

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Szűcs Zsolt

**Metabolomikai esettanulmányok torma (*Armoratia rusticana*)
és nagylevelű hárs (*Tilia platyphyllos* Scop.) növényeken**

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Metabolomikai esettanulmányok torma (*Armoratia rusticana*)
és nagylevelű hárs (*Tilia platyphyllos* Scop.) növényeken**

Szűcs Zsolt

Témavezető: Dr. Vasas Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

Metabolomikai esettanulmányok torma (*Armoratia rusticana*) és nagylevelű hárs (*Tilia platyphyllos Scop.*) növényeken

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

Írta: Szűcs Zsolt okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád az MTA doktora
tagok: Dr. Alberti-Dér Ágnes, PhD
Dr. Bak István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: online webes felületen keresztül (ZOOM)
2021 . január 19.

Az értekezés bírálói:

Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Hunyadi Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád az MTA doktora
tagok: Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Hunyadi Attila, PhD
Dr. Alberti-Dér Ágnes, PhD
Dr. Bak István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: online webes felületen keresztül (ZOOM)
2021. január 19

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	6
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Metabolomika.....	10
2.2. <i>Armoratia rusticana</i> glükoszínolát-mirozínáz-izotiocianát rendszerének jellemzése.....	11
2.2.1. <i>A. rusticana</i> bioaktív vegyületei.....	15
2.2.1.1. Glükoszínolátok.....	16
2.2.1.2. Mirozínáz enzim és aktivitása.....	16
2.2.1.3. Izotiocianátok.....	17
2.2.2. Az <i>A. rusticana</i> hatóanyagainak farmakológiája.....	17
2.2.2.1. Az <i>A. rusticana</i> hatóanyagainak felszívódása és metabolizációja.....	17
2.2.2.2. Az <i>A. rusticana</i> hatóanyagainak élettani hatásai.....	18
2.3. <i>Tilia platyphyllos</i> Scop.....	19
2.3.1. Flavonoidok farmakológiája.....	20
3. Anyagok és Módszerek.....	23
3.1. Vegyszerek.....	23
3.2 A mérések során alkalmazott műszerek és a mérések paraméterei.....	24
3.2.1. LC-ESI-MS.....	24
3.2.2. SPME-GM-MS.....	25
3.3. Gombatörzsek izolálása és azonosítása.....	26
3.4. Általánosan használt táptalajok.....	28
3.5. Torma táptalaj (HorseRadish extraction - HRE) készítés.....	28
3.6. Gomba oltóanyagok készítése.....	29
3.7. Tormatáptalajon való gombainkubáció.....	29
3.8. Szinigrinen, mint önálló szénforráson való növekedés.....	30
3.9. Allil- és 2-fenil-etil-izotiocianát növekedés-gátló hatásának meghatározása a gombákra.....	31
3.10. A <i>Tilia platyphyllos</i> növényi anyagának gyűjtése, mintaelőkészítés.....	32
3.11. A <i>Tilia platyphyllos</i> fenológiai stádiumainak skálázása.....	34
3.12. A kromatogramok kiértékelése és a vegyületek azonosítása.....	35
3.13. Adatbányászat.....	36
4. Eredmények és megbeszélésük.....	38

4.1. <i>Armortia rusticana</i>	38
4.1.1. Endofitonok és talajgombák azonosítása.....	39
4.1.2. Torma endofitonok és talaj gombák glükoszínolát-bontó aktivitása.....	40
4.1.3. A bomlástermékek kimutatása.....	49
4.1.4. További, endofiton gombákon végzett kísérletek.....	54
4.1.4.1. Szinigrin, mint az endofiton és talaj gombák kizárólagos szénforrása.....	54
4.1.4.2. Izotiocianátok általi növekedésgátlás.....	54
4.2. <i>Tilia platyphyllos</i>	55
4.2.1. Szezonális variabilitás a <i>T. platyphyllos</i> murvaleveleiben.....	58
4.2.2. A metabolitok diverzitása és klaszterezése.....	60
4.2.2.1. A fejlődés során koncentráció-változást nem, vagy kis mértékben mutató metabolitok.....	62
4.2.2.2. A fejlődés során koncentráció-növekedést mutató metabolitok.....	66
4.2.2.3. A fejlődés során koncentráció-csökkenést mutató metabolitok.....	66
4.2.2.4. A fejlődés során átmeneti koncentráció-növekedést mutató metabolitok.....	69
4.2.2.5. A fenoloidok kinetikájának összehasonlítása más fajok szerveivel.....	71
4.2.3. A lehetséges alkalmazások, következmények.....	71
5. Összefoglalás.....	74
5.1 Summary.....	81
6. Irodalomjegyzék.....	83
6.1 Az értekezés alapját képező közlemények.....	94
7. Tárgyszavak.....	96
8. Keywords.....	96
9. Köszönetnyilvánítás.....	97
10. Függelék – az értekezésben megjelenő, standarddal igazolt vegyületek kémiai képletgyűjteménye.....	98
10.1. Glükoszínolátok.....	98
10.2. Fenoloidok.....	99

Rövidítésjegyzék

GLC	-	glükozinolátok
ITC	-	izotiocianátok
AITC	-	allil-izotiocianát
PeITC	-	fenetil-izotiocianát
MYR	-	mirozináz enzim
LC-ESI-MS/MS	-	folyadékkromatográfia elektroionizációs tömegspektrométerrel kapcsolva
UHPLC	-	ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia
SPME	-	szilárd fázisú mikroextrakció
SGB/SGA	-	szaboroud glükóz tápoldat
PDB/PDA	-	burgonya dextróz tápoldat
CzD	-	czapek-Dox tápoldat
MEB/MEA	-	maláta kivonaton alapuló tápoldat
HRE	-	torma kivonaton alapuló tápoldat
DMSO	-	dimetil-szulfoxid
GSH	-	glutation

1. Bevezetés

A gyógynövények nem csak az elmúlt időkben foglaltak el fontos helyet a gyógyászatban, hanem napjainkban is. Szerepük a humán és az állatgyógyászatban egyaránt fontos. A bioaktív vegyületeket tartalmazó növények fogyasztása a világ minden táján jellemző, gyógyászati vagy kulináris céllal. Az elmúlt pár évtizedben felerősödött az igény a gyógynövények iránt, mivel ezekről általánosságban elmondható, hogy hatás - mellékhatás arányuk kedvezőbb. Emellett a terápián kívül igen jól alkalmazhatóak prevencióra is, ami felé az orvostudomány is orientálódik napjainkban (González Rodríguez and Cardentey García, 2016; Lian et al., 2016; Lyu et al., 2017; Zhou et al., 2019, 2017).

A számos új gyógyszerként és táplálékként elfogyasztott növény modern fitokémiai módszerekkel történő vizsgálata igen fontos. Ehhez tágabb értelemben hozzátartozik a különböző mikroorganizmusokkal való interakciójuk, illetve a metabolomra való külső és belső hatások vizsgálata is. A növényi mátrixok sokfélesége, és a bennük található aktív metabolitok sokszínűsége miatt ugyanakkor újfajta megközelítésre is szükség van. A fentebb leírt megközelítésekhez tökéletesen illeszkedik a műszeres bioanalitika mérési módszerek és az adatok feldolgozását lehetővé tévő nagy áteresztőképességű módszerek fejlődése.

Az ún. metabolomikai módszertan fontos megközelítéssé vált a fitokémiában, amely lehetővé teszi adatfeldolgozási technikákkal az adatgyűjtést az általános jelenségek és a korrelációk megtalálására anélkül, hogy az általunk vizsgálni kívánt bioaktív vegyületeket tisztítani kellene a mátrixokból. Ez a megközelítés természetesen nem teljesen helyettesíti a bioaktív vegyületek standardokkal végzett kalibrálás utáni kvantitatív meghatározását, a kinyert adatok mennyisége ugyanakkor nagyságrendekkel nagyobb, mint a klasszikus fitokémiai módszerek használata esetén. Egy jól megtervezett LC-ESI-MS/MS vagy NMR alapú metabolomikai kísérletből ugyanis nagyon sok adat

nyerhető arra nézve, hogy milyen metabolitok milyen nagyságrendben vannak jelen a vizsgált mátrixban.

A metabolomikai vizsgálat lehet célzott, amikor egy vegyületcsoport vagy vegyületcsalád jellemzőit, mennyiségi mintázatát monitorozzuk, vagy lehet nem célzott, amikor a mátrixban levő legtöbb metabolitot szeretnénk látni, illetve ezen metabolitok trendszerű viselkedését, ahogy azt (Garcia et al., 2016; Xiang et al., 2011) is tette.

A metabolomika, mint módszer a gyógynövények minőségbiztosításában is jelentős szerepet kapott az utóbbi években. Számos tanulmány taglalja, hogyan is lehet felhasználni ezt a módszertant a gyógynövények standardizálásában, minőség-ellenőrzésében (Ahmad et al., 2020; Mukherjee et al., 2016; Pandey et al., 2016; Rahman et al., 2019).

Jelen munka célja két különböző növény metabolomjának vizsgálata, eltérő megközelítés szerint. Ilyen szempont a metabolom és a növényekben jelen lévő mikrobiom interakciója, valamint a metabolom időbeli változásának követése. A vizsgálatok egyik részét célzott, míg a másik részét nem célzott metabolomikai technika alkalmazásával végeztük. Ezen megfigyelésekhez két különböző modellnövényt vettünk alapul.

Egy modellnövényünk, az *Armoracia rusticana* (torma) esetében a növény vegyületei és nem-patogén gombái közötti interakciót szeretnénk volna vizsgálni. Másik modellnövényünk, a *Tilia platyphyllos* (nagylevelű hárs) kapcsán egy gyógyászati nyersanyagként fontos növényi rész fejlődése folyamán követtük végig a metabolitok mintázatának változását.

A vizsgálatainkhoz megfelelően alkalmazható műszeres analitikai metodikákat kellett kifejleszteni, amivel ezeket a növényi mátrixokat vizsgálni tudtuk. Ahogy lentebb olvasható, a modellnövényeink egymástól igen eltérőek mind az alkalmazott növényi rész, mind metabolom szintjén, valamint a vizsgálni kívánt szemléleti szegmens is nagyban különbözik.

Munkánk során a célkitűzésünk a következő kérdések megválaszolása volt:

Armoratia rusticana:

- Az endofitonok és a talajgombák képesek-e a glükoszínolát (GLC) típusú vegyületek bontására?
- Ha képesek bontani a fentebb írt vegyületcsaládot, akkor ez a bontás milyen mértékű?
- A vegyületcsaládnak több különböző tagja van. A gombák képesek lehetnek mindet bontani, vagy kémiai szerkezet szerint diszkriminálnak?
- A GLC-k bomlásakor felszabaduló izotiocianátok (ITC-ek) fungicid hatását a gombák hogyan tolerálják?
- A GLC-k gombák általi bontását hogyan tudjuk monitorozni, a felszabadult, illékony ITC-eket milyen technikával tudjuk detektálhatóvá tenni?
- Kimutathatóak-e további interakciók a gombák és a vegyületcsalád között?
- A fentebb tárgyalt kísérletek alapján különböznek-e a torma eredetű endofitonok a talajgombáktól?

Tilia platyphyllos:

- A virágzat jelentős részét adó murvalevél metabolit mintázatát befolyásolja-e a betakarítási idő?
- Abban az esetben, ha metabolitok mennyiségét befolyásolja a gyűjtés időpontja, akkor ezen metabolitok mennyisége időben hogyan változik?
- Az időbeli lefutás vizsgálata során lehet-e klaszterekbe, csoportokba sorolni a vegyületeket?
- Van-e olyan vegyületcsoport, ami nem a virágzás alatt, a szokásos betakarítási időszakon belül van jelen a legnagyobb mennyiségben?
- A vegyületcsoportok között van-e olyan csoport, aminek a teljes gyűjtési időszak alatt nem változik érdemben a mennyisége?
- A vegyületek szintjének változásának milyen következményei lehetnek?

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Metabolomika

Az „omika” egy széles körben elterjedt tudományág, amely során különböző mátrixok pillanatfelvételét vizsgáljuk így az adott mátrix adott időpillanatban tapasztalható állapotáról nyerünk információt van. Ezen megállapítás alapján az omika vizsgálhat fehérjéket (proteomika) vagy génszekvenciákat is (genomika). A mi esetünkben is metabolomikáról beszélünk, mert a vizsgálni kívánt növényi részt az adott életszakasznak megfelelően dolgoztuk fel, hogy a lehető legjobb képet kapjuk annak metabolit-mintázatáról. Előnye a klasszikus vizsgálatokhoz képest, hogy nincs feltétlenül szükség vegyületek tisztítására, standardok használatára, hiszen az adott pillanatban minden, az összes jelen lévő vegyülettel egyszerre szeretnénk jellemezni a mátrixunkat. Így viszont nem igazán tudunk kvantitatív méréseket végezni, hiszen csak relatív mennyiségekkel tudunk számolni. A metabolomikai megközelítés számos tudományterületen bizonyult már hasznosnak a hólyagdaganatok diagnosztizálásán át (Alberice et al., 2013) a frissen vágott jégsaláta metabolomjának vizsgálatáig (Garcia et al., 2016).

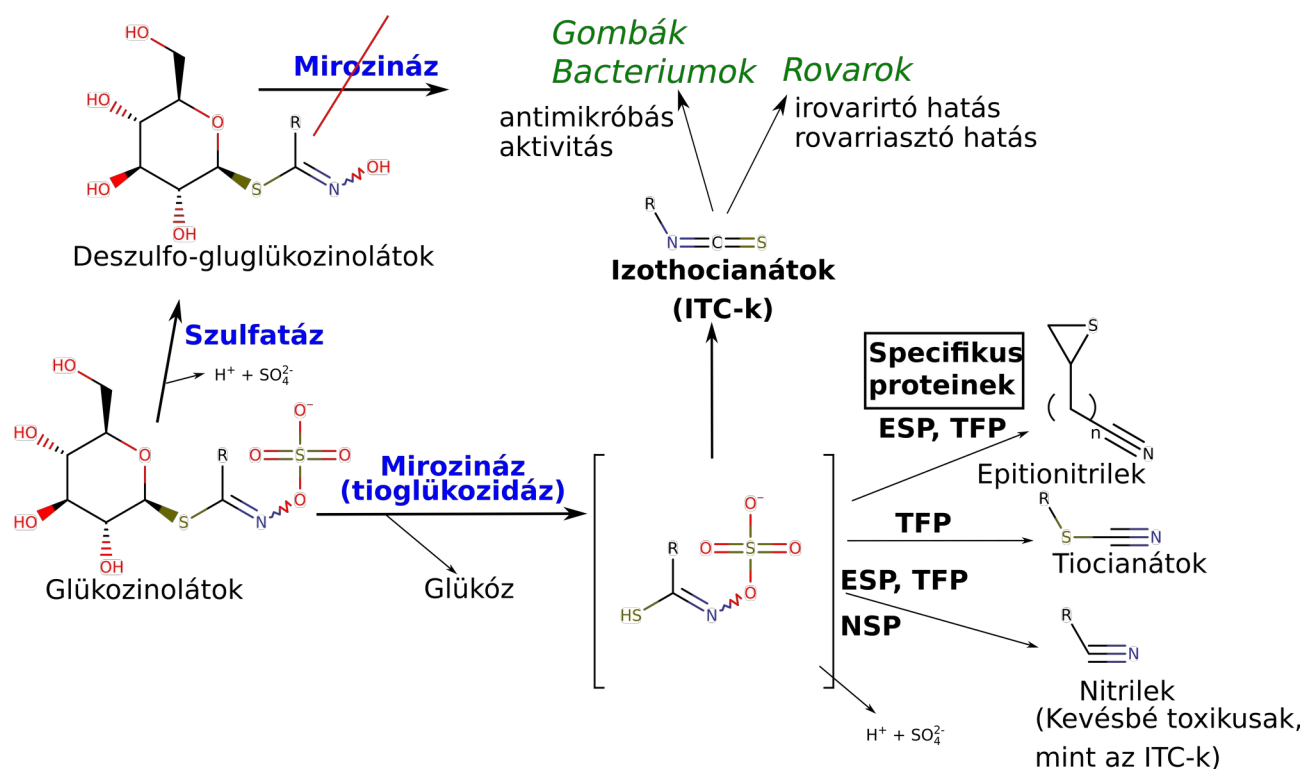
A modern LC-MS berendezések érzékenysége és felbontása lehetővé teszi, hogy metabolitok széles skáláját detektáljuk viszonylag széles tartományban. A metabolomikában, eltérően a proteomikától nincs szükség enzimatis emésztésre, ráadásul ezek elválasztása rövidebb kromatográfiás idővel is megoldható, így alkalmas akár nagy betegcsoportok mintáinak gyors lemérésére és kiértékelésére is (Patti, 2011).

2.2. *Armoratia rusticana* glükozinolát-mirozináz-izotiocianát rendszerének jellemzése

Felkapott téma napjainkban, hogy a növényi mikrobiom hatással van a növények állapotára csakúgy, ahogy az emberi mikrobiom magára az emberre (van der Heijden and Hartmann, 2016). Tehát kijelenthető, hogy a növényben lévő mikroorganizmusok természetesen hatással vannak a növényi metabolitokra. Ilyen mikroorganizmusok a növényekben élő endofitonok, amelyekre számos meghatározás létezik, de általában a növényekben élő nem patogén, tünetet nem okozó törzseket jelölik (Fesel & Zuccaro, 2016; Schulz & Boyle, 2005), és különféle taxonómiai csoportokba tartozhatnak, így lehetnek baktériumok, gombák. Mint ahogy azt már említettük, a növényben lévő mikroorganizmusok hatással lehetnek a növény metabolitjaira, amelyek akár az endofiton gombák és a növény interakciója során is létrejöhetnek, amelyek számos másodlagos metabolitot képesek átalakítani (Ludwig-Müller, 2015). Ezen tények miatt az endofiton gombák igen intenzíven kutatott terület, nagy mennyiségű irodalom áll rendelkezésre annak ellenére, hogy a csoportot nehéz definiálni (Fesel & Zuccaro, 2016; Schulz & Boyle, 2005). A kutatások egyik legerősebb hajtóereje az új bioaktív hatóanyagok felfedezése, amihez ezek a mikroorganizmusok kiválóak (Gunatilaka, 2006). Az endofitonok különböző speciális enzimeket termelhetnek, amik akár speciális körülmények között is működőképesek lehetnek. Például izoláltak olyan endofitont sós vízben élő növényből, aminek enzimmészlete még a magas sókoncentrációban is működött (Suryanarayanan et al., 2012). A gombák növényekkel kialakított jótékony kölcsönhatásai felhasználhatóak a növényvédelemben, például biokontrollra vagy sótolerancia növelésére (Govinda Rajulu et al., 2011; Vos et al., 2014).

Fontos, hogy ezeknek az endofitonoknak a nem-patogén működésük nem stabil (Fesel & Zuccaro, 2016; Schulz & Boyle, 2005), a valódi endofitonok is lehetnek látens patogének, ami súlyos károkat

képes okozni a növényekben (Photita et al., 2004; Slippers & Wingfield, 2007). Mindezek ellenére az endofitonok interakcióját a növényi védekezőrendszerrel (az *Armoracia rusticana* esetében a glükoszínolát-mirozináz-izotiocianát rendszert) eddig még nem vizsgálták kellő részletességgel.



1. ábra: A glükoszínolát - mirozináz - izotiocianát (GSL-MYR-ITC) rendszer és annak kölcsönhatása a gombákkal és az ökoszisztéma egyéb tagjaival. Az ismert enzimek forrásai különböző színnel vannak jelölve: Növények: fekete, gombák vagy baktériumok: piros, rovarok: kék. Rövidítések: ESP, epitionitril-specifikus protein, NSP, nitril-specifikus protein, TFP, tiocianátképző protein. Hivatkozások: (Lazzeri et al., 2013; Mejía-Garibay et al., 2015; Wittstock & Burow, 2007).

A glükoszínolát-mirozináz-izotiocianát (GSL-MYR-ITC) kémiai védelmi rendszere jelen van a Brassicaceae, a Capparaceae, a Resedaceae és a Moringaceae növényeiben. Ez az egyik legjobban vizsgált növényi védekező rendszer (Kissen et al., 2009). A mirozináz (EC 3.2.1.147, tioglükozid-glükohidroláz; MYR) a glükoszínolát és a víz közötti reakciót katalizálja, így glükózt és tiohidroximátot kapunk. A szabad tiohidroximát ezt követően spontán átrendeződik izotiocianátra

vagy melléktermékekre (1. ábra) (Nguyen et al., 2013; Wittstock & Burow, 2007). A legtöbb izotiocianát rendkívül csípős, és reaktív -NCS csoportjaik miatt különböző bioaktivitást mutatnak, ami erős antimikrobiális, rovarölő és egyéb hatásokat eredményez (Nguyen et al., 2013). Ez a kémiai védelmi rendszer első tagja a Brassicaceae növényeiben különböző glükozinolát formában van jelen. Érdekes, hogy az izotiocianátok kis mennyiségben, rendszeresen fogyasztva jótékony hatással vannak az emberi szervezetre, így a Brassicaceae növényeket funkcionális ételekként hasznosítjuk. Ezért kis mennyiségű izotiocianátok rendszeres fogyasztása megakadályozhat számos betegséget (Nguyen et al., 2013).

A glükozinolátok kémiaiilag stabilak és elkülönülnek aktiváló enzimüktől a mirozináztól, mivel külön kompartmentben foglalnak helyet. A növényi szövet sérülésekor kerülnek egymással érintkezésbe, ami a reakció lezajlását eredményezi. A fajoktól, szervektől, fejlődési stádiumtól és sok más tényezőtől függ a kompartmentalizációs stratégia, ami nagy változatosságot mutat (Kissen et al., 2009). A mirozináz és a glükozinolát általában, de nem minden esetben egymástól elszeparált sejtekben találhatóak. A GSL-ITC rendszert ezért „kémiai bomba” -nak is szokták nevezni, amelyet a kórokozók és a növényevő állatok támadása vált ki (Kissen et al., 2009). Az izotiocianátok bizonyítottan gombaellenes hatással rendelkeznek (Azaiez et al., 2013; Bertóti et al., 2016; Wu et al., 2011). Érdekes kérdés, hogy akkor az endofiton gombák hogyan képesek tolerálni ezt a gombaölő metabolitot? Valójában a mirozináz aktivitás előnyös lehet a gombák számára, mivel az enzimreakció során glükóz szabadul fel a tioglükozidból. Ráadásul az endofiton gombák akár képesek is lehetnek arra, hogy hatástalanítsák a gazdaszervezet „kémiai bombáját”. Természetesen meg kell küzdeniük a felszabadult ITC-k toxicitásával, vagy meg kell akadályozniuk a felszabadulását (amint azt egy *Aspergillus sp.* törzs (Galletti et al., 2008) mutatja). Kimutatták, hogy a MYR aktivitás számos mikroorganizmusban jelen van, köztük az *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Citrobacter*, *Enterobacter* és sok más fajban is (Albaser et al., 2016; Smits et al., 1993; Tani et al.,

1974). A glükozinolátok metabolizálására képes törzsek az emberi bél mikrobiológiai közösség részét is képezik (Krul et al., 2002; Luang-In et al., 2014; Saha et al., 2012).

Az endofitonok a gazdaszervezet másodlagos anyagcseréjére gyakorolt hatását illetően eddig nem sok tanulmány jelent meg. Egy tanulmány leírta, hogy az endofitonok specifikusan módosíthatják a növényi anyagcserét saját hasznukra. Különösen a flavonoid-glikozidok deglikozidációját figyelték meg a *Paraconiothyrium variable* esetében. A deglikozilált flavonoidok jelentősen kedvezőbb hatást gyakoroltak a spórából történő hypha növekedésére (Tian et al., 2014). Ezenkívül a növényi másodlagos metabolitok szelektív *in vitro* módosításainak eseteit is lejegyezték (Ludwig-Müller, 2015).

A növényi metabolitok endofiton gombákra gyakorolt hatását részletesebben vizsgálták. A tanulmányok arra utalnak, hogy a kémiai komponensek ténylegesen a mikrobiom fejlődését segítik elő a növényi gyökerek körül, az ilyen metabolitokat jól toleráló mikrobák szaporodnak fel a rizoszférában. Például a *Fusarium* és a *Rhizopus* fajok, amelyek a glükozinolát exudátumot lebonthatják, amelyek nagy mennyiségben voltak jelen a Brassicaceae növények gyökerei körül a talajban (Ishimoto et al., 2000). Egyes növényi patogének (például *Phoma lingam* és *Verticillium dahliae*) szintén glükozinolátokat bonthatnak (Wu & Meijer, 1999). Ez azt mutathatja, hogy a torna fő glükozinolátjának, a szinigrinnek a bontása detoxifikációs folyamat, mivel a szinigrin hidrolízisnek nincs hatása a vizsgált gombák növekedésére vagy spóracsírázására. Ezért valószínűsíthető, hogy a kórokozók ezt a képességet is használják a növény védelmének leküzdésére. Az *Alternaria brassicicola* kórokozó az oxidatív stresszválaszt kiváltó gének fokozott transzkripcióján keresztül alkalmazkodik az antifungális allil-izotiocianát (AITC) hatásához. Ezek közé tartoznak a glutation S-transzferázok, a tioredoxinok, a glutation-peroxidázok, a γ -glutamilcisztein-szintetázok (Sellam et al., 2007).

A fentiek mellett ugyanakkor nem csak a növényi metabolit van hatással a gombák növekedésére, szaporodására, illetve kiválasztódására, hanem ennek ellenkezője is igaz, tehát mikroorganizmusok,

mint az endofiton gombák is képesek hatni a növények metabolomjára. Mint logikusan látható, ezen folyamatok dinamikusan változnak egymásra hatnak, és nem lehet kimondani, hogy tisztán csak a mikrobiom gyakorol hatást a növényre, vagy a növény befolyásolja a mikrobiomot.

Repcében mutatták ki, hogy szalicilsavval, amit a gombák is képesek előállítani és használni, a növényben a glükoszínolát-termelés indukálható, ami függ az alkalmazott szalicilsav mennyiségétől is (Kiddle et al., 1994).

Szintén repcében tapasztalták azt, ha csírázó magokat patogén gombával kezelték (*Alternaria brassicae*), az megváltoztatta a növény ITC mintázatát. Természetesen ez elsősorban a növény reakciója a fertőző gomba elleni védekezésre (Doughty et al., 1996).

A növényvilág más területein is jellemző, hogy a mikrobiom hatással van a növényre. *Arabidopsis thaliana* esetében egy tanulmány bemutatja, hogy a talajban élő mikrobiom a levelek metabolom mintázatát megváltoztatják, ezáltal lesz maga a növény ellenállóbb a különféle élőlényekkel szemben, akik őt táplálékként fogyasztják. A tanulmány azt találta, hogy a talaj mikrobiom összetétele képes volt a levelek aminosav összetételét befolyásolni, ami kapcsolatban állt a növényt fogyasztó rovarok táplálkozási szokásaival (Badri et al., 2013).

A *Setaria viridis* esetében, ahol a növények növekedését elősegítő baktériumokat vizsgáltak, kimutatták, hogy ezen mikrobák növelték a növényben purin, zeatin és riboflavin útvonalakban résztvevő metabolitok mennyiségét (Agtuca et al., 2019).

2.2.1. *A. rusticana* bioaktív vegyületei

2.2.1.1. Glükozinolátok

A glükozinolát típusú vegyületek a Brassicaceae család tipikus vegyületei (Fahey et al., 2001). A torma mellett például a mustár (*Brassica nigra*, *Sinapis alba*), káposzta (*Brassica oleracea*), retek (*Raphanus sativus*) tartoznak ugyanebbe a családba. A glükozinolátok olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyek fontos szerepet játszanak a növény védelmi rendszerében. A vegyület több olyan részből áll, ami egy enzimfolyamat eredményeképpen hidrolizálni képes (1. ábra). A hidrolízis eredményeképpen keletkeznek az izotiocianátok (ITC), amik a védelmi rendszer aktív szereplői. Amellett hogy baktericid és fungicid hatásuk van, ezek adják a növények jellegzetes illatát és ízét is (Li & Kushad, 2005).

A glükozinolátok az ITC részen kívül egy kénen keresztül kapcsolódó β -D-glükopiranozt, egy β -tioglikozid-N-hidroxiszulfátot és egy oldalláncot tartalmaznak, amiknek nagy a variabilitása, tormaából eddig 15-féle glükozinolátot sikerült kimutatni. Vízben jól oldódnak, hőstabilitásuk is jónak mondható (Agneta et al., 2014; Oerlemans et al., 2006).

