

DEBRECENI EGYETEM
Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma
Mezőgazdaságtudományi Kar
Földhasznosítási, Műszaki és Területfejlesztési Intézet

INTERDISZCIPLINÁRIS AGRÁR- ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:
Prof. dr. Nagy János
MTA doktora

Témavezetők:
Prof. dr. Barnabás Beáta
MTA levelező tagja
Prof. dr. Nagy János
MTA doktora

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***IN VIVO, IN VITRO* KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
FŐBB TERMESZTETT NÖVÉNYEINK IVAROS NEMZEDÉKÉNEK
FEJLŐDÉSÉRE**

Készítette:
Timár Ilona
doktorjelölt

Debrecen
2007

1. A KUTATÁS CÉLKITÚZÉSEI

Hazánkban a mezőgazdasági növények termésbiztonságát nagymértékben befolyásolják a különböző biotikus és abiotikus környezeti tényezők. A termésbiztonság az egyik fő alappillére a termesztés gazdaságosságának, amely a mezőgazdaságilag fontos növényfajoknál a vetőmagtermesztésben is jelentős célkitűzés. A vetőmagtermesztés közvetlen kapcsolatban áll a virágzásbiológiával, mint alaptudománnyal. A zárvatermő növények ivaros szaporodása, egyedfejlődése az ivarsejtek fúzióján alapul, az új sporofiton nemzedék életciklusa a kettős megtermékenyítéssel kezdődik. Ezért a szaporodásbiológiával kapcsolatos kérdések közvetlenül érintik a vetőmagtermesztés alapjait, kiemelt kutatási területnek számítanak. Fontos gazdasági növényeink genetikai diverzitásának növelése a növénynemesítési kutatások egyik alapvető célja, melynek megvalósítására a hagyományos genetikai, embriológiai módszerek és az *in vitro* manipulációs technikák együttes alkalmazása nagy esélyt ad.

A változó környezeti hatásoknak, pl. extrém időjárási változásoknak kitett növények egyedfejlődésük generatív szakaszában igen érzékenyen reagálnak elsősorban terméseszköken a különböző abiotikus stresszhatásokra. Ezért célszerű megvizsgálni, és részletesen megismerni azokat a kritikus fázisokat a hím és női gametofiton fejlődésében, melyek a legsérülékenyebbek, ezáltal nem kívánt termés kiesés következhet be.

A környezeti hatások laboratóriumi körülmények között célirányosan is tervezhetők (pl. mesterséges növénynevelési technikák igénybevétele). Az un. *in vitro* környezet lehetőséget teremt az egyedfejlődési, differenciálódási folyamatok jobb nyomonkövetésére és a különböző környezeti tényezők hatásának direkt vizsgálatára.

A növényi szervezetbe vagy az abból származó, *in vitro* tenyésztett sejtekbe történő beavatkozások akkor lehetnek eredményesek, ha azokat célirányosan, az egyedfejlődés, ill. a növényi sejtciklus megfelelő fázisaiban hajtjuk végre.

A növényi ivaros folyamatokról rendelkezésünkre álló ismeretek alapvető információként szolgálnak napjainkban a kísérletes szaporodásbiológia egyik fontos területét képező *in vitro* fertilizációs kutatásokhoz is. Izolált hímivarsejtek és petesejtek összeolvasztásával életképes utód hozható létre és ez elvileg lehetővé teszi hibridek előállítását is a búza és rokon fajai között, a protoplasztfúzióhoz hasonló gametoplaszt-fúzióval.

A fajok közötti *in vitro* ivarsejtfúzió megvalósításához részletes információra van szükség az egyes *Triticum* fajok pollen- és embriózsák fejlődési folyamatairól természetes körülmények között *in situ*, valamint *in vitro*.

Napjainkban a nemesítési gyakorlat részéről nagy igény van életerős dihaploid, antéra illetve mikrospóra kultúrából származó dihaploid vonalak előállítására a nemesítés genetikai bázisának kiszélesítése és a vonalelőállítás idejének lerövidítése érdekében. A Martonvásáron létrehozott génbankban a magas androgenetikus kapacitású exotikus kukoricák genotípusai használhatók genetikai forrásként. A magas indukciós képességet mutató genotípusok antérakultúrájában számos

mikrospóra eredetű struktúra formálódik, amelyeknek csupán egy része képes fertilis növénné fejlődni. A zigotikus, illetve androgenetikus embriogenezis, valamint a kallogenezis tanulmányozását célzó összehasonlító morfológiai vizsgálatokkal kívánjuk feltárni az *in vitro* környezetben lejátszódó folyamatok jellemző sajátosságait, így növelve a haploidindukció hatékonyságát, melynek köszönhetően lehetővé válik a módszer gyakorlati alkalmazása.

A hazai minőségi bortermelésünk világpiacra elfoglalt rangos helye indokolja a szőlővel végzett kutatások jelentőségét. A kutatások vizsgálati eredményei olyan - a szőlőben új – biotechnikai módszerek kidolgozásához nyújtanak alapokat, melyek segítségével a szőlőnemesítés, elsősorban a rezisztenciára történő nemesítés rövidebbé és hatékonyabbá tehető. A két borszőlő genotípuson végzett vizsgálataink a szőlő hím és női gametofitonjának tanulmányozására irányultak.

Kutatási céljainkat a következőkben foglaltuk össze:

- Különböző genomösszetételű és eltérő ploidszintű *Triticum* fajok hím és női gametofitonja differenciálódásának nyomonkövetése *in vivo* és *in vitro* környezeti körülmények között.
- A búza hím és női gametofiton fejlődési szinkronviszonyának feltárása. Ennek ismeretében egy közvetett vizsgálati módszer segítségével a búza női gametofiton fejlődési fázisának meghatározása.
- A búza petesejt *in planta* fejlődésének tanulmányozása az embriózsák érése során.
- Az izolált búza petesejt morfológiai és funkcionális jellemzése a fiatal állapottól az öregedésig fény és elektronmikroszkópos vizsgálattal.
- A *Triticum* fajok *in planta* fejlődött fiatal embrióinak jellemzése térfogatuk alakulása, morfológiai sajátosságai alapján. Az eredmények segítséget nyújtanak az *in vitro* fertilizáció során mesterségesen létrehozott interspecifikus, intergenerikus embriók tanulmányozásához.
- A hidegkezelést kapott kukorica mikrospóra embriogenezisének tanulmányozása fény és elektronmikroszkóp segítségével.
- A szőlővirág fejlődésdinamikájának megismerése, a hím és a női gametofiton fejlődési állapotának meghatározása, jellemzése.

2. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

A virágzás és virágzásbiológiával foglalkozó kutatás gyökerei évtizedekkel korábbi időkre nyúlnak vissza intézetünkben. A hibrid növényfajták előállításával számos növényfajnál kiugró terméseredményeket értek el. A nagy terméseket adó hibridbúzák előállításának igénye inspirálta a búza virágzásbiológiájának intenzív kutatását.

