

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Plaszko Tamás

Témavezető: Dr. Gonda Sándor



DEBRECENI EGYETEM  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Plaszkó Tamás okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája  
(Farmakológiai programja) keretében

Témavezető: Dr. Gonda Sándor, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Béni Szabolcs, PhD  
Dr. Leiter Éva Julianna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora  
tagok: Dr. Béni Szabolcs, PhD  
Dr. Leiter Éva Julianna, PhD  
Gálné Dr. Miklós Ida, PhD  
Dr. Jekő József, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, Élettudományi labor épület (ÉTK), földszint F202-es terme  
2024. február 13., 13:00 óra

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Bevezetés.....</b>                                     | <b>3</b>  |
| <b>2. Célkitűzések.....</b>                                  | <b>5</b>  |
| <b>3. Anyagok és módszerek.....</b>                          | <b>6</b>  |
| <b>4. Eredmények.....</b>                                    | <b>13</b> |
| <b>5. Megbeszélés.....</b>                                   | <b>25</b> |
| <b>6. Összefoglalás.....</b>                                 | <b>33</b> |
| <b>7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....</b> | <b>35</b> |
| <b>8. Köszönetnyilvánítás.....</b>                           | <b>37</b> |

## 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 torma fajtákból 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. 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 tormában 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.

### 3. Anyagok és módszerek

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

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 jelen dolgozatban szereplő gombatörzseket már korábban izolálták a Növényteni Tanszék munkatársai (Szűcs et al., 2018). A talajgombákat a torma termesztésére használt terület növénymentes pontjairól izolálták. Az E1-E7 izolátumok fajsztíű azonosítása már korábban megtörtént (Szűcs et al., 2018). A többi törzs esetében a taxonómiai azonosítást az ITS (Internal Transcribed Spacer),  $\alpha$ -actin vagy calmodulin génjeik amplifikálásával és Sanger szekvenálásával végeztük el. A szekvenciákot NCBI BLAST keresést hajtottunk végre, majd a találatok alapján legfeljebb nemzetség szinten azonosítottuk a gombákat.

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 filmréteggént 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 homogenizátor segítségével homogenizáltuk steril BagPage zacskókban. 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 fajoként különbözhet, ezért száraztömeg alapon standardizáltuk az inokulációs mennyiséget, amit liofilezással határoztunk meg.

A headspace üvegek inokulációja során 500 µL térfogatú, 500 µg száraztömeggel ekvivalens gombaszuszpenziót pipettáztunk az üvegekbe. Végezetül az üvegeket lezártuk, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk legalább 3 napig. Az egyes tenyészetek légtéréből az inokulációt követő 3. és 4. napon vettünk mintát. A kísérletet két biológiai ismételéssel, tehát gombánként összesen 4 replikával végeztük. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk afelől, hogy a kéntartalmú vegyületek a torma kivonatok specializált anyagaiból keletkeznek, kontroll tenyészeteket is inokuláltunk MEB táptalajra. Ezeket egy biológiai ismételésben készítettük el, és a beoltást követő 3. és 4. napon injektáltunk.

A gombák gőzterének VOC profilját Bruker Scion 456-os gázkromatográfárral vizsgáltuk, mely egy Bruker SHS-40 Headspace mintavevőből és egy hozzákapcsolt Bruker SQ tömegspektrométerből állt. A vizsgálatok során egy Br-5 kapilláris kolonnát használtunk. 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 is vizsgáltuk.

Az ionkromatogramokon (EIC, XIC) az összes kromatográfias csúcsot manuálisan átválogattuk, ezután minden csúcshoz manuálisan összegyűjtöttük a legintenzívebb spektrumból (legintenzívebb csúcsot tartalmazó minta) a legnagyobb mennyiségben előforduló jellegzetes ionokat (max. 5-öt). A jellemző ionok listáját felhasználva célzott csúcsdetektáló algoritmust használtunk az mzMine 2.39 szoftverben, majd az azonos metabolitokhoz tartozó ion abundancia értékeket összeadtuk R-ben. 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 teszteket 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.

### **3.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben**

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 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, majd steril vizes mosás után sterilen feldaraboltuk a mintákat. Az így kapott mintát steril, műanyag mintatartó edényekbe helyeztük és folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk. A mintákat további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

A fagyott, darabolt növényi részeket egy 20 mm-es acélgolyóval együtt 50 mL térfogatú, rozsdamentes acélból készült, steril örlőkorsókban kriogén őröltük. Az így homogenizált mintákat liofileztük, és a genomi DNS és metabolomikai extrakciókig sötét exsikkátorban tároltuk szilikagélben.

