

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***Armoracia rusticana* endofitonok vizsgálata *in vitro* és *in vivo* modellekben**

Plaszgó Tamás

Témavezető: Dr. Gonda Sándor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Glükózinnolát-mirozináz kémiai védelmi rendszer	5
2.2. Endofitonok	7
2.3. Illékony szerves vegyületek (Volatile Organic Compounds, VOC)	8
2.4. Növény-gomba interakciók	9
3. Célkitűzések	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torna-asszociált gombák gőzterében	13
4.1.1. Standard mikrobiológiai táptalajok	13
4.1.2. Tormakivonat készítése	13
4.1.3. Felhasznált endofiton és talajgomba törzsek	13
4.1.4. Gombák azonosítása	14
4.1.5. Gomba inokulumok készítése	14
4.1.6. Gombatörzsek inkubálása	15
4.1.7. Headspace GC-MS mérési paraméterek	15
4.1.8. Adatelemzés	16
4.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben	16
4.2.1. Tormafajták mintavételezése	16
4.2.2. Mintaelőkészítés, kriogén őrlés	17
4.2.3. Fitokémiai analízis	17
4.2.3.1. Folyadékkromatográfiás tömegspektrometria (LC-MS)	17
4.2.3.2. Minőségi ellenőrzéseken átesett vegyületjelöltek MS/MS analízise	18
4.2.3.3. Csúcsdetektálás	19
4.2.3.4. Metabolomikai mérések minőségellenőrzése QC mintákkal	19
4.2.3.5. Mintaelrendezés és randomizálás	20
4.2.3.6. Vegyületjelölt szűrési kritériumok	20
4.2.3.7. Érzékenységi driftek korrekciója	20
4.2.3.8. Vegyületek azonosítása vagy hozzávetőleges azonosítása	21
4.2.4. Gombaközösségek metagenomikai vizsgálata	21
4.2.4.1. Genomi DNS extrakció	21
4.2.4.2. Univerzális gomba ITS primerek ellenőrzése tormamintákban	21
4.2.4.3. Primer tervezés	22
4.2.4.4. Szekvenálási könyvtárkészítés és szekvenálás	22
4.2.4.5. Metagenomikai adatok analízise	23
4.2.4.6. Metagenomikai adatok diverzitás metrikáinak elkészítése	24
4.2.4.7. Metagenomikai és metabolomikai adatok közötti korrelációk keresése adatbányászati módszerekkel	25
5. Eredmények	27
5.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torna-asszociált gombák gőzterében	27
5.1.1. Endofiton és talajgomba izolátumok azonosítása	27
5.1.2. Gombák gőzteréből azonosított illékony szerves vegyületek (VOC)	29
5.1.3. Gombák VOC mintázatai	31

5.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben.....	38
5.2.1. Tormafajták glükozinolát tartalma.....	38
5.2.2. Nem-célzott metabolomika	39
5.2.3. Amplikon szekvenálás	43
5.2.4. Mikrobiom diverzitás vizsgálata	44
5.2.5. Tormafajták endofiton gombaközösségének összetétele	46
5.2.6. Mikrobiom - metabolom korrelációk.....	48
6. Megbeszélés	54
6.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torna-asszociált gombák gőzterében	54
6.1.1. Azonosított gombák	54
6.1.2. Headspace GC-MS inokulációs módszer hatékonysága.....	54
6.1.3. Gombák által történő glükozinolát lebontás	55
6.1.4. Endofiton és talajgombák elkülöníthetősége VOC mintázat alapján.....	56
6.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben.....	56
6.2.1. Nem-célzott metabolomikával azonosított vegyületek	56
6.2.2. Glükozinolát tartalom és a kémiai összetétel variabilitása	57
6.2.3. Tormaminták endofiton gombaközösségének összetétele	57
6.2.4. Gomba és kémiai abundancia adatok közötti korrelációk.....	58
7. Összefoglalás.....	62
8. Summary.....	64
9. Irodalomjegyzék.....	65
9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	65
9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke	76
10. Társszerzői hozzájárulások, nem saját eredmények.....	78
11. Tárgyszavak.....	79
12. Keywords	79
13. Köszönetnyilvánítás	80
14. Melléklet.....	81
15. Függelék.....	82

1. Bevezetés

“Az vagy, amit megeszel.” A mára már közhellyé vált mondás megalkotója akkoriban valószínűleg még nem számolt azzal a ténnyel, hogy már egy szimpla növényi résszel együtt egy komplett ökoszisztémát is elfogyasztunk. Az elmúlt néhány évtized kutatása ugyanis rávilágított arra, hogy természetes körülmények között a növények belső szövetei, sejtjei egy diverz baktérium és gomba közösségnek adhatnak otthont. Jellemzően ezek az élőlények látható tünetek nélkül kolonizálják a gazdanövényt, sőt még segíthetik is annak fejlődését, patogénekkal szembeni túlélését, stb.

Jelen értekezés alapjául szolgáló kutatómunkánk során mi is ezen élőlényeket vizsgáltuk, elsősorban arra a kérdésre keresve a választ, hogy milyen molekuláris szintű kapcsolatok játszanak szerepet az endofiton fonalas gombák és a gazdanövény közötti interakciókban. Vizsgálataink a Brassicaceae növény család egyik képviselője, a torma (*Armoracia rusticana*) gomba-közösségének megismerésére irányultak. Ez a növény nem csak élelmiszeripari és molekuláris biológiai (a tormaperoxidáz enzimet számos immunhisztokémiai és ELISA módszerben használják) vonatkozása miatt fontos, de farmakológiai szempontból is jelentős lehet kemopreventív tulajdonsága miatt. A növény továbbá diverz antimikrobiális vegyületek előállítására képes, mely számos izgalmas kérdést vet fel azzal kapcsolatban, hogy hogyan képes egy változatos és komplex mikrobiális közösség kialakulni egy ilyen zord kémiai környezetben.

Munkánk során lehetőségünk adódott arra, hogy ezen interakciókat *in vitro* és *in vivo* modellekben is vizsgáljuk. Tormagyökerekből számos endofiton fonalas gombát sikerült izolálnunk és hosszú távon fenntartanunk, melyekben headspace GC-MS technikával azt vizsgáltuk, hogy tormagyökerekből készített kivonaton inkubálva milyen illékony szerves vegyületek (VOC) előállítására képesek. Ezen felül, az elmúlt néhány évben alkalmunk volt arra, hogy egy kísérleti mezőgazdasági telepen, szabadföldi körülmények között termesztett tormafajtákból vegyünk több mint száz gyökérmintát, hogy metabolomikai és metagenomikai módszerekkel feltárhassuk a gombaközösség és a torma metabolitjai közötti *in vivo* interakciókat.

Az általunk alkalmazott módszerek közül kiemelendő a metabolomika, mely a többi “omikához” hasonlóan szintén egy interdiszciplináris terület, számos tudományág (műszeres analitika, informatika, adattudomány) eszközeit alkalmazza annak érdekében, hogy egy biológiai rendszer teljes metabolit készletét vizsgálhassuk. A klasszikus analitikai eljárásokkal

szemben, melyeknél elsősorban csak néhány jól definiált vegyület analízisére van lehetőségünk, a metabolomika segítségével akár több száz kémiai “feature”, vagyis vegyületjelölt relatív mennyisége meghatározható, sőt akár hozzávetőlegesen is azonosítható informatikai algoritmusokkal, így rengeteg információt kaphatunk a vizsgált szervezet pillanatnyi állapotáról.

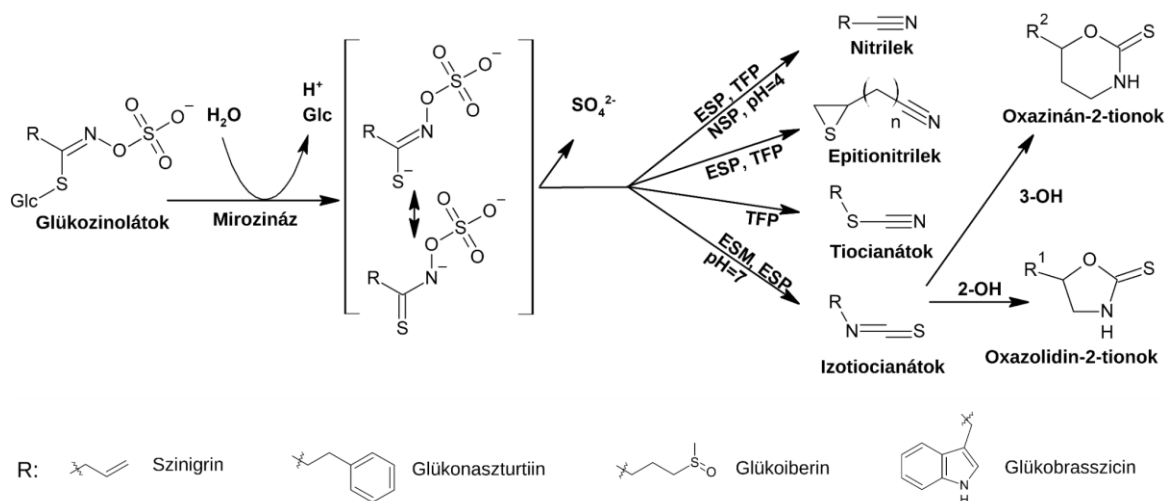
Ezen módszerekkel az alábbi kérdésekre szerettünk volna választ kapni kutatómunkánk során: Képesek-e az endofitonok, illetve a gazdanövény környezetében élő talajlakó gombák a növény metabolit készletét hasznosítani? Amennyiben igen, milyen illékony anyagcseretermékek utalhatnak erre? Van-e különbség az endofiton és talajgombák között a növény által termelt vegyületek felhasználását illetően? Továbbá fő kérdésünk volt még, hogy a gazdanövény kémiai összetétele befolyásolja-e a benne élő gombaközösség összetételét? Milyen vegyületek, vegyületosztályok szerepe szignifikáns az ilyen interakciókban?

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Glükoszínolát-mirozináz kémiai védelmi rendszer

A jelen értekezésemben bemutatott vizsgálatok modellnövénye a Brassicales rendbe tartozó torma (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) volt. A Brassicales növényrend képviselői rendelkeznek az egyik legaktívabban kutatott kémiai védelmi rendszerrel, melynek kulcsfontosságú bioaktív vegyületei a glükoszínolát anyagcsere útvonalból származnak (Blažević et al., 2020). A bioaktív vegyületek prekursorai a jelentős bioaktív hatással nem rendelkező glükoszínolátok, melyek aminosavakból származó, változatos struktúrájú tioglükozidok. Elnevezésük az oldalláncuk alapján történik, mely lehet alifás (Ala, Leu, Ile, Val, Met és Glu aminosav eredetűek), indol (Trp eredetű) vagy benzol gyűrűs (Phe vagy Tyr eredetű). Bioszintézisük a kloroplasztiszbán és a citoszolban zajlik, számos enzim kooperációjával (Chhajer et al., 2020; Harun et al., 2020).

A glükoszínolátok általában véve valamilyen szöveti sérülés hatására hidrolizálódnak a külön kompartmentekben tárolt mirozináz enzim által katalizált reakcióban (1. ábra). A hidrolízis intakt sejtekben is lejátszódhat alternatív mirozinázok által (Bednarek et al., 2009).



1. ábra. Glükoszínolátok hidrolízise, majd spontán átrendeződése bioaktív vegyületekké, továbbá a tormában legnagyobb koncentrációban előforduló glükoszínolátok szerkezeti képlete. Rövidítések: ESP, epithiospecifier protein; TFP, thiocyanate-forming protein; ESM, epi-thiospecifier modifier protein; NSP, nitrile-specifier proteinek.

Hidrolízist követően az instabil glükoszínolát aglikon (tiohidroximát-O-szulfát) spontán átrendeződik különféle illékony bomlástermékekké (1. ábra), mely bomlástermékek

gombákkal való interakciójának szakirodalmát két áttekintő tanulmányban is összefoglaltuk (Plaszkó et al., 2022, 2021). Fiziológiás pH-n az alapértelmezett bomlástermékek az izotiocianátok, melyek a legaktívabban kutatott glükozinolát bomlástermékek. Széles farmakológiai hatásspektrummal rendelkeznek, köszönhetően annak, hogy nagymértékben reaktívak nukleofilekkel szemben (Hanschen et al., 2014). Elsősorban az izotiocianátok felelnek a Brassicaceae növények emberi fogyasztás szempontjából előnyös tulajdonságaikért. Ezen növények (pl.: torma, mustár, káposzta, stb.) gyakori fogyasztásával számos betegség kialakulásának esélye csökkenthető, elsősorban kemopreventív hatásuk miatt (Sturm and Wagner, 2017). Szintén fontos tulajdonságuk, hogy rendkívül potens antimikrobiális hatással rendelkeznek. Már számos humán- és növénypatogén, illetve mikotoxin termelő gombával szemben (pl.: *Candida* fajok, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*) bizonyították az izotiocianátok antifungális hatását, mint azt összefoglaltuk korábbi tanulmányunkban (Plaszkó et al., 2021). Ezen hatásuk számos gyakorlati alkalmazásuk alapját képezi, használják növényvédelemben, de akár gabonák, gyümölcsök, tejtermékek, pékáruk tartósítására is (Plaszkó et al., 2021). Bár hatékony antifungális vegyületek, már számos gombáról leírták, hogy rendkívül hatásos detoxifikációs mechanizmusokat alkalmazhatnak az izotiocianátok semlegesítésére, pl.: kevésbé hatásos vegyületekké történő közvetlen biotranszformációval (Holland et al., 1994), glutathion konjugátumok létrehozásával (Chen et al., 2020; Szűcs et al., 2018), glutathion transzferázok használatával (Calmes et al., 2015).

A másik számottevő szakirodalommal rendelkező vegyületosztály a nitrilek, melyek alacsonyabb pH-n ($\text{pH} < 5$) vagy Fe^{2+} ionok és nitrile specifikus proteinek (NSP) jelenlétében képződnek a mirozináz reakció során (Wittstock et al., 2016). Mint már áttekintettük, közvetlen antifungális hatásukat már számos esetben igazolták, de aktivitásuk sokkal alacsonyabb az izotiocianátokhoz képest (Plaszkó et al., 2022). Bár jelentős mennyiségben képződhetnek számos növényben, pontos ökológiai szerepük még tisztázatlan gyenge bioaktivitásuk miatt. Előzetes eredményeink alapján feltételezhető, hogy szinergista kölcsönhatások révén növelhetik a az izotiocianátok aktivitását, így indokolva a képződésüket.

Az indol glükozinolátokból származó vagy hidroxilált oldallánccal rendelkező izotiocianátok instabil vegyületek, melyekből további downstream bomlástermékek keletkezhetnek, ilyen például az indol-3-metánamin (Bednarek et al., 2009). Aszkorbinsav jelenlétében aszkorbigin jöhet létre, vagy ha víz a reakció partner, indol-3-metanol képződhet, mely tovább oxidálódhat indol-3-karbaldehiddé, indol-3-karbonsavvá vagy dimer, oligomer formákká (Agerbirk et al., 2009; Buskov et al., 2000; Hanschen et al., 2014). Az indol glükozinolátokból indol-3-acetonitril is létrejöhet, mely szintén számos downstream termék

prekuzora lehet (Plaszkó et al., 2022). A Brassicaceae növényekből már számos fitoalexint is leírtak, melyek fontos antimikrobiális vegyületek a növényvilágban. A brassinin például szintén a glükozinolát útvonalból származik, amely molekula számos további fitoalexin bioszintézisének kiindulópontja, további részletek nemrégiben megjelent áttekintő munkánkban olvashatóak (Plaszkó et al., 2022). Az imént említett vegyületek szakirodalma kisebb az izotiocianátokéhoz képest, és bár széles biológiai hatásspektrummal rendelkeznek, pontos ökológiai szerepük, a nitrilekhez hasonlóan, egyelőre tisztázatlan.

Mint azt két áttekintő tanulmányunkban is bemutattuk (Plaszkó et al., 2022, 2021), a Brassicaceae növények bioaktív vegyületek rendkívül diverz arzenáljával veszik fel a versenyt a különböző mikrobákkal, patogénnel szemben. Mivel számos vegyület individuális szerepe nem tisztázott, így feltételezhető, hogy komplex kémiai folyamatokban vehetnek részt. Kutatásunk alanya, a torma is bővelkedik glükozinolát eredetű anyagcsere-termékekben, így jó alapot szolgálhat a komplex és dinamikus növény-mikroba interakciók mélyebb megértéséhez, ráadásul sok Brassicaceae növényhez hasonlóan a torma sem alkot mikorrhiza kapcsolatokat (Sharma et al., 2023), így még inkább alkalmas lehet pusztán a növény belsejében élő közösség (endoszféra) mikrobiális közösségének feltérképezésére.

2.2. Endofitonok

Ma már jól ismert tény, hogy a növények egészségét és jólétét, az állati szervezetekhez hasonlóan, nagyban befolyásolja azok mikrobiomja (Patil et al., 2023). Bár a növényi mikrobiom egyik legintenzívebben kutatott részhalmaza az endofitonok, pontos definiálásuk a mai napig sem egyszerű. Számos különböző definíció született az endofitonokra az elmúlt évtizedekben, de általában olyan nem-patogén előlényeknek tekintjük őket, amelyek a növények belsejét kolonizálják látható tünetek nélkül (Fesel and Zuccaro, 2016; Schulz and Boyle, 2005). Az endofitonok a gyógyszerészeti tudományokban is egyre kiemeltebb szerepet kapnak, ugyanis fontos bioaktív vegyületek potenciális forrásai lehetnek (Anand et al., 2023; Gunatilaka, 2006). Az endofitonok akár extrém körülmények között működő enzimek tanulmányozására is alkalmasak lehetnek, például a sós élőhelyeken élő növényekből izolált endofitonok olyan enzimeket tartalmaznak, amelyek magas sókoncentrációban is képesek működni (García-Latorre et al., 2023; Suryanarayanan et al., 2012). Nem-patogén állapotukban számos jótékony interakcióban állnak a gazdanövénygel, amelyek a növényvédelemben is kiaknázhatóak, pl.: sótűrés növelése, biokontroll, stb. (Godara and Ramakrishna, 2023; Govinda Rajulu et al., 2011; Vos et al., 2014). Azonban fontos megemlíteni, hogy nem-patogén

életmódjuk nem tekinthető teljesen stabilnak (Fesel and Zuccaro, 2016; Schulz and Boyle, 2005). Bár a pontos háttérmechanizmusa nem teljesen ismert, az endofitonok látens (opportunist) patogének is lehetnek, mely súlyos mezőgazdasági károkkal is járhat (Photita et al., 2004; Slippers and Wingfield, 2007).

Természetesen nem meglepő, hogy az endofitonok, és alapvetően a növényi mikrobiom minden tagja bioaktív vegyületek százainak vannak kitéve a növényekben, és annak környezetében is. Az evolúció során az endofitonok jól alkalmazkodtak a gazdanövény metabolikészetéhez, számos endofiton képes akár szelektíven is átalakítani a növényi metabolitokat, sőt mi több, egyes természetes vegyületek a gazdanövény és endofitonjai közös termékei (Ludwig-Müller, 2015). Mint már korábban bemutattuk, a gombák a növények egyes vegyületeit, például a glükozinolátokat, szénforrásként is felhasználhatják, mely jelenség sokkal gyakrabban volt detektálható endofitonoknál (Szűcs et al., 2018).

A szakirodalomban fellelhető nagyszámú publikáció ellenére az endofitonok ökológiai szerepe, illetve azok kölcsönhatásai a növényi kémiai rendszerekkel továbbra is számtalan izgalmas és megválaszolatlan kérdést tartogatnak.

2.3. Illékony szerves vegyületek (Volatile Organic Compounds, VOC)

Az illékony szerves vegyületek vagy VOC (Volatile Organic Compounds) kifejezést elsősorban olyan természetes vegyületekre alkalmazzuk, amelyek természetes körülmények között illékony formában vannak jelen. Többnyire növények, gombák és baktériumok termelik ezeket a nagyon diverz struktúrájú és sokféle biológiai funkcióval rendelkező vegyületeket. Szerkezetüket tekintve leggyakrabban rövid szénláncú szerves savak, alkoholok, aldehidek, észterek és terpenoidok. Detektálásuk az illékony természetük miatt általában speciális mintavételezési módszerekkel lehetséges (és célszerű), pl.: szilárdfázisú mikroextrakció, headspace extrakció (Zhang and Li, 2010).

A gombák által termelt VOC-ok fontos szerepet játszanak a gombák és más szervezetek közötti kölcsönhatásokban, pl.: fajok közötti szimbiotikus kapcsolatok kialakításában és szabályozásában, antifungális, fitotoxikus vagy rovarvonzó, illetve rovarriasztó aktivitásokban (Hung et al., 2015; Yang et al., 2023). A gombák VOC-okat önszabályozási célból is előállíthatnak, például a *Penicillium paneum* által termelt oktén-3-ol gátolhatja a saját spórázási képességét magas spórakoncentráció esetén (Chitarra et al., 2005).

VOC-ok termelését illetően az endofitonok is egyre nagyobb figyelmet kapnak nem csak a szakirodalomban, de gyakorlati alkalmazásokban is, erre kitűnő példák a *Muscodor*

nemzetség gombái. *Muscodor* izolátumok VOC keverékei például hatékonyan gátolták a patogének fejlődését egyes gyümölcsökön (Mercier and Jiménez, 2004). Egy *Muscodor yucatanensis* izolátum különféle szénhidrogének, észterek és szeszkviterpének termelésével szignifikánsan gátolta más gombafajok növekedését *in vitro* kísérletekben (Macías-Rubalcava et al., 2010).

Mint már korábban láthattuk, növényi anyagcsere útvonalakból is igen diverz VOC-ok származhatnak, például a glükozinolátok hidrolízise során. A glükozinolátok oldalláncától függően a képződő vegyületek rendkívül illékonyak lehetnek, mint például az egyik leggyakrabban előforduló glükozinolátból, a szinigrinből képződő allil-izotiocianát, vagy a glükonaszturtiinból képződő fenetil-izotiocianát (Plaszko et al., 2021).

A VOC-ok a növény-mikroba interakciókban is jelentős szerepet tölthetnek be. A *Cladosporium cladosporioides* gomba által termelt VOC-ok, például α -pinén, szignifikáns növekedés serkentő hatással voltak dohánynövénykékre, *in vitro* körülmények között (Paul and Park, 2013). A fentiekben bemutatott példák alapján elmondható, hogy a különféle különleges VOC-okat termelő gombák nagy gyakorlati potenciállal rendelkezhetnek, és fontos részét képezhetik jövőbeli kutatásoknak.

2.4. Növény-gomba interakciók

Számos tanulmányban már diszkutálták, hogy a növényi anyagcsere útvonalakból származó szerves vegyületek tápanyagként szolgálhatnak a környezetükben élő mikroorganizmusok számára, valamint, hogy a növények különféle antimikrobiális hatású vegyületekkel védekezhetnek a patogén mikrobák ellen. Azonban, a legfrissebb kutatások azt mutatják, hogy ezen jelenségek mögött sokkal komplexebb mechanizmusok húzódnak (Pang et al., 2021). Az evolúció ugyanis olyan ún. "meta-organizmusok" létrejöttét eredményezte, amelyekben a növények aktívan táplálják mikrobiomjukat, és különféle exudátumokkal alakítják annak összetételét, annak érdekében, hogy megakadályozzák a patogén mikrobák térnyerését. Mindeközben a mikrobiom tagjai egymással erős kompetícióban igyekeznek felhasználni a növényi metabolitokat és tápanyagokat, és egyúttal a növényi antimikrobiális vegyületek ellen is védekeznek, így létrehozva a dinamikusán változó növényi metabolomot és mikrobiomot (Pang et al., 2021; Sasse et al., 2018). A növény-mikrobiom interakciókban mind a primer, mind a specializált metabolitok részt vesznek, de arra vonatkozóan, hogy mely vegyületosztályok töltik be a legfontosabb szerepet, viszonylag

hiányosak az ismereteink (Nguyen et al., 2023; Sasse et al., 2018). Bár a legtöbb tanulmányban a bakteriális kölcsönhatásokat vizsgálták, gombákkal kapcsolatban is gyarapodnak az adatok.

A növények és endofiton gombák közötti kölcsönhatások elsősorban elicitáció formájában mutatkoznak a növény részéről, vagyis a gombákkal való első találkozáskor a növényben megindul a specializált metabolitok bioszintézise (Priyashantha et al., 2023). Ennek bizonyítására már számos tanulmány született, például megfigyelték, hogy növényi szövettenyészetekben indukálható a specializált metabolizmus azáltal, hogy a gombák jelenlétét gombasejttal extraktumokkal imitálják (Narayani and Srivastava, 2017). Növényi patogenezis modellekben szintén megfigyelhető, hogy a növény fokozhatja a defenzív vegyületek termelését gombafertőzés esetén, például Brassicaceae növényekből kimutatták, hogy a növény jelentősen növeli a különféle glükozinolátok mennyiségét gombákkal történő kezelés hatására (Madloo et al., 2019; Robin et al., 2017). Bár ezek a tanulmányok mélyebb betekintést nyújtanak a kémiai védelmi mechanizmusokba, legtöbb esetben csak egy-egy gombatorzs által történő fertőzés hatását vizsgálják, azonban már két különböző gomba együttes fertőzése is drasztikusan eltérő hatásokat eredményezhet a vizsgált növényben (Hori et al., 2021).

