

A torma (*Armoracia rusticana*) antifungális hatóanyagainak vizsgálata *in vitro*

Doktori értekezés

Bertóti Regina Lilla

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Szőke Éva, D.Sc., ny. egyetemi tanár
Dr. Vasas Gábor, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Mészáros Annamária, Ph.D., tud. munkatárs
Dr. Leiter Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Láng Orsolya, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Droppa Magdolna, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Hajdú Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS (irodalmi háttér).....	6
1.1. Az <i>Armoracia rusticana</i> biológiai jellemzői.....	6
1.2. A glükozinolát-mirozináz-izotiocianát/nitril rendszer.....	7
1.3. Az izotiocianátok terápiás hatásai.....	9
1.3.1. Antimikrobiális – antibakteriális és antifungális hatás.....	9
1.3.2. Antikarcinogén hatás.....	10
1.3.3. További hatások más betegségek esetén.....	12
1.4. ITC-ok mellékhatásai.....	14
1.5. Torma peroxidáz.....	15
1.6. Biotechnológia, <i>in vitro</i> szövettenyészetek, hairy root kultúrák.....	15
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	18
3. MÓDSZEREK.....	19
3.1. Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata.....	19
3.1.1. Növényi anyagok, <i>in vitro</i> kultúrák, transzformáció.....	19
3.1.2. A géntsztransformáció igazolása polimeráz láncreakcióval.....	20
3.1.3. Biomassza produkció.....	21
3.1.4. Folyadék kromatográfiás-elektrospray ionizációs-tömegspektrometriás vizsgálatok.....	21
3.1.5. Gázkromatográfiás-tömegspektrometriás vizsgálatok.....	22
3.1.6. A mirozínáz aktivitás vizsgálata gélelektroforézissel.....	23
3.1.7. Peroxidáz tartalom és aktivitás.....	24
3.1.8. Statisztikai analízis.....	24
3.2. A torma illóolajantifungális hatásának, és hatásmechanizmusának vizsgálata.....	25
3.2.1. Antifungális kísérletek során vizsgált izotiocianátok.....	25
3.2.2. Antifungális kísérletek során alkalmazott gomba törzsek.....	25
3.2.3. A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata.....	25

3.2.4. „Time-kill assay”.....	26
3.2.5. Analitikai vizsgálatok molekuláris biológiai módszerekkel.....	27
3.2.6. A torma illóolaj és GSH, GSSG vagy GR közötti reakciók tanulmányozása.....	27
3.2.7. A torma illóolajés diamid, menadion-Na-biszulfit (MSB) és a kloro-dinitrobenzol (CDNB) interakciójának vizsgálata.....	28
4. EREDMÉNYEK.....	29
4.1. Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuknak a vizsgálata.....	29
4.1.1. <i>In Vitro</i> HRC-k.....	29
4.1.2. Morfológiai értékelések és biomassza produkció.....	30
4.1.3. A géntranszformáció igazolása.....	32
4.1.4. GLS-ok azonosítása a torma HRC-kban LC-ESI-MS/MS analízissel.....	32
4.1.5. GLS bomlástermékek - nitrilek és ITC-ok detektálása torma HRC-kból GC-MS analízissel.....	35
4.1.6. Torma HRC-k enzim tartalma	38
4.1.6.1. MYR aktivitás	38
4.1.6.2. Peroxidáz tartalom és aktivitás	38
4.1.7. A torma különböző növényi szerveinek inokulálása agrobaktériummal, különböző tulajdonság-mintázattal rendelkező HRC-kat eredményezett.....	46
4.2. A torma illóolajantifungális hatásának vizsgálata.....	53
4.2.1. A torma illóolaj szignifikáns antifungális hatása.....	53
4.2.2. A torma illóolajerősebb növekedésgátló hatást mutatott, mint a főkomponensei önmagukban.....	54
4.2.3. A torma illóolaj nagy koncentrációban fungicid.....	55
4.2.4. A torma illóolaj in vitro interakciója redukált és oxidált glutationnal és glutation reduktázzal.....	56
4.2.5. A torma illóolaj oxidatív stresszt indukált, és koncentráció függő módon kiürítette a glutation raktárakat.....	57
4.2.6. A torma illóolaj interakciója CDNB-al, MSB-al és diamiddal.....	58
5. MEGBESZÉLÉS.....	60

5.1. Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata.....	60
5.1.1. A natív torma gyökér és a HRC-k GLS mintázatának összehasonlítása....	60
5.1.2. Indol GLS-ok és hidrolitikus bomlástermékek.....	60
5.1.3. A torma különböző növényi szerveinek agrobakteriális inokulációja különböző tulajdonság mintázatú HRC-ket eredményez.....	61
5.1.4. A biológiailag aktív komponensek koncentrációja feltehetően a MYR izoenzim mintázattól függ.....	62
5.2. A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata.....	63
5.2.1. A torma illóolaj erősebb antifungális aktivitást mutat, mint egyéb ITC-ok önmagukban.....	63
5.2.2. A torma illóolaj koncentráció függően fungicid, illetve fungisztatikus hatású <i>Candida albicans</i> -on tesztelve	64
5.2.3. A GSH védi a <i>Candida albicans</i> -t a torma illóolajtól.....	64
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	66
6.1. A hairy root kultúrák GLS mintázatában a GLN dominál.....	66
6.2. A torma hairy root kultúrák enzim és metabolit mintázatában meghatározó szerepe van az inokulált növényi szervnek.....	66
6.3. A torma illóolaj antifungális hatása.....	66
6.4. A GSH védi a <i>Candida albicans</i>-t a torma illóolajáltal okozott oxidatív stresszhatástól.....	67
7. ÖSZEFoglalás.....	68
8. SUMMARY.....	69
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	70
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	89
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AddShoots – járulékos hajtások	GC-MS – gázkromatográfia-tömegspektrometria
AITC – allil-izotiocianát	GIB – glükoiбарin
ARAB – glükoarabishirsutain	GLN –glükonaszturtiin
ARE – antioxidáns válasz elemek	GLS – glükozinolat
ArLB – levéllemezből létrehozott <i>Armoracia rusticana</i> hairy root klónok	GSH – glutation
ArP – levélnyélből (petiólum) létrehozott <i>Armoracia rusticana</i> hairy root klónok	GSSG – oxidált glutation
Branching – a hairy root kultúrák elágazása	GST – glutation-S-transzferáz
BPC – főcsúcs kromatogram	GPx – glutation peroxidáz
BRASS – glükobrasszicin	GR –glutacion redukáz
CDNB – 1-klór-2,4-dinitrobenzol	HRC – hairy root kultúra
DGI – napi növekedési index	HRP – torma peroxidáz
DNS – dezoxiribonukleinsav	IBER – glükoiберverin
DTNB - 5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoinsav)	IC₅₀ – 50 %-os növekedésgátlást okozó koncentráció
DWpc – szárazanyag tartalom %	Ie – vélt százalékos növekedés gátlás
EC₅₀ – hatásos koncentráció, mely a mérési vagy vizsgálati végpont 50 %-os csökkenését okozza	Io – mért százalékos növekedés gátlás
Et – dihidro-etídium	IR – interakciós ráta
	ITC – izotiocianát
	I3ACN – indol-3-acetonitril
	LC-ESI-MS/MS – folyadékkromatográfia–elektrospray ionizációs tömegspektrometria
	MIC – minimális gátló koncentráció

MS – tömegspektrometria

MS-táptalaj – Murashige-Skoog táptalaj

MSB – menadion-nátrium-biszulfit

MTT – 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid

MYR – mirozináz

MyrB1, 2, 3 – különböző gél detektációs mirozináz band-ek

MeSPITC – 3-metil tiopropil-izotiocianát

NEO – neoglükobrasszicin

Nrf2 – transzkripciós faktor (nuclear factor erythroid-2 related factor 2)

PCA – főkomponens elemzés

PECN – 3-fenilpropionitril

PEITC - feniletil-izotiocianát

PCR – polimeráz láncreakció

RNS – Ribonukleinsav

SIM – szelektált ion mód

SDS – nátrium-dodecil-szulfát

SOD – szuperoxid-dizmutáz

TIC – teljes ion kromatogram

XIC – extraktált ion kromatogram

X_{1,2} – két tesztelt komponens egyenkénti növekedés gátló hatása

YPD – élesztő kivonat-pepton-dextróz

1. BEVEZETÉS (irodalmi háttér)

A torma Délkelet-Európában és Nyugat-Ázsiában őshonos. Kereskedelmi szempontból az Egyesült Államok mellett Magyarország a legnagyobb torma termesztő ország (1). Fűszerként étkezési céllal használják, annak ellenére, hogy már az ókorban is alkalmazták gyógyításra (1–3). Mindkét felhasználási terület elsősorban a csípős ízű, könnyfakasztó izotiocianátoknak (ITC) köszönhető.

1.1. Az *Armoracia rusticana* biológiai jellemzői

A torma (*Armoracia rusticana* P. Gaertner, B. Meyer & Scherbius) a keresztesvirágúak, más néven Brassicaceae családjába, azon belül az *Armoracia* nemzetség csoportba tartozik (3). Főgyökere orsógyökér, mely földalatti hajtás, függőleges helyzetű, erős megvastagodásra képes gyökértörzs (rizóma). A föld feletti hajtás lágyszárú (1.a ábra), mely a csúcán erősen elágazik. Hosszú, nyeles, ép vagy karéjosan, illetve szeldelten tagolt lemezű tőlevelei vannak (1.b ábra). A szárlevelek ülők vagy rövid nyelűek. Sok virágból álló, összetett sátor virágzattal (1.c ábra) és becőterméssel rendelkezik. Ritkán létrehozott magvai gömbölyűek, aprók (4).



a

b

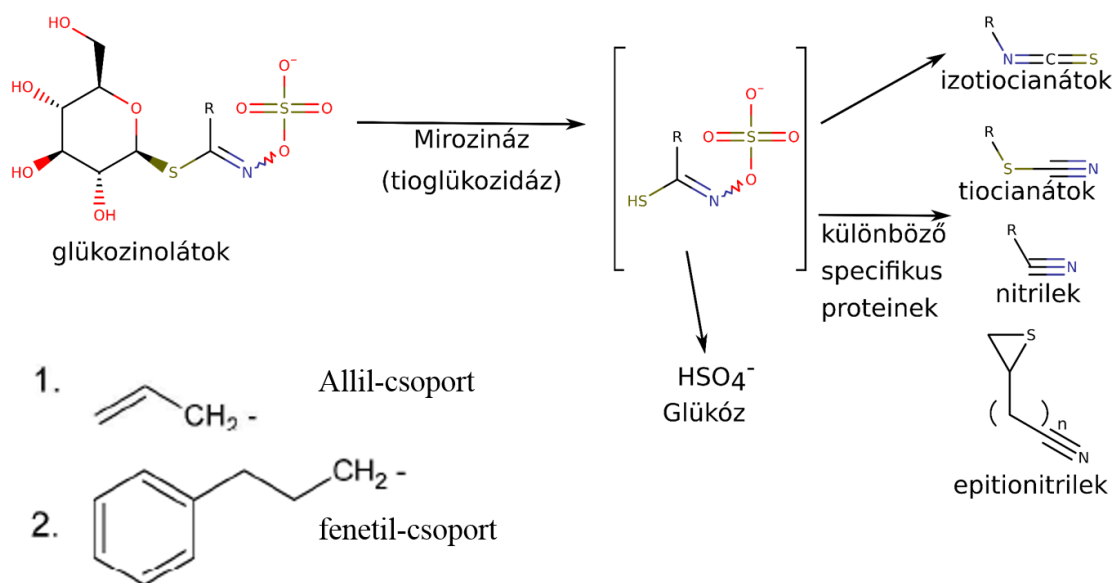
c

1. ábra Virágzó natív *Armoracia rusticana*. **a:** a növény teljes föld feletti hajtása, **b:** ép vagy karéjosan, illetve szeldelten tagolt lemezű tőlevelek a virágzattal, **c:** összetett sátor virágzat.

Évelő növény (2,4), de egyévesként is termesztik. Mindkét típusú rizóma számára a nedves talaj, és mérsékelt klíma a kedvező (3). Vad típusa nem ismert, valószínűleg kihalt. Feltételezik, hogy származása az *Armoracia macrocarpa* és *Armoracia sisymbroides* rokon fajokhoz vezethető vissza (2,3). A növényt kizárólag vegetatív úton, gyökérről szaporítva termesztik (4).

1.2. A glükozinolát-mirozináz-izotiocianát/nitril rendszer

A glükozinolátok (GLS) fő hidrolitikus bomlástermékei az ITC-ok. A GLS-ok N-hidroxi-szulfátok, melyekhez kénnel kapcsolt béta-D-glükopiranoz, valamint rendkívül sokféle oldallánc (R) kapcsolódhat (2. ábra). A szintelen GLS molekulák vakuólumokban tárolódnak, míg a GLS-okat biológiailag aktív molekulává átalakító mirozináz enzim (MYR) a fizikailag szeparált mirozin sejtekben található (2).



2. ábra Glükozinolát konverzió izotiocianátokká, valamint a reakció körülmények függvényében más egyéb illékony bomlástermékekké. A torma jellegzetes glükozinolátjai és bomlástermékei: 1: R = allil (glükozinolát: szinigrin, jellemző termékek: allil izotiocianát, allil tiocianát és allil nitril); 2: R = 2-feniletil- (= fenetil-) (glükozinolát: glükonaszturtiin, jellemző termékek: 2-feniletil-izotiocianát, 2-feniletil-tiocianát és 3-fenilpropionitril) (2,3,5–7).

Ezidáig közel 20 GLS-ot írtak már le tormából, mint például glükoiiberin, szinigrin (SIN), 2-metilszulfonil-oxo-etil-GLS, glükonapin, glükokochlearin, glükokonringianin, glükoszativin, glükoiбарin (GIB), 4-hidroxiglükobrasszicin, neoglükobrasszicin (NEO), glükokapparilinearisin vagy glükobrasszikanapin, glükotropeolin, glükobrasszicin (BRASS), glükonaszturtiin (GLN), 4-metoxiglükobrasszicin, glükoarabishirsutain (ARAB) (2).

Az izotiocianátok (ITC) R oldalláncból és izotiocianát (-NCS) csoportból felépülő illékony komponensek. A bioaktivásban meghatározó szereppel rendelkező R oldallánc megegyezik a prekursor GLS-ban és ITC termékében.

A torma gyökér illóolajának fő komponensei az allil-izotiocianát (AITC; 44,3–81,8%) és a 2-feniletill-izotiocianát (PEITC; 4,2–51,3%) (3,5–8). Az alábbi minor ITC-okat is írtak már le torma gyökérből: izobutil-ITC, 4-izotiocianáto-1-butén, butil-ITC, 3-metilbutil-ITC, pentil-ITC, 4-metilpentil-ITC, benzil-ITC (2), 7-metilszulfonilheptil-ITC, 6-metilszulfonilhexil-ITC, 5-metilszulfonilpentil-ITC, 4-pentenil-ITC, 3-butenil-ITC és n-butil-ITC (3).

Az ITC-ok, különösen az AITC és PEITC számos biológiai és feltételezett gyógyszerészeti hatással rendelkeznek.

A nitrilekben szintén jelen van a prekursor GLS oldallánca. Keletkezésük során a MYR hidrolízis melléktermékeként elemi kén szabadul fel. A nitrilek leggyakrabban szintén illékony komponensek (9). Az indol oldalláncot tartalmazó nitrilek, pl.: indol-3-acetonitril (I3ACN), antikarcinogén és rovarölő hatással rendelkeznek (10,11).

A torma mirozináz (MYR, béta-tioglikozid glükohidroláz) egy 65 kDa-os S-glükozidáz enzim, mely cink atommal kapcsolt 2 azonos alegységből épül fel (3,12). A MYR nem egy szubsztrát specifikus enzim, számos GLS hidrolízisére képes (12). Legalább 3-féle MYR izoenzimet írtak már le (MyrA, MyrB, MyrC), melyek jelenléte faj- és szervspecifikusnak bizonyult (9,13,14). Egy másik MYR osztályzás szerv specifikus expressziós mintázaton alapul: MYRI a föld feletti szervekben fejeződik ki, ide tartoznak a MyrA, MyrB, MyrC és az AtTGG1-3 elnevezésű izoenzimek; a MYRII a gyökérre jellemző, többek között az AtTGG4 -5 izoenzimeket foglalja magában (15).

Amikor a növényi szövet megsérül (pl. reszelés, rágás során) a MYR kapcsolatba kerül a GLS-okkal, mely eredményeként bioaktív ITC-ok, nitrilek, tiocianátok, epitionitrilek vagy oxazolidinok keletkeznek a reakciókörülmények (szubsztrát,

specifikus proteinek jelenléte/hiánya) függvényében (1-3,15). A reakció fő termékei az ITC-ok pH = 5-8 és 20 – 45 °C hőmérsékleten (3,16).

1.3. Az izotiocianátok terápiás hatásai

A torma (*Armoracia rusticana*) gyökerét és levelét évszázadokon keresztül eredményesen alkalmazták a népgyógyászatban fájdalomcsillapításra (pl. derékfájás, fogfájás), a gasztrointesztinális és légzőrendszer megbetegedéseinek kezelésére (pl. asztma, köhögés), vízzel és mézzel keverve influenza kezelésére (4). Továbbá afrodisziákumként (1), tartósítószerként, aszeptikumként (17), valamint takarmányként (18) is alkalmazták. Ennek ellenére a gyógyászati hatásmechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott (3). A torma gyökeréből kinyert illóolaj elsősorban ITC-okat tartalmaz, melyek a MYR hidrolízis fő termékei (2,3,11). A torma illóolajfőkomponensei az AITC és a PEITC (2,3). Az ITC-ok erős antikarcinogén és antimikrobiális aktivitással rendelkeznek (2,3). Számos egyéb gyógyászati hatásuk is ismert, mint pl. vérlemezke aggregáció gátlás (19,20), emésztőrendszer védő hatás (21), rovarölő aktivitás (22), stb.

1.3.1. Antimikrobiális – antibakteriális és antifungális hatás

A természetes és szintetikus ITC-ok is antibakteriális hatással bírnak Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra, mint például *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* fajokra (10,17,23–27).

Az ITC-oknak szintén erős az antifungális (gombaellenes) aktivitásuk különböző élesztő és penészgombákra egyaránt, mint például *Candida* fajok, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, és *A. fumigatus* (11,26–39). Az ITC-ok a növényi patogén gombákra is antifungálisan hatnak (pl.: *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Pithium irregulare*, *Alternaria brassicicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* (11,30,31–34). Ezért feltételezik, hogy a növényi GLS bomlástermékek fontos szerepet töltenek be a növény gombaellenes önvédelmi rendszerében (32,35,36).

Az ITC-ok antimikrobiális hatása nem csak a hagyományos gyógyászatban,

hanem az élelmiszerparban is alkalmazható (24,28,37,38). Mint illékony antimikrobiális komponenseknek, a terápiás, illetve növényvédelmi felhasználásuk ígéretes (30,39,40).

Az ITC-ok hatása több támadáspontúnak tűnik (23). Az izotiocianil csoport részt vesz elektrofil reakciókban pl. tiolokkal, diszulfidokkal, aminokkal, vagy alkoholokkal, az utóbbi kettővel kisebb a reaktivitása (23,24,41–46). Az oldallánc hidrofóbicitásának függvényében könnyen át tudnak hatolni biológiai membránokon, mely során akár kárt is okozhatnak a szerkezetükben (46–48). Az említett tulajdonságok alapján az ITC-ok antibakteriális hatását általánosságban a következő elméletekkel magyarázzák: különböző kulcs enzimek (pl. tioredoxin reduktáz, acetát kináz, citokrómC oxidáz, P-típusú ATPáz) és egyéb fehérjék (pl. quorum érzékelésben résztvevő fehérjék) inaktiválásával (23,24,38,43,49); az aminosav-pool kiürítésével (50); a megnövekedett membrán permeabilitással (47,48); vagy a fentiek következtében kialakuló oxidatív stressz generálással (23,34).

A gombaellenes hatásmechanizmusról kevesebb információ áll rendelkezésünkre. A növénypatogén gomba *Alternaria brassicicola* esetében Calmes és mtsai (31) leírták, hogy az ITC-ok károsítják a mitokondriális funkciókat, és oxidatív stresszt okoznak. Azt is feltételezik, hogy egy megfelelő oxidatív stresszválasz megvédheti a gombákat az ITC-októl (31). Kojima és Ogawa (51) szerint *Saccharomyces cerevisiae*-ben az ITC-ok szétkapcsolják, és befolyásolják a mitokondriális funkciókat (ATP termelés).

1.3.2. Antikarcinogén hatás

Az AITC, PEITC, butil-ITC, szulforafán és 6-metilszulfínhexil-ITC antikarcinogén hatását bizonyították többek között tüdő (52), prosztata (53,54), mell (55), máj (56), melanóma (57), végbél (58,59), vastagbél (60,61), hasnyálmirigy (57,62), gyomor (63), B-sejtes limfóma (57), mieloid leukémia (64), méhnyak (57) és húgyhólyag (65,66) sejtvonalakon és állatmodelleken (2,3). A torma két főkomponensének, a PEITC-nak és az AITC-nak számos sejtvonalon és állatmodellen vizsgálták a rákellenes hatásmechanizmusát (1., 2. táblázat). Az antikarcinogén hatás főként fázis I. (citokróm P enzime család) enzimek gátlásán keresztül történik (2,3), valamint a fázis II. enzimek (pl. GST) génexpressziós szintjének növekedésén keresztül (2,3), vagy epigenetikai szabályozással miRNS-ek segítségével (67).

1. táblázat A torma egyik főkomponensének, a PEITC-nak különböző sejtvonalakon és állatmodelleken megfigyelt rákellenes hatásmechanizmusai Arumugam és Razis nyomán (54).

Hatásmechanizmus	Sejtvonal/ állat modell
a. sejtciklus leállás	
G0/G1 leállás és p21 protein növekedés	DU-14 sejtek, humán prosztatata rák
G0/G1 leállás és p21 protein növekedés	LNCaP sejtek, humán prosztatata rák
G2/M fázis leállás és Bcl-2 és, Bcl-X(L) szint csökkenés	PC-3 sejtek, humán prosztatata rák
G2/M fázis leállás	HeLa sejtek, méhnyakrák
G2 fázis leállás, CDK inhibitor p21waf1/cip1 indukálás	Caco-2 sejtek, humán vastagbél rák
G2/M fázis leállás	PC-3, humán prosztatata rák
b. Oxidatív stressz	
Glutation (GSH) deplécio	ovarium epitélium sejtek
c. Apoptózis indukálás	
p53 független apoptózis útvonal indukálás	PC-3 sejtek, humán prosztatata rák
JNK, ERK és p38 aktiválás	HT-29, humán vastagbél sejtek
JNK aktiválás	különböző sejtvonalak
ROS mediált apoptózis	PC-3 sejtek, humán prosztatata rák
angiogenezis gátlás	HUVEC, humán köldökzsinór véna endotél sejtek

2. táblázat A torma egyik főkomponensének, az AITC-nak különböző sejtvonalakon és állatmodelleken megfigyelt rákellenes hatásmechanizmusai Arumugam és Razis nyomán (54).

Hatásmechanizmus	Sejtvonal/ állat modell
<i>a. sejtciklus leállás</i>	
ciklin B1 és p21waf1/cip1 megnövekedett expressziója	UM-UC-3 sejtek, humán hólyag karcinóma
G1-fázis leállás	HL60 sejtek, humán leukémia
cyclin B1 csökkent expressziója és G2/M fázis leállás	LNCaP sejtek, humán prosztata rák
G2/M fázis leállás	HeLa sejtek, humán méhnyak rák
M fázis leállás	HT29 sejtek, humán végbél rák
<i>b. Apoptózis indukálás</i>	
JNK aktiváció; Bcl-2, Bcl-x1 protein expresszió csökkenés	PC-3 sejtek, humán prosztata rák; LNCaP sejtek
Bcl-2HL60 sejtek down-regulációja, humán leukémia	HL60 sejtek, humán leukémia
<i>c. Kaszpáz aktivitás</i>	
Pro-apoptotikus kaszpáz enzimek (kaspáz-3, -8 és -9) aktivációja	HL60 sejtek, humán leukémia

1.3.3. További hatások más betegségek esetén

A Brassicaceae családban tapasztalt direkt antioxidáns hatásért nem az ITC-ok, hanem a C, E-vitaminok, ill. karotinoidok (68) a felelősek, melyek sejtkárosodás előtt semlegesítik a szabadgyököket.

Indirekt antioxidáns hatást figyeltek meg a szulforafánnál és a PEITC-nál, az ARE (Antioxidant response element) régiót tartalmazó gének transzkripciójának fokozásával, Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2) transzkripció faktorokon keresztül

növekedett a fázis II. enzimek (pl. GST) aktivitása, valamint a hősokk fehérjék szintje, melyek védelmet nyújtanak az oxidatív stresszel szemben (69). A krónikus tüdőbetegségre (COPD) vizsgálták a brokkoli domináns ITC-ját, a szulforafánt. A tüdőt és szisztematikus rendszert érintő magas fokú oxidatív stresszel járó betegség esetén Wise és mtsai (70) azt vizsgálták, hogy a szulforafán Nrf2 aktiválásán keresztül növeli-e az antioxidáns gének expresszióját. Annak ellenére, hogy a torma illóolaj és az AITC enyhe antioxidáns hatását *in vitro* kimutatták (2,68), állatkísérletben (68), illetve a fent leírt randomizált placebo kontrolált kettős vak humán vizsgálatnál nem mutattak ki sem Nrf2 targetgén expressziót, sem egyéb antioxidáns illetve gyulladáscsökkentő hatást. Az AITC krónikus gyulladás csökkentő hatását írták le, mely gyulladással mediátorok, ill. ezek létrejöttében szerepet játszó enzimek (pl. TNF alfa, iNOS) gátlásán keresztül valósul meg (71).

Caglayan és mtsai (72) az AITC-ot nem csak antioxidánsnak, hanem gyulladáscsökkentőnek is találták. Egér állatkísérletben traumás agysérülést követően az AITC Nrf2/HO-1 modulálásán és NF- κ B útvonalakon keresztül nem csak az oxidatív stresszt mérsékelte, hanem a gyulladást is csökkentette.

Maringa Oleifera kivonata (főkomponens: benzil-ITC) emésztőrendszeri védő hatást mutatott sav-alkohol indukálta fekélyre patkány modellen (73).

A butil-, etil- és AITC hatását vizsgálták asztmára tengerimalac állatmodellen, mely során az ITC-ok dóziszfüggően gátolták a bronchusok összehúzódását (74). Immortalizált humán tüdő epitélium sejtvonalban AITC hatására MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1) funkció és expresszió növekedést mutattak ki, mely alapján az AITC ígéretes szernek tűnik a tüdőbetegségek kezelésében (75).