A kriogén őrölt 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 kivonatokat 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 kivonatokat 0,22 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel szűrtük kromatográfiás mintatartó üvegekbe a műszeres analízist megelőzően.

Az LC-MS mérések során egy Dionex Ultimate 3000RS UHPLC rendszert használtunk Thermo Q Exactive Orbitrap tömegspektrométerrel. Az alkalmazott ionizáció elektropray ionizáció (ESI) volt. Nem-célzott metabolomikai mérésekhez Kinetex Polar C<sub>18</sub> kolonnát használtunk. A 10× hígítású mintákból 1-1 µL térfogatot injektáltunk. A glükozinolátok mennyiségi meghatározásához négy, a tormaiban nagyobb mennyiségben jelenlévő glükozinolátból (szinigrin, glükonaszturtiin, glükobrasszicin, glükoiiberin) képeztünk egy négypontos kalibrációs egyenest, 0,01-5 µg mL<sup>-1</sup> koncentráció tartományban. A kvantifikációs mérések során Kinetex XB-C<sub>18</sub> kolonnát használtunk. A tormaminták 200× hígításából és kalibrációs egyenes mintákból 1-1 µL-t injektáltunk.

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.

A mérési nyersfájlokat mzXML formátumba konvertáltuk, majd az XCMSOnline 2.7.2 (XCMS 1.47.3) platform segítségével elemeztük. 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 szoftverben végeztünk célzott csúcsdetektálást.

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 kémiaiailag stabil állapotban tartható a vizsgálataink teljes időtartama alatt. Ennek értelmében a 2018-as Fényestelepi fajtákból (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.

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%, 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 átment 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. Csak az  $R^2 > 0,8$

értékű vegyületjelölteket tartottuk meg a további analízisekhez, így a vak mintákban jelentős mennyiségben jelenlévő jelölteket is elvetettük.

Az adatokra végezve egy LOESS (locally estimated smoothing) függvényt illesztettünk, minden vegyületjelöltre külön-külön, a QC minták alapján. 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 lement szekvenciákat összevonhassunk és egyben elemezhessünk, sztenderdek alkalmazása nélkül. Az extrahált növényi anyagok száraztömegével ezután korrigáltunk.

Az MS<sup>2</sup> spektrumokat a nyers mérési fájllokból a CluMSID csomag segítségével gyűjtöttük be. Minden egyes vegyületjelölt esetében a 10 legstízbő MS<sup>2</sup> spektrumot használtuk fel egy konszenzus spektrum létrehozásához, melyet exportáltunk R-ből, majd annotálás céljából importáltunk a SIRIUS 4.9.9 programba. Ezt követően a SIRIUS CSI:FingerID és CANOPUS algoritmusait használtuk a szerves vegyületek feltehető szerkezetének, illetve a Classyfire hierarchikus osztályainak 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.

A tormaiban található gombák effektív azonosításához meg kellett győződnünk arról, hogy a szakirodalomban gyakran alkalmazott 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 és ITS4, ITS1-F\_KYO2 és ITS2\_KYO2, valamint ITS3\_KYO2 és ITS4 primerpárokkal. 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 reverz primerhez. A DECIPHER R csomag segítségével illesztést végeztünk korábban leírt torma eredetű gombák 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 PCR-el 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 felhasználva, majd egy előzetes Illumina szekvenálás segítségével.

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 könyvtárakból ekvimoláris keveréket szekvenáltunk Illumina MiSeq platformon MiSeq Reagent Kit V3 felhasználásával (2×300 bázispár hosszú paired-end leolvasás, 600 ciklus). A primerek teljesítményének vizsgálatokor a pilóta szekvenálás MiSeq Reagent Kit Nano V2 felhasználásával történt (150 bp hosszú paired-end leolvasás, 150 ciklus). A könyvtárépítési és szekvenálási munkákat a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai végezték.

Szekvenálás után az adatokat demultiplexáltuk, majd FASTQ fájlokat generáltunk. Minden további szekvenciaelemzést R-ben végeztünk a DADA2 csomag segítségével. 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, illetve könnyebb megkülönböztetni a kontroll mintákban azonosított egyedi szennyező szekvenciákat. A taxonómiai hozzárendelést egy "Naive Bayesian" klasszifikációs algoritmussal végeztük el, a DADA2 "assignTaxonomy" függvényével. A klasszifikációs algoritmus a UNITE 8.3 Fungi ITS adatbázis 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.

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.