A torma fő glükozinolátja a szinigrin, de nagyobb mennyiségben megtalálható benne a glükobrasszicin és glükonaszturciin is (Li & Kushad, 2005).

2.2.1.2. Mirozináz enzim és aktivitása

A mirozináz enzim felelős a glükozinolátok hidrolíziséért. Ez az enzim egy β -tioglikozid-glükohidroláz, ami általában fizikailag van elkülönítve a szubsztrátjától, ami azt jelenti, hogy külön kompartmentben foglalnak helyet. Ha a növényt bármilyen sérülés éri, akkor az enzim és a szubsztrát egy térbe kerül, és lezajlik a hidrolízis. Az enzim két, egymáshoz nagyon hasonló 65 kDa tömegű egységből áll, amiket egy cink atom köt össze (Zhang, 2010).

Az enzim aktivitásának mértéke több paramétertől is függ. Ezek a hőmérséklet, ami 37-45 °C között optimális, a pH, ami 5.7-nél éri el a maximumát, de az aktivitás több, mint 80%, ha a pH 5-8 között van, továbbá ha 0.5 mM koncentrációban adunk hozzá aszkorbinsavat, akkor az aktiváló

hatással van az enzimre (Bones & Rossiter, 2006; Nguyen et al., 2013). Ha viszont a körülményeken változtatunk, a pH-t 3 és 6 közé állítjuk be, akkor Fe^{2+} és epitiospecifikus fehérje jelenlétében ITC-k helyett a fő termékek nitrilek és epitionitrilek lesznek (Zhang, 2010).

2.2.1.3. Izotiocianátok

A glükozinolátok enzim hatására a megfelelő körülmények között hidrolizálnak izotiocianátokká amelyek egy $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ (izotiocianát) csoportból és az ehhez kapcsolódó oldalláncból állnak. A torma sérülésekor, ami lehet vágás vagy reszelés, a benne lévő szinigrin allil-izotiocianáttá (AITC, közismertebb nevén mustárolaj), a glükonaszturciin pedig 2-fenetil izotiocianáttá (PeITC vagy „fenetil mustárolaj”) bomlik. Ezen felül számos más glükozinolátot írtak már le tormából, mint a glükoiiberin, glükonapin, glükokochlearin, glükoszativin, glükoiбарin, 4-hidroxiglükobrasszicin, 4-metoxiglükobrasszicin, glükobarbarin, glükobrasszikanapin, glükotropaeolin, glükobrasszicin (Agneta et al., 2014; Nguyen et al., 2013).

2.2.2. Az *A. rusticana* hatóanyagainak farmakológiája

2.2.2.1. Az *A. rusticana* hatóanyagainak felszívódása és metabolizációja

A 2,48 mg/ttk dózisban adott AITC-nek több, mint a 90%-a felszívódott az egér- és patkánykísérletek során (Ioannou et al., 1984). A felszívódás után gyorsan eloszlik, ahol intracelluláris tiolhoz (például glutation) csatlakozik az $-\text{NCS}$ csoporton keresztül. Ez a konjugáció a glutation S-transzferáz (GSH) enzim segítségével valósul meg. A farmakológiai hatás kialakulása nem csak az intracelluláris ITC koncentrációtól függ, hanem, attól is, hogy mennyi konjugált ITC kerül a sejtmembránba (Bruggeman et al., 1986; Nguyen et al., 2013; Zhang, 2001). Az ITC ürülése vizelettel történik különböző konjugált formákban (Conaway et al., 2001).

2.2.2.2. Az *A. rusticana* hatóanyagainak élettani hatásai

Az ITC vegyületek ígéretes daganatellenes vegyületek lehetnek, amik nem csak a prevencióban játszhatnak fontos szerepet, de a már kialakult daganatos sejteket is képesek sikerrel támadni, ami több daganattípus esetében volt már vizsgálva, továbbá a metasztázisok kialakulását is képesek az ITC-k gátolni egyes tanulmányok szerint (Dinkova-Kostova et al., 2002; Fimognari et al., 2002; Hwang & Hyong, 2006; Singh et al., 2004; Srivastava et al., 2003; Valgimigli & Iori, 2009; Yu et al., 1998; Zhang, 2004)

A citokróm P450 (CYP) enzimcsaládba tartozó enzimek hozzájárulhatnak a carcinogenesis-hez, amiket az ITC-k képesek gátolni vagy down-regulálni (Adam-Rodwell et al., 1993; Hecht, 2000; Nguyen et al., 2013; Zhang, 2004)

Helicobacter pylori, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Penicillium notatum*, *Bacillus cereus*, és *Vibrio parahaemolyticus* törzsek ellen már μM nagyságrendű koncentrációban is hatásosak az ITC-k. Ebben az esetben az aktívabb a PeITC (Luciano & Holley, 2009; Shin et al., 2004; Tunc et al., 2007). *In vitro* újabb eredmények alapján az ITC-k hatásosak a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-rezisztens *S. aureus* (VRSA), multidrug-rezisztens *Acinetobacter baumannii* (MRAB), és a multidrug-rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* (MRPA) ellen is (Kim et al., 2015). A baktericid hatás mellett fungicid hatása is van például *Aspergillus flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *Penicillium corylophilum*, és *Pichia anomala*. (Nielsen & Rios, 2000). Ezeken felül több dermatofita patogén gomba ellen is hatásosnak találták az ITC-ket (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, és *Epidermophyton floccosum*) (Choi et al., 2017).

A torna *in vitro* vizsgálatok alapján gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik, ami akár a krónikus megbetegedésekben is előnyös lehet. Ezt a hatást azáltal éri el, hogy csökkenti a NO szintjét, valamint csökkenti iNOS és a COX-2 expresszióját, továbbá hatással van az NF- κ B p65 aktivációra (Marzocco et al., 2015).

2.3. *Tilia platyphyllos* Scop.

A *Tiliae flos* a 9. Európai Gyógyszerkönyvben is hivatalos drog, ami az Európai tanács által is elfogadott természetes édesítőszer, és mint ilyen N2-es osztályba sorolást kapott, ami szerint a hársfavirágot kis mennyiségben élelmiszerekhez hozzá lehet adni (Barnes et al., 2007). Ezen felül a Kárpát-medencében borok és különböző szeszes italok ízesítésére is használják (Dénes et al., 2012). Az Ibériai félszigeten *Tilia platyphyllos* virágzatát rekreációs tea készítésére is felhasználják, míg Romániában és Lengyelországban a *Tilia spp.* virágzatai gyógyteák fontos összetevő, több más komponenssel együtt (Sõukand et al., 2013). A hársfa mindezekén túl kitűnő mézelő fafaj (Juan-Borrás et al., 2014).

A *Tilia platyphyllos* virágzata nagy mennyiségű flavonoidot tartalmaz (kvercetin-3,7-dirhamnozid, kvercitrin, rutin, izokvercitrin, asztragalin (Toker et al., 2001), valamint megtalálhatóak a katechinek ((+) katechin, (-) - epikatechin, katechin-dimerek) és trimerek), fahéjsav-származékok, kumarinok, poliszacharidok és illóolaj is (Karioti et al., 2014).

A növényi drogban a flavonoidok főleg glikozid formában vannak jelen (Karioti et al., 2014; Toker et al., 2001), amelyeket a humán gyomor-bél traktusban bélbaktériumok, (Kim et al., 1998; Macdonald et al., 1983), valamint a humán vékonybél β -glikozidáz enzime is képes a cukorrészt lehasítva aglikonná alakítani (Németh et al., 2003).

A flavonoidok általában aglikon formában szívódnak fel, mint azt a kvercetin esetében már leírták (Crespy et al., 2002); a humán plazmában viszont leginkább konjugált metabolitok formájában vannak jelen (Graefe et al., 2001). Az előbbi, aglikon formák felelősek jelentős mértékben a farmakológiai hatásokért mint a luteolin esetében ezt leírták (Ashaari et al., 2018; Aziz et al., 2018).

Tilia platyphyllos-ban kíséreltük meg a a metabolomikai változatosságot megfigyelni a különböző fenofázisokat végigkövetve. Ilyen típusú vizsgálatot a *Horminum pyrenaicum* L. esetében is elvégeztek a flavonoidok, fenolos savak szezonális változásának a növekedési szakaszokban való nyomon követésével (Raudone et al., 2018).

2.3.1. Flavonoidok farmakológiája

A növényi drog számos olyan vegyületet tartalmaz, amelyek rengeteg jól ismert farmakológiai aktivitással rendelkeznek. Ezen vegyületek a flavonoidok. A vegyületcsalád farmakológiája hatalmas, így jelen írásban csak néhány kiragadott, a drogra jellemző flavonoid példáján keresztül szeretném bemutatni a sokoldalúságukat. Kimutatták, hogy a virágok teljes kivonatának antibakteriális hatása van, elsősorban a kvercetin-származékok mutatnak aktivitást számos patogén baktérium ellen, pl. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* és *Vibrio cholerae* (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010). A kvercetin és a rutin hatásos lehet amfotericin B-vel kombinálva a *Cryptococcus spp.* ellen, ahol a flavonoidok javítják az amfotericin B hatékonyságát és csökkentik az emberi eritrocitákra gyakorolt toxicitást *in vitro* (Oliveira et al., 2016), a kvercetin gátolja a flukonazol-rezisztens *Candida albicans*-t a biofilm képző tulajdonságában *in vivo* és *in vitro* egyaránt (Gao et al., 2016). A flavonoidoknak, például a flavon és a flavonol alapvázalal rendelkező

metabolitoknak vannak vírusellenes hatásai. Ilyen a kempferol és a luteolin, szinergikus aktivitást mutatnak a *Herpes simplex* vírus (HSV) ellen.

A flavonoidok nagyon hatékonyak gyomorfekély ellen, a szabályozó fehérjék foszforilációjának gátlásával, elsősorban a P-kináz jelátvitel befolyásolásával. Hasonlóan az aszpirinhez, az acetilezett flavonoidok átadhatják acilcsoportjukat a COX enzimre. A kvercetin, a kempferol és a rutin szintén mutatnak GIT fekélyek ellen hatást (Sandhar et al., 2011; Tapas et al., 2008). A flavonoidokat általában gyulladáscsökkentőknek tekintik, mivel több tagjuk gátolhatja a COX és LOX enzimeket (Jachak, 2006; Loke et al., 2008; Tapas et al., 2008). A COX enzim gátlásával az apigenint sikeresen alkalmazták reumatoid arthritisben és lupusban állatkísérletes modell esetében (Guardia et al., 2001; Kang et al., 2009). A flavonoidokat gyakran kiváló antioxidánsként említik, amelyek számos mechanizmuson keresztül hatnak, mint például a NO és más ROS aktivitás gátlás, és a xantin-oxidáz gátlása (kvercetin). A mikronizált flavonoid frakciók orális bejuttatás esetén is csökkentik az immobilizált leukociták számát (Jabeur et al., 2017; Nijveldt et al., 2001).

A *T. platyphyllos* esetében elmondható, hogy pozitív eredményeket értek el *in vitro* több daganattípus sejtvonala ellen is (Jabeur et al., 2017).

A Kempferolnak tumorellenes hatása, mint angiogenezis gátló (*in vitro* és *in vivo* zebrahalak esetén) és mint antimetasztatikus vegyület (humán prosztatarák sejtek kultúrákban, humán osteosacoma sejtek esetén) jelenik meg (Kashyap et al., 2017). Akár potenciális jelöltek is lehetnek a daganatos megbetegedések adjuváns kezelésére, mivel képesek apoptózis indukálására (Ramos, 2007), ráadásul egy tanulmány szerint az apigenin gátolhatja az NF- κ B aktiválódását, ami által gátolja a TNF- α hatásait a légutakban (Seo et al., 2014). A luteolin is az NF- κ B útvonalon keresztül fejti ki a gyulladáscsökkentő hatását (Aziz et al., 2018). Maga a luteolin tumorellenes hatást mutat, amely az apoptózis indukációjában mutatkozik meg (Knurek & Buchaj, 2017).

A drog használható nyugtató hatású teának is, mivel a rutin nyugtató és görcsoldó hatású, a kempferol és a kvercetin aglikon *in vivo* anxiolitikus hatással rendelkeznek (Aguirre-Hernández et

al., 2010; Fernández et al., 2006). A Rutin nyugtató hatásáról számos eredmény született már (Ashaari et al., 2018; Luo et al., 2017; Pérez-Ortega et al., 2008).

A luteolin neuroprotektív hatásokat mutat, pozitív hatással van az agyi ischaemiás stroke-ra, epilepsziára, sclerosis multiplexre, az Alzheimer-kórra, valamint a Parkinson-kórra állati modellekben (Ashaari et al., 2018).

A Tiliae flos nemcsak flavonoidokat így luteolint, ami a központi idegrendszer védelme mellett kardioprotektív hatásokkal is rendelkezik (Luo et al., 2017), hanem más fenolos vegyületeket is tartalmaz, mint például katechineket, fahéjsav-származékokat, antocianinokat és kumarinokat. Ezek a vegyületek bizonyítottan bioaktívak különböző kórképekben. A klorogénsav *in vivo* védelmet nyújthat a májfibrózis ellen (Shi et al., 2016). Segítik a cukorbetegség és az elhízás elleni küzdelmet azáltal, hogy befolyásolja a glükóz metabolizmusát (Naveed et al., 2018). A kempferol még csökkenti a plazma glükózsintjét és növeli az inzulinszintet a streptozotocin-diabetikus patkányokban, ezáltal antidiabetikus hatással is rendelkezik (Chandramohan et al., 2015). (+) - katechin sav antioxidáns hatású (McCann et al., 2015), és a katechinek képesek csökkenteni a hasi zsírszövetet és csökkentik a metabolikus szindróma kockázatát. Ezt humán vizsgálatok is alátámasztják (Hibi et al., 2018).

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Vegyszerek

A vizsgálatokban felhasznált vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak. A táptalaj-komponensek (pepton, glükóz-monohidrát, nátrium-nitrát, kálium-hidrogén-foszfát, magnézium-szulfát, kálium-klorid, vas-szulfát) a Reanal-tól lettek beszerezve (Budapest, Magyarország). Az allil-izotiocianát, allil-cianid, 2-fenil-etil-izotiocianát, fenil-propionitril, glutation (redukált formában), (+)-katechin, klorogénsav, (-)-Epikatechin, rutin-trihidrát, a Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (Darmstadt, Németország) cégtől lettek megvásárolva. A tiszta glükozinolátok a Phytoplan-tól (Heidelberg, Németország) lettek beszerezve, az izarhamnetin-3-glükozid és kvercitrin, Carl Roth Gmbh.-tól (Karlsruhe, Németország). Az LC-MS mérésekhez LC-MS minőségű acetonitrilt, vizet és hangyasavat vásároltunk a Fisher Scientific-től (Merelbeke, Belgium).

A további oldószereket (1-propanol, 2-propanol, metanol) és táptalaj kiegészítő komponenseit (streptomycin, kloramfenikol és diklorán) a VWR-től vásároltuk (Budapest, Magyarország). A vizsgálat során minden esetben bidesztillált vizet használtunk.

3.2 A mérések során alkalmazott műszerek és a mérések paramétereit

3.2.1. LC-ESI-MS

Az endofiton és talaj gombák által végzett glükoszínolát-bomlást, valamint a *Tilia platyphyllos* murvaleveleinek metabolitvizsgálatát LC-ESI-MS-ben képesek voltunk kvalitatív és kvantitatív módon meghatározni. Az alkalmazott UHPLC rendszer (Dionex Ultimate 3000RS) egy Thermo Q Exactive Orbitrap tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) volt kapcsolva, elektropray ionizációs forrással (ESI). Az oszlop Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ volt (100 mm × 2,1 mm × 2,6 µm). Az oszlop hőmérsékletét 30°C-on tartottuk; az áramlási sebesség 250 µL/min volt. Az „A” eluálószer 0,1% hangyasavat tartalmazó víz, a „B” eluálószer 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril (Fisher Scientific, USA). A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk a glükoszínolát-bomlás megállapításának mérései során: 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 *T. platyphyllos* metabolom méréséhez az alábbi gradiens került felhasználásra: 0–3 perc, 5% B; 3–15 perc, 100% B; 15–20 perc, 100% B; 20–21 perc, 5% B; 21–29 perc, 5% B. A méréshez a kivonatokat 100-szorosára (*T. platyphyllos*) vagy 200-szorosára (*A. rusticana*) hígítottuk MeOH-lal és 0,22 µm PTFE fecskendőszűrőn szűrtük az LC-MS mérés előtt. Mindkét esetben a minták 1 µl-jét injektáltuk. Egy hígítási sorozattal már előzőleg bizonyítottuk, hogy az adott hígításnál a vizsgált vegyületek a készülék lineáris tartományába esnek. A Q Exactive hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométer negatív ion üzemmódban működött, a következő paraméterekkel: kapilláris hőmérséklet 320 °C, spray feszültség 3,8 kV (*A. rusticana*) és 4.0 kV (*T. platyphyllos*), a felbontást 70 000-re állítottuk. A mért tömegtartomány 150-1000 m/z volt. A

befecskendezés maximális ideje 100 ms volt. Az MS² scan esetén a felbontást 35000-re állítottuk. Az ütközési energia 40 NCE volt. A nyers adatokat az XCMS Online platformmal dolgoztuk fel (Gowda et al., 2014), a platform az Orbitrap-hez javasolt paramétereinek felhasználásával, amit kisebb mértékben módosítottunk az általunk használt készüléknek megfelelően. A platform által kapott adatokkal R-ben ("R: The R Project for Statistical Computing,") dolgoztunk tovább, a ggplot2 csomag alkalmazásával (Wickham, 2016).

A fő GSL-ek kvantálásához öt pontból álló kalibrációs egyenest készítettünk szinigrin, glükonaszturcin, glükoiiberin és glükobrasszicin felhasználásával. A kalibrációs egyenes a 0,01–5 µg/ml koncentrációtartományt fedte le. A GSH kvantifikálásához 0,01–5 µg/ml tartományú kalibrációs egyenest használtunk. A GSH-AITC számszerűsítéshez szükséges reakciót egy korábbi munkánk alapján végeztük el (Gonda et al., 2016). Ötpontos kalibrációs egyenest készítettünk úgy, hogy 0,001–1 µg/ml AITC-t reagáltatunk GSH fölösleggel 7,5 pH-n, NH₄OAc pufferben (Gonda et al., 2016).

A *T. platyphyllos* néhány vegyületének kvantitatív meghatározásához kalibrációs egyeneseket készítettünk a (+) - katechin, (-) - epicatechin, rutin-trihidrát, izorhamnetin-3-glükozid, kvercitrin és klorogénsav esetében. Ezek törzsoldataikból hét pontos hígítási sort készítettünk: 3-3000 µg/L.

Mindkét standard csoportot a hozzá tartozó növény szerinti módszerrel mértük le.

3.2.2. SPME-GM-MS

A glükozinolát-bomlástermékek (izotiociánatok és nitrilek) mérésére, amik illékonyak, egy SPME-GC-MS módszert használtunk. Tíz ml torma-táptalajt (2% agarral szilárdítva) 9 cm átmérőjű Petri-csészékbe öntöttünk. Ez a mennyiségű táptalaj megközelítőleg 60 µmol szinigrin-t tartalmazott. A Petri-csészében lévő táptalajra 100 µl gomba oltóanyagot oltottuk le, amit a táptalaj

felszínén szélesztettünk. A kultúrákat fejfelé lefele helyeztük, majd a Petri-csészék fedeleiben steril Eppendorf cső kupakokba 5 mg aktív szenet helyeztünk, hogy az illékony bomlástermékeket, amiket a gombatenyészet kibocsát, adszorbeálni tudjuk. A szorbenseket naponta kicseréltük. Az aktív szenes mintákat feldolgozásig -24 °C-on tároltuk. Az aktív szénről metil-acetáttal eluáltuk az illékony komponenseket, majd a kapott folyadékot közvetlenül a GC-MS-ben mértük.

A mérési paraméterek a következők voltak: split arány: 10:1; a bemeneti hőmérséklet 150 °C volt. Időprogram: Az inlet kezdeti hőmérséklete 35 °C volt, ezt 3 percig tartottuk, majd ezt követően 15 °C/min hőmérsékleti gradienst alkalmaztunk, míg el nem értük a 90 °C-ot, majd 50 °C/min-re emeltük a gradienst 320 °C-ig; ezután tartottuk a hőmérsékletet 2 percig. HP-5MS 5% (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) fenil-metil-sziloxán oszlopot használtunk. A vivőgáz He, az áramlási sebesség 1 ml/min volt. Az oldószer késleltetése 2,75 perc volt.

Az ötpontos kalibrációs egyenesekhez allil-cianid, allil-izotiocianát, fenilpropionitril és 2-fenil-etil-izotiocianát standardokat használtunk.

3.3. Gombatörzsek izolálása és azonosítása

Az endofiton gombák (1. táblázat) egészséges torma gyökérből lettek izolálva, ezek a minták Újlétáról és Debrecenből származtak. A torma gyökerek felületét először 25%-os Domestos-szal fertőtlenítettük, majd ezt steril desztillált vízzel mostuk le. Ezután apró, pár centiméteres kockákra vágtuk, amiket SGA táptalajra helyeztünk (Hallmann et al., 2006). Az izoláláshoz használt Petri-csészéket szobahőmérsékleten tároltuk. Ezzel a módszerrel hét endofiton törzs lett izolálva (E1-E7).

ID	Faj	Gén szekvenciák	GenBank azonosító szám
E1	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	ITS, eF1	KP191628, KP191635
E2	<i>Macrophomina phaseolina</i>	ITS, β -tubulin	KP191629, KP191637
E3	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	ITS, eF1	KP191630, KP191636

E4	<i>Setophoma terrestris</i>	ITS, α -aktin	KP191631, KP191638
E5	<i>Paraphoma radicina</i>	ITS, α -aktin	KP191632, KP191639
E6	<i>Paraphoma radicina</i>	ITS, α -aktin	KP191633, KP191640
E7	<i>Oidiodendron cerealis</i>	ITS	KP191634
S1	<i>Fusarium sp</i>	ITS	-
S2	<i>Penicillium sp</i>	ITS	-
S3	<i>Fusarium sp</i>	ITS	-
S4	<i>Paraphoma sp.</i>	ITS	-
S5	<i>Penicillium sp</i>	ITS	-
S6	<i>Aspergillus sp</i>	α -aktin	-
S7	<i>Fusarium sp</i>	ITS	-
S8	<i>Penicillium sp</i>	ITS	-
S9	<i>Aspergillus sp</i>	ITS	-
S10	<i>Fusarium sp</i>	ITS	-

1. táblázat. A glükózinolát bontó aktivitást, a kizárólagos szénforráson való növekedést (szinigrin) és az ITC-k növekedésgátlását a táblázatban szereplő gombatörzseket vizsgáltuk, amiket E1-E7 és S1-S10 kóddal jelöltünk.

A referencia csoportnak használt talajgombákat ugyanazon földből izoláltuk, amikben a torma is nőtt, de az izoláláshoz használt föld nem a torma növény közvetlen környezetéből származott.

Először 1 g földet szuszpendáltunk fel 10 ml steril vízzel, majd a szuszpenziót 1000-szeresére hígítottuk, amiből 100 μ l-t szélesztettünk szét egy petri-csészén. Az izolálás antibiotikumot tartalmazó (50 mg/L streptomycin és 50 mg/L kloramfenikol, 2 mg/L diklorán) SGA és PDA táptalajon történt. Ilyen módszerre tíz törzs lett izolálva (S1-S10)

Az endofitonok és talajgombák azonosításhoz a következő primer párokat használtuk: ITS1, ITS4, (ITS); Bt2a, Bt2b (β -tubulin); act-512F, ACT-783R (α -aktin) és EF1-728F, EF1-986R (elongációs faktor 1). Az így kapott szekvenciákat hasonlítottuk össze különböző adatbázisokkal GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), Q-bank Fungi (<http://www.q-bank.eu/fungi/>) és Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) adatbázisok (1. táblázat).

3.4. Általánosan használt táptalajok

SGB/SGA (Saboraud Glucose Broth/Agar) tartalmaz 40 g/L glükóz-monohidrátot, 10 g/L peptont, pH $5,6 \pm 0,2$.

PDB/PDA (Potato Dextrose Broth/Agar) tartalmaz burgonya kivonatot, ami 200 g/L burgonyának felel meg, 20 g/L glükóz-monohidrátot, pH $5,6 \pm 0,2$.

CzD (Czapek-Dox) táptalaj a következő összetevőket tartalmazza: 3,0 g NaNO_3 ; 1,0 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl és 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /L, pH $7,3 \pm 0,2$.

MEB/MEA (Malt extract broth/agar) (20g/L maláta kivonat, 20 g/L glükóz-monohidrát)

Az SGA, CzD, PDA, MEA táptalajok 2% agarral lettek szilárdítva, ha szükség volt rá.

3.5. Torma táptalaj (HorseRadish extraction - HRE) készítés

Ahhoz, hogy azt a génexpressziós mintázatot, ami a növényben élő gombát legjobban jellemzi, minél jobban tudjuk reprodukálni, *in vitro* torma kivonaton alapuló táptalajt készítettünk. Ez a vizes-metanolos kivonat a torma metabolitjainak nagyjából eredeti koncentrációját tartalmazza.

A táptalaj készítésének első lépése a gyökérben jelenlévő mirozináz enzim inaktiválása, amit a gyökér fél órán át tartó főzésével értünk el. A glükozinolátok hőstabilitása miatt ezeket a vegyületeket nem fenyegette bomlás. A főzés után a növényi anyagot aprítottuk, majd pépesre daráltuk, metanol hozzáadásával (3:2 metanol : nyers tömeg), majd golyós hűtő alatt 30 percig forrásban tartottuk ($\sim 80^\circ\text{C}$) a pépesre darált gyökeret. Az extraktot leszűrtük, majd rotadeszten szárazra pároltuk max. 40°C -on. Ezt a száraz extraktot újra felvettük vízben a gyökér eredeti víztartalmának megfelelő mennyiségben (ez kb. 70% vizet jelentett). A folyadékot sterilre szűrtük

0,22 μm pórusátmérőjű steril PES membránon keresztül, majd a felhasználásig $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A tápoldatot szükség esetén sterilizett agarral elegyítettük, ami így 2% agart tartalmazott.

3.6. Gomba oltóanyagok készítése

A kísérletek kivitelezéséhez megfelelő, adagolható gomba oltóanyagot kellett készítenünk. Ehhez rázatva (200 rpm), folyékony maláta kivonaton, Czapek-Dox táptalajon vagy HRE táptalajon (kb 30 ml tápoldat) neveltük a gombákat steril körülmények között. A gombák növekedésétől függően 3-9 napig hagytuk őket nőni. Steril körülmények között a micéliumot centrifugáltuk (20.000 rpm, 5 perc), ezután a tápoldat kimosása végett 3x steril bidesztillált vízzel is átmostuk.

A micéliumot steril körülmények között üveghomogenizátor (üvegből készült eszköz, aminek a homogenizáló hatása a csiszolatos dörzsfelülettel ellátott két rész között valósul meg. A egyik része egy üvegtubus, amibe szinte teljes mértékben illeszkedik egy üvegből készült pisztillus) segítségével közel homogén állagúvá diszpergáltuk, és az ily módon elkészített oltóanyagot 4°C -on tároltuk.

A kísérletekhez szükséges mennyiségű oltóanyagot a gomba szárazanyagtartalma alapján standardizáltuk, amit liofilizálás utáni tömegméréssel mértük le.

3.7. Tormatáptalajon való gombainkubáció

A gombákat az előzőekben ismertetett tormakivonat alapú táptalajon inkubáltuk, hogy meg tudjuk határozni a gombáknak a torma másodlagos metabolitjaira gyakorolt hatásait. 5 ml folyékony tápoldatba oltottunk be annyi gombát, hogy annak koncentrációja $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ száraz tömegnek

feleljen meg. Ezután ezt a bekevert hígítást 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe szétosztottuk úgy, hogy mindegyik csőbe 250 µl hígítatlan HRE táptalajjal egyenértékű szuszpenzió kerüljön. Az Eppendorf csöveket steril műanyag tároló edénybe helyeztük, ahol a steril bidesztillált vízzel biztosítottuk a magas relatív páratartalmat a párolgás minimalizálása érdekében a vizsgálat során. A kontroll beoltatlan táptalaj volt. A mintavétel után a mintákat fagyasztottuk és -24 °C-on tároltuk a további feldolgozásig. Mindegyik időponthoz legalább 3 ismétlés tartozott. A teljes kísérlet 16 napig tartott, a mintavételi időpontok gyakorisága és az egyes törzsek időbeni végpontjai előzetes kísérleteken alapultak. Mivel az egyes endofitonok növekedési üteme különbözött, ezért különböző napokon vettünk mintákat a növekedési görbe megállapításához. Hasonló kísérleti elrendezést alkalmaztunk a talajgombák esetében is, de ebben az esetben csak a 16 napos mintákat dolgoztuk fel.