A keresztesvirágúak közé tartozó *Lepidium meyenii* (maca, főkomponens butil-ITC) etanolos kivonatát vizsgálták patkány állatmodellekben posztmenopauzális oszteoporózissal, mely során a maca hatásosnak bizonyult az ösztrogén hiányos csonttriturálás ellen (76). Egy másik tanulmányban a szulforafán bizonyult hatásosnak hipoxiás oszteoblaszt sejteken (77). A szulforafán csökkentette a hipoxia-mediált apoptózist és a reaktív oxigén gyök (ROS) szintet az oszteoblasztokban, valamint az oszteoblasztok hipoxia-mediált mineralizáció gátlását is csökkentette.

Humán kísérletben igazolták, hogy a magas glükorafanin tartalmú brokkoli diéta csökkenti a vérplazma LDL-koleszterin szintjét (78).

Cukorbetegség okozta szívizom károsodásra is vizsgálták a brokkoli hatását, melynek során Nrf2 aktivációt figyeltek meg egér állatmodellben (79).

A szulforafán szintén hatásosnak bizonyult szív koronáriaér betegségekben TGF-beta1- (Transforming growth factor beta) indukált patkány fibroblaszt aktiváción és extracelluláris mátrix interakciókon keresztül (80).

Vérlemezké aggregáció gátló hatását bizonyították az AITC-nak (20), valamint a wasabi kivonatának (19). Az AITC hatását *in vitro* vizsgálták patkány és humán vérlemezkében gazdag plazmán (20). A tobzódást kollagén, trombin, ADP, és arachidonsav segítségével indukálták. AITC hatására gyengült a tromboxán A2 képződése és az ATP felszabadulása. Az AITC gátolta a celluláris Ca^{2+} koncentráció növekedését, valamint patkány plazmában a vérlemezkék alakja is megváltozott a kezelés hatására. Az AITC trombo-embólia ellen védő hatását mutatták ki egér modell kísérletben. A wasabi főkomponense a 6-metilszulfínihexil-ITC *in vitro* RL34 sejteken és *in vivo* patkány modellen is gátolta a vérlemezkék aggregációját, GST indukálásán és biomolekulák szulfhidril csoportjával (pl. GSH, cisztein) való kapcsolódáson keresztül (19).

Lynch és munkatársai egy randomizált kettős vak vizsgálatban kimutatták, hogy a brokkoliból kinyert szulforafán mérsékli az autizmus tüneteit (81).

Továbbá a brokkoli mag kivonat GLS-jai képesek a bőr öregedéséhez vezető fehérjék oxidációjának mértékét csökkenteni (82).

1.4. ITC-ok mellékhatásai

Állatkísérletekben kimutatták, hogy nagy dózisban (200-400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$) az ITC-ok oxidáló és karcinogén hatásúak lehetnek (83). Ilyen mértékű humán expozíció gyakorlatilag nem érhető el élelmiszerekkel, az átlagos bevitt mennyiséget 10 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -nak becsülik. Az AITC nagy mennyiségben az intracelluláris glutation koncentrációját csökkenti, így a redox háztartás felborításán keresztül oxidatív stresszt okoz. A sejtbe bejutva az ITC-ok elreagálnak a glutationnal, majd a termékek egy része a sejtekből exportálódik, és extracellulárisan szétbomlanak az eredeti vegyületekre, melyek újra belépnek a sejtbe. A folyamat során az intracelluláris tiolok depléciója következhet be, mely akár apoptózist is kiválthat (83). Továbbá H_2O_2 jelenlétében réz ionokkal szuperoxid is keletkezhet (84).

1.5. Torma peroxidáz

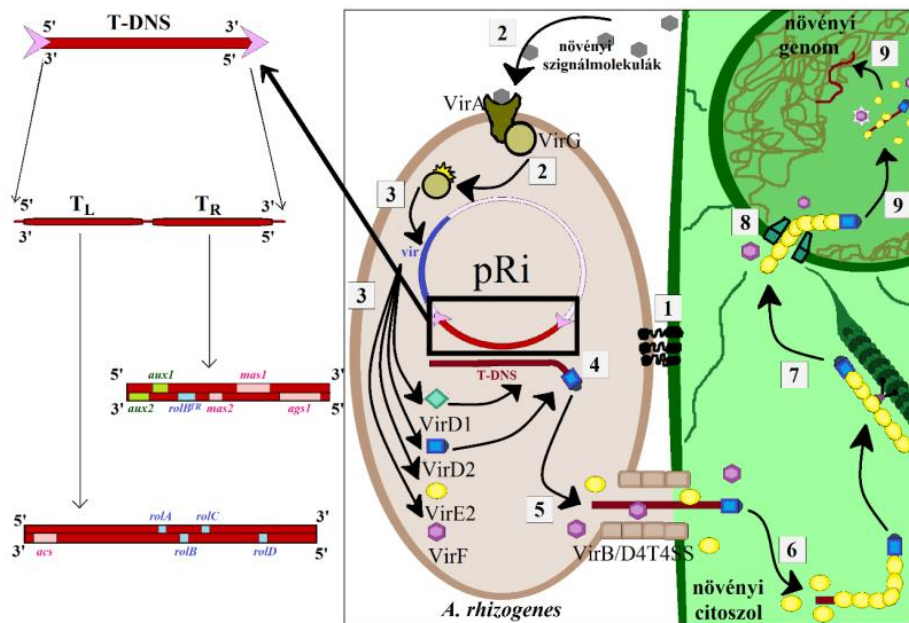
A torma nagy mennyiségben tartalmazza a torma peroxidáz (HRP) enzimet. A HRP egy 44 kDa-os fehérje, mely egy 308 aminosavas polipeptid láncból, egy hemin proszтетikus csoportból és 2 Ca^{2+} ionból épül fel, melyek az enzimszerkezet fenntartásában játszanak szerepet (85,86). A HRP jelzi számos specifikus enzim jelenlétét/működését, mint pl. glutation peroxidáz, nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) peroxidáz (85). Szintén szerepet játszik a növény védelmi funkcióiban, a lignifikációban és visszaalakítási mechanizmusokban is, pl. fertőzött vagy károsodott növényi szövetek esetében (85). A HRP-t számos molekuláris biológiai módszerben alkalmazzák: vér glükóz és koleszterin szint mérésében; egyéb enzim-tartalmak megbecsülésében; immunpróba vizsgálatokban (pl. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Western blot), vagy DNS tisztításhoz (1,3,85). A húsiparban is alkalmazzák (87).

1.6. Biotechnológia, in vitro szövettenyészetek, hairy root kultúrák

Hairy root kultúrák létrehozásához a növényi szövetet *Agrobacterium rhizogenes*-szel fertőzik meg. Az *Agrobacterium rhizogenes* egy természetben is előforduló talajbaktérium, mely hajszálgökeresedést okoz (88). A transzfer-DNS (T-DNS) a baktérium Ri (root inducing, azaz gyökér indukáló) plazmidjában található, mely *RolA*, *RolB* és *RolC* virulens géneket tartalmaz (3. ábra). A transzfer-DNS képes integrálódni a növényi genomba, mely következtében kialakul a hajszálgökeresedési betegség (88,89). A virulens gének integrációja a szekunder metabolitok szintézisében is változást okozhat (89). A korlátlan növekedésű hairy root klónok (HRC) genetikailag stabilak, hormon mentes táptalajon akár 16 évig is fenntarthatók (90). Alkalmask másodlagos anyagcsere-termékek termeltetésére (pl. gyógyszerek, ízanyagok, pigmentek) (89,91–93). A géntaszformáció következtében a másodlagos anyagcsere-termékek szintézise eltérhet az eredeti növényétől (89,92). Az anyanövényhez viszonyítva a következő fajok hairy root kultúráiban mutattak ki magasabb indol GLS szintet: *Brassica rapa*, *Sinapis alba* és *Eruca sativa*. A teljes GLS szint viszont minden esetben alacsonyabb volt a HRC-kban, mint az anyanövényben (94,95). A HRC-k alkalmasak léptéknövelésre, hiszen jól tolerálják a bioreaktorokban való tenyésztést (92). Ezen kívül funkcionális génanalízisre is kiváló modellek a HRC-k

(96). A tormának nincsenek (vagy nagyon csekély számú) életképes magjai, de Nakashimada és mtsai (97) és Repunte és mtsai (98) HRC-k segítségével létrehoztak mesterséges magokat. A torma HRC-k fitoremediációra (pl. oxibenzén napozókrémből) vagy szennyvíz tisztításra (pl. diklofenákkal vagy paracetammal szennyezett) is alkalmasak (99–101).

Torma HRC-kal számos alkalommal termeltettek sikeresen nagy mennyiségben torma peroxidázt (HRP) (102–106). A géntranszformált HRC-ok nem csak nagyfokú biomassza produkcióra alkalmasak (87), hanem a peroxidáz aktivitásuk is növekedett, akár 20-szoros mértékben (105). Továbbá a torma HRC-k HRP aktivitását eredményesen növelték a következő elicitorokkal: *Verticillium sp.* gombával, növényi kivonatokkal, nehézfémekkel (106,107). Torma HRC-ok léptéknöveléséhez egyedül a poliuretánnal immobilizált „air-lift” bioreaktorok bizonyultak alkalmasnak (108).



3. ábra Az *A. rhizogenes* transzfer-DNS-ének integrációja a növényi genomba Tzifra és Citovsky (109) valamint Szőke és mtsai (110) nyomán. A Ri plazmid T-DNS részei – zöld: hormon szintézis gének; kék: Rol gének; rózsaszín: opin szintézis gének.

A torma gyökere a Keresztesvirágúak közül is kiemelkedik extrém magas GLS tartalma révén (2,111). A másodlagos anyagcseretermékek közé tartozó GLS-ok (a

bioaktív ITC-ok prekursorai) az anyanövényhez viszonyítva alacsonyabb mennyiségben termelődnek a torma HRC-okban. A torma HRC-k GLS-MYR-ITC rendszerével kapcsolatban hiányosak a rendelkezésünkre álló információk. Néhány tanulmányban foglalkoztak a Brassicaceae családba tartozó HRC-k GLS elicitációjával. Alnsour és mtsai (111) növelték a táptalaj $MgSO_4$ koncentrációját, GLS termeltetési céllal. Wielanek és mtsai (112,113) prekursor aminosavak adagolásával (fenilalanin, cisztein) sikeresen elicitálták a GLS-okat egyéb Brassicaceae HRC-kban. *Brassica oleracea* HRC-k GLS bioszintézisét a növekedési táptalaj auxin koncentrációjának változtatásával befolyásolták (71). Chung és mtsai (114) réz-oxid nanopartikulumokkal növelték a GLS és fenoloid komponensek termelését és génexpresszióját *Brassica rapa* HRC-kban. A citokininek közé tartozó kinetinnel szintén növelni tudták a *Brassica rapa* HRC-k GLS tartalmát (94). *Eruca sativa* HRC-kban a táptalaj kénel való kiegészítésével fokozták az alifás és indol GLS-ok szintézisét, az efetonnal és jázminsavval való kezelés viszont csak az indol GLS tartalmat növelte (95). *Sinapis alba* és *Brassica rapa* HRC-kban szintén jázminsavval elicitálták az indol GLS-okat (94). Az anyanövényhez hasonlítva a HRC-k kevesebb GLS-ot, de több indol GLS-ot tartalmaztak (94). *Arabidopsis thaliana* esetében a kiindulási HRC-hoz képest a citokróm P450 génnel transzformált 3. generációs HRC 7-szer több alifás GLS-ot tartalmazott, de a GLS szint ebben az esetben is alacsonyabb volt az anyanövényhez viszonyítva (115).

Összegezve, torma HRC-kat ezidáig elsősorban HRP termeltetésre alkalmazták sikeresen, mindössze néhány tanulmány foglalkozott a Brassicaceae HRC-k GLS termeltetésével, elicitálásával, mely során az egyes GLS-ok szintjét sikeresen növelni tudták, de az anyanövényhez viszonyítva az össz-GLS szint minden esetben alacsonyabb volt a HRC-kban. A torma HRC-k GLS-MYR-ITC rendszerével kapcsolatban hiányosak a rendelkezésünkre álló információk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk során célunk volt torma (*Armoracia rusticana*) hairy root vonalak létrehozása; biológiailag aktív vegyületek, valamint enzimatis variabilitásuk, a GLS-MYR-ITC rendszer tanulmányozása. A HRC vonalakat vizsgáltuk GLS, MYR, és a GLS-ok illékony bomlástermékeire (ITC, nitril), valamint peroxidázra. Ezen felül célul tűztük ki a különböző növényi szervekből (levéllemezből és levélnyélből) létrehozott genetikai vonalak összehasonlítása a fent említett tulajdonságok alapján.

Az *in vitro* kultúrák analízisén túl célunk volt a torma illóolaj (természetben előforduló ITC-ok keveréke) biológiai hatásai közül az antifungális hatásmechanizmusának a feltérképezése. A vizsgálatokhoz a fonalas gombák közé tartozó, tüdő aszpergillózist okozó humán patogén *Aspergillus fumigatus*-t, valamint apatogén modell szervezet párját, az *Aspergillus nidulans*-t; illetve a kandidiázisért felelős humán patogén sarjadzó gomba *Candida albicans*-t és apatogén modell szervezetként a *Saccharomyces cerevisiae*-t választottuk. Továbbá igazolni kívántuk a torma illóolaj hatását folyékony és illékony közegben. A hatásmechanizmus felderítéséhez *Candida albicans*-on vizsgáltuk a torma illóolaj, ill. az AITC és PEITC sztenderdek hatását. Az oxidatív stresszhatás hipotézisünk igazolásához célunk volt a torma illóolaj különböző oxidatív stresszt kiváltó antifungális szerekkel való interakció vizsgálata, valamint az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó molekulák, ill. enzimek szintjének molekuláris analízise, úgymint az enzimaktivitások meghatározása.

3. MÓDSZEREK

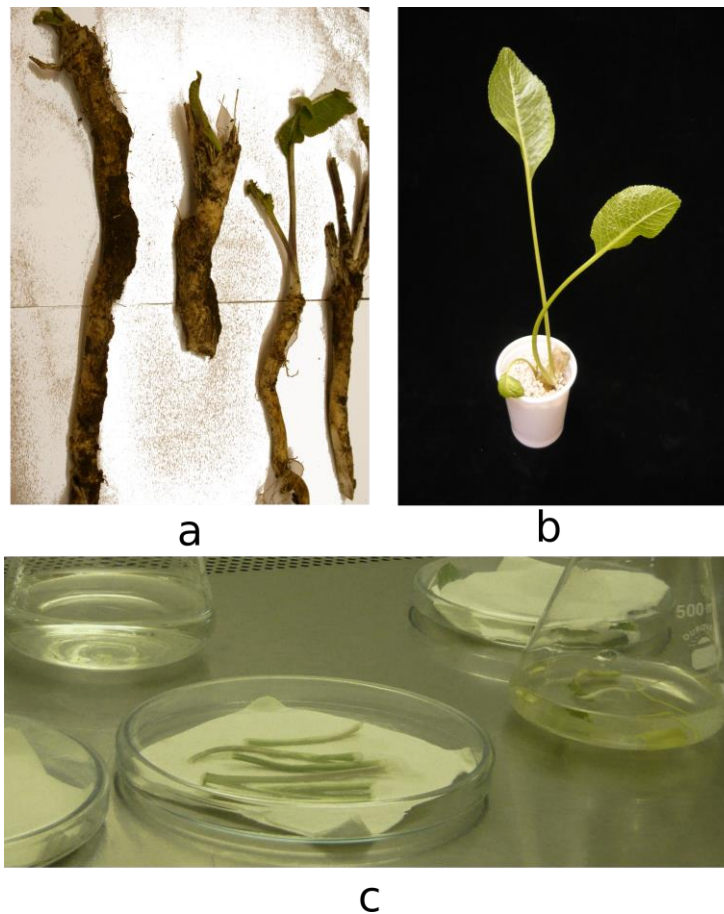
3.1. *Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata*

3.1.1. *Növényi anyagok, in vitro kultúrák, transzformáció*

A vizsgálatokhoz a Borsod-Abaúj-Zemplén megyei Királdról származó *Armoracia rusticana* (Gaertn. Mey. et Scherb.) rizómákat (4.a ábra) alkalmaztunk anyanövényként.

A megtisztított gyökereket fungazol kezelést követően steril perlitbe ültettük, és műanyag palackban hajtottuk (4.b ábra). A gyökéren újonnan kihajtott levéllemezek és levélnevek eltávolítását követően 0,01% (v/v) Tween-80-at tartalmazó Na-hipoklorid vizes oldatával (3-szoros hígítás) 30 percen keresztül felületileg sterilizáltuk agitáció mellett, majd háromszor öblítettük steril desztillált vízzel (4.c ábra). Ezután a levéllemezeket és nyeleket 3,0% (m/v) szaharóz és 0,7% agar tartalmú Murashige-Skoog által kidolgozott (116) MS táptalajra ültettük. Ezt követően a felületileg sterilizált levéllemezeket, ill. nyeleket *Agrobacterium rhizogenes* A4, T37, 15834 és 8196 törzsekkel inokuláltuk steril tű segítségével. A fertőzött növényi szerveket 22 ± 2 °C-on, 12 órás foto-periódus mellett inkubáltuk.

Kettő-négy héttel az inokulációt követően, a fertőzés helyén genetikailag különböző hairy root klónok jelentek meg melyeket elkülönítve izoláltunk. A baktériumok eliminációja érdekében az egyes klónokat antibiotikum tartalmú (1 g/l ampicillin (Sigma, Budapest, Magyarország) és 250 mg/l cefotaxim (Sigma)) szilárd MS táptalajra (+ 3,0 % (m/v) szaharóz, 0,7 % agarral szilárdítva) helyeztük, 4 hét után az átoltást azonos összetételű táptalajra megismételtük. Ezt követően kétszer 4 hétre 500 mg/l ampicillin (Sigma) és 125 mg/l cefotaxim (Sigma) antibiotikum tartalmú szilárd MS táptalajra oltottuk át a klónokat. A baktérium mentesítést követően 2% szaharóz tartalmú táptalajt alkalmaztunk. Felszaporítás céljából 40 ml folyékony antibiotikum mentes MS (agar mentes) táptalajt tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban neveltük. A folyadék-kultúrákat 100 rpm-en rázószekrényben (Braun, Melsungen) 22 ± 2 °C, sötétben tenyésztettük. A HRC-k 1-2 cm-es csúcsi részeit 4 hetente friss táptalajba átoltottuk.



4. ábra Sterilizált torna növényi szervek létrehozása. **a:** Királdi termőföldből származó *Armoracia rusticana* anyanövény gyökerek, **b:** steril perlitben, műanyag palackban kihajtott torna, **c:** a friss hajtások levélgyeinek sterilizálása az agrobaktériumos inokuláció előtt.

3.1.2. A géntranszformáció igazolása polimeráz láncreakcióval

Az összes létrehozott HRC vonal DNS izolálását követően (Promega Kit, Madison, WI, USA) polimeráz láncreakcióval (PCR) igazoltuk a géntranszformációt. Negatív kontrollként az anyanövényből, pozitív kontrollként az *A. rhizogenes* A4 baktérium tenyészetből izolált DNS-t alkalmaztuk. A PCR reakcióhoz *RolC* primereket (szintetizálta: Bio Basic Canada Inc. (106)) és Promega Kit-et használtunk. Soudek és mtsai (105) PCR programjának módosított változatát alkalmaztuk: denaturáció 2 perc, 94 °C; amplifikációs ciklus 30-szor: 0,5 perc, 94 °C; 1 perc annotáció, 59 °C; 1,5 perc DNS szintézis, 72 °C; ezt követően a mintákat 4 °C-on tartottuk a Bio-Rad iCycler

készülékben (Hercules, CA, USA). Agaróz gélelektroforézist követően (55 V) UV fény alatt, 260 nm-en detektáltuk a *rolC* geneket. Az analízist 2 technikai ismétlésben végeztük el, azonos eredménnyel.

3.1.3. *Biomassza produkció*

A HRC-kat 40 ml folyékony MS tápközeget tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban szaporítottuk fel. Rázószekrényben (Braun, Melsungen) 100 rpm-en, 22 ± 2 °C-on, sötétben tenyésztettük a különböző klónokat. A friss hairy root csúcsok átoltása előtt a lemértük a friss tápközeget tartalmazó lombikok tömegét analitikai mérlegen. Miután steril lamináris fülkében átoltottuk a HRC-kat, lemértük az immár HRC csúcsokat és tápközeget is tartalmazó lombikok tömegét. A két mérés különbségéből megkaptuk az átoltott HRC tömegét. Négy hét elteltével a HRC-kről leitattuk a tápközeget, majd megmértük a friss tömegüket. A biomassza produkciót napi növekedési indexként (DGI) határoztuk meg ($DGI = (\text{végső tömeg}/\text{kiindulási tömeg})/\text{tenyésztési napok száma}$ (117)). A szárazanyag tartalom (%) meghatározásához száraz tömeget is mértünk liofilizált (Christ, Melsungen) mintákból.

3.1.4. *Folyadékkromatográfiás-elektrospray ionizációs-tömegspektrometriás vizsgálatok*

Minta előkészítés: négy hetes liofilizált minták vizes kivonatait analizáltuk folyadékkromatográfiás-elektrospray ionizációs-tömegspektrometriás (LC-ESI-MS/MS-el). Pontosabban bemért, hozzávetőleg 50 mg száraz tömegű (DW) mintákat 80 °C-on 5 percen át hőkezeltük, hogy inaktiváljuk a MYR enzimet. Miután Eppendorf csövekben kvarchomokkal homogenizáltuk a mintákat, 1000 µl forrásban lévő steril bi-desztillált vizet adtunk hozzá. A mintákat vortexeltük, majd 90 °C-os vízfürdőbe helyeztük 10 percre. A vortexelt mintákat 3000 rpm fordulaton 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót azonos körülmények között újra centrifugáltuk, majd az így kapott felülúszót steril bidesztillált vízzel 5 ml-e hígítottuk, melyből 1,5 ml-t 0,22 µm RC membránon (FilterBio RC Syringe Filter; Labex Ltd.) szűrtük az analitikai vizsgálatokhoz.

Reverz fázisú magas fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC): Agilent 1100 HPLC rendszert (Santa Clara, CA, USA) alkalmaztunk; oszlop: Zorbax SB-C18 (150 × 3,0 mm; I.d 3,5 µm), 30 °C-on tartva; eluensek: A: 0,1% hangyasav, B: metanol; 0–30

perc: eluens B 10%-tól 40%-ig; 30–31 perc: eluens B 40%-tól 100%-ig; 31–37 perc: eluens B 10%; áramlási sebesség: 0,3 ml/perc; injektálási mennyiség: 5 µl.

ESI-MS/MS: Agilent 6410 Tripla Quadrupole készüléken Electrospray ion forrást alkalmaztunk, a méréseket negatív ion módban végeztük.

ESI beállítások: nitrogén gáz hőmérséklet 350 °C, nebulizer nyomás 45 psi, szárító gáz áramlási sebesség 9 liter/perc, kapilláris feszültség: 3500 V, fragmentor feszültség: 100 V; ütközési energia: 25–30 eV (szerkezettől függően). A ütközési energia, prekursor és termék ionok adatait a 4. táblázat mutatja be. Az azonosítás Agneta és mtsai (2,118), Rochfort és mtsai (119), valamint Fabre és mtsai (120) tanulmányain, valamint autentikus sztenderdekkel (GLN and SIN) való összehasonlításon alapult. Az azonosított GLS-ok MS² fragmenseit a 11. ábra szemlélteti az Eredmények fejezetben.

A GLS-ok kvalitatív és kvantitatív mérését is végeztük. A kvantitatív mérésekhez GLN és SIN sztenderdek 4-4 pontos kalibrációját alkalmaztuk 0,066-33,333 µg/ml tartományban. A kalibrációs egyenesek adatai a következők voltak: SIN: R²=0,9994; $f(x)=1,020x+3,0043$; GLN: R²=0,9998; $f(x)=0,9843x+3,5342$.

Az alkalmazott módszer Bennett és mtsai (121), Argentieri és mtsai (122), Agneta és mtsai (118), valamint Sansom és mtsai (123) tanulmányain alapult.

3.1.5. Gázkromatográfiás-tömegspektrometriás vizsgálatok

Mintaelőkészítés: friss, 4 hetes HRC mintákból pontosan bemért, megközelítőleg 350 mg friss mintákat dörzsöltünk el kvarchomokkal Eppendorf-csővekben, majd lezárva 7 percig inkubáltuk. Ezt követően 700 µl acetont pipettáztunk hozzá, vortexeltük, majd centrifugáltuk 1 percig 13 000 rpm fordulaton. A felülúszót azonos körülmények között újra centrifugáltuk, majd 0,22 µm-es pórusátmérőjű RC membrán szűrőn (FilterBio RC Syringe Filter; Labex Ltd., Budapest, Magyarország) szűrtük az analízishez. Az eredményeket száraz tömegre vonatkoztatva határoztuk meg.

Gázkromatográfiás-tömegspektrometria (GC-MS): Szűcs és mtsai (6) módszerének módosított változatát alkalmaztuk. Az injektálás split módban történt (15:1 split arány), injektálási mennyiség: 2 µl. A GC-MS analízist Agilent 6890 GC műszerrel végeztük, 5973N tömeg szelektív detektorral, és Chrom Card Server Ver.1.2. szoftverrel (Santa Clara, CA, USA) felszerelve. Kapilláris oszlop: 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, SLB-5ms 5% fenil-metil sziloxán. Vivő gáz: He. Áramlási sebesség: 1,6 ml/perc. Hőmérséklet

program: 50°C (3 perc); 15 °C/perc emelkedéssel 200 °C-ig (2 perc); 40 °C/perc emelkedéssel 280 °C-ig (1 perc). Analízis: 18 perc. MS körülmények: 70 eV ionizációs energia, 40–500 m/z tömeg tartomány (scan mód). Csúcs azonosítás: sztenderdek és retenciós idők alapján, ill. a tömegspektrumok és a NIST 05 könyvtár spektrumainak összevetése, és irodalmi adatok alapján (6,14,123,124) Az azonosítás a NIST 05 könyvtár-, és irodalmi adatokon, valamint autentikus sztenderdekkel (PEITC és AITC) való összehasonlításon alapult. A fő komponenseket (PEITC, MeSPITC) a teljes ion kromatogramból (TIC, total ion chromatogram) integráltuk ki. A minor komponensek integrálása szelektív ion monitorizálás (SIM, selected ion monitoring) módban történt, a következő jellegzetes m/z termék ionok alapján: AITC (99; 72; 41), PECN (91; 65; 43), IBACN (156; 155; 130; 101) (3. táblázat). Négy pontos kalibrációs egyenest készítettünk az AITC (Sigma) és PEITC (Sigma) sztenderdekből, 0,00976 µg/ml és 1,25 µg/ml tartományban. Mindhárom biológiai ismétlés mérési sorozatát kalibrációval kezdtük, mely adatai a következők: 1.ismétlés: AITC: $R^2=0,9816$; $f(x)=1,1423x+7,7568$; PEITC: $R^2=0,9776$; $f(x)=1,1429x+8,0328$; 2.ismétlés: AITC: $R^2=0,9996$; $f(x)=0,9995x+8,0007$; PEITC: $R^2=0,9950$; $f(x)=0,8845x+8,3040$; 3.ismétlés: AITC: $R^2=0,9999$; $f(x)=0,9356x+7,2445$; PEITC: $R^2=0,9990$; $f(x)=1,1499x+7,7228$.