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-kból 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, ezért clr-transzformációt végeztünk az adatokon.

Az egyes mintacsoportok és fajták közötti szignifikáns különbségeket a főkomponens regresszió módszerével határoztuk meg. Ehhez a normalizált kémiai és gomba 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. Valamennyi statisztikai tesztből származó  $p$ -értéket Benjamini-Hochberg korrekciónak vetettünk alá ( $n = 18004$ ), “False discovery rate” (FDR) korrekció végett.

## 4. Eredmények

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

#### 4.1.1. 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 tormából izolált endofiton, illetve talajgombatorzset vizsgáltunk, amelyeket legalább nemzetség szinten tudtunk azonosítani.

#### 4.1.2. 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 glükozinolátokból származnak. Számos vegyület spektrumát és retenciós idejét standard vegyületekével is össze tudtuk hasonlítani, a többi vegyületet NIST spektrumkönyvtári keresés alapján hozzávetőlegesen azonosítottuk.

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 ( $\beta$ -fellandré). 18 csúcsot nem sikerült azonosítanunk, elsősorban az alacsony jel-zaj arány miatt, ami alacsony "Similarity Score" pontszámot eredményezett.

Korábbi vizsgálataink során (Szűcs et al., 2018) már megpróbáltuk detektálni, sikertelenül, az allil-cianid jelenlétét gombák gőzteréből egy aktívszenes-deszorpciós módszerrel. A jelen dolgozatban is leírt inokulációs módszerünk azonban kiválóan alkalmas

volt az említett vegyület detektálására. Továbbá fontos megemlíteni, hogy a maláta-kivonatot tartalmazó táptalajon növe gombák gőzteréből nem detektáltunk kén tartalmú bomlástermékeket, ezzel is igazolva, hogy glükozinolát eredetűek.

#### 4.1.3. Gombák VOC mintázatai

Mint láthattuk, számos gomba gőzteréből azonosítottunk alkoholokat, észtereket és glükozinolát bomlástermékeket, de fontos megemlítenünk, hogy ezek a vegyületek kontroll, inokulálatlan torma kivonat 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, mely egy gyakran előforduló VOC gombákban, pl. az endofiton *Muscodora albus*-ban (Strobel, 2011).

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

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, de számos esetben detektálható volt relatíve nagy szórással.

A kontroll minták (inokulálatlan torma kivonat) gőzterében számos vegyület nem volt jelen, köztük a benzaldehid,  $\beta$ -felandrén, 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 kén tartalmú 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. 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.

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.

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. 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. Alkohokok (például metil-1-butanol) termelését illetően szintén ezek a törzsek voltak említésre méltóak.

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  $\beta$ -felandrén amit E15 - *Phomopsis* sp. termelt említésre méltó mennyiségben.

## **4.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben**

### **4.2.1. 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* endoszférajában még nagyobb arányban lehetnek olyan gombák amelyek hasonló kémiai kölcsönhatásokban vannak a növénnel. 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 (Plaszko 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. 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, glükoiiberin 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 évhatas ( $p_{\text{nem korr.}} = 0,2465$ ). További glükozinolátokat nem-célzott metabolomikával is tudtunk vizsgálni, relatív abundancia alapon.

#### 4.2.2. 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 mutatattak, így összesen 355 vegyületjelöltet tudtunk vizsgálni a továbbiakban.

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). 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).

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  $m/z$  - retenciós 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.

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 vegyületjelölből a legkisebb és a legnagyobb mennyiséget tartalmazó fajta értékei közötti különbség kiszámításával, majd a különbségeket osztva a szórással megkaptuk a hatásnagyság értékeket (Cohen-féle  $d$ ) vegyületjelöltként. 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 gyökerek 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.

#### 4.2.3. 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, 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 gombáéban 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.

#### 4.2.4. Mikrobiom diverzitás vizsgálata

Már az amplitikon szekvenálásból származó nyers adatok feldolgozásánál is megfigyelhető volt, hogy a talajminták gombaközösségére vonatkozó adatok (pl.: egyedi leolvasások) jelentősen eltértek a növényi mintákhoz képest. Továbbá 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 külcsoport 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. Az Simpson dominancia index alapján elmondható, hogy a tormamintákban néhány gombataxon jelentősen nagyobb arányban fordult elő. Bár a teljes dominancia viszonylag alacsony volt a répa és talajmintákban, a tormákhoz 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 típushoz képest. 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.