A vizsgálatok során összefüggéseket kerestek a különböző életkorú bibe megporzásakor létrejött megtermékenyülés és a magkötési százalék, valamint a magkötés során kapott búzaszemek átlagos tömegének változása között (Rajki-Cicer 1961b). Az *in vivo* körülmények között végzett

makromorfológiai megfigyeléseken alapult eredmények később bővültek a fénymikroszkópos szövettani ismeretekkel. A termő korának hatását vizsgálták a fejlődő búzaszemek struktúrájának alakulására (Molnár-Láng, M., Rajki-Cicer, E. 1983).

Intézetünk fitotronjában 1972-től széleskörű lehetőség nyílt a korábbi eredményes virágzásbiológiai kutatások folytatásaként egzakt, megismételhető, kontrollált *in vivo*, *in vitro* körülmények között a hím ivaros nemzedékkel, a pollennel kapcsolatos kutatások megvalósítására. A pollen életképességével foglalkozó kutatómunkát a növénynemesítési és korszerű genetikai kutatások részéről felmerült igények gyorsították fel. A mélyhűtéses pollentartósítási módszer kidolgozásával (Barnabás, B., Rajki, E. 1976.) a dehidratált állapotú kukorica, rozs és tritikálé pollen hosszú ideig tartósítható cseppfolyós nitrogénben, -196°C hőmérsékleten. A tartósított funkcióképes pollen felhasználásával megvalósítható a különböző időpontokban, vagy egymástól távol eső helyeken virágzó egyedek keresztezése, valamint a genetikai alapanyagok nemzetközi cseréje a Martonvásáron létesített pollenbankon keresztül.

A pollen-biotechnológiai vizsgálatok anyaga a kukorica (*Zea mays* L.) és a búza (*Triticum aestivum* L.) volt. A portoktenyésztési kísérletekben a pollenkallusz-indukciót vizsgálták. A kukorica és búza haploid kalluszokból illetve embrioidokból sikeresen növényeket regeneráltak.

A technikai fejlődés a nagyobb felbontóképességű mikroszkópok, elektronmikroszkóp segítette a növényi ivarsejtek *in planta* és *in vitro* körülmények közötti tanulmányozását, citológiai és ultrastrukturális megismerését. Az izolált ivarsejtek fúziója, az *in vitro* fertilizációs technika alkalmazásával és a petesejtekbe történő injektálás, mikromanipulációk módszerével a búza genetikai transzformációját teszi lehetővé.

3. A KUTATÁS MÓDSZEREI

A kísérleteket, vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézetében, Martonvásáron végeztük között. Az együttműködésben végzett munkák:

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő, búza elektronmikroszkópia;

ELTE Növényismereti Tanszék, Budapest, búza embriózsák LSM vizsgálat;

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental de Zaidín, CSIC. Granada, Spain, kukorica mikrspóra embriogenezis fény- és elektronmikroszkópia;

FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger, szőlővirág mintavétel, pollen fénymikroszkópia.

A vizsgálatokban felhasznált növények

- Az eltérő genomösszetételű és ploidisztű búza hím és női gametofiton *in planta* és *in vitro* fejlődésének összehasonlító vizsgálatához az alábbi *Triticum* fajokat használtuk:

Triticum aestivum L. cv. Mv 15 (AABBDD) ($2n=6x=42$)

Triticum araraticum Jakubz. (AAGG) ($2n=4x=28$)

Triticum monococcum L. (AA) ($2n=2x=14$).

- A búza petesejt finom szerkezetét, méretváltozásait és morfológiai sajátosságait a Siete Cerros és a Chinese Spring tavaszi búzafajtákon tanulmányoztuk.
- Az érett pollenszemek méreteinek analíziséhez a Chinese Spring tavaszi búzafajtát használtuk.
- Az eltérő ploidisztű búzafajok embriófejlődésének összehasonlítását a *Triticum aestivum* L. cv. Mv 15 (AABBDD) ($2n=6x=42$), *Triticum araraticum* Jakubz. (AAGG) ($2n=4x=28$), *Triticum monococcum* L. (AA) ($2n=2x=14$), növényeken végeztük.
- A kukorica *in vitro* androgenezis folyamatát a nagy haploidindukciós gyakoriságot mutató DH 109 x ZK191/a hibrid antéráinak felhasználásával vizsgáltuk.
- A szőlővirág fejlődésdinamikájának jellemzéséhez, strukturális, morfológiai vizsgálataihoz az alábbi genotípusokat használtuk:
Muscadinia rotundifolia Planch. x *Vitis vinifera* L. BC₃,
Leányka.

A kísérleti növények nevelési körülményei

- Szabadföldön:

a kísérleti növények közül a búza és a szőlő növényeket neveltük fel.

A búza hím és női gametofiton *in vivo* és *in vitro* fejlődésének összehasonlító vizsgálatához a növényeket szántóföldi kispácellás körülmények között neveltük fel. A növények egy részéből a főkalászokat - amikor a hím gametofiton Mu (középső egymagvas) fejlődési állapotú volt - *in vitro* kalászkakultúrában neveltük tovább, virágzásig.

A két szőlő genotípus virágait az FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger kölyuktetői szabadföldi fajtagyűjteményében nevelt növényekből szedték.

- Fitotronban:

a búza petesejtek excizálásához, az érett pollen méretének- a fiatal embriók- és a kukorica androgenezis vizsgálatához a növényeket fitotronban, kontrollált környezeti körülmények között neveltük fel.

Vizsgálatok

- Búza pollen és embriózsák *in vivo* és *in vitro* fejlődésének vizsgálata

Három eltérő ploidisztű és genomösszetételű búzafaj fejlődését kívántuk összehasonlítani vizsgálataink során, melyeket eltérő környezetben neveltünk fel. A búza hím és női ivaros nemzedék *in vivo* és *in vitro* fejlődésének nyomonkövetésére fajonként 20-20 azonos fejlettségi állapotú főkalászt használtunk. A főkalászokat celofán zacskóval izoláltuk. A kalászok középső harmadából származó antérából meghatároztuk a mikrospóra fejlettségi állapotát.

A mikrospóra-fejlődés középső 1-sejtmagvas (Mid uninucleate = Mu) állapotától kezdődően, naponként 5-5 antérát és 10-10 termőt vettünk ki, a 3-sejtes pollen kialakulását jelentő antézis bekövetkeztéig. Az antérákat a mikrospóra-fejlettségi állapot detektálására fixáló oldatban (abszolút alkohol és jégecet 3:1 arányú keverékében), a termőket 0,1M foszfátpufferrel készített, 2,5%-os glutáraldehid-oldatban fixáltuk mikrotechnikai vizsgálatok céljából.