3.1.6. A mirozináz aktivitás vizsgálata gélelektroforézissel

Minta előkészítés: Gonda és mtsai módszerével történt (16). A friss 4 hetes mintákat kvarc homokkal Eppendorf csövekben eldörzsöltük, majd 1:1 arányban (friss tömeghez viszonyítva) 20 mM pH = 6,5 Na-foszfát puffert adtunk a mintákhoz. A mintákat vortexeltük, majd 10 percig, 13 000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszóból Bradford próbával (125) meghatároztuk a kivonatok fehérje tartamát. Az enzim vizsgálatokat fehérje egységekre vonatkoztattuk.

Gél elektroforézis: Gonda és mtsai módszerének megfelelően (16) a natív poliakrilamid géleken (5,7% gyűjtő/felső gél és 10 vagy 7,5% szeparáló/alsó gél) 100 µg fehérje/µl-es mintákat vizsgáltunk, 5-szörös mennyiségű cracking pufferrel. Egyszerre 4 gélt elektroforetizáltunk 50 mA-el, 3 órán keresztül, 4°C-on, sötétben. A géleket kétszer mostuk desztillált vízzel, majd 1 mM-os Na-foszfát pufferrel amíg a pH szint le nem csökkent 7,3-ra.

A detektálás 1 mM Na-foszfátot (a teljes oldat 5%-a), 1 mM aszkorbinsavat (1%), 0,01 % metilvörös indikátort (10 %), 2,5 mg/ml szinigrint (25%) és 59 % desztillált vizet tartalmazó oldattal történt. Az előhívó oldat metilvörös indikátort tartalma okozta az intenzív vörös band-eket a GLS-ok enzimreakciója során, mely következtében HSO_4^{2-} szabadult fel. A kiértékelést CP Atlas 2.0 gélkép feldolgozó szoftverrel végeztük (zöld csatorna).

3.1.7. Peroxidáz tartalom és aktivitás

Minta előkészítés: a tenyésztési periódus végén (4 hét) begyűjtött mintákat kvarchomokkal homogenizáltuk Eppendorf csövekben. Ezt követően 50 mM pH = 7,5 Na-foszfát puffert adtunk a mintákhoz 1:1 arányban (mg:µl). A mintákat vortexeltük és 10 percig 13 000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszók fehérje tartamát Bradford próbával (125) határoztuk meg. Az enzim-vizsgálatok eredményeit aktivitás / fehérje egységben határoztuk meg (mmol pirogallol / perc / mg protein, mmol guaiacol / perc / mg protein). A gél elektroforézishez és spektrofotometriás méréshez M. Hamvas és mtsai (126) módszerét alkalmaztuk. A statisztikai elemzésekben az összes izoenzim teljes peroxidáz aktivitásával számoltunk.

3.1.8. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist R 3.5.2. szoftverrel (127) végeztük és ggplot2 (128) csomaggal vizualizáltuk. A kémiai képletek és szerkezetek rajzolásához ChemAxon MarvinSketch programot használtunk (129).

A multivariábilis statisztikai elemzéseket az összes vizsgált tulajdonság adataival végeztük. Főkomponens elemzéssel (PCA) vizsgáltuk az inokulált szerv alapján a két HRC csoportot. A box-plotok szemléltetik a statisztikai különbségeket a torma HRC-k eredetét tekintve két csoportja között (P-petiólum, LB- levéllemez) a következő tulajdonságokban: GLS-ok és bomlástermékeik, enzimaktivitások és általános paraméterek (P n = 11 és LB n = 10). Hőtérkép és hierarchikus klaszterezéssel vizsgáltuk a mért eredmények közötti korrelációkat és antikorrrelációkat. A komponensek rendezése a skálázott és központosított jellemzők adatkészlete szerint a Minkowski távolságmátrix hierarchikus csoportos elemzésével kapott sorrend szerint

történt. A csoportosítást Ward módszerével végeztük. A szín arányos Pearson két jellemző közötti korrelációs értékével.

3.2. A torma illóolaj antifungális hatásának, és hatásmechanizmusának vizsgálata

3.2.1. Antifungális kísérletek során vizsgált izotiocianátok

A kísérleteinkben alkalmazott torma illóolaj at (torma illóolaj; fő komponensek: AITC 69 ± 2 v/v %; PEITC $18,8 \pm 1,4$ v/v %; minor komponensek: egy AITC izomer 1,75 v/v %; butil-ITC 1,13 v/v %; butenil-ITC 0,35 v/v %; 4-pentenil-ITC 0,23 v/v %) a KELET PRODUCT Zrt. (Magyarország, Újléta) terméke. Az AITC és PEITC sztenderdek a Sigma-Aldrich Kft, (Magyarország) termékei. Mindhárom illóolajat - 20 °C-on tároltuk. Közvetlenül a kísérletek előtt 1 v/v % koncentrációban feloldottuk yeast extract peptone dextrose (YPD) tápközegben, melyet 5 g/l élesztő kivonatból, 10 g/l dextrózból és 10 g/l peptonból készítettünk. Az így kapott torma illóolaj/AITC/PEITC-YPD oldatokat 37 °C-on, 1 órán keresztül zárt Eppendorf csőben inkubáltuk, és 15 percenként vortexeltük.

3.2.2. Antifungális kísérletek során alkalmazott gomba törzsek

A következő gomba törzseket alkalmaztuk a kísérletek során: *Candida albicans* SC5314, *Saccharomyces cerevisiae* S288C, *Aspergillus fumigatus* AF293, *Aspergillus nidulans* FGSCA4. Valamennyi gomba törzs a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék törzsgyűjteményéből származott. A sarjadzó gombákat YPD agar táptalajon 30 °C-on tartottuk fenn, míg a fonalas gombákat minimál nitrát agar táptalajon 37 °C-on (130). A kísérletek előtt az élesztő gomba sejteket előtenyésztettük YPD tápközegben, 30 °C-on, egy éjszakán át. Az *Aspergillus* törzsek esetében 6 napos agaros táptalajon tenyésztett konídiákkal dolgoztunk.

3.2.3. A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata

A torma illóolaj illékony fázis antifungális hatásának teszteléséhez a 4 vizsgált gomba törzset a megfelelő táptalajon 4 részre osztott Petri csészében tenyésztettük. Az egyes rekeszekbe 5 μ l 1×10^5 számú élesztő sejtet (*Saccharomyces cerevisiae* S288C, *Candida albicans* SC5314) vagy konídiumot (*Aspergillus fumigatus* AF293, *Aspergillus*

nidulans FGSCA4) tartalmazó szuszpenziót inokuláltunk. A sarjadzó gombákat YPD, a fonalas gombákat minimál nitrát agaros táptalajon lettek tenyésztettük. A tiszta torma illóolaj-t (1 µl) vagy 100 µl 10-szeres hígítású torma illóolaj-YPD oldatot, (mely 1 µl tiszta illóolajat tartalmazott) egy szűrőpapírra csöppentettük, a szűrőpapírt a Petri csésze osztatának közepére helyeztük. A kultúrákat 24 °C-on 5 napig inkubáltuk. A kísérletet 2 alkalommal, alkalmanként 3-3 párhuzamos mintával végeztük el.

A torma illóolaj antifungális hatását MTT-tesztel (131) folyadék fázisban is vizsgáltuk. A gomba törzseket 1 ml 0-5 µl torma illóolaj/ ml YPD oldatot tartalmazó YPD tápközegben tenyésztettük. A tápközeget 1×10^4 élesztő sejttel vagy konídiával inokuláltuk, és 24 °C-on 1 napig inkubáltuk. A sejteket 0,05 ml 5 mg/ml-es MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) oldattal kezeltük 4 órán keresztül, ezt követően 0,3 ml HCl-SDS oldatot (20 m/v % SDS feloldva 20 mM-os HCl oldatban) adtunk a tenyészethez, melyet további 20 órán keresztül inkubáltunk. A mintákat centrifugáltuk (10 perc, 20 °C, 3000 rpm) és a felülúszóból a keletkezett MTT-formazánt detektáltuk spektrofotométerrel 550 nm-en. A mikróbák növekedését az MTT-formazán képződés alapján karakterizáltuk, és IC_{50} értékeket (az a torma illóolaj koncentráció, mely 50 %-os gátlást okoz a mikroorganizmusok növekedésében) számítottunk mind a 4 vizsgált törzsre.

A torma illóolaj, AITC és PEITC növekedést gátló hatását rázatott *C. albicans* kultúrákban is teszteltük. 0-2,5 µl/ml tápközeg torma illóolaj-, AITC- vagy PEITC-YPD oldatokat tartalmazó 20-20 ml YPD tápközeget inokuláltunk *C. albicans* 1 éjszakás előtenyészetével (kezdeti $OD_{640} = 0,1$). Az így létrehozott tenyészeteket 37 °C-on, 140 rpm-en 12 órán keresztül inkubáltuk, majd 640 nm-en mértük az optikai denzitást. Minden vizsgált koncentrációt 3 párhuzamos tenyészetben vizsgáltunk. Az átlag \pm szórás értékeket 4 párhuzamosan végzett kísérlet alapján számítottuk.

3.2.4. „Time-kill assay”

20-20 ml YPD tápközeget tartalmazó Erlenmeyer lombikokba inokuláltunk *C. albicans* sejteket, és 37 °C-on, 140 rpm-en inkubáltuk, amíg az OD_{640} elérte a 0,6-0,7-es értéket (kiindulási $OD_{640} = 0,1$). A kultúrákat a következő koncentrációjú torma illóolaj-YPD oldatokkal kezeltük: 0; 0,025; 0,25 vagy 2,5; 5; 25 µl/ml, a változásokat az OD_{640} értékeken keresztül követtük. A tenyészeteket tovább inkubáltuk 37 °C-on és 140 rpm-

en 24 órán keresztül. A kezeléstől számított alábbi időpontokban vettünk mintákat az élő sejtszám meghatározásához: 0, 3, 6, 9, 12 és 24 óra. A „0” időpontban vett mintákat 1×10^3 sejt/ml-re hígítottuk, mely szuszpenzióból 100 μ l mennyiséget szélesztettünk YPD-agar táptalajt tartalmazó Petri csészékre. A sejt sűrűségtől függetlenül a fent leírt hígítási lépéseket végeztük el valamennyi mintából. A Petri csészéket 37 °C-on 1 napig inkubáltuk, majd meghatároztuk a kialakult telepek számát. Az átlag \pm szórás értékeket 3 párhuzamos kísérlet alapján számítottuk.

3.2.5. Analitikai vizsgálatok molekuláris biológiai módszerekkel

A *C. albicans* sejeket YPD tápközegben, 37 °C-on, 140 rpm-en tenyésztettük. Amikor az OD₆₄₀ elérte a 0,6-os értéket, a tenyészeteket 0-2,5 μ l/ml torma illóolaj-YPD oldattal kezeltük, majd 3 órával a kezelés után mintát vettünk. A szuperoxid képződés méréséhez a kultúrákat 3 órával az illóolaj-YPD kezelést követően dihidroetídiummal kezeltük, és a képződött etídiumot (Et) detektáltuk. A GSH, GSSG tartalmakat és a specifikus enzim aktivitásokat 3 órával a kezelést követően detektáltuk. Az átlag \pm szórás értékeket 3 független kísérlet alapján számítottuk és ábráztuk. A kísérletet AITC-al és PEITC-al is elvégeztük.

A sejtek szuperoxid tartamán kívül a következő enzimek aktivitását mértük a korábbi tanulmányokban (132,133) leírtak alapján: kataláz, szuperoxid diszmutáz (SOD), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST) és glutation peroxidáz (GPx). Az átlag \pm szórás értékeket 3 független kísérlet alapján számítottuk.

A minták glutation (GSH) és oxidált glutation (GSSG) tartamát NADPH-GR-DTNB teszttel (134) határoztuk meg Fekete és mtsai (132) és Jakab és mtsai (133) által kidolgozott módszerek alapján.

3.2.6. A torma illóolaj és GSH, GSSG vagy GR közötti reakciók tanulmányozása

GSH-t (50 mM), GSSG-t (50 mM) vagy GR-t (35 U/ml) inkubáltunk 0,1 M Na-foszfát pufferban (pH = 7,5) 1 μ l/ml torma illóolaj-val vagy nélkül, 0,5 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően a minták GSH és GSSG tartalmát, valamint GR aktivitását határoztuk meg NADPH-GR-DTNB teszttel (134).

3.2.7. A torma illóolaj és diamid, menadion-Na-biszulfít (MSB) és 1-kloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) interakciójának vizsgálata

Az interakciókat 1 ml YPD tápközegben *Candida albicans* SC5314 sejteken 37 °C-on, 1 napos tenyésztéssel végeztük. Előkísérletek során a torma illóolaj-YPD számos koncentrációját teszteltük kombinálva a H₂O₂, diamid, MSB és CDNB számos koncentrációjával. Ezek alapján a torma illóolaj-YPD és diamid (tiol csoportok eloxidálása (135)) vagy MSB (redox ciklusban O²⁻ képződés, 4Fe-4S fehérjék károsodása (135)) között antagonista interakciót, a torma illóolaj-YPD és CDNB (GSH pool kiürítés (136)) között szinergista interakciót, míg a torma illóolaj-YPD és H₂O₂ között semmilyen interakciót nem feltételeztünk. Ezért a H₂O₂-ot elhagytuk a további kísérletek során, és a további kísérleteket arra hegyeztük ki, hogy kimutassuk az antagonizmus jelenlétét a torma illóolaj-YPD és diamid vagy MSB között, és a szinergizmust a torma illóolaj-YPD és CDNB között.

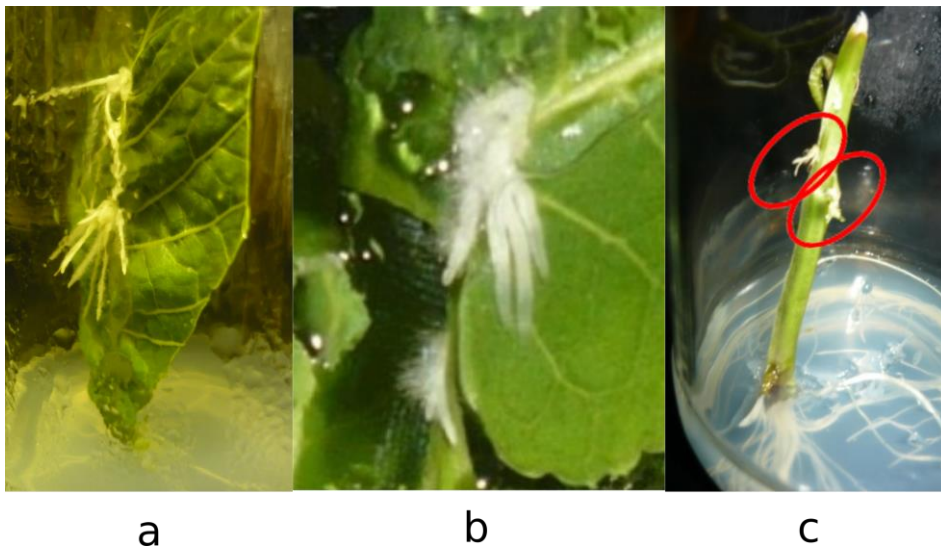
1-1 ml YPD tápközéget kiegészítettünk 0; 0,13 vagy 0,25 µl/ml torma illóolaj-YPD-vel és/vagy 9,6 vagy 16 µM MSB-vel, 6 vagy 10 µM diamiddal, 0,03 vagy 0,06 µM CDNB-vel és 1 x 10⁴ számú *C. albicans* sejttel inokuláltuk. Mindegyik kultúrát 37 °C-on 1 napig inkubáltuk. A növekedés mértékét az optikai denzitás mérésével határoztuk meg 640 nm-en. Interakciós rátát (IR) számítottunk az Abbott formulával: $IR = I_o / I_e$, ahol I_o a mért és I_e a vélt százalékos növekedés gátlás, melyet a két tesztelt komponens együttesen okoz. $I_e = X_1 + X_2 - (X_1 X_2 / 100)$, ahol $X_{1,2}$ jelenti a két tesztelt komponens egyenkénti növekedés gátló hatását. $IR > 1,5$ érték szinergista, $1,5 > IR > 0,5$ additív, és $IR < 0,5$ antagonista interakciót jelent (137). Átlag ± szórás értékeket 3 független kísérlet alapján számítottunk.

4. EREDMÉNYEK

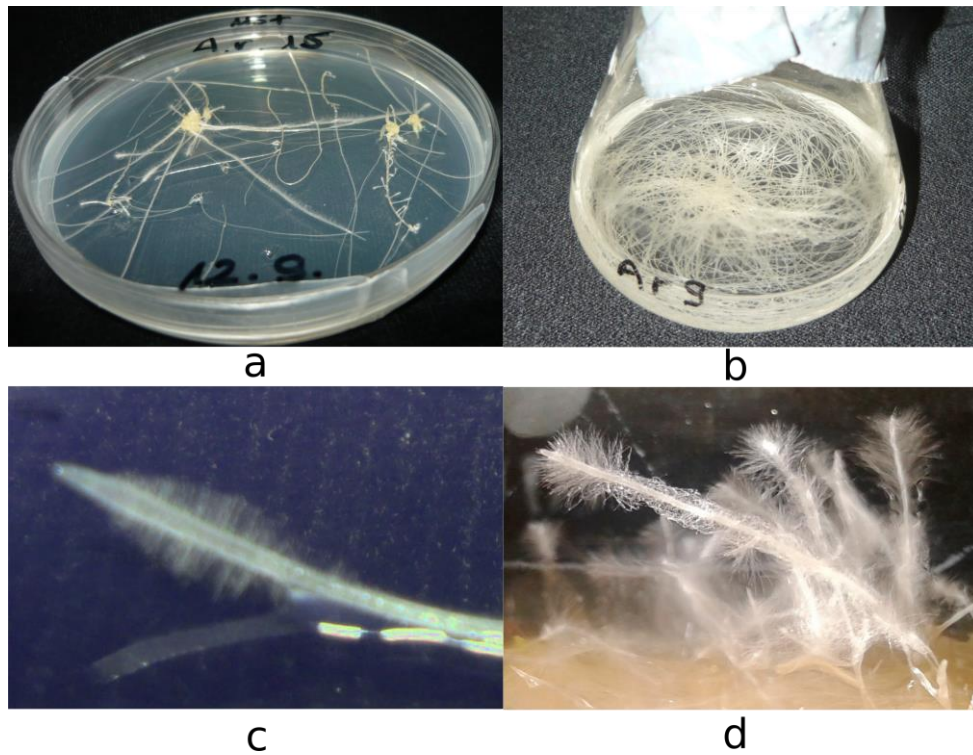
4.1. *Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata*

4.1.1. *In vitro HRC-k*

Az 50 izolált HRC vonalból 21 volt életképes; 11-et a levéllemez fertőzéséből (ArLB, *Armoracia rusticana* Leaf Blade, 5.a és 5.b ábra), 10-et pedig a levélnyel inokulálásából (ArP, *Armoracia rusticana* Petiolum, 5.c ábra), izoláltunk (5. és 6. ábra). Az összes életképes vonalat az *A. rhizogenes* A4 törzssel való inokulálással hoztuk létre. A T37, 15834 és 8196 *A. rhizogenes* törzsekkel való fertőzéssel mindössze néhány vonalat kaptunk, melyek az antibiotikus kezelés alatt (6.a ábra) instabilnak bizonyultak. A biomasza felszaporítás a Módszerek fejezetben leírtak szerint folyékony tápközegben történt (6.b ábra).



5. ábra Kettő-négy héttel az inokulációt követően, a fertőzés helyén genetikailag különböző hairy root klónok jelentek meg. **a** és **b**: levéllemezen (ArLB klónok), **c**: levélnyélen (ArP klónok)

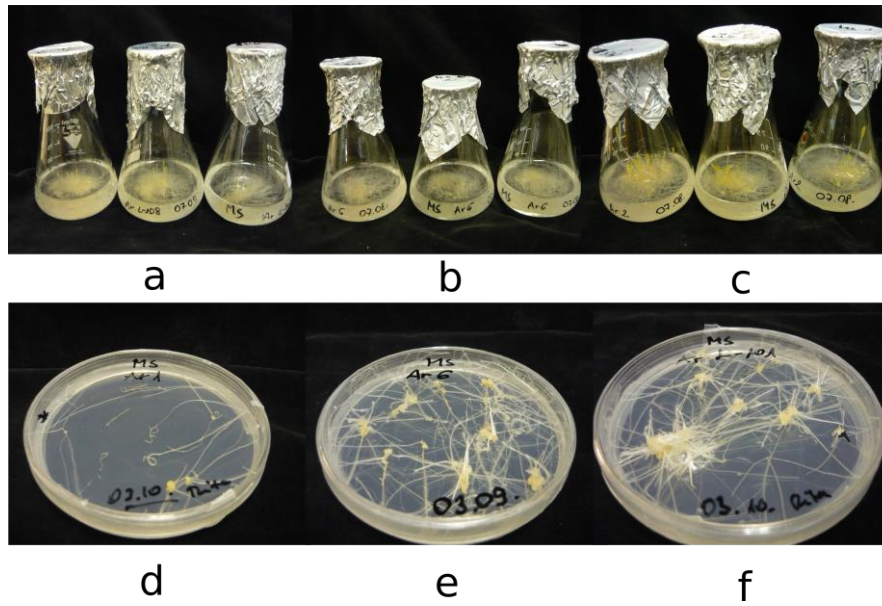


6. ábra Torma hairy root kultúrák **a:** fenntartása antibiotikus szilárd agaros, **b:** felszaporítása folyékony MS táptalajon. Hairy root-ok morfológiája a levegőbe nyúló csúcsokon **c:** szilárd agaros-, **d:** folyékony MS táptalajon.

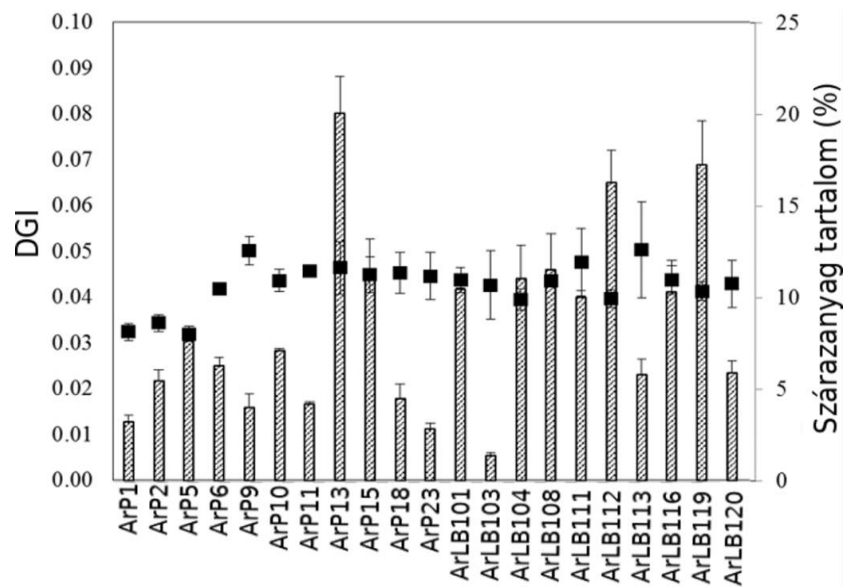
4.1.2. Morfológiai értékelések és biomassza produkció

A HRC-k morfológiai tulajdonságai közül az elágazó és járulékos hajtás képző képességet, valamint a GLS mérések vizes kivonatainak rózsaszín színét vizuálisan értékeltük, a kapott értékeket felhasználtuk a multi-statisztikai elemzéshez (6. táblázat, 7. ábra).

A biomassza produkció jellemzéséhez napi növekedési indexet (DGI) és szárazanyag tartalmat határoztunk meg (8. ábra, 6. táblázat).



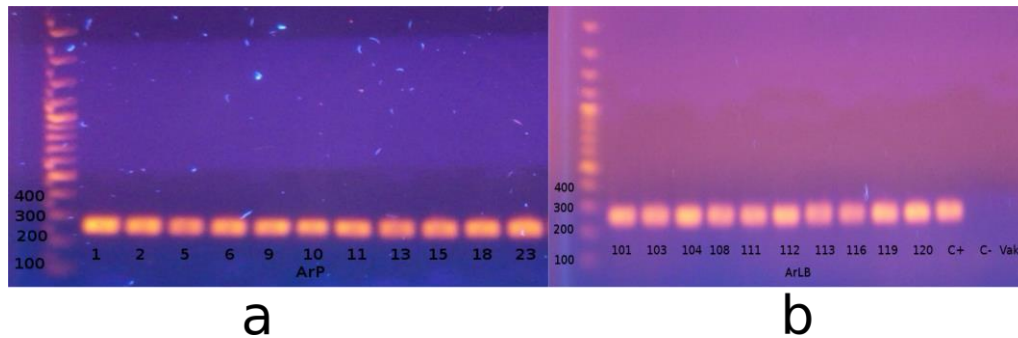
7. ábra Az *Agrobacterium rhizogenes* A4-es törzsszel transzformált *Armoracia rustica* HRC-k vizuálisan értékelt morfológiai különbségei (a)-(c): járulékos hajtásképződés (AddShoot); értékek: (a): 0; (b): 1; (c): 2. (d)-(f): Elágazás (Branching); értékek: (d): 0; (e): 1; (f): 2.



8. ábra Az *Agrobacterium rhizogenes* A4-es törzsszel transzformált *Armoracia rustica* HRC-k napi növekedési indexe, valamint szárazanyag tartalma.