Tovább nehezíti a teljes metabolomra történő konklúziók levonását, hogy a publikációk döntő többségében csak egy-egy jól definiált vegyületosztályra fókuszáltak, sőt a legtöbb tanulmány a specializált metabolitokra összpontosított, azonban nem csak ezen vegyületek felelhetnek védelmi funkciókért a növényekben. Egy NMR tanulmányban figyelték meg például, hogy a *Combretum lanceolatum* növény primer metabolizmusa szignifikánsan megváltozott endofiton gombákkal történő kolonizáció hatására. A treonin, almasav, *N*-acetil-mannózamin mennyisége 290-740-szeresére nőtt a kezelés hatására. A szerzők szerint ezek a vegyületek a növény védelmében szerepet játszó specializált metabolitok prekursorai is lehetnek (Lacerda et al., 2021).

Egy másik fontos megközelítés a növény-mikroba interakciók vizsgálatában annak a jelenségnek a megfigyelése, hogy a növények metabolitok segítségével hogyan “toborozzák” a számukra hasznos mikrobákat (Park et al., 2023). Ebben a témában született tanulmányok arra a megállapításra jutottak, hogy a specializált metabolitok a legfontosabb faktorok a mikrobák vonzásában, ugyanis a mikroorganizmusok felismerhetik a gazdanövényt a kibocsátott exudátumaik alapján. A flavonoidok és sztrigolaktonok például fontos szignálmolekulaként szolgálhatnak a szimbiotikus mikorrhiza kapcsolatok létrejöttében (Holmer et al., 2017). Egyes vegyületosztályok, pl.: glükozinolát bomlástermékek (Plaszkó et

al., 2021), kumarinok (Voges et al., 2019), triterpének (Huang et al., 2019), befolyásolásával a gazdanövény mikrobaközösségei is megváltozhatnak.

A talaj- és rizoszféra gombák szakirodalma elég jelentős, az endofiton gombaközösségekről viszonylag kevesebb az információ, annak ellenére, hogy gyakorlatilag minden növényben jelen vannak (Rodriguez et al., 2009). A természetes talajok rendkívül változatos gombaközösséggel rendelkeznek, így logikus azt feltételeznünk, hogy a növényben élő gombaközösség, a magból öröklött közösségen kívül, talajgombákból alakul ki (Abdelfattah et al., 2023). Érdekes azonban, hogy a növények rizoszférájában csak a talajmikrobák egy kis hányada él, annak ellenére, hogy a rizoszféra bővelkedik szerves tápanyagokban (DeAngelis et al., 2009), ráadásul ennek a szűkebb közösségnek is csak néhány tagja tudja kolonizálni a növények belsejét (Sasse et al., 2018). Mindez azt sugallja számunkra, hogy a rizoszférában található kémiai mikrokörnyezet egy nagyon erős szelekciós nyomás a gombákra nézve, mellyel a leendő endofitonok különféle kémiai adaptációs mechanizmusok kifejlesztésével birkóznak meg (Szűcs et al., 2018).

3. Célkitűzések

Doktori értekezésemet megalapozó kutatómunkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Növényi extraktumokon inkubált endofiton és talajgombák gőzterében található illékony szerves vegyületek (VOC) meghatározását terveztük, hogy megvizsgáljuk a tormaiban és környezetében élő gombák képesek-e a növényre jellemző metabolitokat felhasználni, átalakítani.
- Terveztük továbbá szabadföldi körülmények között termesztett tormafajták gyökereiben található gombaközösségeket feltárni metagenomikai (amplikon szekvenálás) módszerekkel, ezzel minél több információt nyerve arról, hogy milyen taxonok alkotják ezen növény endoszféráját.
- A vizsgált tormagyökerekből metabolomikai vizsgálatokat is terveztünk a növény metabolit készletének részletes feltérképezése érdekében. Terveztük továbbá a metabolomikai mérésekből származó vegyületjelöltek részletesebb azonosítását legalább vegyületosztályok szintjén.
- Végezetül azt terveztük feltárni, hogy a gazdanövény és mikrobiomja között milyen kémiai kölcsönhatások vannak, milyen vegyületek felelnek a gombaközösség összeszerelődéséért és milyen gombataxonok befolyásolják a gombaközösség összetételét.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torma-asszociált gombák gőzterében

4.1.1. Standard mikrobiológiai táptalajok

Vizsgálataink során Malt Extract Broth (MEB, 20 g L⁻¹ malátakivonat, 20 g L⁻¹ glükóz-monohidrát, 1 g L⁻¹ pepton), Saboraud Glucose Broth (SGB, 40 g L⁻¹ glükóz-monohidrát, 10 g L⁻¹ pepton, pH 5,6 ± 0,2) és Potato Dextrose Broth (PDA, 200 g L⁻¹-nek megfelelő burgonyakivonat, 20 g L⁻¹ glükóz-monohidrát, pH 5,6 ± 0,2) táptalajokat használtunk. Szükség esetén a táptalajokat 2% agarral szilárdítottuk.

4.1.2. Tormakivonat készítése

A tormakivonatot az alábbi protokoll alapján készítettük: kb. 500-1000g friss, egészséges tormagyökeret nagy darabokra vágunk, 30 percig vízben főztük a mirozináz enzim inaktiválása érdekében, majd 3:2 oldószer:nyerstömeg arányban metanollal homogenizáltuk. A metanolos elegyet 30 percig forraltuk golyóshűtő alkalmazása mellett. Az így kapott kivonatot leszűrtük, és rotációs vákuumbepárlóban közel szárazra pároltuk, majd nagyjából a gyökerekben lévő vízmennyiségben (jellemzően a nyerstömeg 70%-a) újra szuszpendáltuk. A folyadékot előszűrés után sterilre szűrtük 0,20 µm pórusátmérőjű PES membránon, majd -24 °C-on tároltuk további felhasználásig. A kivonatot szükség esetén 2% steril agarral egészítettük ki. A vizsgálataink során használt tormakivonat 1856 µg mL⁻¹ szinigrint, 239,8 µg mL⁻¹ glükonaszturtiint, 6,96 µg mL⁻¹ glükoiiberint és 41,33 µg mL⁻¹ glükobrasszicint tartalmazott (a kvantifikációs módszer részletei a 4.2.3.1. alfejezetben találhatóak).

4.1.3. Felhasznált endofiton és talajgomba törzsek

A jelen dolgozatban szereplő gombatörzseket már korábban izolálták a Növényteni Tanszék munkatársai (Szűcs et al., 2018). Az endofiton gombákat egészséges tormagyökerekből izolálták, amelyeket Debrecen közelében termesztettek. 4× hígítású nátrium-hipoklorit oldattal történő felületi sterilizálást követően többször átöblítették steril desztillált vízzel, majd a gyökereket kb. 2 × 2 × 1 cm méretű darabokra vágták és sztreptomomicinnel és klóramfenikollal kiegészített SGA, PDA táptalajokra helyezték. A felületi sterilitást azonos típusú táptalajon ellenőrizték azáltal, hogy egy-egy darabot a táptalajba

nyomkodtak vagy az utolsó öblítővizet szélesztették. Ha nem volt látható növekedés a negatív kontroll táptalajokon, akkor a növényi darabokat felületi kontaminánsoktól mentesnek tekintették. Az inkubáció szobahőmérsékleten, sötétben történt, majd a gyökérdarabok szélén megjelenő gombákat tekintették endofitonoknak.

A talajgombákat a torma termesztésére használt terület növénymentes pontjairól izolálták. Körülbelül 1 g talajt 10 ml steril vízben szuszpendáltak, majd a szuszpenzió sorozathígítását szélesztették táptalajra. Az inkubálás során megjelent gombákból folyamatos átoltásokkal tiszta kultúrákat állítottak elő.

4.1.4. Gombák azonosítása

Az E1-E7 izolátumok fajszintű azonosítása már korábban megtörtént (Szűcs et al., 2018). A többi törzs esetében a gombák taxonómiai azonosítását az ITS (Internal Transcribed Spacer), α -actin vagy calmodulin géneik amplifikálásával és Sanger szekvenálásával végeztük el. A szekvenciákat NCBI BLAST keresést hajtottunk végre, majd a találatok alapján legfeljebb nemzetség szinten azonosítottuk a gombákat.

4.1.5. Gomba inokulumok készítése

A különböző gombatörzsek által kibocsátott VOC-ok méréséhez a gombákat autoklávozott headspace kromatográfiás üvegekben inkubáltuk. 1 mL meleg, agarral kiegészített kivonatot pipettáztunk az üvegekbe, amelyeket ezután addig forgattunk, amíg a kivonat vékony filmréteggé megszilárdult az üveg alsó részében.

A headspace üvegek egyenletes beoltásához minden gombatörzsből folyékony szuszpenziót készítettünk. A gombákat 30 mL MEB tápoldatban, 200 rpm fordulatszámon rázatva, szobahőmérsékleten 7-10 napig tenyésztettük. A micéliumokat MiniMix CC (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Franciaország) homogenizátor segítségével homogenizáltuk steril BagPage (Interscience) zacskókban. A zacskókon ezután egy műanyag rudat óvatosan görgettünk ezzel elősegítve az egyenletes homogenizálást. Az így előállított szuszpenziókat 2 percig centrifugáltuk 13500 rpm-en, majd a micéliumokat steril vízzel mostuk. A gombaszuszpenziókat inokuláció előtt 4 °C-on tároltuk. Mivel a morfológia és konídiumképző képesség fajonként különbözhet, ezért száraztömeg alapon standardizáltuk az inokulációs mennyiséget, amit liofilezással határoztunk meg.

4.1.6. Gombatörzsek inkubálása

A headspace üvegek inokulációja során 500 μL térfogatú, 500 μg száraztömeggel ekvivalens gombaszuszpenziót pipettáztunk az üvegekbe. Fél percig tartó óvatos forgatás után az üvegekből a felesleges vizet eltávolítottuk, majd az üvegeket 30 percig nyitva hagytuk lamináris boxban annak érdekében, hogy a maradék folyadék elpárologjon. Végezetül az üvegeket lezártuk, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk legalább 3 napig.

Az egyes tenyészetek légteréből az inokulációt követő 3. és 4. napon vettünk mintát. A kísérletet két biológiai ismétléssel, tehát gombánként összesen 4 replikával végeztük. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk afelől, hogy a kéntartalmú vegyületek a tormakivonatok specializált anyagaiból keletkeznek, kontroll tenyészeteket is inokuláltunk MEB táptalajra. Ezeket egy biológiai ismétlésben készítettük el, és a beoltást követő 3. és 4. napon injektáltunk.

4.1.7. Headspace GC-MS mérési paraméterek

A gombák gőzterének VOC profilját Bruker Scion 456-os gázkromatográfval vizsgáltuk, mely egy Bruker SHS-40 Headspace mintavevőből és egy hozzákapcsolt Bruker SQ tömegspektrométerből állt. A vizsgálatok során egy Br-5 kapilláris kolonnát (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 1,0 μm filmvastagság) használtunk. A vivőgáz hélium volt, 1 mL min⁻¹ áramlási sebességgel. Mintavétel előtt a headspace üvegeket 20 percig, 40 °C-on inkubáltuk a mintavevő készülékben, majd 1000 μL mintát injektáltunk. A transzfer és injektor hőmérsékletét 230, illetve 250 °C-on tartottuk; 20:1-es splitet használtunk. A kezdeti 40 °C-os hőmérsékletet 2 percig tartottuk, majd 10 °C perc⁻¹ sebességgel 280 °C-ra emeltük, és 3 percig tartottuk. A tömegspektrométer elektron ionizációs (EI) módban üzemelt 180 °C-on, 1 s⁻¹ scannelési sebességen. A tömegspektrumokat 50-400 m/z, “full scan” módban rögzítettük. Az illékony vegyületek azonosítása a NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA; 2.0g verzió, build 2011.05.19.) spektrumkönyvtára alapján zajlott.

A módszer teljesítményét standard vegyületekből készült kalibrációs egyenessel vizsgáltuk, mely az összes analit (aceton, allil-cianid, allil-izotiocianát, szén-diszulfid, etil-acetát, dimetil-szulfid, metil-acetát, metil-formiát, fenil-propionitril, fenetil-izotiocianát) 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 5,00 és 10,00 nL-es keverékéből állt. Nem mindegyik analit volt detektálható mindegyik koncentrációtartományban, ezért a LLOQ (lower limit of quantitation) értékeket a legalacsonyabb reprodukálható koncentrációban határoztuk meg.

4.1.8. Adatelemzés

Az ionkromatogramokon (EIC, XIC) az összes kromatográfiás csúcst manuálisan átválogattuk, ezután minden csúchoz manuálisan összegyűjtöttük a legtisztább spektrumból (legintenzívebb csúcst tartalmazó minta) a legnagyobb mennyiségben előforduló jellegzetes ionokat (max. 5-öt). A jellemző ionok listáját felhasználva célzott csúcsdetektáló algoritmust használtunk az mzMine 2.39 (Pluskal et al., 2010) szoftverben, majd az azonos metabolitokhoz tartozó ion abundancia értékeket összeadtuk R-ben (R Core Team, 2023). A célzott csúcsdetektálás paraméterei a következők voltak: Intensity tolerance = 50.0%, Noise level = 9.0×10^4 , m/z tolerance = 0.5, Retention time tolerance = 0.1 (min). Az adatokat Openchrom 1.4.0 (Wenig and Odermatt, 2010) segítségével konvertáltuk CDF formátumba. Minden további statisztikai analízist R-ben végeztünk. A gombák közötti szignifikáns különbségek kimutatására a nyers metabolit abundancia értékeket ANOVA modellekben vizsgáltuk ($n = 4$ minden gombatorzs esetében). A szignifikáns vegyületeken Dunnett post hoc tesztet futtattunk, ezáltal megkaptuk a statisztikai különbségeket az egyes gombák és a kontrollok között. Az endofiton és talajgombák közötti statisztikai különbségek vizsgálatához az egyes gombatorzsoknál az egyes vegyületek jelenlétét egyetlen számértékként átlagoltuk, majd Fisher-féle egzakt próbával vizsgáltuk.

4.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben

4.2.1. Tormafajták mintavételezése

Fajtafenntartási célból számos torma (*Armoracia rusticana* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.) fajtát neveltek egy kísérleti mezőgazdasági telepen, mely Hajdúhadház-Fényestelepen található (1. terület, 47°39'09.8"N 21°42'30.5"E). Összesen 13 fajtából gyűjtöttünk mintákat (fajtánként legalább négyet) 2018 és 2019 novemberében. Ezen felül a termőrétegből gyűjtöttünk 4 talajmintát mindkét évben. 2019 novemberében sárgarépa (*Daucus carota* L.), illetve egy Halápon található mezőgazdasági területről (2. terület) további torma mintákat is gyűjtöttünk külső kontrollként.

Mintavétel során a növényekről eltávolítottuk a leveleket, majd a gyökereket steril műanyag zsákokba helyeztük, majd a Tanszékre szállítottuk további feldolgozásra. A gyökerekről eltávolítottuk a talajmaradékokat egy alapos csapvizes mosással. A felületi fertőtlenítési eljárás első lépéseként 96%-os etanolba mártottuk a gyökereket 30 másodpercig, majd 10 percig 0,1% Tween 20 és 2,5% aktív klór tartalmú NaOCl oldatban áztattuk azokat. Ezután a fertőtlenített mintákat steril zacskókban ötször átmostuk, autoklávozott type II vízzel.

Lamináris boxban, steril késsel egy reprezentatív mintát vágunk ki a steril gyökérmintákból (mérettől függően a gyökér 1/2 - 1/16 részét, mindig hosszában vágva), majd azt körülbelül 1 cm³ méretű kockákra vágjuk fel. Az így kapott mintát steril, műanyag mintatartó edényekbe helyezzük és folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk. A mintákat további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

4.2.2. Mintaelőkészítés, kriogén őrlés

A fagyott, darabolt növényi részeket egy 20 mm-es acélgolyóval együtt 50 mL térfogatú, rozsdamentes acélból készült őrlőkorsókba helyezzük (Retsch GmbH, Haan, Németország), melyeket az őrlés előtt autoklávoztunk, majd előhűtöttünk folyékony nitrogénben. Az őrlőkorsókat összeszerelés után ismét folyékony nitrogénbe merítettük, hogy a minta felolvadását elkerüljük. A mintákat ezután Retsch Mixer Mill MM 400-as műszerrel homogenizáltuk, 30 s⁻¹ frekvencián, a minta méretétől függően 45-90 másodpercig. Az így homogenizált mintákat liofileztük, és a genomi DNS és metabolomikai extrakcióig sötét exsikkátorban tároltuk szilikagélben.

4.2.3. Fitokémiai analízis

A kriogén őrlött majd liofilizált növényi mintákból 25 mg-t bemértünk, majd 5 percig extraháltunk 0,1% hangyasavval kiegészített 75%-os metanollal, 4 °C-on. Előzetes vizsgálataink alapján ez az kivonószer adta a legnagyobb vegyület lefedettséget nem-célzott metabolomikai vizsgálatokban. A kivonatok min. 48 óráig stabilak voltak. A kivonatok 4 °C-on 24000 g-n 3 percig centrifugáltuk, majd a felülúszókból 10× vagy 200× hígítást készítettünk a kivonószerrel a nem-célzott metabolomikai analízishez, illetve a glükozinolátok mennyiségi meghatározásához. A hígított kivonatok 0,22 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel szűrtük kromatográfiás mintatartó üvegekbe a műszeres analízist megelőzően.

4.2.3.1. Folyadékkromatográfiás tömegspektrometria (LC-MS)

Az LC-MS mérések során egy Dionex Ultimate 3000RS UHPLC rendszert használtunk Thermo Q Exactive Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Egyesült Államok). Az alkalmazott ionizáció elektropray ionizáció (ESI) volt. Nem-célzott metabolomikai mérésekhez Kinetex Polar C₁₈ kolonnát (100 × 3 mm × 2,6 µm, 100Å) használtunk, mely 25 °C-on volt termosztálva. Gradiens elúciós módszert használtunk az alábbi gradiens program szerint (A oldószer, víz + 0,1% hangyasav; B oldószer, acetonitril + 0,1% hangyasav): 0-2 perc, 0% B; 2-14 perc, 0-100% B; 14-15 perc, 100% B; 15-16 perc, 100-0%

B; 16-25 perc, 0% B, 0,2 mL perc⁻¹ áramlási sebességgel. A 10× hígítású mintákból 1-1 µL térfogatot injektáltunk. Az Orbitrap-et “full MS” üzemmódban működtettük, 125-800 m/z tartományban és 35000 FWHM felbontáson, polaritás váltással. A kapilláris hőmérséklet 320 °C, a maximum injektálási idő 100 ms volt. Az elektrospray 3,8 és 4,0 kV feszültségen üzemelt negatív és pozitív ion módokban.

A glükozinolátok mennyiségi meghatározásához négy, a tormában nagyobb mennyiségben jelenlévő glükozinolátból (szinigrin, glükonaszturtiin, glükobrasszicin, glükoiiberin) képeztünk egy négyponthoz kalibrációs egyenest, 0,01-5 µg mL⁻¹ koncentráció tartományban. A kvantifikációs mérések a fentebb bemutatott műszeren zajlottak, az alábbi módosításokkal. Kinetex XB-C₁₈ kolonnát használtunk (100 mm × 2.1 mm × 2.6 µm), mely 30 °C-on volt termosztálva, az áramlási sebesség 0,25 mL perc⁻¹ volt. A gradiens program a következő volt (A oldószer, víz + 0,1% hangyásav; B oldószer, acetonitril + 0,1% hangyásav): 0-2 perc, 5% B; 2-5 perc, 25% B; 5-6 perc, 60% B; 6-7 perc, 100% B; 7-9 perc, 100% B; 9-10 perc, 5% B, 10-18 perc, 5% B. A tormaminták 200× hígításából és kalibrációs egyenes mintákból 1-1 µL-t injektáltunk. Az Orbitrap negatív ion módban működött a kvantifikációs mérések során, a kapilláris hőmérséklete 320 °C volt, az elektrospray feszültsége 3,8 kV, az m/z tartomány 150-1000-re, a felbontás 70,000 FWHM-re volt állítva. A maximális injektálási idő 100 ms volt.

4.2.3.2. Minőségi ellenőrzéseken átesett vegyületjelöltek MS/MS analízise

Valamennyi, a további analízisek szempontjából jelentős vegyületjelölt célzott fragmentálása hasonló paraméterekkel zajlott, kivéve a tömegtartományt, melyet lecsökkentettünk annak érdekében, hogy csak olyan ionokat vizsgáljunk, melyeket az “inclusion list” tartalmazott; a pozitív és negatív ion módból származó adatokat külön vettük fel. A fragmentációra kijelölt vegyületjelöltek listáját olyan jelöltek alapján alkottuk meg amelyek átmentek a QC (minőségellenőrzési) szűréseken (3.2.3.4. alfejezet), majd a listát inclusion list-ekre bontottuk úgy, hogy maximum 5 ko-eluálódó vegyületjelölt került egy listára, ezáltal jó lefedettséget biztosítva. A listák átfedései alapján a legintenzívebb 2-5 vegyületjelöltet választottuk ki fragmentációra 30 normalizált ütközési energián (NCE, normalized collision energy), az ion gyűjtési idő legfeljebb 250 ms volt.

4.2.3.3. Csúcsdetektálás

A mérési nyersfájlokat mzXML formátumba konvertáltuk, majd az XCMSOnline 2.7.2 (XCMS 1.47.3) platform segítségével elemeztük (Gowda et al., 2014). A vegyületjelölt

detektálás alapvetően az alapértelmezett Orbitrap beállításokkal zajlott, néhány kisebb módosítással. A glükozinolátok mennyiségi kiértékeléséhez a korábban említett négy pontos kalibrációs egyenest használtuk minden olyan glükozinolátra, amelyek mennyisége a kalibráció lineáris tartományába esett. Ilyen esetekben az mzMine 2.53 (Pluskal et al., 2010) szoftverben végeztünk célzott csúcsetektálást.

4.2.3.4. Metabolomikai mérések minőségellenőrzése QC mintákkal

A metabolomikai mérésekre szánt QC (quality control) mintákat a “hosszú távú referencia minták” elvén (Dudzik et al., 2018; Evans et al., 2020) készítettük el, mely elv szerint ha hosszabb távon (akár több éven keresztül) vizsgálunk hasonló mintákat, akkor egy olyan mintakeveréket szükséges készítenünk, amely hasonló mátrixot tartalmaz mint a vizsgálandó mintáink és kémiaiilag stabil állapotban tartható a vizsgálataink teljes időtartama alatt. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy minden kezelésből, mintatípusból vagy fajtaból egységnyi térfogatot összekeverünk, feltételezve, hogy ez a mintakeverék a későbbi években gyűjtött mintáink kémiai variabilitást is lefedi, majd ezt a keveréket olyan körülmények között tároljuk, hogy stabil maradjon pl.: folyékony nitrogén alatt. Így válik lehetővé szenderdek alkalmazása nélkül az olyan szekvenciák nyers adatainak összevonása, amelyek mérése között akár évek (és az ezzel járó műszerújrahangelások, stb.) telnek el. A módszer hátránya, hogy ha jövőbeli vizsgálataink során olyan kezeléseket alkalmaznánk melyek jelentősen befolyásolhatják a minták kémiai összetételét vagy újabb fajtaból, mintavételi területekről származó mintákat is bevonnánk, akkor elégtelen lehet a vegyületek lefedettsége, és ilyenkor új QC mintákat kell készítenünk, amelyek a teljes kísérleti variabilitást lefedik. Ilyen probléma elméletileg kialakulhat erős évhatás esetén is.

Ennek értelmében a 2018-as Fényestelepi fajtaból (23 összesen) és a 2019-es Halápi mintavételi pontokból (13 összesen) egy-egy mintának a tömény kivonatait kevertük össze, majd a keverékből 50 mL-t szétpipettáztunk 2 mL fagyasztócsövekbe és folyékony nitrogénben tároltuk azokat további felhasználásig. Minden egyes mérési szekvenciához 2 mL QC mintát hagytunk felolvadni, majd annak 10× hígításával alkottunk QC mintákat a mérés előtt.

4.2.3.5. Mintaelrendezés és randomizálás

Az LC-MS szekvenciák mindig oldószer vakkal kezdődtek (Evans et al., 2020) egy mosó (MeOH) injektálása után. Ezt követte 2 QC minta, majd egy 3 pontos QC linearitás mintasorozat (25x, 10x és 5x hígítású QC minták), további 4-6 QC minta, ezek után pedig a valódi minták következtek, minden 6-7 injektálás után egy-egy QC mintát beiktatva. A

szekvencia elején jelenlévő számos QC minta a kolonna ekvilibrálását teszi lehetővé, stabilizálva a retenciós időket (Dudzik et al., 2018). A valódi minták minden esetben randomizált sorrendben voltak injektálva (Evans et al., 2020).

4.2.3.6. Vegyületjelölt szűrési kritériumok

Az izotóp és addukt vegyületjelöltek eltávolítása után, a QC minták integrálásából származó értékek alapján olyan jelöltekkel dolgoztunk a továbbiakban, melyek megbízható linearitással és pontossággal voltak mérhetők. Ezután minden olyan vegyületjelöltet eltávolítottunk, amelyek relatív szórása (RSD) több volt mint 30% (Dunn et al., 2011), továbbá egy kevésbé gyakran alkalmazott filtert is használtunk, hogy meggyőződjünk a vegyületjelöltekből származó jelek és azok koncentrációja közötti erős lineáris kapcsolatról. Ezt minden RSD-szűrőn átmert vegyületjelölten elvégeztük azáltal, hogy Pearson-korrelációval kiértékeljük az abundancia és a koncentráció értékek közötti linearitást. Ehhez egy QC linearitási mintasorozatot (hígítási sor, a legtöményebb QC minta kétszer töményebb volt, mint a valódi minták) és egy vak mintát használtunk. Ezzel csak olyan vegyületjelölteket tartottunk meg, amelyek lineárisan reagáltak a hígítási tartományon belül (Broadhurst et al., 2018). Csak az $R^2 > 0,8$ értékű vegyületjelölteket tartottuk meg a további analízisekhez, így a vak mintákban jelentős mennyiségben jelenlévő jelölteket is elvetettük.

