szárazságtűrő fajták fontossága nő. A nemesítők fontos feladata az új, magasabb szárazság toleranciával rendelkező fajták előállítására, ennek megfelelően a búza szárazságtűrésével kapcsolatban Magyarországon is régóta folytatnak kutatásokat mind Szegeden, a Gabonakutató Nonprofit Kft.-ben (Csenz *et al.* 2002, Csenz 2009), mind pedig Martonvásáron, az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében (Galiba *et al.* 1989, Balla *et al.* 2006, Bencze *et al.* 2011). A vízhiány sokféle hatást gyakorol a gabonanövényekre, befolyásolja fejlődésüket, morfológiájukat, élettani folyamataikat, ennél fogva pedig termésüket (Barnabás *et al.* 2008). A búza (*Triticum aestivum* L.) Európában évszázadok óta a legfontosabb termesztett étkezési célú gabonaféle, az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezetének (FAO) adatai szerint világszerte a legnagyobb termőterületen vetett és a második legnagyobb mennyiségű termést adó gabonanövény (Curtis 2002). Termését a generatív életszakaszban jelentkező szárazság erősen csökkenti (Jamieson *et al.* 1995). Ebből a szempontból fontos fejlődési fázisok a meiózis, az antézis, valamint a korai szemfejlődés időszaka. A meiózis időszakában történik meg a mikro- és makrospóra anyasejtek számfelező osztódása. A folyamat során a sejt örökítő anyagának megkettőződését követően számfelező osztódás megy végbe, lehetőséget teremtve a genetikai anyag, tehát a tovább örökített tulajdonságok rekombinációjára (Caryl *et al.* 2003). A folyamat elengedhetetlen a funkcióképes ivarsejtek létrejöttéhez, tehát az ebben az időszakban fellépő károsító hatások jelentősen csökkentik a fertilitást, ennek következtében pedig negatív hatással bírnak a termés mennyiségére. Korábbi kutatásokban a meiózis idején fellépő szárazság negatív hatását különösen a mikrosporogenezis, azaz a pollenfejlődés szempontjából találták jelentősnek (Lalonde *et al.* 1997).

A virágzás, más szóval antézis idején ható szárazság szintén csökkenti a szemkötést, ezáltal a kalászonkénti szemek számát, amely a búza termésmennyiségét meghatározó egyik legfontosabb tényező (Jamieson *et al.* 1995). A vízhiány mind a pollen, mind pedig a bibe károsításán keresztül kifejtheti negatív hatását, ezen felül irodalmi adatok szerint szántóföldi körülmények között a szárazságstressz 2-3 nappal le is rövidíti az antézis időszakát mind az érzékeny, mind pedig a toleráns búza genotípusok esetén (Khanna-Chopra és Selote 2007). A korai szemfejlődés időszakában bekövetkező vízhiány a fejlődő szemtermések abortcióját illetve az érett szemek zsugorodását válthatja ki, ezzel termésvesztést okozva (Blum 1998).

A toleráns genotípusok stresszválaszának jobb megértése hozzájárulhat a magasabb stressztoleranciával rendelkező új fajták nemesítéséhez. Vizsgálataink célja volt, hogy fényt derítsünk a reprodukzív folyamatok idején alkalmazott szárazságstressz által a különböző stressztoleranciával rendelkező fajták szemterméseinek fejlődésében okozott szövettani változásokra, melyek befolyásolhatják a termés mennyiségét. Ennek érdekében a kontrollált környezetben alkalmazott vízmegvonás hatását vizsgáltuk, különös tekintettel a szemek morfológiájára, az embriók fejlődésére, a keményítő- és fehérjetartalomra, valamint a termésre.

Vizsgálati anyag és módszer

Növényanyag és a növénynevelés körülményei

Kísérleteink során a szárazságra érzékeny Cappelle Desprez és a szárazság toleráns Plainsman V őszi búza genotípusokat (Guóth *et al.* 2009) vizsgáltuk. A növényeket 7 hetes, 4 °C-on történő vernalizáció után 2 liter űrtartalmú cserepekbe, szántóföldi talaj-homok-tőzeg keverékbe (3:1:1, v/v/v) ültettük, majd növénynevelő kamrákban neveltük a T1 tavaszi növénynevelő program (Tischner *et al.* 1997) alkalmazásával. A növényeket a talaj vízkapacitás értékéig öntöztük az ültetéstől a kezelések kezdetéig a jó vízellátottság elérésének érdekében. A megporzás idejének kontrollálása céljából a kezeletlen és a vízhiánynak kitett növények virágaiból a porzókat az antézis előtt öt nappal eltávolítottuk, a kalászokat celofán zacskókkal izoláltuk, majd azokat az antézis idején kézzel, pergetéses módszerrel poroztuk be. A terméslemek meghatározásához genotípusonként és kezelésként húsz növényt 32/14 °C-os végső nevelési hőmérséklet mellett teljes éréssig neveltünk.

Stresszkörülmények

A szárazságstresszt hét napon át tartó, teljes vízmegvonással idéztük elő a reprodukív életszakasz három fenofázisában: a meiózisz, az antézisz valamint a korai szemfejlődés idején. A kezelés kezdetének időpontját a meiózisz illetve az antézisz megelőző második napra időzítettük. A korai szemfejlődés idején a kezelés kezdete a virágzást követő harmadik napra esett. A többi növénynevelési paraméter megegyezett a kontroll növények esetében alkalmazottakkal.

A víztartalom meghatározása

A talaj térfogatarányos víztartalmát (TVT) HH2 típusú talajnedvesség-mérővel (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK) mértük mind teljes víztelítettség mellett, mind pedig a szárazságkezelés végén. A méréseket mindkét módszer esetében kezelésként 15 cserépen végeztük el.