4.1.3. A géntranszformáció igazolása

A HRC-kba beépült bakteriális *RolC* gén jelenlétét minden klón esetében megerősítettük PCR analízissel. Pozitív kontrollként az *A. rhizogenes* A4 törzs DNS-ét, negatív kontrollként az anyanövény DNS-ét alkalmaztuk (9. ábra).



9. ábra *Armoracia rusticana* HRC-k PCR analízise **a:** ArP vonalak, **b:** Ar LB vonalak.

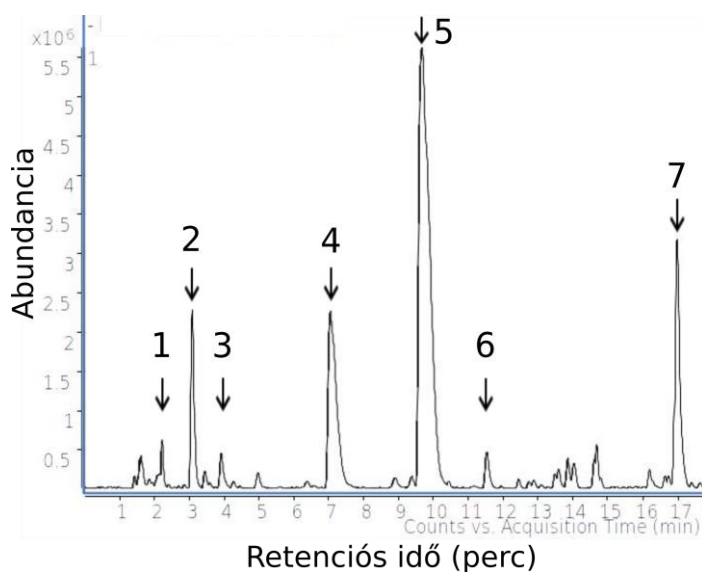
4.1.4. GLS-ok azonosítása a torma HRC-kban LC-ESI-MS/MS analízissel

A jellegzetes fragmensek (110,118,120–124) alapján (11. ábra), hét GLS-ot azonosítottunk (10. ábra, 3. táblázat) a HRC-k vizes kivonatából, melyek a következők: 1: szinigrin (SIN); 2: glükoiiberin (IBER), 3: glükoiбарin (GIB); 4: glükobrasszicin (BRASS); 5: glükonaszturtiin (GLN); 6: 4-metoxi-glükobrasszicin, vagy neoglükobrasszicin (NEO); 7: glükaorabishirsutain (ARAB). A detektált GLS-ok az oldalláncaik alapján különböző osztályokba sorolhatóak; alifás, aromás, indol- és tiometilalkil-GLS-okat is kimutattunk.

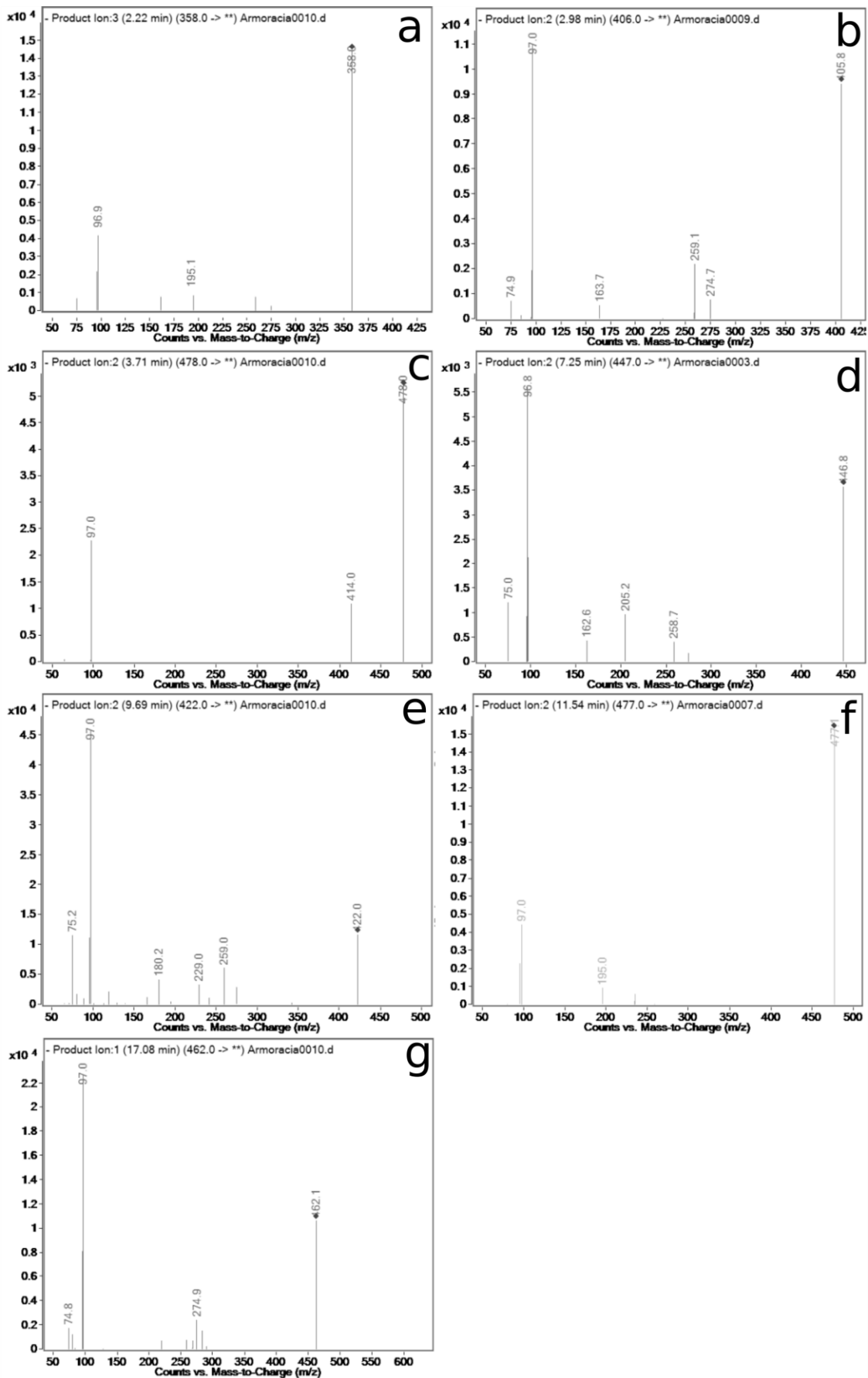
3. táblázat: *Armoracia rustica* HRC-kból LC-ESI-MS/MS-el (feltételesen) azonosított GLS-ok, és a kvantitatív analízishez felhasznált MS² fragmensek.

ID	(Feltétele- sen) azonosított GLS-ok	[M-H] ⁻ (m/z)	Rt (perc) ¹	GLS osztály	MS ² (m/z)	CE (V) ²
	1	SIN	358	2,22	alifás	195,1; 97,0; 75,3
2	IBER	406	2,98	alifás	258,8; 97,0; 75,1	30
3	GIB	478	3,71	alifás	414,0; 97,0	25
4	BRASS	447	7,06	indol	258,8; 205,0; 96,9; 75,0	25
5	GLN	422	9,69	aromás	259,0; 180,2; 97,0; 75,2	25
6	NEO	477	11,63	indol	259,1; 195,2; 74,7; 96,8	25
7	ARAB	462	17,08	alifás	274,9; 97,0; 74,8	30

¹ retenciósi idő; ² ütközési energia



10. ábra Az *Agrobacterium rhizogenes* A4-es törzssel transzformált *Armoracia rustica* HRC-kból LC-MS/MS-el mért reprezentatív BPC szken kromatogram. Azonosított és feltételesen azonosított természetes GLS-ok: 1: szinigrin; 2: glükoiibererin, 3: glükoiбарin; 4: glükobrasszicin; 5: glükonaszturtiin; 6: 4-metoxi-glükobrasszicin, vagy neoglükobrasszicin; 7: glükaorabishirsutain.



11. ábra Az *Armoracia rusticana* HRC-kből azonosított és feltételesen azonosított GLS-ok fő MS² fragmensei. **a:** Szinigrin: 195,1; 96,9; 75,3; **b:** glükoiberberin: 274,7; 259,1; 79,0; 74,9; **c:** glükoibarin: 414,0; 97; **d:** glükobrasszicin: 258,7; 205,2; 162,6; 96,8; 75,0; **e:** glükonaszturtiin: 259,0; 229,0; 180,2; 97,0; 75,2; **f:** 4-metoxi- vagy neoglükobrasszicin: 195,0; 97,0; **g:** glükaorabishirsutain: 274,9; 97,0; 74,8.

A jellegzetes GLS fragmensek 259 (szulfoglükóz) és 75 (H₃SCN), mindegyik feltételesen azonosított GLS molekulában jelen voltak, minimum minor fragmenseként. A 97-es fragmens (HSO₄) minden vizsgált GLS molekulában bázis fragmenseként volt jelen (10. ábra). A komponensek azonosítása irodalmi adatokkal (118–120) és sztenderdekkel (GLN és SIN) való összehasonlításon alapult.

A multivariábilis statisztikához felhasznált kvantitatív mérési eredményeket a 6. táblázat tartalmazza.

4.1.5. GLS bomlástermékek - ITC-ok és nitrilek detektálása torma HRC-kből GC-MS vizsgálatokkal

A PEITC, a glükonaszturtiin (GLN) bomlásterméke (4. táblázat, 12. ábra) bizonyult a torma HRC-k ITC főkomponensének. Nem minden detektált GLS ITC párja volt kimutatható a GC-MS mintákból (12. ábra, 5. táblázat). Például az aromás ITC/nitril komponensek nem voltak dominánsak, de a 3-metiltiopropil-ITC (MeSPITC), ami a glükoiberberin (IBER) terméke, nagy mennyiségben volt jelen a mintákban. A jelenség hátterében állhat a HRC-k eltérő MYR enzim mintázata (későbbi fejezetekben részletezve).

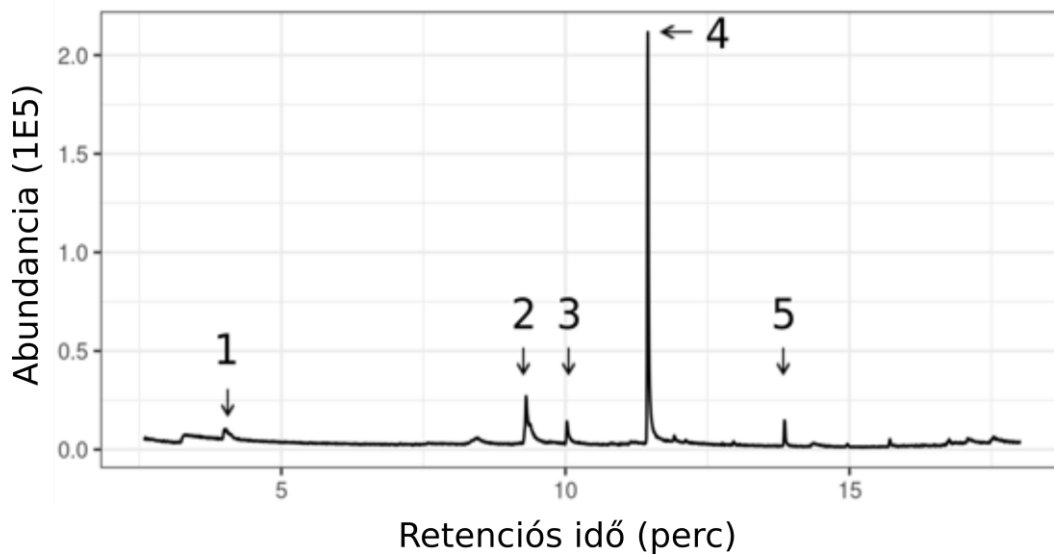
Annak ellenére, hogy 7 GLS-ot detektáltunk, bomlástermékeik közül mindössze 3 ITC-ot (AITC, MeSPITC, PEITC), és 2 nitrilt tudtunk azonosítani (12. ábra, 4. táblázat), melyek közül a 3-fenilpropionitril (PECN, 5. táblázat) a fő GLS, a GLN hidrolitikus bomlásterméke (114,121).

A multivariábilis statisztikához felhasznált kvantitatív mérési eredményeket a 6. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: *Agrobacterium rhizogenes* A4 törzssel transzformált *Armoracia rustica* HRC-kból GC-MS-sel azonosított és feltételesen azonosított ITC-ok és nitrilek.

ID	(Feltételesen) azonosított ITC/ nitril	[M-H] ⁻ (m/z)	Rt (min) ¹	ITC/nitril osztály	MS (m/z)	Prekurzor GLS
1	AITC	99	4,6	Alifás	99; 72; 41	(SIN)
2	PECN	131	9,3	Alifás	91; 65; 43	(GLN)
3	MeSPITC	147	10,0	Alifás	101; 72; 61; 41	(IBER)
4	PEITC	163	11,4	Aromás	163;105; 91	(GLN)
5	I3ACN	155	14,4	Indol	156; 155; 130; 101	(BRASS, NEO)

¹ retenciós idő



12. ábra Az *Agrobacterium rhizogenes* A4-es törzssel transzformált *Armoracia rustica* HRC-kból GC-MS-sel mért reprezentatív XIC kromatogram. Azonosított és feltételesen azonosított természetes GLS bomlástermékek: 1: AITC; 2: PECN; 3: MeSPITC; 4: PEITC; 5: I3ACN.

5. táblázat GLS-ok, és enzimatis ITC és nitril termékeik (6,138–140).

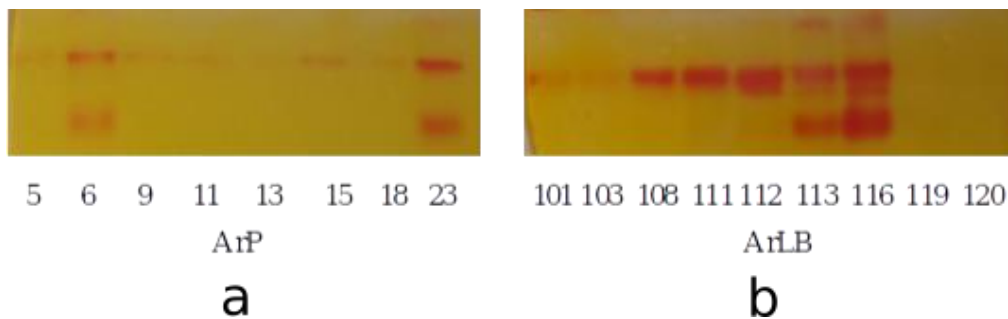
GLS	GLS hidrolitikus termékei	
	ITC	Nitril (115,141)
Szinigrin (SIN) ^a	Allil-ITC (AITC) ^a	Allil-cianid
Glükoberberin (IBER) ^a	3-(metiltio)propil-ITC (MeSPITC) ^a	4-(metiltio)-butánnitril
Glükobarin (GIB) ^a	7-(metilszulfonil)-heptil-ITC	NA
Glükobrasszicin (BRASS) ^a	3-indolilmetil-ITC	indol-3-acetonitril (I3ACN) ^a
Glükonasturtiin (GLN) ^a	2-feniletal-ITC (PEITC) ^a	3-fenilpropionitril (PECN) ^a
4-metoxi -vagy neoglükobrasszicin (NEO) ^a	4 -metoxiindol-3-ilmetil- vagy 1 -metoxiindol-3- ilmetil-ITC	1-metoxiindol-3- acetonitril
Glükoarabishirsutain (ARAB) ^a	7-(metiltio)-heptil-ITC	NA

Jelölések: ^a: Komponensek, melyeket a vizsgálataink során detektáltunk az *A. rusticana* hairy root kultúrákban; NA, nincs adat.

4.1.6. Torma HRC-k enzim tartama

4.1.6.1. MYR aktivitás

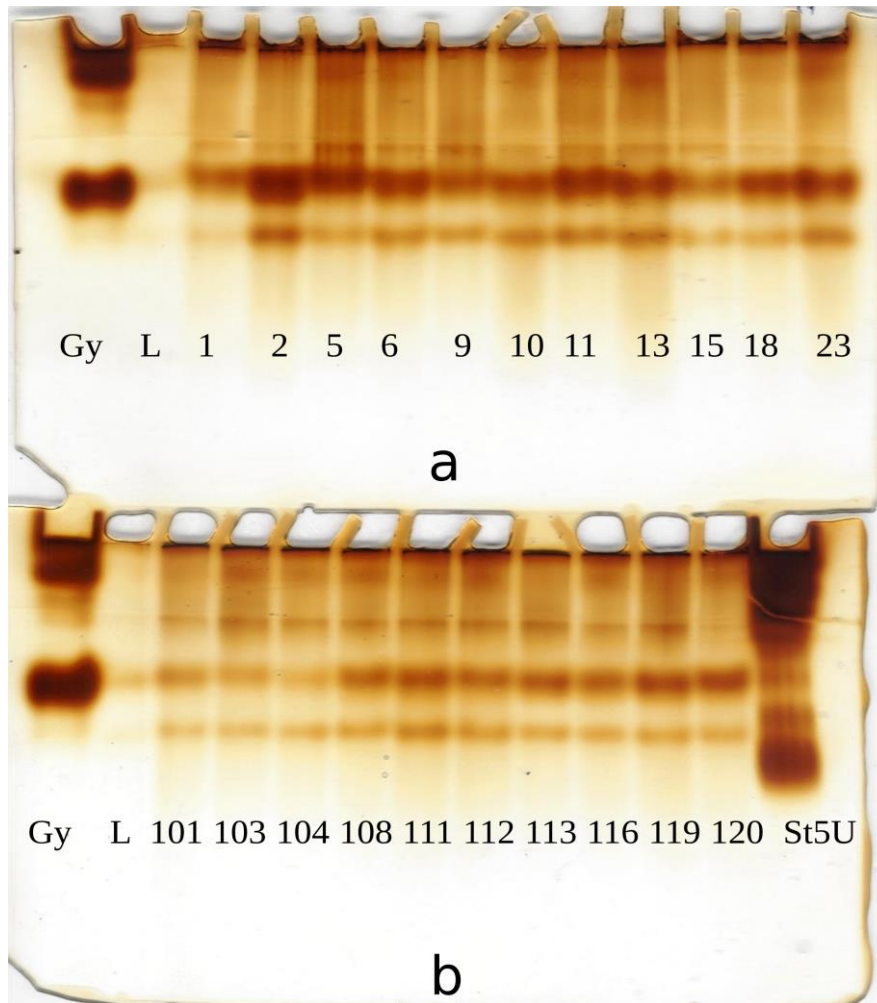
Natív poliakrilamid géleken 3 különböző MYR izoenzimet figyeltünk meg (13. ábra). Az ArP és ArLB csoportokba tartozó HRC-k látható variabilitást mutatnak. A Myr2 izoenzim szinte minden klónban jelen volt (13. ábra, 6. táblázat). Néhány HRC (ArLB113, ArLB116, ArP23) 3 izoenzimet is tartalmazott. A HRC-k különböző izoenzim mintázata (13.a és 13.b ábra) magyarázhatja a bioaktív illékony komponensek eltérő jelenlétét.



13. ábra Torma (*Armoracia rusticana*) HRC-k MYR aktivitásának detektálása natív poliakrilamid gélen, **a**: levélnyélből létrehozva (ArP), **b**: levéllemezből létrehozva (ArLB) látható variabilitást mutat.

4.1.6.2. Peroxidáz tartalom és aktivitás

Irodalmi adatok alapján (86,102) a torma HRC-k torma peroxidázt (HRP) termelnek. A két alkalmazott módszer (gél analízis és spektrofotometria) összevethető eredményeket adott (6. táblázat) mindkét vizsgált szubsztráttal (pirogallol, gvajakol), a korrelációs értékek 0,70 fölött voltak ($p < 0,001$). A géleken 5 izoenzim volt látható (14. ábra).



14. ábra *Armoracia rustica* HRC-k torma peroxidáz (HRP) gél-analízise. Minták: R, torma gyökér; L, *in vitro* torma növényke levele; levéllemezéből létrehozott HRC-k (“ArLB”, 101-120); levélnyélből létrehozott HRC-k (“ArP”, 1-23); 5 egység HRP enzim sztenderd (St5U).

6. táblázat *Armoracia rusticana* HRC-k vizsgált tulajdonságainak adatai.

HRC minták	Ism	Bran- ching	Add- shoot	Kivo- nat színe	DWpc	DGI	Teljes MYR aktivi- tás (gélén)	MYR 1. band	MYR 2. band	MYR 3. band	Prot Cont ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sz.t.)	HRP aktivitás (mmol pirogallol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (mmol gvajakol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (abundancia, pirogallol szubsztrát)	HRP aktivitás (abundancia, gvajakol szubsztrát)
ArP 1	1	0	0	0	8,09	0,012	2	NA	NA	NA	0,553	137,6	231,0	19018,3	9969,3
ArP 2	1	0	2	0	8,58	0,021	1	NA	NA	NA	0,143	198,7	265,1	48652,2	14736,8
ArP 5	1	2	0	0	7,99	0,031	0	9	44	25	0,253	145,7	215,4	61962,9	10601,7
ArP 6	1	1	0	0	10,43	0,024	0	25	154	127	0,215	148,0	245,6	57393,0	10373,5
ArP 9	1	0	2	0	12,53	0,015	0	9	39	14	0,132	247,8	352,1	49787,8	11840,8
ArP 10	1	NA	2	0	10,89	0,028	1	NA	NA	NA	0,131	167,6	332,5	49371,3	13365,7
ArP 11	1	0	1	0	11,40	0,016	0	0	20	0	0,108	170,0	298,0	43114,1	13164,7
ArP 13	1	0	2	0	11,60	0,080	0	0	0	0	0,209	100,2	175,9	40935,3	11926,1
ArP 15	1	2	1	0	11,22	0,046	0	0	37	0	0,136	148,9	197,6	41508,1	9035,2
ArP 18	1	NA	0	0	11,30	0,017	0	0	28	0	0,114	124,3	253,2	39225,8	10490,3
ArP 23	1	0	2	0	11,13	0,011	2	0	88	144	0,203	137,9	217,5	51118,6	13630,7
ArLB 101	1	2	2	1	10,92	0,041	2	0	171	0	0,171	101,8	140,4	33078,3	31365,2
ArLB 103	1	1	0	1	10,64	0,005	1	0	90	0	0,279	149,4	427,0	33999,4	38292,0
ArLB 104	1	1	2	0	9,87	0,043	0	NA	NA	NA	0,377	127,2	145,8	21008,7	30965,4
ArLB 108	1	2	1	0	10,88	0,045	1	0	274	0	0,296	529,9	879,4	26356,5	41720,5
ArLB 111	1	1	2	0	11,89	0,039	0	0	444	0	0,159	131,2	154,4	40302,9	42463,2
ArLB 112	1	1	1	0	9,90	0,065	1	0	412	0	0,263	181,3	249,9	35624,2	34703,1
ArLB 113	1	1	2	0	12,57	0,023	0	11	217	279	0,089	229,7	388,7	56746,9	33764,6
ArLB 116	1	2	2	2	10,91	0,041	1	37	289	352	0,341	164,9	164,6	60836,4	33233,5
ArLB119	1	0	0	0	10,32	0,068	0	0	0	0	0,331	123,9	141,4	42924,5	27849,4
ArLB120	1	1	2	0	10,71	0,023	0	0	0	0	0,306	151,7	219,2	71720,9	32258,3

HRC minták	Ism	Bran- ching	Add- shoot	Kivo- nat szine	DWpc	DGI	Teljes MYR aktivi- tás (gelen)	MYR 1. band	MYR 2. band	MYR 3. band	Prot Cont (ug/ mg sz.t.)	HRP aktivitás (mmol pirogallol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (mmol gvajakol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (abundancia, pirogallol szubsztrát)	HRP aktivitás (abundancia, gvajakol szubsztrát)
ArP 1	2	0	0	0	8,09	0,013	3	NA	NA	NA	0,753	77,1	179,3	99281,3	44829,1
ArP 2	2	0	2	0	8,58	0,022	1	NA	NA	NA	1,001	239,4	514,4	127571,2	67748,4
ArP 5	2	2	0	0	7,99	0,032	3	0	33	0	0,937	197,6	366,9	117851,6	74476,0
ArP 6	2	1	0	0	10,43	0,025	2	0	115	38	0,783	212,3	343,3	103260,3	64358,3
ArP 9	2	0	2	0	12,53	0,016	3	0	73	0	1,395	175,0	515,0	100553,8	59757,2
ArP 10	2	NA	2	0	10,89	0,028	2	NA	NA	NA	0,477	353,1	591,1	104020,1	62566,1
ArP 11	2	0	1	0	11,40	0,017	0	0	17	0	0,757	212,2	462,1	111839,8	67801,3
ArP 13	2	0	2	0	11,59	0,080	0	0	19	0	0,483	306,9	469,7	132780,1	75201,1
ArP 15	2	2	1	0	11,22	0,046	0	0	18	0	0,811	193,3	233,2	116610,1	51503,6
ArP 18	2	NA	0	0	11,30	0,018	0	0	53	0	0,660	125,0	184,6	122090,7	50105,4
ArP 23	2	0	2	0	11,13	0,011	0	0	120	99	0,540	204,1	290,4	150150,7	61082,0
ArLB 101	2	2	2	1	10,92	0,042	0	0	121	3	0,685	148,6	228,3	130560,7	40021,3
ArLB 103	2	1	0	1	10,64	0,005	2	0	104	0	0,635	218,6	386,0	138632,5	47035,5
ArLB 104	2	1	2	0	9,87	0,044	NA	NA	NA	NA	0,450	166,9	211,1	138363,7	42823,5
ArLB 108	2	2	1	0	10,88	0,046	2	0	244	0	0,839	184,4	319,6	140852,8	52838,2
ArLB 111	2	1	2	0	11,90	0,040	2	0	447	0	0,778	241,8	240,2	163756,4	62805,9
ArLB 112	2	1	1	0	9,90	0,065	2	0	513	0	0,571	183,8	202,4	159912,7	60849,4
ArLB 113	2	1	2	0	12,57	0,023	1	23	175	217	0,606	195,6	334,1	185964,9	55013,8
ArLB 116	2	2	2	2	10,91	0,041	1	49	243	328	0,894	170,7	291,0	181044,6	51931,0
ArLB119	2	0	0	0	10,32	0,069	1	0	0	0	0,889	139,5	282,3	168933,3	62639,3
ArLB120	2	1	2	0	10,71	0,023	1	0	0	0	0,577	157,4	320,7	170088,2	59614,7