Az antéra mintavétel és a mikrospóra fejlettségi állapot meghatározása párhuzamosan történt a női gametofitonéval. Az antérákat, ill. a mikrospórákat a fixálás után a vizsgálat jellegéből adódóan a preparátum festési eljárásával, beágyazás nélkül is vizsgálni tudtuk, a pollenszem fejlettségi állapotát meghatároztuk és megmértük az átmérőjét. A három búzafaj pollenjének méretbeli alakulását jellemző adatokat statisztikai módszerrel, varianciaanalízissel elemeztük, értékeltük.

Az embriózsák kialakulását a Spurr-gyantába beágyazott termőkből (fajonként és mintavételenként 10-10 termő) ultramikrotechnikai eljárásokkal készített és 0,5% toluidinkékkel megfestett (O'Brien et al. 1981) félvékony (1,5µm-es) hosszmetseteken tanulmányoztuk Zeiss Ultraphot-III típusú fénymikroszkóppal. A különböző fejlettségű termők hosszirányú sorozatmetsetein kikerestük az ovulumok belsejében elhelyezkedő embriózsákok legnagyobb kiterjedésű metsetét, és okulár mikrométer segítségével meghatároztuk az embriózsákok hosszúsági és szélességi adatait. Az adatok alapján (COREL DRAW számítógépprogram segítségével) az embriózsák alak- és térfogatváltozását tükröző sematikus ábrákat szerkesztettünk.

- Az embriózsák lézer scanning mikroszkópos vizsgálata

A fixált, víztelenített búzatermőket (Mv 15) Polietilén glikolba ágyaztuk (PEG 1500). A dermedést követően a mintákból Reichert (acélkéses) mikrotómmal 10-40µm vastagságú metseteket készítettünk. A metseteket akridinnarancs (SIGMA, c.i. 46005) mikroszinezéssel (1µl/ml) megfestettük.

- A hím és a női gametofiton egymáshoz viszonyított fejlődésének vizsgálata

Vizsgálataink kiterjedtek a különböző ploidszintű búzafajok hím és női gametofiton egymáshoz viszonyított fejlődésének megfigyelésére. Összesen nyolc mintavételi alkalmat és hat, illetve öt fejlődési fázist vettünk alapul.

A hím gametofiton megfigyelt fejlődési stádiumai:

Mu (mid-uninucleate), középső 1 magvas állapot

Lu (late uninucleate), késői 1 magvas állapot

Pm (premitotic) osztódás előtti állapot

eBn (early binucleate) korai kétmagvas állapot

Bc (bicellular) kétsejtes állapot

Tc (tricellular) érett háromsejtes állapot

A női gametofiton megfigyelt fejlődési stádiumai:

tetrád állapot
makrospóra állapot
kétmagvas állapot
négymagvas állapot
hétsejtes (8 magvas) állapot

Ezek a megfigyelések fontos információt adnak arra vonatkozóan, hogyan szervezzük a növénynevelést és hangoljuk össze az ivarsejt izolálási tevékenységet a sikeres *in vitro* ivarsejt fúzióhoz.

A szőlővirág fejlődésdinamikájának strukturális, növényanatómiai, morfológiai, szövettani vizsgálatát a növényekről szedett 5-5 virágmintán végeztük.

A szőlőpollen fejlődési állapotok

A portokokat feltárva preparátumot készítettünk, megfestettük a benne lévő mikrospórákat. A mikrospórák megfestésére az Alexander féle eljárást alkalmaztuk (Alexander 1969). Mindkét genotípusban az alábbi fejlődési állapotokban történt a mintavétel:

1. PMC (pollenanyasejt),
2. Tetrád,
3. Korai egymagvas: szabálytalan forma, vékony, halványzöldes festődésű pollenfal, sejtmag nem látható,
4. Középső egymagvas: rögbilabda formájú mikrospóra, vastag, sötétzölden festődő pollenfal, a sejtmag halvány, a mikrospóra középpontjában található,
5. Késői egymagvas: kerekded forma, egyre sötétebben festődő citoplazma, a sejtmag az erősen festődő nukleólusszal a mikrospóra egyik pólusa felé vándorol, míg az ellenkezőn egy vakuólum alakul ki,
6. Korai kétmagvas: a citoplazma olyan sötét, hogy a sejtmagok csak nehezen fedezhetők fel, az egyik sejtmag egy lencseszerű lefűződésben található,
7. Érett pollen: a citoplazma egyenletes sötétlila festődésű, sejtmagok egyáltalán nem láthatók, sötétzöld pollenfal.

A szőlőtermő vizsgálata

A pollen fejlődési állapotának meghatározása után kiválasztottuk azt az 5-5 virágot, amelyben tetrád, középső egymagvas és késői egymagvas/kétmagvas átmeneti állapotú mikrospórák találhatók. Ezen virágok termőit (genotípusonként 15 minta) ágyasztuk be műgyantába félvékony metszetek készítésére.

- Búza embrió vizsgálatok

A hét sejtes (8 magvas) embriózsákot a kéthetes embrióval és az érett embrióval vetettük össze.

A fitotronban, Conviron PGV típusú növénynevelő kamrában t2 tavaszi klímaprogramon (Tischner et al. 1997) nevelt három *Triticum* faj (*T. aestivum*, *T. araraticum*, *T. monococcum*) növények izolált kalászaiból 3-3 kalászt kasztráltunk. A kalászokat mesterségesen megporozva, pörgetéssel módszerrel megtermékenyítettük.

A megporzást, megtermékenyítést követően a 14. napon a kéthetes magkezdeményeket 2,5%-os glutáraldehid oldatban fixáltuk. Az embriókat sztereomikroszkóp alatt (Zeiss Stemi 2000-C típus) kiemeltük, hosszúsági és szélességi kiterjedését a mikroszkóp okulár mikrométere segítségével meghatároztuk. A kéthetes embriókról morfológiai összehasonlítás céljából fotókat készítettünk Zeiss EM910 elektronmikroszkóp segítségével SEM üzemmódban.

A három *Triticum* faj érett szemterméseit 48 órán át, desztillált vízben, szobahőmérsékleten duzzasztottuk. A megduzzadt szemek terméshéját felhasítva az érett embriót sztereomikroszkóp alatt kiemeltük, megmértük. A kapott adatokat táblázatba foglaltuk.

- Petesejt vizsgálatok

In planta petesejtek

A három *Triticum* fajnál a petesejt méretbeli fejlődését vizsgáltuk. A termőkből készült metszetek közül azokat válogattuk ki, amelyeken meghatározhattuk az embriózsák mikropile felőli végén elhelyezkedő petesejt legnagyobb átmérőjét. Az *in planta* petesejtek adatait táblázatba foglaltuk, az egyes fejlődési állapotokat lefotóztuk. Így információt kaptunk, hogy miként érheti el a petesejt a funkcionális érettség állapotát.