A minták liofilizálása után a mintákat 250 µL 10% 1-propanolban vettük fel a annak érdekében, hogy könnyebb legyen centrifugálni, és a viszkozus poliszacharidok ne oldódjanak be. A felülúszót fagyasztóban, -24 °C-on tároltuk. A gombapelletet ezután liofilizáltuk és meghatározzuk a száraz tömeget, majd ebből megállapítottuk a különféle törzsek növekedési görbáját.

3.8. Szinigrinen, mint önálló szénforráson való növekedés

Ebben a kísérletben a szinigrint használtuk kizárólagos szénforrásként egy mesterséges, egyéb szénforrást nem tartalmazó táptalajban.

Táptalajként 100 µl Czapek Dox szervesetlen táptalajt használtunk, pozitív kontrollként ehhez adtunk 2% szacharózt. A kísérletben a szacharózhoz képest ekvimoláris mennyiségű szinigrint használtunk fel, a negatív kontrollunk pedig víz volt. A kísérletet 96 lyukú plate-en 12 napon keresztül végeztük. Mindent felhasznált oldatot steril PES-fecskendőszűrőn keresztül sterilre szűrtünk. A gomba növekedést fotometriásan 800 nm hullámhosszon mértük 3x3 mátrixban egy

Epoch mikroplate olvasóban. A változásokat vizuális vizsgálat is megerősítette. A teljes növekedést négy ismételtesben végeztük el.

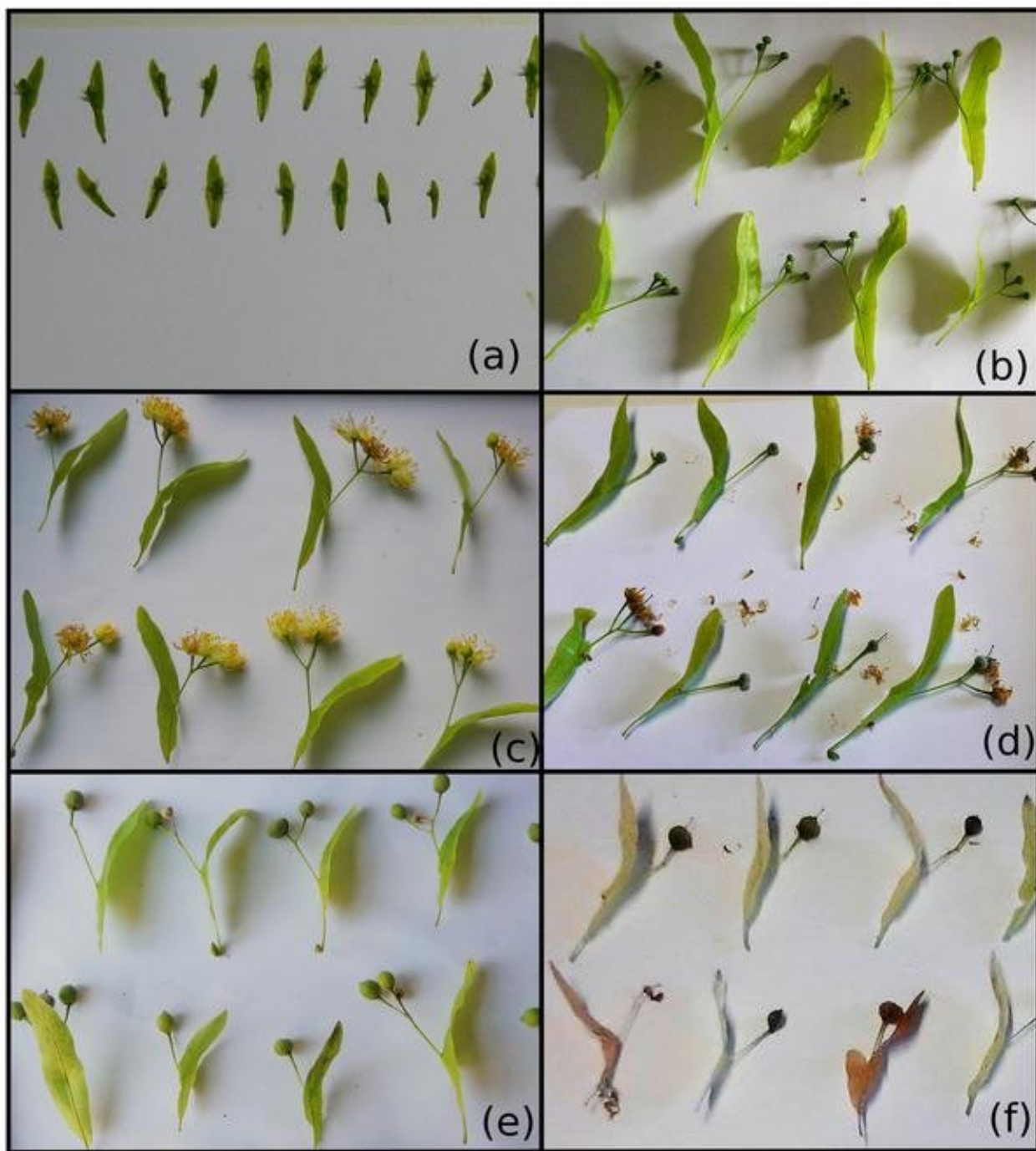
3.9. Allil- és 2-fenil-etil-izotiocianát növekedés-gátló hatásának meghatározása a gombákra

Az *A. rusticana* fungicid illékony vegyületeinek növekedést gátló hatását vizsgáltuk. Az endofitonokat és a talaj gombákat közvetlenül össze tudtuk hasonlítani. SGB táptalajt alkalmaztunk, aminek 500 µl-ét gombákkal oltottuk be 24 lyukú plate-n. A növekedést 800 nm hullámhosszon követtük nyomon, a lyukakban egyenletesen, 5x5 mátrixban végeztük a fotometriás mérést egy Epoch mikroplate olvasóban, ezáltal lehetővé téve a fonalas gombák növekedésének számszerűsítését. A beoltást követően csak akkor kezdtük meg a kezelést, ha a növekedés megkezdődött, amit szintén fotometriás eljárással monitoroztuk. Az abszorbancia növekedésének észlelésekor a tenyészeteket DMSO-val hígított AITC vagy PeITC 5 µl-es mennyiségével kezeltük. Az első kísérletsorozat alkalmával mind az AITC, mind a PeITC vég koncentrációja 0,25, 2,5, 25, 250 µg/ml volt. 2500 µg/ml egyenértékű kezelés is tesztelve volt. Ebben az esetben a végső koncentráció nem volt pontos az ágensek alacsony vízdékonysága miatt. Egy későbbi kísérletben az IC₅₀ meghatározásához azonos elrendezéssel, további koncentrációkat teszteltünk a felbontás javítása érdekében (0,445, 0,791, 1,406, 4,45, 7,91, 14,1, 44,5, 79,1, 141, 445, 791, 1406 µg/ml koncentrációkkal dolgoztunk). A kontrollt DMSO-val kezeltük. Mivel az ITC-k bizonyos mértékig illékonyak, ezért egy plate egy koncentrációval és egy ágenssel lett kezelve. A gombák növekedési üteme különbözött egymástól, ezért az inokulációtól számított 12, 24 vagy 36 óra után lettek kezelve a gombatorzsek. A kezelt plate-eket sötétben, szobahőmérsékleten 48 órán át inkubáltuk. A

növekedést úgy számítottuk ki, hogy a kezelés után 48 órával mért abszorbanciából kivontuk a (közvetlenül a kezelés előtt mért) nulla idő abszorbanciát. Mindegyik pontnak, amiből IC₅₀ értéket számoltunk R-ben ('drc' (Ritz et al., 2015) felhasználásával), legalább 3 ismétlése volt.

3.10. A *Tilia platyphyllos* növényi anyagának gyűjtése, mintaelőkészítés

A murvaleveleket négy szomszédos *Tilia platyphyllos* Scop. fáról gyűjtöttük a Debreceni Egyetem campusáról (47.5556 N, 21.6215 É), a szerv megjelenésétől a szeneszenciáig (112 nap). Jellemzően 150–200 mg volt a száraz tömege a murvaleveleknek (kezdetben körülbelül 40-50 db, míg a későbbi időszakban 8-10 db került gyűjtésre) (2. ábra). A mintavétel során a fák több pontjáról reprezentatívan lettek a minták gyűjtve. A mintákat meleg levegő áramoltatással (40° C-ot meg nem haladó hőmérsékleten) szárítottuk, a gyűjtést követő egy órán belül, és nagyjából 4 órán át tartott a szárítás. A maradék nedvességet egy éjszakán át tartó liofilizálással távolítottuk el egy Christ Alpha 1-2 LD készülékben. A mintákat lezárt mintatartókban, sötétben, szobahőmérsékleten tároltuk a további feldolgozásig.

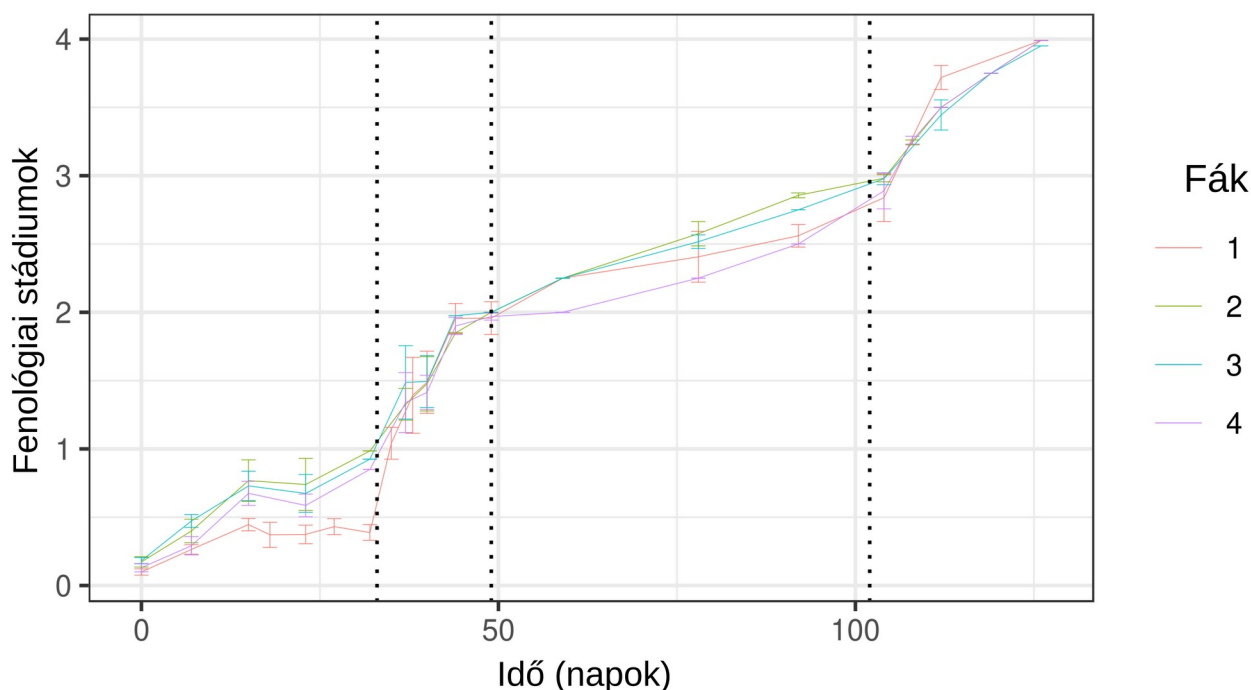


2. ábra. A *Tilia platyphyllos* murvalevelinek képei a különböző mintavételi időpontokban és fenológiai szakaszokban. A fényképeket szárítás előtt készítettük. a) 0. nap, b) 27. nap, c) 42. nap, d) 52. nap, e) 88. nap, f) 104. nap.

A szárított mintákat mozsárban, folyékony N₂ felhasználásával homogenizáltuk. Ezután a pontosan bemért 25 mg anyaghoz 1 ml MeOH-t adtunk, majd szobahőmérsékleten tartottuk 10

percig, ezután pedig 30 percig 75 ° C-on extraháltuk. Az elegyet 13 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 3 percig, és a kapott felülúszót -24 °C-on tároltuk.

3.11. A *Tilia platyphyllos* fenológiai stádiumainak skálázása



3. ábra. A fenológiai stádiumok előrehaladása az idő múlásával a *Tilia platyphyllos* murvalevelei esetében, négy fáról vett mintából (különböző színű rajzolva). Az y tengelyen a fenológiai stádiumok szakaszai jelennek meg, és a Pontozott függőleges vonalak választják el a főbb fenológiai fázisokat.

A murvalevek fenológiai stádiumait saját skála szerint szakaszokra osztottuk. A fenofázis különböző stádiumai szinte egy időben követték egymás az összes vizsgált fán (3. ábra). Az első szakasz (0–1) a murvalevél növekedése és a virágrügy kialakulása, amely a 0. és a 32. nap között volt (2. ábra (a) - (b)). Gyors kezdeti méretnövekedést figyeltünk meg, amely a 0-15. napok között volt. A második fázis a virágzási fázis (1–2, 2. ábra (c) –(d)). Ez a 32. naptól (az első virágok kinyílásától) a 49. napig (a szirmok többségének leeséséig, a virágzás ekkor ért véget) tartott. A

harmadik szakasz (2–3) a termésfejlődési szakasz, amely a 49. és a 104. nap között volt (2. ábra (e)). A negyedik szakasz (3–4) a termések teljes kifejlődése után kezdődött, ekkor kezdődött meg a murvalevelek öregedése, amelyet az egész szerv megbarnulása jellemez (2. ábra (f)), majd csak ezt követően hullanak le a fákról.

3.12. A kromatogramok kiértékelése és a vegyületek azonosítása

A kromatogramok kiértékelése az XCMS online (Tautenhahn et al., 2012) szoftverrel történt (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) az alábbi paraméterek használatával: (I) vegyület detektálás: centWave módszer, min. és max. csúcs szélessége = 5 és 20, S/N küszöb = 10, mzdiff = 0,01, in.tegrációs módszer = 1, csúcs előszűrés = 3, előszűrés intenzitás = 5000, zajszűrés = 1000; (II) Retenció idő korrekció: Obiwrap módszer, profStep = 1; (III) Igazítás: mzwid = 0,015, minfrac = 0,5, bw = 5, max = 100, minsamp = 1; (IV) Statisztikai teszt: ANOVA. Az összes alkotóelem hozzávetőleges azonosítását LC-ESI-MS/MS segítségével végeztük.

A fenoloidok azonosítása MS/MS spektrumok alapján az adatbázisból származó fragmentációs mintázaton (<https://metlin.scripps.edu/>), az irodalomból származó referenciákon és a rendelkezésre álló standardok fragmentálódásával történő összehasonlításon alapult. A flavonoidok azonosítását MS/MS segítségével az aglikon és az aglikon jellegzetes fragmenseinek azonosításával végeztük (Karioti et al., 2014; Parejo et al., 2004; Vukics & Guttman, 2010). Hasonló megközelítést alkalmaztunk a katechinekre is (Jabeur et al., 2017; Karioti et al., 2014) és a fahéjsav-származékokra (Mohd Shukri & Alan, 2010; Parejo et al., 2004; Sánchez-Rodríguez et al., 2012). A

fő cél az utóbbiak esetében a fenilpropanoid egység(ek) típusának azonosítása volt. A kumarinok azonosítására a (Parejo et al., 2004) cikkét használtuk.

3.13. Adatbányászat

Az *Armoratia rusticana* esetében annak meghatározására, hogy a metabolit koncentrációja jelentősen megváltozik-e a kezelések eredményeként, ANOVA-t használtunk XCMS online felület segítségével (Gowda et al., 2014). Az XCMS Online alkalmazásban minden megfigyelési pontot (egy mintavételi időponthoz tartozó fák mintáinak összességét) külön kezelésként értékelve ANOVA-nak vettünk alá. A megfigyelési pont egy adott időpontban végzett kezelés mintáiból állt, $n \geq 3$. Ezekre az adatokra Bonferroni korrekciót használtunk. A jellemzők szignifikánsak voltak $p < 3.03e-6$ esetén. A sikeres ANOVA tesztek után a Dunett post-hoc-tesztet alkalmaztuk a többszörös kezelések összehasonlításához. Ezeket vagy a végponthoz, vagy a legközelebbi kontroll kezelési pontjaihoz viszonyítottuk (mindkettő $n=3$). Az összes számítást R-ben ("R: The R Project for Statistical Computing,") végeztük.

A *Tilia platyphyllos* esetében XCMS online felületről kinyert nyers adathalmazt a következő kritériumok szerint szűrtük az R 3.5.0-ban: 1., tisztaság: csak azokat a csúcsokat vettük figyelembe, amelyek egy időpontban mind a négy fa mintájában jelen volt, vagy egyikből sem tudtuk kimutatni; 2., jel-zaj arány: a csúcs abundanciájának maximuma $1E5$ felett kellett, hogy legyen; 3., vak kontroll: a mintákban egy-egy vegyület esetében legalább 100-szor több kell, hogy legyen a csúcs alatti terület, mint a vakban (MeOH), ha ott megtalálható.

Az izotópok és az adduktok jelenlétét félautomata azonosítását és szortírozását ezen a ponton végeztük, az R 3.5.0-ban: a csúcsokat multi korreláció alapján listáztuk ($> 0,9$, Pearson) azonos retenciós idővel ($\pm 0,03$ perc) és izotópokra és adduktokra jellemző tömeggel (^{13}C , + $HCOOH$, [2M

– H⁺), és manuálisan ellenőriztük ezt a listát. Összesen 182 csúcsról derült ki, hogy izotóp vagy addukt, ezeket az elemzés előtt kivettük.

A nyers adatkészletet autoskáláztuk (metabolitonként), majd hierarchikus klaszterezésnek vetettük alá az R 3.5.0-ban (hclust, „Minkowski” távolságmetrikával és „Ward.D” klaszterezési módszerrel), hogy hierarchikus klasztereket és vegyületek rendszerét megkapjunk. Az egyes metabolitok esetében az idő és a fák hatásait ANOVA modellekben vizsgáltuk, minden egyes metabolitra külön-külön, R (aov) értékben.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. *Armoratia rusticana*

A metabolomikai esettanulmányunk egyik modellnövénye az *Armoratia rusticana*, vagyis a torma. Metabolomikai szempontból, ez a növény azért érdekes, mert a bioaktív vegyületek alapvetően inaktivált állapotban vannak jelen, az aktiválásukhoz pedig egy enzimatikus folyamat szükséges (1. ábra). Ebben az esetben a vegyületek változását egy külső tényező, a gombák indukálhatják. Az esettanulmány leginkább célzott metabolomikai koncepciót alkalmaz, mely jelen esetben egy vegyületcsalád vizsgálatát jelenti, mégpedig azon elv mentén, hogy a vegyületcsoport mennyiséges és minősége hogyan és milyen mértékben változik a gombákkal való inkubálás során. Ezen mennyiségi és minőségi változások monitorozására különböző műszeres analitikai technikákat dolgoztunk ki, hogy a megfelelően kivitelezett kísérleteket nyomon tudjuk követni.

Ebben az esetben az *A. rusticana* és a benne élő fonalas gombák, vagyis endofitonok interakciójának vizsgálatára törekedtünk. Bár a mirozináz aktivitással rendelkező gombákról sok tanulmány létezik, a Brassicaceae növények endofiton gombáinak mirozináz aktivitását eddig még nem vizsgálták. Mivel általában a glükozinolát-mirozináz-izotiocianát (GSL-MYR-ITC) rendszert pont gombák ellen kifejlesztett védekező rendszernek tekintik, ezért a gombák esetleges aktivitásának vizsgálata komplexebbé tenné ezt a rendszert. Ebben a megközelítésben jobban megértenénk a gombák habitusát, amelyek a növénnel együtt élnek. Természetesen a gombákat mindenképpen össze kellene hasonlítani egy kontrollcsoporttal, hogy a jelenség specifikusságát is igazolni lehessen.

Tilia platyphyllos-tól eltérően a tormát általában élelmiszerként azonosítjuk. Viszont már régóta ismeretes emésztést elősegítő hatása, valamint további gasztrointesztinális problémákban is ajánlják

(puffadás, étvágytalanság). Külsőleg leginkább reumás fájdalmak esetében alkalmazható (Sampliner and Miller, 2009).

4.1.1. Endofitonok és talajgombák azonosítása

Hét endofiton gombát izoláltunk az *Armoracia rusticana* felületi fertőtlenített gyökeréből. Az azonosítás során kiderült, hogy az izolált endofiton gombák különböző genusokba tartoznak (Dr. Gonda Sándor és Dr. Emri Tamás munkája). Az izolált törzseket a tenyészetek makro és mikroszkópos vizsgálatával, és DNS-eik taxonómiai szempontból releváns szegmenseinek szekvenálásával (ITS, β tubulin, α -aktin és transzlációs EF) azonosítottuk. A szekvenciákat a GenBank-ban rendelkezésre álló szekvenciákkal hasonlítottuk össze, így megállapítottuk, hogy az izolátumok az 1. táblázatban bemutatott fajokhoz tartoznak. A gombák három taxonómiai-funkcionális csoporthoz tartoznak: A két *Fusarium oxysporum* izolátum (E1, E3) a Hypoceraleshez tartozik. Ennek a fajnak már találtak endofiton törzseit *Brassica napus*-ban (Zhang et al., 2014). A másik csoport tagjai a rokon *Pleosporales* (E4–6) és *Botryosphaeriales* (E2) kládokhoz tartoznak (de Gruyter et al., 2009). Ezeket a fajokat endofitonokként is leírták (Chowdhary & Kaushik, 2015; El-Elmat et al., 2015). Az *Oidiodendron cerealis* (E7) meglehetősen szokatlan, mivel ez egy tipikus ericoid endofiton (Mclean et al., 1999), amely az Ericaceae növény család gazdasejtjeit kedveli (Grelet et al., 2016).

Az általunk izolált talajgombák közül négy *Fusarium* (S1, S3, S7, S10), három *Penicillium* (S2, S5, S8), kettő az *Aspergillus* (S6, S10) és egy *Paraphoma* (S4) törzsbe tartoznak (1. táblázat). Ezen törzsek identifikálását a 3.3 alfejezetben leírt módszerekkel makro és mikroszkópos vizsgálat, valamint DNS szekvenálással (ITS és α -aktin) végeztük.

4.1.2. Torma endofitonok és talaj gombák glükozinolát-bontó aktivitása

Számos vizsgált gombáról (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Setophoma terrestris*, *Paraphoma radicina*) kimutattuk, hogy bontják a különféle glükozinolátokat. A kísérleteinkből látszik, hogy az endofitonok általában hatékonyabban bontották ezen vegyületeket, mint az azonos talajból származó talajgombák. A bomlás sebessége bizonyos mértékben a glükozinolátok oldalláncától függött, amint azt később láthatjuk. Ennek a módszernek a fő kísérlete a különböző gomba törzsek inkubálása a torma-kivonaton (HRE) mint táptalajon, és ezután a glükozinolát-koncentrációk mennyiségi meghatározása LC-MS segítségével (A mérés lebonyolításában Dr. Cziáky Zoltán és Sinka László volt segítségünkre). Ez lehetővé tette a gombák feltételezett mirozináz enzim aktivitásának mérését, amihez szükségünk volt izolált endofiton és talajból származó gombatörzsekre.

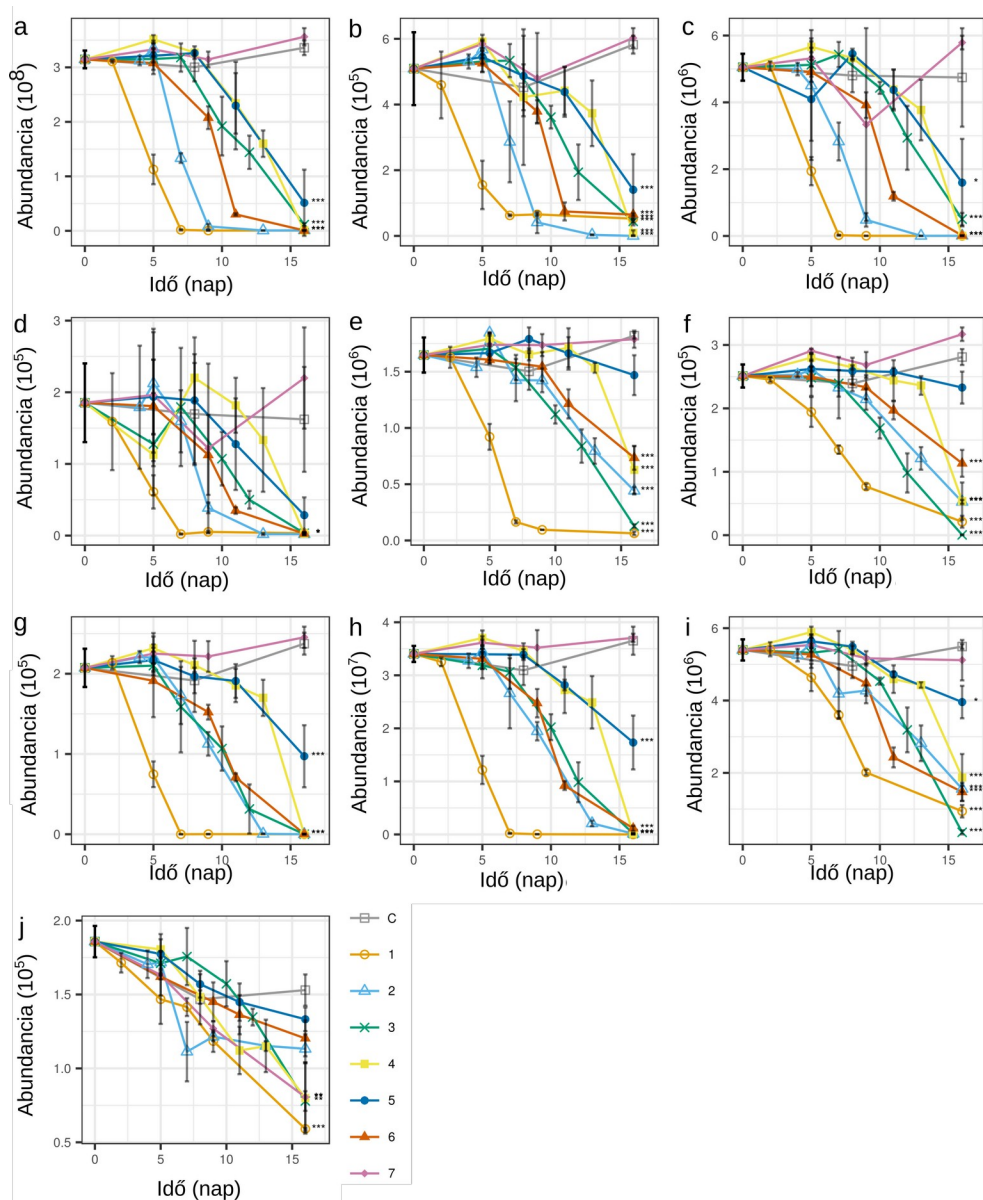
[M-H] ⁻ (m/z)	Rt	Triviális név	Oldallánc	Glükozinolát osztály
358.0275	1.59	Szinigrin *	2-propenil	alifás
372.0434	2.69	Glükonapin	3-butenil	alifás
374.0591	4.23	Glükokochlearin	1-metilpropil	alifás
386.0592	6.37	Glükobrasszikanapin	4-pentenil	alifás
422.0261	1.28	Glükoiberin *	3-(metilszulfenil)propil	metiltioalkil
478.0888	7.4	Glükoibarin	7-(metilszulfenil)heptil	metiltioalkil
408.0435	7.32	Glükotropaeolin	benzil	aromás
422.0591	9.08	Glükonasztucin *	feniletil	aromás
447.0544	8.49	Glükobrasszicin *	indol-3-ilmethyl	indol
477.0649	9.29	4-Metoxiglükobrasszicin	4-metoxiindol-3-ilmethyl	indol