4.2.3.7. Érzékenységi driftek korrekciója

Az adatokra végezett egy LOESS (locally estimated smoothing) függvényt illesztettünk, minden vegyületjelöltre külön-külön, a QC minták alapján (Dunn et al., 2011). Az ismert értékek (QC-k) közötti feltételezett elméleti érzékenységeket az illesztett görbével külön-külön minden egyes metabolitra kiszámítottuk, és a valódi minták vegyületjelölt intenzitásait ezekkel az értékekkel korrigáltuk. Gyakorlatilag ez minden abundancia értéket “fold-change” értéként fejez ki, ahol a referencia (1,00) az átlag-mintában, a QC-mintában lévő vegyületjelölt abundanciája. Ez az eljárás lehetővé teszi azt is, hogy hónapok elteltével lemerített szekvenciákat összevonhassunk és egyben elemezhessünk, sztenderdek alkalmazása nélkül. Az extrahált növényi anyagok száraztömegével ezután korrigáltunk.

4.2.3.8. Vegyületek azonosítása vagy hozzávetőleges azonosítása

Az MS^2 spektrumokat a nyers mérési fájllokból a CluMSID csomag (Depke et al., 2019) segítségével gyűjtöttük be. Minden egyes vegyületjelölt esetében a 10 legstabilabb MS^2 spektrumot használtuk fel egy konszenzus spektrum létrehozásához, melyet exportáltunk R-

ből, majd annotálás céljából importáltunk a SIRIUS 4.9.9 (Dührkop et al., 2019) programba. Ezt követően a SIRIUS CSI:FingerID és CANOPUS algoritmusait (Djoumbou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021, 2015) használtuk a szerves vegyületek feltehető szerkezetének, illetve a Classyfire hierarchikus osztályainak (Djoumbou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021) meghatározásához, minden egyes vegyületjelöltre külön-külön. A SIRIUS által adott javaslatokat manuálisan is értékeltük szakirodalmi adatok alapján, arra törekedve, hogy elérjük a Metabolomic Standards Initiative (MSI) 2. azonosítási szintjét.

4.2.4. Gombaközösségek metagenomikai vizsgálata

4.2.4.1. Genomi DNS extrakció

Növényi minták esetében a genomi DNS kivonatokat E.Z.N.A. Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA) kitek segítségével készítettük el, kb. 10 mg liofilizált növényi mintát felhasználva. Talajmintákból E.Z.N.A. Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc.) felhasználásával készültek genomi DNS kivonatok, kb. 100 mg nyers talajmintából. Az extrakciókat a gyártó által mellékelt használati útmutató alapján végeztük minden esetben. A DNS extrakciós protokollt üres mikrocentrifuga csöveken és üres mintatartó edényeken is elvégeztük mindkét fajta izoláló kittel, ezzel előállítva a szekvenálás során használható negatív kontroll mintákat. Az összes torma genomi DNS kivonatból egy ekvimoláris keveréket készítettünk, hasonlóan a metabolomikai QC mintákhoz, annak érdekében, hogy ezzel megvizsgálhassuk, hogy a szekvenálási torzítás (Schirmer et al., 2015) mennyire befolyásolhatja megegyező minták ASV (amplicon sequence variant) összetételét. A kivonatok DNS koncentrációját Nabi UV/Vis Nano (MicroDigital Co., Seongnam, Dél-Korea) spektrofotométerrel határoztuk meg.

4.2.4.2. Univerzális gomba ITS primerek ellenőrzése tormamintákban

A szakirodalomban már számos ITS primer párt leírtak (Toju et al., 2012), melyek alkalmasak lehetnek a gombaközösség feltárására különböző növényi mintákból (Toju et al., 2019). A tormában található gombák effektív azonosításához meg kellett győződnünk arról, hogy ezek a primerek a torma ITS, vagy más szekvenciáit csak nem zavaró mértékben amplifikálják. Ennek vizsgálatához *in vitro* torma klónok teljes ITS, továbbá ITS1 és ITS2 szekvenciáit amplifikáltuk ITS1-F_KYO2 (Toju et al., 2012) és ITS4 (White et al., 1990), ITS1-F_KYO2 és ITS2_KYO2 (Toju et al., 2012), valamint ITS3_KYO2 (Toju et al., 2012) és ITS4 primerpárokkal.

4.2.4.3. Primer tervezés

Annak érdekében, hogy egy olyan specifikus primerpárral rendelkezünk, amely nem kötődik a torma ITS2 régiójában, de valamennyi Ascomycota, Basidiomycota taxonra specifikus, egy új forward primert terveztünk a már meglévő ITS4_KYO3 (5' - CTB TTV CCK CTT CAC TCG - 3') (Toju et al., 2012) reverz primerhez. A DECIPHER R csomag (Wright, 2020) segítségével illesztést végeztünk korábban leírt torma eredetű gombák (Szűcs et al., 2018) és releváns növények (pl.: *Armoracia*, *Daucus*) ITS szekvenciáiból, és a konszenzus szekvencia részletek alapján új primer jelölteket kerestünk. A gyakorlati szempontból használható olvadási hőmérsékletet mutató primer jelölteket további *in silico* analíziseknek is alávetettük. Az általunk tervezett forward primereket az ITS4_KYO3 reverz primerrel kombinálva egy már korábban leírt (Toju et al., 2012) PCR protokoll alapján teszteltük *in vitro* torma klónok és különböző gombák gDNS-én. Vizsgálataink szerint a legjobban teljesítő primer jelölt az 5' – TTT CAA CAA CGG ATC TCT T – 3' volt, továbbiakban "ITS3_NOHR". A primer teljesítményét *in silico* is értékeltük a UNITE 8.3 fungi ITS adatbázist (Abarenkov et al., 2021a) felhasználva, majd egy előzetes Illumina szekvenálás segítségével.

4.2.4.4. Szekvenálási könyvtárkészítés és szekvenálás

Mind a növényi, mind a talaj- és "QC" minták esetében az ITS2 régiót amplifikáltuk az ITS4_KYO3 és az általunk fejlesztett ITS3_NOHR primerrel. A primerpárok a megfelelő Illumina adaptert is tartalmazták (5' - TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG - 3' forward primernél és 5' - GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G - 3' reverz primernél. A primereket a Geneti Biotech szintetizálta (Hradec Králové, Cseh Köztársaság). A PCR reakciókeverék az alábbiakat tartalmazta egy minta esetében: 5 µL genomi DNS (5 ng µL⁻¹ koncentráció), 5-5 µL forward és reverz primer (1 µM) és 12,5 µL 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Basel, Svájc). Az amplifikálás ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) műszerrel és az alábbi hőprogrammal történt: denaturáció 95 °C 10 perc, 35 amplifikációs ciklus (94 °C 20 másodperc, 50 °C 30 másodperc, 72 °C 20 másodperc), végezetül 72 °C 7 perc. A második, indexelési PCR reakció a Nextera XT Index Primer 1 felhasználásával zajlott (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), az alábbi hőprogram szerint: denaturáció 95 °C 3 perc, 8 amplifikációs ciklus (95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 20 másodperc), 72 °C 5 perc. Minden PCR reakció után tisztítva lettek az amplikonok AMPure XP gyöngyökkel (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). A könyvtárak DNS koncentrációját Qubit fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztuk meg, a

minőségellenőrzés BioAnalyzer DNA 1000 Chip segítségével történt (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). A könyvtárakból ekvimoláris keveréket szekvenáltunk Illumina MiSeq platformon MiSeq Reagent Kit V3 felhasználásával (2×300 bázispár hosszú paired-end leolvasás, 600 ciklus). A primerek teljesítményének vizsgálatakor a pilóta szekvenálás MiSeq Reagent Kit Nano V2 felhasználásával történt (150 bp hosszú paired-end leolvasás, 150 ciklus). Mivel gyakorlatilag minden laborfelület és felhasznált anyag DNS kontaminációt tartalmazhat, továbbá a DNS tisztító kitek is jellegzetes mikrobiommal (“kitom”) rendelkezhetnek, ezért kifejezetten ajánlott negatív kontroll minták szekvenálása is (Hornung et al., 2019). Emiatt mi is előállítottunk számos kontroll mintát a növényi és talaj DNS extrakciós kitekkel azáltal, hogy az extrakciót üres csöveken hajtottuk végre az extrakciós protokollnak megfelelően, majd az így kapott “vak” mintákat minden további könyvtárépítési folyamaton végigvittük és szekvenáltuk a valódi mintákhoz hasonlóan. A könyvtárépítési és szekvenálási munkákat a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai végezték.

4.2.4.5. Metagenomikai adatok analízise

Szekvenálás után az adatokat demultiplexáltuk, majd FASTQ fájlokat generáltunk az Illumina BaseSpace Sequence Hub szolgáltatásával. Minden további szekvenciaelemzést R-ben végeztünk (R Core Team, 2023) a DADA2 csomag (Callahan et al., 2016) segítségével. Optimalizálás után az első 18, 19 és az utolsó 15, 60 nukleotidot levágtuk a forward és reverz leolvasásokról (“read”) a “filterAndTrim” függvénnyel annak érdekében, hogy eltávolítsuk a primerekhez tartozó, illetve az alacsony minőségű szekvenciariészleteket, továbbá minden olyan leolvasás eltávolításra került ahol a várható hiba (expected error) több volt mint 2 vagy kétértelmű N nukleotidot tartalmazott (filterAndTrim paraméterek: maxEE = 2, maxN = 0, trimLeft = c(18, 19), trimRight = c(15, 60), truncQ = 2). A szűrés után a DADA2 által használt hibamodelleket randomizált mintavétellel (randomize = TRUE), majd a leolvasásokat dereplikáltuk és a DADA2 induktív statisztikai algoritmusát használtuk az alapértelmezett paraméterekkel. A szűrt, zajmentesített paired-end leolvasás párokat egyesítettük amennyiben volt legalább 20 nukleotidnyi átfedés közöttük. A nem egyesíthető párok forward szekvenciáit is megtartottuk a további analízisekhez, ugyanis számos gombanemzetség hosszabb ITS2 szekvenciákkal rendelkezhet (Pauvert et al., 2019). A DADA2 szerzőinek javaslatára a metagenomikában gyakran használt OTU-k (Operational taxonomic unit) helyett ASV-kkel (amplicon sequence variant) dolgoztunk, mivel sokkal előnyösebbek, ha különböző szekvenálási futtatások adatait szeretnénk összevonni (Callahan et al., 2017), illetve könnyebb

megkülönböztetni a kontroll mintákban azonosított egyedi szennyező szekvenciákat. Az egyes negatív kontroll mintákban azonosított összes ASV elvetése nem lenne célszerű, mivel ez biológiailag érvényes szekvenciák eltávolítását is eredményezheti, ami megnehezíti az adatok biológiai értelmezését (Nguyen et al., 2015). Ebből kifolyólag a negatív kontroll mintákban legalább 25 leolvasással és legalább 0,5%-ban jelenlévő ASV-ket távolítottuk csak el az analízisekből. A taxonómiai hozzárendelést egy “Naive Bayesian” klasszifikációs algoritmussal végeztük el, a DADA2 “assignTaxonomy” függvényével. A klasszifikációs algoritmus a UNITE 8.3 Fungi ITS adatbázis (Abarenkov et al., 2021a) alapján végezte a hozzárendelést. Ezután minden olyan ASV-t szűrtünk amely nem érte el a minimum 80%-os bootstrap konfidencia szintet vagy ha legfeljebb “Kingdom” taxonómiai szinten tudta azonosítani az algoritmus. Azért, hogy meggyőződjünk a módszer megbízhatóságáról, az előzetesen szűrt ASV-ken NCBI BLASTn keresést is végeztünk a szigorúbban ellenőrzött, de jelentősen kisebb méretű RefSeq adatbázisban, majd a kapott találatok taxonómiai információi alapján manuális ellenőriztük a DADA2 általi taxonómiai hozzárendeléseket.

4.2.4.6. Metagenomikai adatok diverzitás metrikáinak elkészítése

A minták alfa- és béta-diverzitásának jellemzésénél és összehasonlításánál a minták típusát (fényestelepi vagy halápi torma, répa, talaj) és a fajtákat (fényestelepi torma) vettük figyelembe. A minták taxonómiai gazdagságát az ACE-index segítségével becsültük meg. A minták diverzitását a Shannon-, a Dominance (Simpson) és a Buzas & Gibson-féle egyenletességi indexekkel határoztuk meg. A fent említett csoportok taxonómiai gazdagságának és diverzitásának statisztikai összehasonlítására Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A béta-diverzitást a Bray-Curtis hasonlóság, a Whittaker-diverzitás és a súlyozatlan UniFrac távolság segítségével becsültük meg. A béta-diverzitást a hasonlóság vagy távolság értékek alapján főkoordináta-elemzéssel (PCoA) ábrázoltuk. Egyirányú hasonlósági elemzést (ANOSIM) is végeztünk a csoportokon belüli és a csoportok közötti különbségek meghatározására. A szignifikánsan eltérő csoportok esetében a SIMPER (Clarke, 1993) segítségével határoztuk meg a különbözőségért felelős taxonómiai egységeket. Valamennyi elemzést a Past v4.09 (Hammer et al., 2001) szoftverben végeztük el, kivéve a súlyozatlan UniFrac-elemzést, melyet R-ben. Mivel várható volt, hogy a mintákban filogenetikailag diverz fajok is előfordulnak, a filogenetikai faépítés megbízhatóságának a tesztelésére 200 ASV-ből álló véletlenszerű mintasorozatot választottunk. Az előzetes tesztekhez a Phylogeny.fr platformon (Dereeper et al., 2008) egy filogenetikai munkafolyamatot építettünk fel, amely az illesztésekhez a MUSCLE (Edgar, 2004), az illesztések kurálásához a GBLOCKS (Castresana,

2000), a filogenezisekhez pedig a PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) programokból állt. A szubsztitúciós modellek kiválasztása az SMS (Lefort et al., 2017) segítségével történt. Az Akaike kritérium (18516,25156) szerint a legjobb modell a GTR+G+I volt. A létrehozott fák megbízhatóságát az aLRT (SH-szerű) (Anisimova and Gascuel, 2006) segítségével becsültük meg. A súlyozatlan UniFrac-elemzést R-ben (R Core Team, 2023) végeztük el a phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) csomag segítségével, a GTR+G+I szubsztitúciós modell alapján a phangorn (Schliep, 2011) csomag segítségével konstruált filogenetikai fán, amely a DECIPHER (Wright, 2020) csomagban implementált algoritmussal készített illesztésen alapult.

4.2.4.7. Metagenomikai és metabolomikai adatok közötti korrelációk keresése adatbányászati módszerekkel

Minden további analízist R-ben (R Core Team, 2023) végeztünk. A downstream analízisek előtt az azonos taxonómiai hozzárendelésű ASV-ket összevontuk, és az egyes poolokon belüli egyedi ASV-k számával a továbbiakban nem foglalkoztunk. Az adatokat a törzs, rend és nemzetség szintjén összevont abundanciák alapján, valamint a diverzitás metrikák (amelyeket korábban a nyers, nem összevont ASV-kből számítottunk) szerint értékeltük. Amennyiben a taxonómiai hozzárendelés bootstrap konfidencia értéke nem érte el a legalább 80%-os értéket, tehát nem volt megbízható a hozzárendelés nemzetség szinten, abban az esetben a legalacsonyabb megbízható szintet használtuk. Ez utóbbi számos ASV esetében vegyes azonosítási szinteket eredményezett. A metagenomikai és metabolomikai vegyületjelöltek korrelációs elemzését csak a fényestelepi fajták adathalmazán belül ($n = 8 \times 2 \times 4$), míg a mintacsoportok közötti közösségi különbségeket mind a fajták, mind a sárgarépa és talajminták, illetve a halápi tormák felhasználásával vizsgáltuk.

A metagenomikai adatok kompozíciós (“compositional”) természetűek, ennél fogva clr-transzformációt (“center log ratio”) szükséges elvégezni az adatokon (Gloor et al., 2017). Clr-transzformálás előtt a nulla értékek imputálását (behelyettesítés egy meghatározott értékkel) végeztük el, a nyers adatokban nullák aránya 71,7%, 79,3% és 90,8% volt törzs, rend és nemzetség szinteken. Az imputálási paramétereket az alapján optimalizáltuk, hogy a lehető legtöbb leolvasást meg tudjuk tartani. Optimalizálás után a nullák cseréjét “Bayesian-Multiplicative” módszerrel a zCompositions csomagban (Palarea-Albaladejo and Martín-Fernández, 2015) található függvények segítségével végeztük el, majd végezetül az adatok clr-transzformációja következett a compositions csomagban (Boogaart et al., 2022) található függvényekkel (Gloor et al., 2017).

Az egyes mintacsoportok és fajták közötti szignifikáns különbségeket a főkomponens regresszió módszerével határoztuk meg. Ehhez az autoskálázott (szórással osztott adatokból kivonjuk az átlagot, így 0 átlag és 1 variancia jellemzi őket) kémiai adatokat (Van Den Berg et al., 2006) vagy a clr-transzformált gomba abundancia adatokat szórványos főkomponens analízisnek (sparse principal component analysis, sPCA) vetettük alá. A kémiai, illetve a gomba abundancia adatok esetében a főkomponensek száma 12, illetve 6 volt. Statisztikai teszteket csak azokon a főkomponenseken végeztünk, melyek az adathalmaz teljes varianciájának legalább 2,5%-os szórását lefedték, az ilyen főkomponenseket ANOVA modellekkel vizsgáltuk R-ben.

Az sPCA-pontszámok vagy a megfelelően skálázott adatok közötti Spearman-féle korrelációkat a `cor.test` függvény segítségével számoltuk ki R-ben. A négy megközelítés a következő volt: "rawcordf", korreláció az egyes gombák abundancia és a vegyületjelöltek abundancia adatai között; "p2cordf", korreláció az egyes gombák sPCA pontszámai és a vegyületjelöltek sPCA pontszámai között; "p1cordf_f", korreláció az egyes gombák sPCA pontszámai és a vegyületjelöltek abundancia adatai között; "p1cordf_c", korreláció az egyes gombák abundancia és a vegyületjelöltek sPCA pontszámai között. A gomba abundancia adatok mindhárom szintjén (törzs szinten aggregált, rend szinten aggregált, nemzetség szintű) kerestünk korrelációkat. A diverzitási adatokat csak a "rawcordf" megközelítéssel vizsgáltuk. $N = 250$ -nél minden korrelációs értékre konfidenciaintervallumot is számítottunk. A nyers korrelációkat a "rawcordf" megközelítésben a hozzávetőlegesen azonosított vegyületekre vagy a relatív szórás $> 0,66$ értékekkel rendelkező jellemzők között határoztuk meg.

Valamennyi statisztikai tesztből származó p -értéket Benjamini-Hochberg korrekciónak vetettük alá ($n = 18004$), "False discovery rate" (FDR) korrekció végett.

5. Eredmények

5.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torma-asszociált gombák gőzterében

5.1.1. Endofiton és talajgomba izolátumok azonosítása

Inkubációs kísérleteink elvégzése előtt szükségünk volt a gombaizolátumok taxonómiai besorolására. A markergének, gombák esetében leggyakrabban az ITS, szekvenálása manapság már egy olcsó és könnyen kivitelezhető eljárás, amellyel nagyon sok környezeti gombaizolátum legalább nemzetség szinten azonosítható bioinformatikai adatbázisok segítségével. Munkánk során összesen 43, tormaából izolált endofiton, illetve talajgombatörzset vizsgáltunk, amelyeket legalább nemzetség szinten tudtunk azonosítani (1. táblázat).

1. táblázat. Az azonosított torma endofiton és talajgomba izolátumok listája.			
Izolátum	Nemzetség	Eredet	Szekvenált gén(ek)
E1	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	torma endofiton	ITS, eF1
E2	<i>Macrophomina phaseolina</i>	torma endofiton	ITS, β -tubulin
E3	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	torma endofiton	ITS, eF1
E4	<i>Setophoma terrestris</i>	torma endofiton	ITS, α -actin
E5	<i>Paraphoma radicina</i>	torma endofiton	ITS, α -actin
E6	<i>Paraphoma radicina</i>	torma endofiton	ITS, α -actin
E7	<i>Oidiodendron cerealis</i>	torma endofiton	ITS
E8	<i>Fusarium</i> sp.	torma endofiton	ITS
E9	<i>Fusarium</i> sp.	torma endofiton	ITS
E10	<i>Fusarium</i> sp.	torma endofiton	ITS
E11	<i>Plectosphaerella</i> sp.	torma endofiton	ITS
E12	<i>Plectosphaerella</i> sp.	torma endofiton	ITS
E13	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	torma endofiton	ITS
E14	<i>Volutella</i> sp.	torma endofiton	ITS
E15	<i>Phomopsis</i> sp.	torma endofiton	ITS

E16	<i>Cadophora</i> sp.	torma endofiton	ITS
E17	<i>Colletotrichum</i> sp.	torma endofiton	ITS
S1	<i>Notophoma</i> sp.	talaj	ITS
S2	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S3	<i>Curvularia</i> sp.	talaj	ITS
S4	<i>Curvularia</i> sp.	talaj	ITS
S5	<i>Curvularia</i> sp.	talaj	ITS
S6	<i>Aspergillus</i> sp.	talaj	α -actin
S7	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S8	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S9	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S10	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S11	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S12	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S13	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S14	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S15	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S16	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S17	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S18	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S19	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S20	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S21	<i>Paraphoma</i> sp.	talaj	ITS
S22	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S23	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS
S24	<i>Aspergillus</i> sp.	talaj	calmodulin
S25	<i>Fusarium</i> sp.	talaj	ITS
S26	<i>Penicillium</i> sp.	talaj	ITS

5.1.2. Gombák gőzteréből azonosított illékony szerves vegyületek (VOC)

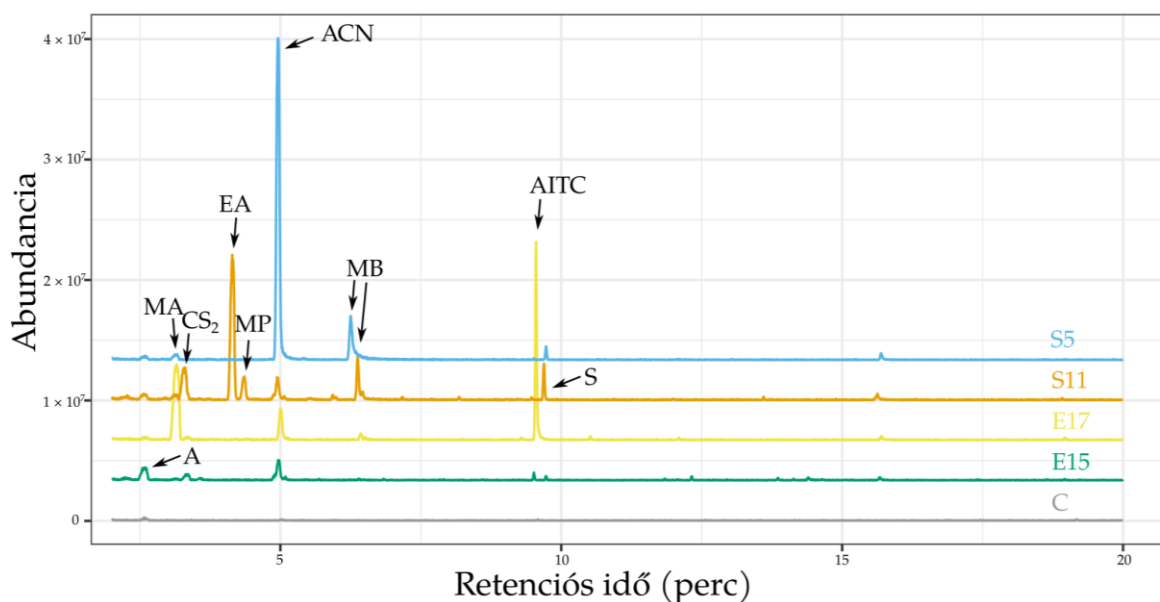
A vizsgálandó gombák nagy száma miatt egy olyan agarfilmes eljárást dolgoztunk ki, amely lehetővé tette több tíz különálló tenyészet párhuzamos inkubálását és kémiai vizsgálatát. Az egyes gombatenyészetek gőzteréből számos vegyületosztályba tartozó VOC-ot tudtunk azonosítani, köztük észtereket, rövid szénláncú alkoholokat, egy rövid szénláncú savat, egy aromás vegyületet, egy monoterpént, valamint több kéntartalmú VOC-ot és nitrileket, utóbbiak feltételezhetően a tormakivonatban megtalálható glükozinolatokból származnak. Számos vegyület spektrumát és retenciós idejét standard vegyületekével is össze tudtuk hasonlítani, a többi vegyületet NIST spektrumkönyvtári keresés alapján hozzávetőlegesen azonosítottuk (2. táblázat).

2. táblázat. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből, headspace GC-MS-el azonosított illékony szerves vegyületek (VOC). NIST azonosítás esetén a "Similarity Score" abból a mintából származik ahol az adott vegyület a legjobb jel-zaj aránnyal volt detektálható.