A zászlóslevelek relatív víztartalmának meghatározását (RVT %) Augé *et al.* (1998) módszerével végeztük. A levelek tömegét teljes víztelítettség (t_f , telített tömeg) mellett, a szárazságkezelés végén (t_f , friss tömeg), valamint 80°C-on, 24 órásszáritást követően (t_{sz} , száraz tömeg) is megmértük. A relatív víztartalmat a következő képlet segítségével számítottuk ki:

$$RVT(\%) = \frac{t_f - t_{sz}}{t_f - t_{sz}} \times 100$$

Szöveti vizsgálatok

A szemfejlődés nyomon követéséhez szükséges mintavétel mindkét genotípusnál kezelésként három-három különböző növény főkalászának középső régiójából történt. A mintavétel a meiózisz és az antézisz idején alkalmazott stresszek esetében a megporzást követő első öt napon, míg a korai szemfejlődés idején kezelt

növényeknél a megporzást követő 5., 7., 9., 12. és 14. napon történt. Kalászonként 10 darab, fejlődésben lévő, megtermékenyített termőt kémiai módszerrel, 2,5% (v/v) glutáraldehid és 4% (w/v) formaldehid tartalmú 50 mM-os Na-kakodilát pufferben (pH 7,2) fixáltunk. A mintákat az említett pufferben való mosás után emelkedő koncentrációjú etilalkohol-sorban víztelenítettük. A termőket ezt követően *Spurr* (1969) módszere szerint epoxi gyantába ágyztuk. A termőkből azok hosszanti szimmetriáskjával párhuzamos félvékony (1 μ m vastagságú) metszeteket készítettünk Ultracut-E mikrotom (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) segítségével. A szénhidrátok jelölésére 0,5% (w/v) perjódsvas Schiff (PAS), a fehérjék jelölésére pedig 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue festést alkalmaztunk. A metszetek vizsgálata BX51 típusú fénymikroszkóppal (Olympus, Tokyo, Japan) történt, a méréseket az Image-Pro Plus 5.1 képanalizáló szoftverrel (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) végeztük. Az embriók méretét azok transzverzális középsíkban készült metszetein határoztuk meg, az embrió átmetszeti területének mérésével. Az érett embriók méretének meghatározása a szemek szimmetriáskban történő szétvágása után Zeiss Stereo Discovery sztereomikroszkóp (Jena, Germany) és az említett képfeldolgozó szoftver használatával történt.

Sztereológiai analízis

A fejlődő szemtermések endospermium sejtjeiben található keményítőszemcsék és fehérjetestek számának meghatározására sztereológiai analízist végeztünk. Mindkét genotípus fejlődő szemterméseiből mintákat gyűjtöttünk az egyes kezelések végén, és a visszaöntözést követő 5. napon. Az A és B típusú keményítőszemcsék, valamint a fehérjetestek és az endospermium sejtek egységnyi térfogatban előforduló számát *Weibel és Gomez* (1962) módszere alapján számítottuk ki, melyhez kezelésként és genotípusonként három különböző kalász középső régiójának virágaiból származó szemterméseit (n=3 genotípusonként és kezelésként) használtuk fel. A beágyazott szemtermésekből készített, véletlenszerűen kiválasztott félvékony metszeteken határoztuk meg a sejtek és a sejtalkotók egységnyi felületre eső számát, a térfogati denzitásokat, valamint a β koefficiens számításához szükséges sejtalkotó méreteket. A mérésekhez szükséges felvételeket a BX51 mikroszkóphoz (Olympus, Tokyo, Japan) kapcsolt C8484 kamera (Hamamatsu Photonics Co., Hamamatsu, Japan) segítségével készítettük. A sejtek és sejtalkotók mennyiségének, valamint azok méretének meghatározása a CellP képanalizáló program (Olympus, Tokyo, Japan) segítségével történt.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai értékelése az SPSS for Windows 10.0 programmal, varianciaanalízis alkalmazásával történt.

Vizsgálati eredmények

A szárazság hatása a vegetatív szövetekre és a termésre

A búza generatív fejlődési fázisának eltérő időpontjaiban (meiózis, virágzás, korai szemfejlődés) alkalmazott, megegyező időtartamú kezelések fajtától függetlenül hasonló mértékben, a kezelés előtt jellemző átlagosan 35%-os értékről 10%-ra csökkentették a talaj térfogatarányos víztartalmát, az egyes kezelések között szignifikáns különbség nem volt. Ennek ellenére a különböző kezelések során a növények eltérő mértékben mutatták a szárazságstresszre jellemző sárgulások, majd száradásos fenotípusos változásokat, ami arra utalt, hogy az azonos mértékű vízmegvonás a különböző egyedfejlődési fázisokban eltérő mértékű stresszhatást okozott. Ezt a zászlóslevelek eltérő relatív víztartalma is megerősítette (1. táblázat). A meiózis idején alkalmazott vízmegvonás hatására az érzékeny genotípus leveleinek relatív víztartalma csökkent, míg a Plainsman V-nél nem figyeltünk meg változást a kontrollhoz képest (1. táblázat). Az antézis idején fellépő szárazságstresszre mindkét fajta hasonló mértékű vízvesztéssel reagált (1. táblázat), de a levelek sárgulása és száradása csupán az érzékeny fajtára volt jellemző. A Cappelle Desprez esetben megfigyeltük a kalászok csúcsi részének sárgulását majd száradását is, mely az ott található szemtermések abortálásához vezetett. A visszaöntözést követően a Plainsman V teljes, míg a Cappelle Desprez részleges regenerációt mutatott.