2. táblázat. A tormakivonatban található azonosított glükozinolátok. Ezeket a vegyületeket az endofitonok és a talaj gombák is bontották. (Azokat a glükozinolátokat, amelyeket standarddal azonosítottunk, csillaggal jelöltük, a többi pedig referencia alapján lett azonosítva (Agneta et al., 2014). Rövidítés: Rt retenció idő (perc)

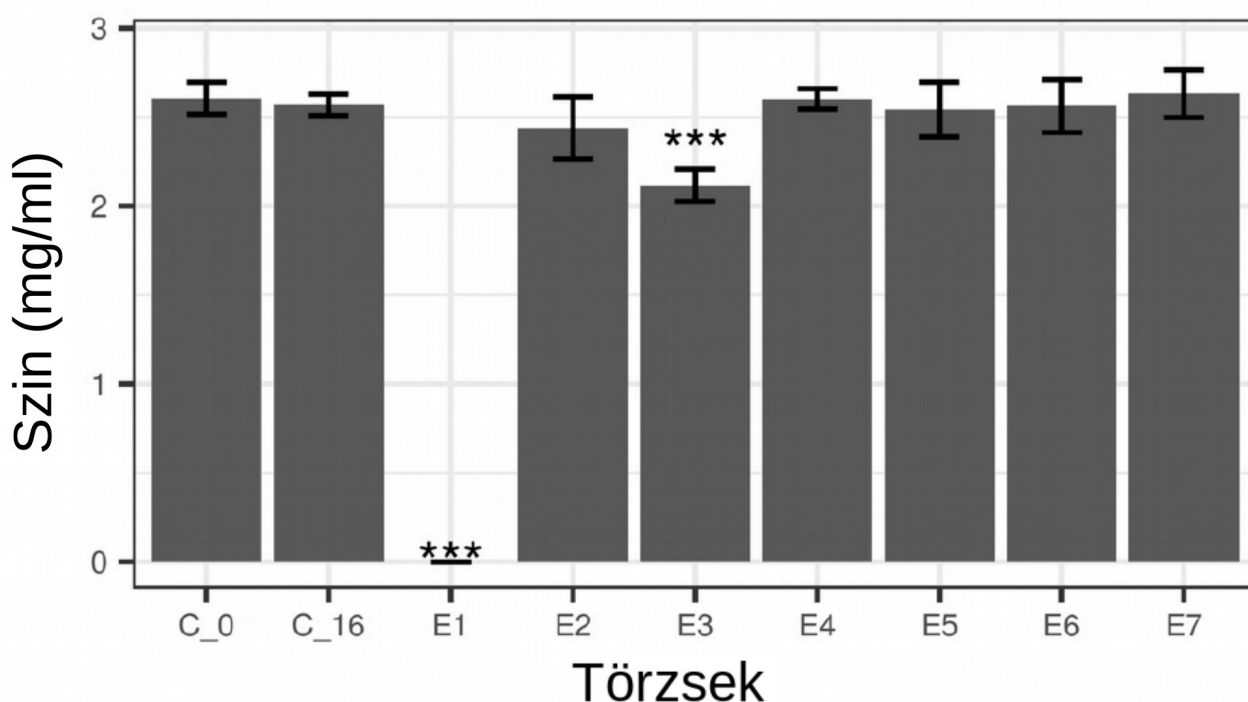
A tormakivonatból különféle glükozinolátok lettek azonosítva. Az LC-MS/MS mérés megmutatta, hogy egy 250 μ L-es alikvot (ami 0,295 g torma nyers tömegnek, vagy 0,088 g torma száraztömegnek felel meg) 1,42 μ mol szinigrin (2,37 mg/ml), és 0,077 μ mol glükonaszturciint tartalmazott (129 μ g/ml), és kisebb-nagyobb mennyiségben egyéb GSL-eket is (2. táblázat). Az inkubáció után LC-MS mérést végeztünk, majd az abból kapott kromatogramokat az XCMS Online segítségével célzottan glükozinolátokat keresve szűrtük az adatokat. Ha egy vegyület által adott jelnek kromatográfiás csúcs alakja volt, és az MS/MS-ben a GSL-specifikus fragmensek megjelentek, akkor glükozinolátként azonosítottuk. Erre a célra az MS²-ben a 259.012 (C₆H₁₁SO₉⁻) és 96.960 (HSO₄⁻) fragmenseket kerestük (Fabre et al., 2007; Rochfort et al., 2008). A kimutatott kisebb glükozinolátok alifás (glükonapin, glükokoklearin), tiometil-alkil (glükoi berin) és indolos (glükobrasszicin) csoportba tartoztak (2. táblázat). Már korábban is leírták, hogy ezen típusú glükozinolátok megtalálhatóak a torma gyökérben (Agneta et al., 2014). Bár a GSL-ek detektálási érzékenysége az LC-ESI-MS-ben változó, a detektált GSL-ek közül többnek a jel aránya 0,73–1,72 volt szinigrinhez viszonyítva (Maldini et al., 2012; Tian et al., 2014). Ebből következtethetünk arra, hogy a kisebb GSL-ek nagyjából 0,7–40,6 nmol (mindegyik) mennyiségben voltak jelen ebben a kivonatban.

A kontrollokban a legtöbb glükozinolát koncentrációja nem változott szignifikánsan a 16 napos inkubációs periódus alatt ($p > 0,05$). A hét endofiton gombából hat sikeresen lebontotta a legtöbb vagy az összes glükozinolátot ($p > 0,05$, 4. ábra). Az inkubáció végére a hét törzsből hat szignifikánsan csökkentette a fő glükozinolát, a szinigrin mennyiségét ($p < 0,001$, 4a. ábra). Az E7 törzs (*O. cerealis*) azonban nem volt képes a glükozinolátokat lebontani (4. ábra). A szinigrin bontási képességét ugyanazon gombák esetében szintén teszteltük, hasonló mennyiségű szinigrinnel SGB-ben (5. ábra). Ez arra utal, hogy a nagy mennyiségű GSL jelenléte önmagában nem elegendő az enzimek indukálásához, amelyek felelősek a bontásért, annak ellenére, hogy a glükozinolát-bontó képességük kifejezett (E2, E4-E6) (4-5. ábra). Ez indokolta a HRE-ben végzett munka

fontosságát a gombák bontási képességeinek bemutatására. Annak ellenére, hogy a HRE összetétele a torma gyökér különféle sejtjeinek átlaga, *in planta* körülményekhez jobban hasonlít, mint egy szokásos mikrobiológiában használt táptalaj. A teljes növényi kivonat szintén jobbnak bizonyult az endofitonok egy másik vizsgálata szempontjából, mégpedig az endofitonok növekedési jellege szempontjából (Murphy et al., 2015). Amikor az endofitonok a mirozinázt nem tartalmazó sejtek intracelluláris terébe bejutnak, a gomba eredetű mirozináz enzim bonthatja a benne lévő glikozinolátokat. Ezek az enzimek lehetnek intra-, vagy extracellulárisak is (Reese et al., 1958).



4. ábra: A glükoszínolátok bomlása a torma eredtű endofiton gombáival beoltott torma-kivonatban. A következő glükoszínolát alosztályokat mutatjuk be: a-d., alifás; e-f, metiltioalkil; g-h, aromás; i-j, indol. Ábrák: a., szinigrin; b., glükonapin; c., glükokoklearin; d., glucobrasszikanapin; pl. glükoiiberin; f., glükoiбарin; g., glükotropaeolin; h., glükonaszturciin; i., glükobrasszicin; j., 4-metoxi-glükobrasszicin. Gombák: E1, *Fusarium oxysporum*; E2, *Macrophomina phaseolina*; E3, *Fusarium oxysporum*; E4, *Setophoma terrestris*; E5, *Paraphoma radicina*; E6, *paraphoma radicina*; E7, *Oidiodendron cerealis*; C, kontroll (nem lett gombával beoltva). Statisztikai teszt: Dunnett-teszt, végpont-minták az utolsó időpont-kontrollhoz viszonyítva ($n = 3$, ***, $p < 10^{-5}$; **, $p < 10^{-4}$; *, $p < 5 \cdot 10^{-4}$).



5. ábra: Az SGB táptalajból visszamért szinigrin mennyisége, aminek a kezdő koncentrációja 2.5 mg/ml volt (hasznlóan a torma-kivonathoz) és az endofitonokkal 16 napig inkubáltuk. Jelmagyarázat: C_0, kontroll (nulla idő); C_16, kontroll (16 naposan); Endofitonok (16 nap): E1, *Fusarium oxysporum*; E2, *Macrophomina phaseolina*; E3, *Fusarium oxysporum*; E4, *Setophoma terrestris*; E5, *Paraphoma radicina*; E6, *paraphoma radicina*; E7, *Oidiodendron cerealis*. Az alkalmazott statisztikai teszt ANOVA volt, amelyet Dunnett-teszt követett, „***”, $p < 0,001$.

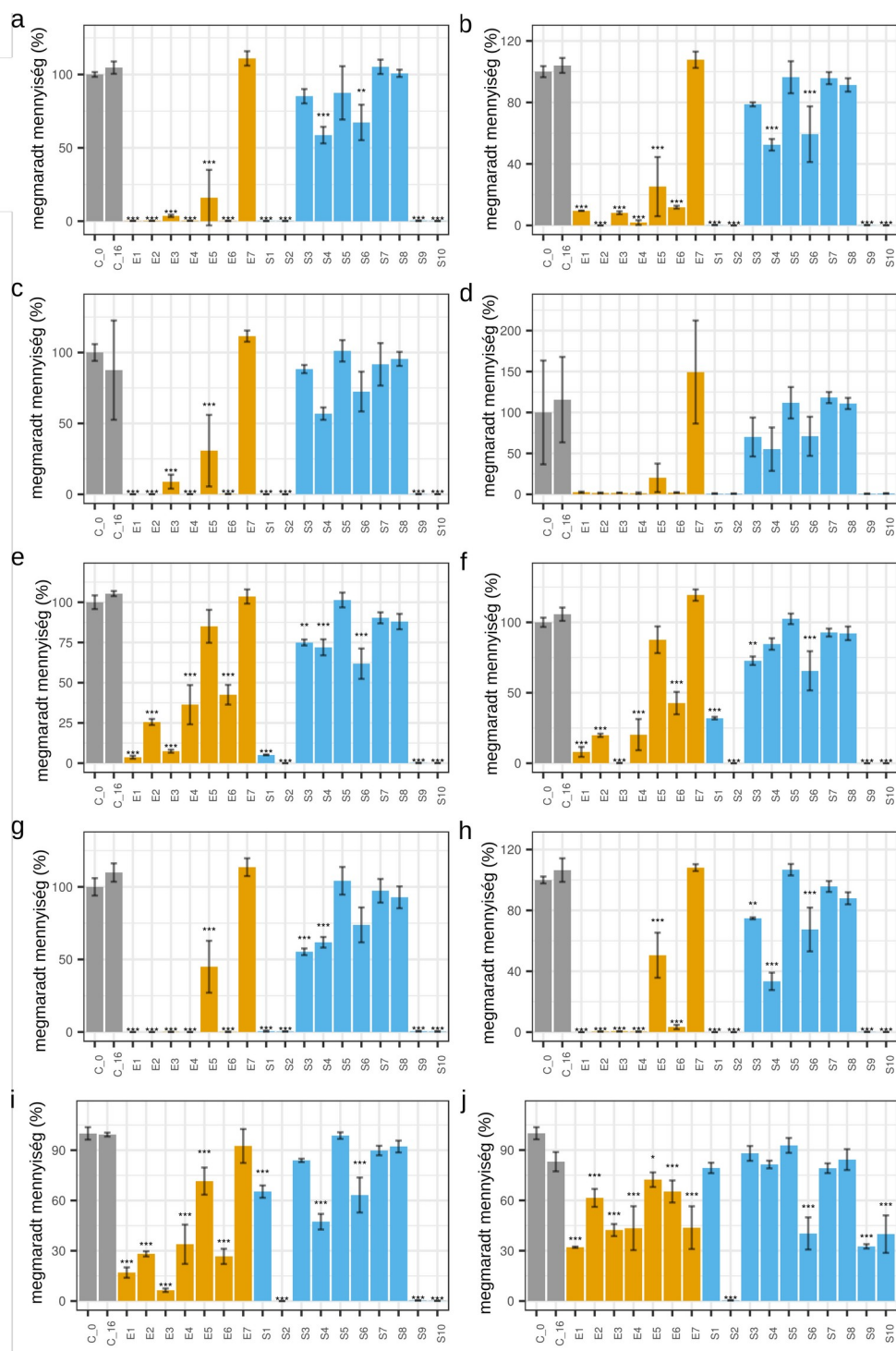
A szinigrin és a glükonaszturciin koncentráció-csökkenésének meredekségéből kiszámítható a bomlási sebesség, ami 0,606–1,476 mM/nap és 0,018–0,057 mM/nap tartományban volt. A fajon belüli különbségek az E1-E3 (*F. oxysporum*) és az E5-E6 (*P. radicina*) törzseknél jól megfigyelhetők. Míg az E1 már a növekedési szakaszában gyorsan lebontotta a legtöbb glükozinolátot (1,125 mM/nap szinigrin; 0,057 mM/nap glükonaszturciin), addig az E3 sokkal kisebb aktivitást mutatott, és akkor is csak azután, hogy a növekedése leállt (0,606 mM/nap szinigrin; 0,030 mM/nap glükonaszturciin). Ugyanazon törzsek sokkal kevésbé különböztek az indolos glükozinolátok bontása esetében (4i-j. ábra). Az E5 és E6 törzsek közötti különbségek kevésbé voltak kifejezettek az E1 és E3 törzsekhez viszonyítva. Az E5 és az E6 törzsek esetében a 9–10. nap körül elérték a stacioner fázist, de az E5 törzs már néhány nappal korábban megkezdte a glükozinolátok bontását. Amint az szinigrin bontása megkezdődött, hasonló sebességgel ment végbe az E5 és az E6 esetében is. A különbség sokkal szembetűnőbb volt a metiltio-alkil-glükozinolátok (4e-f. ábra) és az aromás glükozinolátok (4g-h. ábra) esetében. A kísérlet végére az E6 csak a tiometil-alkil-glükozinolátok koncentrációját csökkentette, de ez a csökkenés nem volt szignifikáns ($p > 0,05$), szemben az E5-tel ($p < 0,001$). Másrészt az E6 az E5-höz viszonyítva 1,72-szeres sebességgel bontotta a glükonaszturciint. Az E4 törzs az E5-E6-hoz hasonló viselkedést mutatott, különösen a metiltio-alkil- és aromás GSL-ek esetében (4e-h. ábra). Csak akkor bontotta le a GSL-eket, miután elérte a stacioner fázist. Az E2 törzs sokkal hatékonyabb volt az alifás GSL-ek bomlásában, mint a lassan növekvő E4–6 törzsek (4b-d. ábra). Azonban ez a törzs hasonló hatékonysággal bontja le az aromás és metiltio-alkil-GSL-eket (4e-h. ábra).

Nyilvánvalóan látszik az adatokból, hogy a különféle glükozinolát csoportok bontási sebessége más és más. Az indol GSL-eket tudták a legkevésbé bontani a gombák (4i-j. ábra), bár sokkal alacsonyabb koncentrációban voltak jelen, mint a főbb vegyületek. A többi osztályt (alifás, metitiolalkil és aromás) többé-kevésbé hasonló hatékonysággal bontották le.

A glükoszínolátok lebontására kevésbé voltak képesek a talajból izolált gombák, amiket izoláltunk. Ugyanezen 16 napos inkubálás és a minta előkészítés után azt kaptuk, hogy míg néhány talajgomba aktív volt, általánosságban a hatékonyságuk alacsonyabb volt, mint az endofitonoké (6. ábra). A tíz törzs közül négy az inkubációs periódus végére lebontotta az összes szinigrint (S1–2, S9–10); kettő csak részlegesen (S4, S6), míg négy nem volt képes metabolizálni a szinigrint (S3, S5, S7–8). A gombatörzsek szempontjából azt láthatjuk, hogy mind a bontani képes törzsek közül az S1 és S10 *Fusarium* fajokat jelöl, míg az S2 *Penicillium*, az S9 pedig *Aspergillus*. Ugyanígyen változatosságot mutat a részleges és a semmilyen metabolizációt nem mutató csoport is.

Más alifás GSL-k bontása valamivel kevésbé volt hatékony (6c-d. ábra). Annak ellenére, hogy képes bontani a szinigrint és az alifás GSL-eket, az S1 nem tudta hatékonyan lebontani az indolos GSL-eket (6i-j ábra). Ez hasonló az endofitonok esetében megfigyelt jelenséghez, de ez a metabolizációs sebesség kicsit nagyobb az S1 jelenlétében, mint az endofitonoknál.

A gomba eredetű tioglükózidáz/mirozináz enzimet már korábban leírták (Galletti et al., 2008; Reese et al., 1958; Smits et al., 1993; Wu & Meijer, 1999). Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez az enzimatis tevékenység meglehetősen elterjedt. A fentebb bemutatott potenciális glükoszínolát-bontási képesség kiváló példa arra, hogy a mikrobiális közösség hogyan változtathatja meg a növényi metabolomot különféle módokon. Az eredmények rávilágítanak a fajon belüli variabilitás fontosságára a növény-mikrobiom kölcsönhatások tanulmányozásakor (Robinson et al., 2000).



6. ábra A szinigrin és a minor glükozinolátok bomlása tormakivonaton a endofitonokkal (narancs) és talaj gombákkal (kék) végzett 16 napos inkubálás után. A következő glükozinolát alosztályokat mutatjuk be: a-d., Alifás; e-f, metiltioalkil; g-h, aromás; i-j, indol. Alábrák: a., szinigrin; b., glükokapin; c., glükokoklearin; d., glucobrassicin; e., glükoiiberin; f., glükoiбарin; g., glükotropaeolin; h., glükonaszturciin; i., glükobrassicin; j., 4-metoxi-glükobrassicin. Gombák: E1, *Fusarium oxysporum*; E2, *Macrophomina phaseolina*; E3, *Fusarium oxysporum*; E4, *Setophoma*

terrestris; E5, *Paraphoma radicina*; E6, *paraphoma radicina*; E7, *Oidiodendron cerealis*; C_0, kontrol (nulla idő); C_16, kontrol (16 naposan); S1-S10: a torma mintájával azonos helyszínen található talajgomba. Statisztikai teszt: Dunnett-teszttel, a végidőmintákat összehasonlítottuk a végidő-kontrollal ($n = 3$, ***, $p < 3 \cdot 10^{-6}$; **, $p < 3 \cdot 10^{-5}$ *, $p < 1,9 \cdot 10^{-4}$).

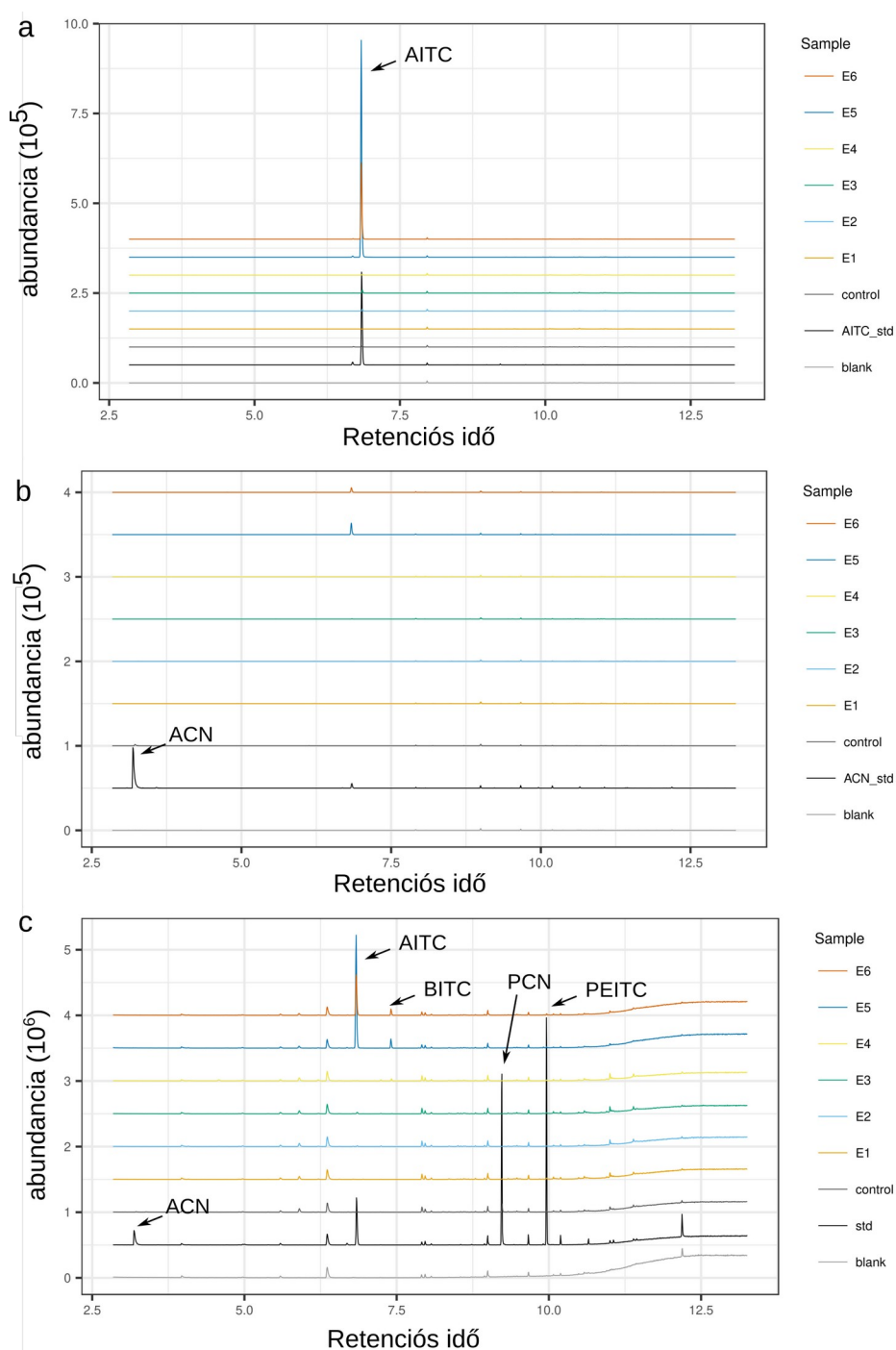
4.1.3. A bomlástermékek kimutatása

SPME-GC-MS használatával a szilárd torma táptalajon növe endofitonok fölött lévő gőztérből sikeresen mutattuk ki a szinigrinből keletkező allil-izotiocianátot, a glutation konjugátumot pedig LC-MS segítségével a táptalajból mutattuk ki.

A HRE-n való inkubáció utáni LC-MS adatokban először deszulfatált glükozinolátokra szűrtünk (Ratzka et al., 2002). A *Helix pomatia*-ból származó szulfatáz enzimet használtunk deszulfo-glükozinolátok gyártására, az enzim jól működött a tiszta glükozinolátokon, és a HRE-n is. A deszulfo-GSL-ek jellegzetes csúcsokat adnak pozitív ion módban az LC-MS-ben, de ezek a termékek nem voltak jelen az endofiton gombákkal inkubált HRE-ben.

Megkíséreltük a szinigrin vagy glükonaszturciin tipikus illékony bomlástermékeit, vagyis ITC-ket vagy nitrileket is kimutatni. Specifikus fehérjék vagy egyéb, az általánostól különböző körülmények hiányában a glükozinolátok bomlástermékei az izotiocianátok (1. ábra) (Wittstock & Burow, 2007), amelyek erősen mérgező gombaölő szerek (Azaiez et al., 2013; Wittstock & Burow, 2007; Wu & Meijer, 1999). Meglepő módon csak az E5 és az E6 esetében volt kimutatható az AITC a Petri-csésze légterében (7a. ábra). Az ITC teljes mennyiségének körülbelül 1,25% -a szabadult fel és került a gőztérbe a 6. napon E6 esetében 24 óra alatt. A másik négy szinigrin-bontó faj (E1-E4) esetében csupán nyomokban tudtunk kimutatni AITC-t a gőztérből (A mérés lebonyolításában Dr. Szikszai-Kiss Attila volt segítségünkre). A nitrilképződés az egyik módszer az ITC-k toxikus hatásainak kivédésére, amit egy *Aspergillus* törzsben is leírtak már (Galletti et al., 2008). Ennek

ellenére az allil-cianidot egyetlen mintában sem tudtunk detektálni (7b. ábra), ahogy a glükonaszturciin jelentősebb bomlástermékeit sem (7c. ábra), bár ez az AITC-hez és az allil-nitrilhez viszonyítva alacsony illékonyaságuk következménye is lehet. Az ITC-ket azonban csak szabad formában tudjuk detektálni a GC-MS technikával, mivel a konjugátumok nem illékonyak. Lehetséges, hogy az AITC a közegben csak és kizárólag konjugált formában volt jelen, mert egy másik tanulmányban már próbálták a szinigrint bontani *Citrobacter* segítségével, majd a folyékony táptalajt szerves oldószerrel való extrahálás után GC-MS-ben mérni, de ekkor sem sikerült illékony terméket kimutatni (Albaser et al., 2016).

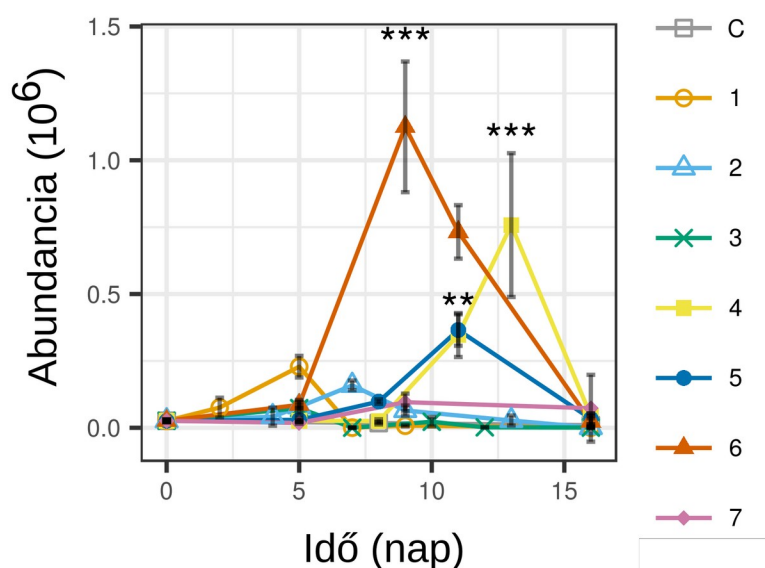


7. ábra Az endofiton gombák által a tormakivonatból felszabaduló illékony anyagok SPME-GC-MS kromatogramjai a szilárdított tormakivonaton történő növekedés során. Az illékony alkotóelemeket a szilárd táptalaj levegőjéből 24 órán keresztül adszorbeáltattuk aktív szénrel, majd metil-acetáttal eluáltuk a GC-MS méréshez. Rövidítések: ACN, allil-nitril; AITC, allil-izotiocianát; BITC, butil-izotiocianát-izomer (m/z 115, valószínűleg glükokoklearinból származik); PCN, fenilpropionitril; PeITC, 2-feniletil-izotiocianát. Alábrák: a., Allil-izotiocianát (SIM m/z 99); b., allil-cianid (SIM m/z 67); c., teljes ionkromatogram (TIC). Jelmagyarázat: blank, aktív szén eluátum (semmit nem adszorbeált); AITC_std, 100 $\mu\text{g/ml}$ allil-izotiocianát (standard); ACN_std, 100 $\mu\text{g/ml}$ allil-nitril (standard); control, tormakivonat gombaleoltás nélkül; E1-E6: torma endofiton gombák (a maximális abundanciával rendelkező napokon); std, standard keverék, allil-cianid, allil-izotiocianát, fenilpropionitril és 2-feniletil-izotiocianát (mindegyik 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$). A gombák színek kódja megegyezik a 4. ábra színek kódjával. Gombák: E1, *Fusarium oxysporum* (5. nap); E2, *Macrophomina phaseolina* (7. nap); E3, *Fusarium oxysporum* (6. nap); E4, *Setophoma terrestris* (6. nap); E5, *Paraphoma radicina* (6. nap); E6, *paraphoma radicina* (6. nap).