Excizált petesejtek

A hexaploid Siete Cerros és Chinese Spring tavaszi búzafajtákból steril, kontrollált körülmények mellett történt a petesejtek excizálása.

A kasztrált virágokból az ováriumok ill. a petesejtek excizálása meghatározott időpontban 3 naponként (a kasztrálás után 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 napos állapotban) mikrosebészeti eljárással, (Kovács et al. 1994) ZEISS STEMI 2000C típusú binokuláris mikroszkóp használatával történt. Az egyes izolált petesejteket (Pónya et al. 1999), WPI A203XVZ típusú nanoliter-injektor segítségével vittük át 5 mikroliteres mikrocseppekbe. Az ivarsejteket alacsony olvadáspontú agaróz gélbe (SIGMA, op= 30°C, fp= 65°C, No. A-9414) ágyaztuk. A petesejteket tartalmazó megszilárdult agarózcseppeket 2,5% glutáraldehidet tartalmazó 0,2 M-os Na-kakodilát ((CH₃)₂As(O)ONa x 4H₂O) pufferben (pH 6,9) fixáltuk. Az alakjukat megőrző, morfológiailag ép sejtek és sejtmagok átmérőjét megmértük okulármikrométer segítségével. A petesejteket műgyantába ágyaztuk fénymikroszkópos- és TEM vizsgálatokhoz.

- A búza érett pollenjének vizsgálata

A Chinese Spring három-sejtes érett pollenjének vizsgálatakor az érett pollent tartalmazó portokokat feltártuk. Öt portokból, portokonként 10-10 pollent választottunk ki a mikroszkópi látómezőben). A preparátum készítésekor a tárgylemezen lévő megfestett (karmin ecetsav 1%), lefedett pollenszemeket láng felett melegítve derítettük a felhalmozódott keményítőtartalom miatt. ZEISS Ultraphot-III típusú fénymikroszkóp okulár mikrométerével megmértük az érett pollenben levő (két) generatív és vegetatív sejtet. Adatokat gyűjtöttünk a méreteikről és az adatokat táblázatban megjelenítettük, elemeztük.

- Portoktenyészetek

Minimum 15 db kukorica portokot gyűjtöttünk össze véletlenszerűen a Petri-csészéből 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 17 nappal a sejtenyésztésbe vonás kezdetét követően és ezeket később a fény, ill. a TEM-os előkészítési eljárásnak vetettük alá. Az antérákat 4°C-on, egy éjszaka fixáltuk 4%-os paraformaldehid, 0,1%-os glutáraldehid, 0,1 mol/l Na-kakodilát puffert (pH 7,2) tartalmazó oldatban. A fixált mintákat beágyasztuk Unicryl gyantába, majd metszeteket készítettünk.

- Ubiquitin immunolokalizáció

A kukorica portok félvékony metszeteit, 3-aminopropil-triethoxi-szilán bevonatú tárgylemezre tettük. Ezeket a tárgylemezeket rendre TBS-be (10mM/l Tris, 115mM/l Na Cl, pH 7,4) helyeztük (10 perc szobahőmérséklet), majd 1 órára (szobahőmérséklet) az un. blokkoló oldatba 2% BSA TBS, ezt követően nyúl polyclonális anti-ubiquitin antiszérumot adtunk hozzá (Sigma, St. Luis, MI, USA) ezt 1:10 arányban kevertük a blokkoló oldattal (4°C egy éjszakán át) valamint TBS-be helyeztük (3x20 perc szobahőmérsékleten), az anti-nyúl IgG (Fe) – bázikus foszfatáz konjugátummal inkubáltuk (Promega Coop., Madison, WI, USA) ezt 1:200 arányban hígítottuk, 4°C-on 4 órán keresztül TBS (3x20 perc szobahőmérsékleten), a detekciós puffer: Tris-HCL 100mmol/l pH 9.5, NaCl 100mmol/l, Mg Cl₂ 5mmol/l, levasimole 1mmol/l volt (20 perc szobahőmérsékleten), és végül NBT/BCIP szubsztrátumot adtunk hozzá (Armesco Inc., Solon, OH. USA) (5 óra szobahőmérsékleten sötétben). A kontroll lemezek pedig az antiubiquitin antitest hozzáadása nélkül készültek.

Szöveti vizsgálatok

- Beágyazások

A búzatermőknél kétféle beágyazást alkalmaztunk: Spurr-gyantás (AGAR SIENTIFIC LTD, U.K. R1032) Spurr (1969) és Polietilén glikolos (PEG 1500).

Unicryl gyantás beágyazás

A puffer oldatban kimosott kukorica portok mintákat, víztelenítettük etanol sorozatban. A dehidratációt követően a hőmérsékletet fokozatosan csökkentettük –25°C-ig, ami megfelel az Unicryl gyanta (BB International, Cardiff, UK) beágyazási eljárások előírásainak. A polimerizációt –25°C-on három napon keresztül UV megvilágítás mellett végeztük.

Agarózos beágyazás

A búza kéthetes magkezdeményeiből kinyert embriókat tárgylemezre tett, 1:1 arányú LMP (SIGMA, op=30 °C, fp=65 °C, No. A-9414) agaróz-glükóz cseppbe helyeztük, a félig megszilárdult anyagot egy zárócseppel szendvicsszerűen lefedtük. A teljesen megszilárdult agarózból zsilett pengével blokkot metszettünk ki, melynek a közepében beágyazva helyezkedett el az embrió. A további vizsgálatig (SEM) glutáraldehid 2,5%-os oldatában tároltuk.

• Metszés

A búzatermőket és az izolált petesejteket tartalmazó műgyanta blokkokat Reichert-Jung ULTRACUT E 701704 típusú mikrotom segítségével, üveggéssel és gyémántkéssel metsztük meg. A félvékony (1-2 μm) metszetek 0,5% toluidinkékkel megfestettük. A vizsgálatot, fotódokumentációt OPTON ULTRAPHOT III típusú mikroszkóppal végeztük. A polimerizálódott petesejteket fáziskontraszt mikroszkóp alatt azonosítottuk és az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz (TEM) gyémántkéssel ultramikrotommal ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk.

A PEG-be ágyazott búzatermőkből a Reichert (acélkéses) mikrotommal 10-40 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket akridinnarancs (SIGMA c.i.46005) mikroszinezéssel (1 $\mu\text{l/ml}$) megfestettük, LSM vizsgálathoz.