Retenciós idő (perc)	Legabundánsabb csúcsok (m/z)	Vegyület	Vegyületosztály	Azonosítás módszere (Similarity Score, találat pontossága)
2,09	60	Metil-formiát	észter	standard
2,58	58	Aceton	keton	standard
2,88	62	Dimetil-szulfid	kéntartalmú szerves vegyület	standard
2,99	74	Metil-acetát	észter	NIST (926)
3,14	76	Szén-diszulfid	kéntartalmú sz.v.	standard
3,58	60	Ecetsav	szerves sav	NIST (661)
4,20	61, 70, 88	Etil-acetát	észter	standard
4,42	56, 74	Metil-1-propanol	alkohol	NIST (818)
5,02	52, 67	Allil-cianid	nitril	standard
6,03	57	Etil-propionát	észter	NIST (762)
6,09	61, 73	Propil-acetát	észter	NIST (711)
6,49	55, 57, 70	Metil-1-butanol, 1. izomer	alkohol	NIST (880)

6,55	55, 57, 70	Metil-1-butanol, 2. izomer	alkohol	NIST (908)
9,32	72, 99	Metil-1-butanol-acetát	észter	NIST (703)
9,58	60, 72, 99	Allil-izotiocianát	kéntartalmú sz.v.	standard
9,80	104, 78, 51	Sztirol	aromás	NIST (855)
11,17	51, 77, 106	Benzaldehid	aromás	NIST (819)
12,41	77, 93, 136	β -fellandré	monoterpén	NIST (852)
15,85	65, 91, 131	Fenil-propionitril	nitril	standard
19,18	65, 91, 163	Fenetil-izotiocianát	kéntartalmú sz.v.	standard

Az azonosított vegyületek közül a fenetil-izotiocianát, fenil-propionitril, allil-izotiocianát és allil-cianid egyértelműen glükozinolát eredetű bomlástermékek. Ezeken felül további 2 kéntartalmú vegyületet is azonosítottunk, melyek feltételezhetően szintén glükozinolát eredetűek. Mindezek mellett hat észter vegyület, az etil-acetát, etil-propionát, metil-1-butanol acetát, metil-acetát, metil-formiát és propil-acetát jelenlétét is sikerült kimutatnunk. Más vegyületosztályokba tartozó vegyületek között megemlítendő két aromás vegyület (benzaldehyd, sztirol), egy szerves sav (ecetsav), egy keton (aceton) és egy monoterpén (β -fellandré). 18 csúcsot nem sikerült azonosítanunk, elsősorban az alacsony jel-zaj arány miatt, ami alacsony “Similarity Score” pontszámot eredményezett. Az 2. ábrán látható néhány reprezentatív kromatogram különböző gombák gőzteréből, a fontosabb azonosított csúcsokkal megjelölve.



2. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből származó teljes ionkromatogramok (TIC). Kromatogramok alulról felfelé: C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E15 - *Phomopsis* sp. torma endofiton gomba; E17 - *Colletotrichum* sp. torma endofiton gomba; S11 - *Fusarium* sp. talajgomba; S5 - *Curvularia* sp. talajgomba. Rövidítések: A - aceton; ACN - allil-cianid; AITC - allil-izotiocianát; CS₂ - szén-diszulfid; EA - etil-acetát; MA - metil-acetát; MB - metil-1-butanol (mindkét izomer); MP - metil-1-propanol; S - sztirol.

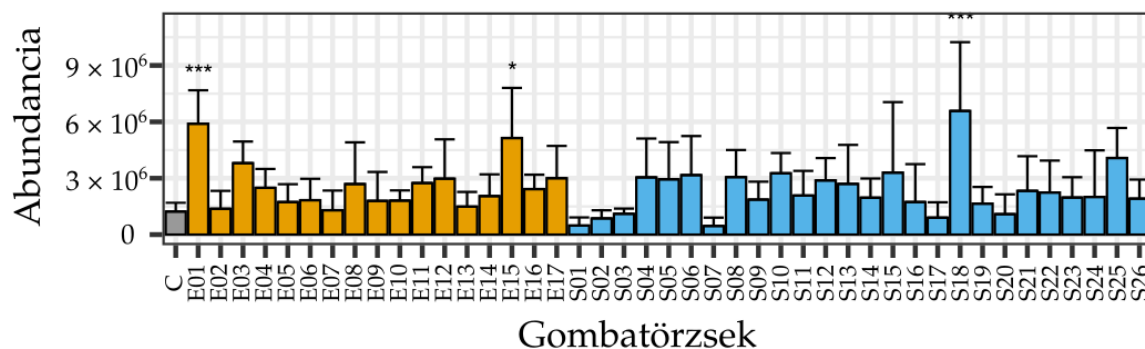
Korábbi vizsgálataink során (Szűcs et al., 2018) már megpróbáltuk detektálni, sikertelenül, az allil-cianid jelenlétét gombák gőzteréből egy aktívszenes-deszorpciósi módszerrel. A jelen dolgozatban is leírt inokulációs módszerünk azonban kiválóan alkalmas volt az említett vegyület detektálására. Továbbá fontos megemlíteni, hogy a malátakivonatot tartalmazó táptalajon növe gombák gőzteréből nem detektáltunk kén tartalmú bomlástermékeket, ezzel is igazolva, hogy glükoszínolát eredetűek.

5.1.3. Gombák VOC mintázatai

Mint láhattuk, számos gomba gőzteréből azonosítottunk alkoholokat, észtereket és glükoszínolát bomlástermékeket, de fontos megemlítenünk, hogy ezek a vegyületek kontroll, inokulálatlan tormakivonat gőzterében is jelen voltak nyomnyi mennyiségben, mely azt jelentheti, hogy spontán bomlás eredményeképp is létrejöhetnek. Azonban, jelentős számú

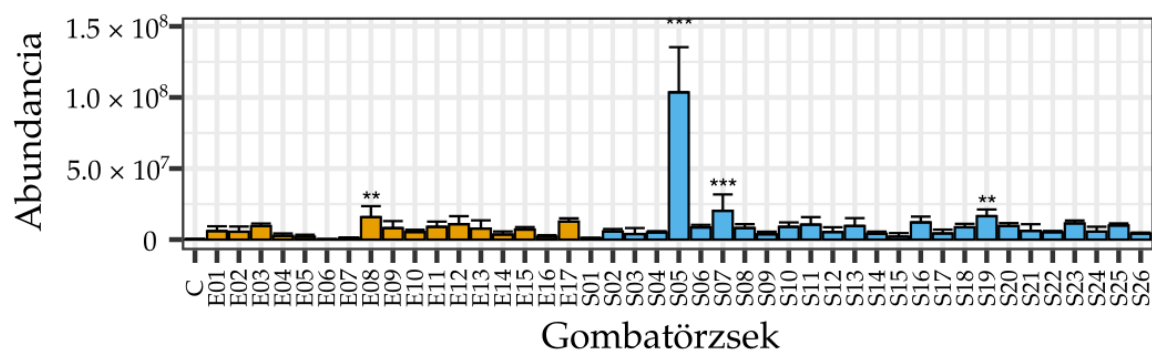
endofiton és talajgomba szignifikánsan nagyobb mennyiségben termelte ezeket a vegyületeket a kontrollhoz viszonyítva.

Az aceton esetében a leginkább kiemelkedő törzsek az E1 - *Fusarium oxysporum*, E15 - *Phomopsis* sp. és S18 - *Penicillium* sp. voltak, ezek szignifikáns mennyiségű acetont állítottak elő (3. ábra), mely egy gyakran előforduló VOC gombákban, pl. az endofiton *Muscodor albus*-ban (Strobel, 2011).



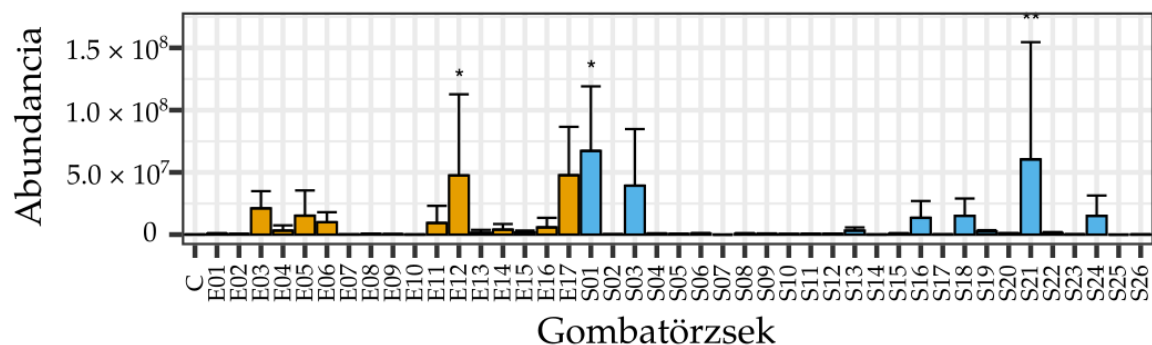
3. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált aceton mennyisége. C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A kontrollhoz képest szignifikánsan több allil-cianid számos *Fusarium* sp. törzs (E8, S7 és S19) gőzterében volt detektálható, illetve egy *Curvularia* talajgomba esetében (S5) (4. ábra).



4. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált allil-cianid mennyisége. C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

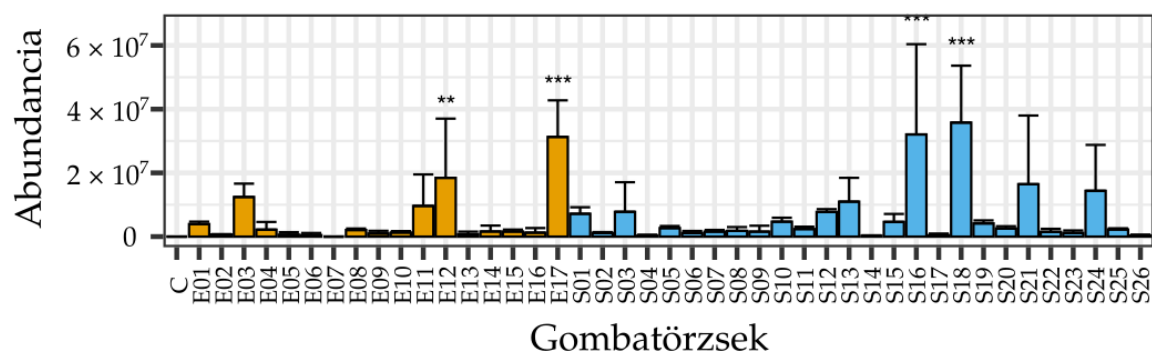
A torma fő glükozinolátjának, a szinigrin bomlásának terméke, az allil-izotiocianát 3 gomba gőzteréből volt szignifikánsan nagyobb mennyiségben detektálható a kontrollhoz képest, E12—*Plectosphaerella* sp., S1 - *Notophoma* sp. és S21 - *Paraphoma* sp. esetében (5. ábra), de számos esetben detektálható volt relatíve nagy szórással.



5. ábra. Tormakivonat inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált allil-izotiocianát mennyisége. C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

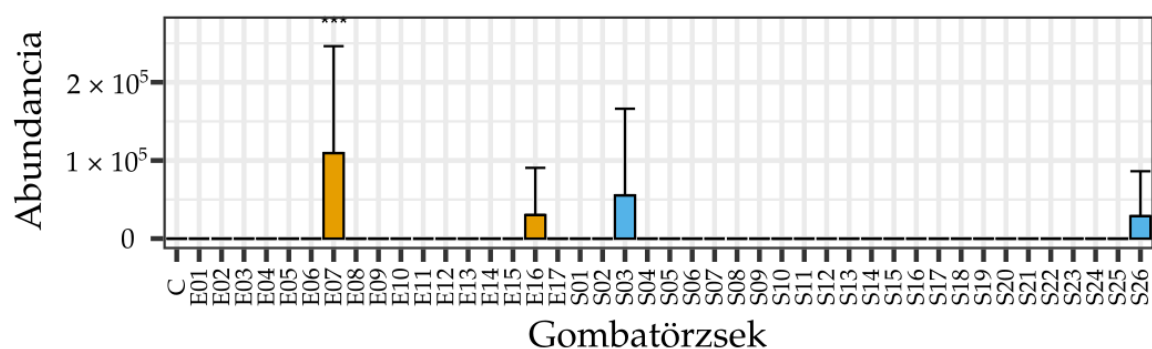
A kontroll minták (inokulálatlan tormakivonat) gőzterében számos vegyület nem volt jelen, köztük a benzaldehid, β -fellandrén, dimetil-szulfid, ecetsav, etil-acetát, etil-propionát, metil-1-butanol, metil-1-butanol-acetát, metil-1-propanol, metil-acetát, metil-formiát, propil-acetát, szén-diszulfid és sztirol. Ez alapján bizonyos, hogy a gombák állították elő ezeket az inkubációs során.

A kéntartalmú VOC-ok közül a szén-diszulfid valamennyi gomba gőzterében jelen volt, de négy gombatörzs kimagasló mennyiségben termelte: E17 - *Colletotrichum* sp., E21 - *Plectosphaerella* sp., S16 - *Fusarium* sp. és S18 - *Penicillium* sp. (6. ábra).



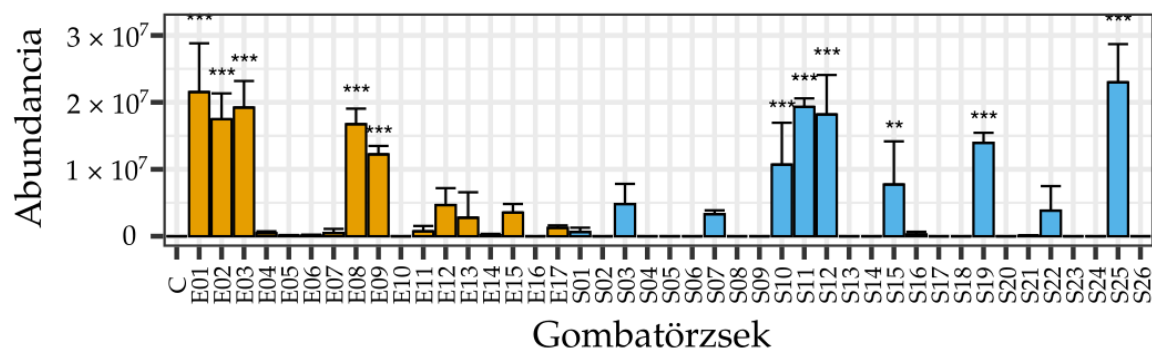
6. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált szén-diszulfid mennyisége. C - kontroll, inokulátatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Szén-diszulfid mellett a dimetil-szulfid jelenlétét is kimutattuk, azonban ezt csak 4 gombatörzs termelte detektálható mennyiségben: E7 - *Oidiodendron cerealis*, E16 - *Cadophora* sp., S3 - *Curvularia* sp. és S26 - *Penicillium* sp. (7. ábra).



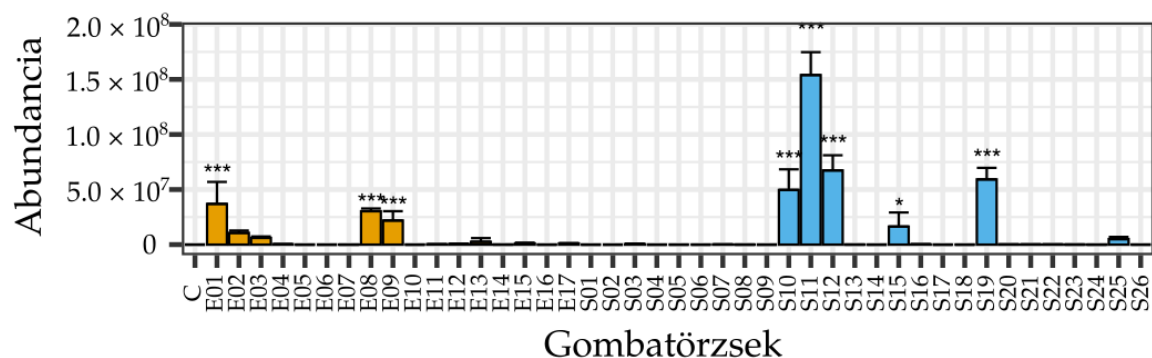
7. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált dimetil-szulfid mennyisége. C - kontroll, inokulátatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): *** $p < 0,001$.

Egy további, fragmentációs mintázata alapján minden bizonnyal szintén kéntartalmú VOC-ot is detektáltunk számos mintában (retenciós idő 3,33 perc, $m/z = 72$), melyet részletesebben nem sikerült azonosítanunk. Ezt a potenciálisan kéntartalmú, de azonosítatlan vegyületet jelentősen nagy számú *Fusarium* nemzetségbe tartozó törzs (E1, E3, E8, E9, S10, S11, S12, S15, S19, S25) és a *Macrophomina phaseolina* (E2) a kontrollhoz képest szignifikánsan nagy mennyiségben állították elő (8. ábra).



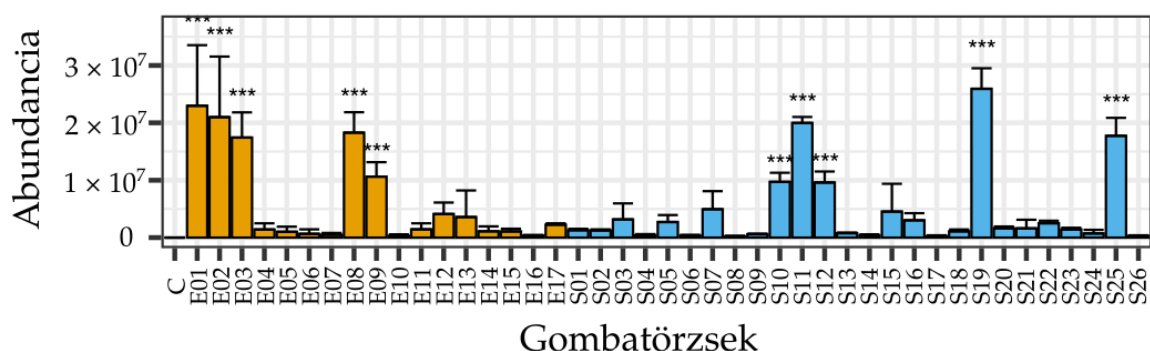
8. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált potenciálisan kéntartalmú, azonosítatlan vegyület mennyisége. C - kontroll, inokulátatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombák egy csoportja (E1, E8, E9, S10, S11, S12, S15, S19, S25) jól elkülönülő mintázatot mutattak az észterek, mint pl. az etil-acetát, termelését illetően (9. ábra).



9. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált etil-acetát mennyisége. C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

További észterek, köztük a metil-acetát, etil-propionát, propil-acetát előállításában is kiemelkedőek voltak az imént említett törzsek, valamennyi esetben szignifikáns mennyiségben voltak detektálhatóak ezek a vegyületek (nem ábrázolt eredmények). Alkoholok termelését illetően szintén ezek a törzsek voltak említésre méltóak, mely például metil-1-butanol esetében az 10. ábrán is megfigyelhető.



10. ábra. Tormakivonaton inkubált torma endofiton és talajgombák gőzteréből detektált metil-1-butanol mennyisége. C - kontroll, inokulálatlan tormakivonat; E01-17, tormából izolált endofitonok; S01-S26, talajgombák (további részletek az 1. táblázatban láthatóak). Szignifikancia szintek (ANOVA és Dunnett post hoc tesztek alapján): *** $p < 0,001$.

Az abundánsabb vegyületek között megemlítendő még a metil-formiát, melyet a S13 - *Penicillium* sp., S16 - *Fusarium* sp. és S18 - *Penicillium* sp. törzsek állítottak elő a kontrollhoz képest szignifikáns mennyiségben, illetve a metil-1-butanol acetát melyet a E12 - *Plectosphaerella* sp., E17 - *Colletotrichum* sp. és S21 - *Paraphoma* sp. törzsek gőzteréből detektáltunk számottevő mennyiségben. Néhány kevésbé gyakori vegyület az ecetsav és sztirol volt, amelyeket egy *Fusarium* sp. izolátumnál (S11) detektáltunk, továbbá a benzaldehid a E2 - *Macrophomina phaseolina*, S19 - *Fusarium* sp. törzseknél, illetve a β -fellandrén amit E15 - *Phomopsis* sp. termelt említésre méltó mennyiségben.

5.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben

5.2.1. Tormafajták glükozinolát tartalma

A headspace-GC-MS analízissel bebizonyosodott, hogy a tormából és környezetéből izolált gombák számos tagja képes a tormában található vegyületeket hasznosítani, átalakítani. Ezen és korábbi eredményeink alapján (Szűcs et al., 2018) azt feltételeztük, hogy a torma természetes, *in vivo* endoszférájában még nagyobb arányban lehetnek olyan gombák amelyek hasonló kémiai kölcsönhatásokban vannak a növénygel. Ennek vizsgálatához nagyszámú tormagyökeret sikerült begyűjtenünk 2 éven keresztül, majd a metabolom szempontjából kíméletes módon feldolgoznunk és tárolnunk. Logikusan azt feltételeztük, hogy a glükozinolátok a leginkább meghatározóak a torma-gomba kémiai interakciókban, mivel rendkívül változatos antimikrobiális vegyületek prekursorai (Plaszkó et al., 2022, 2021). Mivel a torma speciális metabolit készletének legnagyobb részét is ezek a vegyületek teszik ki, így kiemelten fontosnak tartottuk, hogy a főbb glükozinolátok koncentrációját célzottan, kvantitatívan is meghatározzuk. Valamennyi vizsgált fajtában a fő glükozinolátok a szinigrin és a glükonaszturtiin voltak, míg kisebb mennyiségben glükobrasszicin és glükoiiberin is kvantifikálható volt (3. táblázat). A szinigrin száraz tömegre vetített koncentrációja az egyes fajtákban $1,14 \pm 0,66\%$ - $3,43 \pm 0,65\%$ tartományban volt, a glükonaszturtiin koncentrációja pedig a $0,36 \pm 0,18\%$ - $0,67 \pm 0,31\%$ tartományban. A glükoiiberin és glükobrasszicin koncentrációja $0,03$ - $0,07\%$ között változott. A glükozinolátok koncentrációjának relatív szórása fajtákon belül viszonylag nagy volt, 26,9% szinigrin és 19,8% glükonaszturtiin esetében, ennek ellenére a fajták közötti szórás a vártnál kisebb volt. Szinigrin, glükonaszturtiin, glükobrasszicin, glükoiiberin esetén a legnagyobb és legkisebb átlagértékek között 3,33, 1,99, 20,5, és 2,81-szeres különbség volt megfigyelhető. Az alifás szinigrin és glükoiiberin koncentrációjára sokkal nagyobb hatással volt maga a vizsgált fajta ($p_{\text{nem korr.}} =$

0,0008 és 0,0049) mint glükobrasszicin és glükonaszturtiin esetén ($p_{\text{nem korr.}} = 0,6510$ és $0,0227$). 2019-ben jelentősen kevesebb szinigrin, glükoiberin és glükobrasszicin szintetizálódott a fajtákban ($p_{\text{nem korr.}} = 5,21\text{E-}7$, $0,0019$ és $0,0024$), míg a glükonaszturtiin mennyiségénél nem volt számottevő évhataás ($p_{\text{nem korr.}} = 0,2465$). További glükozinolátokat nem-célzott metabolomikával is tudtunk vizsgálni, relatív abundancia alapon.

3. táblázat. Tormafajták glükozinolát tartalma %-ban a száraztömegre viszonyítva (n = 4). Rövidítések: GBR, glükobrasszicin; GIB, glükoiberin; GLN, glükonaszturtiin; SIN, szinigrin.					
Fajta	Év	SIN átlag ± szórás	GLN átlag ± szórás	GIB átlag ± szórás	GBR átlag ± szórás
A	2018	2,769 ± 0,686	0,603 ± 0,112	0,017 ± 0,012	0,072 ± 0,074
C	2018	2,685 ± 0,537	0,542 ± 0,093	0,037 ± 0,038	0,135 ± 0,091
G	2018	3,435 ± 0,646	0,492 ± 0,053	0,073 ± 0,064	0,083 ± 0,064
I	2018	2,831 ± 0,511	0,440 ± 0,045	0,082 ± 0,041	0,088 ± 0,067
K	2018	2,608 ± 0,196	0,498 ± 0,031	0,046 ± 0,047	0,077 ± 0,062
M	2018	2,226 ± 0,501	0,431 ± 0,053	0,038 ± 0,021	0,111 ± 0,077
U	2018	2,679 ± 0,746	0,337 ± 0,052	0,032 ± 0,020	0,071 ± 0,049
W	2018	3,798 ± 0,660	0,467 ± 0,024	0,051 ± 0,046	0,063 ± 0,061
A	2019	2,567 ± 0,527	0,629 ± 0,126	0,004 ± 0,003	0,074 ± 0,010
C	2019	1,947 ± 0,602	0,538 ± 0,062	0,020 ± 0,013	0,054 ± 0,012
G	2019	1,837 ± 0,820	0,670 ± 0,307	0,011 ± 0,010	0,057 ± 0,022
I	2019	2,983 ± 1,121	0,587 ± 0,066	0,038 ± 0,027	0,058 ± 0,015
K	2019	1,915 ± 0,254	0,480 ± 0,073	0,032 ± 0,023	0,057 ± 0,030
M	2019	1,141 ± 0,667	0,383 ± 0,204	0,009 ± 0,011	0,056 ± 0,019
U	2019	2,112 ± 0,264	0,625 ± 0,077	0,010 ± 0,007	0,057 ± 0,013
W	2019	1,707 ± 0,973	0,359 ± 0,185	0,008 ± 0,007	0,048 ± 0,014

5.2.2. Nem-célzott metabolomika

Mivel a tormafajták között nem találtunk jelentős eltérést a glükozinolát-tartalmat illetően, így még hangsúlyosabbá vált a nem-célzott LC-MS/MS metabolomika szerepe a növény-gomba interakciók megértésében. Az XCMS online csúcs-detektáló algoritmus

összesen 2576 vegyületjelöltet azonosított pozitív és negatív ion módban, melyekből az izotópcsúcsok és adduktok eltávolítása után 1310 maradt. A műszeres analízis során alkalmazott QC minták segítségével a linearitást, relatív szórást és a mérés reprodukálhatóságát is meg tudtuk határozni. Ezek alapján szűrtük azon vegyületjelölteket, melyek max. 30% relatív szórást és legalább 0,8 linearitást mutattak, így összesen 355 vegyületjelöltet tudunk vizsgálni a továbbiakban. A jelöltek teljes listája megtalálható a mellékletben (Melléklet 1. táblázat).