Mivel sok törzs esetében nem találtunk illékony bomlástermékeket, ezért célzottan kerestünk az LC-MS mérésekben lehetséges nem-illékony GSL-metabolitokat (CysGly-AITC, Cys-AITC, glutation-AITC). Egy csúcsot találtunk, mégpedig 405,0914 m/z , és 8,12 perc retenciós idő paraméterekkel. A vegyület egzakt tömege alapján GSH (glutation)-AITC konjugátum lehet. Szerkezetét *in vitro* standardakból készített GSH (glutation)-AITC konjugátummal igazoltuk, egy korábbi tanulmányunkban alkalmazott származékképzési reakció alkalmazásával (Gonda et al., 2016). A két vegyület azonos MS^2 -spektrumot és retenciós időt mutatott. Azon gombák táptalaja, amelyek gőzterében nem volt AITC, nagy mennyiségben mértünk ki GSH-AITC adduktot.

A nulla időponti kontrollhoz képest az E1 és az E2 táptalajaiban 8,77-szer és 6,07-szer több GSH-AITC adduktot tartalmaztak. Ennél sokkal nagyobb arányú a különbség az E4, E5 és az E6 esetében (29,14, 14,05 és 43,27-szeres növekedés, $p < 0,01$, Dunnett-teszt). Az E3 esetében nem növekszik a konjugátum mennyisége, ami valószínűleg a szinigrin lapos bomlási görbéje miatt lehet (5a., 8.

ábra). A GSH-AITC addukt jelenléte azt sugallja, hogy az ITC-k legalább részben a GSL konjugátumokként vannak jelen a gombákban. Az AITC spontán módon konjugálódik a gombák tiol-készletével (főleg GSH-val (Pócsi et al., 2004)), aminek egy részét a táptalajba eliminálja a gomba. Az ITC toxicitás növekszik, ha a gombák GSH-készlete elfogy (Bertóti et al., 2016), fokozva a fehérje -SH csoportok elleni támadást. Az addukt kis mennyiségének feltehetően az lehet az oka, hogy a GSH visszavétele igen gyors (8. ábra). A konjugáció lehet spontán, vagy glutathion-S transzferáz enzimek által segített (Bernardi et al., 2003; Zhang et al., 1995). Az AITC elleni toleranciát az *Alternaria brassicicola* nekrotróf gomba esetében a glutathion-S transzferázok és tioredoxinok szintjének emelkedésével magyarázzák (Sellam et al., 2007). A GSH-AITC konjugátum megjelenhet a táptalajban aktív efflux vagy a sejtek lízise következtében is.



8. ábra: Az allil-izotiocianát-glutathion-addukt koncentrációjának változása az endofitonok tormakivonaton való növekedésük során. Gombák: E1, *Fusarium oxysporum*; E2, *Macrophoma phaseolina*; E3, *Fusarium oxysporum*; E4, *Setophoma terrestris*; E5, *Paraphoma radicina*; E6, *paraphoma radicina*; E7, *Oidiodendron cerealis*; C, kontrol (nem lett gombával leoltva). Statisztikai teszt: Dunnett-teszttel, a legmagasabb koncentrációk (minden törzsönként eltérő) időpontját összehasonlítottuk a nulla időtartamú kontrollokkal ($n = 3$, ***, $p < 10^{-3}$; **, $p < 10^{-2}$; *, $p < 0,05$)

Még abban az esetben is, amikor a GSH-AITC konjugátumot detektáltuk, nagyobb mennyiségű szabad GSH volt kimutatható a táptalajból. Ez arra utalhat, hogy a GSH mennyisége nem fogy el ezen körülmények között, és/vagy egy aktív mechanizmussal a GSH nagy hatékonysággal képes regenerálódni. A szabad GSH jelenléte megmagyarázza a gombák életképességét a szinigrin bomlás (és AITC felszabadulás) során. Az is elképzelhető, hogy a GSH aktívan szekretálódik a táptalajba, de meglehet, hogy a molekulának csak igen korlátozott funkciói vannak az extracelluláris térben a gombák esetében (Pócsi et al., 2004). A GSH magas intracelluláris koncentrációját és gyors ciklikusságát már leírták (Albaser et al., 2016). Míg mások kimutatták, hogy a tisztított *Citrobacter* myrozináz a tiszta glükozinolátokat ITC-kké bontja, addig az AITC nem volt kimutatható a *Citrobacter* táptalajából, amely szinigrinen nőtt, mint kizárólagos szénforráson (Albaser et al., 2016). Valószínű, hogy a jelen vizsgálat endofiton gombái hasonló elvek alapján bontják a glükozinolátokat, mint az említett *Citrobacter* törzs. Természetesen az sem zárható ki hogy egy másik termék vagy konjugátum van jelen a rendszerben.

Összességében a tioglükozidáz aktivitás elmarad a már megfigyelt GSL-bontó képességtől (Galletti et al., 2008; Reese et al., 1958; Smits et al., 1993). A termék ITC volt, szabad vagy konjugált formában. Hasonlóan a *Citrobacter* enziméhez, amelyet vizsgáltak (Albaser et al., 2016), ezek az enzimek is alkalmazhatók glükozidázokként (vagy homológokként is), amelyek szubsztrátként elfogadják a tioglükozidokat is. A 5. és 6. ábra azt mutatja, hogy ezeknek a mikrobiális enzimeknek valószínűleg széles spektrumuk van: szubsztrátként elfogadják a legtöbb glükozinolátot, de a különböző GSL-eket eltérő sebességgel képesek bontani. Már ezelőtt is vizsgálták, hogy a különböző növényi mirozinázok milyen sebességgel képesek bontani a különféle oldalláncokat tartalmazó GSL-eket (Bernardi et al., 2003; Gonda et al., 2016) a *Citrobacter* mirozinázához képest (Albaser et al., 2016). Annak ellenére, hogy a gombák elég jól tolerálják a felszabadult ITC-t a HRE-n a növekedésük során, továbbra is vannak megválaszolatlan kérdések. A GLS-ek bontása a gombák esetében nem feltétlenül jelenti azt, hogy a növényi vegyületeket

képesek szelektíven felhasználni, ezért a szinigrint mint az egyetlen szénforrást használtuk, hogy a gombák növekedését teszteljük.

4.1.4. További, endofiton gombákon végzett kísérletek

4.1.4.1. Szinigrin, mint az endofiton és talaj gombák kizárólagos szénforrása.

Kizárólag szinigrint, mint szénforrást tartalmazó CzD táptalajon nevelve a gombákat, ki tudtuk mutatni, hogy, a szinigrint sok gombatörzs képes felhasználni. Ebben az esetben jelentősebb különbséget találtunk a talaj és az endofiton gombák között.

Meglepő módon a hét torma endofitonból négy képes volt felhasználni a szinigrint kizárólagos szénforrásként. A leghatékonyabb szinigrint bontó gomba képes volt mind a szinigrint, mind a glükózt felhasználni, mint szénforrást (E1). A talajgombákat is vizsgáltuk, itt tíz törzs közül csupán három volt képes felhasználni a szinigrint, mint kizárólagos szénforrást. Ez a típusú kísérlet specifikusabbnak tűnik, mint a GSL-ek bontása az endofitonok és a talajgombák elkülönítésére.

A kísérlet értékelésekor megállapítható, hogy az endofitonok nagyobb mértékben voltak képesek tápanyagként felhasználni a védekezésre szánt metabolitokat, mint a talajgombák.

4.1.4.2. Izotiocianátok általi növekedésgátlás

A növekedésgátlás nem tartozik szorosan a metabolomikai vizsgálataink közé, de bővebb betekintést enged a témába, és jól mutatja az endofitonok és talajgombák közötti különbséget. A viszonylag alacsony mennyiségű ITC sikeresen gátolta az összes vizsgált gombánk növekedését

folyékony tápközegekben. Ebben az esetben is különbséget láthatunk az endofitonok és a talaj gombás csoportja között: az endofitonok jobban tolerálták az ITC-ket. IC_{50} -értékeket mértünk, amik összehasonlításából kitűnik, hogy a gombák többsége sokkal jobban tolerálta az AITC-t, mint a PeITC-t: az IC_{50} -értékek közötti átlagos különbség 2,30-szoros volt. Megfigyelhető volt, hogy az endofiton gombák esetében szinte hiányoznak az AITC-re kifejezetten érzékeny gombák.

4.2. *Tilia platyphyllos*

A torma mellett a másik modellnövényünk a nagylevelű hárs, vagyis a *Tilia platyphyllos*. Ebben az esetben a növény feldolgozása és mérése alapján leginkább a fenolos anyagaira koncentrálna az így kinyerhető teljes metabolomját szeretnénk volna vizsgálni nem kiemelve egy-egy vegyületet sem, vagyis egy nem célzott metabolomikai megközelítést alkalmaztunk. Jelen esetben a metabolitok változását az idő előrehaladtával szeretnénk volna monitorozni a teljes növényi mátrix esetében. Ezen tanulmányhoz standardizált gyűjtési és tárolási metódusokat kellett kidolgoznunk, ami lehetővé tette a stabil állapotban levő metabolom későbbi torzítás nélküli analitikai vizsgálatát.

Ezen gyógynövény esetében, az aktív komponenseket tartalmazó virágzatot (hagyományosan) szinte kizárólag virágzás során gyűjtik össze. Mivel *Tilia platyphyllos* különböző képleteivel eddig több tanulmány is foglalkozott, de ezek esetében is a virágzat a leggyakrabban vizsgált szerv, ezért fontosnak tartottuk, hogy a gyógyászati szempontból is releváns murvalevelet önamgában is tanulmányozzuk, ami a drog tömegének nem elhanyagolható mennyiségét adja, ráadásul ez a képlet a botanikai virággal ellentétben, ami 7-14 napig elérhető fajtól függően, több, mint 100 napig jelen van. Kifejezetten a murvalevelet csak pár tanulmány járta körül részletesebben (Karioti et al., 2014; Toker et al., 1999). Egy korábbi tanulmány külön hasonlította össze a különböző szervek flavonoid tartalmát (Toker et al., 2001). A rokon fajokat, mint a *Tilia cordata* Mill és a *Tilia americana* var. *A*

mexicana (Schltdl) Hardin-t részletesebben vizsgálták a *Tilia platyphyllos*-nál. Számos további cikk jelent meg a különböző *Tilia spp.* virágzatának kémiai összehasonlításáról, vagy *Tilia spp.* más fajokkal való összehasonlításáról (Neirynck et al., 2000; Toker et al., 1999; Yıldırım et al., 2000).

A hárs virágzata lényeges szerepet tölt be a gyógynövényeink körében, hiszen a kislevelű hárssal (*Tilia cordata*) együtt alkotják a Tiliae flos-t, ami a jelenleg is hatályban lévő magyar és európai gyógyszerkönyvben is megtalálható hivatalos drog. Ezt a drogot már régóra használják elsősorban meghűléses betegségek esetén, de a népi gyógyászat szerint gyomorbántalmak esetén, és immunstimulánsként is alkalmazható.

A *Tilia platyphyllos* murvaleveleit több, mint száz napon keresztül gyűjtöttük, szárítottuk, majd metanolos kivonás után LC-ESI-MS készülékkel lemértük (A mérés lebonyolításában Dr. Cziáky Zoltán és Sinka László volt segítségünkre), az adatokat pedig XCMS Online segítségével elemeztük.

A különböző kritériumoknak megfelelő szűrés után (egy metabolitnak az összes időpontban homogénnek kellett lennie az illeszkedés szempontjából akár nulla, akár nem nulla értékekről legyen szó, a maximális nyers intenzitásnak 10^5 -nél nagyobbnak kellett lennie, az adott vegyület maximális intenzitásának 100-szor magasabbnak kellett lennie, mint, amennyit a kontroll tartalmazott továbbá az adduktokat és izotópokat félautomata módon távolítottuk el) 504 vegyületet tudtunk az adatszettből kinyerni, amik közül az MS² adatok alapján 51-et tudtunk azonosítani (3. táblázat). Számos flavonoidot, köztük kempferol-, kvercetin- és luteolin-glikozidokat, valamint katechinszármazékokat, kumarinszármazékokat és kinasavszármazékokat azonosítottunk, néhány nem-fenolos vegyülettel egyetemben (Mulroney et al., 1995).

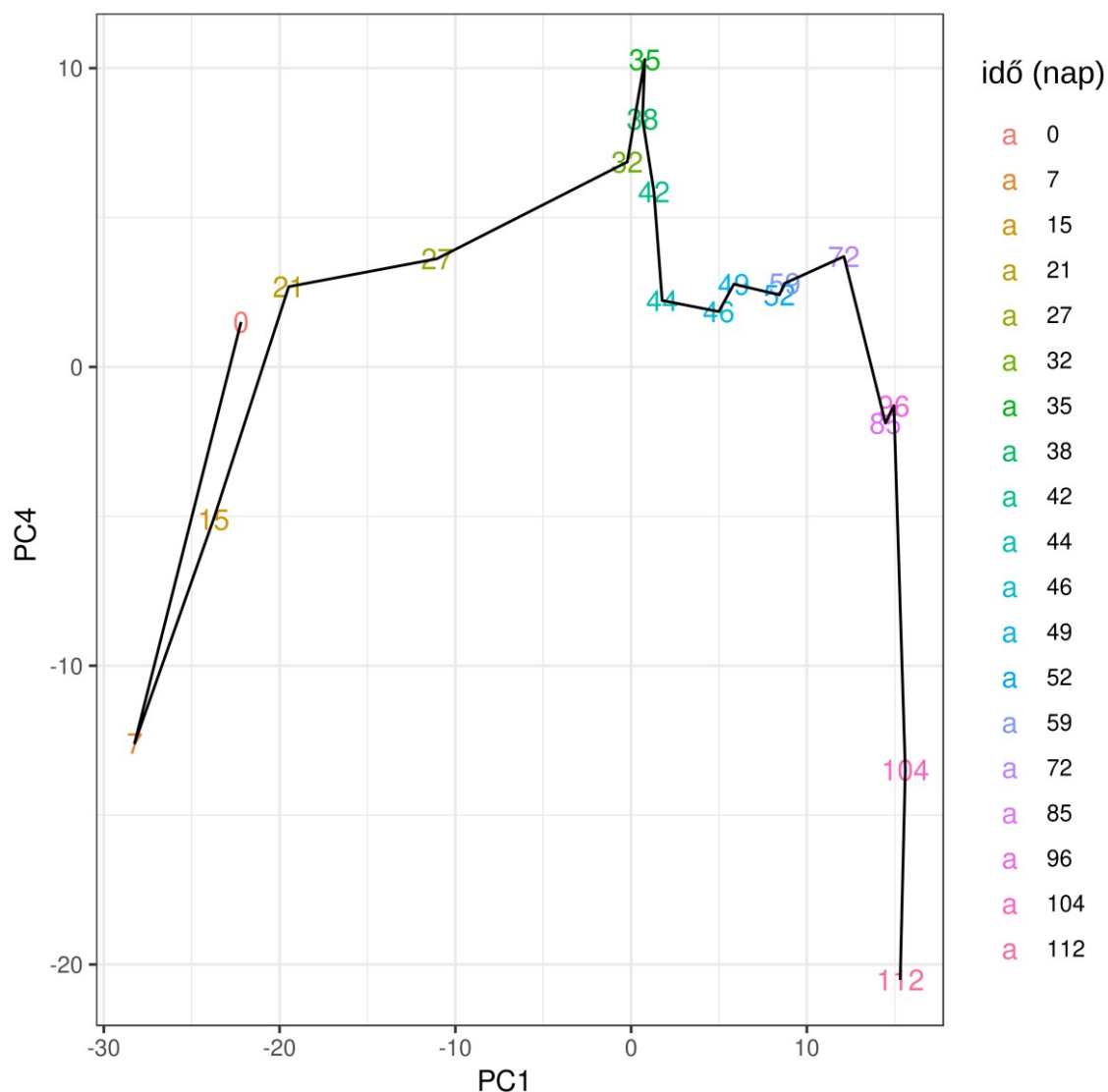
ID	Vegyület neve	[M-H] ⁻	Rt (perc)	Osztály	kl.	Referencia
1	Dihexozid	341.1084	1.006	A	2	M
2	Kínasav-származék 1	373.1238	1.02	B	1	MSA, P, SR
3	Kínasav-dihexozid-származék 1	533.1714	1.023	B	4c	MSA, P, SR
4	Kínasav	191.055	1.04	B	6b	MSA, P, SR
5	Kínasav-hexozid	353.1084	1.04	B	3	MSA, P, SR
6	Kínasav-hidroxikínasav konjugátum	383.1190	1.04	B	6b	MSA, P, SR
7	Kínasav-származék 3	406.0199	1.04	B	3	MSA, P, SR
8	Kínasav-származék 4	421.096	1.04	B	3	MSA, P, SR
9	Kínasav dimer	365.1083	1.057	B	6b	MSA, P, SR
10	Procianidin dimer (B típus) 1	577.1352	8.239	D	6a	K
11	Eszkületin-származék	385.0776	8.421	C	4c	P
12	(+)-Katechin	289.0717	8.712	D	5b	Standard
13	Katechin-származék	335.0772	8.712	D	5b	K
14	Klorogénsav	353.0877	8.8	B	5b	Standard
15	Hidroxi-koniferil alkohol-hexozid	357.1188	8.962	B	1	MSA, P, SR
16	Fraxin	369.0823	9.269	C	1	P
17	Procianidin dimer (B típus) 2	577.1347	9.377	D	1	K
18	(-)-Epikatechin	289.0716	9.625	D	6a	Standard
19	kumaroil-kínasav 1	337.0927	9.64	B	6b	MSA, P, SR
20	Taxifolin-hidroxikinoil-hexozid	655.1515	9.838	D	6b	K, V
21	Kvercetin-hexozid-deoxihexozid	609.1458	9.856	D	6b	K, V
22	Procianidin trimer (C típus)	865.1984	9.856	D	6a	K
23	Kvercetin-deoxihexozid-származék	615.1115	9.944	D	6b	K, V
24	Kvercetin-dihexozid	625.1407	9.944	D	6b	K, V
25	Kvercetin-deoxihexozid-pentozid	579.1352	9.961	D	6b	K, V
26	Kínasav-származék 6	461.1664	9.97	B	1	MSA, P, SR
27	kumaroil-kínasav 2	337.0927	10.048	B	6b	MSA, P, SR
28	Kvercetin-deoxihexozid-származék 1	725.1932	10.1	D	4b	K, V
29	Kvercetin-dideoxihexozid	593.1503	10.117	D	6b	K, V
30	Kvercetin-deoxihexozid-pentozid- származék 2	661.1385	10.13	D	6b	K, V
31	Luteolin-deoxihexozid-pentozid	563.1399	10.135	D	6b	K, V
32	Kvercetin-deoxihexozid-pentozid- származék 1	629.1275	10.135	D	6b	K, V
33	Taxifolin-kinoil-hexozid	639.1562	10.135	D	6b	V
34	Rutin	609.1458	10.14	D	6b	Standard
35	Luteolin-deoxihexozid-származék 4	679.1516	10.328	D	6b	K, V
36	Kempferol-dideoxihexozid- pentozid	709.1982	10.346	D	4b	K, V
37	Kempferol-deoxihexozid-dihexozid	755.204	10.346	D	4b	K, V
38	Luteolin-deoxihexozid-származék 5	613.1770	10.364	D	1	K, V
39	Kempferol-dideoxihexozid	577.1553	10.398	D	6b	K, V
40	Luteolin-deoxihexozid-származék 3	613.1326	10.398	D	6b	K, V
41	Luteolin-deoxihexozid-származék 1	645.1428	10.398	D	6b	K, V
42	Eriodiktiol-hexozid	449.1083	10.432	D	4c	K, V

43	Kvercetin-hexozid	463.0880	10.467	D	5a	K, V
44	Kvercetin-pentozid	433.0770	10.679	D	5a	K, V
45	Kvercetin-származék	501.0646	10.679	D	5a	K, V
46	Procianidin A2	575.1061	10.702	D	-	Standard
47	Kvercitrin	447.0926	10.817	D	5a	Standard
48	Tetrahidroxikalkon-hexozid	433.1135	10.904	D	4c	K, V
49	Kempferol-pentozid	417.0824	10.938	D	5b	K, V
50	Isoramnetin-3-glükózid	477.1034	11.18	D	5b	Standard
51	Luteolin-származék	499.0854	11.186	D	5b	K, V
52	Kempferol-deoxihexozid	431.0979	11.717	D	6b	K, V

3. táblázat: Különböző fenológiai stádiumokban lévő *Tilia platyphyllos* murvalevelekből származó standarddal igazolt és feltételezetten azonosított vegyületek. Az azonosítás a felsorolt hivatkozásokon és standardokkal történő összehasonlításra alapul. Osztály rövidítések: A, szacharidok; B, kinasav-származékok; C, kumarinok; D, flavonoidok (beleértve a katechineket és procianidineket). Hivatkozások: K, (Karioti et al., 2014); M, (Mulroney et al., 1995); MSA, (Mohd Shukri & Alan, 2010); P, (Parejo et al., 2004); SR, (Sánchez-Rodríguez et al., 2012); V, (Vukics & Guttman, 2010).

4.2.1. Szezonális variabilitás a *T. platyphyllos* murvaleveleiben

Az általános metabolomváltozást ábrázoltuk egy PCA biplot ábrán (9. ábra), ahol PC1 és PC4 ($p = 8.12E-24$, $p = 3.95E-4$, ANOVA) mutatja legjobban a metabolomban a legjelentősebb változást a virágzás előtt, amely a 0–14. nap között, a murvalevél intenzív növekedési szakaszában jelentkezett (11, 12, 14, 15. ábra). A fiatal szervben (0–21. nap közötti időszak) a metabolom rendkívüli módon különbözik a virágzás és a későbbi fejlődési szakaszok metabolomjától. A metabolom a virágzás során viszonylag stabil, amelyet a termésnövekedés során jellemző változás követ, és nagyon eltér attól, amely a murvalevél növekedése során történt. Mivel a 9. ábra az egész változás variációjának csak kis részét fedti le (9.68% és 5.85%), célszerűbb az alábbiakban a különböző nagyobb klaszterek kinetikáját részletesebben megvizsgálni.



9. ábra A *Tilia platyphyllos* murvalevelének metabolitjainak átlagolt PCA ábrája (PC1 és PC4). Az egy mintavételi időpontból származó négy fa mintáját átlagoltuk, és különböző színekkel (és számokkal (napok száma)) ábrázoltuk. Megjegyzendő, hogy a PC4 tengely mentén a korai növekedési szakaszban (0–21. Nap) és az öregedés (72–112. Nap) szakaszban történik jelentős változás, míg a PC1 mentén a virágzás előtt (21–32. Nap) tapasztalható ilyen.

Az idő és az egyes fák hatásainak jelentőségét ANOVA modellben vizsgáltuk minden egyes vegyületre külön-külön. Bonferroni korrekció után ($n=504$) 241 vegyületről derült ki, hogy szignifikánsan ($p < 9,92E-5$) változik időben (ez a vegyületek 47,82%-a). Ezek közül 202 (40,07%) magas szignifikancia szintet mutat ($p < 1,98E-6$). A fák közötti különbség az összes vizsgált

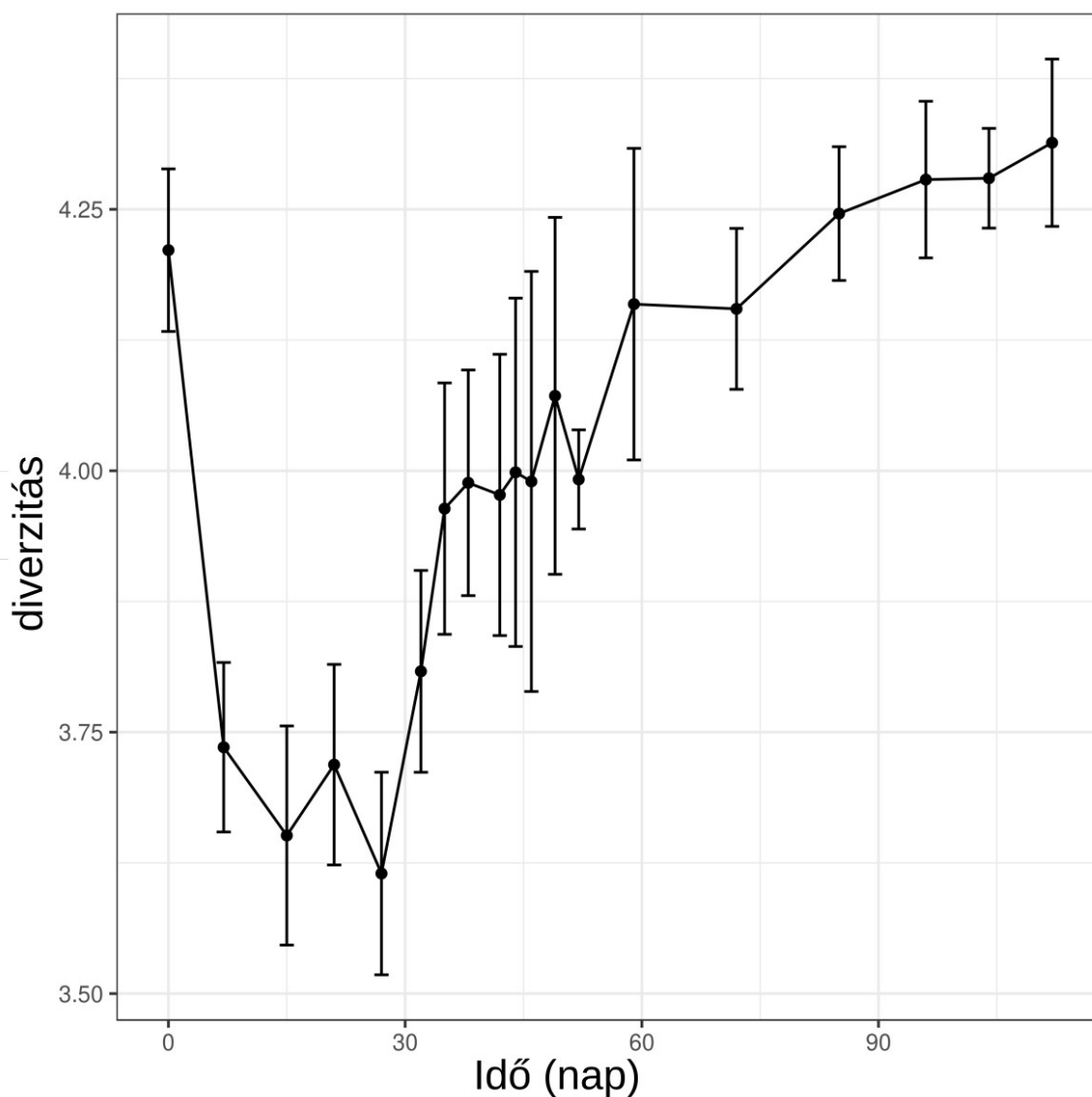
metabolit 6,34%-ában volt szignifikáns ($n=32$). Egy 15 metabolitból álló csoport (2,97%) szignifikáns különbségeket mutatott ($p < 9,92E-5$) a fák és a mintavételi idő között is.

A növényi szövetekben a szezonális variabilitást vizsgáló tanulmányok időbeli felbontása általában sokkal kisebb, mint a jelenlegi tanulmányban használt felbontás (Dai et al., 2015; Vagiri et al., 2015; Valares Masa et al., 2016; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2016), így azok nem elegendőek számos tendencia megfelelő felismeréséhez. Például (Salminen et al., 2004; Tuominen & Salminen, 2017) szerint a jelenségeket nem tudták volna leírni, ha csupán havonta egyszeri mintavétel lett volna. A nem célzott metabolomikai megközelítés ki lett egészítve azzal, hogy néhány vegyület standardjából kalibrációs egyenest tudtunk készíteni (Cosmulescu et al., 2014), ami további információkkal szolgált (Dai et al., 2015).

Korábbi tanulmányok már megmutatták, hogy a különböző korú szövetek metabolomja lényegesen különbözik egymástól a *Quercus sp.* leveleiben (Salminen et al., 2004), a *Geranium sylvaticum*-ban (Tuominen & Salminen, 2017) és a *Cistus ladanifer*-ben (Valares Masa et al., 2016).

4.2.2. A metabolitok diverzitása és klaszterezése

A metabolom diverzitását általában nem veszik figyelembe a szezonális metabolit-változásokat vizsgáló tanulmányok. A jelen munkában a Shannon-indexet használtuk a metabolom diverzitás mérésére, ahogy (Peters et al., 2018) is tették. Amint az 10. ábrán látható, a kezdeti metabolom sokkal változatosabb összehasonlítva a növekedési fázissal: sok vegyület eltűnik a szervfejlés első hetében. Ezt követően lassú növekedés figyelhető meg, mivel új vegyületek jelennek meg, de a kezdeti összetettséget csak a termés kifejlődése után éri el.



10. ábra A *Tilia platyphyllos* murvalevelének metabolitjainak átlagolt Shannon diverzitási indexe a fejlődése során.