Az Unicrylbe ágyazott kukorica portokokból félvékony, 1 μm vastag metszeteket készítettünk Reichert-Jung ultramikrotommal, majd ezeket 0,5%-os metilénkékkel, valamint 0,5%-os toluidin kékkel festettük meg, a megfestett metszeteket 1%-os bórsavban tartottuk 10 percen keresztül. Ezt követően Zeiss Axioplan fotómikroszkóppal vizsgáltuk. Az ultravékony metszeteket (70 nm vastagság) ugyanezzel a mikrotommal készítettük, melyeket 300-mesh nikkel gridekre tettük, valamint uranilacetáttal, ólom-citráttal festettük meg. Megfigyeléseinket Zeiss EM 10C/CR transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük 60KV-on.

• Fénymikroszkópos vizsgálat

A megfestett mikrospórákat és a félvékony, 1-2 μm vastagságú metszeteket vizsgáltuk OPTON ULTRAPHOT III típusú, valamint Zeiss Axioplan fénymikroszkóppal

• TEM vizsgálat

Az ultravékony metszeteket fém gridekre helyeztük és uranilacetáttal, ólom-citráttal kontrasztosítottuk (Venable et al. 1965), Zeiss EM10C/CR valamint Zeiss EM910 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

• SEM vizsgálat

A fiatal búza embriók hosszúsági és szélességi kiterjedését a mikroszkóp okulár mikrométere segítségével meghatároztuk. A formvar bevonatú egylyukú gridekre helyezett embriókat

szénbevonattal láttuk el, uranilacetattal megfestettük, és Zeiss EM910 típusú elektronmikroszkóppal 60 kV-on vizsgáltuk.

A kéthetes embriókról morfológiai összehasonlítás céljából fotókat készítettünk elektronmikroszkóp segítségével SEM üzemmódban.

Alkalmazott matematikai módszerek

A szignifikancia szinteket egytényezős véletlen blokk varianciaanalízissel és többtényezős ANOVA varianciaanalízissel számítottuk ki.

A búza embriózsák adataiból a COREL DRAW számítógépes grafikai program segítségével az embriózsák alak- és térfogatváltozását tükröző sematikus ábrákat szerkesztettünk. Az embriózsák és az embrió térfogatot a $\frac{4}{3}\pi \cdot r^2 \cdot R$ képlet alapján számoltuk.

4. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A gabonafélék közül három, eltérő ploid szintű és genom összetételű búza faj (*T. aestivum* cv Mv 15, *T. araraticum* és a *T. monococcum*) hím és női gametofitonjának *in vivo* és *in vitro* fejlődését követtük nyomon a meiózistól az érett pollen és embriózsák kialakulásáig.

A hím gametofitonok differenciálódási dinamikájában nagy eltérések nem adódtak a különböző ploid szintből eredően a háromsejtes fejlődési állapotig. A haploid hím gametofiton fejlődésbeli különbsége az érett pollen kiszóródásakor jelentkezett a leggyorsabb fejlődésű hexaploid fajtánál. A mikrospórák fejlődése lassúbb volt az *in vitro* környezetben, az egymagvas fejlődési állapot egy kicsit hosszabb periódusúnak bizonyult az első pollen mitózis alatt a kontrollhoz viszonyítva. A genotípusból adódóan lényeges különbség nem mutatkozott az *in vitro* pollenfejlődésben. Mind az *in vitro*, mind az *in vivo* környezetben az egymagvas mikrospórából a hárommagvas funkcionális pollenné fejlődés egy héten belül megtörtént. Eltérés volt azonban a különböző fejlődési állapotok hosszában az *in vitro* és a természetes körülmények között.

A hím gametofiton fejlődését *in vivo* és *in vitro* három fejlődési stádiumban – Mu (középső 1 magvas), Bn (2 magvas), Tc (3 sejtes), - a pollenszemek átmérője alapján vizsgáltuk. A varianciaanalízis eredménye szerint a *Triticum* fajok vonatkozásában megbízhatóak a különbségek $p=0,1\%$ -os szinten. Eltérést egy esetben $p=0,5\%$ -os szinten kaptunk és két esetben nem volt szignifikáns különbség, bármely két kombináció összehasonlításával.

2. Az *in vitro* kalászkultúrákban az embriózsákok fejlődése megegyezett az *in vivo* kontrollal, mindhárom faj esetében különbség a méretbeli növekedésben tapasztalható. A hexaploid faj embriózsákja szignifikánsan nagyobb méretű a másik két fajtánál. A női gametofitonok maximális kiterjedésüket a hím gametofitonok érése előtt már két-három nappal elérték. A differenciálódás dinamikájára a ploid szint volt hatással, a tetraploid és a diploid faj 7-sejtes női gametofitonjának differenciálódásához egy nappal hosszabb időre volt szükség, mint a hexaploid faj esetében.

3. A hétsejtes női gametofiton fejlődése gyorsabb, mint a hím gametofitoné. A vizsgált fajoknál az embriózsák a funkcióképes makrospórából három, illetve négy nap alatt jött létre az egymást követő három gyors mitózis eredményeképpen, míg a két mikrospóra mitózissal differenciálódó trinukleátus pollen csak a hetedik napon volt megfigyelhető. A hím és a női gametofiton fejlődés aszinkronja áll fenn, a *Triticum* fajok protogyniáját támasztva alá.
- Az *in planta* fejlődött petesejtek a kialakulástól a receptív állapotig érési folyamaton mennek keresztül, méretnövekedés és alakváltozás kíséretében.
4. A *Triticum* faj kéthetes embrióinak térfogat adatai eltérő fejlődési intenzitást mutattak akár az antéziskori embriózsák-, vagy az érett szem csíra- ill. embrió térfogatával vetettük össze. Az átlag értékek alapján a diploid búza kéthetes embriói meghaladták a hexaploid búza embrióinak térfogatát is. Ugyancsak ezt erősítette meg, amikor a kéthetes magkezdeményeket az érett szemekhez viszonyítottuk. A diploid kéthetes magkezdemény mérete az érett szem közel 60%-át, a hexaploid az 50%-át, a tetraploid csupán 23%-át érte el.
5. Az *in planta* növekedésű petesejtek vizsgálatát az excizált vagy izolált petesejtek követték, melyek gömb alakjukat a kiemelés után vették fel. A petesejtek és a sejtmagok méretváltozása összefügg az életkorukkal. A petesejtek átmérőinek vizsgálatához a kasztrálástól számítva 3, 6, 9, 12, 15, 18 napos petesejteket használtunk, a két hexaploid búzafajta a Chinese Spring és a Siete Cerros esetén. Mindkét fajta tekintetében a petesejt és a sejtmag átlagos növekedése hasonlóan emelkedő volt a harmadik naptól a 18. napig. A sejt- és magátmérők a maximumok elérésében különböztek a két fajtánál. A megtermékenyítés szempontjából meghatározó 6 és 9 napos sejtek átmérője 63,49 μm és 73,32 μm volt.
- A 3, 6, 9, 12, 15, 18 napos petesejtekből készített félvékony metszeteket használtuk a morfológiai vizsgálatok végzése során és jellemeztük a sajátosságaik alapján, melyek szintén összefüggtek a korukkal. A három legjellemzőbb és legnagyobb eltérést mutató fiatal (3 napos), receptív (9 napos), és öreg (18 napos) petesejtek jelentették.
6. Az izolált petesejt fénymikroszkópos megfigyelésénél részletesebb ultrastrukturális feltárást végezhattunk a TEM segítségével.
- Az antézis előtti fiatal fejlettségi állapotú 3 napos petesejt citoplazmájában lipid testek, mitokondriumok, amiloplasztok, keményítő szemek találhatók a perifériális vezikulumok között.
- A receptív állapotú, 9 napos petesejt, az antézishez időben a legközelebb esett. Ultrastrukturális jellemzői a denz citoplazma, mitokondriumok nagyszámú jelenléte, a nukleuszban az endoplazmatikus retikulum, a polarizáltság erőteljesen megfigyelhető.
- Az öreg fejlettségi állapotú petesejt számos sajátossággal rendelkezik. A sejtmag kromatin állománya degradálódott. A sejtmag membránjához kromatin maradványok tapadtak ún. blebbingeket képezve. A citoplazmában lipid, keményítő, protein halmozódott fel. Lizis volt megfigyelhető a vezikulumokban és autofág vakuolumok jelentek meg. Az öreg állapotú petesejtek a programozott sejthalál jellegzetességeit viselték.