#### 4.2.5. Tormafajták endofiton gombaközösségének összetétele

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. 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 taxonómiaiag kevésbé feloldható ASV-k elsősorban a Ceratobasidiaceae, Nectriaceae, Pezizaceae, Sordariomycetes, Ascomycota csoportokba tartoztak. Közel megegyező taxonómiai összetételt mutattak az ugyanerről a területről származó sárgarépa külcsoporthoz tartozó 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. Ez a jelenség elsősorban tormamintákban volt megfigyelhető, répákban nem, ami ugyan származhat a mintavételi mélység különbségéből (64 + 12 torna, 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 varianciát 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 fajtán belüli variabilitás volt megfigyelhető. 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. A variabilitást mutató taxonok szignifikáns része korrelációkat mutatott a vegyületjelöltekkel (pl.: Xylariales, Sordariales, Pleosporales, Eurotiales, Capnodiales, stb.).

#### 4.2.6. 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. 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 ismertett transzformálások miatt a gomba adathalmaz már nem volt kompozíciós (Gloor et al., 2017). A metabolomikai adatok vagy valódi koncentrációként (glükózinolát-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.

Rend szinten vizsgálva az adatokat megfigyelhető, hogy a leginkább érintett gombatorzsek a Xylariales, Capnodiales, Sordariales és Saccharomycetales rendekbe tartoztak. 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. 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.

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 tormaiban, más káposztafélékhez képest is. Ha összevetjük a vegyületosztályok és a gomba rendek közötti szignifikáns korrelációk hatásnagyság értékeit, nem lehet egyértelműen kiválasztani legnagyobb hatást mutató vegyületosztályt, bár kisebb különbségek azért látszanak.

A nemzetség szintű adatokat vizsgálva 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.

Hőtérképen ábrázolva megfigyelhettük, hogy számos primer és specializált vegyületosztály részt vett ezekben az interakciókban, beleértve a lipideket, indol származékokat, glikozidokat és peptideket. Az egy vagy több gombataxonnal nagymértékű korrelációkat mutató vegyületek több klaszterben is szóródhatnak a hőtérképen, ami azt jelenti, hogy az eredmények nem magyarázhatóak szimplán a vegyületek multi-korrelációjával.

Az értekezésben 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.

## 5. Megbeszélés

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

#### 5.1.1. 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).

#### 5.1.2. 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 azáltal, 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).

### 5.1.3. Gombák által történő glükozinolát lebontás

Régóta ismert tény, hogy gombák is képesek a glükozinolátok lebontására, először *Aspergillus sydowi*-ból írtak le tioglukozidáz aktivitást közel 80 éve (Reese et al., 1958). Azóta a glükozinolát-bontó gombák listája jelentősen kibővült, mint azt áttekintettük (Plaszkó 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 növvő 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 illékonyságuk 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. Fontos megjegyeznünk azonban, hogy az allil-cianid képződése nem csak enzimatis reakció terméke lehet, pH vagy ionos változások hozzájárulhatnak a spontán bomlással történő létrejöttéhez. Az allil-izotiocianát szintén tagadhatatlanul szinigrin eredetű vegyület, amit 3 gombatorzs 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; Plaszkó et al., 2021). Ez is hozzájárulhat ahhoz, hogy kevés gombatorzs 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 gombatorzs esetén detektáltunk szén-diszulfidot is, 4 esetben szignifikáns mennyiségben a kontrollhoz képest, mely származhat az allil-izotiocianát nem-enzimatis 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 ( $R^2 = 0,608$ ).

#### 5.1.4. 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 vizsgálat endofiton és talajgombák csoportjai nem elkülöníthetőek 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.

## 5.2. Metabolom - mikrobiom korrelációk vizsgálata terepi tormanövényekben

### 5.2.1. Nem-célzott metabolomikával azonosított vegyületek

A glükozinolátok mellett kempferol glikozidokat és foszfolipideket is kimutattak már torma gyökerekből (Herz et al., 2017), mely alátámasztja 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 torma gyökerekből, de tudni róla, hogy a Brassicaceae növénycsalád 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 növénycsalád 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.

### 5.2.2. 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 amelyeket 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.

### 5.2.3. 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), *Podospora* (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, ezt már több növény család 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.

#### 5.2.4. 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 összefüggéseként 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 játszanak 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 akumulálódhatnak, 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 odacsalogatásában (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, 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 megállításának, 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, 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, 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



növénnyel 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 izotiocianát 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 izotiocianát 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. 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.

## 6. 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 gombataxonon 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, glükozinolát 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 glükozinolátjai 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.

## 7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



**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., Gécz, 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.19.



## 8. 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.