233, nagy mintán belüli variabilitással rendelkező vegyületjelöltön MS/MS fragmentációt is végeztünk. A fragmentációs mintázatok alapján a Sirius szoftver potenciális vegyületjelölteket talált, melyeket szakirodalmi adatok alapján ellenőriztünk (MSI - Metabolomics Standards Initiative 2. szintű azonosítás, 4. táblázat). A vegyületjelöltek között olyan speciális metabolitokat is találunk, mint pl.: flavonoid glikozidok (kempferol aglikon), polifenolos vegyületek (fenilpropanoid és kumarin glikozid), indol származékok és primer anyagcseretermékek (foszfolipidek, aminosav származékok, peptidek).

4. táblázat. Tormamintákból MSI 2. szinten azonosított vegyületek listája.				
m/z	Polaritás	Retenciósidő (perc)	Vegyület	MS/MS fragmentumok
166,0684	pozitív	12,18	N,N-(dimetil)-tiobenzamid	120,081 149,042 103,0545
247,1451	pozitív	12,3	Indol-3-metil amin származék	167,1067 149,0962 139,1119 121,1016 116,0709
251,0857	pozitív	12,44	Indol-3-metil-cisztein	205,0794 187,0756 162,0597 130,0653
295,1299	pozitív	11,82	γ-Glu-Phe (dipeptid)	278,1016 232,0966 186,0914 166,0863 120,081

308,114	pozitív	10,35	1-hexozil-indol-3-karbaldehyd	146,06005
353,1066	pozitív	13,49	Metoxikumarin-hexozid	249,0757 207,06532 189,0545
357,1299	pozitív	2,88	1-hidroxi-indol-3-karbonsav glicin származék	325,2126 255,1705 202,0487 178,05 160,0393 145,0496 134,0603 127,0393 109,0288
369,1195	pozitív	12,81	5-O-feruloil kinasav	193,0862
423,1370	pozitív	12,51	Cys-Cys-Pro-Thr (peptid)	277,06765 191,0672 179,04861 162,02196 116,05315 76,02218
454,2942	pozitív	17,75	1-16:0-lysoPE (foszfolipid)	313,2736 282,2781 239,23677 155,01043
471,1042	pozitív	11,02	3-metilszulfonilpropil-izotiocianát glutation konjugátum	308,0918 199,0714 162,02189 179,04857 122,06358
480,31	pozitív	18,06	1-18:0-lysoPE (foszfolipid)	339,28943 308,29481 265,2537 155,01046
518,3259	pozitív	16,79	1-18:3-lysoPC (foszfolipid)	184,07345
535,1106	pozitív	13,49	Kempferol származék	282,705519
160,0394	negatív	11,19	Indol-3-karbonsav	132,0444

247,0723	negatív	11,89	5-hidroxi-indolecetsav-hexozid	218,9611 200,9504 160,0394 116,0492
388,0748	negatív	11,52	Pentil-glükozinolát	274,9911 259,0126 195,0331 146,0635
447,0938	negatív	12,86	Kempferol-hexozid	285,041 284,0331 255,03, 227,0347 151,0023
617,1502	negatív	12,98	Kempferol-dihexozid	493,1205 285,041 284,0332 255,0302 227,0341 151,003
549,1256	negatív	13,13	Kempferol-dipentozid	285,04095 284,03318 255,02927 178,99794

Azokat a vegyületjelölteket, melyeket nem tudtunk szakirodalom alapján validálni, vagy a hozzávetőleges vegyületosztályuk alapján (Classyfire hierarchia, MSI 3. szintű azonosítás) (Djoumbou Feunang et al., 2016) vagy az m/z - retenció idő (nem azonosított) értékeik alapján hivatkozunk rájuk. MSI 3. szinten az alábbi vegyületosztályokba tudtunk rangsorolni számos vegyületjelöltet: 2 cianogén glikozid, egy flavonoid glikozid, egy glükozinolát, 3 lipid (vagy lipid-szerű struktúra), 9 aminosav származék, 14 glikozid és 19 egyéb, feltehetően aromás vegyület (Melléklet 1. táblázat).

A metabolomikai eredmények alapján kiderült, hogy számos fajta nagyon hasonló kémiai mintázattal rendelkezett, ezért kiválasztottunk egy részhalmazt, melyek a mikrobiom - metabolom korrelációk meghatározásánál a kémiai oldala lett az adathalmaznak. A kémiai adatok PCA (főkomponens analízis) ábrái alapján manuálisan választottunk ki 8 olyan fajtát, melyek lefedték a hozzávetőlegesen azonosított és nagy relatív szórással rendelkező vegyületjelöltek nagy részét. A főkomponens értékek a 8 választott fajta között szignifikánsan eltértek ($p = 0,0332$), mely arra utal, hogy a fajták között szignifikáns kémiai különbség volt.

A metabolomikai különbségek bemutatására szintén alkalmas lehet a különböző mintavételi évek vagy fajták összehasonlításakor számolt hatásnagyság értékek eloszlásának vizsgálata.

Egy adott vegyületjelöltből a legkisebb és a legnagyobb mennyiséget tartalmazó fajták értékei közötti különbség kiszámításával, majd a különbségeket osztva a szórással megkaptuk a hatásnagyság értékeket (Cohen-féle d) vegyületjelöltenként. A hatásnagyság értékek 1,289 szórásnyi mediánja azt mutatja, hogy jelentős mértékű a fajták közötti kémiai variabilitás. Az év-faktor hatásnagyság értékeit összehasonlítva a medián viszonylag nagy, 0,4678 volt, ami azt jelzi, hogy a torma-gombák kémiai összetétele nem elhanyagolható mértékben változhat évente. A 359 vizsgált vegyületjelölt közül 59 esetében az év-faktor hatásnagysága legalább 1 volt, ami feltételezhetően a 2018 és 2019 évek közötti időjárási különbségekből adódott. Mivel nem volt célunk a különböző fajták kémiai különbségeit vizsgálni, az adatokat a további adatelemzési modellekbe fajták vagy évek szerinti csoportosítás nélkül vittük be. Az ebből fakadó kémiai diverzitás tette lehetővé, hogy közvetlen korrelációkat találjunk a vegyületjelöltek és az endofiton gombák abundancia értékei között, ahogy ezt majd a későbbiekben bemutatjuk.

5.2.3. Amplikon szekvenálás

A növény-gomba interakciók megértésére való törekvéseink másik rétegét a növényben élő endofiton gombaközösség feltárása képezte. Erre jelenleg az egyik leginkább alkalmas módszer a metagenomika, azon belül is a nagy áteresztőképességű amplikon szekvenálás, amellyel mintánként több tíz- vagy százezer gomba eredetű szekvencia is azonosítható. Mint már bemutattuk (5.1. fejezet), az ITS egy jó markergén lehet gombák azonosítására, melyet gyakran szekvenálnak metagenomikai tanulmányokban. Az ITS-en belül, az ITS2 alrégió használata a gomba amplikon szekvenálás során fontos előnyökkel járhat, pl.: az ITS1 alrégióval szemben a képződő amplikonok hosszában kisebb variabilitás figyelhető meg, illetve több univerzális primer kötőhelyet tartalmaz. Előnyös tulajdonságai miatt elfogadott a használata második generációs szekvenálási platformokon (Ihrmark et al., 2012; Nilsson et al., 2019; Toju et al., 2012). Amennyiben a gomba szekvenciák amplifikálása élő növényi szövetből zajlik, célszerű legalább egy olyan primert használni, mely specifikusan a gomba szekvenciákat amplifikálja (Toju et al., 2012). *In silico* pilot kísérletünk során a szakirodalomban gyakran használt univerzális gomba primerek nem bizonyultak hatékonyak a torma-endofiton rendszerben, mivel a gazdanövény DNS-e is nagy arányban amplifikálódott. Ennek következtében bioinformatikai módszerekkel terveztünk egy olyan primert amely nem rendelkezik kötőhellyel a torma ITS2 régiójában, viszont a lehető legtöbb gombában igen. Az

ITS3_KYO2/ITS4_KYO3 és fITS7/ITS4_KYO3 primer párokkal egy előzetes szekvenálási kísérletet is elvégeztünk, ahol az amplikonok legalább 40 százaléka növényi eredetű ITS szekvenciaként lett azonosítva a UNITE 8.3 eukarióta adatbázis (Abarenkov et al., 2021b) szerint. Az általunk fejlesztett ITS3_NOHR forward primer és a szakirodalomban használt ITS4_KYO3 reverse primer használatával azonban az egyértelműen növényi eredetű ITS leolvasások aránya 0.2% volt. Az előzetes szekvenálási eredményeink alapján a további kísérleteinkben az általunk fejlesztett forward primert használtuk.

Az ITS3_NOHR primer *in silico* az egyedi Ascomycota ITS szekvenciák 95,3%-ban és az egyedi Basidiomycota ITS szekvenciák 85,8%-ban képes bekötődni a UNITE 8.3 gomba adatbázis (Abarenkov et al., 2021a) szerint, amennyiben legfeljebb 1 mismatch hibát engedélyeztünk az illesztési algoritmusnak (a primer 5' vége felőli 6. bázisban volt a leggyakoribb a mismatch). A primer hatékonysága megközelíti a ITS3_KYO2 és fITS7 primerekét az említett gomba törzsekben (Ihrmark et al., 2012).

A szűrési lépés során a negatív kontroll mintákban is megtalálható ASV-k eltávolításával az össz egyedi ASV-k 0,7%-a lett eltávolítva. Az eltávolított ASV-k között feltehetően humán eredetű, dermatofiton nemzetség is megtalálható volt mint pl. a *Malassezia*. Sokkal nagyobb hatással volt a teljes adatsorra nézve az olyan ASV-k eltávolítása, melyek nem adtak értelmes találatot sem a UNITE, sem az NCBI RefSeq (gomba ITS) adatbázisokban, mivel így az egyedi ASV-k 78.5%-a (az összes leolvasás 26,35%-a) el lett eltávolítva. Az 50 leggyakoribb ilyen szekvenciát megvizsgálva az NCBI BLAST segítségével kiderült, hogy legtöbbjük valamilyen növényi eredetű, de nem ITS szekvencia. A szűrési lépések összesen 2673 ASV-t eredményeztek, a medián leolvasás szám mintánként 26116 volt.

A szekvenálási QC minták használata nagyon hasznosnak bizonyult a szűrési paraméterek optimalizálásánál, mivel mind a 4 replika szinte megegyező ASV összetételt mutatott, nagyon alacsony szórással. Ezen tulajdonságának köszönhetően a QC minták hasznosak lehetnek a szekvenálási hibák korrigálásában, azonban ez további vizsgálatokat igényel.

5.2.4. Mikrobiom diverzitás vizsgálata

Már az amplikon szekvenálásból származó nyers adatok feldolgozásánál is megfigyelhető volt, hogy a talajminták gombaközösségére vonatkozó adatok (pl.: egyedi leolvasások) jelentősen eltértek a növényi mintákhoz képest. Továbbá a 2.4. fejezetben is megemlített szakirodalmi adatok alapján feltételezhető volt, hogy a talajmintákban található gombaközösség szignifikánsan eltér a torma endoszférájától, ennek alátámasztására szolgálnak

a különféle diverzitás indexek. A diverzitási metrikákat az előzetes szűrési lépéseken átment 2673 ASV alapján készítettük el. Az 1. területről származó tormaminták esetén az átlagos ASV gazdagság (richness) 45,2 (27-94 közötti értékekkel) volt, a 2. terület esetében 45,4 (24-109 közötti értékekkel), a répa külcsoporthoz tartozó minták esetén pedig 39,5-es átlagértéket találtunk (29-48 közötti értékekkel). Ezzel szemben a talajminták sokkal nagyobb gazdagságot mutattak 383,6 átlagértékkel (109-609 tartományban). Az ACE és Shannon indexek is hasonló dinamikát mutattak (Melléklet 1. ábra). Az Simpson dominancia index alapján elmondható, hogy a tormamintákban néhány gombataxon jelentősen nagyobb arányban fordult elő (Melléklet 1. ábra). Bár a teljes dominancia viszonylag alacsony volt a répa és talajmintákban, a tormához képest ezekben sokkal egyenletesebbek az abundancia értékek. A dominancia értékektől függetlenül a Buzas és Gibson index alapján már kevésbé egyenletesek az abundancia értékek. Összességében elmondható, hogy a tormaminták csoportján belül jelentősen nagyobb variabilitás volt megfigyelhető a diverzitási indexek értékeiben.

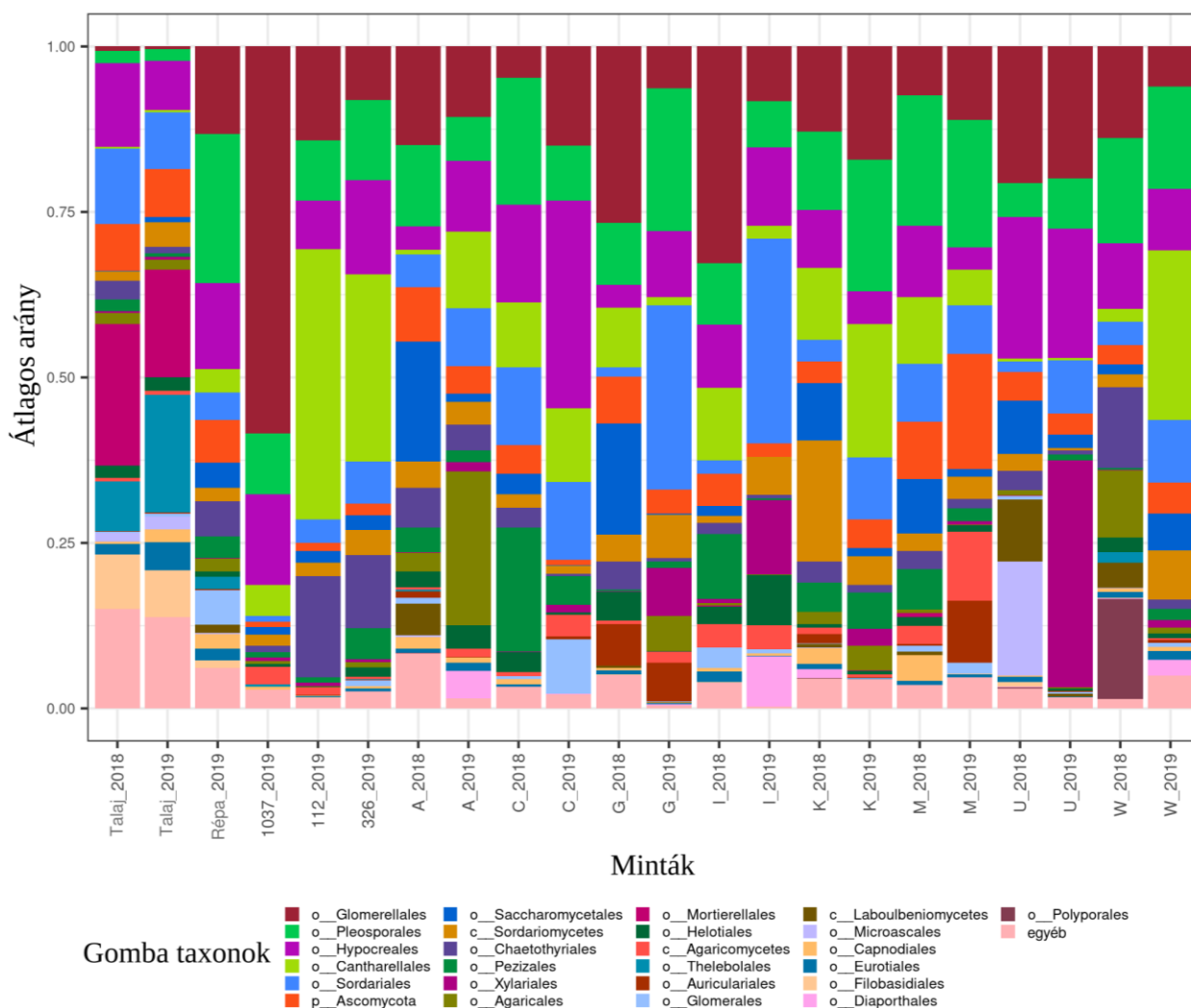
A minták közötti béta-diverzitás vizsgálatát a Bray-Curtis féle hasonlóság, illetve a Whittaker disztancia értékek alapján végeztük. Mindkét béta-diverzitás metrika azt mutatta, hogy a talajminták rendkívüli módon eltérnek a többi minta típusához képest (Melléklet 2. ábra). Ezen felül, a béta-diverzitás értékek magasabbak voltak a torma mintacsoportokon belül, mint a többi csoportban, az ANOSIM tesztek alacsony R értékei szintén ezt a megfigyelést támasztották alá. Bár a különböző mintacsoportok (talaj, répa, torma) közötti különbségek jóval nagyobbak voltak, mint a csoportokon belüli különbségek (a talaj minták nagy távolsága miatt), a tormaminták mindkét béta-diverzitás metrika esetében nagy változatosságot mutattak.

A diverzitás vizsgálatához egy még kifinomultabb analízist, súlyozatlan UniFrac elemzést is végeztünk. A UniFrac módszer előfeltétele egy robusztus filogenetikai fa, ezért több fát is készítettünk, hogy teszteljük a megbízhatóságukat. A többszörös illesztések metrikái alapján az UniFrac analízis megbízhatóan elvégezhető volt. A UniFrac disztancia értékek a korábbi diverzitás metrikákhoz hasonló elrendeződést mutattak. Az UniFrac disztancia értékek ANOSIM tesztjei szintén összevethetőek voltak a korábbi eredményekkel, bár talajmintákon belül nagyobb változatosságot mutattak.

Összességében elmondható, hogy mind az alfa-, mind a béta-diverzitás metrikák jelentős variabilitásra utaltak a torma mintacsoportok között és azokon belül is, ami összefüggésben állhat a tormaminták metabolomjának változásaival.

5.2.5. Tormafajták endofiton gombaközösségének összetétele

A legabundánsabb ASV-k taxonómiai besorolása az 11. ábrán látható. ANOVA analízis alapján a gombaközösségek a mintacsoportok között szignifikáns eltérést mutattak törzs, család és nemzetség szinten is ($p = 10^{-18}$) a béta-diverzitási metrikákhoz hasonlóan.



11. ábra. Gomba taxonok relatív átlagos aránya az egyes tormafajták endofiton gombaközösségein belül ($n = 4$ mintacsoportonként). Az előzetesen szűrt gomba taxonok felső 25%-a össze lettek vonva legalább rend szinten (amennyiben nem volt feloldható akkor a legalacsonyabb feloldható taxonómiai szinten). A gomba taxon előjelei követik a UNITE adatbázisban is használt nomenklatúrát: c__, osztály; o__, rend; p__, törzs. A maradék ASV-k arányát az “egyéb” szín jelöli. A minta azonosítók a minta_év sémát követik, ahol a Talaj talajmintákat, a Répa külső kontroll sárgarépa mintákat, az 1037, 112, 326 különböző talajokból származó tormamintákat jelölnek. Az A-W a különböző tormafajták belső azonosítója.

Az 1. területről származó tormamintákban a legabundánsabb ASV-k a Cantharellales, Glomerellales, Hypocreales, Pleosporales, Saccharomycetales, Sordariales gomba rendekbe sorolhatóak, melyek számos növényekkel kapcsolatos nemzetséget is magukban foglalnak (tipikus endofitonok, epifitonok, patogének), pl.: *Claviceps*, *Colletotrichum*, *Epichloë*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*. A taxonómiai kevéssé feloldható ASV-k elsősorban a Ceratobasidiaceae, Nectriaceae, Pezizaceae, Sordariomycetes, Ascomycota csoportokba tartoztak. Közel megegyező taxonómiai összetételt mutattak az ugyanerről a területről származó sárgarépa kulcsoport minták is.

A növényi mintákkal szemben az 1. területről származó talajmintákban jelentősen eltérő gombaközösség volt megfigyelhető, elsősorban a Filobasidiales, Mortierellales, Hypocreales, Sordariales, Thelebolales, Umbelopsidales rendek domináltak. Leggyakoribb nemzetségek a *Humicola*, *Metarhizium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Solicoccozyma*, *Trichoderma*, és *Umbelopsis* voltak. Ezeken felül a Chaetomiaceae család azonosítatlan tagjai, illetve egyéb Ascomycota ASV-k voltak abundánsak. Fontos megemlíteni, hogy 2018 és 2019 között a talajközösségek nem változtak jelentősen, mely azt jelezheti, hogy a növényi mintákban megfigyelhető közösségek összetételét elsősorban nem a talaj befolyásolja.

Számos esetben egy vagy két endofiton taxon rendkívül domináns volt egy-egy mintában (Melléklet 3. ábra). Ez a jelenség elsősorban tormamintákban volt megfigyelhető, répákban nem, ami ugyan származhat a mintavételi mélység különbségéből (64 + 12 torma, 4 répa), de a dominancia indexek vizsgálatánál is jól látható volt. Legtöbb esetben a legdominánsabb taxonok az összes leolvasás 20-40%-át tették ki (medián 33,57%), de egy mintában a 95,9%-ot is elérte. Ez a jelenség a talajmintákban nem volt ennyire jellemző (medián 21,61%).

Mivel a növény - talaj különbségek sokkal nagyobbak voltak, mint a tormaminták közötti variabilitás, ezért az 1. területről származó tormák adatait részletesebben is megvizsgáltuk. Számos gombataxon nagy variációt mutatott az egyes fajták között, azt sugallva számunkra, hogy a későbbiekben jó korrelációs modellek építhetők belőlük. Ilyen taxonok pl.: Agaricomycetes (0,01% - 6,5%), Morosphaeriaceae és *Melanoleuca* (0 - 10%), *Monosporascus* (0,04% - 17,1%) és *Setophoma* (<0,01% - 6,3%). Ezek a különbségek számos esetben korreláltak valamilyen vegyületjelölttel, ahogy azt majd a későbbiekben is láthatjuk.

A gombaközösség összetételét illetően néhány esetben jelentős fajtan belüli variabilitás volt megfigyelhető (rend szinten, Melléklet 3. ábra). C, G, I, K és M fajták esetén az átlagos mintázat stabil volt a két mintavételi év között, viszont A, U és W fajták esetén számottevő variabilitás figyelhető meg a 2 év gombaközösség mintázatában (Melléklet 3. ábra). A

variabilitást mutató taxonok szignifikáns része korrelációkat mutatott a vegyületjelöltekkel (pl.: Xylariales, Sordariales, Pleosporales, Eurotiales, Capnodiales, stb.).

5.2.6. Mikrobiom - metabolom korrelációk

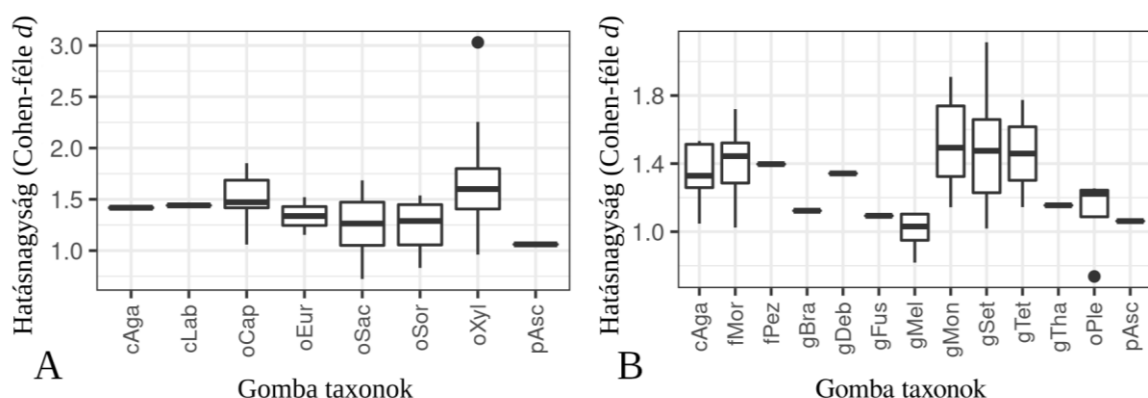
A metabolomikai és metagenomikai adatok analízise után végezetül ezen adatok együttes analízise következett. A különböző omikai adatok integrálása, a növény-gomba interakciók vizsgálatának legkomplexebb és legnehezebben interpretálható elemei. Szerencsére az egyre szofisztikáltabb statisztikai módszerek, modellek, dimenziócsökkentő eljárások nagyban segíthetik a biológiai interpretációját az ilyen komplex adathalmazoknak.

A család vagy nemzetség szinten összevont gomba adatok főkomponensei szignifikáns Spearman korrelációkat mutattak különböző vegyületjelöltekkel 37 és 41 esetben ($p < 0,05$, Melléklet 2. táblázat). Az esetek nagy száma miatt a PCA töltés értékek értelmezése helyett inkább megpróbáltuk a közvetlen Spearman korrelációkat megvizsgálni a clr-transzformált gomba és kémiai abundancia adatok között, mely egyre szélesebb körben használt megközelítés (Quinn and Erb, 2021). A megközelítés egyik fontos előnye, hogy ezáltal nem hagyunk ki az analízisből olyan vegyületeket, amelyek nem korrelálnak semelyik másikkal (és emiatt egy nem vizsgált főkomponens dimenzióban találhatóak), továbbá az adatok interpretációja is sokkal egyszerűbb. Főbb hátránya az, hogy nagyon nagy számú statisztikai tesztet kell elvégezni, emiatt statisztikai korrekciót kell végezni a fals pozitív eredmények kiszűrésére, ami jelentősen csökkenti a statisztikai erőt. A korábban ismertetett transzformálások miatt a gomba adathalmaz már nem volt kompozíciós (Gloor et al., 2017). A metabolomikai adatok vagy valódi koncentrációként (glükozinolát-tartalom) vagy a vegyületjelöltek QC-hoz viszonyított fold-change értékeként lettek kifejezve (nem célzott metabolomikai eljárásból származó értékek), ezért a metabolomikai adatok nem kompozíciós jellegűek. Ezek következtében nem feltételeztünk korrelációs műtermékeket, a módszer használhatónak bizonyult. Habár a család és nemzetség szintű adatok között jól látható átfedések voltak, amennyiben egy családon belül valamelyik nemzetség nagyon domináns volt, így is sikerült 99 (család szint) és 72 (nemzetség szint) szignifikáns korrelációt találnunk ezzel a módszerrel ($p < 0,05$, Melléklet 2. táblázat, "rawcordf" adatok).