Az adatok klaszterezését (van den Berg et al., 2006) R 3.5.0-ban végeztük, hogy különböző metabolitszoportokat kapjunk hasonló időbeli koncentráció-kinetikával. Négy nagy trendet tudtunk azonosítani, amit a vegyületek nagy vonalakban követnek; 1. nincs szignifikáns változás, 2. alacsony kezdeti koncentráció, amely később növekszik, 3. magas kezdeti koncentráció, amely később csökken, és 4. átmeneti növekedés a murvalevél növekedési vagy virágzás előtti fázisában. A csoportosítás tehát a vegyületek koncentrációjának időbeni változásainak hasonlóságán és eltérésén alapul. Az adatszettet hierarchikus csoportosításnak vetettük alá, és azonos magasságban

klaszterekre vágással, 6 klaszter jött létre, amelyek hasonló változásokat mutattak a fejlődési időszak alatt, de közül néhány klaszter tovább osztható alcsoportokra (11. ábra, 12. ábra). Több klaszter különféle osztályba tartozó fenolos vegyületeket tartalmazott (flavonoidok, kinasav-zármazékok) (3. táblázat). (Tuominen & Salminen, 2017) munkájával összhangban megállapíthatjuk, hogy a különféle metabolitcsoportok eltérő tendenciákat mutathatnak az idő függvényében. Fontos azonban hozzátenni, hogy az egy metabolit osztályba tartozó vegyületek is mutathatnak eltérő szezonális tendenciákat, mint például a *Quercus* sp. Esetében is (Salminen et al., 2004).

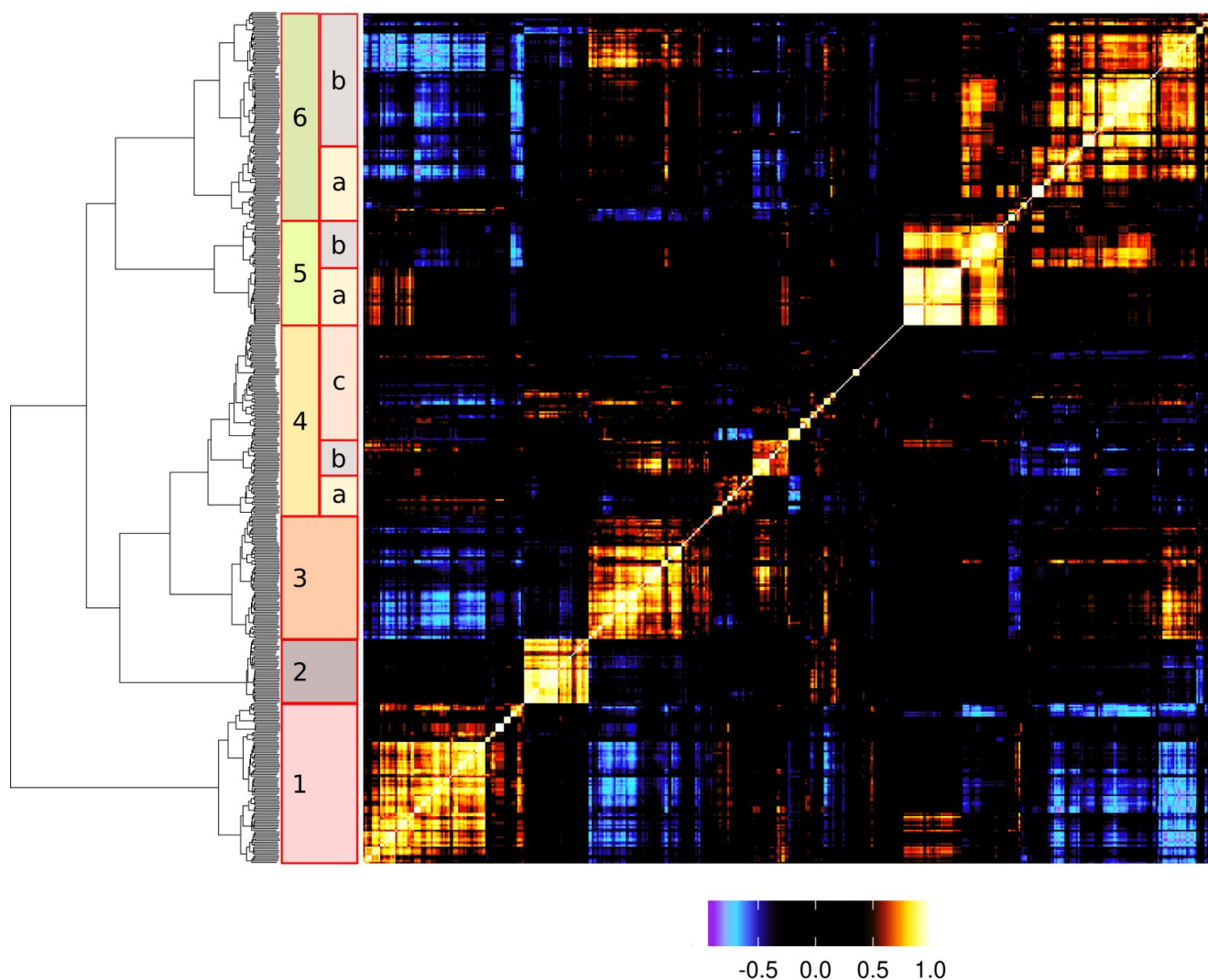
A későbbiekben a klasztereket nem sorban, hanem a bennük található trendeknek megfelelően mutatjuk be, a könnyebb értelmezhetőség miatt. A vegyületek könnyebb azonosíthatósága miatt a 3. táblázatban szereplő ID-t félkövérrel is mindig megjelenítjük illetve erre is hivatkozunk a következőkben.

4.2.2.1. A fejlődés során koncentráció-változást nem, vagy kis mértékben mutató metabolitok

Számos vegyület nem mutatott szignifikáns szezonális variabilitást ($p > 9.92E-5$). Ezek többsége a 2., 4. és 5a. klaszterbe tartozik.

A 2. klaszter primer metabolitokat tartalmaz (dihexozid (**1**)), nem azonosítottunk másodlagos metabolitokat ebből a klaszterből (3. táblázat). Ennek a csoportnak a szintjei átmeneti csökkenést mutatnak a murvalevél expanziója során, és csökken akkor is, amikor a murvalevelek öregedése megkezdődik (ami ellentétes a késői metabolom diverzitásának növekedésével), de általánosan elmondható, hogy szintjük állandó a szövetben (12. ábra).

A monoszacharidok változatos kinetikát mutatnak a *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii* (Riipi et al., 2002) leveliben, ott minden monoszacharid más és más fenológiai stádiumban mutat maximum értéket, ami eltér az általunk talált dihexozid kinetikájától.

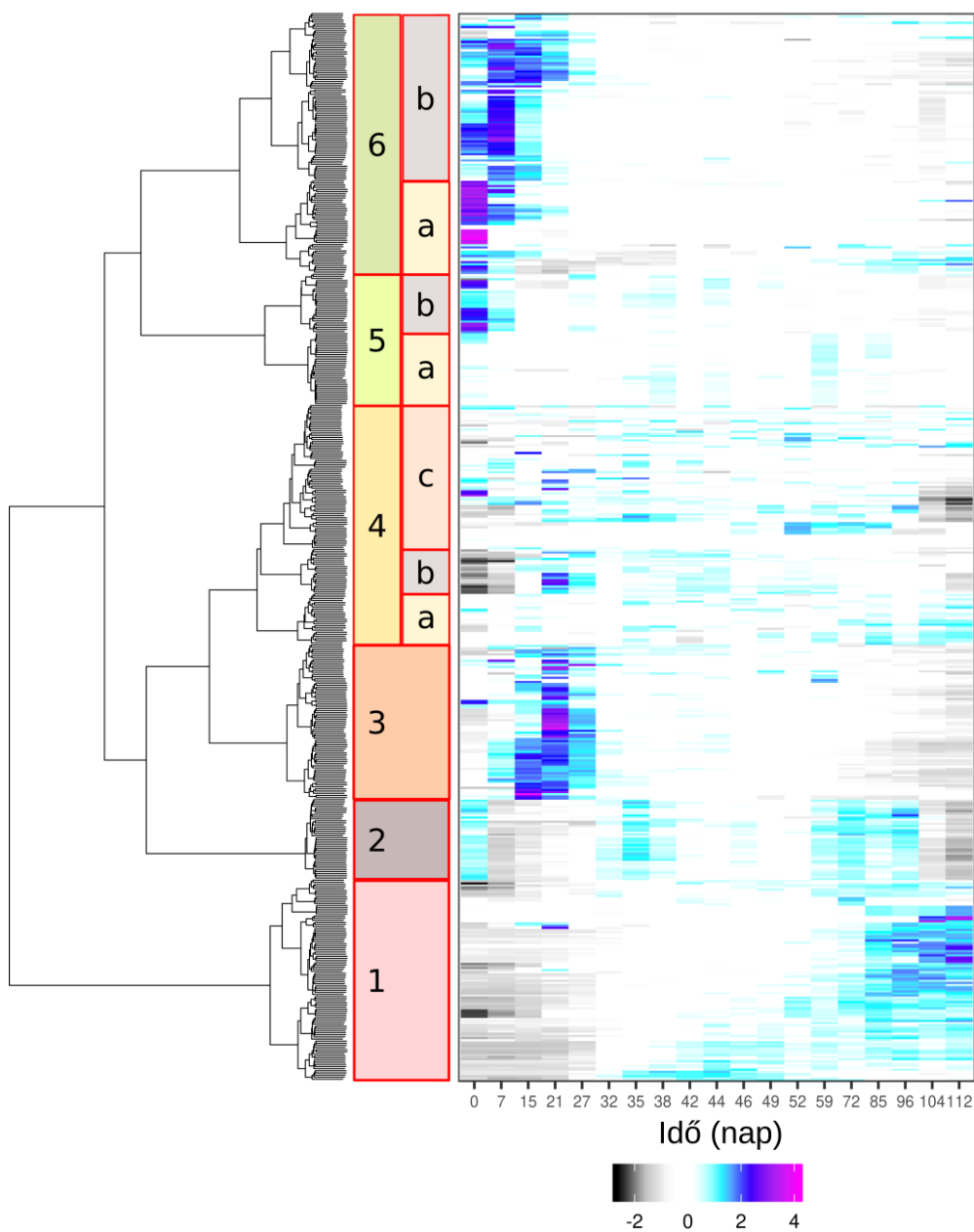


11. ábra. A *Tilia platyphyllos* murvaleleveliből származó 504 metabolit szűrt, skálázott és központosított adatszettjének Pearson-korrelációs hő térképe a szerv élettartama alatt. A színes téglalapok számozása és betűi a klaszterek számát, illetve az alcsoportokat mutatják.

Hasonló csoport a 4-5a. Klaszterek, amely egy lazán kapcsolódó csoport, sok azonosított fenoloiddal. Ezen csoportok metabolitjainak koncentrációi nagyságrendileg ugyanabba a tartományba esnek a szerv teljes élettartama alatt (12. ábra, 13(d). ábra és 3. táblázat), a változások nem voltak szignifikánsak ($p > 9.92E-5$). Egy alcsoport (4b.) alacsony koncentrációkat mutat a fiatal

szövetekben, ami két hét alatt nagy fokú emelkedésen megy át, majd lassú csökkenést mutat a későbbiekben (12. ábra, kempferol-dezoxihexozid-dihexozid (37, 4b. klaszter, 13a. ábra). A 4-5a. klaszterek flavonoid glikozidokat tartalmaznak, mint például kempferol-diglikozidokat (37, 36, 4 klaszter), pentozidokat (kvercetin-pentozid (44, 5a. klaszter)), hexozidot (kvercetin-hexozid (43, 5a. klaszter)) és deoxihexozidot. (kvercetin (47, 5a. klaszter), 13d. ábra), kalkon-hexozidot (48, 4. klaszter) és egy kumarin-származékot (eszkuletin-származék, 11, 4. klaszter).

A kvercetin-glikozidok markáns jelenlétét kimutatták már a *Quercus sp.* levelekből (Salminen et al., 2004), de ezek tendenciája különbözött a többi flavonoid glikozidokétól. A össz-fenoloidmennyiség viszonylag gyengén csökkenő tendenciája mögött az egyes metabolitok szintjén azért számos változás történt (Salminen et al., 2004). Az idő függvényében a fenoloid vegyületek összességében viszonylag stabil képet mutattak a *Betula sp.* leveleiben (Riipi et al., 2002). A *Ribes* levelekkel foglalkozó tanulmányban (Vagiri et al., 2015) számos flavonoid (kvercetin-rutinozid és kvercetin-malonil-glükózid) csupán gyenge tendenciákat tudott produkálni.



12. ábra: A *Tilia platyphyllos* murvaleleveliből származó 504 metabolit relatív abundanciájának hő térképe a szerv élettartama alatt, hierarchikus csoportosítás alapján rendezve, a változás kinetikája alapján. Metabolit-alapú, autoskálázott adatok kerülnek bemutatásra: a kvantitatív változást az időbeli átlagértékhez viszonyítva mutatjuk be (amely 0-ként jelenik meg). A színes téglalapok számozása és betűi a klaszterek számát, illetve az alcsoportokat mutatják.

4.2.2.2. A fejlődés során koncentráció-növekedést mutató metabolitok

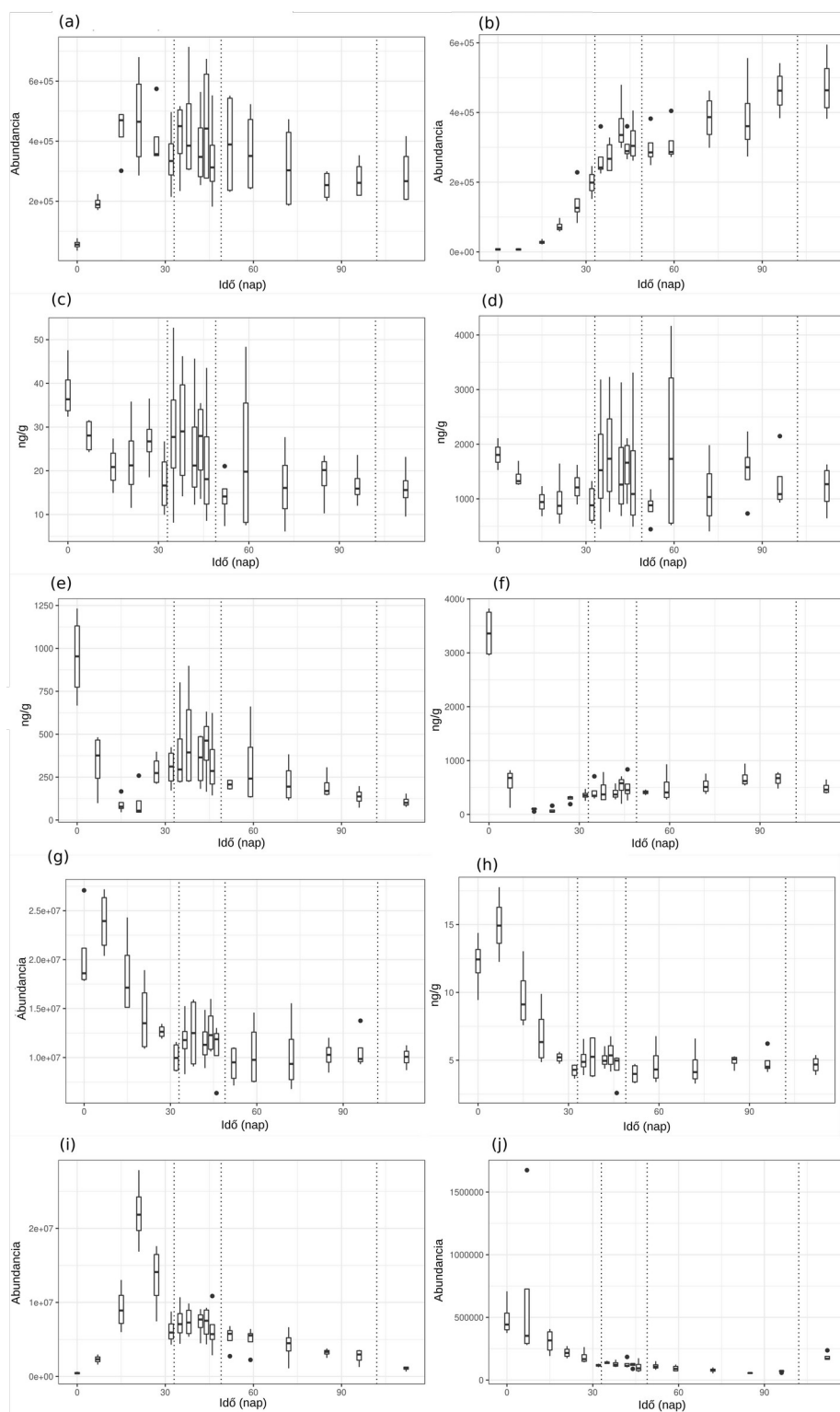
Az 1. klaszter egy kompakt pontfelhő, egy vegyületcsoport, amihez néhány vegyület laza korrelációval kapcsolódik (11. ábra). Az 1. klaszter kompakt csoportjának vegyületei alacsony mennyiségben vannak jelen a fiatal szövetben, de koncentrációjuk jelentősen növekszik a murvalevél növekedése során, és változatlan marad a virágzás és a termés növekedése során (12. ábra), bár egyes metabolitok esetében a koncentráció változása a virágzás befejezése után is folytatódik (12. ábra). A legtöbb metabolit esetében a változás statisztikailag szignifikáns ($p < 9,92E-5$). Ez a klaszter bioszintetikus út szempontjából változatos csoport, mivel tartalmaz egy kén-sav-származékot (26), egy kumarint (fraxin (16), 13b. ábra), és egyéb fenilpropanoidot (hidroxi-coniferil-alkohol-hexozid (15)). A fraxin általunk megfigyelt szezonális változása ellentétes azzal, amelyet (Marrelli et al., 2014) a *Ficus carica* leveleknél a kumarin esetében megfigyeltek.

4.2.2.3. A fejlődés során koncentráció-csökkenést mutató metabolitok

Az 5b.-6a. klaszterek felelősek a metabolom hirtelen változásának jelentős részéért a murvalevél fejlődésének első 14 napjában, valamint az 5b. klaszterbe tartozó vegyületek határozzák meg a fiatal murvalevél vegyületeinek karakterisztikáját. A korai szakaszban nagyon magas a vegyületek koncentrációja, ami a későbbi, fejlődési szakaszokra lecsökken. Maximális koncentrációjuk a 0. napon volt, majd gyors, statisztikailag szignifikáns csökkenés történt 7-14 napon belül ($p < 9,92E-5$). Például a (-)-epicatechin (18) koncentrációja körülbelül tizedére csökkent (13f. ábra) az első két hétben. A 14. naptól kezdve ezen vegyületek koncentrációi gyakorlatilag állandóak maradtak a murvalevél élete során. Ezen csoport tagjai között több monoglikozidot is találtunk. A flavonoidok közül pedig a flavonol típusú aglikonokat tartalmazók domináltak (3. táblázat): kempferol-pentozid

(**49**, 5b. klaszter)) és izorhamnetin-3-glükozid (**50**, 5b. klaszter, 13c. ábra) sorolhatóak ide például. Ez a csoport tartalmaz számos katechint ((+)-katechin, (**12**, 5b. klaszter, 13e. ábra), (-)-epikatechin (**18**, 6a. klaszter, 13f. ábra)), egy katechinszármazékot (**13**, 5b. klaszter), egy procianidin dimert (**10**, 6a. klaszter) és egy procianidin trimert (**22**, 6a. klaszter), valamint klorogénsavat (**14**, 5b. klaszter).

A különféle fajok fiatal szerveiben korábban is megfigyeltek már a nagy mennyiségű cserzőanyagot, mint procianidint és katechint. A *Quercus sp.* (Salminen et al., 2004), esetében az összfenoloid-mennyiség, mint az egyes kempferol-glikozidok és hidrolizálható tanninok mennyisége az általunk tapasztalt tendenciát követte: a fiatal szövetekben magasabb a mennyiségük, ami ezután csökkenő tendenciát követ. Ugyanezt a jelenséget figyelték meg a *Juglans regia* különböző fajtái esetében is (Cosmulescu et al., 2014). A nagy mennyiségű katechin-bioszintézis oka az lehet, hogy a fiatal, tápanyagban gazdag szövetet megvédje a növény a növényi kártevőktől és a patogén mikroorganizmusoktól addig, amíg az összetettebb bioszintetikus útvonalak be nem indulnak (Falasca et al., 2014).



13. ábra. Négy *Tilia platyphyllos* fáról származó murvalevelek kiválasztott metabolit-koncentrációinak változásai, LC-ESI-MS-vel mérve. Az “y” tengely vagy a koncentráció száraz tömegre viszonyítva (ahol rendelkezésünkre állt standard), vagy a nyers abundancia. A pontozott függőleges vonalak elkülönítik a főbb fenológiai fázisokat: a murvalevél növekedésének fázisa, virágzási fázis, termésfejlődési fázis és az öregedési fázis. Azokat a vegyületeket, amelyekre vonatkozóan standard állt a rendelkezésünkre, csillaggal '*' jelöltük. Alábrák: (a) kempferol-

deoxihexozid-dihexozid (37, 4b., klaszter); (b) fraxin (16, 1. klaszter); (c) izorhamnetin-3-glükozid* (50, 5b. klaszter); (d) kvercitrin* (47, 5a. klaszter); (e) (+)-katechin* (12, 5b. klaszter); (f) (-)-epikatechin* (18, 6a. klaszter); (g) kvercetin-dideoxi-hexozid (29, 6b. klaszter); (h) rutin* (34, 6b. klaszter); (i) kinasav-hexozid (5, 3. klaszter); (j) kempferol-deoxihexozid (52, 6b. Klaszter).

4.2.2.4. A fejlődés során átmeneti koncentráció-növekedést mutató metabolitok

A 3. és 6b. klaszterek alkotják ezt a csoportot, amelyben a vegyületek (6. klaszter, 12. ábra) alacsony koncentrációban vannak jelen a 0. napon (6b. klaszter), vagy hiányoztak (3. klaszter). Ezt az állapotot a vegyületek koncentrációjának átmeneti növekedése követte, majd a virágzás kezdetétől fogva az ezekbe a klaszterekbe tartozó vegyületek nem mutattak egyértelmű tendenciát: viszonylag alacsony koncentrációban voltak jelen végig a termésképződés és annak növekedése során (12. ábra). Ezen vegyületek nagy része esetében szignifikánsan kimutatható variabilitás látszik ($p < 9,92E-5$). Ez a trend éppen ellentétes az 1. klaszterben megfigyelttel (nagyon alacsony mennyiségű a virágzás előtt), ennél fogva erős negatív korreláció figyelhető meg a két csoport között (11. ábra).

A 6b. alcsoportban a vegyületek maximális koncentrációja a 7-21. nap között volt, míg a 3. klaszter vegyületeinek koncentrációja 21-32 nap között érte el maximumát (közvetlenül a virág nyílása előtt). Ez a csoport a flavonoidok és a kinasav-származékok nagy diverzitását mutatta. A flavonok (luteolin), flavánonolok (taxifolin) és a flavonolok (kvercetin, kempferol) elsősorban glikozidokként vannak jelen ebben az esetben: az összes diglikozid flavonoidot és szinte az összes deoxihexozidot cukrot tartalmazó vegyület a 6b. alcsoportba sorolódott (13c-d. ábra, 3. táblázat). A luteolin-glikozidok közé tartoznak a luteolin-deoxihexozid származékok (35, 41, 40, 6b. klaszter) és a luteolin-deoxihexozid-pentozid (31, 6b. klaszter). A kvercetinszármazékokat egy kvercetin-dideoxihexozid (29, 6b. klaszter, 13g. ábra), egy kvercetin-dihexozid (24, 6b. klaszter), számos

kvercetin-deoxihexozid-pentozid származék (25, 30, 32, 6b. klaszter), egy kvercetin-deoxihexozid származék (23, 6b. klaszter), valamint egy kvercetin-hexozid-deoxihexozid (21, 6b. klaszter) és a rutin (34, 6b. klaszter, 13h. ábra) képviseli. A kempferol-glikozidok közül egy kempferol-deoxihexozid (52, 6b. klaszter, 13j. ábra) sorolható ide. Kínasav-fenilpropanoid konjugátumok szintén ezt az időbeni lefutást mutatják (két kumaroil-kínasav izomer (19, 27, 6b. klaszter), egy kínasav-hidroxikínasav konjugátum (6, 6b. klaszter, 3. táblázat), egy kínasav-hexozid (5, 3. klaszter, 13i. ábra) és két kínasavszármazék (7, 8, 3. klaszter). A kínasav a fenilpropanoid szintézisútvonal közbelső metabolitja is egyben (Fraser & Chapple, 2011), ennél fogva a flavonoidok bioszintézisének prekursora. A flavonoidban gazdag virág kinyílása előtti felhalmozódásuk (Toker et al., 2001) arra utalhat, hogy a murvalevél a később virágba transzportálódó vegyületek gyártását és raktározását végzi a virágzásig. Egyes vegyületek koncentrációja nagyjából ötödére csökken le (például a rutin (34, 13h. ábra). Az ilyen vegyületek tisztítása elkerülhetetlenné tenné a mintavételi idő optimalizálását, mivel mint látható, néhány napos időeltérés nagy koncentrációbeli különbségeket eredményez.

A trendek és a változások arányai nagyon hasonlítanak a *p*-kumaroil-kínasav-származékok és a gallotanninok szezonális változásaira a *Betula sp.* levelek esetében (Riipi et al., 2002). Kevésbé látványos ideiglenes koncentráció-növekedést figyeltek meg ugyanazon fajoknál az összes flavonoid-glikozid és azok egyes részhalmozásaiban (Riipi et al., 2002). A *Juglans* levelekben a rutinkoncentráció mutatott hasonló tendenciát: mennyisége növekedett a növekedési időszakban, majd a szintjének esése követett be (Cosmulescu et al., 2014). Ugyanez a jelenség volt megfigyelhető a rutin és a quercitrin esetében különböző almafajtáinak leveleiben (Usenik et al., 2004).

4.2.2.5. A fenoloidok kinetikájának összehasonlítása más fajok szerveivel

Noha a fenti változásokat néhány mondatban nem könnyű összefoglalni, és jelentős fajok közötti különbségek is lehetnek (Raal et al., 2015), egyes jelenségek egyértelműen azt mutatják, hogy a murvalevél metabolomja - annak ellenére, hogy része a generatív hajtásnak – különféle fajok vegetatív leveleinek metabolomjához hasonló kinetikát mutat. Mind a murvalevél, mint más fajok leveleit közvetlenül össze lehet hasonlítani, mivel fotoszintetizálnak, és a murvalevél fenolos összetétele nagyban hasonlít a levelek összetételére, és különbözik a *T. platyphyllos* botanikai virágainak összetételétől, ahogy (Toker et al., 2001) munkájában is megfigyelhetjük.

Először is, a fiatal murvalevél sokkal gazdagabbnak tűnik metabolitokban, mind a diverzitás, mind a mennyiség szempontjából. Hasonló jelenségeket figyeltek meg a katechinek és a procianidinek esetében a *Betula pendula* leveleiben (Raal et al., 2015), valamint a *Quercus* sp. (Salminen et al., 2004) esetében. A leggyorsabb változások a szerv növekedése során történtek, mint (Salminen et al., 2004) tanulmányában is. Ezért a szövet életkora a bioaktivitás kvalitásait figyelembe véve rendkívüli jelentőséggel bírhat, főleg, ha a változások ilyen gyorsak és nagyok: emlékezzünk arra, hogy a virágzás előtt három vegyületcsoport eléri a maximális koncentrációt. Ezek a vegyületek maximumukat a 0. napon mutatják, vagy a 7–21. nap között, vagy közvetlenül a virágzás előtt (21–32. nap) érik el. Sőt, ezek a különböző dinamikák viszonylag állandó általános védekezést szolgáló vegyület-koncentrációként is vizsgálhatóak lennének, amit úgy általában antioxidáns vagy teljes polifenolos vizsgálattal vizsgálnánk. Salminen et al. (2004) szerint a teljes polifenoltartalom durva számszerűsítése egyébként nem mond semmit az egyes vegyületek mennyiségi változásáról.

4.2.3. A lehetséges alkalmazások, következmények

Mivel a metabolom különböző fenológiai stádiumokban eltérő, ezért eltérő bioaktivitásokra, valamint felszívódási és eloszlási kinetikára számíthatunk, amint azt a *Lippia thimoides* (Silva et al., 2016) példája is mutatja.