HRC munták	Ism	Bran- chung	Add- shoot	Kivo- nat színe	DWpc	DGI	Teljes MYR aktivi- tás (gélén)	MYR 1. band	MYR 2. band	MYR 3. band	Prot Cont (ug/ mg sz.t.)	HRP aktivitás (mmol pirogallol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (mmol gvajakol/ perc/mg fehérje)	HRP aktivitás (abundancia, pirogallol szubsztrát)	HRP aktivitás (abundancia, gvajakol szubsztrát)
ArP 1	3	0	0	0	8,09	0,013	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-
ArP 2	3	0	2	0	8,58	0,022	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-
ArP 5	3	2	0	0	7,99	0,032	1	0	50	0	-	-	-	-	-
ArP 6	3	1	0	0	10,43	0,025	3	0	136	74	-	-	-	-	-
ArP 9	3	0	2	0	12,53	0,016	1	0	69	2	-	-	-	-	-
ArP 10	3	NA	2	0	10,89	0,028	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-
ArP 11	3	0	1	0	11,40	0,017	1	0	31	0	-	-	-	-	-
ArP 13	3	0	2	0	11,60	0,080	1	0	17	0	-	-	-	-	-
ArP 15	3	2	1	0	11,22	0,046	1	0	85	0	-	-	-	-	-
ArP 18	3	NA	0	0	11,30	0,018	1	0	40	0	-	-	-	-	-
ArP 23	3	0	2	0	11,13	0,011	2	0	137	89	-	-	-	-	-
ArLB 101	3	2	2	1	10,92	0,042	2	0	130	2	-	-	-	-	-
ArLB 103	3	1	0	1	10,64	0,005	1	0	77	0	-	-	-	-	-
ArLB 104	3	1	2	0	9,88	0,044	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-
ArLB 108	3	2	1	0	10,88	0,046	2	0	262	0	-	-	-	-	-
ArLB 111	3	1	2	0	11,89	0,040	2	0	431	0	-	-	-	-	-
ArLB 112	3	1	1	0	9,90	0,065	2	0	427	0	-	-	-	-	-
ArLB 113	3	1	2	0	12,57	0,023	3	30	207	260	-	-	-	-	-
ArLB 116	3	2	2	2	10,91	0,041	3	37	274	354	-	-	-	-	-
ArLB119	3	0	0	0	10,32	0,069	0	0	0	0	-	-	-	-	-
ArLB120	3	1	2	0	10,71	0,023	0	0	0	0	-	-	-	-	-

HRC minták	Ism	SIN (µg/mg DW)	IBER (abundancia)	GIB (abundancia)	BRASS (abundancia)	GLN (µg/mg DW)	NEO (abundancia)	ARAB (abundancia)	AITC (µg/mg DW)	PECN (abundancia)	3MeSPITC (abundancia)	PEITC (µg/mg DW)	IBACN (abundancia)
ArP 1	1	0,062	602	45	3486	3,215	4968	403	<0,001	0	0	0,000	0
ArP 2	1	0,120	0	385	1994	<0,001	10779	894	<0,001	139859	0	0,277	11806
ArP 5	1	0,016	1016	433	2417	1,125	6423	3125	<0,001	1001208	882148	1,413	2319
ArP 6	1	<0,001	0	0	0	<0,001	19350	0	0,000	522378	1059190	0,796	5413
ArP 9	1	<0,001	0	0	0	<0,001	5793	0	0,037	0	933898	0,389	1546
ArP 10	1	<0,001	0	0	0	<0,001	5211	0	0,031	0	988378	0,580	0
ArP 11	1	<0,001	0	0	0	<0,001	3878	0	<0,001	328908	664270	0,253	31730
ArP 13	1	<0,001	0	0	0	<0,001	1468	0	<0,001	0	542272	0,238	14519
ArP 15	1	<0,001	0	0	0	<0,001	13403	0	<0,001	561650	696841	0,410	20740
ArP 18	1	<0,001	0	0	0	<0,001	5302	0	<0,001	0	336248	0,183	15809
ArP 23	1	<0,001	0	0	0	0,005	3249	0	0,021	467592	467592	0,282	6416
ArLB 101	1	<0,001	0	0	0	<0,001	1213	0	<0,001	774021	0	0,173	36336
ArLB 103	1	0,198	7574	1866	93199	3,977	84840	9211	<0,001	698770	771684	0,354	52127
ArLB 104	1	0,631	611	12767	22469	1,883	30141	15583	0,016	783173	777682	0,408	50649
ArLB 108	1	0,861	5338	11492	36968	7,823	34513	20106	<0,001	926877	676167	0,181	48353
ArLB 111	1	0,825	4825	4705	40590	10,649	41056	10607	<0,001	1574916	782922	0,513	45226
ArLB 112	1	0,090	0	2835	2800	<0,001	3161	732	<0,001	1408780	0	0,265	15428
ArLB 113	1	0,064	172	211	8421	0,351	12043	1393	<0,001	472696	0	0,086	42368
ArLB 116	1	0,355	880	1896	9615	3,353	9911	4616	<0,001	0	0	0,000	0
ArLB119	1	<0,001	0	76	48	<0,001	9794	0	<0,001	697136	748391	0,582	21824
ArLB120	1	0,099	7731	870	30375	4,532	36319	2673	<0,001	825290	934662	0,537	39509

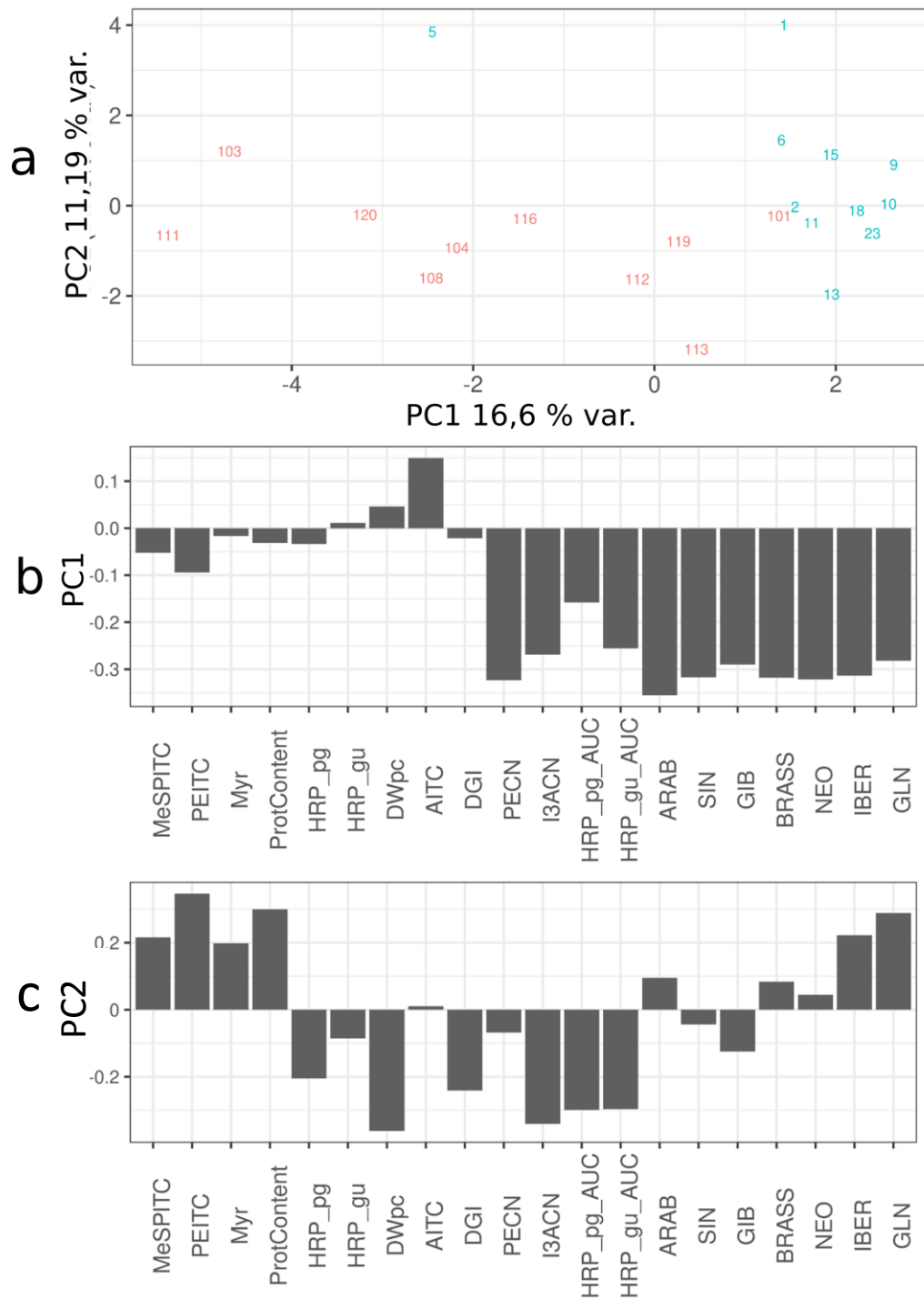
HRC minták	Ism	SIN (µg/mg DW)	IBER (abundancia)	GIB (abundancia)	BRASS (abundancia)	GLN (µg/mg DW)	NEO (abundancia)	ARAB (abundancia)	AITC (µg/mg DW)	PECN (abundancia)	3MeSPITC (abundancia)	PEITC (µg/mg DW)	I3ACN (abundancia)
ArP 1	2	0,046	639	87	4409	2,492	4333	169	<0,001	346915	712186	0,188	0
ArP 2	2	0,009	0	104	433	<0,001	2709	36	<0,001	0	0	0,013	18078
ArP 5	2	0,007	370	204	1210	0,553	4002	1727	<0,001	692652	1096129	0,490	10862
ArP 6	2	<0,001	0	0	0	<0,001	6879	0	0,001	478252	615428	0,074	3939
ArP 9	2	<0,001	0	0	0	<0,001	3987	0	0,002	298282	670542	0,065	8052
ArP 10	2	<0,001	0	0	0	<0,001	12188	0	<0,001	0	582288	0,055	10244
ArP 11	2	<0,001	0	0	0	<0,001	9239	0	0,002	0	1017572	0,162	6744
ArP 13	2	<0,001	0	0	0	<0,001	1770	0	<0,001	0	578774	0,058	5766
ArP 15	2	<0,001	0	0	0	<0,001	2867	0	0,001	406203	1476783	0,212	2023
ArP 18	2	<0,001	0	0	0	<0,001	9219	0	0,003	403919	716461	0,067	20678
ArP 23	2	<0,001	0	0	0	<0,001	2577	0	<0,001	0	0	0,014	7351
ArLB 101	2	<0,001	0	0	0	<0,001	1713	0	<0,001	360230	508618	0,062	12512
ArLB 103	2	0,061	0	349	22331	0,101	20508	1139	0,001	839641	829962	0,100	22804
ArLB 104	2	0,101	0	1113	2558	0,108	12612	1721	<0,001	593077	440418	0,040	29911
ArLB 108	2	<0,001	0	184	134	<0,001	4801	0	<0,001	585337	0	0,016	34638
ArLB 111	2	0,112	141	962	7657	0,340	12539	1252	<0,001	960783	294562	0,028	19864
ArLB 112	2	<0,001	0	99	0	<0,001	5182	0	<0,001	738915	355113	0,044	23862
ArLB 113	2	<0,001	0	0	0	<0,001	9674	0	<0,001	424121	0	0,014	30659
ArLB 116	2	0,058	0	485	2626	0,055	8552	505	<0,001	595145	0	0,016	26508
ArLB119	2	<0,001	0	0	0	<0,001	10605	0	<0,001	731839	483094	0,066	25767
ArLB120	2	<0,001	0	176	2868	<0,001	3059	0	<0,001	662815	549624	0,042	30588

HRC minták	Ism	SIN (µg/mg DW)	IBER (abundancia)	GIB (abundancia)	BRASS (abundancia)	GLN (µg/mg DW)	NEO (abundancia)	ARAB (abundancia)	AITC (µg/mg DW)	PECN (abundancia)	3MeSPIC (abundancia)	PEITC (µg/mg DW)	IACN (abundancia)
ArP 1	3	0,335	3665	284	16166	16,890	25563	1274	<0,001	0	0	0,392	0
ArP 2	3	0,094	0	695	2865	0,000	11285	824	<0,001	106753,077	0	0,446	9151
ArP 5	3	0,210	18161	3232	33286	18,375	48616	24487	<0,001	333086	284809	1,345	10807
ArP 6	3	<0,001	0	126	289	<0,001	35781	0	0,004	480584	822582	1,073	10169
ArP 9	3	<0,001	0	0	0	<0,001	27860	0	0,003	341755	329103	0,682	6648
ArP 10	3	<0,001	0	191	205	<0,001	27677	0	<0,001	0	414916	0,641	3387
ArP 11	3	<0,001	0	0	0	<0,001	38608	0	<0,001	0	713729	0,523	9902
ArP 13	3	<0,001	0	0	0	<0,001	14537	0	0,004	0	544097	0,757	13556
ArP 15	3	<0,001	0	0	0	<0,001	15035	0	0,001	0	1277942	1,431	6418
ArP 18	3	<0,001	0	0	115	<0,001	16121	0	0,005	403567	430686	0,508	17046
ArP 23	3	<0,001	0	0	0	<0,001	10096	0	<0,001	0	0	0,364	9516
ArLB 101	3	<0,001	0	119	720	<0,001	62400	0	<0,001	318034	349505	0,493	9568
ArLB 103	3	0,423	10909	2580	140600	7,953	130237	13232	0,001	621711	929586	0,932	15543
ArLB 104	3	0,534	0	4427	16190	0,820	51026	8938	<0,001	521147	447385	0,341	23445
ArLB 108	3	<0,001	0	1294	1306	<0,001	27584	378	0,001	582202	737024	0,685	18125
ArLB 111	3	0,916	7027	6177	53380	14,163	63183	14687	0,003	870645	593456	0,901	22227
ArLB 112	3	0,167	0	3868	3610	<0,001	35022	924	<0,001	584286	0	0,289	17201
ArLB 113	3	<0,001	0	143	4681	<0,001	32379	0	<0,001	400541	0	0,182	20270
ArLB 116	3	0,790	2549	6944	25529	5,099	48884	9951	0,004	642320	569821	0,991	11005
ArLB119	3	<0,001	0	0	0	<0,001	22086	0	<0,001	978366	629389	0,668	23823
ArLB120	3	0,296	14089	2864	74447	11,512	108448	6618	<0,001	579194	566144	0,459	7416

4.1.7. A torma különböző növényi szerveinek inokulálása agrobaktériummal, különböző tulajdonság-mintázattal rendelkező HRC-kat eredményezett

A multivariábilis statisztikai elemzés során a vizsgált tulajdonságok között (mint pl. természetes termék komponensek koncentrációja, enzim aktivitások, és biológiai adatok: növekedési érték, száraz tömeg, stb., 6. táblázat) érdekes pozitív és negatív korrelációkat figyeltünk meg, melyeket az alábbiakban részletezek.

Számos szignifikáns különbséget találtunk az ArP és ArLB vonalak között (ArP: levélnyélből létrehozott HRC-k; ArLB: levéllemezből létrehozott HRC-k) (15. ábra, 7. táblázat). Valamennyi szignifikánsan különböző tulajdonságban az ArLB vonalak rendelkeztek magasabb értékekkel. A DGI (napi növekedési index) nagyobb volt az ArLB vonalakban (16.a ábra, $p = 0,04864$), míg az egyéb növekedési paraméterek (szárazanyag tartalom %, DWpc) nem volt szignifikánsan eltérő a két csoport között (16.b ábra, $p = 0,83269$). Az enzimek közül a MyrB2 izoenzim aktivitása volt az ArLB vonalakban magasabb, de nem szignifikánsan (16.c ábra; $p = 0,08308$). A GLS-ok közül az összes alifás (SIN, 16.d ábra, $p = 0,00730$; IBER, $p = 0,03864$; GIB, $p = 0,00278$; ARAB, $p = 0,03068$), valamint két aromás (BRASS, 16.e ábra, $p = 0,00291$; NEO, $p = 0,00153$) volt számottevően nagyobb mennyiségben kimutatható az ArLB klónokból (7. táblázat). A GLS bomlástermékeket tekintve, mindössze két nitril mutatott szignifikáns különbséget az ArP és ArLB vonalak között (PECN, 16.f ábra, $p = 0,00072$ és I3ACN; 16.g ábra, $p = 0,00025$), melyek prekursorai a GLN, ill. a BRASS. Meglepő módon a GLN szubsztrát nem mutatott szignifikáns eltérést a két csoport között (16.h ábra, $p = 0,09426$). A gélen detektált HRP aktivitás az ArLB klónokban szignifikánsan magasabb volt (16.i ábra, $p = 0,00745$).



15. ábra Főkomponens elemzés (PCA, principal component analysis) pont diagrammja a torma (*Armoracia rusticana*) HRC-k összes vizsgált változója alapján; GLS tartalom, ITC tartalom, valamint enzim aktivitás/mintázat. **a:** A főkomponens elemzés (PCA) pont diagrammja különböző HRC-okat mutat a PC1-PC2 síkban, melyek a tulajdonságaik alapján különülnek el. A különböző

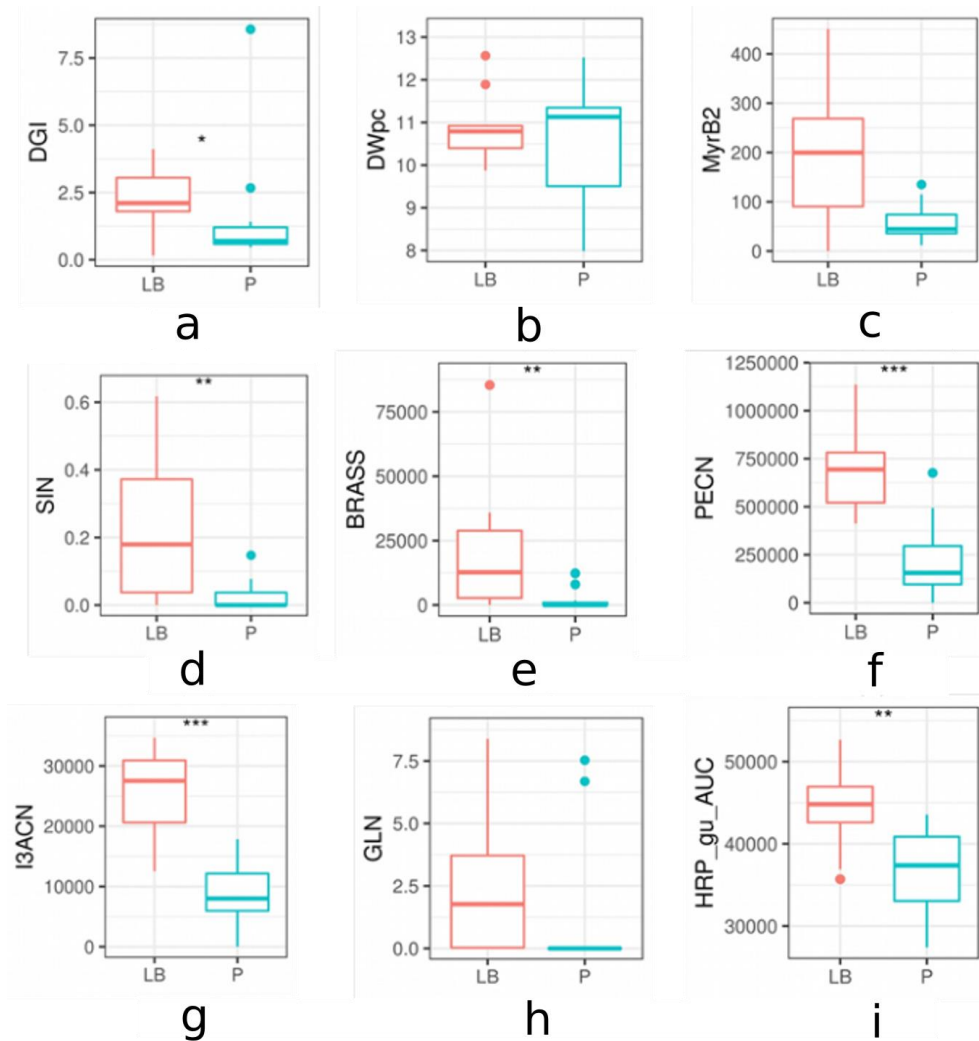
szervekből származó vonalakat különböző színek jelölik: piros—petiolum, kék—levéllemez. **b:** A tulajdonságok (loading values) hozzárendelése a HRC-kre kapott értékekhez a főkomponens 1 síkban (PC1, principle component 1). **c:** A tulajdonságok (loading values) hozzárendelése a HRC-kre kapott értékekhez a főkomponens 2 síkban (PC2, principle component 2).

Ahogy a 15.a ábra szemlélteti, a HRC-k két csoportra különülnek el az inokulált szerv eredete alapján (ArP: petiolum; ArLB: levéllemez), mindkét csoport laza klasztert alkot, néhány szorosabb alcsoporttal. A PC1 pimenzióban (15.a ábra) jól látható, hogy a két csoport a szerv-eredet alapján különül el (levélnyel *versus* levéllemez). A PC1 „loading plot” (15.b ábra) alapján jól megfigyelhető, hogy a két csoport közötti különbségek elsősorban GLS (GIB, NEO, SIN, BRASS, ARAB, IBER és GLN) tartalomtól és a peroxidáz aktivitástól következnek, és nem a biomassa paramétereiből (pl. szárazanyag tartalom (DWpc), fehérje tartalom (ProtCont)). Amíg az ArP csoport tagjai $0,0272 \pm 0,0710$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ SIN-t tartalmaztak, az ArLB esetében a koncentrációk egy nagyságrenddel magasabbak voltak $0,2194 \pm 0,3015$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($p < 0,01$). Az ArP és ArLB HRC-k GLN tartalma $1,2926 \pm 4,2789$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, valamint $2,4240 \pm 4,0377$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ volt, de ez a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($p = 0,3760$). Az ArP klónok szárazanyag tartalma $10,47 \pm 1,49$ %, az ArLB vonalaké $10,86 \pm 0,80$ % volt ($p = 0,4818$). A csoportokon belüli különbségekért (PC2 15.c ábra) mindkét alcsoportban elsősorban a szárazanyag tartalom (%), protein tartalom, és meglepő módon a teljes mirozináz aktivitás a felelős.

7. táblázat Statisztikai különbségek a vizsgált tulajdonságokban (változók) az inokulált szerv (levélnyel vagy levéllemez) alapján elkülönült két torma HRC csoport között.

Változók	<i>p</i> érték	Szignifikancia
Branching	0,06823	
AdShoots	0,43899	
PinkExtract	0,05616	
DWpc	0,83269	
DGI	0,04864	*
MyrB1	0,76511	
MyrB2	0,08308	
MyrB3	0,66652	
SIN	0,00730	**
IBER	0,03864	*
GIB	0,00277	**
BRASS	0,00291	**
GLN	0,09426	
NEO	0,00153	**
ARAB	0,03068	*
AITC	0,10321	
PECN	0,00072	***
MeSPITC	0,34163	
PEITC	0,48132	
I3ACN	0,00025	***
ProtContent	0,94386	
HRP_pg	0,62207	
HRP_gu	0,23127	
HRP_pg_AUC	0,01124	*
HRP_gu_AUC	0,00745	**

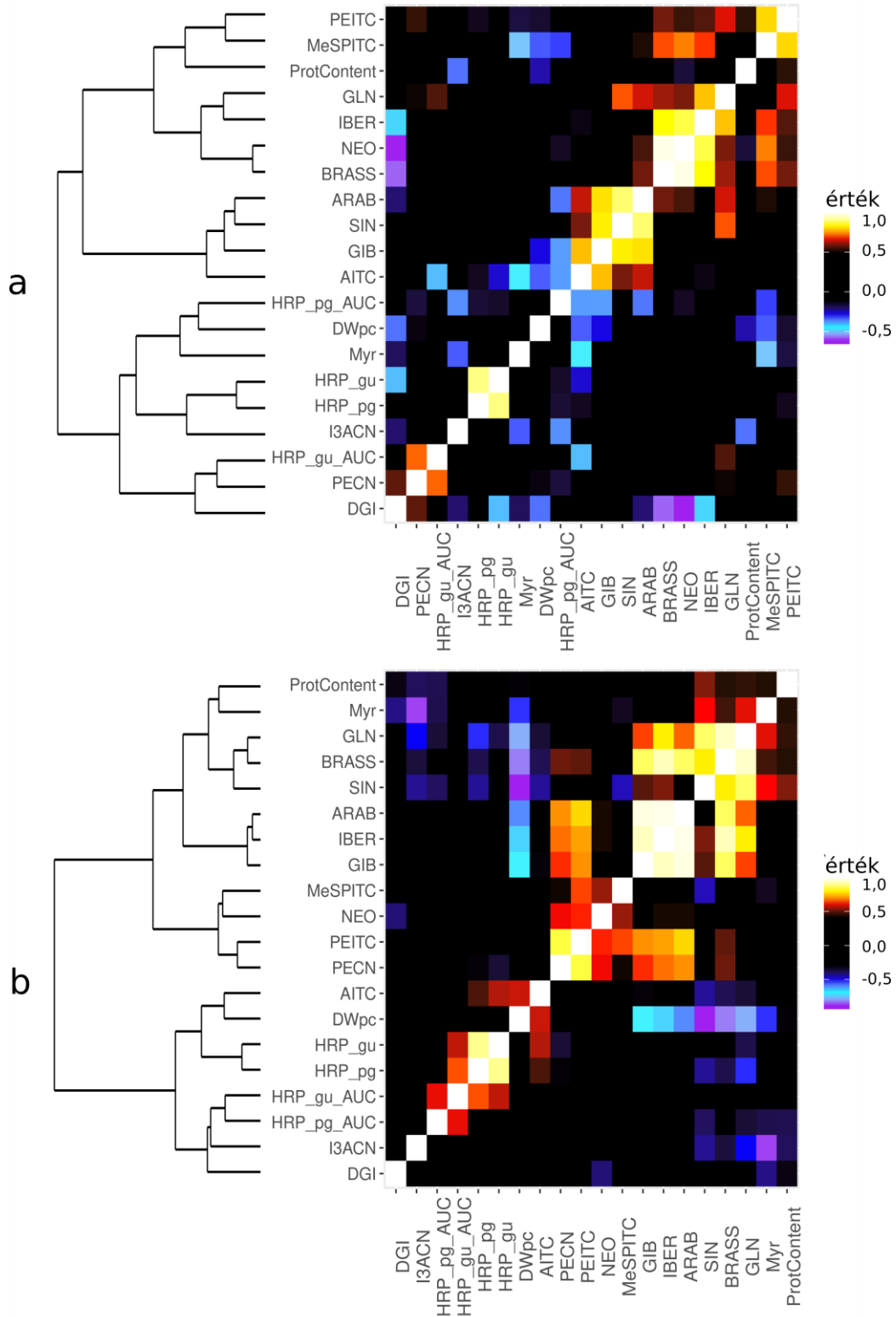
Jelölés: Statisztikai szignifikancia: t-teszt, két-oldalú, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



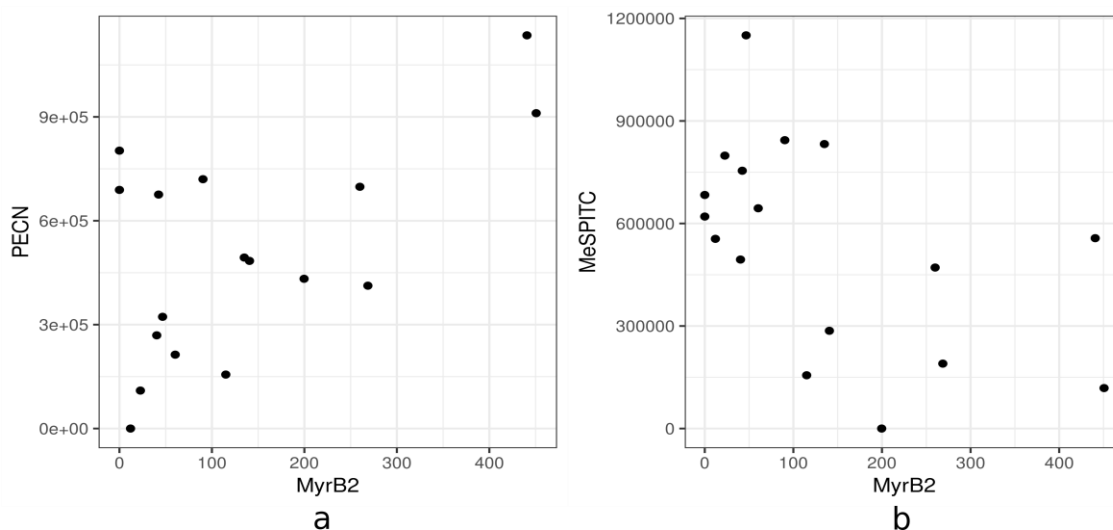
16. ábra A box-plotok szemléltetik a statisztikai különbségeket a torma HRC-k két csoportja között (P-petiólum, LB-levéllemezzel) a következő tulajdonságokban: GLS-ok és bomlástermékek, enzimaktivitások és általános paraméterek. A szignifikáns különbségek jelölése: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Kruskal–Wallis teszt. Alábrák: **a**: napi növekedési index (DGI); **b**: száraz tömeg % (DWpc); **c**: mirozináz (MYR), a gél-analízis során kapott második band aktivitása; **d**: szinigrin (SIN) tartalom ($\mu\text{g}/\text{mg}$); **e**: glükobrasszicin (BRASS) tartalom (abundancia); **f**: 3-fenilpropionitril (PECN) tartalom (abundancia); **g**: indol-3-acetonitril tartalom (abundancia); **h**: glükonaszturtiin tartalom ($\mu\text{g}/\text{mg}$); **i**: torma peroxidáz (HRP) aktivitás, gvajakol szubsztráttal, gél-analízissel mérve.