7. A Chinese Spring búzafajta érett, háromsejtes pollenjeit és azok generatív, vegetatív sejt adatait hasonlítottuk össze. A két hímvarsejt dimorfizmusát a méretükben meglévő következetes különbség is jelzi. A pollen átmérője nagyságrendileg megegyezik a hexaploid petesejt méretével, míg a hímvarsejtek méretük alapján csak a negyede az érett petesejtnak.
8. A DH109 x ZK 191/a hibridvonalhoz tartozó kukorica antérákat késői 1 magvas fejlettségi állapotban izoláltuk. Ezeknek embrioid jellegű struktúráit hidegkezelés segítségével állítottuk elő YP táptalajon.
- A fénymikroszkópos vizsgálatok szerint az antérákból készített metszeteken 2 sejtes mikrospóra jelenléte volt kimutatható két nappal az éheztetési eljárást követően. A tenyésztett mikrospórák többféle variációja, az ún. MCM, azaz többsejtes mikrospórák, illetve a többmagvas mikrospórák, azaz MNM egyaránt megfigyelhetők voltak a tenyésztésbe vonást követő ötödik naptól kezdődően csakúgy, mint degenerált és nem indukálódott mikrospórák, amelyek szintén előfordultak a populációban. A sokfajta mikrospóra alpopulációknak az előfordulása arra hívta fel a figyelmünket, hogy sokféle sejtosztódási, ill. fejlődési típus figyelhető meg a kultúrában.
- Az ultramikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ezekben a celluláris formákban, sejt csoportosulásokban sajátosságok figyelhetők meg csakúgy, mint az egyes sejtmag pórusok jelenléte az indukció korai stádiumában, valamint az intine alatt megjelenő vastag sejtfal képződése. Ezekben a struktúrákban bizonyos fokú polaritás is megfigyelhető volt. A proembrió jellegű struktúrák kb. 10-13 nappal a tenyésztésbe vonás időpontjától voltak fellelhetők, ugyanakkor az embrió jellegű struktúrák megjelenése ennél későbbi időpontra tehető mintegy 16 nappal a tenyésztés kezdetétől.
- Az ubiquitin vizsgálat érdekében a kereskedelemi forgalomban lévő poliklonális antitesteket használtuk az antérák félvékony metszetein immunocitokémiai detektálás céljára a spanyol kutatókkal az együttműködés során. Az előbb említett összes sejt típusban a jelölés megfigyelhető volt, kivéve a degenerált és a nem indukálódott mikrospórák esetében. Az MCM(soksejtes mikrospórák), androgenikus mikrospórák esetében a jelölés intenzitása lényegesen nagyobb volt. A vizsgálat során az ubiquitin, pollen sejtciklus, ill. androgenezis indukciójában betöltött szerepére, valamint annak a degradatív útvonal biztosításában betöltött szerepére vonatkozóan került sor egy modell felállítására.
9. A szőlő virág fejlődésdinamikai vizsgálata során – a búzánál alkalmazott metodikát adaptáltuk - mindkét fajta esetén a hím és női gametofiton fejlődési állapotát detektáltuk.
- A szőlő pollen fejlődésében hét fázist különítettünk el. Meghatároztuk a jellemző strukturális bélyegeket. A szisztematikus mintavételekkel korrelációt kerestünk a magkezdemény és a pollenszemek egyes fejlődési állapotai között.
- Egy közvetett módszer segítségével az embriózsákban a sejtesedési állapot meghatározása, az optimális fejlettség megítélése, kiválasztása szövettenyésztési célból.

5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ ILLETVE ÚJSZERŰ EREDMÉNYEI

Komplex összehasonlító vizsgálati eredményeket kaptunk az *in vivo* és *in vitro* környezetben nevelt növények hím és női gametofitonjáról a kialakulástól az érett állapotig sejtani, szövettani, morfológiai, fejlődésdinamikai szempontok szerint az eltérő genomu, ploidszintű *triticum* fajokról, melyet teljessé tesz ezen fajok fiatal embrióinak morfológiai jellemzése.

In planta vizsgálatainkban az elemzés során sikeres metszetsorozat készült a petesejt kezdeti fejlődésétől a receptív állapotú petesejtgig, a fázisokat mikrofelvevételek fotói illusztrálják.

A szabályos mintavételi intervallumokban excizált petesejtekből mikrotechnikai eljárást követően 1-2µm vastagságú metszeteket készítettünk, így részletes morfológiai, finomstrukturális elemzésüket tettük lehetővé. Ismereteink hozzájárultak, hogy megnyíljon az út az optimális kondíciójú petesejtek kiválogatásával a különböző mikromanipulációs célokhoz megfelelő módszerek alkalmazására.

A kukorica portoktenyészetekben, vagyis az androgenetikus indukciót követően az antérában található mikrospóra eredetű struktúrákat a heterogenitás jellemzi. Az egyszerre előforduló eltérő formák jelenlétét, a mikroszkópos vizsgálat mellett immunocitokémiai jelölés alkalmazása is igazolta, szolgáltatva részletesebb információt róluk. Nevezetesen az elhalt, nem fejlődött mikrospóráról, a soksejtes-, a soksejtmagvas- intenzív jelölést mutató mikrospóra struktúrákról.