Például a kumarinokhoz kapcsolódó bioaktivitások valószínűleg jobbak lesznek a későbbi fenológiai szakaszokban, míg a kinasav-származékok a virágzás előtt vannak a legmagasabb koncentrációban jelen.

A flavonoidok valamilyen formában mindig jelen vannak a murvalevélben, bár az egyes vegyületek koncentrációi jelentősen eltérnek. Ahogy általában a növényekben, a flavonoidok elsősorban glikozid formában vannak jelen (Karioti et al., 2014; Toker et al., 2001), amelyeket az emberi gyomor-bélrendszerben is jelenlévő bélbaktériumok deglikozilálnak (Kim et al., 1998; Macdonald et al., 1983), vagy a humán vékonybélből származó β -glikozidáz enzimek bontanak (Németh et al., 2003). A flavonoidokról úgy tudjuk, hogy aglikonként abszorbeálódnak, amint azt a kvercetin esetében már bizonyították (Crespy et al., 2002). Ezután az emberi plazmában konjugált metabolitként vannak jelen (Graefe et al., 2001). Úgy gondoljuk, hogy leginkább ez utóbbi formák felelősek a farmakológiai hatásokért is. A tiszta flavonoid aglikonok farmakokinetikája nem mindig feleltethető meg a növényi kivonatban találhatóakénak (Wang et al., 2011), nem is beszélve arról, hogy ugyanazon aglikonnak különféle glikozidjai vannak (például ramnozidok és béta-glükozidok) (Gonzales, 2017). A fiatal murvalevél gazdag flavonoid diglikozidokban és más flavonoidokban, amelyek idővel kevésbé jelentősek, míg a monoglikozidok koncentrációja viszonylag állandó marad. Röviddel a virágzás előtt és röviddel utána a murvalevél metabolomja rendkívüli hasonlóságot mutat a virágzáskori állapottal, ami a fő betakarítási időszak.

A bemutatott adatok azt sejtetik, hogy a murvalevelek valószínűleg magas bioaktivitást mutatnak a virágzási időn kívül is, és valószínűleg ettől eltérő bioaktivitást mutatnak más fenológiai stádiumokhoz képest. Ez akkor is igaz, ha 1) az azonosítatlan vegyületek bioaktivitását nem vettük figyelembe; 2) a vegyületek többségének mennyisége csupán becslés a nyers adatok alapján, így

valószínűleg pontatlanságot okoz a különféle vegyületek mérési érzékenységének eltérése; valamint 3) az esetleges szinergizmusokat ez a rendszer nem veszi figyelembe.

Könnyen felismerhető, hogy a különféle metabolitok eltérő kinetikát mutatnak, új vegyületek későbbi megjelenése és a vegyületek kimutatási határ alá csökkenése sem ritka eset. A metabolom viszonylag stabil képet mutat a szokásos gyűjtési periódus alatt, de vannak olyan fejlődési szakaszok, amikor már néhány nap is jelentős eltéréseket okozhatnak. Igen érdekes, hogy az általános metabolom diverzitásának csökkenését lehet megfigyelni az idő múlásával, a legkevésbé diverz állapot pont a virágzás előtt van: Az 504 metabolit közül 224-nek ekkor volt a legmagasabb a koncentrációja, és ezt a diverzitást később sem kompenzálja a 1. klaszterben a vegyületek koncentrációjának növekedése (12. ábra). Vagyis a legtöbb flavonoid diglikozid, katechinszármazék és flavonoid deoxihexozid nagyobb mértékben van jelen a fiatal murvalevelekben, mint a virágzás során.

A legtöbb azonosított flavonoid sokkal nagyobb koncentrációban volt jelen a murvalevelekben a fiatalabb szövetben, mint a virágzás során (11-12. Ábra, 13f-h. ábra). Ezek alapján várható, hogy ezek a (bizonyos) flavonoid aglikonok specifikus farmakológiai hatásuk várhatóan a fiatal murvalevelekben lesz a legmagasabb.

5. Összefoglalás

Munkánk sikerrel alkalmazta a metabolomikai megközelítést a célkitűzésben feltett kérdések megválaszolására. A munkán belül meg tudunk különböztetni célzott és nem célzott metabolomikai megközelítést is. Előbbire jellemző, hogy néhány vegyület vagy vegyületcsalád változásait, követi nyomon, jelen esetben az *A. rusticana*-ban található GLS-MYR-ITC vonalat követve a glükozinolátok és izotiocianátok interakcióit vizsgáltuk endofiton gombákkal. A nem célzott megközelítést pedig a *T. platyphyllos* esetében alkalmaztuk, amikor a metabolom időbeli változásait nem egy-egy vegyületen vagy vegyületcsaládon vizsgáltuk, hanem a kivonatban lévő összes, az alkalmazott műszeres analitikai eljárással kimérhető, jórészt fenolos metaboliton.

A fitokémiai tudományos irodalomban is jelentős a metabolomika, ahol több területen is alkalmazzák. Ilyen alkalmazási terület a gyógynövények standardizálása, metabolomikai alapon való elkülönítése vagy az orvostudomány irányába tendáló vérből vagy vizeletből való gyógynövénykomponensek kimutatását célzó kutatások. Ezen tanulmányokban egyaránt alkalmaznak célzott és nem célzott metabolomikai megközelítést (Ahmad et al., 2020; Manach et al., 2009; Pandey et al., 2016; Xiang et al., 2011).

Jelen munka során az *Armortia rusticana* és a *Tilia platyphyllos* vizsgálatát végeztük el célzott és nem célzott metabolomikai megközelítéssel, és mind a metabolit-endofiton gomba interakció vizsgálatára, mind a murvalevél kémiai mintázat-változásának megfigyelésére igaz, hogy a metabolomikai megközelítés igen hasznosnak bizonyult. Főbb eredményeinek az alábbiak.

Az *Armortia rusticana* esetében a fő következtetésünk az volt, hogy az endofiton gombák aktív interakcióban állnak a gazdanövényvel glükozinolát-mirozináz-izotiocianát (GLC-MYR-ITC) rendszerben. Az adatok alapján valószínűsíthető, hogy az endofitonok kimutathatóan adaptálódtak a gazdanövény gombaellenes szekunder metabolitjaihoz. Ez az alkalmazkodási képesség ugyanis bizonyos mértékben megkülönböztette az endofiton gombákat az ugyanazon talajban található

talajgombáktól, mint azt különböző kísérleti megközelítéseket alkalmazva megmutattuk: az endofitonok a talajgombákhoz képest jobban tolerálták az allil-izotiocianátot; nagyobb arányuk volt képes a glükoszínolát bontására; nagyobb arányuk volt képes felhasználni a szinigrint, mint kizárólagos szénforrást. Az eredmények azt mutatják, hogy nem lehet egyértelmű határvonalat húzni a gyökérből származó endofitonok és az ugyanazon talajból származó gombák között, ám ennek ellenére kimutatható különbségek vannak. A jelen eset hasonlít ahhoz, amit az endofitonokból és a talaj gombákból származó új természetes vegyületek arányának összehasonlításakor tapasztaltak (Schulz & Boyle, 2005). Az eredmények nagyon jól illeszkednek az endofiton kontinuum megközelítéshez: az endofitonok számos ponton lehetnek jelen egy funkcionális gradiens mentén. Ugyanakkor a most leírt jelenségek például szolgálnak olyan mechanizmusokra, amelyekkel a növények a gyökérben élő mikrobiom összetételét képesek irányítani a vegyületeik által. A gyökérben talált endofitonok valószínűleg a talajgombák egy részhalmaza, amelyek rendelkeznek olyan biokémiai potenciállal, amik lehetőséget adnak, hogy a növény gyökereit kolonizálják. Az előnyük a talajgombákhoz képest többek között abban áll, hogy a növény által termelt védekező vegyületeket képesek nagyobb mértékben tolerálni. Ha a gomba eredetű mirozináz *in planta* expresszálódik, míg a növény még egészséges, akkor ez egy lehetséges mechanizmus, amellyel az endofitonok csökkentik a *Brassicaceae* fajok betegségeinek előfordulását. Ugyanezen változásokhoz vezethet, ha a növény mikrobiomját az endofitonok szabályozzák a növényt védő aktív metabolitok felszabadításával. Ez egy olyan tény, amely révén az endofiton gombák képesek más oldalról megközelíteni a növény kémiai védelmi rendszerét. A gomba eredetű mirozináz alkalmazásával a gombák hatástalaníthatják a növény által előkészített, glükoszínolátból készült kémiai bombát, amelynek a növény gyökerének megfertőzésekor lehet szerepe.

Nem elhanyagolható tény, hogy a tormát kolonizálni képes endofiton gombák kiszoríthatják az egyébként patogénként funkcionáló egyéb mikroorganizmusokat, ezáltal védhetik magát a növényt

is. Ezen tény ismeretében maga a növény sokkal védettebb, egészségesebb. Ha feltételezzük, hogy más, a gyógyászatban használt növények esetében is hasonló mechanizmus játszódik le, miszerint a növényekkel együtt élő endofitikus gombák segítenek a patogének elleni küzdelemben, ezáltal egészségesebb lesz a növény, ami akár magasabb hatóanyaghozamot is jelenthet. Ennek tekintetében nem elhanyagolható a növények endofiton gombáinak szelekciója és esetlegesen ezen adaptációt és bioaktív vegyületek termelését elősegítő gombákkal való direkt fertőzésének vizsgálata sem.

Ebben az esetben a tormát, mint növényt jótékony hatásai miatt fogyasztjuk, de az általa termelt bioaktív metabolitok mikrobaellenes hatása mellett nem lehet elmenni, főleg amiatt, hogy a vegyületekhez nem adaptálódott törzsek érzékenyebbek ezen anyagokra. Számos humán patogén mikroorganizmus van jelen a környezetünkben, ami ellen hatásosnak bizonyulhat a használata, így az az általuk okozott fertőzések is csökkenthetők.

Tilia platyphyllos esetében a murvalevél a „Tilia flos” drog része, amelyet szinte kizárólag a virágzás során szoktak gyűjteni. A jelen munkánkban megállapítottuk, hogy a murvalevél a bioaktív fenolos vegyületek gazdag forrása lehet úgy a virágzás előtt mint után, bár a metabolitmintázat jelentősen eltérhet a különböző fejlődési stádiumokban. Különösen a murvalevél korai fejlődési szakaszát jellemzi a polifenolos vegyületek rendkívüli sokfélesége, a katechinszármazékok és a flavonoid-glikozidok nagy mennyisége. A termésnövekedés késői stádiumában magasabb a fraxin koncentráció, a kinasav és egyes származékainak koncentrációja. Ezek miatt maga a murvalevél potenciálisan terápiás értékű lehet nemcsak a virágzás során, hanem a fejlődés korai szakaszában vagy a termésnövekedés kései fenostádiumában is.

Mivel a vegyületek mintázata a különböző stádiumokban eltérő, így a biológiai hatások is függhetnek a fenológiai stádiumtól. Ez igaz különösen a kvercetin, a luteolin-glikozidok, a katechin származékok és ezek deoxiglikozidjainak mennyisége sokkal magasabb a korai fejlődési szakaszban, mint a virágzás során. Érezhető ezek alapján annak szükségessége, hogy optimalizáljuk

ezen növényi drog betakarítási idejét, ha különböző bioaktív komponensekre akarunk fókuszálni, különösen reprodukálható farmakológiai vizsgálatokhoz. Még egy hét is nagyban befolyásolhatja a növény másodlagos metabolitjainak mintázatát, amire számos, a tanulmányban standardként használt és putatíván azonosított vegyület példája rámutat. Így elgondolkodhatunk azon, hogy milyen, eddig a növényhez nem igazán kötött hatások várhatóak, ha nem a megszokott virágzási időszakban gyűjtjük be őket. Természetesen egy korai betakarítás hátránya az lehet, hogy maguk a murvalevelek kicsik, tömegük csekély, de ahogy láhattuk, a vegyületek diverzitása kifejezetten nagy, aminek előnye akár felülmúlhatja az előbbi problémát. Ilyen probléma nincs, ha a virágzás után gyűjtjük be a növényi részt, viszont a metabolitok időbeli változása miatt teljesen más pattern figyelhető meg, ami teljesen más farmakodinámiás hatást vetíthető előre.

A tanulmány konklúziója során láhattuk a metabolomikai megközelítés fontosságát, miszerint elfogadható, hogy akár egy növényi metabolit-endofiton gomba interakció, akár egy metabolom időbeni lefutása nem feltétlenül ítéltető meg egy-egy paraméter vizsgálata alapján.

A tanulmány során a célkitűzéssel összhangban leírt új eredmények:

Armoratia rusticana

- **Az endofitonok és a talajgombák képesek-e a glükozinolát (GLC) típusú vegyületek bontására?**

Mind az endofitonok, mind a talajgombák képesek voltak a glükozinolát típusú vegyületek bontására, de a két csoport különböző mértékben bontotta ezeket.

- **Ha képesek bontani a fentebb írt vegyületcsaládot, akkor ez a bontás milyen mértékű**

Azon túl, hogy képesek-e az egyes gombák bontani a metabolitokat, bizonyítottuk, hogy az E1 és az E2 törzsek teljes mértékben képesek bontani a glükozinolát vegyületcsalád tagjait, viszont az E7 nem volt képes erre. A talajgombák között csupán néhány volt képes a vegyületeket metabolizálni (S1, S2, S9, S10), de azok hatékonysága elmaradt az endofitonoktól.

- **A vegyületcsaládnak több különböző tagja van. A gombák képesek lehetnek mindet bontani, vagy kémiai szerkezet szerint diszkriminálnak?**

Mind az endofitonok, mind a talajgombák metabolizáló képessége függ a különböző oldallánccal rendelkező vegyületeket esetében. Az alifás, a metiltioalkil és aromás oldallánccal rendelkező vegyületeket hasonló hatékonysággal voltak képesek bontani az endofiton gombák. A talajgombák ezeket a vegyületeket szintén metabolizálták, de kevésbé hatékonyan. Ezekhez képest az indol oldallánccal rendelkező glüközinolátokat mind a talaj, mind az endofiton gombák kevésbé voltak képesek használni.

- **A GLC-k bomlásakor felszabaduló izotiocianátok (ITC-ket) fungicid hatását a gombák hogyan tolerálják?**

A glüközinolátok bontásakor felszabadult izotiocianátokat a gombák képesek voltak kezelni. Csupán az E5 és E6 esetében tudtunk légtérből AITC-t detektálni, a többi gomba esetében ez nem volt jellemző. A többi esetben sikerült kimutatnunk, hogy az ITC-k glutation konjugátumai vannak jelen, és feltételezhetően a gombák így védekeznek a vegyületek fungicid hatása ellen.

- **A GLC-k gombák általi bontását hogyan tudjuk monitorozni, a felszabadult, illékony ITC-ket milyen technikával tudjuk detektálhatóvá tenni?**

A gombák által felszabadított ITC-ket GC-MS műszerrel képesek voltunk detektálni, de a glutation konjugátumokat már nem. Ezeknek a detektálásához *in vitro* standardokból készítettünk glutation-AITC konjugátumot, amivel igazolni tudtuk ennek jelenlétét. Ezen konjugátumot már képesek voltunk LC-MS-ben mérni.

- **Kimutathatóak-e további interakciók a gombák és a vegyületcsalád között?**

További, a tanulmány szempontjából kisebb jelentőségű, de a gombák metabolomikai variabilitásának megértéséhez szorosan kapcsolódó kísérleteket is végeztünk. Ezek egyike

volt a szinigrin, mint kizárólagos szénforrás alkalmazása. Új eredményként le tudtuk írni, hogy az endofiton gombák sokkal hatékonyabban képesek a szinigrint, mint önálló szénforrást felhasználni annak ellenére, hogy a belőle felszabaduló AITC fungicid hatású. Ezt a fungicid hatást pedig mind AITC-re mind PeITC-re mint a torma fő hatóanyagaira elvégeztük, IC_{50} értékekkel szemléltetve.

- **A fentebb tárgyalt kísérletek alapján különböznek-e a torma eredetű endofitonok a talajgombáktól?**

A fentebb elvégzett kísérletek alapján kijelenthető, hogy a talajgombák és az endofitonok elkülöníthetők egymástól célzott, metabolomikai vizsgálatok alapján. Az elkülönítés specifikusabbnak tűnik ha a szinigrint, mint kizárólagos szénforrást felhasználó törzseket vesszük alapul az általánosabb GLS bontási hatékonyságnál.

Tilia platyphyllos:

- **A virágzat jelentős részét adó murvalevél metabolit mintázatát befolyásolja-e a betakarítási idő?**

A murvalevél beltartalmát jelentősen befolyásolja gyűjtésének ideje. Teljesen más metabolitok jellemzőek a murvalevél megjelenésekor és mások virágzás idején, valamint a termésképződés idején.

- **Abban az esetben, ha metabolitok mennyiségét befolyásolja a gyűjtés időpontja, akkor ezen metabolitok mennyisége időben hogyan változik?**

Tanulmányunkban bebizonyítottuk, hogy az időbeli lefutásnak több jellemző trendje van. Vannak vegyületcsoportok, amiknek a koncentrációja alig változik a teljes fejlődés során. Amelyek változnak, jellemzően vagy koncentráció növekedést vagy csökkenést, vagy átmeneti növekedést mutatott.

- **Az időbeli lefutás vizsgálata során lehet-e klaszterekbe, csoportokba sorolni a vegyületeket?**

A metabolitokat a dinamikájuk alapján 6 klaszterbe tudtuk sorolni, amik egy részét további alcsoportokra tudtunk bontani. A 2., 4., 5a. klaszterek nem igazán mutattak koncentráció-változást, míg a 3. és 6b. klaszterek átmeneti koncentrációnövekedést mutattak. Az 1. klaszter leginkább koncentráció növekedést mutatott, ezzel ellentétesen, vagyis csökkenést lehetett megfigyelni az 5a és a 6a klaszterek esetében.

- **Van-e olyan vegyületcsoport, ami nem a virágzás alatt, a szokásos betakarítási időszakon belül van jelen a legnagyobb mennyiségben?**

A tanulmány rávilágít arra a tényre, hogy a murvalevél esetében a vegyületek mennyisége nem a virágzás alatt éri el a maximumot. Több maximum időszak is kiemelhető, többek között a kezdeti, növekedési fázis, vagy közvetlenül a virágzás előtti időszak.

- **A vegyületcsoportok között van-e olyan csoport, aminek a teljes gyűjtési időszak alatt nem változik érdemben a mennyisége?**

Az előző pontokkal összhangban van olyan csoport, amelynek tagjainak koncentrációja érdemben nem változik. Ezen vegyületek a 2., 4. és 5a. klaszterekbe tartozik. A 4-5a csoportok elősorban flavonoid glikozidokat tartalmaznak. A 2. klaszterbe tartozik az egyedüli primer anyagcseretermék, egy dihexozid típusú vegyület.

- **A vegyületek szintjének változásának milyen következményei lehetnek?**

Ezen metabolitváltozásokat figyelembe véve a tanulmány alapján elképzelhető, hogy a murvalevelek különböző fenológiai stádiumaiak különböző farmakodinámiás hatást lehet tulajdonítani, hiszen a metabolitok mennyisége valamint változatossága azt mutatja ezen szerv esetében, hogy farmakológiai szempontból a legaktívabb az expanziós időszak.

5.1 Summary

Our work has successfully applied the metabolomic approach to answer the questions.

In the present study, we performed *Armoratia rusticana* and *Tilia platyphyllos* with a targeted and untargeted metabolomic approach, and both the metabolite-endophyte fungal interaction and the observation of the chemical pattern change in the bract were found to be very useful. The main results are as follows.

In the case of *Armoratia rusticana*, our main conclusion was that endophyte fungi are actively interacting in the glucosinolate-myrosinase isothiocyanate (GLC-MYR-ITC) system. Based on the data, it is likely that endophytes have been shown to adapt to antifungal secondary metabolites of the host plant. This adaptability distinguished endophyton fungi to some extent from soil fungi found in the same soil.

It is not a negligible fact that endophytic fungi that can colonize horseradish can displace other microorganisms that otherwise function as pathogens, thereby also protecting the plant itself. Knowing this fact, the plant itself is much more protected and healthier. Assuming that a similar mechanism occurs in other medicinal plants, this will make the plant healthier, which may even lead to higher drug yields. In this respect, the selection and examination of endophytic fungi of plants cannot be neglected.

In the case of *Tilia platyphyllos*, we found in our present work that bract can be a rich source of bioactive phenolic compounds both before and after flowering, although the metabolite pattern may differ significantly at different developmental stages. In particular, the early developmental stage of bract is characterized by an extraordinary variety of polyphenolic compounds, large amounts of catechin derivatives and flavonoid glycosides. Because of these, bract can be of potential therapeutic value both during flowering and in the early stages of development or late phenostasis of fruit growth.

Because the patterns of the compounds differ at different stages, the biological effects may also depend on the phenological stage. Based on these, one can feel the need to optimize the harvest time of this herbal drug if we want to focus on different bioactive components. Even a week can greatly affect the pattern of secondary metabolites in a plant.

In the conclusion of the study, we saw the importance of the metabolomic approach, according to which it is acceptable that either a plant metabolite-endophyton fungal interaction or the time course of a metabolome cannot be judged by examining a single parameter.

6. Irodalomjegyzék

- Agneta, R., Lelario, F., De Maria, S., Möllers, C., Bufo, S.A., Rivelli, A.R., 2014. Glucosinolate profile and distribution among plant tissues and phenological stages of field-grown horseradish. *Phytochemistry* 106, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.019>
- Agtuca, B.J., Stopka, S.A., Tuleski, T.R., do Amaral, F.P., Evans, S., Liu, Y., Xu, D., Monteiro, R.A., Koppenaal, D.W., Paša-Tolić, L., Anderton, C.R., Vertes, A., Stacey, G., 2019. In-Situ Metabolomic Analysis of *Setaria viridis* Roots Colonized by Beneficial Endophytic Bacteria. *MPMI* 33, 272–283. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-19-0174-R>
- Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, M.E., Martínez, A.L., Moreno, J., Kite, G., Terrazas, T., Soto-Hernández, M., 2010. HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of ethnopharmacology* 127, 91–97.
- Ahmad, R., Ahmad, N., Amir, M., Aljishi, F., Alamer, M.H., Al-Shaban, H.R., Alsadah, Z.A., Alsultan, B.M., Aldawood, N.A., Chathoth, S., Almoftly, S.A., 2020. Quality variation and standardization of black pepper (*Piper nigrum*): A comparative geographical evaluation based on instrumental and metabolomics analysis. *Biomedical Chromatography* 34, e4772. <https://doi.org/10.1002/bmc.4772>
- Albaser, A., Kazana, E., Bennett, M.H., Cebeci, F., Luang-In, V., Spanu, P.D., Rossiter, J.T., 2016. Discovery of a Bacterial Glycoside Hydrolase Family 3 (GH3) β -Glucosidase with Myrosinase Activity from a *Citrobacter* Strain Isolated from Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 1520–1527. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05381>
- Alberice, J.V., Amaral, A.F.S., Armitage, E.G., Lorente, J.A., Algaba, F., Carrilho, E., Márquez, M., García, A., Malats, N., Barbas, C., 2013. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. *Journal of Chromatography A* 1318, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.002>
- Ashaari, Z., Hajzadeh, mosa-al-reza, Hassanzadeh, G., Alizamir, T., Yousefi, B., Keshavarzi, Z., Mokhtari, T., 2018. The Flavone Luteolin Improves Central Nervous System Disorders by Different Mechanisms: A Review. *Journal of Molecular Neuroscience* 65. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1094-2>
- Azaiez, I., Meca, G., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., 2013. Antifungal activity of gaseous allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in vitro and their use for fumonisins reduction in bread. *Food Control* 32, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.020>
- Aziz, N., Kim, M.-Y., Cho, J.Y., 2018. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology* 225, 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>
- Badri, D.V., Zolla, G., Bakker, M.G., Manter, D.K., Vivanco, J.M., 2013. Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. *New Phytologist* 198, 264–273. <https://doi.org/10.1111/nph.12124>
- Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., Newall, C.A., 2007. Herbal medicines. Pharmaceutical Press London.
- Bernardi, R., Finiguerra, M.G., Rossi, A.A., Palmieri, S., 2003. Isolation and biochemical characterization of a basic myrosinase from ripe *Crambe abyssinica* seeds, highly specific

- for epi-progoitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2737–2744. <https://doi.org/10.1021/jf020796g>
- Bertóti, R., Vasas, G., Gonda, S., Nguyen, N.M., Szőke, É., Jakab, Á., Pócsi, I., Emri, T., 2016. Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *Journal of basic microbiology* 56, 1071–1079. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600082>
- Bones, A.M., Rossiter, J.T., 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67, 1053–1067. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.024>
- Bruggeman, I.M., Temmink, J.H.M., van Bladeren, P.J., 1986. Glutathione- and cysteine-mediated cytotoxicity of allyl and benzyl isothiocyanate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 83, 349–359. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90312-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90312-1)
- Chandramohan, G., S. Al-Numair, K., Alsaif, M., Veeramani, C., 2015. Antidiabetic effect of kaempferol a flavonoid compound, on streptozotocin-induced diabetic rats with special reference to glycoprotein components. *Progress in Nutrition* 17, 50–57.
- Choi, K.-D., Kim, H.-Y., Shin, I.-S., 2017. Antifungal activity of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against pathogenic dermal fungi. *Food Sci Biotechnol* 26, 847–852. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0104-4>
- Chowdhary, K., Kaushik, N., 2015. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141444>
- Conaway, C.C., Krzeminski, J., Amin, S., Chung, F.-L., 2001. Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 14, 1170–1176. <https://doi.org/10.1021/tx010029w>
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., 2014. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves. *Pharmaceutical Biology* 52, 575–580. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.853813>
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C., 2002. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* 50, 618–621.
- Dai, W., Qi, D., Yang, T., Lv, H., Guo, L., Zhang, Y., Zhu, Y., Peng, Q., Xie, D., Tan, J., Lin, Z., 2015. Nontargeted Analysis Using Ultraperformance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Uncovers the Effects of Harvest Season on the Metabolites and Taste Quality of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 9869–9878. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03967>
- de Gruyter, J., Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113, 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.002>
- Dénes, A., Papp, N., Babai, D., Czúcz, B., Molnár, Z., 2012. Wild plants used for food by Hungarian ethnic groups living in the Carpathian Basin. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 81, 381–396. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.040>
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P., 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11908–11913. <https://doi.org/10.1073/pnas.172398899>
- Doughty, K.J., Blight, M.M., Bock, C.H., Fieldsend, J.K., Pickett, J.A., 1996. Release of alkenyl isothiocyanates and other volatiles from *Brassica rapa* seedlings during infection by *Alternaria brassicae*. *Phytochemistry* 43, 371–374. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00189-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00189-6)