A hőtérképen (17. ábra) jól látható a növekedés *versus* másodlagos anyagcsere termékek termelése, számos komponens szintézise (NEO, BRASS, IBER, GLN, ARAB, I3ACN) és a biomassa produkció (DGI, DWpc) közötti negatív korreláción keresztül. Az ArP klónokban a GLS-ok (GLN, BRASS, SIN) a HRP (HRP_pg, HRP_pg_AUC) aktivitással is negatív korrelációt mutatnak. Ez a jelenség feltehetően a tápanyag felhasználási arány korlátozásának tulajdonítható; az öfenntartási és növekedési folyamatok, valamint a védelmi metabolitok bioszintézise verseng az erőforrásokért. Mivel a GLS bioszintézishez nem csak szénre, hanem kénre és nitrogéren is szükség van, így a jelenség sokkal jelentősebb, mint egyéb speciális/szekunder metabolitok esetében.

A MyrB2 és egyes bioaktív komponensek közötti összefüggéseket a 18. ábra szemlélteti. PECN-el pozitív (18.a ábra), míg MeSPITC-al negatív (18.b ábra) korrelációt mutatott.



17. ábra a: A petiólumból, **b:** levéllemezéből indukált HRC vonalak korrelációs hőterképe és hierarchikus klaszterezése. A szín arányos Pearson két jellemző közötti korrelációs értékével.

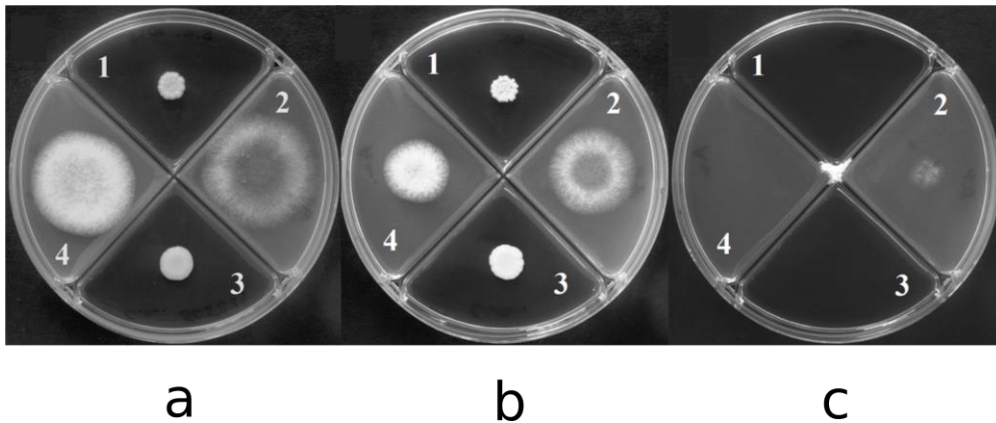


18. ábra Korrelációk a MYR enzimaktivitás-és GLS bomlástermékek jelenléte között *Armoracia rusticana* HRC-k különböző vonalaiban. Tengelyek: MeSPITC, 3-metiltiopropil-ITC (abundancia mérés GC-MS-sel); MyrB2, gél kiértékeléssel mért mirozináz izoenzim aktivitás; PECN - 3-fenil-propionitril (abundancia mérés GC-MS-sel).

4.2. A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata

4.2.1. A torma illóolaj szignifikáns antifungális hatása

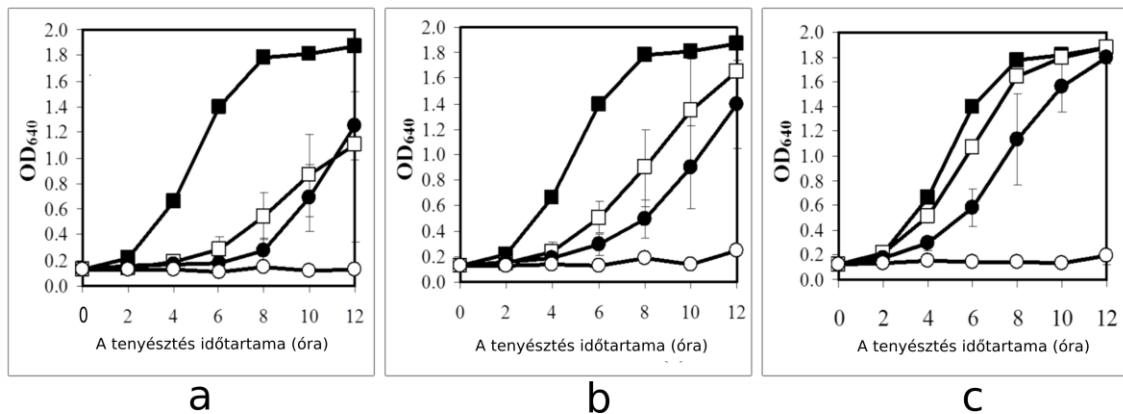
Kísérleteinkben a torma illóolaj figyelemre méltó antifungális hatását tapasztaltuk légtérbe párologtatva *Saccharomyces cerevisiae*-n és *Aspergillus nidulans*-on, valamint a humán patogén *Candida albicans*-on és *A. fumigatus*-on tesztelve (19. ábra). A várakozásoknak megfelelően a tiszta illóolaj (19.c ábra) hatásosabb volt, mint azonos mennyiségben YPD tápközegbe oldva (19.b ábra). A torma illóolaj folyadék kultúrákhoz adagolva is erős antifungális hatást mutatott (20.a ábra). Az IC₅₀ értékeket 1 ml-es mikro-kultúrákból MTT-teszt segítségével határoztuk meg (132), melyek rendre 5, 6, 10 és 13 µl torma illóolaj-YPD/ml tápközeg (körülbelül 0,05, 0,06, 0,1 és 0,13 µg torma illóolaj/ml kultúra) értékűnek bizonyultak *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. nidulans* valamint *A. fumigatus* esetében.



19. ábra A torma illóolaj antifungális aktivitása légtérbe párologtatva. *Saccharomyces cerevisiae* S288C (1), *Aspergillus fumigatus* AF293 (2), *Candida albicans* SC5314 (3) és *Aspergillus nidulans* FGSCA4 (4) törzsek. A tenyészeteket **a:** kezelés nélkül, vagy **b:** 1 µl torma illóolaj/100 µl YPD vagy **c:** 1 µl tiszta torma illóolaj légtérbe párologtatásával neveltük.

4.2.2. A torma illóolaj erősebb növekedésgátló hatást mutatott, mint a főkomponensei önmagukban

A torma illóolajat 20 ml-es rázatott *C. albicans* kultúrákon is vizsgáltuk, hogy több információhoz jussunk antifungális hatását illetően. Az *Aspergillus* fajok esetében a növekedésük biztosításához szükséges rázatási frekvencia (220 rpm) feltehetően jelentősen lecsökkentette a torma illóolaj folyékony fázisban tartását, ami gyenge ismételtetőséget eredményezett. A torma illóolaj, hasonlóan a főkomponenseihez (AITC és PEITC) nagymértékben gátolta a *C. albicans* kultúrák növekedését (20. ábra). Annak ellenére, hogy a torma illóolaj, AITC és PEITC antifungális aktivitása hasonlóan bizonyult, a növekedést gátló hatás a torma illóolaj esetében (20.a ábra) szignifikánsan magasabb volt, mint az AITC (20.b ábra) vagy PEITC (20.c ábra) hatására. Az AITC erősebb gátló hatást mutatott, mint a PEITC (20. ábra).



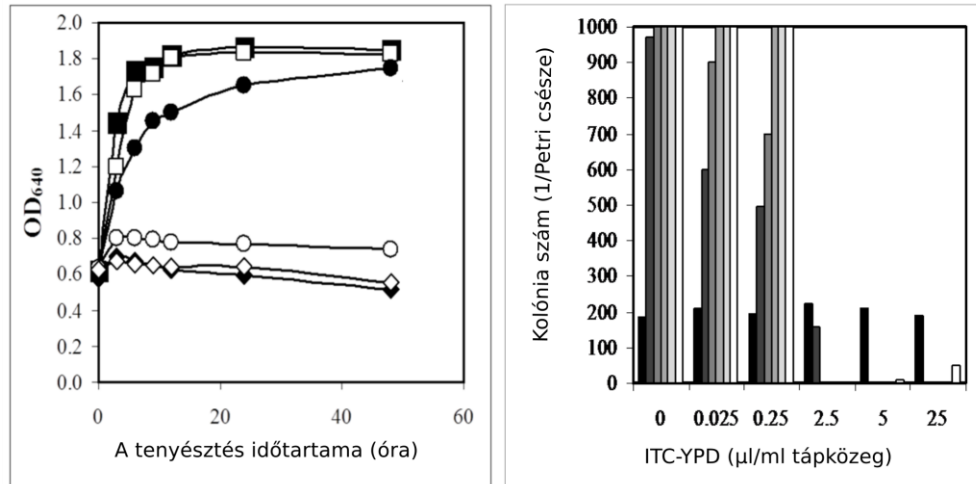
20. ábra A torma illóolaj, AITC és PEITC hatása *Candida albicans* SC5314 törzs növekedésére. 0 (■); 0,025 (□); 0,25 (●) vagy 2,5 (○) μl torma illóolaj-YPD/ml tápközeget (a), AITC-YPD-t (b) vagy PEITC-YPD-t (c) oldatokat tartalmazó YPD tápközegben tenyésztett *Candida albicans* rázatott kultúrák növekedési görbéi. Megjegyzés: néhány esetben a szórás jelei nem láthatóak, mert kisebbek, mint a használt szimbólum.

A PEITC növekedést csökkentő hatása szignifikánsan kisebb volt (Student's t-teszt, $n=4$, $p < 0,05$), mint a torma illóolaj-é vagy az AITC-é, 0,025 μl ITC-YPD/ml (a kísérlet kezdetétől számított 4. és 10 óra között), valamint 0,25 μl ITC-YPD/ml tápközeg (a kísérlet kezdetétől számított 6. és 12. óra között). Az AITC növekedésgátló hatása szignifikánsan alacsonyabb volt (Student's t-teszt, $n=4$, $p < 0,05$), mint a torma illóolajé 0,025 és 0,25 μl ITC-YPD/ml oldatot alkalmazva (a kísérlet kezdetétől számított 6. és 8. óra között).

4.2.3. A torma illóolaj nagy koncentrációban fungicid

Time-kill assay-vel demonstráltuk, hogy a torma illóolaj inkább fungicid (fungitoxikus) mint fungisztatikus *C. albicans* sejteken tesztelve. A torma illóolaj néhány óra elteltével elpusztította a gomba sejteket (21. ábra). A kísérleteink során 1-2 esetben néhány sejt túlélte még a 25 μl torma illóolaj-YPD/ml tápközeges kezelést is (21.b ábra). Viszont érdekesképpen a túlélőket csak az idősebb tenyészetekben tudtuk kimutatni. A jelenség azt sugallja, hogy mindössze néhány sejt (a detektálási limit alatt) maradt életben az illóolajos kezelés hatására, majd a torma illóolaj tenyészetekből való

elpárolgását követően a túlélő sejtek újra elkezdtek növekedni, így az idősebb tenyészetekben a sejtsűrűség elérte újra a kimutatási határt. A túlélő sejtek újabb kísérletekben nem mutattak megváltozott torma illóolaj érzékenységet, ami azt mutatja, hogy a túlélésük nem mutációnak, hanem fiziológiai adaptációnak tulajdonítható.



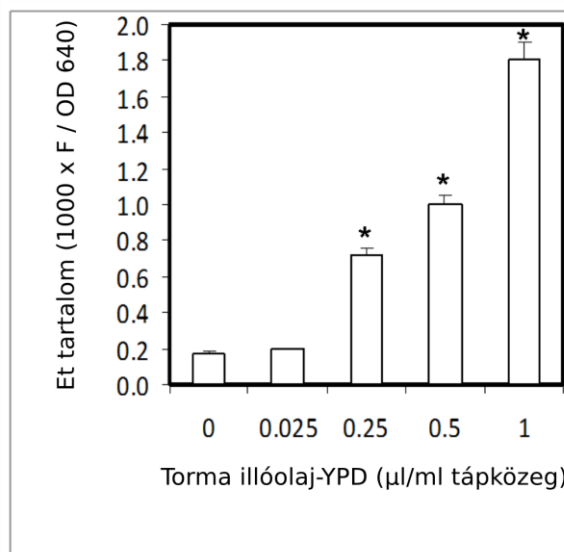
21. ábra Time-kill assay *Candida albicans* SC5314 törzsön. az OD₆₄₀=0,6-os *Candida albicans* tenyészeteket a következő koncentrációjú torma illóolaj-YPD oldatokkal kezeltük: 0 (■); 0,025 (□); 0,25 (●) vagy 2,5 (○); 5 (◆); 25 (◇) µl/ml. **b:** A kezelést követően az élő sejtszám meghatározásához rendszeresen vettünk mintákat: 0 óra (fekete), 3 óra (sötét szürke), 6 óra (szürke) 9 óra (világosabb szürke), 12 óra (legvilágosabb szürke) és 24 óra (fehér). Megjegyzés: a magasabb, mint 1000 kolónia / Petri-csésze értékeket 1000 kolónia / Petri-csésze oszloppal ábrázoltuk. A szórás értékek kisebbek voltak, mint 20 %.

4.2.4. A torma illóolaj *in vitro* interakciója redukált és oxidált glutationnal és glutation redukttázzal

A torma illóolaj (1 µl/ml) 0,5 órás inkubálási periódust követően 84 ± 5 %-kal csökkentette az 50mM kiindulási koncentrációjú minták GSH tartalmát, valamint 42 ± 7 %-al a kiindulási 35 U/ml GR (*S. cerevisiae*-ből) aktivitását. GSSG esetében (50 mM kiindulási koncentráció) nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést.

4.2.5. A torma illóolaj oxidatív stresszt indukált, és koncentráció függő módon kiürítette a glutation raktárakat

A torma illóolaj *C. albicans* sejteken már közepes koncentrációban (0,25 μ l torma illóolaj-YPD/ml tápközeg) oxidatív stresszt generált. Az oxidatív stresszt jellemezte a sejtek megemelkedett szuperoxid szintje (22. ábra), az indukált specifikus GR, GPx, kataláz és SOD aktivitás (8. táblázat). A GSH és GSSG tartalom viszont meglepő módon nem változott, a kultúra növekedése mégis csökkent (20. ábra). Magasabb koncentrációban (2,5 μ l torma illóolaj-YPD/ml tápközeg), rövid (3 órás) expozíció viszont kiürítette a GSH poolt (8. táblázat), miközben a szuperoxid szint erősen megnövekedett (22. ábra), és azonnal megölte a sejteket (20. ábra), még az antioxidáns enzimek indukálódása előtt (8. táblázat). Az AITC és PEITC hasonló hatást mutatott a GSH metabolizmusra, valamint a szuperoxid és antioxidáns enzim produkcióra, mint a torma illóolaj.



22. ábra A torma illóolaj-YPD kezelés hatása a *Candida albicans* SC5314 törzs szuperoxid termelésére.

* - Szignifikáns különbség a kezeletlen kultúrákhoz viszonyítva (*Student's t*-teszt, $n = 3$, $p < 0,05$).

8. táblázat A torma illóolaj hatása a GSH, GSSG mennyiségére, valamint a specifikus GR, GPx, kataláz, GST és SOD aktivitásokra *C. albicans* SC5314 törzsben.

	torma illóolaj-YPD ($\mu\text{l/ml}$)			
	0 (kontroll)	0,025	0,25	2,5
GSH^a	4,1 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4	3,6 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2*
GSSG^a	0,021 \pm 0,003	0,017 \pm 0,003	0,016 \pm 0,002	0,023 \pm 0,003
GSH/GSSG	195 \pm 34	225 \pm 46	225 \pm 34	18 \pm 9*
GR^b	3,6 \pm 0,36	3,5 \pm 0,36	5,2 \pm 0,40*	3,6 \pm 0,40
GPx^b	0,56 \pm 0,08	0,60 \pm 0,08	0,72 \pm 0,08*	0,52 \pm 0,08
Kataláz^c	1,3 \pm 0,12	1,5 \pm 0,12*	1,8 \pm 0,12*	1,0 \pm 0,16
SOD^d	146 \pm 30	340 \pm 60*	360 \pm 60*	160 \pm 40
GST^b	1,0 \pm 0,12	1,4 \pm 0,16	1,8 \pm 0,16*	0,8 \pm 0,16

^a - nmol/(ml OD₆₄₀); ^b - (mkat/kg protein); ^c - (kat/kg protein); ^d - (unit/mg protein)

* - Szignifikáns különbség a kezeletlen kultúrákhoz viszonyítva (Student's t-teszt, n = 3, p < 0,05)

4.2.6. A torma illóolaj interakciója CDNB-al, MSB-al és diamiddal

A torma illóolaj antifungális hatása antagonizmust mutatott MSB-el és diamiddal, valamint szinergizmust CDNB-lal (9. táblázat). Az antagonizmus magyarázata lehet az antioxidáns enzimek és/vagy GSH termelés (132,142). A szinergizmus valószínűleg a CDNB GSH-pool kiürítő hatásának a következménye, amit több tanulmányban, számos *Candida albicans* fajon vizsgálva leírtak már (143).

9. táblázat A torma illóolaj interakciója oxidatív stresszt generáló anyagokkal

Antifungális anyag	torma illóolaj-YPD	I₀	I_e	IR	Interakció
(μM)	(μl/ml)	(%)^a	(%)		
-	-	0,25	54 \pm 5	-	-
-	-	0,13	32 \pm 5		
MSB	9,6	-	59 \pm 7	-	-
MSB	16	-	72 \pm 8	-	-
Diamid	6	-	62 \pm 8	-	-
Diamid	10	-	85 \pm 10	-	-
CDNB	0,03	-	6 \pm 2	-	-
CDNB	0,06	-	21 \pm 3	-	-
MSB	9,6	0,25	38 \pm 4	81	0,47 antagonizmus
MSB	16	0,25	7 \pm 2	87	0,08 antagonizmus
Diamid	6	0,25	25 \pm 4	83	0,30 antagonizmus
Diamid	10	0,25	45 \pm 6	93	0,48 antagonizmus
CDNB	0,03	0,13	89 \pm 8	36	2,5 szinergizmus
CDNB	0,06	0,13	93 \pm 7	46	2,0 szinergizmus

^a – az átlag \pm szórás értékeket 3 független kísérlet alapján számítottuk.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. *Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata*

5.1.1. *A natív torma gyökér és a HRC-k GLS mintázatának összehasonlítása*

A natív torma gyökérnek fő GLS komponense a SIN (2,3), ezzel szemben a torma HRC-k fő GLS komponensei többek között aromás és indol GLS-ok: ARAB, BRASS, melyek a natív gyökérben csupán minor komponensként vannak jelen. A natív gyökérben a GLN általában egy nagyságrenddel kisebb mennyiségben van jelen, mint a SIN (2,108). A fentiekből adódóan, az aromás GLS-ok dominanciája HRC specifikusnak tűnik.

Annak ellenére, hogy a HRC-k össz-GLS szintje az anya növényénél alacsonyabbnak bizonyul, a HRC-kben az indol GLS-ok sokkal dominánsabbak, mint az anya növényben (94,95,113,144,145).

7 különböző mirozináz B (MYB) transzkripciós faktort detektáltak *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*-ben (146), amelyek szerv és GLS-osztály specifikus jelenlétet mutattak. Az alifás GLS-ok transzkripciójában a MYB28 és MYB29 transzkripciós faktorok vesznek részt, melyek szintje a szárban és egyéb szervekben eltérő volt (146). A teljes növény szerv specifikus GLS akkumulációja és transzkripciós mintázata eltér az *in vitro* kultúrákétól (115,144). Az alifás GLS gének transzkripciós faktorai a HRC-kben szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a natív gyökérben (144).

Az alacsony SIN-AITC tartalom ellenére felismerhető az *Armoracia rusticana* anyanövény jellegzetes GLS-ITC/nitril mintázata a torma HRC-kben (3-5 táblázat). A mintázat nem emlékeztet az *Armoracia macrocarpa*-ra az IBER-MeSPITC, GIB, BRASS és ARAB komponensek jelenléte miatt (2,124). Továbbá a tipikus *A. macrocarpa* komponensek, mint az 5-metiltiopentil-ITC (berteroin) és 6-metiltiohexil-ITC (lesquerellin) (124) nincsenek jelen a torma HRC-k mintázatában.

5.1.2. *Indol GLS-ok és hidrolitikus bomlástermékek*

Az indol GLS BRASS és az indolecetsav kapcsolatát érdemes közelebbről megvizsgálni. Először is, a növényi eredetű indol GLS-ok képesek I3ACN-é

hidrolizálódni. Ez a komponens képes a növénynek védelmet nyújtani a gombákkal szemben (140), továbbá az I3ACN az indolecetsav bioszintézisnek is a köztes terméke (120,123). Az agrobakteriális fertőzés során, a T-DNS – mely tartalmazza az auxin (pl. indolecetsav) termelésért felelős géneket – integrálódik a növényi genomba (88), mely a HRC-k korlátlan növekedési képességét okozza (147,148). Tehát a detektált I3ACN származhat a GLS-ok hidrolíziséből, valamint az *Agrobacterium* gén terméke is lehet (138,147–149). A növény az I3ACN-t eredetétől függetlenül tudja hasznosítani antifungális anyagként, vagy a növekedést elősegítve auxin (indolecetsav) termelés intermediereként (9).

5.1.3. A torma különböző növényi szerveinek agrobakteriális inokulációja különböző tulajdonság mintázatú HRC-eket eredményez

Legjobb tudásunk szerint ez az első összehasonlító tanulmány, melyben a szervfüggő agrobakteriális inokuláció ekkora metabolit és enzimbéli különbségeket eredményezett a Keresztesvirágúak családjában. Egy tanulmány szerint *Arabidopsis thaliana*-ban a GLS-ok akkumulációja és transzkripciója szövet specifikus, és eltér az in vitro kultúrákban (mint HRC) megfigyeltektől (144), de azzal kapcsolatban nem közöl adatot, hogy a GLS tartalom és enzim aktivitás hogyan alakul különböző szövetekből indukált HRC-kből. Mindössze *Coffea arabica* hairy root-ok esetében írták le a következő jelenséget: különböző embrió szervek inokulációja eltérő gén expressziós mintázatot eredményezett (150). Az, hogy eddig nem vizsgálták a különböző szervekből létrehozott HRC-k közötti eltéréseket, részben annak tudható be, hogy az általános hairy root indukciós protokollok célszerve a levél, a szövet állaga miatt (151). A „leaf-disc” módszer (feldarabolt levelek baktérium szuszpenzióba mártása) a legelterjedtebb hairy root képző technika (105,107,152–154). Habár Saitou és mtsai (106,155) fertőztek közvetlenül tüvel axiális torma levelet, valamint petiolumot is, később együtt analizálták a létrehozott HRC-k peroxidáz tartalmát. A jelen tanulmánynak megfelelően, a HRP szint jóval magasabb volt a HRC-kben, mint az in vitro növényke levelében. Sajnos Saitou és mtsai (106) kéziratában nem közöltek adatokat a bioaktív komponensekkel kapcsolatban. Egy másik tanulmányban *Brassica rapa* hipokotilt, levelet és gyökeret inokuláltak tú segítségével. A gyökérből létrehozott HRC-k nem voltak életképesek, ill. az életképes HRC-k 89%-át levelekről izolálták, mindössze

11%-uk származott hipokotilról (141). Az általánosan alkalmazott levél életképebb HRC forrásnak tűnik a levélnyelhez hasonlítva.