1. táblázat. *A fajtákra jellemző kontroll és a kezelések végén mért zászlóslevél víztartalom értékek (\pm standard eltérés). Az oszlopokon belül az eltérő betűk az átlagértékek szignifikáns eltérését jelölik a $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten.*

Kezelés ideje (1)	Genotípus (2)	Zászlóslevél víztartalom (RVT %) (3)	
		Kontroll (4)	Kezelés végén (5)
Meiózis (6)	Cappelle Desprez	84,68 ^a \pm 4,22	55,11 ^{bc} \pm 8,70
	Plainsman V	87,31 ^a \pm 4,74	82,19 ^a \pm 3,40
Antézis (7)	Cappelle Desprez	79,41 ^a \pm 4,65	56,95 ^{bc} \pm 10,29
	Plainsman V	85,97 ^a \pm 7,88	64,21 ^b \pm 5,47
Korai szemfejlődés (8)	Cappelle Desprez	80,55 ^a \pm 2,46	36,95 ^c \pm 15,28
	Plainsman V	82,41 ^a \pm 4,23	48,58 ^c \pm 2,65

A korai szemfejlődés idején alkalmazott stressz hatására a levelek hervadása a kezelés harmadik napjától volt megfigyelhető, majd az ötödik napra a levelek besodródtek. Mindkét fajta esetén sárgulást figyeltünk meg, a visszaöntözést követően azonban csupán a Plainsman V fajta levelei voltak képesek a rehidratációra és a regenerációra.

A szárazságstressznek kitett növények szemfeltöltődési és érési időszaka a kontroll növényekhez viszonyítva genotípustól függetlenül tíz nappal lerövidült. A kezelés hatására az érett szemtermések zsugorodottak voltak és a Cappelle Desprez kalászainak felső harmadában a magkezdemények jelentős része abortálódott.

A meiózis és virágzás idején alkalmazott vízmegvonás hatására a Plainsman V fertilitása, illetve szemkötése nem változott szignifikánsan, ugyanakkor a fajta korai

szemfejlődés idején kezelt növényeinek szemkötése 18%-kal csökkent. Ezzel szemben az érzékeny Cappelle Desprez fertilitása a meiózis idején fellépő vízmegvonás hatására 16%-kal, szemkötése az antézis idején és a korai szemfejlődés idején ható stressz következtében 43%-kal, illetve 53%-al csökkent (2. táblázat).

A szárazság által kiváltott ezerszemtömeg csökkenés a meiózis idején kezelt Plainsman V kivételével mindkét fajta és minden kezelés érett szemterméséinél megfigyelhető volt (2. táblázat).

Mindkét genotípusnál a korai szemfejlődés idején adott stressz okozta a legnagyobb károsodást. A Plainsman V-re jellemző nagyobb mértékű ezerszemtömeg csökkenés feltehetően a jobb szemkötés, azaz a magasabb szemszám következménye volt.

A kezelések hatására a kalászonkénti termés mindkét genotípusnál szignifikánsan csökkent, de a Plainsman V valamennyi kezelésre szignifikánsan ($P \leq 0,05$) alacsonyabb termésveszteséggel reagált, mint a Cappelle Desprez (2. táblázat).

2. táblázat. A kontroll és kezelt Cappelle Desprez és Plainsman V növényekre jellemző fertilitás/szemkötés, ezerszem-tömeg, valamint kalászonkénti termés értékek (\pm standard eltérés). Az oszlopokon belül az eltérő betűk az átlagértékek szignifikáns eltérését jelölik a $P \leq 0,005$ valószínűségi szinten.

Fajta (1)	Kezelés (2)	Fertilitás/ szemkötés (%) (3)	Ezerszem- tömeg (g) (4)	Kalászonkénti termés (mg) (5)	Növényenkénti termés (mg) (6)
Cappelle Desprez	kontroll (7)	69,9 ^a \pm 7,5	27,7 ^c \pm 5,6	1115,3 ^b \pm 232,9	5001,3 ^b \pm 2072,1
	meiózis (8)	58,4 ^b \pm 9,3	22,3 ^d \pm 4,0	715,0 ^d \pm 70,0	2927,1 ^b \pm 915,5
	antézis (9)	40,1 ^c \pm 17,8	19,6 ^d \pm 9,0	494,9 ^e \pm 249,6	1288,6 ^c \pm 597,9
	korai szem- fejlődés (10)	32,6 ^c \pm 12,1	13,5 ^e \pm 5,2	252,0 ^f \pm 132,8	509,6 ^c \pm 348,8
Plainsman V	kontroll (7)	70,0 ^a \pm 4,8	42,4 ^a \pm 6,2	1421,6 ^a \pm 267,0	8925,1 ^a \pm 3258,5
	meiózis (8)	65,0 ^a \pm 7,2	36,2 ^{ab} \pm 8,1	956,4 ^c \pm 240,7	3743,1 ^b \pm 1503,6
	antézis (9)	74,4 ^a \pm 7,6	30,1 ^{bc} \pm 10,9	927,8 ^{bed} \pm 316,1	2649,4 ^b \pm 868,3
	korai szem- fejlődés (10)	57,3 ^b \pm 7,8	16,1 ^c \pm 5,5	420,5 ^e \pm 166,9	1416,8 ^c \pm 410,2

Az embrió fejlődésére gyakorolt hatások

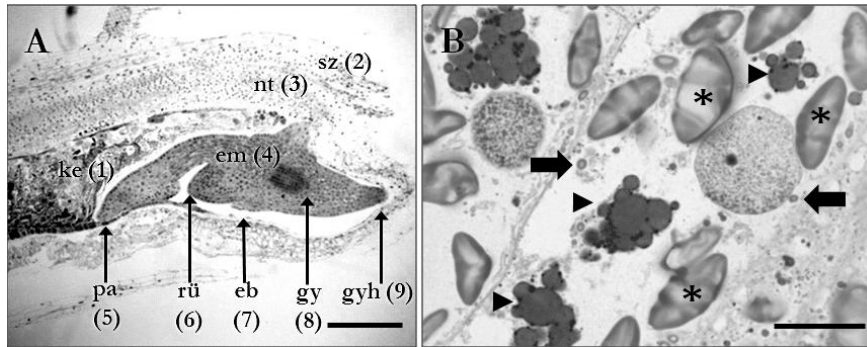
A szemtermésekben fejlődő embriók vizsgálatát fénymikroszkóp segítségével végeztük el (1. A ábra). Az embriófejlődés folyamata eltérő reakciót mutatott a különböző fenofázisban alkalmazott kezelések hatására. A meiózis idején ható stressz a Cappelle Desprez embriók méretbeli növekedésében már a fejlődés korai fázisában (negyedik és ötödik nap) lemaradást okozott és az érett szemtermésekben méretük 12,4%-kal elmaradt a kontrolltól. Ezzel szemben a kezelt Plainsman V embriók mérete a szemtermés fejlődésének kezdetén nem különbözött szignifikáns

mértékben a kontrolltól, és az érett embriók mérete is csupán 4,4%-kal csökkent (3. táblázat).