A szőlő pollen és termő fejlődési stádiumait részletesen leírtuk és dokumentáltuk, elősegítve az androgén és gynogén eredetű szövettenyésztési módszerek sikeres alkalmazhatóságát.

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A termesztett búza és rokon fajainak virágzás és szaporodásbiológiai vizsgálata fontos háttér információkat szolgáltat a biotechnológiai beavatkozásokat is alkalmazó, korszerű növénynevelési kutatások számára. A hím és női gametofiton (a pollen és az embriózsák) kialakulásának ésérésének részletes citológiai, szövettani vizsgálata az ivaros folyamatok szinkronizációjának tanulmányozása egyrészt gazdagítja a mai napig hiányos ismereteinket a különböző gabonafajok gametofitikus folyamatairól, másrészt lehetőséget teremt a környezeti változások direkt és közvetett hatásainak vizsgálatára, valamint az ivaros nemzedék, az ivarsejtek *in vitro* mikromanipulációjára biotechnológiai célból.

Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző genomösszetételű és ploidszintű *Triticum* fajok pollenfejlődése, a 3-sejtes állapot kialakulása „*in planta*” és *in vitro* egyaránt 1 hét alatt lezajlik a meiózist követően. A 3-sejtes pollen ún. érése és kiszóródása a portokból már nagymértékben függött az abiotikus környezeti tényezőktől (elsősorban a hőmérséklettől). Az embriózsák kialakulása természetes és *in vitro* körülmények között időben megelőzte a 3-sejtes pollen kialakulását, így bebizonyosodott, hogy a vizsgált *Triticum* fajok nőelzők (protogynek). Arról azonban, hogy a

petesejt a kialakulását követő igen fiatal állapotban termékenyülőképese-e, még nincsenek megbízható eredményeink, ehhez további vizsgálatok szükségesek.

Ultrastrukturális vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az igen fiatal, az érett (antéziskori) és az idős búza petesejtek morfológiailag, szerkezetileg és ebből eredően funkcionálisan is különböznek egymástól. További vizsgálatuk választ adhat olyan alapvető kérdésekre, hogy pl. mivel váltható ki a parthenogenetikus petesejt aktiváció, és erre melyik fejlődési állapot a legalkalmasabb, vagy milyen fejlettségű petesejtbe injektáljunk agronomiailag hasznos géneket a stabil integráció elérése érdekében.

Az embriózsák és a petesejt mérete a hexaploid fajnál volt a legnagyobb, és a ploid szint csökkenésével a méretek is csökkentek. Ez a tendencia azonban az embriók vonatkozásában már nem volt megfigyelhető. Az embriózsák és a petesejt méretei nem korreláltak az embrió méreteivel a vizsgált *Triticum* fajoknál. A fiatal embriók az idegen génbeviteli-, transzformációs kutatási célokra alkalmas anyagként használhatók.

A női gametofitonról alkotott ismereteink bővítése hozzájárul a Növényi Sejtbiológiai és Élettani Osztály *in vitro* fertilizációs kísérleteinek további sikeres folytatásához és a növényi „lombik-baby” program megvalósításához, az indukált parthenogenezis kísérletekhez, a petesejt krioprezervációs munkákhoz és a molekuláris biológia terén a petesejtbe történő génbevétel - azaz a transzformációs kutatásokhoz -, a petesejtből cDNS könyvtárak létrehozásához.

A kukorica *in vitro* androgenezisének citológiai és ultrastrukturális vizsgálata nemzetközi szempontból is úttörő munkának számít, mivel az indukciós gyakoriság általában olyan alacsony mikrspórára vetítve, hogy a folyamatot nem sikerül követni. Intézetünkben rendelkezésre álltak a saját előállítású nagy haploidindukciós képességű kukorica genotípusok és a hatékony portoktenyésztési módszer, amely lehetővé tette a mikrspóra eredetű struktúrák részletes ultrastrukturális vizsgálatát és spanyol együttműködésben a folyamat biokémiai elemzését. Az általunk kidolgozott kukorica haploidindukciós módszer gyakorlati alkalmazhatóságát az intézet kukoricanemesítőivel közösen vizsgáljuk és értékeljük.

A szőlő haploid/dihaploid növényeknek a makrogametofiton sejtjeiből történő indukciójához sok egyéb tényező mellett elengedhetetlen az embriózsák fejlettségi állapotának meghatározása és az optimális fejlettségi állapot kiválasztása a szövettenyésztési módszerek célirányos alkalmazására. Az *in vitro* ovarium vagy ovulum tenyészetekből nagy eséllyel kaphatunk gynogenetikus haploid, homozigóta dihaploid növényegyedeket, amelyeket a továbbiakban nemesítési és genetikai vizsgálatokra használhatunk fel.

7. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

Tudományos publikációk:

Timár, I., Kristóf, Z., Barnabás, B.:1997. Comparative studies on the male and female gametophyte development in three different *Triticum* species. Plant Science 126. pp. 97-104.

Barnabás, B., **Timár, I.**, Pónya, Zs.:1997. Különböző ploidisztű és genomösszetételű *Triticum* fajok női gametofitonjának differenciálódása természetes és *in vitro* körülmények között. Növénytermelés, 1997. Tom. 46. No. 2.

Pónya, Zs., **Timár, I.**, Szabó, L., Kristóf, Z., Barnabás, B.:1999. Morphological characterisation of wheat (*T. aestivum* L.) egg cell protoplasts isolated from immature and overaged caryopses. Sex Plant Reprod.(1999) 11: 357-359.

Barnabás, B., Pónya, Zs., Finy, P., Solymoss, M., **Timár, I.**, Fehér, A., Dudits, D.:2000. Micromanipulation of gametic cells in cereals. In: Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology (Hrazdina, G. ed.), IOS Press, Amsterdam, pp. 76-79.

Alché, J.D., Castro, A.J., Solymoss, M., **Timár, I.**, Barnabás, B., Rodríguez-García, M.I.:2000. Cellular Approach to the Study of Androgenesis in Maize Anthers: Immunocytochemical Evidence of the Involvement of the Ubiquitin Degradative Pathway in Androgenesis Induction. J. Plant Physiol.(2000). 156. 146-155.

Barnabás, B., Pónya, Zs., Szakács, É., **Timár, I.**, B. Obert and A. Pretová.:2001. Biotechnology and Micromanipulation of Plant Sexual Processes in flowering plants. Biologia. Journal of the Slovak Academy of Sciences. (Bratislava). 56. 1. 7-12.

Timár, I., Barnabás, B.:2001. Környezeti hatások a búza hím és női gametofitonjára. XLIII. Georgikon Napok. Keszthely. pp. 1063-1067.

B. Barnabás, Z. Pónya, F. Bakos, **I. Timár**, É. Darkó, I. Takács and É. Szakács: 2002. Plant gametes as tools for molecular Breeding. *Acta Agr. Hun.* 50. 3. pp. 295-301.