5.1.4. *A biológiailag aktív komponensek koncentrációja feltehetően a MYR izoenzim mintázattól függ*

Az ArP és ArLB csoportok közötti szignifikánsan eltérő aromás nitril koncentrációkért feltehetően a különböző MYR izoenzim aktivitások a felelősek (11. ábra, 17. ábra). Ez a következő két, egymással ellenkező jelenséggel szemléltethető a legjobban: egy MYR band (MyrB2) intenzitása és a PECN abundanciája között szignifikánsan pozitív korrelációt tapasztaltunk (korrelációs érték = 0,58; $p = 0,014$; 17.a ábra); másrészt a MyrB2 enzim nagyobb mértékű jelenléte alacsonyabb mennyiségű MeSPITC-ot (korrelációs érték = -0,516; $p = 0,03$; 17.b ábra) eredményezett. Tehát a különböző izoenzimekkel katalizált hidrolízis feltehetőleg különböző bomlástermék mintázatokat hoz létre a HRC-kben. A hatásnak nem kell közvetlennek lennie: a MYR izoenzimek működése nélkül is bekövetkezhet megnövekedett nitril termelődés; spontán bomlás, vagy egyéb enzimek, enzim komplexeken keresztül, mint pl. NSP, ESP (6,15,139,156–158).

Statisztikailag ugyan nem szignifikánsan, de úgy látszik, hogy a szerv-eredet befolyásolja a HRC-k MYR mintázatát (11. ábra, 15.c ábra). Brassicaceae növényekben már írtak le szerv-specifikus MYR aktivitást és génexpressziót. Li és Kushad (159) azt tapasztalták, hogy a natív torna növény leveleinek és gyökereinek a GLS tartalmuktól függetlenül eltérő a MYR aktivitásuk. Wittstock és mtsai (156) *Arabidopsis thaliana*-ban a MYR izoenzimek és nitril specifikus proteinek (NSP) jelenlétét szerv specifikus kombinációban figyelték meg. Annak ellenére, hogy a MYR nem szubsztrát specifikus enzim (22), az enzimátikus hidrolízis különféle termékeket (pl. ITC, nitril) (158) eredményezhet a különböző MYR kötő fehérjéken és MYR asszociált fehérjéken (pl. NSP vagy epitiospecifikus proteinek, ESP-k) keresztül.

A fentiekkel összhangban az eredményeink azt mutatták, hogy az ITC-nitril csere valószínűsíthetően a MYR jelerősség változások következménye (158). Eriksson és mtsai (160) a MYR gén család szerv specifikus expressziójáról számoltak be. Mindössze a mag szövetben tapasztaltak MyrA izoenzim génexpressziót, míg a MyrB izoformák a kotiledonban és a levelekben fejeződtek ki. Továbbá feltételezték a MyrB

gének egyedi szerv-specifikus expresszióját, mert a magok és a levelek tartalmaztak egyedi MyrB transzkriptokat. Ezen felül az *Arabidopsis thaliana*-ban szintén szerv-specifikus NSP génextpressziós szabályozást mutattak ki (161). Az eredményeink alapján az illékony anyagoknak nem csak a teljes hozamát, hanem az összetevőket is erősen befolyásolhatja az enzim mintázat. Az említett enzimek mintázatát pedig feltehetőleg a HRC-k szerv eredete határozza meg.

Összegezve, valószínűsíthető, hogy a különböző szervek inokulációjából származó eltérő enzim expressziós mintázatok következményei az eltérő komponensek bioszintézisét okozó GLS–MYR–ITC/nitril rendszerben megfigyelt különbségek.

5.2. A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata

5.2.1. A torma illóolaj erősebb antifungális aktivitást mutat, mint egyéb ITC-ok önmagukban

Az ITC-ok antifungális hatását, ideértve a torma illóolaj-ét is, számos publikációban tanulmányozták (11,26,27,29–33,35,36). Kísérleteink során a torma illóolaj légtérbe párologtatva és folyadék fázisban is hatásosan gátolta az *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. nidulans* és *A. fumigatus* növekedését (7. ábra). A mért IC₅₀ értékek (0,05-0,13 µg/ml a vizsgált fajoktól függően) összevethetőek a torma főkomponensét alkotó AITC és etil-ITC, ill ezek elegyeinek hatásával *Botrytis cinerea*-án és *Penicillium expansum*-on tesztelve (EC₅₀ = 0,07 – 0,14 µg/ml) (30).

Számos kísérletben megfigyelték, hogy a különböző ITC-ok antifungális hatásának erősségét jelentősen befolyásolja az oldallánc típusa, valamint a cél molekula természete (32,45). Nem meglepő, hogy az ITC-ok keveréke általánosságban erősebb hatású, mint az egyes ITC komponensek önmagukban. Például Wu és mtsai (30) az AITC és etil-ITC 3:1 arányú keverékét erősebb antigerminációs hatásúnak találták *P. expansum* és *B. cinerea* spórákon vizsgálva, mint az AITC-t és etil-ITC-t önmagában. Park és mtsai (29) a torma illóolaj alacsonyabb minimális gátló koncentrációját (MIC) állapították meg, mint az AITC-ét, számos baktériumon és egy *C. albicans* törzsön tesztelve. Kísérleteinkben a torma illóolaj szintén szignifikánsan erősebb növekedés gátló hatást mutatott *C. albicans*-on tesztelve, mint a fő komponensei (AITC, PEITC)

önmagukban (18. ábra). Ezek az adatok kiemelik az ITC keverékek, csak úgymint a természetes torma illóolaj fölényét az önálló ITC-ok hatásával szemben.

5.2.2. A torma illóolaj koncentráció függően fungicid, illetve fungisztatikus hatású *Candida albicans*-on tesztelve

Az ITC-k illékony természete döntő szerepet tölt be az antifungális aktivitásban, mivel a gomba növekedése újra megindulhat egy fungisztatikus, de nem fungicid komponens elpárolgását követően. Annak ellenére, hogy a kísérleteinkben a torma illóolaj túlnyomóan fungicid (fungitoxikus) hatásúnak bizonyult *C. albicans*-on tesztelve (19. ábra), ismert a különböző ITC-ok koncentráció függő fungisztatikus (alacson koncentrációk esetén) és fungitoxikus (magasabb koncentrációk esetén) hatása *Sclerotinia sclerotiorum* teszt organizmusokon (32). Az erős, de időleges antifungális hatású ITC-ok előnyösek lehetnek: a táplálékként bevitt ITC-ok hatékonyan kontrollálhatják a mikrobiális aktivitást a szájüregben és a vékonybélben, anélkül, hogy maradandó károkat okoznának a mikroflórában. Másrészt a mikrobákban a rövid jelenlétük az erős hatásukkal kombinálva megelőzheti a rezisztencia gyors kifejlődését. Nem meglepő módon, az ITC-ok fontos szerepet töltenek be számos növény antifungális és egyéb védelmi rendszerében (35,36,47).

5.2.3. A GSH védi a *Candida albicans*-t a torma illóolajtól

Számos *in vivo* és *in vitro* kísérleti adat demonstrálja, hogy az ITC-ok reakcióba lépnek a GSH-al, akár ki is üríthetik a GSH-pool-t, de fehérjéket is inaktiválhatnak tiol csoportjaikkal reagálva (19,23,24,42–45,161,162). Az adataink (8. táblázat) a torma illóolaj szignifikáns növekedésgátló hatását szemléltetik, anélkül, hogy megzavarnák a sejtek GSH összetételét. Ezt részben magyarázhatja a torma illóolaj által generált oxidatív stressz (19. ábra, 8. táblázat), mely feltehetőleg a mitokondriális funkciókat károsítja (32). A megfigyelés azt sugallja, hogy a GSH depléciónak nem szükségszerű a torma illóolaj antifungális aktivitásában. Alacsony torma illóolaj koncentráció esetén a GSH-ITC reakciót katalizáló (20,26,46,47,162–164) GST indukciója (8. táblázat), valamint a magas koncentrációknál a GSH-pool depléciónak azt sugallja, hogy a torma illóolaj reagál a GSH-nal *in vivo*, de a sejtek ellensúlyozni tudják a folyamatot alacsony torma illóolaj szint mellett. Nem meglepő módon a *C. albicans*-ban jól ismert módon a

GSH szint csökkenését okozó CDNB (143) erős szinergizmust mutatott a torma illóolajjal (9. táblázat). Ebből a szempontból feltételezzük, hogy a GSH nem az ITC-ok célmolekulája, hanem a védelmi rendszer része, azaz a GSH védi a sejteket a tiolreaktív anyagokkal szemben.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. *A hairy root kultúrák GLS mintázatában a GLN dominál*

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a HRC-k GLS mintázata eltér a natív gyökér mintázatától. Amíg a natív gyökérben az alifás SIN dominál a nála körülbelül egy nagyságrenddel kisebb mennyiségben jelen lévő GLN mellett, a HRC-kben egyértelműen az aromás GLN a főkomponens. Enzimatikus bomlástermékeik (SIN→AITC, GLN→PEITC) is prekuzoraikkal azonos arányban vannak jelen. A natív gyökérben minor komponensként megjelenő indol GLS-ok és nitrilek néhány HRC-ban major komponensként jelentek meg. Az indol-3-acetonitril nemcsak a glükobrasszicin, hanem az agrobakteriális géntranszformáció terméke is lehet.

6.2. *A torma hairy root kultúrák enzim és metabolit mintázatában meghatározó szerepe van az inokulált növényi szerveknek*

A tanulmány alapján kiemelendő, hogy különböző növényi szervek *Agrobacterium rhizogenes*sel való inokulálásával növelhető a képződő HRC genetikai klónok variabilitása. Annak ellenére, hogy a legelterjedtebb célszerv a levéllemez, egyéb növényi szervek, mint pl. levélnyél (petiólum) is transzformálható agrobaktériummal HRC képzési céllal, más metabolit és enzimmintázatot eredményezve.

Az enzim- és egyéb proteinek termelése általában a natív növényekben is szervspecifikus. Ez feltehetően átfordítódik a HRC-k szerv specifikus MYR jelenlétére, ami hozzájárul a torma HRC-k biológiailag aktív komponenseinek a különböző mintázat- és koncentráció beli különbségeihez. Ez jelenik meg a GLS–MYR–ITC/nitril rendszer szerv-függő különbségeiben.

6.3. *A torma illóolaj antifungális hatása*

Kimutattuk, hogy a torma illóolaj koncentráció függő fungicid (nagyobb koncentrációk) és fungisztikus (kisebb koncentrációk) hatással bír fonalas és sarjadzó, valamint humán patogén (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) és apatogén (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*) gombákra, illékony és folyadék fázisban egyaránt.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a torma illóolaj (természetes ITC-ok keveréke) erősebb antifungális hatással bír, mint főkomponensei (AITC, PEITC) önmagukban. Ennek magyarázata a major és minor ITC és nitril komponensek együttes additív vagy szinergista hatása lehet.

6.4. A GSH védi a Candida albicansst a torma illóolaj által okozott oxidatív stresszhatástól

A torma illóolaj antifungális hatásával kapcsolatos kísérletek eredményeit összefoglalva feltételezzük, hogy a torma illóolaj egyéb ITC-okhoz hasonlóan több támadásponton hat (25). A torma illóolaj a sejtekben számos enzimet és fehérjét inaktiválhat, valamint a mitokondriális funkciókra hatva oxidatív stresszt indukálhat (32). A sejtek GSH-nal képesek detoxifikálni a torma illóolaj komponenseit (46,163). A GSH spontán reagál a torma illóolaj ITC komponenseivel, mely reakciót a GST katalizálhatja. A sejtek túlélnek a torma illóolaj kezelést, amíg ez a folyamat aktív. Az antioxidáns folyamatok szintén segíthetik ezt a jelenséget (32,47). Magas koncentrációban a torma illóolaj letális, mivel kiüríti a GSH poolt (a gyors GSH felhasználás, és/vagy a GSH termelés inaktiválásán keresztül), ami kontrolálatlan ITC-protein és a sejt egyéb érzékeny reakciójához vezet, súlyos oxidatív stresszt és valószínűleg egyéb károkat is okozva. Ennek következtében a GSH metabolizmus manipulálása hatékony stratégia lehet a gombák ITC toleranciájának megzavarásához.

Szintén bemutattuk, hogy a torma illóolaj hat a *C. albicans* sarjadzó sejtjeiben zajló GSH metabolizmusra, és oxidatív stresszt okozhat elsősorban a GSH-pool deplécióján keresztül. Feltételezzük, hogy a sejtek túlélése a GSH tartalmuktól függ, mely védelmet nyújt a reaktív ITC molekulákkal szemben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A torma hairy root kultúrák a glükozinolát-mirozináz-izotiocianát rendszer tanulmányozására, valamint a biológiailag aktív izotiocianátok, valamint a molekuláris biológiában széleskörben felhasznált torma peroxidáz termeltetésére alkalmas növényi szervek. *Armoracia rusticana* levélnyél, illetve levéllemez *Agrobacterium rhizogenes*-szel való fertőzést követően 21 életképes hairy root genetikai klónt izoláltunk és vizsgáltunk. Multivariábilis statisztikai módszerrel elemeztük a hairy root klónok biomassza tulajdonságait, glükozinolát-, izotiocianát- és nitril tartalmát, mirozináz és torma peroxidáz enzimek mintázatát, valamint a morfológiai tulajdonságaikat. A pozitív és negatív korrelációkon túl, a hairy root kultúrák számos vizsgált tulajdonságukban szerv-eredet függőséget mutattak. Például a napi növekedési index, a glükobrasszicin és torma peroxidáz értékek szignifikánsan magasabbak voltak a levéllemezéből indukált hairy root vonalakban.

A torma (*Armoracia rusticana*) fűszerként, valamint gyógyászati felhasználásáért is az illóolaja (különböző izotiocianátok természetes keveréke) a felelős. Az izotiocianátok antikarcinogén hatása mellett az antimikrobiális – elsősorban az antibakteriális – aktivitása széles körben tanulmányozott. A kísérleteinkben a torma illóolaj erős fungicid hatását mutattuk ki *Candida albicans*-on tesztelve, illékony, illetve folyékony fázisban egyaránt. Folyadék fázisban a torma illóolaj antifungális hatása jóval jelentősebb volt, mint a fő komponenseinek (allil- és fenetil-izotiocianát) hatása önmagukban. A torma illóolaj szubletális koncentrációban oxidatív stresszt generált, amit a megemelkedett szuperoxid tartalom, a megnövekedett specifikus glutation reduktáz, glutation peroxidáz, kataláz, valamint szuperoxid diszmutáz aktivitások jellemeztek. A glutation-függő detoxifikációt jelző specifikus glutation-S-transzferáz aktivitás növekedését is megfigyeltük. A torma illóolaj magasabb koncentrációban kiürítette a glutation poolt, erősen megnövelte a szuperoxid termelést, és gyorsan elpusztította a sejteket. A torma illóolaj és a glutation poolt kiürítő 1-klór-2,4-dinitrobenzol együttes alkalmazása erős szinergizmust mutatott *Candida albicans* sejteken. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a glutation metabolizmus megvédi a gombát az izotiocianátoktól.

8. SUMMARY

Horseradish hairy root cultures are plant tissue organs, used to study the glükosinolate–myrosinase–isothiocyanate system and also to produce the biologically active isothiocyanates and horseradish peroxidase, which enzyme is widely used in molecular biology. After *Agrobacterium rhizogenes* infection of sterile *Armoracia rusticana* petioles and leaf blades, 21 viable hairy root clones were isolated. Biomass properties, glükosinolate content, isothiocyanate and nitrile content, myrosinase and horseradish peroxidase enzyme patterns, and morphological features were analysed with multi-variable statistical methods. Beyond that several positive and negative correlations were observed, the most outstanding phenomenon was many parameters of the hairy root clones proved dependence on the organ of origin. For example, the daily growth index, glükobrassicin, or horseradish peroxidase values showed significantly higher levels in horseradish hairy root cultures initiated from leaf blades.

Both for the condimental and medicinal usage of horseradish (*Armoracia rusticana*), it's essential oil (a natural mixture of different isothiocyanates) is responsible. Beside of the isothiocyanates anticarcinogenic effect, its antimicrobial – primarily the antibacterial - activity, and the mechanism of action is wide-spread studied. In our experiments, horseradish essential oil had strong fungicide effect against *Candida albicans* both in volatile and liquid phase. In liquid phase this antifungal effect was more significant than those of it's main components allyl, and 2-phenylethyl isothiocyanate. Horseradish essential oil, induced oxidative stress at sublethal concentration, which was characterized with the increase of superoxide content and up-regulated specific glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities. Induction of specific glutathione S-transferase activities as marker of glutathione dependent detoxification was also shown. At higher concentration, horseradish essential oil depleted the glutathione pool, increased heavily the superoxide production and killed the cells rapidly. When horseradish essential oil and the glutathione pool depleting agent, 1-chlore-2,4-dinitrobenzene were applied together to kill *Candida albicans* cells, strong synergism was observed. Based on all above, we assume that glutathione metabolism protects fungi against isothiocyanates.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Shehata A, Mulwa RMS, Babadoost M, Uchanski M, Norton MA, Skirvin R, Walters SA. Horseradish: Botany, Horticulture, Breeding. In Horticultural Reviews; Janick, J., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009: 221–261.
2. Agneta R, Möllers C, Rivelli AR. (2013) Horseradish (*Armoracia rusticana*), a neglected medical and condiment species with a relevant glükosinolate profile: a review. Genet Resour Crop Evol, 1923–1943.
3. Nguyen NM, Gonda S, Vasas G. (2013) A Review on the Phytochemical Composition and Potential Medicinal Uses of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root. Food Rev Int, 29: 261–275.
4. Bratsch A. (2009) Specialty Crop Profile: Horseradish. Virginia Cooperative Extension, 438(104).
5. Gonda S, Kiss-Szikszai A, Szűcs Z, Nguyen NM, Vasas G. (2016) Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC): Simultaneous Determination of Glucosinolates and AITC by CE-MEKC. Phytochem Anal, 27: 191–198.
6. Szűcs Z, Plaszkó T, Cziáky Z, Kiss-Szikszai A, Emri T, Bertóti R, Sinka LT, Vasas G, Gonda S. (2018) Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glükosinolate - myrosinase - isothiocyanate system. BMC Plant Biol, 18(1): 85.
7. Tomsone L, Kruma Z, Galoburda R, Talou T. (2013) Composition of Volatile Compounds of Horseradish Roots (*Armoracia rusticana* L.) Depending on the Genotype. Proc Latv Univ Agr, 29: 1–10.
8. Tisserand R, Young R. Essential oil safety: a guide for health care professionals; Second edition.; Elsevier Ltd: Edinburgh, 2013.

9. Bones AM, Rossiter JT. (1996) The myrosinase-glükosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant*, 97: 194–208.
10. Mcdanell R, Mclean AEM, Hanley AB, Heane RK, Fenwick GR. (1988) Chemical and biological properties of indole glükosinolates (glükobrassicins): A review. *Food Chem Toxicol*, 26: 59–70.
11. Vig AP, Rampal G, Thind TS, Arora S. (2009) Bio-protective effects of glükosinolates – A review. *LWT - Food Sci Technol*, 42: 1561–1572.
12. Li X, Kushad MM. (2005) Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiol Biochem*, 43: 503–511.
13. Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. In *Plant Molecular Evolution*; Doyle JJ, Gaut BS. Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2000: 93–113.
14. Márton MR, Krumbein A, Platz S, Schreiner M, Rohn S, Rehmers A, Lavric V, Mersch-Sundermann V, Lamy E. (2013) Determination of bioactive, free isothiocyanates from a glükosinolate-containing phytotherapeutic agent: A pilot study with *in vitro* models and human intervention. *Fitoterapia*, 85: 25–34.
15. Angelino D, Dosz EB, Sun J, Hoeflinger JL, Van Tassell ML, Chen P, Harnly JM, Miller MJ, Jeffery EH. (2015) Myrosinase-dependent and –independent formation and control of isothiocyanate products of glükosinolate hydrolysis. *Front Plant Sci*, 6: 831.
16. Gonda S, Szűcs Z, Plaszkó T, Cziáky Z, Kiss-Sziksai A, Vasas G, M-Hamvas M. (2018) A Simple Method for On-Gel Detection of Myrosinase Activity. *Molecules*, 23: 2204.
17. Mucete D, Borozan A, Radu F, Jianu I. (2006) Antibacterial activity of isothiocyanates, active principles in *Armoracia rusticana* roots (II), *J Agroalimnt Processes Technol*, 12(2): 453-460.

18. 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. *Economic Botany*, 63: 303-313.
19. Morimitsu Y, Hayashi K, Nakagawa Y, Horio F, Uchida K, Osawa T. (2000) Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, wasabi. *Biofactors*, 13: 271-276.
20. Lee DS, Kim TH, Jung YS. (2014) Inhibitory effect of allil isothiocyanate on platelet aggregation. *J Agric Food Chem*, 62: 7131–7139.
21. Matsuda H, Ochi M, Nagatomo A, Yoshikawa M. (2007) Effects of allil isothiocyanate from horseradish on several experimental gastric lesions in rats. *Eur J Pharmacol*, 561: 172–181.
22. Worfel RC, Schneider KS, Yang TCS. (1997) Suppressive Effect of Allyl Isothiocyanate on Populations of Stored Grain Insect Pests. *J Food Process Pres*, 21: 9–19.
23. Dufour V, Stahl M, Baysse C. (2015) The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology*, 161: 229–243.
24. Luciano FB, Hosseinian FS, Beta T, Holley RA. (2008) Effect of free-SH containing compounds on allil isothiocyanate antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci*, 73: M214-220.
25. Shin IS, Masuda H, Naohide K. (2004) Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *Int J Food Microbiol*, 94: 255–261.
26. Blažević I, Radonić A, Skočibušić M, De Nicola GR, Montaut S, Iori R, Rollin P, Mastelić J, Zekić M, Maravić A. (2011) Glucosinolate profiling and antimicrobial screening of *Aurinia leucadea* (Brassicaceae). *Chem Biodivers*, 8: 2310–2321.
27. Kurepina N, Kreiswirth BN, Mustaev A. (2013) Growth-inhibitory activity of natural and synthetic isothiocyanates against representative human microbial pathogens. *J Appl Microbiol*, 115: 943–954.

28. Nielsen PV, 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. *Int J Food Microbiol*, 60: 219–229.
29. Park HW, Choi KD, Shin IS. (2013) Antimicrobial activity of isothiocyanates (ITCs) extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against oral microorganisms. *Biocontrol Sci*, 18: 163–168.
30. Wu H, Zhang X, Zhang GA, Zeng SY, Lin KC. (2011) Antifungal Vapour-phase Activity of a Combination of Allyl Isothiocyanate and Ethyl Isothiocyanate Against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* Infection on Apples. *J Phytopathol*, 159: 450-455.
31. Calmes B, N’Guyen G, Dumur J, Brisach CA, Campion C, Iacomi B, Pigné S, Dias E, Macherel D, Guillemette T, Simoneau P. (2015) Glucosinolate-derived isothiocyanates impact mitochondrial function in fungal cells and elicit an oxidative stress response necessary for growth recovery. *Front Plant Sci*, 6: 414.
32. Kurt S, Güneş U, Soylu EM. (2011) *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of synthetic pure isothiocyanates against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Manag Sci*, 67: 869–875.
33. Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR, James RL. (2003) Isothiocyanates Produced by Brassicaceae Species as Inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis*, 87: 407–412.
34. Sellam A, Dongo A, Guillemette T, Hudhomme P, Simoneau P. (2007) Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allil-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Pathol*, 8: 195–208.
35. Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M, Brown PD, Saito K, Kamiya Y. (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of

- Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant J, 67: 81–93.
36. Tierens KF, Thomma BP, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BP, Broekaert WF. (2001) Study of the role of antimicrobial glükosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. Plant Physiol, 125:1688–1699.
 37. Sharma HK, Ingle S, Singh C, Sarkar BC, Upadhyay A. (2012) Effect of various process treatment conditions on the allil isothiocyanate extraction rate from mustard meal. J Food Sci Technol, 49: 368–372.
 38. Dufour V, Stahl M, Rosenfeld E, Stintzi A, Baysse C. (2013) Insights into the mode of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol, 79: 6958–6968.
 39. Edris AE. (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother Res, 21: 308–323.
 40. Morath SU, Hung R, Bennett JW. (2012) Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. Fungal Biol Rev, 26: 73–83.
 41. Åsberg SE, Bones AM, Øverby A. (2015) Allyl isothiocyanate affects the cell cycle of *Arabidopsis thaliana*. Front Plant Sci, 6: 364.
 42. Bruggeman IM, Temmink JH, van Bladeren PJ. (1986) Glutathione- and cysteine-mediated cytotoxicity of allil and benzyl isothiocyanate. Toxicol Appl Pharmacol, 83: 349–359.
 43. Luciano FB, Holley RA. (2009) Enzymatic inhibition by allil isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. Int J Food Microbiol, 131: 240–245.
 44. Kawakishi S, Kaneko T. (1987) Interaction of proteins with allil isothiocyanate. J Agric Food Chem, 35: 85–88.

45. Nakamura Y, Miyoshi N. (2010) Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74: 242–255.
46. Nakamura Y, Ohigashi H, Masuda S, Murakami A, Morimitsu Y, Kawamoto Y, Osawa T, Imagawa M, Uchida K. (2000) Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*, 60: 219–225.
47. Lin CM, Preston JF, Wei CI. (2000) Antibacterial mechanism of allil isothiocyanate. *J Food Prot*, 63: 727–734.
48. Sofrata A, Santangelo EM, Azeem M, Borg-Karlson AK, Gustafsson A, Pütsep K. (2011) Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of *Salvadora persica* is highly active against Gram-negative bacteria. *PLoS ONE*, 6: e23045.
49. Breier A, Ziegelhöffner A. (2000) “Lysine is the Lord”, thought some scientists in regard to the group interacting with fluorescein isothiocyanate in ATP-binding sites of P-type ATPases but, is it not cysteine? *Gen Physiol Biophys*, 19: 253–263.
50. Nowicki D, Maciąg-Dorszyńska M, Kobiela W, Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G. (2014) Phenethyl isothiocyanate inhibits shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by stringent response induction. *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 2304–2315.
51. Kojima M, Ogawa K. (1971) Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I) Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. *J Ferment Technol*, 49: 740–746.
52. Hecht SS, Kenney PMJ, Wang M, Upadhyaya P. (2002) Benzyl isothiocyanate: an effective inhibitor of polycyclic aromatic hydrocarbon tumorigenesis in A/J mouse lung. *Cancer Lett*, 187: 87–94.
53. Zhang C, Shu L, Kim H, Khor TO, Wu R, Li W, Kong ANT. (2016) Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically

through regulating microRNA-194. *Mol Nutr Food Res*, 60: 1427–1436.