Az antézis idején a kezelt embriók mérete az első öt nap során mindkét fajtánál átmeneti csökkenést mutatott (3. táblázat). Bár az ötödik napon egyik fajtánál sem figyeltünk meg különbséget a kontroll és a kezelt embriók mérete között, az érett szemtermésekben található embriók mérete 21%-kal (Cappelle Desprez) illetve 12,1%-kal (Plainsman V) maradt el saját kontrolljától (3. táblázat).

A korai szemfejlődés időszakában kezelt embriók mérete meghaladta a kontroll embriókra jellemző értéket (3. táblázat). A különbség mindkét fajta esetében szignifikáns volt a megporzást követő kilencedik és tizenegyedik napok között. Az embriók növekedési intenzitása azonban a későbbi fejlődés során lecsökkent, így a szárazságstressznek kitett növényekben fejlődő embriók végső mérete a Cappelle Despreznél 44,2%-kal, a Plainsman V-nél 25,8%-kal maradt el kontrolljától (3. táblázat).

2. ábra. A megtermékenyítést követő tizenegyedik napon gyűjtött fejlődő búza szemtermésből származó embrió (A) és endospermium szövet (B). Rövidítések: ke: keményítős endospermium, sz: szállítószövet, nt: nucellusz eredetű transzfer sejtek, em: embrió, pa: pajzsocska, ri: rügyecske, eb: epiblaszt, gy: gyököcske, gyh: gyökérhüvely. Csillag: A típusú keményítőszemcse, nyíl: B típusú keményítőszemcse, nyílhegy: proteintestek. Bar: 200 μm (A), 20 μm (B).



Az érett embriók tekintetében a legnagyobb méretcsökkenést mindkét genotípusnál a korai szemfejlődés kori kezelés okozta. A Plainsman V szárazságkezelt embrióiban már a fejlődés hetedik napján elkezdődött a differenciálódás, melynek következtében megkülönböztethetővé vált az embrió hajtáspólusa és a szkutellum. A fajta kontroll embriói valamint a Cappelle Desprez kontroll és kezelt embriói is gömbstádiumúak voltak ebben a korban. Ez utóbbi embrióknál a hajtás, illetve a gyökérpólus a Plainsman V kezelt embrióihoz képest két nappal később, a megporzást követő kilencedik napon vált megkülönböztethetővé. A kezelt embriók mindkét fajtánál a fejlődés kilencedik, tizenkettedik és tizenegyedik napján a kontrollokhoz képest szignifikánsan nagyobbak és differenciáltabbak voltak (3. táblázat), a kezelt Plainsman V embriók differenciáltsága pedig meghaladta a Cappelle Despreznél megfigyeltet: a 14 napos Plainsman V embriók vizsgálata során világosan elkülöníthető volt a rügyhüvely, a levélkezdemények, a mezokotil, a gyökércsúcs és a gyökérhüvely. A keményítőszemcsék jelenléte a tizenegyedik

napon valamennyi embrióra jellemző volt, a szárazságstressz nem volt hatással a szemcsék megjelenési idejére vagy számára.

Az endospermium fejlődését érintő változások

Az endospermium fejlődési folyamataiban a kezelések hatására bekövetkezett változásokat szövettani vizsgálatok segítségével követtük nyomon (1. B ábra). A meiózis idején alkalmazott szárazság egyik fajta esetében sem befolyásolta a fejlődő endospermium szövettani jellemzőit a megporzást követő első 5 nap folyamán. Az embrióközeleli endospermium sejtesedése genotípustól és kezeléstől függetlenül a megporzást követő 3. napon, a perifériás endospermium sejtesedése pedig az 5. napon következett be.

3. táblázat. *A különböző időpontban alkalmazott vízmegvonás hatása a fejlődésben lévő, valamint az érett szemtermésekben található embriók méretére. Az adatok a kezelt szemtermésekből származó embriók méretének a kontrollhoz viszonyított százalékos arányát jelölik.*

Kezelés (1)	Fajta (2)	Az embriók mérete a kontroll arányában (%) (3)					Érett szem (5)
		Megtermékenyítést követő nap (4)					
		1	2	3	4	5	
Meiózis (6)	Cappelle D.	92,7 ns	92,2 ns	89,1 ns	75,3 *	54,4 ***	87,6 **
	Plainsman	92,8 ns	85,7 ns	101,4 ns	98,1 ns	105,6 ns	95,6 ns
	V						
Antézis (7)	Cappelle D.	103,9 ns	91,6 ns	83,9 *	80,9 **	94,7 ns	79,0 ***
	Plainsman	103,8 ns	78,7 *	77,0 **	61,9 **	94,9 ns	87,9 **
	V						
KSZF (8)	Cappelle D.	Megtermékenyítést követő nap (4)					Érett szem (5)
		5	7	9	12	14	
	Cappelle D.	99,3 ns	117,2 ns	193,6 **	119,6 *	130,7 **	57,8 ***
	Plainsman	101,5 ns	130,0 ns	151,7 *	157,9 **	126,5 **	74,2 ***
	V						