Rend szinten vizsgálva az adatokat megfigyelhető, hogy a leginkább érintett gombatorzsek a Xylariales, Capnodiales, Sordariales és Saccharomycetales rendekbe tartoztak (12.A ábra). Fontos megemlíteni, hogy néhány mintában ezen leolvasások aránya az összes leolvasás rendre 73,4%, 15,7%, 74,2% és 38,4%-át is elérte. Néhány más csoportból származó taxon is korrelációkat mutatott egyes vegyületjelöltekkel, pl.: Laboulbeniomycetes,

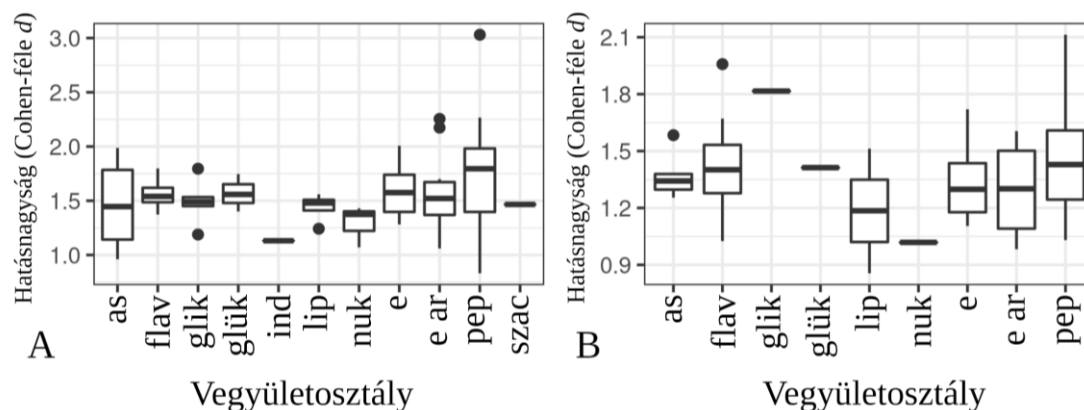
Agaricomycetes és Eurotiales, azonban ezek átlagosan a leolvasások kevesebb mint 1%-áért feleltek.

A legalább nemzetség szinten aggregált adatokat vizsgálva a *Monosporascus*, *Setophoma*, *Tetracladium*, illetve a Morosphaeriaceae, Agaricomycetes taxonokba tartozó gombákra gyakorolta a legnagyobb hatást a növény kémiaja (12.B ábra). Ezek a taxonok feleltek rendre az összes leolvasás 5,6%, 1,3%, 0,3%, 1,5% és 0,8%-áért, maximális arányuk pedig akár a 73,4%, 32,1%, 28,6%, 59,2% és 21,7%-ot is elérte. További gomba taxonok is változtak, de kisebb hatásmérettel, pl.: *Fusarium*, *Melanoleuca*, *Brachyphoris*, *Thanatephorus*, valamint a Pezizaceae és Pleosporales csoportokba tartozó gombák, amelyek rendre 4,0%, 5,4%, 0,4%, 4,9%, 2,4% és 3,2%-át tették ki az összes leolvasásnak. Összességében elmondható, hogy az összes leolvasás 35,23%-át kitevő ASV-k korreláltak egy vagy több vegyületjelölttel.



12. ábra. Clr-transzformált gomba abundancia adatok és a vegyületjelöltek közötti szignifikáns korrelációk hatásnagyságának összehasonlítása. A Benjamini-Hochberg korrigált, 0,05-től kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A hatásnagyság a gomba abundancia értékek és a kémiai adatok 1. és 4. kvartilisei közötti eltéréseként lett definiálva és Cohen-féle d értéként lett kifejezve. Alábrák: **(A)** Jelenségek rend szintű taxonómiai felbontáson; **(B)** Jelenségek nemzetség szintű taxonómiai felbontáson. Rövidítések: cAga, Agaricomycetes osztály; cLab, Laboulbeniomycetes osztály; fMor, Morophaeriaceae család; fPez, Pezizaceae család; gBra, *Brachyphoris* nemzetség; gDeb, *Debaryomyces* nemzetség; gFus, *Fusarium* nemzetség; gMel, *Melanoleuca* nemzetség; gMon, *Monosporascus* nemzetség; gSet, *Setophoma* nemzetség; gTet, *Tetracladium* nemzetség; gTha, *Thanatephorus* nemzetség; oCap, Capnodiales rend; oEur, Eurotiales rend; oPle, Pleosporales rend; oSac, Saccharomycetales rend; oSor, Sordariales rend; oXyl, Xylariales rend; pAsc, Ascomycota törzs.

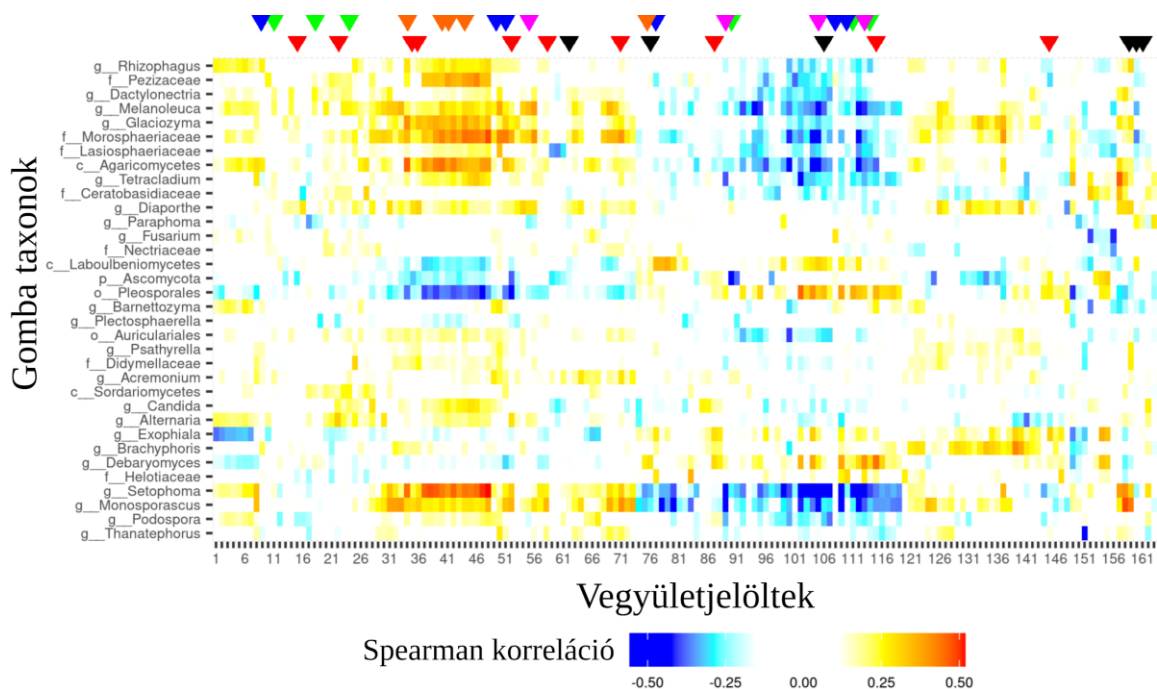
A legnagyobb befolyással lévő vegyületjelöltek listáján számos természetes vegyületet megtalálhatunk különböző bioszintetikus osztályból. Meglepő módon a főbb glükozinolátok nem eredményeztek nyers korrelációt egyik gomba csoporttal sem, annak ellenére, hogy nagyon nagy koncentrációban megtalálhatóak a tormában, más káposztafélékhez képest is. Ha összevetjük a vegyületosztályok és a gomba rendek közötti szignifikáns korrelációk hatásnagyság értékeit, (13.A ábra) nem lehet egyértelműen kiválasztani legnagyobb hatást mutató vegyületosztályt, bár kisebb különbségek azért látszanak.



13. ábra. Clr-transzformált gomba abundancia adatok és a vegyületjelöltek közötti szignifikáns korrelációk hatásnagyságának összehasonlítása vegyületosztályonként. A Benjamini-Hochberg korrigált, 0,05-től kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A hatásnagyság a gomba abundancia értékek és a kémiai adatok 1. és 4. kvartilisei közötti eltéréseként lett definiálva és Cohen-féle d értéként lett kifejezve. Alábrák: **(A)** Jelenségek rend szintű taxonómiai felbontáson; **(B)** Jelenségek nemzetség szintű taxonómiai felbontáson. Rövidítések: as, aminosavak és származékaik; e, egyéb vegyületek (ismeretlen vagy nem azonosított); e ar, egyéb aromás/polifenolos vegyületek; flav, flavonoid glikozidok; glik, glikozidok; glük, glükozinolátok; ind, indol származékok; lip, lipidek és lipidszerű vegyületek; nuk, nukleotid származékok; pep, peptidek; szac, szacharidok.

Hasonló jelenség figyelhető meg, ha a nemzetség szintű adatokat vizsgáljuk (13.B ábra). Az ábra alapján nem bizonyítható az a feltételezés, hogy a glükozinolátok játszanak a kulcsszerepet a gombaközösség kialakításában, legalább akkora hatása van a flavonoid glikozidoknak vagy más hozzávetőlegesen azonosított glikozidoknak. Továbbá úgy tűnik, hogy szintén fontos szerepe van a lipideknek és lipidszerű molekuláknak, illetve a peptideknek is, bár peptidek esetében a relatív szórás értékek is magasak. A legnagyobb hatásnagyság értéket (absz. hatásnagyság > 2) a peptid-szerű vegyületek mutatták, a Canopus algoritmus szerint ezek gamma-glutamil aminosav-származékokhoz, illetve további peptidekhez tartozhatnak. A korrelációk másik nagyobb csoportja (absz. hatásméret $> 1,5$) primer és specializált metabolit osztályokat is tartalmaz, mint pl.: flavonoid és más feltételezett glikozidok, illetve egy glükozinolát. Ezek erős korrelációt mutatnak számos gombataxon abundanciájával. Ezeken felül még néhány peptidet, foszfolipidet és N,N-(dimetil)-

tiobenzamid is megtalálhatunk ebben a csoportban. Rend szinten a legerősebben befolyásolt gomba taxonok a Xylariales, Capnodiales és Saccharomycetales, míg nemzetség szinten a *Setophoma*, *Monosporascus* és *Tetracladium* voltak.



14. ábra. Clr-transzformált gomba abundancia adatok és vegyületjelölt abundancia adatok közötti Spearman korrelációk hő térképen ábrázolva (az adatok hierarchikus klaszterezéssel lettek sorba rendezve). A gomba taxonok előjelei követik a UNITE adatbázisban használt nomenklatúrát: g__, nemzetség; f__, család; c__, osztály; o__, rend; p__, törzs. A vegyületjelöltek jelölése a következő: piros nyíl - aminosav származékok, 15, 22, 35, 36, 52, 58, 71, 87, 115, 145; zöld - indol származékok: 11, 18, 24, 90, 111, 114; fekete - lipidek: 62, 76, 106, 159-161; magenta - peptidek: 105, 113, 89, 55; kék - glükoszínolátok: 9, 49, 51, 77, 108, 110; narancs - flavonoid glikozidok: 34, 40, 41, 44, 75.

A 14. ábrán számos korrelációt megfigyelhetünk a kémiai és gomba adatok között, továbbá látható, hogy számos primer és specializált vegyületosztály részt vett ezekben az interakciókban, beleértve a lipideket, indol származékokat, glikozidokat és peptideket. Az egy vagy több gombataxonon nagymértékű korrelációkat mutató vegyületek több klaszterben is szóródhatnak a hő térképen, ami azt jelenti, hogy az eredmények nem magyarázhatóak szimplán a vegyületek multi-korrelációjával.

A bemutatott eredményeink alapján kijelenthető, hogy a növény-gomba interakciók valóban komplex hálózatok szövedéke, már az általunk bemutatott 2 dimenzióban (metabolomika-metagenomika) is sok biológiai jelenség magyarázata rejlik. Azonban, az efféle hálózatok feltárása nem triviális feladat, sőt, újabb omikai rétegek bevonásával a problémák halmaza még nagyobbra tágítható. A problémára számos megoldás létezhet, pl. korrelációs hálózatok építése, mely jövőbeni kutatómunkánk egyik fontos alapköve.

6. Megbeszélés

6.1. Illékony szerves vegyületek (VOC) vizsgálata torma-asszociált gombák gőzterében

6.1.1. Azonosított gombák

Az általunk azonosított endofiton gombák jellemzően Brassicaceae növények endoszférajában is gyakran előfordulnak, néhány kevésbé gyakori nemzetségbe tartozó törzset is tudtunk azonosítani, mint például a *Volutella* sp. *Arabidopsis thaliana*-ból, amely szintén a Brassicaceae képviselője, számos, általunk is talált nemzetséget leírtak, pl.: *Phoma*, *Phomopsis* és *Plectosphaerella* (Junker et al., 2012).

Bár jóval több talajgombát sikerült izolálnunk az endofitonokhoz képest, de fajdiverzitást tekintve egy sokkal homogénebb csoportnak mutatkozott, elsősorban a *Fusarium* és *Penicillium* fajok domináltak. Ez nem meglepő, hiszen világszerte a talajközösségekben csak néhány Ascomycota taxon domináns, köztük az imént említett genusok (Egidi et al., 2019).

6.1.2. Headspace GC-MS inokulációs módszer hatékonysága

A gombanevelési módszerünk alkalmazásával, a lezárt headspace üveg feltételezhetően mikroaerofil környezetet biztosít a gombák számára, amely serkenti a VOC-ok előállítását. Ezt a jelenséget már endofiton gombákban is megfigyelték korábban (Schoen et al., 2017). A módszerünk segítségével, tudomásunk szerint először írtuk le a *Cadophora*, *Curvularia*, *Notophoma*, *Paraphoma*, *Plectosphaerella*, *Pyrenochaeta*, *Setophoma* és *Volutella* nemzetségekbe tartozó gombák VOC mintázatát. Néhány további általunk is vizsgált nemzetség képviselőinek VOC profilját már korábban is leírták, pl.: *Colletotrichum* (Rojas-Flores et al., 2019), *Penicillium* (Ndagijimana et al., 2008), *Phomopsis* (Singh et al., 2011), mely vizsgálatokban számos, általunk is azonosított vegyületet találtak, mint például a metil-1-butanol, aceton (Singh et al., 2011), metil-1-butanol acetát, benzaldehid (Rojas-Flores et al., 2019) és sztirol (Ndagijimana et al., 2008). A gombák által termelt VOC-ok különböző versenyelőnyökhöz juttathatják őket, főleg ha a gazdanövények által előállított tápanyagok is hozzáférhetőek számukra. Ezt a jelenséget a növények is kihasználhatják a saját érdekükben, például azért, hogy különböző exudátumokat bocsátanak a környezetükbe (Zeng et al., 2003), ezzel odavonzva és táplálva olyan gombákat melyek segíthetik annak fejlődését. Az exudátumok összetételének, pl. a glükozinolátok arányának változtatásával a növény saját

javára változtathatja a rizoszféra közösség összetételét (Bressan et al., 2009; DeWolf et al., 2023).

6.1.3. Gombák által történő glükozinolát lebontás

Régóta ismert tény, hogy gombák is képesek a glükozinolátok lebontására, először *Aspergillus sydowi*-ből írtak le tioglükozidáz aktivitást közel 80 éve (Reese et al., 1958). Azóta a glükozinolát-bontó gombák listája jelentősen kibővült, mint azt áttekintettük (Plaszko et al., 2022), pl.: *Macrophomina phaseolina*, *Phoma radicina*, *Setophoma terrestris* (Szűcs et al., 2018), *Aspergillus clavatus*, *Fusarium oxysporum* (Smits et al., 1993).

Mivel a malátakivonat táptalajon növe gombák gőzteréből nem detektáltunk kén tartalmú vegyületeket, így minden bizonnyal a tormakivonaton inkubált gombák által előállított kén tartalmú vegyületek glükozinolát bomlástermékek lehetnek. Előzetes számításaink alapján tormában a glükozinolátok adják a növény össz kén tartalmának kb. 30-35%-át. A különböző standardok keverékét tartalmazó kalibrációs minták jó relatív szórást (RSD) mutattak az allil-cianid, allil-izotiocianát, dimetil-szulfid és szén-diszulfid esetében. A fenetil-izotiocianát és fenil-propionitril műszeres analízise nem volt megbízhatóan reprodukálható alacsony illékonyaságuk miatt, így ezeket a továbbiakban nem tárgyaljuk. Az általunk alkalmazott módszerrel nagyon jól detektálható volt a szinigrinből származó allil-cianid, gyakorlatilag mindegyik gombatenyészet gőzterében detektálható volt, és 4 törzs a kontrollhoz képest szignifikánsan nagy mennyiségben termelte (4. ábra). Fontos megjegyeznünk azonban, hogy az allil-cianid képződése nem csak enzimátikus reakció terméke lehet, pH vagy ionos változások hozzájárulhatnak a spontán bomlással történő létrejöttéhez. Az allil-izotiocianát szintén tagadhatatlanul szinigrin eredetű vegyület, amit 3 gombatörzs is szignifikáns mennyiségben termelt. Az izotiocianátok konjugátumot alkothatnak a glutationnal vagy fehérjék tiol oldalláncával amelyek GC-MS-el történő detektálása gyakorlatilag lehetetlen (Hanschen et al., 2014; Plaszko et al., 2021). Ez is hozzájárulhat ahhoz, hogy kevés gombatörzs esetében tudtuk detektálni, ugyanis feltételezhető, hogy a gombák afféle kémiai adaptációs mechanizmusként glutationt bocsáthatnak ki a környezetükbe a számukra toxikus izotiocianátok eliminálása végett. Hasonló konklúzióra jutottunk korábbi vizsgálataink során is (Szűcs et al., 2018). Számos gombatörzs esetén detektáltunk szén-diszulfidot is, 4 esetben szignifikáns mennyiségben a kontrollhoz képest, mely származhat az allil-izotiocianát nem-enzimátikus bomlásából (Pecháček et al., 1997), vagy akár gombák általi detoxifikációs útvonalakból is. Ezt alátámaszthatja az is, hogy a headspace gőzterekben az allil-izotiocianát és szén-diszulfid szintjének korrelációja viszonylag magas volt ($R^2 = 0,608$).

6.1.4. Endofiton és talajgombák elkülöníthetősége VOC mintázat alapján

A gomba izolátumok döntő többsége egyedien jellemezhető volt a VOC mintázatuk alapján, ugyanis számos vegyület mennyisége nagyon szignifikánsan eltért 1-1 izolátum között, ilyenek például az allil-cianid ($p = 5,55 \times 10^{-48}$), allil-izotiocianát ($p = 3,48 \times 10^{-4}$) és szén-diszulfid ($p = 5,40 \times 10^{-13}$). Mindezek ellenére, az általunk vizsgált endofiton és talajgombák csoportjai nem különíthetők el szignifikánsan, sem a VOC mintázatot, sem az egyedi vegyületek mennyiségét tekintve. Ez a megfigyelés eredhet abból is, hogy míg az endofiton csoport nagy taxonómiai diverzitást mutatott, a talajgombák csoportjára ez már nem volt igaz. Bár fontos megjegyeznünk, hogy a *Fusarium* és a többi nemzetséghez tartozó gombák között nagyon jelentős az eltérés a gőzterükből detektált vegyületeket illetően, de szignifikáns eltérést a két vizsgált csoport között ez esetben sem találtunk.

6.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben

6.2.1. Nem-célzott metabolomikával azonosított vegyületek

A glükozinolátok mellett kempferol glikozidokat és foszfolipideket is kimutattak már tormagyökerekből (Herz et al., 2017), mely alátámasztja a 4. táblázatban összefoglalt megfigyeléseinket. A hozzávetőlegesen azonosított glükozinolátok izomerjeit már leírták tormából mint izotiocianát bomlástermékek (Blažević et al., 2020), bár pentil-glükozinolátot korábban nem találtak tormamintákban (Agneta et al., 2012). A glükozinolátokra jellemző m/z 259,0126 fragmens (Rochfort et al., 2008) jelenléte, és a Canopus találatok alapján a vegyületjelölt minden bizonnyal egy glükozinolát. A többi vegyület között szerepel egy kumarin-glikozid, amelyet jelenlegi tudásunk szerint korábban még nem írtak le tormagyökerekből, de tudni róla, hogy a Brassicaceae növény család egyes tagjainak exudátumának fontos alkotóeleme (Sarashgi et al., 2021), így jelenléte nem meglepő. Az indol-3-karbaldehid és más triptofán eredetű vegyületek szintén gyakran előfordulnak a Brassicaceae szakirodalomban, és a növény család különböző fajaiból is kimutatták már őket (Bednarek et al., 2011; Li et al., 2023). Összességében a CSI:FingerID és a Canopus algoritmusok által generált javaslatok jelentősen lerövidítették a vegyületjelöltek azonosításához szükséges időt, bár részletesen megvizsgálva nem mindegyik javaslat bizonyult teljesen pontosnak. A 4. táblázatban szereplő 21 vegyületen kívül a Melléklet 1. táblázata még további 69 olyan vegyületet tartalmaz, amelyeket legalább vegyületosztály szintjén be lehetett sorolni ("canopus_class").

6.2.2. Glükózínolát tartalom és a kémiai összetétel variabilitása

A glükózínolátok alapvetően antifungális vegyületek prekurzorai (Plaszkó et al., 2022, 2021) és kiemelt jelentőségük van a növényi patogenezis megelőzésében (Agee et al., 2010; Frerigmann et al., 2016; Kuhn et al., 2017). Hat, olasz tormafajtán végzett összehasonlító vizsgálatban hasonló szinigrin, glükonaszturtiin, glükobrasszicin és glükoiiberin glükózínolát arányokról számoltak be, mint amilyeneket mi is találtunk az általunk vizsgált mintákban (Agneta et al., 2014). A mintavételi évek közötti variabilitás feltehetően a vegetációs időszakokban lehullott csapadék mennyiségének különbségeiből adódik, mivel a hőmérséklet és a csapadék fontos szerepet játszik a növény termesztésében (Nguyen et al., 2013). Fontos még megjegyezni, hogy a főbb glükózínolátok koncentrációjának 2-20-szoros különbségeit az egyes fajták között elegendőnek találtuk ahhoz, hogy a koncentráció adatokat autoskálázás után Spearman korrelációs tesztekkel vizsgáljuk.

6.2.3. Tormaminták endofiton gombaközösségének összetétele

A növényi mintákban számos olyan nemzetséget találtunk, amelyeket már endofitonként leírtak korábban, többek között a *Paraphoma* (Kang et al., 2021), *Plectosphaerella* (Feng et al., 2021; Wei et al., 2021), *Podospira* (Penner and Sapir, 2021) nemzetségeket. Ezek közül néhányat már Brassicaceae növényekben is azonosítottak, pl.: *Exophiala* (Maciá-Vicente et al., 2016), *Plectosphaerella* (Ważny et al., 2021), *Setophoma* (Poveda et al., 2020; Szűcs et al., 2018).

Az összes alfa- és béta-diverzitás metrika egyértelmű különbségeket mutatott a különböző mintatípusok között. Ahogy az várható volt, a talajminták mutatták a legnagyobb gazdagságot és diverzitást a többi mintához képest. Ez nem meglepő, hiszen a növényi mikrobiom általában kevésbé diverz (Sasse et al., 2018), mivel egy nagyon erős szűrő lehet, hogy számos talajgomba képtelen kolonizálni növényi szöveteket. Korábban is leírták már, hogy filogenetikailag távoli növénycsaládok gyökér endofiton közösségei meglepően nagy hasonlóságot mutatnak (Toju et al., 2019).

Ezzel szemben, a dominancia és egyenlőségi indexek azt mutatták, hogy a tormaminták nagyobb variabilitással rendelkeznek saját kategóriájukon belül mint a talajminták. Hasonló jelenséget már korábban is leírtak (Seabloom et al., 2019), ahol a szerzők arra a megállapításra jutottak, hogy a gomba endofiton közösségek eltérnek egy területen belül, de a gazdanövények tápanyagellátása nincs rájuk konzisztens hatással. Ennek ellenére, ahogy majd a későbbiekben is láthatjuk, ha egyetlen fajból elegendően nagy számú replika a rendelkezésünkre áll, sikeresen

lehet olyan modelleket építeni melyek képesek feltárni a növényi kémia és a gomba kolonizáció közti korrelációkat. A legtöbb tormamintában néhány gombatörzs viszonylag nagy dominanciával rendelkezett (Melléklet 3. ábra), ezt már több növénycsalád esetében is megfigyelték korábban (Toju et al., 2019). A dominancia mértéke azonban még így is szembetűnő, mely arra utalhat, hogy vannak pionír vagy gyorsan növekvő opportunisták fajok, melyek a növényi niche jelentős részét elfoglalhatják. Ez érdekes kérdéseket vet fel azzal kapcsolatban is, hogy az ilyen jellegű vizsgálatokban hány replikát lenne szükséges részletesen megvizsgálni.