54. Arumugam A, Razis AFA. (2018) Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: a Review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19: 1439–1448.
55. Gupta P, Srivastava SK. (2012) Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER2-positive breast cancer models. *BMC Med*, 10: 80.
56. Lamy E, Herz C, Lutz-Bonengel S, Hertrampf A, Márton MR, Mersch-Sundermann V. (2013) The MAPK Pathway Signals Telomerase Modulation in Response to Isothiocyanate-Induced DNA Damage of Human Liver Cancer Cells. *PLOS ONE*, 8, e53240.
57. Mitsiogianni M, Koutsidis G, Mavroudis N, Trafalis DT, Botaitis S, Franco R, Zoumpourlis V, Amery T, Galanis A, Pappa A, Panayiotidis MI. (2019) The Role of Isothiocyanates as Cancer Chemo-Preventive, Chemo-Therapeutic and Anti-Melanoma Agents. *Antioxidants (Basel)*, 8: 106.
58. Yano S, Wu S, Sakao K, Hou DX. (2019) Involvement of ERK1/2-mediated ELK1/CHOP/DR5 pathway in 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate-induced apoptosis of colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 83: 960–969.
59. Gupta R, Bhatt LK, Momin M. (2019) Potent antitumor activity of Laccaic acid and Phenethyl isothiocyanate combination in colorectal cancer via dual inhibition of DNA methyltransferase-1 and Histone deacetylase-1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 377: 114631.
60. Darkwa M, Burkhardt C, Tsuji P. (2019) Dietary Polyphenols and Sulforaphane: Impact on Hallmarks of Colon Cancer (P06-045-19). *Curr Dev Nutr*, 3.
61. Yanaka A, Suzuki H, Mutoh M, Kamoshida T, Kakinoki N, Yoshida S, Hirose M, Ebihara T, Hyodo I. (2019) Chemoprevention against colon cancer by dietary intake of sulforaphane. *FFHD*, 9: 392-411.
62. Krajka-Kuźniak V, Cykowiak M, Baer-Dubowska W. (2019) Phytochemical

Combinations Modulate the Activation of Nrf2 and Expression of SOD in Pancreatic Cancer Cells More Efficiently Than Single Plant Components. *Proc*, 11: 22.

63. Morrison MEW, Joseph JM, McCann SE, Tang L, Almohanna HM, Moysich KB. (2019) Cruciferous Vegetable Consumption and Stomach Cancer: A Case-Control Study: Nutrition and Cancer: A Case-Control Study. *Nutr Cancer*, 1-10.
64. Zou Y, Huang Y, Ma X. (2019) Phenylhexyl isothiocyanate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis via repairing mutant P53 in human myeloid leukemia M2 cells. *Oncol Lett*, 18: 3358–3366.
65. Lin JF, Tsai TF, Lin YC, Chen HE, Chou KY, Hwang TIS. (2019) Benzyl isothiocyanate suppresses IGF1R, FGFR3 and mTOR expression by upregulation of miR-99a-5p in human bladder cancer cells. *Int J Oncol*, 54: 2106–2116.
66. Chang WJ, Chen BH, Inbajar BS, Chien JT. (2019) Preparation of allil isothiocyanate nanoparticles, their anti-inflammatory activity towards RAW 264.7 macrophage cells and anti-proliferative effect on HT1376 bladder cancer cells. *J Sci Food Agric*, 99: 3106-3116.
67. Zhang C, Shu L, Kim H, Khor TO, Wu R, Li W, Kong ANT. (2016) Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically through regulating microRNA-194. *Mol Nutr Food Res*, 60: 1427–1436.
68. Majewska A, Bałasińska, Śena O, Dąbrowska B. (2004) Antioxidant properties of leaf and root extract and oil from different types of horseradish (*Armoracia rusticana* Gaertn.). *Folia Hortic*, 16: 15–22.
69. Dayalan Naidu S, Suzuki T, Yamamoto M, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT. (2018) Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1. *Mol Nutr Food Res*, 62: e1700908.
70. Wise RA, Holbrook JT, Criner G, Sethi S, Rayapudi S, Sudini KR, Sugar EA, Burke A, Thimmulappa R, Singh A, Talalay P, Fahey JW, Berenson CS, Jacobs

- MR, Biswal S, Broccoli Sprout Extract Trial Research Group. (2016) Lack of Effect of Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. PLOS ONE, 11: e0163716.
71. Lee SY, Bong SJ, Kim JK, Park SU. (2016) Glucosinolate biosynthesis as influenced by growth media and auxin in hairy root cultures of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Emir J Food Agric, 28: 277–282.
 72. Caglayan B, Kilic E, Dalay A, Altunay S, Tuzcu M, Erten F, Orhan C, Gunal MY, Yulug B, Juturu V, Shain K. (2019) Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in traumatic brain injury in mice. Mol Biol Rep, 46: 241–250.
 73. Abdull R, Ahmad F, Ibrahim MD, Kntayya SB. (2014). Health Benefits of Moringa oleifera. APJCP, 15(20): 8571–8576.
 74. Dorsch W, Adam O, Weber J, Ziegeltrum T. (1984) Antiasthmatic effects of onion extracts-detection of benzyl- and other isothiocyanates (mustard oils) as antiasthmatic compounds of plant origin. Eur J Pharmacol, 107: 17–24.
 75. Wang D, Wang C, Cao Y, Zhang X, Tao X, Yang L, Chen J, Wang S, Li Z. (2014) Allyl Isothiocyanate Increases MRP1 Function and Expression in a Human Bronchial Epithelial Cell Line. Oxid Med Cell Longev, 2014: 547379.
 76. Zhang Y, Yu L, Ao M, Jin W. (2006) Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. J Ethnopharmacol, 105: 274–279.
 77. Chen Q, Wu S, Lu T, Chen J, Xu Z, Chen J. (2019) The Effect of Sulforaphane on the Activity and Mineralization of Osteoblasts under Oxidative Stress. Pharmacology, 104: 147–156.
 78. Armah CN, Derdemezis C, Traka MH, Dainty JR, Doleman JF, Saha S, Leung W, Potter JF, Lovegrove JA, Mithen RF. (2015) Diet rich in high glucoraphanin broccoli reduces plasma LDL cholesterol: Evidence from randomised controlled trials. Mol Nutr Food Res, 59: 918–926.

79. Xu Z, Wang S, Ji H, Zhang Z, Chen J, Tan Y, Wintergerst K, Zheng Y, Sun J, Cai L. (2016) Broccoli sprout extract prevents diabetic cardiomyopathy via Nrf2 activation in db/db T2DM mice. *Sci Rep*, 6: 30252
80. Fix C, Carver-Molina A, Chakrabarti M, Azhar M, Carver W. (2019) Effects of the isothiocyanate sulforaphane on TGF- β 1-induced rat cardiac fibroblast activation and extracellular matrix interactions. *J Cell Physiol*, 234: 13931–13941.
81. Lynch R, Diggins EL, Connors SL, Zimmerman AW, Singh K, Liu H, Talalay P, Fahey JW. (2017) Sulforaphane from Broccoli Reduces Symptoms of Autism: A Follow-up Case Series from a Randomized Double-blind Study. *Glob Adv Health Med*, 6: 1-7.
82. Shimoda H, Hirano M, Takeda S, Hitoe S. (2018) Glucosinolates and isothiocyanates from broccoli seed extract suppress protein glycation and carbonylation. *FFHD*, 8: 35-48–48.
83. Valgimigli L, Iori R. (2009) Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environ Mol Mutagen*, 50: 222–237.
84. Murata M, Yamashita N, Inoue S, Kawanishi S. (2000) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allil isothiocyanate. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 797–805.
85. Akbar H, Sedzro DM, Khan M, Bellah SF, Billah SMS. (2018) Structure, Function and Applications of a Classic Enzyme: Horseradish Peroxidase. *J Chem Environ Biol Eng*, 2: 52–59.
86. Veitch NC. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochem*, 65: 249–259.
87. Mano Y. Transgenic Horseradish (*Armoracia rusticana*). In *Transgenic Crops II*; Bajaj, Y.P.S., Ed.; *Biotechnology in Agriculture and Forestry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2001: 26–38.
88. Gelvin SB. (2003) *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology*

- behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 16–37.
89. Habibi P, Soccol CR, Grossi-de-Sa MF. Hairy Root-Mediated Biotransformation: Recent Advances and Exciting Prospects. In *Hairy Roots*; Srivastava V, Mehrotra S, Mishra S, Eds.; Springer Singapore, 2018: 185–211.
 90. Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM, Oksman-Caldentey KM. (2016) Exploring the Metabolic Stability of Engineered Hairy Roots after 16 Years Maintenance. *Front Plant Sci*, 7: 1486.
 91. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 161: 839–851.
 92. Srivastava S, Srivastava AK. (2007) Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 29–43.
 93. Tian L. Using Hairy Roots for Production of Valuable Plant Secondary Metabolites. In *Filaments in Bioprocesses*; Krull R, Bley T., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Vol. 149, 2015: 275–324.
 94. Kastell A, Smetanska I, Ulrichs C, Cai Z, Mewis I. (2013) Effects of Phytohormones and Jasmonic Acid on Glucosinolate Content in Hairy Root Cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. *Appl Biochem Biotechnol*, 169: 624–635.
 95. Kastell A, Schreiner M, Knorr D, Ulrichs C, Mewis I (2018). Influence of nutrient supply and elicitors on glukosinolate production in *E. sativa* hairy root cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 132: 561–572.
 96. Zhong C, Nambiar-Veetil M, Bogusz D, Franche C. Hairy Roots as a Tool for the Functional Analysis of Plant Genes. In *Hairy Roots*; Srivastava V, Mehrotra S, Mishra S, Eds.; Springer Singapore, 2018: 275–292.
 97. Nakashimada Y, Uozumi N, Kobayashi T. (1995) Production of plantlets for use as artificial seeds from horseradish hairy roots fragmented in a blender. *J Ferment Bioeng*, 79: 458–464.

98. Repunte VP, Kino-Oka M, Taya M, Tone S. (1993) Reversible morphology change of horseradish hairy roots cultivated in phytohormone-containing media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75: 271–275.
99. Huber C, Bartha B, Harpaintner R, Schröder P. (2009) Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environ Sci Pollut Res Int*, 16: 206-213.
100. Huber C, Bartha B, Schröder P. (2012) Metabolism of diclofenac in plants – Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J Hazard Mater*, 243: 250–256.
101. Chen F, Huber C, May R, Schröder P. (2016) Metabolism of oxybenzone in a hairy root culture: Perspectives for phytoremediation of a widely used sunscreen agent. *J Hazard Mater*, 306: 230–236.
102. Parkinson M, Cotter T, Dix PJ. (1990) Peroxidase production by cell suspension and hairy root cultures of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Sci*, 66: 271–277.
103. Krsnik-Rasol M. (1991) Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int J Dev Biol*, 35: 259-263.
104. Saitou T, Kamada H, Harada H. (1991) Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horseradish (*Armoracia lapathifolia*). *Plant Sci*, 75: 195–201.
105. Soudek P, Podlipna R, Marsik P, Vanek T. (2005) Optimalization of the peroxidase production by tissue cultures of horseradish in vitro. *Biol Plant*, 49: 487–492.
106. Flocco CG, Alvarez MA, Giulietti AM. (1998) Peroxidase production *in vitro* by *Armoracia lapathifolia* (horseradish)-transformed root cultures: effect of elicitation on level and profile of isoenzymes. *Biotechnol Appl Biochem*, 28: 33–38.
107. Flocco CG, Giulietti M. (2003) Effect of Chitosan on Peroxidase Activity and Isoenzyme Profile in Hairy Root Cultures of *Armoracia lapathifolia*. *Appl*

Biochem Biotechnol, 110: 175–183.

108. Taya M, Yoyama A, Nomura R, Kondo O, Matsui C, Kobayashi T. (1989) Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system. *J Ferment Bioeng*, 67: 31–34.
109. Tzifra T, Citovsky V. (2006) Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 17: 147–154.
110. Szőke É, Balázs A, Blázovics A, Kéry Á, Kursinszki L, Lemberkovics É, Then M, Alberti-Dér Á, Balogh Gy, Bányai P, Blazics B, Böszörményi A, Kalász H, Könczöl Á, Lugasi A, Szarka Sz, Szentmihályi K, Vasas G. (2012) *Farmakognózia – Fitokémia. Gyógynövények alkalmazása. IV-V. fejezet.* Semmelweis Egyetem, Budapest.
111. Alnsour M, Kleinwächter M, Böhme J, Selmar D. (2013) Sulfate determines the glükosinolate concentration of horseradish in vitro plants (*Armoracia rusticana* Gaertn., Mey. & Scherb.): Sulfate increases the glükosinolate concentration of horseradish in vitro plants. *J Sci Food Agric*, 93: 918–923.
112. Wielanek M, Królicka A, Bergier K, Gajewska E, Skłodowska M. (2009) Transformation of *Nasturtium officinale*, *Barbarea verna* and *Arabis caucasica* for hairy roots and glükosinolate-myrosinase system production. *Biotechnol Lett*, 31: 917–921.
113. Wielanek M, Urbanek H. (2006) Enhanced glükotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 177–186.
114. Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M. (2018) Production of bioactive compounds and gene expression alterations in hairy root cultures of chinese cabbage elicited by copper oxide nanoparticles. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 134: 95–106.
115. Kastell A, Zrenner R, Schreiner M, Kroh L, Ulrichs C, Smetanska I, Mewis I.

- (2015) Metabolic Engineering of Aliphatic Glucosinolates in Hairy Root Cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep*, 33: 598–608.
116. Murashige T, Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15: 473–497.
117. Bertoli A, Giovannini A, Ruffoni B, Guardo AD, Spinelli G, Mazzetti M, Pistelli L. (2008) Bioactive Constituent Production in St. John's Wort *in Vitro* Hairy Roots. Regenerated Plant Lines †. *J Agric Food Chem*, 56: 5078–5082.
118. Agneta R, Rivelli AR, Ventrella E, Lelario F, Sarli G, Bufo SA. (2012) Investigation of Glucosinolate Profile and Qualitative Aspects in Sprouts and Roots of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Using LC-ESI-Hybrid Linear Ion Trap with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Infrared Multiphoton Dissociation. *J Agric Food Chem*, 60: 7474–7482.
119. Rochfort SJ, Trenerry VC. (2008) Imsic, M.; Panozzo, J.; Jones, R. Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glükosinolates based on MSn fragmentation. *Phytochem*, 69: 1671–1679.
120. Farbe N, Poinot V, Debrauwer L, Vigor C, Tulliez J, Fourasté I, Moulis C. (2007) Characterisation of glükosinolates using electrospray ion trap and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 306–319.
121. Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA. (2004) Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, 52: 428–438.
122. Argentieri M, Accogli R, Fanizzi F, Avato P. (2011) Glucosinolates Profile of “Mugnolo”, a Variety of *Brassica oleracea* L. Native to Southern Italy (Salento). *Planta Medica*, 77: 287–292.
123. Sansom CE, Jones VS, Joyce NI, Smallfield BM, Perry NB, van Klink JW. (2015) Flavor, Glucosinolates, and Isothiocyanates of Nau (Cook's Scurvy Grass,

- Lepidium oleraceum*) and Other Rare New Zealand Lepidium Species. J Agric Food Chem, 63: 1833–1838.
124. Petrović S, Drobac M, Ušjak L, Filipović V, Milenković M, Niketić M. (2017) Volatiles of roots of wild-growing and cultivated *Armoracia macrocarpa* and their antimicrobial activity, in comparison to horseradish, *A. rusticana*. Ind Crop Prod, 109: 398–403.
 125. Bradford MM. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 72: 248–254.
 126. M.-Hamvas M, Máthé C, Vasas G, Jámbrik K, Papp M, Beyer D, Mészáros I, Borbély G. (2010) Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. Acta Biol Hung, 61: 35–48.
 127. R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on Feb 28, 2019).
 128. Wickham H. ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis, Springer-Verlag New York Available online: <https://www.springer.com/us/book/9780387981413> (accessed on Feb 28, 2019).
 129. ChemAxon - Software Solutions and Services for Chemistry & Biology Available online: <https://chemaxon.com/> (accessed on Sep 4, 2019).
 130. Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 52: 233–246.
 131. Gun Lee D.; Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. Biochem Biophys Res Commun, 263: 646–651.
 132. Fekete A, Emri T, Gyetvai A, Gazdag Z, Pesti M, Varga Z, Balla J, Cserháti C,

- Emody L, Gergely L, Pócsi I. (2007) Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. FEMS Yeast Res, 7: 834–847.
133. Jakab Á, Emri T, Sipos L, Kiss Á, Kovács R, Dombrádi V, Kemény-Beke Á, Balla J, Majoros L, Pócsi I. (2015) Betamethasone augments the antifungal effect of menadione—towards a novel anti-*Candida albicans* combination therapy. J Basic Microbiol, 55: 973–981.
134. Anderson ME. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth Enzymol, 113: 548–555.
135. Pócsi I, Miskei M, Karanyi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade R. A. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. BMC Genomics, 6:182.
136. Nasution O, Srinivasa K, Kim M, Kim Y-J, Kim W, Jeong W, Choi W. (2008) Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. Eukaryot Cell, 7(11): 2008–2011.
137. Moreno AB, Del Pozo AM, Borja M, Segundo BS. (2003) Activity of the Antifungal Protein from *Aspergillus giganteus* Against *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 93: 1344–1353.
138. Radojčić Redovniković I, Gliveti T, Delonga K, Vorkapi J. (2008) Glucosinolates and their potential role in plant. Period Biol, 110: 297–309.
139. Kissen R, Bones AM. (2009) Nitrile-specifier Proteins Involved in Glucosinolate Hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 284: 12057–12070.
140. Kim M, Chiu YC, Kim N, Park H, Lee C, Juvik J, Ku KM. (2017) Cultivar-Specific Changes in Primary and Secondary Metabolites in Pak Choi (*Brassica Rapa*, Chinensis Group) by Methyl Jasmonate. International J Mol Sci, 18: 1004.

141. Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M. (2016) Production of glükosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). 3 Biotech, 6: 175.
142. Cuéllar-Cruz M, Castaño I, Arroyo-Helguera O, De Las Peñas A. (2009) Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104: 649–654.
143. González-Párraga P, Marín FR, Argüelles JC, Hernández JA. (2005) Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. Biochem Biophys Acta, 1722: 324–330.
144. Kastell A, Smetanska I, Schreiner M, Mewis I. (2013) Hairy roots, callus, and mature plants of *Arabidopsis thaliana* exhibit distinct glükosinolate and gene expression profiles. Plant Cell Tiss Organ Cult, 115: 45–54.
145. Cuong DM, Kim JK, Bong SJ, Baek SA, Jeon J, Park JS, Park SU. (2018) Comparative analysis of glükosinolates and metabolite profiling of green and red mustard (*Brassica juncea*) hairy roots. 3 Biotech, 8: 382.
146. Kim YB, Li X, Kim SJ, Kim HH, Lee J, Kim H, Park SU. (2013) MYB Transcription Factors Regulate Glucosinolate Biosynthesis in Different Organs of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Molecules, 18: 8682–8695.
147. Pedras MSC, Nycholat CM, Montaut S, Xu Y, Khan AQ. (2002) Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. Phytochem, 59: 611–625.
148. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev, 31: 425–448.
149. Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol, 42: 207–220.
150. Alpizar E, Dechamp E, Espeout S, Royer M, Lecouls AC, Nicole M, Bertrand B,

- Lashermes P, Etienne H. (2006) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Rep*, 25: 959–967.
151. Doran PM. *Hairy Roots: Culture and Applications*; (1997) Harwood Academic, Australia 1997; CRC Press; ISBN 978-90-5702-117-6.
152. Noda T, Tanaka N, Mano Y, Nabeshima S, Ohkawa H, Matsui C. (1987) Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Cell Rep*, 6: 283–286.
153. Ha PC, Su KN, Ji YH, Ju BS, Seok PJ, Il PN, Un PS. (2019) Effects of Culture Medium on Growth and Glucosinolate Accumulation in the Hairy Root Cultures of Watercress. *Research J Biotechnol*, 14: 6.
154. Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT. Leaf disc transformation. In *Plant Molecular Biology Manual*; Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., Verma, D.P.S., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1989: 63–71.
155. Saitou T, Hashizume A, Kamada H. (2000) Genes for phytochrome A in horseradish: isolation of cDNAs and analysis of expression during light-induced formation of adventitious shoots from hairy roots. *Plant Cell Rep*, 19: 1212–1218.
156. Wittstock U, Meier K, Dörr F, Ravindran BM. (2016) NSP-Dependent Simple Nitrile Formation Dominates upon Breakdown of Major Aliphatic Glucosinolates in Roots, Seeds, and Seedlings of *Arabidopsis thaliana* Columbia-0. *Front Plant Sci*, 7: 1821.
157. Kuchernig JC, Burow M, Wittstock U. (2012) Evolution of specifier proteins in glükosinolate-containing plants. *BMC Evol Biol*, 12: 127.
158. Barth C, Jander G. (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glükosinolate breakdown and insect defense. *Plant J*, 46: 549–562.
159. Li X, Kushad MM. (2004) Correlation of Glucosinolate Content to Myrosinase

Activity in Horseradish (*Armoracia rusticana*). J Agric Food Chem, 52: 6950–6955.

160. Eriksson S, Ek B, Xue J, Rask L, Meijer J. (2001) Identification and characterization of soluble and insoluble myrosinase isoenzymes in different organs of *Sinapis alba*. *Physiol Plant*, 111: 353–364.
161. Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J, Rask L, Meijer J. (2009) Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochem*, 70: 1345–1354.
162. Zhang Y. (2004) Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res*, 555: 173–190.
163. Cavell BE, Syed Alwi SS, Donlevy A, Packham G. (2011) Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: mechanisms of action and implications for human health. *Biochem Pharmacol*, 81: 327–336.
164. Øverby A, Stokland RA, Åsberg SE, Sporsheim B, Bones AM. (2015) Allyl isothiocyanate depletes glutathione and upregulates expression of glutathione S-transferases in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 6: 277.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező saját közlemények

Bertóti R, Böszörményi A, Alberti Á, Béni S, Szőke É, Vasas G, Gonda S. (2019) Variability of Bioactive Glucosinolates, Isothiocyanates and Enzyme Patterns in Horseradish Hairy Root Cultures Initiated from Different Organs. *Molecules*, 24(15): 2828.

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. *J Basic Microbiol*, 56(10): 1071-1079.

A disszertációtól független közlemények

Szűcs Z, Plaszkó T, Cziáky Z, Kiss-Szikszai A, Emri T, Bertóti R, Sinka L.T, Vasas G, Gonda S. (2018) Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glukosinolate-myrosinase-isothiocyanate system. *BMC Plant Biol*. 18: 85.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szőke Éva** professzor asszonynak, a biológiai tudományok doktorának, aki akkori intézetvezetőként lehetőséget biztosított arra, hogy doktori kutatómunkámat elkezdhessem. Továbbá hálával tartozom hasznos tanácsaiért, a növényi biotechnológia gyakorlati tudományába való bevezetéséért, szakmai irányításáért, támogatásáért.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Vasas Gábor** egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszék vezetőjének, hogy a mesterképzésen megkezdett kutatómunkám kiteljesítését, valamint irányítását mindvégig szakmailag és emberileg is maximálisan támogatta.

Köszönettel tartozom **Dr. Béni Szabolcs**nak, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet igazgatójának, hogy kutatómunkáim megvalósulását mindvégig maximálisan támogatta. Hálás köszönettel tartozom szakmai tanácsaiért.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Blázovics Annának**, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet korábbi igazgatójának is, hogy lehetőséget biztosított kutatómunkám folytatásához.

Őszinte köszönettel tartozom **Dr. Gonda Sándornak**, A Debreceni Egyetem Növénytani Tanszék egyetemi adjunktusának a közös kísérleti és publikációs munkánk során nyújtott mintaértékű emberi és szakmai, elméleti és gyakorlati iránymutatásáért, támogatásáért.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Emri Tamás**nak, a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék egyetemi docensének az antifungális hatásvizsgálatokban nyújtott útmutatásáért, közös gyakorlati és publikációs munkánkért.

Köszönettel tartozom **Dr. Pócsi István** professzor úrnak, a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék vezetőjének, hogy Phd tanulmányaim alatt is lehetőséget biztosított a diplomamunkámhoz megkezdett antifungális kísérletek részletes kidolgozásához. Hálásan köszönöm támogatását, szakmai tanácsait.

Őszinte hálával tartozom **Koller Bélánének**, a Semmelweis Egyetem Növényi biotechnológiai laboratórium aszisztensének a mérhetetlenül nagy segítségét a növényi

szövettenyészetek fenntartásában, felszaporításában, begyűjtésében.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Mathuny Rudolf**nének a szövettenyésztés gyakorlati rejtelseinek való megismerésében.

Köszönettel tartozom **Dr. Alberti-Dér Ágnes** egyetemi docensnek, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézet igazgató helyettesének, a folyadékkromatográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségéért, útmutatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Böszörményi Andrea** egyetemi adjunktusnak (Semmelweis Egyetem, Farmakognóziai Intézet) a gázkromatográfiás kísérletekben nyújtott útmutatásáért.

Köszönet illeti **Héthelyi Évát**, az MKE műszaki szakértőjét, hogy bevezetett a gázkromatográfia alapjaiba.

Köszönettel tartozom **Mikóné dr. Hamvas Márta** egyetemi adjunktusnak (Debreceni Egyetem, Növénytan Tanszék) az enzim vizsgálatokban nyújtott kutatói példamutatásáért, gyakorlati útmutatásáért.

Hálás köszönettel tartozom **Könye Rita** doktorandusz kollegámnak a közös szakmai eszmefuttatásokért, a PCR analízisben nyújtott útmutatásáért, valamint a mintaelőkészítésben, ill. szövettenyésztésben nyújtott segítségéért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a **Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében**, valamint a **Debreceni Egyetem Növénytan Tanszékén**, illetve **Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékén** dolgozó valamennyi munkatársamnak, valamint hallgatónak, akik munkámat mindvégig önzetlen támogatásukkal segítették.

Végül, de nem utolsó sorban végtelen hálával tartozom **családomnak** és **barátaimnak**, hogy doktori értekezésem elkészítése alatt kitartó megértéssel, türelemmel, szeretettel és biztatással támogattak. Külön köszönettel tartozom **férjemnek**, a mintaelőkészítésben nyújtott segítségéért, folyamatos biztatásáért és támogatásáért.