*** $p \leq 0,0005$, ** $p \leq 0,005$, * $p \leq 0,05$ valószínűségi szinten szignifikáns; ns nem szignifikáns. KSZF: korai szemfejlődés

A virágzás idején alkalmazott vízmegvonást követően a perifériális endospermium szinciciális magosztódása fajtától és kezeléstől függetlenül azonos ütemben zajlott és a 3. npra bekövetkezett az embrióközeleli endospermium sejtesedése. Az ovulum üregének egy rétegben való kibélelése után a perifériális endospermium sejtfalainak szintézise a kezelt Plainsman V esetében a kontrollt egy nappal megelőzve már a negyedik napon elkezdődött. Ez a folyamat a szárazságstressznek kitett Cappelle Desprez szemtermésekben a kontroll körülmények között kialakuló endospermiummal azonos módon, a megporzás utáni ötödik napon ment végbe. A

perifériás endospermium sejtfalainak szintézisével egy időben elkezdődött a keményítő felhalmozása a raktározó sejtekben.

A korai szemfejlődés idején ható szárazság az endospermium és az aleuron réteg fejlődésére is jelentős hatást gyakorolt. Az embrióközeli endospermium erősen festődő citoplazmával rendelkező sejtjei mindkét genotípusnál a megporzást követő hetedik napig támogatták az embriók fejlődését, majd a 9. naptól kezdődően fokozatosan vakuolizálódtak és degradálódtak. A folyamat a kezelés hatására mindkét fajtánál gyorsabban ment végbe. A kezelt szemtermésekben az aleuron réteg fejlődése is felgyorsult: a tizenkettedik napra az aleuron sejtjeiben található vakuólumok a kontrolltól eltérően már protein mátrixba ágyazott zárványokat is tartalmaztak. A réteg sejtfalai a megporzást követő tizennegyedik napra a kezelt szemtermésekben genotípustól függetlenül nagymértékben megvastagodtak és a sejteket sűrűn elhelyezkedő aleuron szemcsék töltötték ki.

Az embriót és az endospermiumot körülvevő sejtrétegek változásai

Vizsgálataink során a perikarpium és a megtermékenyítést követően létrejött szövetek között elhelyezkedő sejtrétegek, azaz a harántsejtek és a tömlősejtek rétegeinek, a külső és belső integumentum sejtrétegeinek és a nucellusz epidermiszének vízmegvonás hatására bekövetkezett változásait követtük nyomon.

A meiózis illetve az antézis idején alkalmazott szárazság hatására az általunk vizsgált periódusban a fajták között csupán a külső integumentum tekintetében volt eltérés kimutatható. A Plainsman V esetében a külső integumentum két sejtrétege a megtermékenyítést követő harmadik napra összetömörödött és eltűnt. A Cappelle Desprez termőiben ez a folyamat a negyedik napra fejeződött be.

A korai szemfejlődés idején a belső integumentum (a későbbi teszta) belső sejtjében a gyantaszerű komponensek felszaporodása a kezelt Plainsman V növények esetében a kezelt Cappelle Desprez-vel és a kontrollokkal összehasonlítva két nappal korábban, hét napos korban volt megfigyelhető. A nucellusz epidermisze (a majdani hialin réteg) az aleuron réteg megjelenéséig sértetlen maradt. Ez a kontroll növényeknél tizenkét napos, míg kezelt esetben kilenc napos korban következett be. A szemfejlődés tizennegyedik napjára a kezelt Plainsman V szemtermésekben a belső integumentum belső rétegének, valamint a nucellusz epidermiszének sejtfalai az aleuron réteg és a tömlősejtek sejtjei között összenyomódtak és belőlük a teszta és a hialin rétegek jöttek létre. Ebben az időpontban a kezelt Cappelle Desprez szemtermésekben csupán a hialin réteg volt megfigyelhető.

Sztereológiai analízis

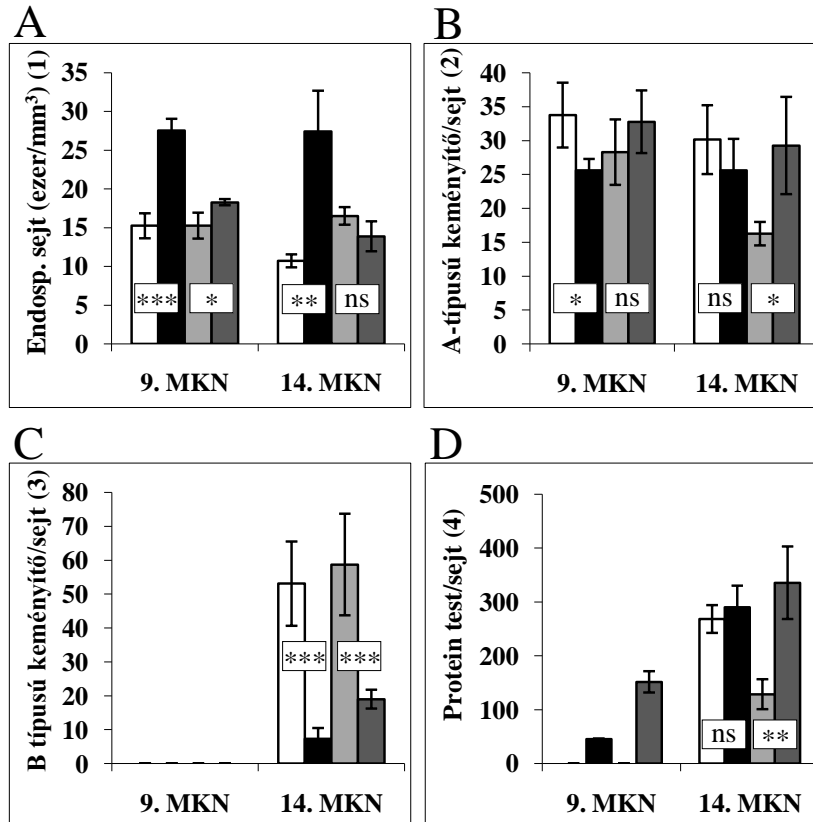
Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az alkalmazott kezelések közül a meiózis és az antézis idején ható szárazság egyik fajta esetében sem váltott ki szignifikáns eltéréseket az általunk vizsgált paraméterek (térfogategységre vonatkoztatott endospermium sejtszám, az A és B típusú keményítőszemcsék száma, a fehérjetestek sejtenkénti száma) tekintetében.

Ezzel szemben a korai szemfejlődés idején szignifikáns különbség volt kimutatható a kontroll és a szárazságkezelt szemtermések sztereológiai jellemzői között. Ennek megfelelően a továbbiakban az ezen kezelés által kiváltott hatások kerülnek

tárgyalásra. A mintavételt a szárazságkezelés végére (9. MKN) valamint az azt követő ötödik napra (14. MKN) időzítettük, annak érdekében, hogy a visszaöntözés hatása is felmérhető legyen.

A Cappelle Desprez esetében a vízmegvonás hatására több mint kétszeres, szignifikáns ($P \leq 0,0005$) emelkedés volt megfigyelhető az egységnyi térfogatra eső endospermium sejtek számára a kezelés végén, tehát a megporzást követő kilencedik napon (9. MKN). Ez a különbség a visszaöntözés ötödik napján (14. MKN) is detektálható volt (2. A ábra).

2. ábra. A korai szemfejlődés idején alkalmazott szárazság hatása az egységnyi térfogatra eső endospermium sejtek számára (A), az A típusú keményítőszemcsék sejtenkénti számára (B), a B típusú keményítőszemcsék sejtenkénti számára (C), valamint a proteintestek sejtenkénti számára (D).



Jelmagyarázat (5)



MKN: megtermékenyítést követő nap; *** $p \leq 0,0005$, ** $p \leq 0,005$, * $p \leq 0,05$ valószínűségi szinten szignifikáns; ns nem szignifikáns

A Cappelle Desprez-ből származó szárazságkezelt szemek endospermiuma a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan ($P \leq 0,05$) kevesebb lencse alakú, A típusú keményítőszemcsét tartalmazott a kezelés végén, ám ez a különbség a visszaöntözést követően (14. MKN) már nem volt szignifikáns (2. B ábra). A Plainsman V kezelt endospermium sejtjeiben az A típusú szemcsék száma a kezelés végén nem különbözött a kontrolltól, azonban az 5 napos visszaöntözés végén már szignifikánsan ($P \leq 0,05$) több szemcsét figyeltünk meg (2. B ábra). A kisebb méretű, gömb alakú B típusú keményítőszemcsék megjelenése a kezelt szemtermések esetében a tizenkettedik, míg a kontrollok esetében a tizennegyedik napra esett. A szárazság hatására a B típusú szemcsék térfogatarányos és sejtenkénti száma mindkét fajtánál szignifikánsan ($P \leq 0,005$) elmaradt a kontrolltól (2. C ábra). Ez a csökkenés az érzékeny fajtánál 86,3%-os, míg a toleránsnál 67,7%-os volt. A szárazságstressz hatására mindkét genotípus endospermiumaiban megnőtt a fehérjetestek mennyisége és mérete (2. D ábra), megjelenésük az endospermium kalazális régiójában pedig a kontrollhoz viszonyítva két nappal korábban, a kilencedik megporzást követő napon következett be. A tizennégy napos szárazságkezelt Plainsman V szemtermések a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan ($P \leq 0,005$) több fehérjetestet tartalmaztak (2. D ábra). Ez a megnövekedett fehérjetartalom a szárazságstresszre érzékeny Cappelle Desprez fajtára nem volt jellemző.

Vizsgálati eredmények értékelése, megvitatása

Eredményeink szerint a búza reproduktív életszakaszában a szárazságstressz hatása fejlődési állapot függőséget mutat. A vízmegvonás termésre, fertilitásra és a szemtermések fejlődésre gyakorolt hatása a meiózis idején volt a legkisebb, a korai szemfejlődés idején pedig a legnagyobb. A meiózis idején alkalmazott kezelés a szemtermések fejlődését lelassította, különösen az érzékeny genotípus esetében. Az antézis időszakában mindkét fajta szemfejlődése átmenetileg lelassult, a fertilitásban és a termés mennyiségében jelentkező csökkenés kifejezettebben jelentkezett.

Kísérleteinkben a korai szemfejlődés idején alkalmazott szárazságstressz megnövelte a szemfejlődés sebességét. Az aleuron réteg, valamint a teszta és a hialin réteg korai megjelenése a kezelt szemtermésekben az érési folyamatok szárazság hatására történő felgyorsulását támasztják alá. Ezzel párhuzamosan más kutatók eredményeihez hasonlóan (*Altenbach et al.* 2003, *Plaut et al.* 2004, *Westgate* 1994) a vízmegvonás mindkét genotípus esetében jelentősen, 10 nappal le is rövidítette a szemtermés érését. Bár a szemfeltöltődés sebességének növekedése önmagában a nagyobb termésmennyiség kialakulását segíthetné elő, a szemfeltöltődési időszak drasztikus lerövidülése és a tíz nappal korábban bekövetkező teljes érés végül a termés csökkenését okozta.

A korai szemfejlődés idején alkalmazott vízmegvonás hatására az általunk elvégzett legkésőbbi mintavétel (14 MKN) az embriók mérete mindkét fajtánál meghaladta a kontrollra jellemző értékeket. Ennek oka, hogy a kezelt szemekben az embriók fejlődése a szemtermés általános fejlődési folyamataihoz hasonlóan felgyorsult, ennek megfelelően nagyobb méretük az előrehaladottabb fejlődési állapot

következménye volt. A vízmegvonás lerövidítette a fejlődés időtartamát, csökkentette a rendelkezésre álló tápanyagok mennyiségét és ezzel végső soron mindhárom kezelés esetén korlátozta az érett embriók méretét.

A szemtermésekben raktározódó keményítő és fehérje mennyisége egyrészt a korai fejlődés során determinálódó endospermium sejtszám (Cochrane és Duffus 1983), másrészt a sejtek végső méretének függvénye, melyet a szemfeltöltődés hossza és sebessége is befolyásol (Egli 1998). A sejtésedést követően az endospermium sejtek mitotikus aktivitása genotípustól függően a nyolcadik-tizenhatodik napig folytatódik (Gao et al. 1992, Gleadow et al. 1982), növelve a szemtermés tápanyag befogadó képességét. Az endospermium sejtek osztódási és növekedési folyamatainak zavartalansága tehát igen jelentős tényező a szemtermés mérete és a termés mennyisége szempontjából. A szárazságra érzékeny Cappelle Desprez endospermium szövetei a korai szemfejlődés kori kezelést követően a kontrollhoz képest adott térfogatra vonatkoztatva szignifikánsan magasabb számú, kisebb méretű raktározó sejtet tartalmaztak. Ez arra utal, hogy a sejtek osztódást követő térfogatnövekedése csupán korlátozott mértékben következett be. A jelenségre magyarázatul szolgálhat a sejtfaalak rigiddé válása, illetve a csökkent víztartalom miatt kialakuló turgor csökkenés is, mely a sejtek kiterjedéses növekedését lehetetlenné teszi. A kisebb méret következtében a sejtek tartalék tápanyag raktározó kapacitása, valamint a szemtermések mérete is korlátozott volt, ami végső soron a termés jelentős mértékű csökkenését idézte elő. A Plainsman V esetében a korai szemfejlődés idején kezelt szemtermések endospermium sejtjei sem méretükben, sem pedig számukban nem tértek el a kontrolltól. A fentiekben vázolt, csupán az érzékeny genotípusra jellemző szövettani eltérések közrejátszhattak abban, hogy a korai szemfejlődés idején a Cappelle Desprez termésnövekedése szignifikáns mértékben meghaladta a toleráns Plainsman V-nél megfigyelt mértéket.

Korábbi szövettani vizsgálatok (Evers 1970, Briarty et al. 1979) igazolták, hogy a B típusú keményítőszemcsék berakódása a fejlődés során csak az endospermium sejtek osztódásainak végleges befejeződését követően indul meg. Megfigyeléseink szerint a kezelt termőkben a B típusú keményítőszemcsék a kontrollhoz képest két nappal korábban jelentek meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a korai szemfejlődés idején a kezelés hatására az endospermium sejtek osztódása mindkét vizsgált genotípusban már a megporzást követő tizenkettedik napon leállt, jelentősen korlátozva ezzel a sejtszámot és így a szemtermések raktározó kapacitását. A termésadatok arról tanúskodnak, hogy a szárazságkezelte növények a visszaöntözés után sem voltak képesek kompenzálni a vízmegvonás által okozott károsodást.

Kísérleteinkben a korai szemfejlődés idején alkalmazott szárazság hatására jelentős, genotípustól függő változásokat figyeltünk meg a fehérjetestek sejtenkénti számában. A két fajta közötti különbséget a kis molekulatömegű glutenin alegységek tekintetében kisebb, ám szignifikáns mértékben Guóth et al. (2009) is kimutatták. A Plainsman V által mutatott fehérje mennyiség emelkedés egybevág Ozturk és Aydin (2004) eredményeivel, akik az alacsony talajnedvesség hatására szintén az endospermium sejtek megnövekedett fehérjetartalmát figyelték meg. A raktározott fehérjék mennyiségének növekedésével összefüggésben állhat az ismert jelenség, miszerint szárazság illetve ozmotikus stressz hatására a levelekben az oldható nitrogén, azaz főként a szabad aminosavak mennyisége megnő (Lanlor és Cornic 2002). A rendelkezésre álló nagyobb mennyiségű aminosav felveti a fehérjék

szemtermésbe való nagyobb mértékű beépítésének lehetőségét is. A szakirodalomból ismert, hogy a szemfeltöltődés idején a fehérjetestekbe beépülő glutenin és gliadin fehérjék mennyisége és összetétele jelentősen befolyásolja a liszt sütőipari tulajdonságait (Shewry *et al.* 2002). Az endospermiumban található keményítőszemcsék közül feltehetően a kisebb, B típusú szemcsék számának van jelentősebb hatása a sütőipari tulajdonságokra (Gan *et al.* 1995). Ennek oka az A típusú szemcsékhez képest jóval nagyobb fajlagos felületük és ezáltal nagyobb vízmegkötő képességük (Park *et al.* 2005). Ez a tulajdonság nagyban hozzájárul a tésztaiban a fehérje-keményítő mátrix felületén található folyamatos folyadékréteg létrejöttéhez, amely meggátolja a gázbuborékok eltávozását és a tészta összeesését. Park *et al.* (2009) szerint a jó sütőipari tulajdonságok feltételeznek egy optimális B típusú keményítőszemcse-tartalmat, azonban ez a paraméter a fehérjetartalom függvényében változó érték. Tehát a B típusú szemcsék és a fehérjék mennyiségének aránya felelős lehet a tészta tulajdonságaiért. A keményítő/fehérje arány minőségre gyakorolt hatását Dai *et al.* (2008) is leírták. Kísérleteinkben ez az arány mindkét fajtánál lecsökkent, hiszen csökkent a B típusú szemcsék mennyisége, ugyanakkor a toleráns Plainsman V esetében a fehérjemennyiség is megemelkedett, tovább csökkentve az arányt. A fajták reakciója tehát összességében hasonló volt, azonban a Plainsman V-nél kifejezettebben jelentkezett. Ezen tényezők sütőipari tulajdonságokra gyakorolt hatásának felmérése a csak minőségvizsgálatokkal válik lehetővé.

Eredményeink arra utalnak, hogy az egyes fajtákban a sejtek és sejtalkotók szintjén megjelenő stresszválaszbeli különbségek a szemek feltöltődését és a termés mennyiségét is befolyásolják.

IRODALOM

- Altenbach, S.B.–DuPont, F.–Kotbari, K.–Chan, R.–Johnson, E.–Lieu, D.: 2003. Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in a US spring wheat. *J Cereal Sci* 37:9–20
- Arnell, N.W.: 1999. Climate change and global water resources. *Global Environ Change* 9:31–49
- Augé, R.M. –Duan, X.–Crocker, J.L.–Witte, W.T.–Green, C.D.: 1998. Foliar dehydration tolerance of twelve deciduous tree species. *J Exp Bot* 49:753–759
- Balla, K. –Bedő, Z. –Veisz, O.: 2006. Effect of heat and drought stress on the photosynthetic processes of wheat. *Cereal Res Commun* 34:381–384
- Barnabás, B.–Jäger, K.–Fehér, A.: 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* 31:11–38
- Bencze, S. –Bamberger, Z. –Janda, T. Balla, K. –Bedő, Z. Veisz, O.: 2011. Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities. *Cent Eur J Biol* 6:376–387
- Blum, A.: 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100:77–83
- Briarty, L.G.–Hughes, C.E.–Evers, A.D.: 1979. The developing endosperm of wheat – A stereological analysis. *Ann Bot* 44:641–658

- Caryl, A.P.–Jones, G.H.–Franklin, C.H.: 2003. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *J Exp Bot* 54: 25–38
- Cochrane, M.P.–Duffus, C.M.: 1983. Endosperm cell number in cultivars of barley differing in grain weight. *Ann Appl Biol* 102:177–181
- Cseuz, L.: 2009. Possibilities and limits of breeding wheat for drought tolerance. (*Triticum aestivum* L.) PhD Thesis. Szent István University, Gödöllő
- Cseuz, L. –Pauk, J.– Kertész, Z. –Matusz, J.– Fónad, P. –Tari, I. –Erdei, L.: 2002. Wheat breeding for tolerance to drought stress at the Cereal Research Non-Profit Company. *Acta Biol. Szeged* 46.3-4:25-26
- Curtis, B.C.: 2002. Wheat in the world. [In: Curtis BC, Rajaram S, Macpherson HG (szerk.) Bread wheat. Improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series, No. 30. Rome, 2002.]
- Dai, Z.M.–Yin, Y.P.–Zhan, M.–Li, W.Y.–Yan, S.H.–Cai, R.G.–Wang, Z.L.: 2008. Distribution of starch granule size in grains of wheat grown under irrigated and rainfed conditions. *Acta Agron Sin* 34:795–802
- Egli, D.: 1998. Seed biology and the yield of grain crops. CAB International, New York
- Evers, A.D.: 1970. Development of the endosperm of wheat. *Ann Bot* 34:547–555
- Galiba, G.–Simon-Sarkadi, L.–Salgo, A.–Kocsy G.: 1989. Genotype dependent adaptation of wheat varieties to water stress *in vitro*. *J Plant Physiol* 134. 6:730–735
- Gan, Z.–Ellis, P.R.–Schofield, J.D.: 1995. Mini review. Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *J Cereal Sci* 21:215–230
- Gao, X.–Francis, D.–Ormrod, J.C.–Bennett, M.D.: 1992. Changes in cell number and cell division activity during endosperm development in allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. *J Exp Bot* 43:1603–1609
- Gleadon, R.M.–Dalling, M.J.–Halloran, G.M.: 1982. Variation in endosperm characteristics and nitrogen contents in six wheat lines. *Aust J Bot* 9:539–551
- Guóth, A.–Tari, I.–Gallé, Á.–Csiszár, J.–Pécsvárad, A.–Cseuz, L.–Erdei, L.: 2009. Comparison of the drought stress response of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *J Plant Growth Regul* 28:167–176
- Jamieson, P.D.–Martin, R.J.–Francis, G.S.: 1995. Drought influences on grain yield of barley, wheat, and maize. *NZ J Crop Hort Sci* 23:55–66
- Khanna-Chopra, R.–Selote, D.S.: 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environ Exper Bot* 60:276–283
- Lalonde, S.–Beebe, D.U.–Saini, H.S.: 1997. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sex Plant Reprod* 10:40–48
- Lawlor, D.W.–Cornic, G.: 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275–29
- Oz̧turk, A.–Aydın, F.: 2004. Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. *J Agron Crop Sci* 190:93–99

- Park, S.H.–Chung, O.K.–Seib, P.A.*: 2005. Effects of varying weight ratios of large and small wheat starch granules on experimental straight-dough bread. *Cereal Chem* 82:166–172
- Park, S.H.–Wilson, J.D.–Seabourn, B.W.*: 2009. Starch granule size distribution of hard red winter and hard red spring wheat: Its effects on mixing and breadmaking quality. *J Cereal Sci* 49:98–105
- Plaut, Z.–Buton, B.J.–Blumenthal, C.S.–Wrigley, C.W.*: 2004. Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post anthesis water deficit and elevated temperature. *Field Crop Res* 86:185–198
- Shewry, P.R.–Halford, N.G.–Belton, P.S.–Tatham, A.S.*: 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:133–142
- Spurr, A.R.*: 1969. A low viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43
- Tischner, T.–Kószegi, B.–Veisz, O.*: 1997. Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron Hung* 45:85–104
- Weibel, E.R.–Gomez, D.M.*: 1962. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 17:343–348
- Westgate, M.E.*: 1994. Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. *Crop Sci* 34:76–83

A szerzők levelezési címe

Fábián Attila – Jäger Katalin – Barnabás Beáta

MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet
Martonvásár
Brunszvik u. 2.
H-2462

Email: fabian.attila@agrar.mta.hu