6.2.4. Gomba és kémiai abundancia adatok közötti korrelációk

Eredményeink alapján elmondható, hogy a növény-mikroba interakciók vizsgálatában a komplex kémiai módszerek, mint pl. a metabolomika, rendkívül előnyösek lehetnek. Bár ez a módszer nem tudja kiváltani azokat a tanulmányokat, ahol knock-out mutáns növényeket használnak egy-egy vegyület a növényi mikrobiom összeszerelődésében játszott hatásának bizonyítására, a metabolomikai módszer megmutatta, hogy a növényi gombaközösség körülbelül egyharmada korrelál a növényi metabolom változására.

Bár a tervezett kísérleti elrendezés megengedte számunkra a korrelációk keresését, eredményeinket nem szabad közvetlenül ok-okozati összefüggésekként értelmezni, ugyanis számos egyéb magyarázat állhat a jelenségek hátterében. A vegyületjelölt és gomba abundancia értékek közötti pozitív korreláció lehet például a “toborzás” - elicitáció pozitív visszacsatolási hurok eredménye. Ilyen esetekben a gomba követi a növény által kibocsátott kémiai szignálokat, majd megpróbálja kolonizálni azt, melyet a növény válaszütemmel próbál kordában tartani (Sasse et al., 2018). A vegyület bioszintézise olyan szinten stabilizálódik amit a gomba még képes elviselni, de további növényi válaszütemet már nem eredményez, ezzel létrehozva egy kiegyensúlyozott antagonista kapcsolatot a növény és a gomba között (Schulz et al., 2015). Ha ez a bioszintetikus ráta magasabb mint az alapszint, akkor feltehetően egy pozitív korrelációt láthatunk a gomba abundancia értékek és metabolit koncentrációja között. Mivel a metabolomikában dinamikus folyamatok “pillanatképét” vizsgáljuk (Shen et al., 2023), az is lehetséges, hogy egy vegyületjelölt koncentrációjának emelkedése egy gomba behatolásának az eredménye, amely esemény például aminosavak, rövid peptidek vagy sejtfalalkotó monomerek felgyülemelését okozhatja. Megemlítenéd, hogy élő szövetek kolonizációjakor a gombák speciális sejtfal degradáló enzimeket használhatnak (Sun et al., 2023; Zuccaro et al., 2011). Mivel a különböző gomba taxonok inváziós stratégiája

eltérhet, így a növény különféle bioszintetikus vegyületek kombinációjával védekezik (Narayani and Srivastava, 2017; You et al., 2021).

Feltételezhetően negatív korrelációkat láthatunk a kémiai és gomba adatok között olyan esetekben, amikor a gomba megpróbál behatolni a gazdanövénybe, de egy olyan vegyület bioszintézise indul be, amely sikeresen csökkenti a gombakolonizációt. Azok a növények, melyek nem képesek efféle vegyületek bioszintézisére, sokkal nagyobb eséllyel kolonizálódnak egy ilyen gombatörzs által, bár ezt a jelenséget csak bizonyítottan antifungális hatással rendelkező vegyületekre lehet leszűkíteni (Bednarek et al., 2009; Lipka et al., 2010). Más esetekben a negatív korreláció azt is jelezheti, hogy a sejtek és az apoplaszt kolonizációja során a gombák felvesznek bizonyos vegyületeket, így a növényi szövetek részlegesen kimerülhetnek azokból.

Az azonosított vegyületosztályok közül a flavonoid glikozidok mutatkoztak az egyik legnagyobb befolyással rendelkező csoportnak a gomba abundancia korrelációkat illetően. Sok flavonoid, beleértve a kempferol származékokat is, bizonyítottan antifungális vegyületek *in vitro* körülmények között (Al Aboody and Mickymaray, 2020; Sá et al., 2023), továbbá *in vivo* bizonyítékok is vannak arra vonatkozóan, hogy ezek a vegyületek szerepet játszhatnak a gombák elleni védelemben. A szakirodalomban fellelhetőek olyan publikációk, melyekben leírták, hogy gombafertőzés esetén a flavonoidoknak vagy azok downstream termékeinek a bioszintézise megnövekedhet (Förster et al., 2022), vagy nagyobb mennyiségben akkumulálódhatnak, pl.: *Cucumis sativus* növényekben (McNally et al., 2003). Mivel a flavonoidok a legtöbb gombával pozitív korrelációt mutattak, így elképzelhető, hogy fontos szerepet játszanak a fentebb is említett kolonizáció - elicitáció visszacsatolási hurokban vagy az arbuszkuláris mikorrhiza kapcsolatok létrehozásához alkalmas gombák odacsalogtatásában (Wu et al., 2023).

A glükozinolát bomlástermékek antifungális vonatkozásáról már jelentős méretű szakirodalom elérhető, de mivel a glükozinolátoknak önmagukban nincs antifungális hatásuk, ezért minden bizonnyal a bomlástermékeknek van valódi szerepük a gomba-kolonizáció szabályozásában, mint azt korábban összefoglaltuk (Plaszkó et al., 2022). A jelen kutatómunkában vizsgált natív glükozinolátok gombákra gyakorolt hatása a jelenlegi adatsorban sem látszik egyértelműnek (Melléklet 2. táblázat), mivel a *Saccharomycetales* fajok abundanciája negatívan korrelál a hozzávetőlegesen azonosított glükozinolátokkal, de a *Xylariales* és a *Morosphaeriaceae* tagjai pozitívan. A főbb glükozinolátok láthatóan nem mutatnak korrelációkat, de ez adódhat abból is, hogy a tormában kifejezetten nagy koncentrációban található glükozinolát a többi *Brassicaceae* zöldségfélékhez képest, ami azt

jelentheti, hogy csak a downstream termékek képződése az előfeltétele a gomba kolonizáció megállásának, és nem szükséges (vagy már nem is lehetséges) a glükozinolát bioszintézis fokozása.

Nem meglepő, hogy a fitoalexin-szerű vegyületek negatív korrelációkat mutattak a gombaabundancia értékekkel (Melléklet 2. táblázat), számos, részletesebben nem azonosítható Ascomycota ASV negatívan korrelált egy indol-3-karbonsav származékkal, továbbá egy indol-3-metil aminosav származék és az indol-3-metil cisztein szintén aktívnak bizonyult. Ezen vegyületek közeli rokonai gyakran előkerülnek *Arabidopsis*-gomba interakciókról szóló publikációkban, melyekben szignifikáns szerepet tulajdonítanak ezeknek a vegyületeknek a gomba-kolonizáció gátlásában (Bednarek et al., 2011; Fukunaga et al., 2017; Gamir et al., 2014; Kuhn et al., 2017; Sanchez-Vallet et al., 2010), ebből kifolyólag gondoljuk mi is úgy, hogy ezek magas szintje hozzájárul a gomba-kolonizáció gátlásához.

A peptidek általában véve nem rendelkeznek szignifikáns antifungális hatással, de írtak már le speciális, antifungális hatású peptideket (Fan et al., 2023), bár ezek sokkal nagyobb méretűek mint néhány aminosav. Ennek ellenére érdekes, hogy a 423,1387@12,58 és 471,1058@11,06 peptidek rendkívül erős negatív korrelációt mutattak, magasabb koncentrációjuk esetén a Xylariales, Capnodiales, Saccharomycetales, Sordariales, Agaricomycetes csoportokba és a *Setophoma*, *Monosporascus*, *Melanoleuca* nemzetségekbe tartozó gombák mennyisége is csökkent. Ami még inkább említésre méltó, hogy ezek egyike glutation-izotiocianát adduktként lett azonosítva (Melléklet 1. táblázat), amely az izotiocianátok detoxifikációja során keletkezik gombákban (Szűcs et al., 2018). Az adatokban történő célzott keresés (mzMine szoftverrel) során a 407,1071@11,86 és 471,1388@13,35 vegyületjelölteket is megtaláltuk, amelyek minden bizonnyal szinigrin és glükonaszturtiin izotiocianátjaival alkotott glutation adduktok, továbbá nyomokban egy glükobrasszicin eredetű is fellelhető volt. Megemlítendő, hogy míg glükoiiberinből származó izotiocianát addukt mennyisége 0,709-es korrelációt mutatott a glükoiiberin glükozinolát tényleges mennyiségével, ez az érték szinigrin és glükonaszturtiin esetén 0,35 alatt volt. Ez biztató abból a szempontból, hogy valószínűleg nem mintaelőkészítési műtermékeket, vagyis a nem kielégítő kriogén homogenizálás miatt a mirozináz reakcióból származó downstream termékeket látunk. Viszont, az említett adduktok jelenléte számos további kérdést felvet, amelyek további kutatások alapjául szolgálhatnak. Mivel az izotiocianát származékok vagy adduktok részesei a glükozinolát védelmi rendszernek (Hiruma et al., 2013; Piślewska-Bednarek et al., 2018), feltételezhető, hogy a glükozinolát lebontás látható koncentrációbeli változás nélkül is lezajlódhat. Ahogy fentebb is látható, ez annak is lehet az eredménye, hogy a tormában

különösen nagy koncentrációban találhatóak glükozinolátok a többi keresztesvirágú növényvel összevetve (Gonda et al., 2016). A glükozinolátok közvetlen vizsgálata helyett érdekesebb lehet a downstream bomlástermékeket vizsgálni gomba - növény interakciók tanulmányozásakor, ezzel fény derülhet további, eddig ismeretlen jelenségekre. Az imént említett megközelítést alkalmazták már *Arabidopsis thaliana* növények vizsgálatánál, ahol glükozinolát downstream bomlástermékek széles skáláját vizsgálták (Bednarek et al., 2011). A glükozinolát eredetű izotiociánát downstream termékek létrejöttében a glutationnak is fontos szerepe van, feltételezhetően az autotoxicitás elleni védelemben is (Hématy et al., 2020; Hiruma et al., 2013; Piślewska-Bednarek et al., 2018), amit eredményeink is alátámaszthatnak. A különböző glükozinolát downstream termékek, pl.: indolos vegyületek, bioszintézisére való képesség egy fontos előfeltétele a gombák általi kolonizáció szabályozásának (Bednarek et al., 2009). Ugyanakkor fontos megjegyeznünk, hogy ezekben a folyamatokban szerepet játszó kulcsvegyületek listája egyelőre nem teljes (Frerigmann et al., 2016; Kuhn et al., 2017). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a glükozinolát eredetű izotiociánát bomlástermékek glutationnal alkotott konjugátumai jó kiindulópontjai lehetnek jövőbeli növény-gomba interakciós vizsgálatoknak.

Az aminosav származékok által mutatott pozitív korrelációk, viszont, elsősorban a “gombatoborzás” hipotézist erősítik, mivel a primer metabolitok, nem meglepő módon, tápanyagként is szolgálhatnak a gombák számára. Az is lehetséges továbbá, hogy a megnövekedett gomba diverzitás miatt a fehérjebontó enzimek abundanciája is megnőhet az apoplasztban, mely több, gombák által is felvehető, aminosavat és aminosav származékot eredményezhet. Más primer metabolitok (foszfolipidek és lipid-szerű molekulák, nukleotid származékok) vegyes korrelációkat mutattak az egyes gomba taxonokkal (Melléklet 2. táblázat). Habár leírtak már speciális, antifungális hatású foszfolipideket (Cho et al., 1999), közvetlen antifungális hatás nem jellemző rájuk, ezért feltételezhető, hogy a csökkent mennyiségük elsősorban annak köszönhető, hogy a gombák felhasználták azokat szén- és foszforforrásként.

7. Összefoglalás

A jelen értekezés alapjául szolgáló kutatómunkánk a torma mikrobiomját alkotó endofitonok vizsgálatára irányult. Munkánk során GC-MS és LC-MS/MS műszeres analitikai, illetve új-generációs szekvenálási módszerekkel vizsgáltuk az endofitonok és a gazdanövény közötti kémiai interakciókat.

Kutatásunk első fázisában torma gyökerekből készített kivonaton vizsgáltuk a tormából izolált endofiton gombák, illetve a torma környezetéből izolált talajgombák inkubációja során keletkező illékony szerves vegyületeket (VOC). Az általunk alkalmazott inkubációs módszerrel a relatíve nagy agarfelület és a mikroaerofil környezet megfelelőnek bizonyult a gombák által termelt VOC-ok hatékony analizéséhez. A gombák gőzteréből detektált illékony vegyületek közt találtunk például alkoholokat, észtereket és ketonokat, továbbá olyan kéntartalmú vegyületeket is, melyek minden bizonnyal a tormában található glükozinolátok bomlástermékei. Nem csak a szinigrin eredetű allil-cianidot és allil-izotiocianátot sikerült detektálnunk, hanem szén-diszulfidot és dimetil-szulfidot is, melyek jelenléte alternatív bomlási vagy detoxifikációs útvonalak meglétét sugallják. Továbbá elmondható, hogy számos gombanemzetség (pl.: *Curvularia*, *Notophoma*, *Paraphoma*, *Setophoma*) képviselőjének VOC mintázatát elsőként sikerült leírnunk. Habár az egyes gombák VOC mintázata jelentősen eltérő volt, az endofiton és talajgombák csoportját nem lehetett szignifikánsan elkülöníteni ezen mintázatok alapján. Mivel *in vitro* modellekben bebizonyítottuk, hogy a tormában és környezetében élő gombák számos kémiai kölcsönhatást mutatnak a gazdanövény metabolitjaival szemben, így részletesebben is megvizsgáltuk a torma endoszféráját nagyobb áteresztőképességű módszerekkel.

Kutatásunk második fázisában különböző tormafajták metabolitjainak összessége és a bennük élő endofiton gombák közötti *in vivo* kémiai kölcsönhatásokat vizsgáltuk, nem-célzott metabolomikai és metagenomikai adatok integrálásával. A tormagyökerek metabolomjában mért változások számos korrelációt mutattak a különböző endofiton gombák relatív abundanciájával. Az azonosított gombataxonok legalább egyharmada szignifikánsan korrelált egy vagy több vegyületjelölttel. Nem-célzott metabolomikával számos vegyületjelöltet sikerült hozzávetőlegesen is azonosítanunk, többek között aminosav származékokat, flavonoid glikozidokat, glükozinolátokat, indol származékokat, lipideket, aromás/polifenolos vegyületek, peptideket, stb. Több ilyen vegyületosztályról, például a flavonoid glikozidokról is ismert, hogy antifungális hatással rendelkeznek, ennek ellenére számos gombataxonnal

pozitív korrelációt mutattak. Ez a jelenség a “gombatoborzás” - elicitációs visszacsatolási elméletet igazolhatja, mely szerint ez a visszacsatolási hurok a növény bioszintetikus rátáját egy magasabb szinten stabilizálja, melyet a potenciális kolonizáló gombák még képesek elviselni, de az egyéb, például patogén gombák fejlődését gátolhatja. Ezzel szemben, számos vegyület, például indol származékok, glükozinolat bomlástermékek, negatív korrelációkat mutatott a gombákkal. Feltételezésünk szerint a jelenség hátterében az állhat, hogy ezek a vegyületek fontos szerepet játszanak a gombakolonizáció korlátozásában. Fontos megjegyeznünk még, hogy érdekes módon a torma fő glükozinolatjai nem mutattak szignifikáns korrelációkat. Feltételezzük, hogy a növényen belüli nagy koncentrációjuk miatt nehéz lenne szignifikáns változást detektálnunk korrelációs analízisekben.

Összességében elmondható, hogy a nem-célzott metabolomika egy rendkívül hasznos kiegészítője lehet más omikai (metagenomika, proteomika, transzkriptomika) megközelítéseknek. Az általunk alkalmazott metabolomika - metagenomika kombináció is számos, jól értelmezhető jelenséget tárt fel a növény - gomba kapcsolatok komplex világában. Reményeink szerint kutatómunkánk jó kiindulási alapot jelenthet jövőbeli multi-omikai tanulmányok kivitelezéséhez.

8. Summary

The research underlying the present thesis focused on the fungal endophytes of the horseradish microbiome. We used GC-MS and LC-MS/MS instrumental analysis and next-generation sequencing methods to investigate the chemical interactions between endophytes and the host plant.

In the first phase of our study, we investigated the volatile organic compounds (VOCs) produced during the incubation of endophytic/soil fungi isolated from/near horseradish roots on a medium prepared from horseradish roots. Our proposed incubation method proved to be suitable for efficient analysis of the VOCs produced by the fungi. Among the volatile compounds detected in the headspace of the growing fungi, we found, for example, alcohols, esters and ketones, as well as sulfur-containing compounds that are most likely degradation products of glucosinolates in horseradish. Not only allyl cyanide and allyl isothiocyanate of sinigrin origin were detected, but also carbon disulphide and dimethyl sulfide. The presence of these compounds suggests the existence of alternative degradation or detoxification pathways. Furthermore, we firstly described the VOC patterns of representatives of several fungal genera (e.g. *Curvularia*, *Notophoma*, *Paraphoma*, *Setophoma*). Although the VOC patterns of the individual fungi were significantly different, the endophytic and soil fungi groups could not be significantly distinguished on the basis of these patterns.

In the second phase of our research, we investigated the *in vivo* chemical interactions between the metabolome of different horseradish varieties and their endophytic fungi, integrating untargeted metabolomic and metagenomic data. Changes in the metabolome of horseradish roots showed several correlations with the relative abundance of different endophytic fungi. At least one third of the identified fungal taxa were significantly correlated with one or more chemical features. Using untargeted metabolomics, we were also able to putatively annotate several features, including amino acid derivatives, flavonoid glycosides, glucosinolates, indole derivatives, lipids, aromatic/polyphenolic compounds, peptides, etc. Our results suggest that untargeted metabolomics can be a very useful complementary technique to other omics (metagenomics, proteomics, transcriptomics) approaches. Our metabolomics - metagenomics combination has also revealed a number of well-understood phenomena in the complex world of plant - fungus interactions. We hope that our research can provide a good starting point for future multi-omics studies.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

- Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R.H., Kõljalg, U., 2021a. UNITE general FASTA release for Fungi. <https://doi.org/10.15156/BIO/1280049>
- Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R.H., Kõljalg, U., 2021b. UNITE QIIME release for eukaryotes. <https://doi.org/10.15156/BIO/1264819>
- Abdelfattah, A., Tack, A.J.M., Lobato, C., Wassermann, B., Berg, G., 2023. From seed to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends Microbiol.* 31, 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>
- Agee, A.E., Surpin, M., Sohn, E.J., Girke, T., Rosado, A., Kram, B.W., Carter, C., Wentzell, A.M., Kliebenstein, D.J., Jin, H.C., Park, O.K., Jin, H., Hicks, G.R., Raikhel, N.V., 2010. MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an *Arabidopsis* myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking. *Plant Physiol.* 152, 120–132. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145078>
- Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J.H., Jander, G., 2009. Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochem. Rev.* 8, 101. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9098-0>
- Agneta, R., Möllers, C., De Maria, S., Rivelli, A.R., 2014. Evaluation of root yield traits and glucosinolate concentration of different *Armoracia rusticana* accessions in Basilicata region (southern Italy). *Sci. Hortic.* 170, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.025>
- Agneta, R., Rivelli, A.R., Ventrella, E., Lelario, F., Sarli, G., Bufo, S.A., 2012. Investigation of Glucosinolate Profile and Qualitative Aspects in Sprouts and Roots of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Using LC-ESI Hybrid Linear Ion Trap with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Infrared Multiphoton Dissociation. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7474–7482. <https://doi.org/10.1021/jf301294h>
- Al Aboody, M.S., Mickymaray, S., 2020. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics* 9, 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>
- Anand, K., Kumar, V., Prasher, I.B., Sethi, M., Raj, H., Ranjan, H., Chand, S., Pandey, G.K., 2023. Bioactive molecules from fungal endophytes and their applications in pharmaceutical industries: challenges and future scope. *J. Basic Microbiol.* 63, 690–708. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200696>
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., Schulze-Lefert, P., 2009. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323, 101–106. <https://doi.org/10.1126/science.1163732>
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Themaat, E.V.L. van, Maddula, R.K., Svatoš, A., Schulze-Lefert, P., 2011. Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. *New Phytol.* 192, 713–726. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03824.x>

- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N., 2020. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry* 169, 112100. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
- Boogaart, K.G. van den, Tolosana-Delgado, R., Bren, M., 2022. compositions: Compositional Data Analysis.
- Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F.E.Z., Achouak, W., Berge, O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J.* 3, 1243–1257. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S.N., Kuligowski, J., Wilson, I.D., Lewis, M.R., Dunn, W.B., 2018. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics* 14, 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Buskov, S., Olsen, C.E., Sørensen, H., Sørensen, S., 2000. Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indol-3-ylmethyl oligomers and ascorbigens. *J. Biochem. Biophys. Methods* 43, 175–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00083-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00083-X)
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Calmes, B., Morel-Rouhier, M., Bataillé-Simoneau, N., Gelhaye, E., Guillemette, T., Simoneau, P., 2015. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. *BMC Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0462-0>
- Castresana, J., 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Chen, J., Ullah, C., Reichelt, M., Beran, F., Yang, Z.-L., Gershenzon, J., Hammerbacher, A., Vassão, D.G., 2020. The phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* detoxifies plant glucosinolate hydrolysis products via an isothiocyanate hydrolase. *Nat. Commun.* 11, 3090. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16921-2>
- Chhajer, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., Chen, S., 2020. Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy* 10, 1786. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111786>
- Chitarra, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M., Dijksterhuis, J., 2005. 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.013>
- Cho, K.-W., Seo, Y.-W., Yoon, T.-M., Shin, J.-H., 1999. Purification and Structure Determination of Antifungal Phospholipids from a Marine *Streptomyces*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 709–715.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- DeAngelis, K.M., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Lindow, S.E., Firestone, M.K., 2009. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat

- roots. ISME J. 3, 168–178. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.103>
- Depke, T., Franke, R., Brönstrup, M., 2019. CluMSID: an R package for similarity-based clustering of tandem mass spectra to aid feature annotation in metabolomics. *Bioinformatics* 35, 3196–3198. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz005>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- DeWolf, E., Brock, M.T., Calder, W.J., Kliebenstein, D.J., Katz, E., Li, B., Morrison, H.G., Maïgnien, L., Weinig, C., 2023. The rhizosphere microbiome and host plant glucosinolates exhibit feedback cycles in *Brassica rapa*. *Mol. Ecol.* 32, 741–751. <https://doi.org/10.1111/mec.16782>
- Djoumbou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., Wishart, D.S., 2016. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J. Cheminformatics* 8, 61. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Dudzic, D., Barbas-Bernardos, C., García, A., Barbas, C., 2018. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Review issue 2017 147, 149–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A.A., Melnik, A.V., Meusel, M., Dorrestein, P.C., Rousu, J., Böcker, S., 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* 16, 299–302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Nothias, L.-F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M.A., Petras, D., Gerwick, W.H., Rousu, J., Dorrestein, P.C., Böcker, S., 2021. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nat. Biotechnol.* 39, 462–471. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0740-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., Böcker, S., 2015. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B., Goodacre, R., 2011. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 6, 1060–1083. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J.M., Wang, J., Eldridge, D.J., Bardgett, R.D., Maestre, F.T., Singh, B.K., 2019. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nat. Commun.* 10, 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- Evans, A.M., O'Donovan, C., Playdon, M., Beecher, C., Beger, R.D., Bowden, J.A., Broadhurst, D., Clish, C.B., Dasari, S., Dunn, W.B., Griffin, J.L., Hartung, T., Hsu, P.-C., Huan, T., Jans, J., Jones, C.M., Kachman, M., Kleensang, A., Lewis, M.R., Monge, M.E., Mosley, J.D., Taylor, E., Tayyari, F., Theodoridis, G., Torta, F., Ubhi, B.K., Vuckovic, D., on behalf of the Metabolomics Quality Assurance, Q.C.C. (mQACC), 2020. Dissemination and analysis of the quality assurance (QA) and quality control (QC) practices of LC–MS based untargeted metabolomics practitioners. *Metabolomics* 16, 113. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01728-5>

- Fan, L., Wei, Y., Chen, Y., Jiang, S., Xu, F., Zhang, C., Wang, H., Shao, X., 2023. Epinecidin-1, a marine antifungal peptide, inhibits *Botrytis cinerea* and delays gray mold in postharvest peaches. *Food Chem.* 403, 134419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134419>
- Feng, L., Zhang, A.X., Li, L., Zhang, X.J., Wang, Z., Tan, N.H., 2021. Diversity of cultivable endophytic fungi in two *Rubia* plants and their potential for production of anti-tumour Rubiaceae-type cyclopeptides. *Lett. Appl. Microbiol.* 73, 759–769. <https://doi.org/10.1111/lam.13571>
- Fesel, P.H., Zuccaro, A., 2016. Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.008>
- Förster, C., Handrick, V., Ding, Y., Nakamura, Y., Paetz, C., Schneider, B., Castro-Falcón, G., Hughes, C.C., Luck, K., Poosapati, S., Kunert, G., Huffaker, A., Gershenzon, J., Schmelz, E.A., Köllner, T.G., 2022. Biosynthesis and antifungal activity of fungus-induced O-methylated flavonoids in maize. *Plant Physiol.* 188, 167–190. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab496>
- Frerigmann, H., Piślewska-Bednarek, M., Sánchez-Vallet, A., Molina, A., Glawischnig, E., Gigolashvili, T., Bednarek, P., 2016. Regulation of pathogen-triggered tryptophan metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB transcription factors and indole glucosinolate conversion products. *Mol. Plant* 9, 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.006>
- Fuchs, R., Kopischke, M., Klapprodt, C., Hause, G., Meyer, A.J., Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Lipka, V., 2016. Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28, 130–145. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00887>
- Fukunaga, S., Sogame, M., Hata, M., Singkaravanit-Ogawa, S., Piślewska-Bednarek, M., Onozawa-Komori, M., Nishiuchi, T., Hiruma, K., Saitoh, H., Terauchi, R., Kitakura, S., Inoue, Y., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P., Takano, Y., 2017. Dysfunction of *Arabidopsis* MACPF domain protein activates programmed cell death via tryptophan metabolism in MAMP-triggered immunity. *Plant J.* 89, 381–393. <https://doi.org/10.1111/tpj.13391>
- Gamir, J., Pastor, V., Kaeffer, A., Cerezo, M., Flors, V., 2014. Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* 78, 227–240. <https://doi.org/10.1111/tpj.12465>
- García-Latorre, C., Rodrigo, S., Santamaría, O., 2023. Potential of Fungal Endophytes Isolated from Pasture Species in Spanish Dehesas to Produce Enzymes under Salt Conditions. *Microorganisms* 11, 908. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040908>
- Gloor, G.B., Macklaim, J.M., Pawlowsky-Glahn, V., Egozcue, J.J., 2017. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front. Microbiol.* 8.
- Godara, H., Ramakrishna, W., 2023. Endophytes as nature's gift to plants to combat abiotic stresses. *Lett. Appl. Microbiol.* 76, ovac067. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac067>
- Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Szűcs, Z., Nguyen, N.M., Vasas, G., 2016. Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC). *Phytochem. Anal.* 27, 191–198. <https://doi.org/10.1002/pca.2615>
- Govinda Rajulu, M.B., Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M., 2011. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Divers.* 47, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0071-z>
- Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C.H., Kurczyk, M.E., Benton, H.P., Rinehart, D., Nguyen,