- El-Elimat, T., Figueroa, M., Raja, H.A., Graf, T.N., Swanson, S.M., Falkinham, J.O., Wani, M.C., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., 2015. Biosynthetically distinct cytotoxic polyketides from *setophoma terrestris*. *European Journal of Organic Chemistry* 2015, 109–121. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402984>
- Fabre, N., Poinso, V., Debrauwer, L., Vigor, C., Tulliez, J., Fourasté, I., Moulis, C., 2007. Characterisation of glucosinolates using electrospray ion trap and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 18, 306–319. <https://doi.org/10.1002/pca.983>
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5–51. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00316-2)
- Falasca, A., Melck, D., Paris, D., Saviano, G., Motta, A., Iorizzi, M., 2014. Seasonal changes in the metabolic fingerprint of *Juniperus communis* L. berry extracts by ¹H NMR-based metabolomics. *Metabolomics* 10, 165–174. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0566-1>
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Loscalzo, L.M., Granger, R.E., Johnston, G.A., Paladini, A.C., Marder, M., 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European journal of pharmacology* 539, 168–176.
- Fesel, P.H., Zuccaro, A., 2016. Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* 32, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.008>
- Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., 2002. Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* 23, 581–586.
- Fraser, C.M., Chapple, C., 2011. The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 9. <https://doi.org/10.1199/tab.0152>
- Galletti, S., Sala, E., Leoni, O., Cinti, S., Cerato, C., 2008. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a β -thio-glucosidase. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2170–2173. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.029>
- Gao, M., Wang, H., Zhu, L., 2016. Quercetin Assists Fluconazole to Inhibit Biofilm Formations of Fluconazole-Resistant *Candida Albicans* in In Vitro and in Vivo Antifungal Managements of Vulvovaginal Candidiasis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 40, 727–742. <https://doi.org/10.1159/000453134>
- Garcia, C.J., García-Villalba, R., Garrido, Y., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., 2016. Untargeted metabolomics approach using UPLC-ESI-QTOF-MS to explore the metabolome of fresh-cut iceberg lettuce. *Metabolomics* 12, 138. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1082-x>
- 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). *Phytochemical Analysis* 191–198. <https://doi.org/10.1002/pca.2615>
- Gonzales, G.B., 2017. In vitro bioavailability and cellular bioactivity studies of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts: questions, considerations and future perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society* 76, 175–181. <https://doi.org/10.1017/S0029665116002858>
- González Rodríguez, R., Cardentey García, J., 2016. Herbal medicine as a therapy in a doctor's office. *Rev Ciencias Médicas* 20, 182–187.
- 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 Diversity* 47, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0071-z>
- Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C.H., Kurczy, 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. *Analytical Chemistry* 86, 6931–6939. <https://doi.org/10.1021/ac500734c>
- Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M., 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 41, 492–499.
- Grelet, G., Martino, E., Dickie, I.A., Tajuddin, R., Artz, R., 2016. Ecology of ericoid mycorrhizal fungi: What insight have we gained with molecular tools and what's missing?, in: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. pp. 405–419. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch22>
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco* 56, 683–687.
- Gunatilaka, A.A.L., 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* 69, 509–526. <https://doi.org/10.1021/np058128n>
- Hallmann, J., Berg, G., Schulz, B., 2006. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms, in: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (Eds.), *Microbial Root Endophytes, Soil Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 299–319. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_17
- Hecht, S.S., 2000. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews* 32, 395–411. <https://doi.org/10.1081/DMR-100102342>
- Hibi, M., Takase, H., Iwasaki, M., Osaki, N., Katsuragi, Y., 2018. Efficacy of tea catechin-rich beverages to reduce abdominal adiposity and metabolic syndrome risks in obese and overweight subjects: a pooled analysis of 6 human trials. *Nutrition Research* 55, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.03.012>
- Hwang, E.-S., Hyong, J.L., 2006. Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep1 human hepatoma cells. *Experimental Biology and Medicine* 231, 421–430. <https://doi.org/10.1177/153537020623100408>
- Ioannou, Y.M., Burka, L.T., Matthews, H.B., 1984. Allyl isothiocyanate: Comparative disposition in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 75, 173–181. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90199-6)
- Ishimoto, H., Fukushi, Y., Yoshida, T., Tahara, S., 2000. Rhizopus and Fusarium are selected as dominant fungal genera in rhizospheres of Brassicaceae. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2387–2399. <https://doi.org/10.1023/A:1005583012561>
- Jabeur, I., Martins, N., Barros, L., Calhella, R.C., Vaz, J., Achour, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of Equisetum giganteum L. and Tilia platyphyllos Scop. *Food Funct.* 8, 975–984. <https://doi.org/10.1039/C6FO01778A>
- Jachak, S.M., 2006. Cyclooxygenase inhibitory natural products: current status. *Current medicinal chemistry* 13, 659–678.
- Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M., Escriche, I., 2014. Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Research International, Authenticity, Typicality, Traceability and Intrinsic Quality of Food Products* 60, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.045>
- Kang, H.-K., Ecklund, D., Liu, M., Datta, S.K., 2009. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis research & therapy* 11, R59.
- Karioti, A., Chiarabini, L., Alachkar, A., Fawaz Chehna, M., Vincieri, F.F., Bilia, A.R., 2014. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS analyses of Tiliae flos and its preparations. *J Pharm Biomed Anal* 100, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.010>

- Kashyap, D., Sharma, A., Tuli, H.S., Sak, K., Punia, S., Mukherjee, T.K., 2017. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. *Journal of Functional Foods* 30, 203–219. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.022>
- Kiddle, G.A., Doughty, K.J., Wallsgrave, R.M., 1994. Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *J Exp Bot* 45, 1343–1346. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.9.1343>
- Kim, D.H., Jung, E.A., Sohng, I.S., Han, J.A., Kim, T.H., Han, M.J., 1998. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 21, 17–23.
- Kim, H.-Y., Phan-a-god, S., Shin, I.-S., 2015. Antibacterial activities of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against Antibiotic-resistant bacteria. *Food Sci Biotechnol* 24, 1029–1034. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0131-y>
- Kissen, R., Rossiter, J.T., Bones, A.M., 2009. The “mustard oil bomb”: Not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews* 8, 69–86. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9109-1>
- Knurek, J., Buchaj, A., 2017. Chemotherapeutic and anticancer action of luteolin. *Onkologia i Radioterapia* 42, 31–38.
- Krul, C., Humblot, C., Philippe, C., Vermeulen, M., Van Nuenen, M., Havenaar, R., Rabot, S., 2002. Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis* 23, 1009–1016. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.6.1009>
- Lazzeri, L., Malaguti, L., Cinti, S., Ugolini, L., De Nicola, G.R., Bagatta, M., Casadei, N., D’Avino, L., Matteo, R., Patalano, G., 2013. THE BRASSICACEAE BIOFUMIGATION SYSTEM FOR PLANT CULTIVATION AND DEFENCE. AN ITALIAN TWENTY-YEAR EXPERIENCE OF STUDY AND APPLICATION. *Acta Hortic.* 375–382. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1005.44>
- Li, X., Kushad, M.M., 2005. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.03.015>
- Lian, F.-M., Pang, B., Zhang, Y., Liu, J., He, L.-S., Bai, Y.-J., Tong, X.-L., 2016. Prevention of type 2 diabetes with the Chinese herbal medicine Tianqi capsule: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, Chinese Diabetes Society meeting, Xiamen, 2016 4, S23. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30378-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30378-3)
- Loke, W.M., Proudfoot, J.M., Stewart, S., McKinley, A.J., Needs, P.W., Kroon, P.A., Hodgson, J.M., Croft, K.D., 2008. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.11.002>
- Luang-In, V., Narbad, A., Nueno-Palop, C., Mithen, R., Bennett, M., Rossiter, J.T., 2014. The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 58, 875–883. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300377>
- Luciano, F.B., Holley, R.A., 2009. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 131, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.005>
- Ludwig-Müller, J., 2015. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters* 37, 1325–1334. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1814-4>

- Luo, Y., Shang, P., Li, D., 2017. Luteolin: A Flavonoid that has multiple cardio-protective effects and its molecular mechanisms. *Frontiers in Pharmacology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00692>
- Lyu, M., Wang, Y., Fan, G., Wang, X., Xu, S., Zhu, Y., 2017. Balancing Herbal Medicine and Functional Food for Prevention and Treatment of Cardiometabolic Diseases through Modulating Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02146>
- Macdonald, I.A., Mader, J.A., Bussard, R.G., 1983. The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. *Mutation Research Letters* 122, 95–102. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(83\)90044-1](https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90044-1)
- Maldini, M., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., Natella, F., 2012. A liquid chromatography-mass spectrometry approach to study “glucosinoloma” in broccoli sprouts. *Journal of Mass Spectrometry* 47, 1198–1206. <https://doi.org/10.1002/jms.3028>
- Manach, C., Hubert, J., Llorach, R., Scalbert, A., 2009. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 1303–1315. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800516>
- Marrelli, M., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F., Conforti, F., 2014. Fatty acids, coumarins and polyphenolic compounds of *Ficus carica* L. cv. Dottato: Variation of bioactive compounds and biological activity of aerial parts. *Natural Product Research* 28, 271–274. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.841689>
- Marzocco, S., Calabrone, L., Adesso, S., Larocca, M., Franceschelli, S., Autore, G., Martelli, G., Rossano, R., 2015. Anti-inflammatory activity of horseradish (*Armoracia rusticana*) root extracts in LPS-stimulated macrophages. *Food Funct.* 6, 3778–3788. <https://doi.org/10.1039/C5FO00475F>
- McCann, M.J., Dalziel, J.E., Bibiloni, R., Barnett, M.P., 2015. An integrated approach to assessing the bio-activity of nutrients in vitro: The anti-oxidant effects of catechin and chlorogenic acid as an example. *Integr Food Nutr Metab* 2, 197–204.
- Mclean, C.B., Cunnington, J.H., Lawrie, A.C., 1999. Molecular diversity within and between ericoid endophytes from the Ericaceae and Epacridaceae. *New Phytologist* 144, 351–358. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00510.x>
- Mejía-Garibay, B., Palou, E., López-Malo, A., 2015. Composition, diffusion, and antifungal activity of black mustard (*Brassica nigra*) essential oil when applied by direct addition or vapor phase contact. *Journal of Food Protection* 78, 843–848. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-485>
- Mohd Shukri, M.A., Alan, C., 2010. Analysis of phenolics in *Anacardium occidentale* shoot extracts using a reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 38, 221–230.
- Mukherjee, P.K., Harwansh, R.K., Bahadur, S., Biswas, S., Kuchibhatla, L.N., Tetali, S.D., Raghavendra, A.S., 2016. Metabolomics of medicinal plants – a versatile tool for standardization of herbal products and quality evaluation of Ayurvedic formulations. *Current Science* 111, 1624–1630.
- Mulroney, B., C. Traeger, J., A. Stone, B., 1995. Determination of both linkage position and anomeric configuration in disaccharides by electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 30, 1277–1283. <https://doi.org/10.1002/jms.1190300911>
- Murphy, B., Batke, S., Doohan, F., Hodgkinson, T., 2015. Media Manipulations and the Culture of Beneficial Fungal Root Endophytes. *International Journal of Biology* 7, p94. <https://doi.org/10.5539/ijb.v7n3p94>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z., 2018.

- Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Neirynck, J., Mirtcheva, S., Sioen, G., Lust, N., 2000. Impact of *Tilia platyphyllos* Scop., *Fraxinus excelsior* L., *Acer pseudoplatanus* L., *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L. on earthworm biomass and physico-chemical properties of a loamy topsoil. *Forest Ecology and Management* 133, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(99\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(99)00240-6)
- Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.-G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A., 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0397-3>
- Nguyen, N.M., Gonda, S., Vasas, G., 2013. A Review on the Phytochemical Composition and Potential Medicinal Uses of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root. *Food Reviews International* 29, 261–275. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.790047>
- Nielsen, P.V., Rios, R., 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 60, 219–229. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00343-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00343-3)
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E.L.S., Van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition* 74, 418–425.
- Oerlemans, K., Barrett, D.M., Suades, C.B., Verkerk, R., Dekker, M., 2006. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry* 95, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.013>
- Oliveira, V.M., Carraro, E., Auler, M.E., Khalil, N.M., 2016. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. *Brazilian Journal of Biology* 76, 1029–1034. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07415>
- Pandey, R., Kumar Tiwari, R., Shankar Shukla, S., 2016. Omics: A Newer Technique in Herbal Drug Standardization & Quantification. *Journal of Young Pharmacists* 8, 76–81. <https://doi.org/10.5530/jyp.2016.2.4>
- Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., 2004. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3679–3687. <https://doi.org/10.1021/jf030813h>
- Patti, G.J., 2011. Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of Separation Science* 34, 3460–3469. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100532>
- Pérez-Ortega, G., Guevara-Fefer, P., Chávez, M., Herrera, J., Martínez, A., Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., 2008. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.007>
- Peters, K., Gorzolka, K., Bruelheide, H., Neumann, S., 2018. Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes. *Ecology and Evolution* 8, 9105–9117. <https://doi.org/10.1002/ece3.4361>
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* 16, 131–140.
- Pócsi, I., Prade, R.A., Penninckx, M.J., 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 49, 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
- R: The R Project for Statistical Computing [WWW Document], n.d. URL <https://www.r-project.org/> (accessed 1.15.20).
- Raal, A., Boikova, T., Püssa, T., 2015. Content and dynamics of polyphenols in *Betula* spp. Leaves naturally growing in Estonia. *Records of Natural Products* 9, 41–48.

- Rahman, S., Ul Haq, F., Ali, A., Khan, M.N., Shah, S.M.Z., Adhikhari, A., El-Seedi, H.R., Musharraf, S.G., 2019. Combining untargeted and targeted metabolomics approaches for the standardization of polyherbal formulations through UPLC–MS/MS. *Metabolomics* 15, 116. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1582-6>
- Ramos, S., 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry* 18, 427–442.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 393–396.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T., Kroymann, J., 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11223–11228. <https://doi.org/10.1073/pnas.172112899>
- Raudone, L., Motiekaityte, V., Vainoriene, R., Zymone, K., Marksa, M., Janulis, V., 2018. Phytochemical Profiles of Alpine Plant *Horminum pyrenaicum* L. during Phenological Growth Stages. *Chemistry and Biodiversity* 15. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800190>
- Reese, E.T., Clapp, R.C., Mandels, M., 1958. A thioglucosidase in fungi. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 228–242. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90412-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90412-0)
- Riipi, M., Ossipov, V., Lempa, K., Haukioja, E., Koricheva, J., Ossipova, S., Pihlaja, K., 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: Are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia* 130, 380–390. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0826-z>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Robinson, K.O., Beyene, D.A., Van Berkum, P., Knight-Mason, R., Bhardwaj, H.L., 2000. Variability in plant-microbe interaction between *Lupinus* lines and *Bradyrhizobium* strains. *Plant Science* 159, 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00345-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00345-9)
- Rochfort, S.J., Trenerry, V.C., Imsic, 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>
- Saha, S., Hollands, W., Teucher, B., Needs, P.W., Narbad, A., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Rossiter, J.T., Mithen, R.F., Kroon, P.A., 2012. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Molecular Nutrition and Food Research* 56, 1906–1916. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200225>
- Salminen, J.-P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P., 2004. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology* 30, 1693–1711. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000042396.40756.b7>
- Sampliner, D., Miller, A., 2009. Ethnobotany of Horseradish (*Armoracia rusticana*, Brassicaceae) and Its Wild Relatives (*Armoracia* spp.): Reproductive Biology and Local Uses in Their Native Ranges. *Econ Bot* 63, 303–313. <https://doi.org/10.1007/s12231-009-9088-1>
- Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J.M., Ferreres, F., Moreno, D.A., 2012. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chem* 134, 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.180>
- Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P., others, 2011. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica sciencia* 1, 25–41.
- Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109, 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Sellam, A., Dongo, A., Guillemette, T., Hudhomme, P., Simoneau, P., 2007. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-

- isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology* 8, 195–208. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00387.x>
- Seo, H.-S., Sikder, M.A., Lee, H.J., Ryu, J., Lee, C.J., 2014. Apigenin Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -Induced Production and Gene Expression of Mucin through Regulating Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway in Airway Epithelial Cells. *Biomol Ther (Seoul)* 22, 525–531. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.094>
- Shi, H., Shi, A., Dong, L., Lu, X., Wang, Y., Zhao, J., Dai, F., Guo, X., 2016. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clinical Nutrition* 35, 1366–1373. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.03.002>
- Shin, I.S., Masuda, H., Naohide, K., 2004. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food Microbiology* 94, 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00297-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00297-6)
- Silva, F.S., Menezes, P.M.N., Sá, P.G.S. de, Oliveira, A.L. de S., Souza, E.A.A., Almeida, J.R.G. da S., Lima, J.T. de, Uetanabaro, A.P.T., Silva, T.R. dos S., Peralta, E.D., others, 2016. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. *Pharmaceutical biology* 54, 25–34.
- Singh, A.V., Xiao, D., Lew, K.L., Dhir, R., Singh, S.V., 2004. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* 25, 83–90. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg178>
- Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 696–701. <https://doi.org/10.1007/BF00182812>
- Sõukand, R., Quave, C.L., Pieroni, A., Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Kalle, R., Łuczaj, Ł., Svanberg, I., Kolosova, V., Aceituno-Mata, L., Menendez-Baceta, G., Kołodziejska-Degórska, I., Pirożnikow, E., Petkevičius, R., Hajdari, A., Mustafa, B., 2013. Plants used for making recreational tea in Europe: a review based on specific research sites. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 9, 58. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-58>
- Srivastava, S.K., Xiao, D., Lew, K.L., Hershberger, P., Kokkinakis, D.M., Johnson, C.S., Trump, D.L., Singh, S.V., 2003. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenograft in vivo. *Carcinogenesis* 24, 1665–1670. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg123>
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Gopalan, V., 2012. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity* 54, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0168-7>
- Tani, N., Ohtsuru, M., Hata, T., 1974. Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agricultural and Biological Chemistry* 38, 1623–1630. <https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861388>
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B., 2008. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7, 1089–1099.
- Tautenhahn, R., Patti, G.J., Rinehart, D., Siuzdak, G., 2012. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Anal. Chem.* 84, 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Tian, Y., Amand, S., Buisson, D., Kunz, C., Hachette, F., Dupont, J., Nay, B., Prado, S., 2014. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. *Phytochemistry* 108, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.021>

- Toker, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Memişoğlu, M., Ito, S., 2001. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00351-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00351-X)
- Toker, G., Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Özek, T., 1999. The Composition of Essential Oils from *Tilia L.* Species Growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 11, 369–374. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701158>
- Tunc, S., Chollet, E., Chalier, P., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., 2007. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. *International Journal of Food Microbiology* 113, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.004>
- Tuominen, A., Salminen, J.-P., 2017. Hydrolyzable Tannins, Flavonol Glycosides, and Phenolic Acids Show Seasonal and Ontogenic Variation in *Geranium sylvaticum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 6387–6403. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00918>
- Usenik, V., Mikulič-Petkovšek, M., Solar, A., Štampar, F., 2004. Flavonols of leaves in relation to apple scab resistance. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111, 137–144.
- Vagiri, M., Conner, S., Stewart, D., Andersson, S.C., Verrall, S., Johansson, E., Rumpunen, K., 2015. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum L.*) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chemistry* 172, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.041>
- Valares Masa, C., Sosa Díaz, T., Alías Gallego, J.C., Chaves Lobón, N., 2016. Quantitative Variation of Flavonoids and Diterpenes in Leaves and Stems of *Cistus ladanifer L.* at Different Ages. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21, 275. <https://doi.org/10.3390/molecules21030275>
- Valgimigli, L., Iori, R., 2009. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50, 222–237. <https://doi.org/10.1002/em.20468>
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C.J., 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>
- van der Heijden, M.G.A., Hartmann, M., 2016. Networking in the Plant Microbiome. *PLoS Biology* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>
- Vos, C.M., Yang, Y., De Coninck, B., Cammue, B.P.A., 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control* 74, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.004>
- Vukics, V., Guttman, A., 2010. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 29, 1–16. <https://doi.org/10.1002/mas.20212>
- Wang, H., Lin, W., Shen, G., Khor, T.-O., Nomeir, A.A., Kong, A.-N., 2011. Development and validation of an LC-MS-MS method for the simultaneous determination of sulforaphane and its metabolites in rat plasma and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatographic Science* 49, 801–806. <https://doi.org/10.1093/chrscl/49.10.801>
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.
- Wittstock, U., Burow, M., 2007. Tipping the scales - Specifier proteins in glucosinolate hydrolysis. *IUBMB Life* 59, 744–751. <https://doi.org/10.1080/15216540701736277>
- Wu, H., Zhang, X., Zhang, G.-A., Zeng, S.-Y., Lin, K.-C., 2011. Antifungal Vapour-phase Activity of a Combination of Allyl Isothiocyanate and Ethyl Isothiocyanate Against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* Infection on Apples. *Journal of Phytopathology* 159, 450–455. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01792.x>
- Wu, X.-M., Meijer, J., 1999. IN VITRO DEGRADATION OF INTACT GLUCOSINOLATES BY PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF BRASSICA [WWW Document]. URL <http://www.regional.org.au/au/gcirc/3/617.htm> (accessed 1.15.20).

- Xiang, Z., Wang, X., Cai, X., Zeng, S., 2011. Metabolomics Study on Quality Control and Discrimination of Three Curcuma Species based on Gas Chromatograph–Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis* 22, 411–418. <https://doi.org/10.1002/pca.1296>
- Yang, W., Alanne, A.-L., Liu, P., Kallio, H., Yang, B., 2015. Flavonol Glycosides in Currant Leaves and Variation with Growth Season, Growth Location, and Leaf Position. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 9269–9276. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04171>
- Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, Ö.F., Bilaloğlu, V., 2000. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (Tilia Argentea Desf Ex DC), Sage (Salvia Triloba L.), and Black Tea (Camellia Sinensis) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5030–5034. <https://doi.org/10.1021/jf000590k>
- Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K.J., Ucker, D.S., Kong, A.-N.T., 1998. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Research* 58, 402–408.
- Zhang, L., Yang, M., Gao, J., Jin, S., Wu, Z., Wu, L., Zhang, X., 2016. Seasonal variation and gender pattern of phenolic and flavonoid contents in Pistacia chinensis Bunge inflorescences and leaves. *Journal of Plant Physiology* 191, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.014>
- Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D., Chen, W., Li, G., 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in Brassica napus. *Biological Control* 72, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.018>
- Zhang, Y., 2010. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Molecular Nutrition and Food Research* 54, 127–135. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900323>
- Zhang, Y., 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: Measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 555, 173–190. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.017>
- Zhang, Y., 2001. Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. *Carcinogenesis* 22, 425–431.
- Zhang, Y.S., Kolm, R.H., Mannervik, B., Talalay, P., 1995. Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206, 748–755. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1106>
- Zhou, W., Chen, Z., Li, W., Wang, Y., Li, X., Yu, H., Ran, P., Liu, Z., 2019. Systems pharmacology uncovers the mechanisms of anti-asthma herbal medicine intervention (ASHMI) for the prevention of asthma. *Journal of Functional Foods* 52, 611–619. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.048>
- Zhou, Z., Yang, J., Kong, A.-N., 2017. Phytochemicals in Traditional Chinese Herbal Medicine: Cancer Prevention and Epigenetics Mechanisms. *Curr Pharmacol Rep* 3, 77–91. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0086-1>

6.1 Az értekezés alapját képező 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/233/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szűcs Zsolt
Neptun kód: BBU0B3
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10046386

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szűcs, Z.**, Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Sinka, L. T., Vasas, G., Gonda, S.: Comparative metabolomics of *Tilia platyphyllos* Scop. bracts during phenological development. *Phytochemistry*. 167, 1-11, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112084>
IF: 3.044
2. **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





További közlemények

3. 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
4. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Balla, B., Vasas, G.: Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L.
Int. Biodeterior. Biodegrad. 108, 115-121, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.018>
IF: 2.962
5. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Nguyen, M. N., Vasas, G.: Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC).
Phytochem. Anal. 27 (3-4), 191-198, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2615>
IF: 2.292
6. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Máthé, C., Vasas, G.: Effects of N source concentration and NH₄⁺/NO₃⁻ ratio on phenylethanoid glycoside pattern in tissue cultures of *Plantago lanceolata* L.: A metabolomics driven full-factorial experiment with LC-ESI-MS3.
Phytochemistry. 106, 44-54, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.002>
IF: 2.547

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,575

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,714

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

Debrecen, 2020.07.28.



7. Tárgyszavak

Tilia platyphyllos, hárs, murvalevél, *Armoracia rusticana*, tormagyökér metabolomika, endofiton gombák

8. Keywords

Tilia platyphyllos, large-leaved linden, bract, *Armoracia rusticana*, horseradish root, metabolomics, endophytic fungi

9. Köszönetnyilvánítás

A jelen munka megszületését szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vasas Gábornak, aki nemcsak támogatta a téma elindítását, de szakmai iránymutatásával segítette is azt. A doktori tanulmányaim alatt bármikor számíthattam a segítségére.

Köszönettel tartozom Dr. Gonda Sándornak, aki a mérhetetlen szakmai tudását próbálta átadni, hasznos tanácsaival és végtelen türelmével támogatott az elmúlt években. Bármilyen kérdésre készséges válaszolt, ami csak felmerül egy ilyen munka végzése közben.

Szeretném megköszönni az értekezés alapját adó közlemények társszerzőinek, akikkel a közös munka mindig élmény. Köszönöm, hogy segítették ezen közlemények létrejöttét, legjobb tudásuk szerint időt és energiát nem sajnálva dolgoztak rajta. Köszönöm Dr. Cziáky Zoltánnak és Dr. Kiss-Szikszai Attilának a sok-sok óra műszeridőt, Plaszkó Tamás PhD hallgatónak a rengeteg napi és esti munkát, amit beletettünk.

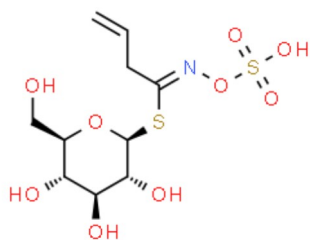
Szeretném megköszönni Dr. Kosztyó Diána, Dr. Magi Tibor és Dr. Majoros Barbara akkori gyógyszerészhallgatók munkáját, akik segítettek a növényi anyagok begyűjtésében, és így lett néhány szabad hétvégém.

Hálás vagyok a TTK-Növénytani Tanszék minden további munkatársának, akik türelmesek voltak a tanszéken lévő műszerek használati ideje alatt. Köszönettel tartozom Fülöpné Barabás Évának, aki tanszéki titkárnőként segített a legtöbb adminisztrációs feladat elvégzésében.

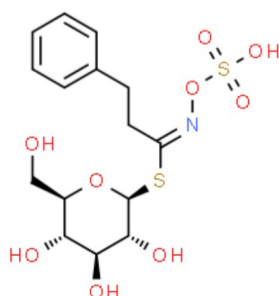
Végül szeretném megköszönni Családomnak a támogatást és a rengeteg türelmet, amit tőlük kaptam.

10. Függelék – az értékesében megjelenő, standarddal igazolt vegyületek kémiai képletgyűjteménye

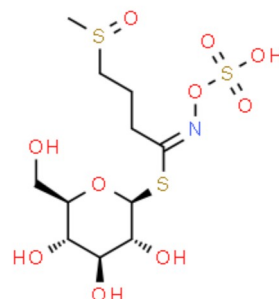
10.1. Glükozinolátok



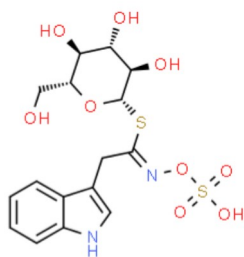
Szinigrin



Glükonaszturciin

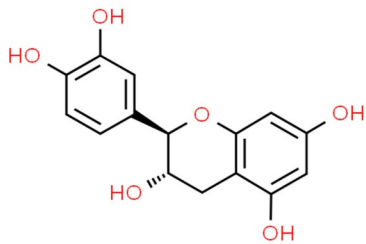


Glukoiberin

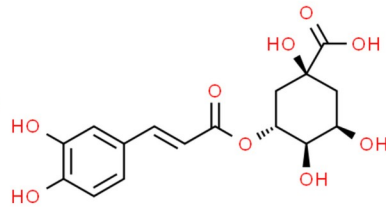


Glükobrasszicin

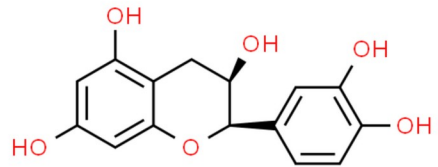
10.2. Fenoloidok



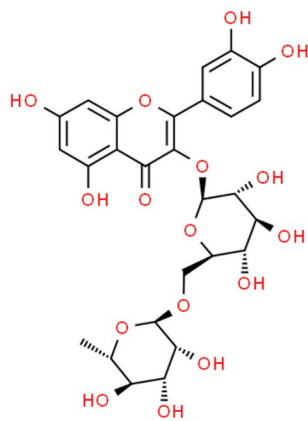
(+)-katechin



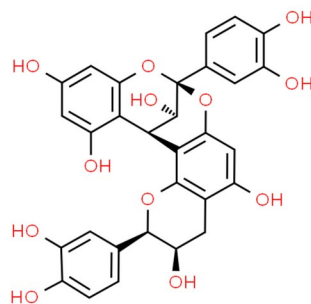
Klorogénsav



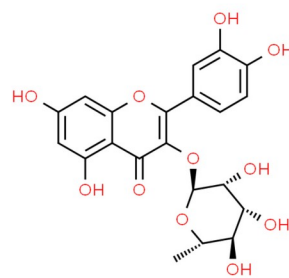
(-)-Epikatechin



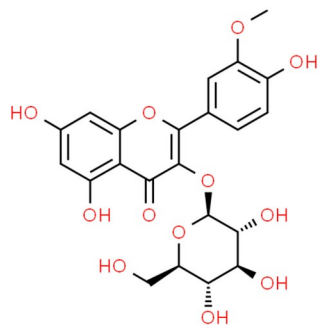
Rutin



Procianidin A2



Kvercitrin



Isoramnetin-3-glükózid