Timár, I., Barnabás, B.:2002. A szaporodásbiológiai kutatás mint a vetőmagelőállítás alapja. II. Növénytermesztési Tudományos Nap. Budapest, Proceedings, pp. 198-204.

Timár, I., Pónya, Z., Szabó, L., Barnabás, B.: 2002. Development of female and male gametophytes in cereal species. *Acta Agron. Hun.* 50. 3. 321-335.

B. Barnabás, **Timár, I.**: 2003. A kukorica *in vitro* androgenezise. Tudomány a Duna két partján. Pozsony. Kalligram Könyv-és Lapkiadó Kft.ISBN 80-7149-543-3. pp.37-39.

Konferencia, szimpózium előadások :

Kovács, M., **Timár, I.**, Barnabás, B.:1994. Manipulation of female gametophyte of wheat (*Triticum aestivum* L.). Fejlődésbiológiai Napok. 1994. Jan. 2-6. Szeged (in Hungarian)

Kovács, M., **Timár, I.**:1994. Manipulation of female gametophyte of wheat (*Triticum aestivum* L.). Növénytermesztési Tudományos Napok. '93. Abstract, p. 48. Budapest, 1994. Jan.11-12. (in Hungarian)

- Kovács, M., Szakács, É., Takács, I., **Timár, I.**, Barnabás, B.:1994. Manipulation of female gametophyte of wheat (*Triticum aestivum* L.). A Magyar Genetikusok Egyesületének III. Konferenciája. Abstract, p. 139. Debrecen, 1994. dec. 8-9. (in Hungarian)
- Kovács, M., **Timár, I.**, Barnabás, B., Kranz, E.:1994. Isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Heberle Bors, E., Hesse, M., Vicente, O., (eds: Frontiers in Sexual Plant Reproduction Research, 13th International Congress on Sexual Plant Reproduction 1994, Vienna, Abstack Book, p. 127.
- Timár, I.**, Barnabás, B.:1995. Eltérő ploidisztű búzafajok női gametofiton fejlődésének összehasonlító vizsgálata. Növénynemesítési Tudományos Napok. '94. Abstract, p.94. Budapest, 1995. Jan.16-17. (in Hungarian)
- Timár, I.**, Kristóf, Z., Pónya, Zs., Barnabás B.:1996. Triticum fajok embriózsákjának vizsgálata lézer szkennig mikroszkóppal. Növénynemesítési Tudományos Napok. '95. Abstract, p.81. Budapest, 1996. Jan. 22-23. (in Hungarian)
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Takács, I., Kristóf, Z., and Kovács, G.:1996. Biotechnology in reproductive biology of cereals. Plant Reproduction '96. 14th International Congress of Sexual Plant Reproduction, Abstract, p. 3. Cumberland Resort, Lorne, Victoria, Australia February18-23. 1996.
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Pónya, Zs., Mitykó, J., Szabó, L.:1996. Recent problems of androgenic morphogenesis in cereals. 2nd Meetind Working Group 1 (Monocots) COST- ACTION 824 Gametic embryogenesis, Vienna 1996. Dec.6-7. Abstract.
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Takács, I., Kristóf, Z., and Kovács, G.:1996. Biotechnology in reproductive biology of cereals. Cost-Action 824 2nd Meeting on Gametic Embryogenesis. Vienna, 1996. Dec. 6-7. Abstract.
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Pónya, Zs., Obert, B., Mitykó, J., Szabó, L.:1997. A gabonafélék androgenetikus morfogenézisének aktuális problémái. Magyar Növényanatómiai szimpózium. Abstract, p.9. Szeged, 1997. Szept.10-12. (in Hungarian), (in English)
- Pónya, Zs., **Timár, I.**, Finy, P., Vértényi, G., Barnabás, B.:1998. Különböző gabonafajok gametoplasztjainak mikromanipulációja *in vitro*. IV. Növénynemesítési Tudományos Napok 1998. jan.28-29. Abstact, p.114.
- Holló, R., **Timár, I.**, Kovács, G., Barnabás, B.:1998. Szőlővirág fejlődésdinamikájának vizsgálata androgén- és gynogenetikus növények előállításá céljából. IV. Növénynemesítési Tudományos Napok 1998. jan. 28-29. Abstact, p.89.
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Pónya, Zs., Szabó, L., Kristóf, Z.:1999. Különböző érettségű búza petesejt protoplasztok morfológiai jellemzése. IV. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok. 1999. ápr. 11-14. Abstract, p.139.
- Barnabás, B., **Timár, I.**, Pónya, Zs., Szabó, L., Kristóf, Z.:1999. A búza petesejt érésének morfológiai sajátosságai. X. Magyar Növényanatómiai szimpózium. Debrecen. 1999. Aug. 26-28. Abstract, p.62.
- Timár, I.**, Szabó, L., Barnabás, B.:2001. A gabonafélék *in planta* fejlődött fiatal embrióinak összehasonlító morfológiai vizsgálata. XI. Magyar Növényanatómiai szimpózium. Keszthely. 2001. Aug. 23-25. Abstract, p.98.

- Timár, I.**, Nagy I.J., Barnabás, B.:2001. A búza bibe receptivitásának és az embriózsák sejtesedésének morfológiai összefüggése. XI. Magyar Növényanatómiai szimpózium. Keszthely. 2001. Aug. 23-25. Abstract, p.96.
- Timár, I.**, Barnabás, B.:2001. A szaporodásbiológiai kutatás mint a vetőmagelőállítás alapja. II. Növénytermesztési Tudományos Nap. Budapest. Abstract, p.80.
- Timár, I.**, Barnabás, B.:2002. A kukorica *in vitro* androgenezisének elméleti és gyakorlati aspektusa. VIII. Növénytermesztési Tudományos Napok. Budapest, 2002. február 12-13. Abstract, p.123.
- Timár, I.**, Barnabás, B.:2002. A szaporodásbiológiai kutatás mint a vetőmagelőállítás alapja. II. Növénytermesztési Tudományos Nap. Budapest, 2001. nov.26. Proceedings, p.198-204.
- Timár, I.**, Simonné Kiss Ibolya, Barnabás, B.:2003. Rizspollen viselkedésének tanulmányozása búza bibén. IX. Növénytermesztési Tudományos Napok. MTA. Budapest. Abstract, p.143.
- Timár, I.**, Simonné Kiss Ibolya, Barnabás, B.:2003. A búza fajidegen megporzását követő embriológiai vizsgálatok. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok. Abstract, p. 154.
- Bakos, F., Molnár I., **Timár, I.**, Molnár-Láng, M., Barnabás, B.: 2006. Wheat x rice crosses: a new distant pollination system. XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction. From gametes to genes. Budapest. Abstract, p.100.