- T., Ray, J., Kuehl, J., Arevalo, B., Westenskow, P.D., Wang, J., Arkin, A.P., Deutschbauer, A.M., Patti, G.J., Siuzdak, G., 2014. Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Anal. Chem.* 86, 6931–6939. <https://doi.org/10.1021/ac500734c>
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Gunatilaka, A.A.L., 2006. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* 69, 509–526. <https://doi.org/10.1021/np058128n>
- Hammer, O., Harper, D., Ryan, P., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9.
- Hanschen, F.S., Lamy, E., Schreiner, M., Rohn, S., 2014. Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 11430–11450. <https://doi.org/10.1002/anie.201402639>
- Harun, S., Abdullah-Zawawi, M.-R., Goh, H.-H., Mohamed-Hussein, Z.-A., 2020. A Comprehensive Gene Inventory for Glucosinolate Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *J. Agric. Food Chem.* 68, 7281–7297. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01916>
- Hématy, K., Lim, M., Cherk, C., Piślewska-Bednarek, M., Sanchez-Rodriguez, C., Stein, M., Fuchs, R., Klapprodt, C., Lipka, V., Molina, A., Grill, E., Schulze-Lefert, P., Bednarek, P., Somerville, S., 2020. Moonlighting function of Phytochelatin synthase1 in extracellular defense against fungal pathogens. *Plant Physiol.* 182, 1920–1932. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01393>
- Herz, C., Tran, H.T.T., Márton, M.-R., Maul, R., Baldermann, S., Schreiner, M., Lamy, E., 2017. Evaluation of an Aqueous Extract from Horseradish Root (*Armoracia rusticana* Radix) against Lipopolysaccharide-Induced Cellular Inflammation Reaction. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2017*, 1950692. <https://doi.org/10.1155/2017/1950692>
- Hiruma, K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Watanabe, S., Narusaka, Y., Shirasu, K., Takano, Y., 2013. Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9589–9594. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305745110>
- Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., Takano, Y., 2010. Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in *Arabidopsis* for nonhost resistance against anthracnose pathogens. *Plant Cell* 22, 2429–2443. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074344>
- Holland, H.L., Brown, F.M., Larsen, B.G., 1994. Preparation of (R)-sulforaphane by biotransformation using *Helminthosporium* species NRRL 4671. *Tetrahedron Asymmetry* 5, 1129–1130. [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(94\)80137-1](https://doi.org/10.1016/0957-4166(94)80137-1)
- Holmer, R., Rutten, L., Kohlen, W., van Velzen, R., Geurts, R., 2017. Chapter Eight - Commonalities in Symbiotic Plant-Microbe Signalling, in: Becard, G. (Ed.), *Advances in Botanical Research, How Plants Communicate with Their Biotic Environment*. Academic Press, pp. 187–221. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.11.003>
- Hori, Y., Fujita, H., Hiruma, K., Narisawa, K., Toju, H., 2021. Synergistic and Offset Effects of Fungal Species Combinations on Plant Performance. *Front. Microbiol.* 12.
- Hornung, B.V.H., Zwartink, R.D., Kuijper, E.J., 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, fiz045.

- <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz045>
- Huang, A.C., Jiang, T., Liu, Y.-X., Bai, Y.-C., Reed, J., Qu, B., Goossens, A., Nützmann, H.-W., Bai, Y., Osbourn, A., 2019. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.aau6389>
- Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3395–3405.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>
- Ihrmark, K., Bödeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>
- Junker, C., Draeger, S., Schulz, B., 2012. A fine line – endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecol.* 5, 657–662.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.002>
- Kang, L., He, D., Wang, H., Han, G., Lv, H., Xiao, W., Zhang, Z., Yan, Z., Huang, L., 2021. “Breeding on Mountains” Resulted in the Reorganization of Endophytic Fungi in Asexually Propagated Plants (*Ligusticum chuanxiong* Hort.). *Front. Plant Sci.* 12.
- Kuhn, H., Lorek, J., Kwaaitaal, M., Consonni, C., Becker, K., Micali, C., Ver Loren van Themaat, E., Bednarek, P., Raaymakers, T.M., Appiano, M., Bai, Y., Meldau, D., Baum, S., Conrath, U., Feussner, I., Panstruga, R., 2017. Key components of different plant defense pathways are dispensable for powdery mildew resistance of the *Arabidopsis* mlo2 mlo6 mlo12 triple mutant. *Front. Plant Sci.* 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01006>
- Lacerda, J.W.F., Siqueira, K.A., Vasconcelos, L.G., Belleite, B.S., Dall’Oglio, E.L., Sousa Junior, P.T., Faraggi, T.M., Vieira, L.C.C., Soares, M.A., Sampaio, O.M., 2021. Metabolomic Analysis of *Combretum lanceolatum* Plants Interaction with *Diaporthe phaseolorum* and *Trichoderma spirale* Endophytic Fungi through 1H-NMR. *Chem. Biodivers.* 18. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100350>
- Lefort, V., Longueville, J.-E., Gascuel, O., 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Li, Y., Jiang, H., Gao, M., He, R., Liu, X., Su, W., Liu, H., 2023. Far-Red-Light-Induced Morphology Changes, Phytohormone, and Transcriptome Reprogramming of Chinese Kale (*Brassica alboglabra* Bailey). *Int. J. Mol. Sci.* 24, 5563.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065563>
- Lipka, U., Fuchs, R., Kuhns, C., Petutschnig, E., Lipka, V., 2010. Live and let die - *Arabidopsis* nonhost resistance to powdery mildews. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 194–199.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.011>
- Ludwig-Müller, J., 2015. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.* 37, 1325–1334. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1814-4>
- Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T., Anaya, A.L., 2010. Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.* 36, 1122–1131.
<https://doi.org/10.1007/s10886-010-9848-5>
- Maciá-Vicente, J.G., Glynou, K., Piepenbring, M., 2016. A new species of *Exophiala* associated with roots. *Mycol. Prog.* 15, 18. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1161-4>

- Madloo, P., Lema, M., Francisco, M., Soengas, P., 2019. Role of major glucosinolates in the defense of kale against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology* 109, 1246–1256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-18-0340-R>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McNally, D.J., Wurms, K.V., Labbé, C., Bélanger, R.R., 2003. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.03.005>
- Mercier, J., Jiménez, J.I., 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.08.004>
- Narayani, M., Srivastava, S., 2017. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochem. Rev.* 16, 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>
- Ndagijimana, M., Chaves-López, C., Corsetti, A., Tofalo, R., Sergi, M., Paparella, A., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., 2008. Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.019>
- Nguyen, N.H., Smith, D., Peay, K., Kennedy, P., 2015. Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytol.* 205, 1389–1393.
- Nguyen, N.M., Gonda, S., Vasas, G., 2013. A Review on the Phytochemical Composition and Potential Medicinal Uses of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root. *Food Rev. Int.* 29, 261–275. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.790047>
- Nguyen, T.A.N., Higa, T., Shiina, A., Utami, Y.D., Hiruma, K., 2023. Exploring the roles of fungal-derived secondary metabolites in plant-fungal interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 125, 102021. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102021>
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* 47, D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Palarea-Albaladejo, J., Martín-Fernández, J.A., 2015. zCompositions — R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 143, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.02.019>
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y., 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>
- Park, I., Seo, Y.-S., Mannaa, M., 2023. Recruitment of the rhizo-microbiome army: assembly determinants and engineering of the rhizosphere microbiome as a key to unlocking plant potential. *Front. Microbiol.* 14.
- Patil, R., Satpute, R., Nalage, D., 2023. Plant microbiomes and their role in plant health. *Microenviron. Microecol. Res.* 5, 2. <https://doi.org/10.53388/MMR2023002>
- Paul, D., Park, K.S., 2013. Identification of Volatiles Produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a Fungal Biocontrol Agent That Promotes Plant Growth. *Sensors* 13, 13969–13977. <https://doi.org/10.3390/s131013969>
- Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., Lesur, I., Vallance, J., Vacher, C., 2019. Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil

- fungus community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecol.* 41, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.03.005>
- Pecháček, R., Velíšek, J., Hrabcová, H., 1997. Decomposition Products of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solutions. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4584–4588. <https://doi.org/10.1021/jf970316z>
- Penner, S., Sapir, Y., 2021. Foliar Endophytic Fungi Inhabiting an Annual Grass Along an Aridity Gradient. *Curr. Microbiol.* 78, 2080–2090. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02437-5>
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D., 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Divers.*
- Piślewska-Bednarek, M., Nakano, R.T., Hiruma, K., Pastorczyk, M., Sanchez-Vallet, A., Singkaravanit-Ogawa, S., Ciesiołka, D., Takano, Y., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Bednarek, P., 2018. Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism. *Plant Physiol.* 176, 538–551. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01455>
- Plaszkó, T., Szűcs, Z., Vasas, G., Gonda, S., 2022. Interactions of fungi with non-isothiocyanate products of the plant glucosinolate pathway: A review on product formation, antifungal activity, mode of action and biotransformation. *Phytochemistry* 200, 113245. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113245>
- Plaszkó, T., Szűcs, Z., Vasas, G., Gonda, S., 2021. Effects of glucosinolate-derived isothiocyanates on fungi: A comprehensive review on direct effects, mechanisms, structure-activity relationship data and possible agricultural applications. *J. Fungi* 7, 539. <https://doi.org/10.3390/jof7070539>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Oresic, M., 2010. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Poveda, J., Zabalgogea, I., Soengas, P., Rodríguez, V.M., Carrea, M.E., Abilleira, R., Velasco, P., 2020. *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale) improvement by biological activity of root endophytic fungi. *Sci. Rep.* 10, 20224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77215-7>
- Priyashantha, A.K.H., Dai, D.-Q., Bhat, D.J., Stephenson, S.L., Promputtha, I., Kaushik, P., Tibpromma, S., Karunarathna, S.C., 2023. Plant–Fungi Interactions: Where It Goes? *Biology* 12, 809. <https://doi.org/10.3390/biology12060809>
- Quinn, T.P., Erb, I., 2021. Examining microbe–metabolite correlations by linear methods. *Nat. Methods* 18, 37–39. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01006-1>
- R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Reese, E.T., Clapp, R.C., Mandels, M., 1958. A thioglucosidase in fungi. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 228–242.
- Robin, A.H.K., Yi, G.-E., Laila, R., Hossain, M.R., Park, J.-I., Kim, H.R., Nou, I.-S., 2017. *Leptosphaeria maculans* alters glucosinolate profiles in blackleg disease-resistant and -susceptible cabbage lines. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01769>
- Rochfort, S.J., Trenerry, V.C., Insic, M., Panozzo, J., Jones, R., 2008. Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSn fragmentation. *Phytochemistry* 69, 1671–1679. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.010>
- Rodríguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–330.
- Rojas-Flores, C., Ventura-Aguilar, R.I., Bautista-Baños, S., Revah, S., Saucedo-Lucero, J.O., 2019. Estimating CO₂ and VOCs production of *Colletotrichum fragariae* and

- Rhizopus stolonifer* grown in cold stored strawberry fruit. Microbiol. Res. 228, 126327. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126327>
- Sá, F.A. da S., Silva, T.C., Andrade, W.M., de Ávila, R.I., Valadares, M.C., Costa, C.R., Santos, A.S., Feitas, V.A.Q., de Paula, J.R., Silva, M. do R.R., 2023. Antifungal activity of the ethanolic extract and flavonoid avicularin from *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. on virulence factors of *Candida* species. J. Herb. Med. 38, 100643. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100643>
- Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., Molina, A., 2010. Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi. Plant J. 63, 115–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04224.x>
- Sarashgi, A., Puschenreiter, M., Baune, M., Paffrath, V., Oburger, E., Giehl, R.F.H., Rosenkranz, T., 2021. Does the exudation of coumarins from Fe-deficient, soil-grown Brassicaceae species play a significant role in plant Fe nutrition? Rhizosphere 19, 100410. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100410>
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? Trends Plant Sci. 23, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Schirmer, M., Ijaz, U.Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W.T., Quince, C., 2015. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. Nucleic Acids Res. 43, e37. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>
- Schliep, K.P., 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. Bioinformatics 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Schoen, H.R., Knighton, W.B., Peyton, B.M., 2017. Endophytic fungal production rates of volatile organic compounds are highest under microaerophilic conditions. Microbiol. Read. Engl. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000555>
- Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. Mycol. Res. 109, 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N., Schobert, M., 2015. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. Curr. Sci. 39–45.
- Seabloom, E.W., Condon, B., Kinkel, L., Komatsu, K.J., Lumibao, C.Y., May, G., McCulley, R.L., Borer, E.T., 2019. Effects of nutrient supply, herbivory, and host community on fungal endophyte diversity. Ecology 100, e02758.
- Sharma, A., Sinharoy, S., Bisht, N.C., 2023. The mysterious non-arbuscular mycorrhizal status of Brassicaceae species. Environ. Microbiol. 25, 917–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16339>
- Shen, S., Zhan, C., Yang, C., Fernie, A.R., Luo, J., 2023. Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. Mol. Plant 16, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.007>
- Singh, S.K., Strobel, G.A., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., Ezra, D., 2011. An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. Microb. Ecol. 61, 729–739. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9818-7>
- Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biol. Rev., Fungal Endophytes 21, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Smits, J.P., Knol, W., Bol, J., 1993. Glucosinolate degradation by *Aspergillus clavatus* and *Fusarium oxysporum* in liquid and solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 696–701. <https://doi.org/10.1007/BF00182812>
- Strobel, G., 2011. *Muscodor* species- endophytes with biological promise. Phytochem. Rev.

- 10, 165–172. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9163-3>
- Sturm, C., Wagner, A.E., 2017. Brassica-derived plant bioactives as modulators of chemopreventive and inflammatory signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091890>
- Sun, J., Zhang, X., Zheng, J., Liu, G., Chen, L., 2023. Importance of Cell Wall Permeability and Cell Wall Degrading Enzymes during Infection of *Botrytis cinerea* in Hazelnut. *Forests* 14, 565. <https://doi.org/10.3390/f14030565>
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Gopalan, V., 2012. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. *Fungal Divers.* 54, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0168-7>
- Szűcs, Z., Plaszkó, T., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Emri, T., Bertóti, R., Sinka, L.T., Vasas, G., Gonda, S., 2018. Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate - myrosinase - isothiocyanate system. *BMC Plant Biol.* 18, 85. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1295-4>
- Toju, H., Kurokawa, H., Kenta, T., 2019. Factors Influencing Leaf- and Root-Associated Communities of Bacteria and Fungi Across 33 Plant Orders in a Grassland. *Front. Microbiol.* 10.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLOS ONE* 7, e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Van Den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., Van Der Werf, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Voges, M.J.E.E., Bai, Y., Schulze-Lefert, P., Sattely, E.S., 2019. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 12558–12565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820691116>
- Vos, C.M., Yang, Y., De Coninck, B., Cammue, B.P.A., 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biol. Control* 74, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.004>
- Ważny, R., Rozpądek, P., Domka, A., Jędrzejczyk, R.J., Nosek, M., Hubalewska-Mazgaj, M., Lichtscheidl, I., Kidd, P., Turnau, K., 2021. The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea* hyperaccumulators. *Sci. Total Environ.* 768, 144666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144666>
- Wei, G., Ning, K., Zhang, G., Yu, H., Yang, S., Dai, F., Dong, L., Chen, S., 2021. Compartment Niche Shapes the Assembly and Network of *Cannabis sativa*-Associated Microbiome. *Front. Microbiol.* 12, 714993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.714993>
- Wenig, P., Odermatt, J., 2010. OpenChrom: a cross-platform open source software for the mass spectrometric analysis of chromatographic data. *BMC Bioinformatics* 11, 405. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-405>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. Guide Methods Appl.* 18.1, 315–322.
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Herfurth, A.-M., Stauber, E.J., 2016. Glucosinolate breakdown. *Adv. Bot. Res.* 80, 125–169. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.006>
- Wright, E.S., 2020. RNAconTest: comparing tools for noncoding RNA multiple sequence alignment based on structural consistency. *RNA* 26, 531–540. <https://doi.org/10.1261/rna.073015.119>

- Wu, J., Lv, S., Zhao, L., Gao, T., Yu, C., Hu, J., Ma, F., 2023. Advances in the study of the function and mechanism of the action of flavonoids in plants under environmental stresses. *Planta* 257, 108. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04136-w>
- Yang, T., Wang, C., Li, C., Sun, R., Yang, M., 2023. Antagonistic effects of volatile organic compounds of *Saccharomyces cerevisiae* NJ-1 on the growth and toxicity of *Aspergillus flavus*. *Biol. Control* 177, 105093. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105093>
- You, C., Qin, D., Wang, Y., Lan, W., Li, Y., Yu, B., Peng, Y., Xu, J., Dong, J., 2021. Plant Triterpenoids Regulate Endophyte Community to Promote Medicinal Plant *Schisandra sphenanthera* Growth and Metabolites Accumulation. *J. Fungi* 7, 788. <https://doi.org/10.3390/jof7100788>
- Zeng, R.S., Mallik, A.U., Setliff, E., 2003. Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by root exudates of Brassicaceae plants: Role of degraded compounds of indole glucosinolates. *J. Chem. Ecol.* 29, 1337–1355. <https://doi.org/10.1023/A:1024257218558>
- Zhang, Z., Li, G., 2010. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* 95, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.017>
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Guldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., Kogel, K.-H., 2011. Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. *PLOS Pathog.* 7, e1002290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002290>

9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/351/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Plaszkó Tamás
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076234

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Plaszkó, T.**, Szűcs, Z., Cziáky, Z., Ács-Szabó, L., Csoma, H., Géczi, L., Vasas, G., Gonda, S.: Correlations between the metabolome and the endophytic fungal metagenome suggests importance of various metabolite classes in community assembly in horseradish (*Armoracia rusticana* L., Brassicaceae) roots.
Front. Plant Sci. 13, 1-34, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.921008>
IF: 5.6
2. **Plaszkó, T.**, Szűcs, Z., Kállai, Z., Csoma, H., Vasas, G., Gonda, S.: Volatile Organic Compounds (VOCs) of Endophytic Fungi Growing on Extracts of the Host, Horseradish (*Armoracia rusticana*).
Metabolites. 10 (11), 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10110451>
IF: 4.932

További közlemények

3. Gonda, S., Szűcs, Z., **Plaszkó, T.**, Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Sinka, D. Z., Bácskay, I., Vasas, G.: Quality-controlled LC-ESI-MS food metabolomics of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) sprouts: Insights into changes in primary and specialized metabolites.
Food Res. Int. 164, 112347, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112347>
IF: 8.1 (2022)
4. **Plaszkó, T.**, Szűcs, Z., Vasas, G., Gonda, S.: Interactions of fungi with non-isothiocyanate products of the plant glucosinolate pathway: A review on product formation, antifungal activity, mode of action and biotransformation.
Phytochemistry. 200, 1-33, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113245>
IF: 3.8





5. **Plaszkó, T.**, Szűcs, Z., Vasas, G., Gonda, S.: Effects of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates on Fungi: A Comprehensive Review on Direct Effects, Mechanisms, Structure-Activity Relationship Data and Possible Agricultural Applications.
J. Fungi. 7 (7), 1-38, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof7070539>
IF: 5.724
6. Gonda, S., Szűcs, Z., **Plaszkó, T.**, Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Mikóné Hamvas, M.: A Simple Method for On-Gel Detection of Myrosinase Activity.
Molecules. 23 (9), 1-11, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23092204>
IF: 3.06
7. Szűcs, Z., **Plaszkó, T.**, Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Emri, T., Bertóti, R., Sinka, L. T., Vasas, G., Gonda, S.: Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate - myrosinase - isothiocyanate system.
BMC Plant Biol. 18 (1), 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-018-1295-4>
IF: 3.67
8. Papp, N., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Plaszkó, T.**, Lőrincz, P., Vasas, G.: Ethnobotanical and ethnopharmacological data of *Armoracia rusticana* P. Gaertner, B. Meyer et Scherb. in Hungary and Romania: a case study.
Genet. Resour. Crop Evol. 65 (7), 1893-1905, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-018-0663-0>
IF: 1.296

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,182

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,532

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.19.



10. Társszerzői hozzájárulások, nem saját eredmények

- Az értekezésben vizsgált gombatörzseket már korábban izolálták a Debrecen Egyetem Növényteni Tanszékének munkatársai (Szűcs et al., 2018).
- A gombatörzsek azonosításában, a metagenomikai diverzitás metrikák elkészítésében Dr. Csoma Hajnalka és Dr. Ács-Szabó Lajos segítettek.
- A műszeres mérések Dr. Cziáky Zoltán, Kállai Zoltán és Dr. Póliska Szilárd együttműködésével zajlottak.

11. Tárgyszavak

Armoracia rusticana, torma, endofitonok, mikrobiom, metagenomika, amplikon szekvenálás, metabolomika, növény-gomba interakciók, illékony szerves vegyületek, VOC

12. Keywords

Armoracia rusticana, horseradish, endophytes, microbiome, metagenomics, amplicon sequencing, metabolomics, plant-fungi interaction, volatile organic compounds, VOC

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Gonda Sándor témavezetőmnek a kutatómunkám koordinálásában és jelen értekezésem megírásában nyújtott önzetlen segítségéért, szakmai fejlődésem elősegítéséért, és a már 8 éve tartó közös szakmai munkánkért.

Köszönettel tartozom továbbá társszerzőimnek, Dr. Vasas Gábornak, Dr. Szűcs Zsoltnak, Dr. Cziáky Zoltánnak, Dr. Ács-Szabó Lajosnak, Dr. Csoma Hajnalkának, Kállai Zoltánnak és Dr. Géczi Lászlónak az értekezésem alapjául szolgáló közlemények elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Dr. Póliska Szilárdot és a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársait a szekvenálási munkálatok elvégzéséért.

Szeretném megköszönni a Növényteni Tanszék minden egyes dolgozójának, illetve kutatócsoportunk jelenlegi és volt szakdolgozóinak, hogy segítségükkel, munkájukkal és szakmai kommentjeikkel támogatták értekezésem elkészülését.

Köszönöm Dr. Csoma Eszternek és Dr. Tósaki Árpádnak a doktori iskolánk adminisztrálásában nyújtott fáradhatatlan munkájukat.

Külön köszönet illeti a családomat a doktori képzés alatt nyújtott mindennemű, önzetlen segítségükért.

Végezetül hálás köszönetet szeretnék mondani barátnőmnek mindenért, de legfőképpen a doktori kutatómunkám során nyújtott mentálhigiénés segítségéért.

14. Melléklet

A jelen értekezés alapjául szolgáló kiegészítő adatok (ábrák, táblázatok) terjedelmük miatt az eredeti publikációkban is közölt, online formátumban kerülnek bemutatásra.

Melléklet 1. ábra. Endofiton és talajgomba közösségek α -diverzitás metrikái, ACE index, Shannon index, Simpson dominancia index, Buzas és Gibson index.

https://www.frontiersin.org/articles/file/downloadfile/921008_supplementary-materials_images_1_pdf/octet-stream/Image%201.PDF/1/921008

Melléklet 2. ábra. Endofiton és talajgomba közösségek β -diverzitás metrikái (Bray-Curtis, Whittaker és súlyozatlan UniFrac) PCoA és ANOSIM grafikonokon ábrázolva.

https://www.frontiersin.org/articles/file/downloadfile/921008_supplementary-materials_images_2_pdf/octet-stream/Image%202.PDF/1/921008

Melléklet 3. ábra. Gomba taxonok relatív átlagos aránya az 1. területről származó tormaminták endofiton gombaközösségein belül. Az előzetesen szűrt gomba taxonok felső 10%-a össze lettek vonva legalább rend szinten (amennyiben nem volt feloldható akkor a legalacsonyabb feloldható taxonómiai szinten).

https://www.frontiersin.org/articles/file/downloadfile/921008_supplementary-materials_images_4_pdf/octet-stream/Image%204.PDF/1/921008

Melléklet 1. táblázat. Tormagyökerekből, nem-célzott metabolomikával detektált vegyületjelöltek listája.

https://www.frontiersin.org/articles/file/downloadfile/921008_supplementary-materials_tables_7_pdf/octet-stream/Table%207.PDF/1/921008

Melléklet 2. táblázat: Statisztikailag szignifikáns jelenségek listája, Benjamini-Hochberg korrigált p értékekkel.

https://www.frontiersin.org/articles/file/downloadfile/921008_supplementary-materials_tables_8_pdf/octet-stream/Table%208.PDF/1/921008

15. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmükben.