

Huminsavak és tápelemek kombinált hatásainak transzkriptomikai vizsgálata kukoricában (*Zea mays* L.)

DECSI KINCŐ - MOSTAFA AHMED - VASZILY ZSOLT -

DONIA ABDUL-HAMID - TÓTH ZOLTÁN

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus,
Növénytermesztési-tudományok Intézet, Keszthely

Összefoglalás

A huminsavak, mezőgazdasági termelésben való felhasználása világszerte több évtizedes múltra tekint vissza és számos tudományos kutatás támasztja alá a vegyületek jótékony hatásait. Makro- és mikroelemekkel kombinált alkalmazásokról azonban kevesebb információ áll rendelkezésre. Tanulmányunk célja volt a huminsavak bórral és kénnel kombinált oldatának hatásvizsgálata a genetika modern eszközeivel. Next Generation Sequencing (NGS) technikával genom szintű transzkriptomikai elemzéseket végeztünk és megállapítottuk, hogy a huminsavak tápelemekkel kombinált alkalmazása számos növényi biokémiai folyamatot pozitívan befolyásol. Jótékony hatásai kiterjednek a fotoszintézis és a sejtlégzés egyes szakaszaira, valamint érintik a riboszomális gének egy részének működését is. A szakirodalomban korábban megjelent megállapítások közül azonban, a huminsavak egyedi vagy kombinált felhasználásából származtatható további pozitív hatásokat (pl. stresszoldó, antioxidáns hatások stb.) génszinten nem sikerült igazolnunk. Vizsgálatainkkal mélyebb betekintést nyújtunk és magyarázatot adunk a huminsavas oldatok alkalmazásakor tapasztalható néhány növényfiziológiai folyamatot érintő változás transzkriptomikai hátterére.

Kulcsszavak: huminsavak, bór, kén, transzkriptomika, NGS, növényi válaszreakciók

Transcriptomic analysis of the combined effects of humic acids and nutrients in maize (*Zea mays* L.)

K. DECSI – MOSTAFA AHMED – ZS. VASZILY –

DONIA ABDUL-HAMID – Z. TÓTH

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Georgikon Campus,
Institute of Crop Production Sciences, Keszthely

Summary

The use of humic acids in agricultural production worldwide dates back several decades and numerous scientific studies support the beneficial effects of the compounds. However, less information is available about their combined use with macro- and microelements. The aim of our study was to investigate the effects of humic acids combined with boron and sulfur using modern genetic tools. We performed genome-level transcriptomic analyses using the Next Generation Sequencing (NGS) technique and found that the combined use of humic acids with nutrients positively influences several plant biochemical processes. Its beneficial effects extend to certain stages of photosynthesis and cellular respiration, and also affect the function of some ribosomal genes. However, among the findings previously published in the literature, at the gene level we were unable to confirm additional positive effects (e.g. stress-relieving, antioxidant effects, etc.) that can be derived from the individual or combined use of humic acids. Our studies provide deeper insight and explain the transcriptomic background of changes in some plant physiological processes observed upon application of humic acid solutions.

Key words: humic acids, boron, sulphur, transcriptomics, NGS, plant responses

Bevezetés

A humuszanyagok, növényi és állati eredetű anyagokból képződnek fizikai, kémiai, enzimatis és mikrobiológiai átalakulások közben, az úgynevezett humifikációs (humuszképző) folyamat során. A könnyen lebomló szerves anyagok optimális körülmények mellett gyorsan mineralizálódnak és szervesetlen anyagokká

alakulnak. A nitrogéntartalmú anyagok a nehezen lebomló vegyületek jelentős részével egyesülnek, és kémiai polimerizációval nagy molekulatömegű, sötét szíű, viszonylag stabil új vegyületekké, úgynevezett humuszanyagokká alakulnak. A humin anyagokat pH-függő oldhatóságuk alapján három csoportba sorolhatjuk: huminsavak (HS), fulvosavak (FS) és huminok (HU) (*de Melo et al.* 2016).

Mind az elsődleges (pl. fotoszintézis), mind a másodlagos anyagcsere-folyamatokat (pl. stresszhatások elleni védekezésben szerepet játszó vegyületek termelődése) nagymértékben befolyásolják a humin- és fulvosav tartalmú oldatok (*Rose et al.* 2014, *Billingham* 2015, *Laskosky et al.* 2020, *Nardi et al.* 2021).

A fotoszintézis az egyik olyan asszimilációs folyamat, amely nagymértékben meghatározza a növényi termés mennyiségét. A huminsavval kezelt növények leveleinek klorofill-a és klorofill-b tartalma lényegesen magasabb, mint a kezeletlen növényeké. A viszonylag magasabb klorofilltartalom miatt a fotoszintézis fényszakasza jobban működik, ezáltal megnő a nettó fotoszintézis sebessége (*Chen et al.* 2004, *Delfine et al.* 2005, *Bybordí és Ebrahimian* 2013, *Fan et al.* 2014).

A humin- és fulvosavas kezelés azonban csak megfelelő mikroelem-ellátás mellett lehet eredményes. A klorofillmolekulák központi magja a magnézium, a fény megkötésében fontos szerepet játszó fotokémiai aktív centrumok vasat, ként, mangánt és kalciumot tartalmaznak. A fényelnyelést követően a növényben végbemenő átalakulási folyamatokban szerepet játszó egyes vegyületek (pl. citokrómok, plasztocianin, ferredoxin stb.) vasat, ként és rezet is tartalmaznak. A fényperiódus végén keletkező energia a növények ATP-molekuláihoz kötődik, mely vegyülethez jelentős mennyiségű foszfor szükséges (*Simkin et al.* 2020).

A CO₂ átalakulása szerves anyaggá az enzimatis szakaszban megy végbe (*Sherin et al.* 2022). Az ebben a szakaszban termelődő enzimek – mind a C₃, mind a C₄ növényekben – tartalmaznak magnéziumot. *Chen et al.* (2022) kukoricánövényeket neveltek cserépben, két HS ellátási szinten. Az eredmények azt mutatták, hogy a talajban javult a foszfor, kálium, vas és magnézium elérhetősége, valamint nőtt a RuBisCO és ATP-szintáz enzimek aktivitása.

A huminsavak növelik a növények tápanyagfelvételét is azáltal, hogy kelátot képeznek, és a mikrotápanyagokat a növényekhez szállítják (*Faralli et al.* 2019). Kelátképző tulajdonsága elősegíti a bevitt elemek hasznosulását,

a HS-tartalmú termékek adagolásával pedig az enzimek működése is előnyösen befolyásolható.

Souza et al. (2022) azt találták, hogy a huminsavak kulcsfontosságú szabályozó szerepet játszanak a növényi válaszokban, integrálva a hormonális jelátviteli és visszacsatolási utakat.

A kutatások kezdete óta ismert, hogy a huminsavas vegyületek növelhetik a növények ellenállását bizonyos stresszhatásokkal szemben – például ví zhiány, szélsőséges hőmérséklet vagy ozmotikus változások –, mezőgazdasági felhasználásuk is ezen a védőtulajdonságon alapul. Kísérleti vizsgálatok azt is bebizonyították, hogy a kezelések növelik a növények stressz-ellenállóságát, elsősorban az olyan antioxidáns enzimeknek köszönhetően, mint a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a peroxidázok (POD) és a kataláz (CAT). Ezek az enzimek semlegesítik az élő szervezetekben termelődő reaktív oxigénformákat (ROS), és antioxidáns funkciót töltenek be. *Meng et al. (2023)* élő perje növényeket kezeltek huminsavval. Azt találták, hogy a HS-kezelések növelték az aszkorbát-peroxidáz (APX), a kataláz (CAT), a peroxidáz (POD) és a szuperoxid-diszmutáz (SOD), valamint a brassinoszteroid (BR) szintjét a növényekben.

A megnövekedett antioxidáns enzimaktivitás megakadályozza a káros lipid-peroxidációs folyamatokat. Számos kutató végzett huminsavakkal vizsgálatokat, és pozitív génszintű változásokat mutatott ki az antioxidáns válaszokban (*Albiach et al. 2001, El-Bassiouny et al. 2014, Mukherjee et al. 2014, Khodair és Abd El-Rahman 2021, Aly et al. 2022*). A sikimisav-út olyan vegyületeket termel, amelyek felelősek a stressz- okozta sérülések gyógyulásáért és a sérült szövetek fertőtlenítéséért (pl. fenolok stb.). *Kandil et al. (2017)* a huminsavas kezelés következtében megnövekedett fenolvegyület-tartalmat mutatott ki búzában.

Napjainkban egyre inkább terjed a huminsavas készítmények makro- és mikroelemekkel történő kombinált alkalmazása, kelátképző tulajdonságuk és feltételezett szinergista hatásaik kihasználása érdekében. A mezőgazdasági felhasználású huminsavas növénykondicionáló oldatok mellett a kombinációk közül említésre érdemesek a nitrogénnel, bórral és kénnel, valamint akár többféle aminosavval stb. dúsított készítmények is. Ezek közül néhány élettani hatását már vizsgáltuk és eredményeinket *Decsi et al. (2024)* publikációjában tettük közzé.

A forgalomban lévő készítmények a HS mellett célzottan tartalmazzák az egyes makro- vagy mikroelemeket, hiszen mindegyik más életfolyamatot befolyásol, más biokémiai útvonalakra van hatással.

A bőr szerepe például közismerten sokrétű. Részt vesz a jelátviteli folyamatokban, mellyel hormonális hatásokat is indukál. Elősegíti a szénhidrátok szintézisét, de a növényi sejtfalak stabilitásának megőrzésében – ezáltal a stresszhatások elleni védekezésben – is jelentős szerepe van. Szabályozza más ionok felvételét és a transzspirációt. A termékenyülési folyamatok egyik kulcsa, mivel jótékonyan befolyásolja a pollenképződést, valamint a pollentömlő növekedését (Decsi 2023a).

El-Hoseiny et al. (2020) mangófákon vizsgálta a HS és a bór egyedi és kombinált hatásait. A HS és a bór hatékonyan javította a fák növekedését, virágzását, hozamát és a gyümölcs minőségét. Ebből a szempontból a HS hatékonyabb volt, mint a bór. A két anyag együttes használata a fa általános fiziológiai állapota és az éves termelékenysége szempontjából felülmúlta az egyedi alkalmazás hatását. A megfigyelt eredmények a fák fotoszintetikus pigmentjei, tápanyagok, szerves oldott anyagok és fitohormonok – például auxinok, gibberellinek és citokininek – növekedésének a következményei. Hasonlóan jó eredményekről számolt be *Mosa et al. (2015)* almában, illetve *Rehab et al. (2019)* cukorrépában.

Shalaby és El-Messairy (2018) erősen sóstresszes termőközegben vizsgálták a huminsavak bórral kombinált hatásait, dinnye növényeken. Eredményeik szerint a kezelt növényeknél 22%-os termésnövekedést mértek a kontroll állományokhoz képest. Emellett a dinnye a hossznövekedésében és a klorofilltartalmában is javulást mutatott, valamint növekedett a levelek tápanyagtartalma (N és K) és a gyümölcsök összes oldható szárazanyag-tartalma, miközben csökkent a levelekben felhalmozott nátrium és kloridionok mennyisége.

A kén szintén közismert stresszoldó hatású makroelem, mely egyben a kéntartalmú aminosavak alkotóeleme is. Diszulfid hidak kialakítására képes, melyek a fehérjék felépítésében játszanak szerepet. A szulfhidril csoportok pedig olyan fontos biokémiai folyamatokban vesznek részt, mint a zsírsav-anyagcsere vagy a citromsavciklus (Decsi 2023b).

A huminsavak hatására a kéntartalmú glutation szintje megemelkedik a szövetekben. A glutation egy esszenciális endogén antioxidáns vegyület,

amelyet a növények állítanak elő. Segíti a szervezet védekezését a szabad gyökök és más káros elektrofil vegyületek ellen azért, hogy hozzájuk kötődve eliminálja a peroxidok káros hatásait (*Shehata et al.* 2011). A glutation redukált formáját a reaktív oxigénformák (ROS) egyik legfontosabb semlegesítőjének és a sejtszintű detoxifikáció egyik leghatékonyabb természetes fegyverének tartják.

A HS alkalmazásával kapcsolatosan több kutatócsoport is megerősítette a vegyületcsalád pozitív hatását a glutation bioszintézisre (*Vaccaro et al.* 2015, *Shehata és Abdel-Wahab* 2018).

A szinergista hatás a HS és kén kombinált alkalmazásakor a stresszhatások enyhítésében is megmutatkozott. *Belal et al.* (2019) árpában végzett kísérletei azt mutatták, hogy a HS és kén, különböző arányú kijuttatása javította a szikes, meszes talajviszonyok káros hatásait, míg a talaj szervesanyag-tartalma és egyes felvehető tápanyagok (pl. P, Fe, Mn, Cu és Zn) mennyisége jelentősen megnőtt a kombinált kijuttatást követően.

A HS és kén kombinált alkalmazásának hozamfokozó hatásáról számol be búzában *Ali* (2014) és napraforgóban *Imran et al.* (2023).

Az irodalmi adatok tanulmányozása után szántóföldi kísérleteket állítottunk be. Különböző összetételű huminsavas oldatok felhasználásával alapozó (priming) kezeléseket végeztünk kukoricánövényeken. A kezelések hatására bekövetkező mRNS profilváltozásokat bioinformatikai transzkriptom analízissel elemeztük a Next-Generation Sequencing (NGS) technika segítségével. Célunk volt a kezelések által aktivált biokémiai anyagcsere-folyamatok pontosabb megismerése, a felülexpresszált gének azonosítása, és a HS+B+S kombináció növényekre gyakorolt szerteágazó hatásainak génszintű elemzése.

Anyag és módszer

Növényanyagok

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Keszthelyi Georgikon Campusán P9718E WAXY hibridkukorica növényeket termesztettünk szántóföldi körülmények között. A területen jellemzően Ramann-féle barna erdőtalaj található. A szántott réteg 25–30 cm hosszú volt, humusztartalma 1,5%; pH-ja 7,2. A 8 db 100 m²-es kisparcellát az üzemtábla leghomogénebb részében jelöltük ki, ahol a növényállomány is egyöntetű volt. A sortávolság 70 cm, a

tőtávolság 20 cm, míg a vetésmélység 5 cm volt. A 100 m²-es parcellák 10×10 m oldalhosszúságú, négyzet alakú területet jelentettek, parcellánként 15 sor növényvel. Két kezelést használtunk (HS+B+S oldatkombináció és kontroll), négy ismétlésben, randomizált blokk elrendezésben. A nyolc azonos méretű parcellából 4-et kontrollként (KO) hagytunk meg, 4-et pedig HS+B+S oldatkombinációval kezeltünk.

A bioinformatikai vizsgálatokhoz a jól fejlett, egészséges kukorica növényekből kezelésként 4-4 ismétlésben (összesen 4 kontroll és 4 kezelt növényről származó levélminta parcellánként) 30-50 mg-os levélmintát gyűjtöttünk – steril csipesz segítségével a felső harmadba eső levélemeletek egyikéről, mivel a fiatalabb levelek egységnyi levélterületre vonatkoztatva nagyobb mennyiségű RNS-tartalommal rendelkeznek. A növényekről gyűjtött levélmintákat 2 ml-es eppendorf mintatároló csövekbe helyeztük és 1 ml RNALater (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) oldatban tartósítottuk -20 °C-on a gyűjtéstől a szekvenálásig. A tartósító folyadék lehetővé teszi a pillanatnyi állapot rögzítését és az RNS bomlásának gátlását.

A kezeléseket 2022. június és július 10-én végeztük el, 5 l/ha kombinált oldattal. A növénykondicionáló szerek kijuttatását Straus Austria akkumulátoros háti permetezővel végeztük. A permetező hagyományos porlasztású, kis nyomáson működő gép, a permetlé-tartály nagysága 16 liter.

A kombinált oldat összetétele a következő volt: az oldott HS-tartalom: 0,6 m%, kén-tartalom: 1,2 m/V%, bórtartalom: 0,5 m/V%. A károsításhoz szükséges oldatot laboratóriumi körülmények között állítottuk elő melyhez gilisztahumuszról és tőzegekből előállított, 0,6 m%-os huminsav oldatot vásároltunk (Huminsz Kft.) és az oldatban feloldottuk a kívánt koncentrációjára hígított kristályos kálium-szulfát és bórsav hatóanyagokat. Az alkalmazott tiszta kén (Wang et al. 2023) és bórkoncentrációt (Tahir et al. 2012) a növényfaj igényeihez igazodva, a szakirodalmi adatok alapján számítottuk ki.

A termesztési gyakorlatban a kukoricatermesztők a növény 6-12 leveles állapotáig, május-június hónapban a csődifferenciálódás elősegítése érdekében, míg címerhányás kezdetén, virágzáskor, július-augusztus hónapban a termékenyülés, terméskötődés, termésképzés segítése céljából alkalmaznak bórtartalmú készítményeket. Általánosan elfogadott a

kéntartalmú készítményekkel történő kombinált kijuttatás is, mivel ez utóbbi tápelemnek stresszoldó szerepet tulajdoníthatnak.

Transzkriptomikai elemzések

Két nappal a vegetatív fázisban lévő növényállományok második priming kezelése után (BBCH 51-55) mindkét kezelésből (HS+B+S, KO) 4-4 növényről származó, növényenként 30-50 mg levelet gyűjtöttünk. A mintákat 1-1 ml RNALater (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) oldatba helyeztük, és a további feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. Az mRNS-t RIN_≥7 teljes RNS-t tartalmazó levélszövetmintákból tisztítottuk paramágneses NEXTFLEX® Poly(A) Beads 2.0 gyöngyökkel, majd fragmentáció után a NEXTFLEX® Rapid Directional RNA-Seq 2.0 kit segítségével szál-specifikus NGS könyvtár-előkészítést végeztünk (Tsai et al. 2015). Az elkészült egyesített könyvtárakat Illumina NovaSeq 6000 genomszekvenáló platformon szekvenáltuk (van Dijk et al. 2014). A nyers leolvasások elérhetőek az NCBI nyilvános adatbázisában: *Net1* - kontroll, *Net2* - HA+B+S.

A szekvenálásból származó nyers leolvasásokat minőségellenőrzésnek vetettük alá, az alacsony minőségű régiókat eltávolítottuk, és a leolvasásokat FastQC (*Net3*) és Trimmomatic szoftverek segítségével szűrtük (*Net4*) (Bolger et al. 2014). A következő lépésben az előszűrt és minőségileg megfelelő rövid leolvasásokból egy ún. *de novo* transzkriptomot rekonstruáltunk referencia genom nélkül, a Trinity szoftver segítségével (*Net5*) (Grabherr et al. 2011). A Trinity szekvencia-összeszerelő szoftver képes rövid nukleotidszekvenciákat hosszabb kontigokká összeállítani.

A *de novo* transzkriptom összes kontigját az OmicsBox BioBam programcsomag által használt CloudBlast szekvenciaillesztő programmal azonosítottuk (OmicsBox 2019). A GO (gene Ontology) kifejezéseket ezután a Blast2GO szoftver segítségével társítottuk (*Net6*) (Götz et al. 2008) a blasztolt szekvenciákhoz. Ezután funkcionális annotációt végeztünk EggNOG-mapper segítségével, amely alkalmas új, eddig ismeretlen transzkriptomok funkcionális annotációjára (Huerta-Cepas et al. 2016).

A *de novo* transzkriptom expressziós szintjének becslése szükséges lépés a differenciális expressziós elemzés elvégzéséhez. Referencia szekvencia hiányában a szoftver letérképezi az átiratokat. A leképezés után a szoftver a

génkoordináták figyelembevételével számszerűsíti a leolvasásokat (Li és Dewey 2011). A szoftver egy számlálótábla (count table) kimeneti fájlban rögzíti az eredmények összegzését.

A páronkénti differenciális expressziós analízist a NOIseq szoftverrel végeztük (Net7) a kontroll és a kezelt minták kontigjai között annak meghatározására, hogy mely gének expresszálódnak statisztikailag igazolhatóan ($p < 0,01$) az egyes kezelések eredményeként (Tarazona et al. 2011, 2015).

A teszt segítségével a *de novo* blasztolt, térképezett, annotált transzkriptom adataival összevetve a kezelt állományok down- és upregulált szekvenciái közül kiválasztottuk azokat, amelyek alul- vagy felülreprezentáltak, azaz olyanok, amelyek az átlagosnál kisebb vagy nagyobb mennyiségben vannak jelen a kezelt, mint a kontroll állományokban. Molekuláris funkcióik alapján csoportosítottuk őket, és segítségével jobban megértettük kezeléseink biológiai funkciókra gyakorolt hatását (Al-Shahrour et al. 2004, Subramanian et al. 2005).

A kezelésekre hatással megváltozott biokémiai folyamatok és biológiai mechanizmusok azonosítására kombinált útvonal-analízist használtunk a következő két nyilvános adatbázis, a Plant Reactome (Fabregat et al. 2018) és a KEGG (Kanehisa és Goto 2000) segítségével.

Eredmények

Transzkriptomikai elemzések

A nyers leolvasásokból előszűrés és minőségi ellenőrzés után *in silico* összeállítottunk egy *de novo* szupertranszkriptumot (TSA), mely 1731 hosszabb szekvenciát (kontigot) eredményezett (elérhető az NCBI nyilvános adatbázisában – Net8).

A TSA valamennyi kontigját azonosítottuk és megállapítottuk, hogy a kontigok jelentős része kukoricából (*Zea mays* L.) származik. Sok azonosított szekvencia a translációs folyamatokban (pl. enzimmépzésben) résztvevő gén, és emellett megfigyelhető volt a kezelésekre hatására expresszálódott gének, fotoszintézis és sejtlégzés egyes részfolyamataiban való magas részvételi aránya is.

Az enzimek tekintetében az oxidoreduktázok esetében jelentős a transzkriptumok magas száma, ami szintén a redox reakciók aktiválódását igazolja.

A számlálótáblázat a TSA felhasználásával készült. A többszörösen igazított leolvasások száma 9 206 152 volt a kontroll növényminták, míg 10 442 557 a HS+B+S kombinált kezelést kapott minták esetében. A számlálótábla (count table) 1731 hosszabb kontigot eredményezett.

A számlálótábla segítségével páronkénti differenciális expressziós elemzéseket végeztünk a kontroll, valamint a HS+B+S kezelések között. A kontroll és a kezelések közötti összehasonlítás 808 eltérően kifejezett szekvenciát eredményezett igazolhatóan ($p < 0,01$) az 1731 vizsgált kontigból, amelyek közül 383 felfelé és 425 lefelé szabályozott szekvenciát kaptunk.

A géndúsítási analízisek eredményeként a kontroll vs. HS+B+S kezelésből 113 felül- és 117 alulreprezentált gént kaptunk. Az összehasonlítás során azonosítottuk az egyes géneket, meghatároztuk a GO kifejezéseiket, és elvégeztük funkcionális annotációjukat.

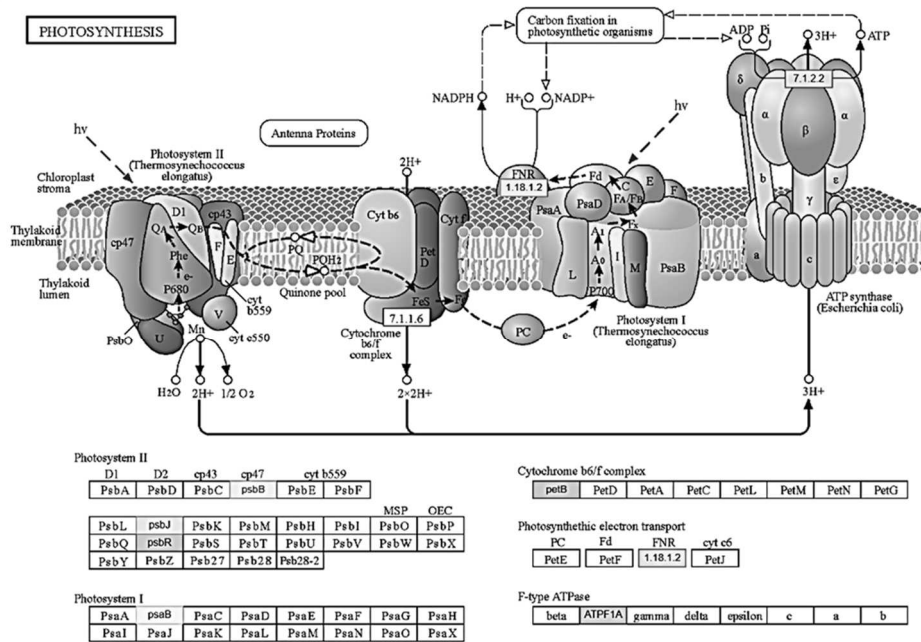
Az bórral és kénnel kombinált, huminsavat tartalmazó kezelések által aktivált gének közül a KEGG adatbázisban 34 és a Plant Reactome adatbázisban 29 kapcsolódott különböző biokémiai útvonalakhoz.

A kezelések hatására aktiválódó gének közül 13 a fotoszintézis bizonyos részfolyamataihoz kapcsolódik (1-2. ábra), további 15 a sejtlégzés oxidatív foszforilációs szakaszában aktiválódik (3. ábra), hat pedig a riboszomális folyamatokban fordul elő (4. ábra).

A kapott eredményeket tovább elemezve megvizsgáltuk a kezelések által modulált gének szerepét az egyes biokémiai útvonalakban. A kombinált útvonalelemzés során azonosított szekvenciáinkat a KEGG és a Plant Reactome adatbázisokban futtattuk.

A fotoszintézis fényfázisában a II. fotorendszerben három gén, az I. fotorendszerben egy gén indukálódott a HS+B+S kezelést követően. Ezenkívül egy-egy gén megnövekedett expressziója mutatkozik meg a citokróm b6/f komplexben, az elektrontranszport láncban és az ATPáz enzimaktivitás részfolyamataiban. Utóbbi három részfolyamat enzimaktivitására is pozitív hatással volt a kijuttatott növénykondicionáló kezelés (EC 7.1.1.6; EC 1.18.1.2; EC 7.1.2.2).

1. ábra. A HA+B+S kezelések által a fotoszintézisben aktivált gének



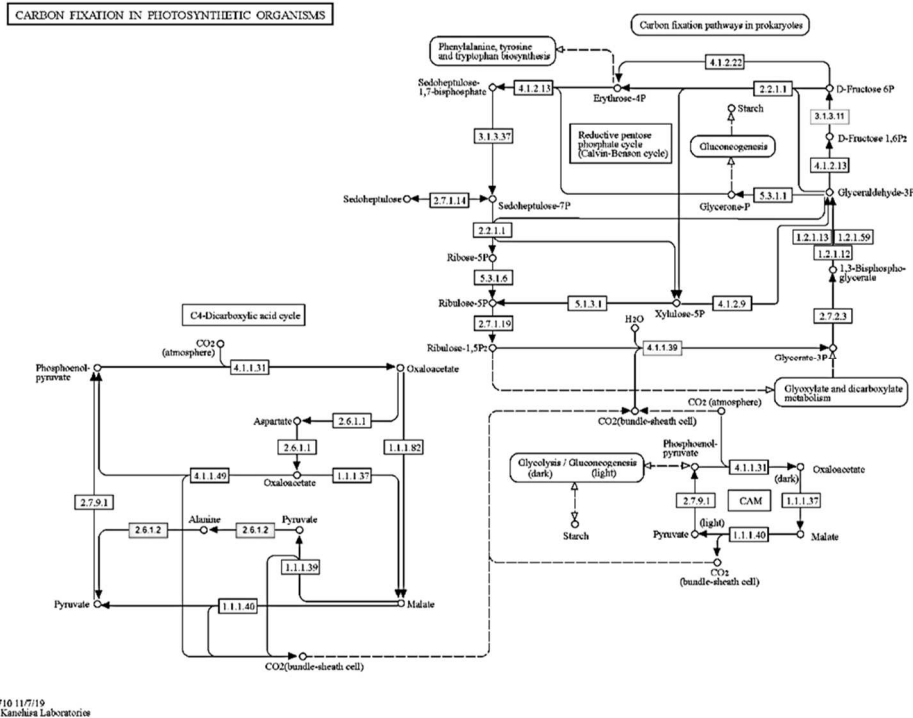
00195 7/2/20
(c) Kanehisa Laboratories

Megjegyzés: az ábra az OmicsBox szoftver <https://www.biobam.com/omicsbox/> Combined Pathway Analysis (Kombinált útvonalelemzés) almenüjével készült, és eredeti formájában kerül bemutatásra. A kép a kontroll és a kezelt növények között statisztikailag szignifikáns kapcsolatokat mutató azonosított gének közötti kapcsolatokat szemlélteti. A rövidítések az adott biokémiai útvonal működésében részt vevő összes gént és enzimet (EC-kód osztályozási név) jelölik, amelyek közül a szí nekkel jelöltek a kezelés hatására jelentős változáson mentek keresztül. Az utóbbiak részletes elemzése a szövegben található.

Figure 1. Genes activated by the HA+B+S treatments in photosynthesis. Note: The figure was generated using the Combined Pathway Analysis submenu of the OmicsBox software <https://www.biobam.com/omicsbox/>, and it is presented in its original form. The image visualizes the relationships among the identified genes that are statistical significant between the control and treated plants. The abbreviations represent all genes and enzymes (EC code classification name) involved in the functioning of the given biochemical pathway, of which those marked in color underwent a significant change due to the treatment. A detailed analysis of the latter can be found in the text.

A fotoszintézis sötét szakasza, melyben a széndioxid megkötése zajlik (2. ábra), további három enzim aktiválódásával járt (EC 2.6.1.2; EC 4.1.1.39; EC 3.1.3.11).

2. ábra. A szénmegkötés során a HA+B+S kezelések által aktivált gének



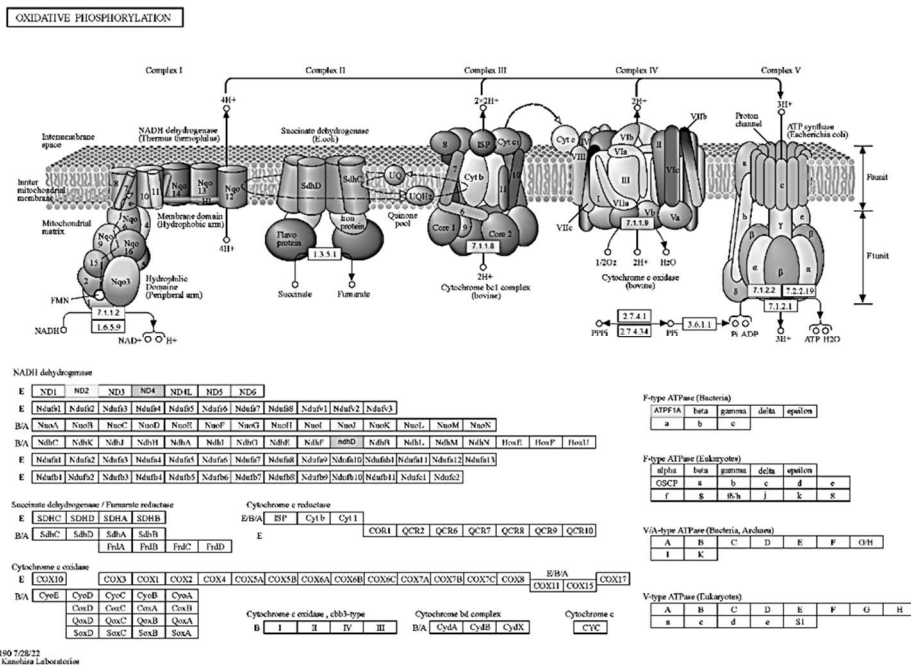
Megjegyzés: az ábra az OmicsBox szoftver <https://www.biobam.com/omicsbox/> Combined Pathway Analysis (Kombinált útvonalelemzés) almenüjével készült, és eredeti formájában kerül bemutatásra. A kép a kontroll és a kezelt növények között statisztikailag szignifikáns kapcsolatokat mutató azonosított gének közötti kapcsolatokat szemlélteti. A rövidítések az adott biokémiai útvonal működésében részt vevő összes gént és enzimet (EC-kód osztályozási név) jelölik, amelyek közül a színekkel jelöltek a kezelés hatására jelentős változáson mentek keresztül. Az utóbbiak részletes elemzése a szövegben található.

Figure 2. Genes activated by the HA+B+S treatments in carbon fixation. The figure was generated using the Combined Pathway Analysis submenu of the OmicsBox software <https://www.biobam.com/omicsbox/>, and is presented in its original form. The image visualizes the relationships between the identified genes that are statistically significant between the treatments. The abbreviations represent all genes and enzymes (EC code classification name) involved in the functioning of the given biochemical pathway, of which those marked in color underwent a significant change due to the treatment. A detailed analysis of the latter can be found in the text.

Ezenkívül a kezelések az egyes disszimilatív folyamatokban is indukáltak génextpressziót. A HS+B+S kezelések tizenegy enzimet és négy egyéb gént

(három a NADPH-dehidrogenáz, és egy az ATPáz működésében résztvevő gén) aktiváltak, amelyek részt vesznek az oxidatív foszforilációs lépésben (3. ábra), amely részfolyamatban a sejtlegzés az ATP-t termeli.

3. ábra. A HA+B+S kezelések által aktivált gének az oxidatív foszforilációban

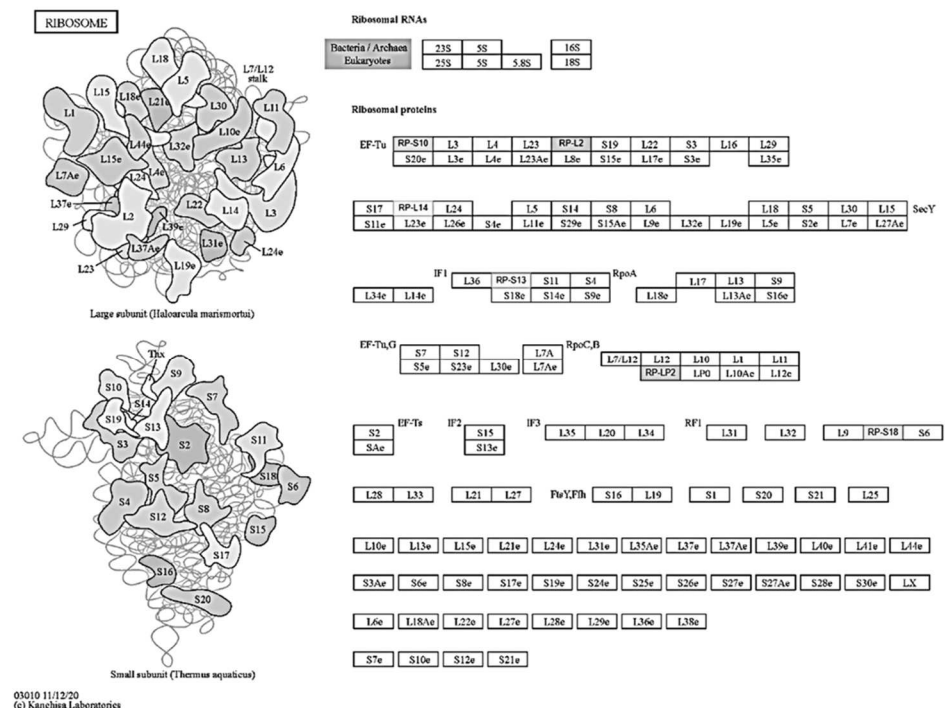


Megjegyzés: az ábra az OmicsBox szoftver <https://www.biobam.com/omicsbox/> Combined Pathway Analysis (Kombinált útvonalelemzés) almenüjével készült, és eredeti formájában kerül bemutatásra. A kép a kontroll és a kezelt növények között statisztikailag szignifikáns kapcsolatokat mutató azonosított gének közötti kapcsolatokat szemlélteti. A rövidítések az adott biokémiai útvonal működésében részt vevő összes gént és enzimet (EC-kód osztályozási név) jelölik, amelyek közül a színekkel jelöltek a kezelés hatására jelentős változáson mentek keresztül. Az utóbbiak részletes elemzése a szövegben található.

Figure 3. Genes activated by the HA+B+S treatments in oxidative phosphorylation. The figure was generated using the Combined Pathway Analysis submenu of the OmicsBox software <https://www.biobam.com/omicsbox/>, and is presented in its original form. The image visualizes the relationships between the identified genes that are statistically significant between the treatments. The abbreviations represent all genes and enzymes (EC code classification name) involved in the functioning of the given biochemical pathway, of which those marked in color underwent a significant change due to the treatment. A detailed analysis of the latter can be found in the text.

Ezekon kívül még 4 és 2 - a kezelések hatására - felülreprezentált, indukált gént találtunk a riboszómák nagy és kis alegységeiben (4. ábra).

4. ábra. A riboszómális működésben a HA+B+S kezelések által aktivált gének



Megjegyzés: az ábra az OmicsBox szoftver <https://www.biobam.com/omicsbox/> Combined Pathway Analysis (Kombinált útvonalelemzés) almenüjével készült, és eredeti formájában kerül bemutatásra. A kép a kontroll és a kezelt növények között statisztikailag szignifikáns kapcsolatokat mutató azonosított gének közötti kapcsolatokat szemlélteti. A rövidítések az adott biokémiai útvonal működésében részt vevő összes gént és enzimet (EC-kód osztályozási név) jelölik, amelyek közül a szíjekkel jelöltek a kezelés hatására jelentős változáson mentek keresztül. Az utóbbiak részletes elemzése a szövegben található.

Figure 4. Genes activated by the HA+B+S treatments in the ribosomal functions. The figure was generated using the Combined Pathway Analysis submenu of the OmicsBox software <https://www.biobam.com/omicsbox/>, and is presented in its original form. The image visualizes the relationships between the identified genes that are statistically significant between the treatments. The abbreviations represent all genes and enzymes (EC code classification name) involved in the functioning of the given biochemical pathway, of which those marked in color underwent a significant change due to the treatment. A detailed analysis of the latter can be found in the text.

A növénykondicionáló kezelések eredményeként az útvonalelemzések azt mutatták, hogy egyes biokémiai folyamatok aktivitása némileg csökkent, melyekben néhány gén felülreprezentált, de leszabályozott volt. Ilyenek voltak a kénanyagcsere, a piroszőlősav, porfirin, inozitol-foszfát, metán, glutation, tiamin, purin és linolénsav metabolizmus. A kezelések hatása nagyobb klaszterekbe szervezte a felszabályozott géneket, amelyek jelentősen befolyásolhatják az olyan specifikus biokémiai folyamatok működését, mint a fotoszintézis fény- és sötét szakasza (összesen 13 gén) és az oxidatív foszforiláció (15 gén). Összehasonlításképpen, a leszabályozott gének biokémiai ciklusonként legfeljebb 1-5 gén működését tudták elnyomni. Összefoglalva, az általunk vizsgált növénykondicionáló kezelések elsősorban a fotoszintézist és a sejtlegzési folyamatokat indukálták (13 és 15 gén), illetve pozitívan befolyásolták a riboszómális folyamatok aktiválódását (hat gén).

Értékelés

Bórral és kénnel dúsított huminsavas kombinált kezeléseket alkalmaztuk kukoricánövényeken és genomszintű transzkripciós elemzéseket végeztünk, hogy mélyebben megértsük a három komponens - növényi biokémiai folyamatokra gyakorolt - együttes hatását.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kezelések elősegítik a fotoszintézis egyes specifikus részfolyamatainak működését. A fotoszintézis fényfázisában a kezelt növények leveleiben a II. fotorendszer (PSII) aktivitása nőtt a kontrollhoz képest. A PSII a fotoszintézis vízhasító enzimkomplexe, és számos fehérje alegységből áll. A psbB és a psbJ alegységek mellett a psbR és a psbZ proteinek is indukálódtak. A psbB egy antennafehérje, amely a psbA és psbD alegységekkel együtt alkotja az elektrontranszport láncot, így a PSII egyikük hiányában sem működik (*Eaton-Rye és Vermaas 1991, Putnam-Evans és Bricker 1994, Wu et al. 1996*). A vizsgálatok azt sugallják, hogy a PsbJ szerepet játszik az elektronáramlás szabályozásában, és elősegíti a psbP alegység és a PSII összeépülését (*Hager et al. 2002, Suorsa et al. 2004*). Jelentőségét az is alátámasztja, hogy az inaktivált psbJ-mutáns dohánynövények nem tudtak fotoautotróf módon növekedni, és fényérzékenységben szenvedtek (*Swiatek et al. 2003*). A psbR szintén fontos láncszem a PSII központi magjában, az

oxigénfejlesztő psbP fehérje felépítésében és működésében. Kimutatták azonban, hogy a psbR stabil összeállításhoz a PSII magkomplexben kloroplasztisz által kódolt belső, kis molekulatömegű PsbJ alegységre van szükség (*Suorsa et al.* 2006). A PsbZ pedig szerepet játszik az elektrontranszfer szabályozásában, illetve a fényvédelemben (*Bishop et al.* 2007).

Megállapítható volt továbbá, hogy a kezelések aktiválták a PsaB fehérje-alegységet kódoló gént. A PsaA és a PsaB homológ integrált membránfehérjék, amelyek az I. fotorendszer (PSI) heterodimer magját alkotják (*Xu és Chitnis* 1995), és biztosítják a PSI összehangolt működését (*Vanselow et al.* 2009).

A citokróm b6f komplex is aktiválódott a kontrollhoz képest, mivel a petB gén felülreprezentálttá vált. A citokróm b6f enzimkomplex felépítésében részt vevő szerkezeti alegység elősegíti a plasztokinon/plasztocianin átalakulást a kloroplasztiszok tilakoid membránjában. A fotoszintézis során a citokróm b6f komplex közvetíti az elektronok és az energia átvitelét a PSII és a PSI között, miközben protonokat visz át a kloroplasztisz sztrómából a tilakoid membránon keresztül a lumenbe (*Hasan et al.* 2013). A citokróm b6f-en keresztüli elektrontranszport felelős a kloroplasztiszokban az ATP-szintézist irányító protongradiens létrehozásáért (*Munekage et al.* 2004).

A fotoszintézisben résztvevő fotorendszerek fehérje alegységein kívül néhány enzim, köztük az ATPáz enzim ATPF1A génje is aktiválódott. *Liu et al.* (2024) ennek a génnek a felszabályozását erősítette meg egy genomszintű elemzés során környezeti stressz alatt álló dahuriai vörösfenyőfajokban. Ezenkívül kezeléseinket követően további enzimek aktiválódását figyeltük meg. Ilyen volt többek között a plasztokinon/plasztocianin oxidoreduktáz (EC 7.1.1.6), amely a citokróm b6f komplexben található, és döntő szerepet játszik a fotoszintézisben, mivel az elektronokat a PSII-ről a PSI-re szállítja (*Tikhonov* 2024). A növényi típusú ferredoxinokra ható ferredoxin-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-reduktáz (EC 1.18.1.2) (*Iyanagi* 2022) szintén aktiválódott a PSI-ben a kezelések nyomán. *Shen et al.* (2020) által megállapították, hogy a huminsavas növénykondicionáló alkalmazása jelentősen növelte a nettó fotoszintetikus sebességet, a sztóma vezetőképességét, a PSI és PSII effektív kvantumhozamát, a PSI és PSII relatív fotoszintetikus elektronátviteli sebességét és a fotokémiai kioltást.

A H⁺-transzportáló ATPáz (EC 7.1.2.2) enzimet – amely részt vesz az ionok szállításában, és létrehozza a H⁺ mozgóerőt a plazmamembránon keresztül,

amely az ion és metabolit transzport nagy részének aktiválásához szükséges (Morsomme 2000) - szintén indukálta az általunk tesztelt kombinált kezelés. Hasonló eredményeket mutattak ki *Canellas et al.* (2013).

A széndioxid fixálási fázisban további gének expresszálódnak, ami a Calvin-ciklus kulcsenzimeinek aktiválásához vezetett, mint például a fruktózbiszfoszfátáz (EC 3.1.3.11) és a ribulóz-bifoszfát-karboxiláz/ oxigenáz (EC 4.1.1.39). Ezenkívül a C₄-dikarbonsav útvonal enzimeit közül az alanin-transzamináz (EC 2.6.1.2) aktivitását is modulálta a HS+B+S kezelés.

Canellas et al. (2013) és *Orsi* (2014) vizsgálataik során hasonló eredményekről tudósítottak.

A huminsavas kezeléseket követően a transzkriptomikai vizsgálatok kimutatták, hogy a C₄-es kukoricában a fotoszintézishez kapcsolódó gének, különösen a klorofill-szintézis és a fényenergia-befogás, felfelé szabályozottak. Ezzel szemben az előzetesen megjelent tanulmányok nem találtak összefüggést a huminsavak alkalmazása és a sötét szakasz enzimeinek esetleges aktiválódása között a C₄-es növényekben. Ez utóbbi funkciót, a RuBisCO enzim aktivitásának szignifikáns növekedését csak C₃-as növényekben mutatta ki *Zhi et al.* (2024), de jelen tanulmányunkban a sötét szakaszban szerepet játszó egyik enzim aktivitásának növekedését is megerősítjük C₄-es növényekben, ami új eredménynek számít. Mindezek a génexpressziós változások együttesen több ponton aktiválhatják a fotoszintézis részfolyamatait, ami végső soron növelheti a terméshozamot (*Delfine et al.* 2005, *Bybordi et al.* 2013).

Ezenkívül számos gén aktiválódott a sejtlégzés oxidatív foszforilációs fázisában a kombinált kezeléseknél köszönhetően. A részfolyamat tizenegy enzimét modulálták a kijuttatott összetevők, köztük a NADH:ubikinon-reduktáz (EC 7.1.1.2), amelynek H-transzlokációs szerepe van; a szerves difoszfátáz (EC 3.6.1.1) és a H-transzportáló ATPáz (EC 7.1.2.2). Továbbá aktiválódott az oxidatív foszforilációs folyamat során a NADH-ubikinon-reduktáz (EC 1.6.5.9), a kinon-citokróm-c reduktáz (EC 7.1.1.8), és a citokróm-c-oxidáz (EC 7.1.1.9). Az EC 7.1.1.8 létfontosságú szerepet játszik a kinon oxidációjában és az elektronok citokrómokra történő átvitelében, egyedülálló szerepet játszik az elektrontranszport láncon belüli heterolitikus folyamatok homolitikus irányba történő eltolódásának - vagyis a reakatív oxigénformák kialakulásának - elkerülésében (*Gao et al.* 2003).

A kezelések hatására szintén aktiválódott a szukcinát-dehidrogenáz (EC 1.3.5.1), mely enzim aerob körülmények között katalizálja a szukcinát oxidációját, amely a citromsav (TCA) ciklus kulcsfontosságú lépése, és az elektronokat a membrán kinonjaira viszi át, így összekapcsolja a TCA ciklust az aerob légzési láncsal. A szintén felülexpresszált ATP-polifoszfát-foszfotranszferáz (EC 2.7.4.1) enzim, felelős a celluláris polifoszfát többségének szintéziséért, az ATP terminális foszfátját használva fel szubsztrátként. Az indukálódott GDP-polifoszfát-foszfotranszferáz (EC 2.7.4.34) pedig szervesen polifoszfátot használ donorként a GDP GTP-vé alakításához. A HS+B+S hatására emelkedett a H⁺/K⁺-kicszerelő ATPáz (EC 7.2.2.19) enzim kódoló gén expressziós szintje is, ami egy P-típusú ATPáz, amely kovalens foszforiláción megy keresztül a szállítási ciklus során. A proton transzport ATPáz enzim (EC 7.1.2.1) szintje szintén szignifikáns emelkedést mutatott. Ez az enzim a protontöbbletből származó elektrokémiai potenciálgradientet hozza létre a plazmamembránon keresztül.

Az aktiválódott EC 1.6.5.9 katalizálja az elektronok átvitelét a NADH-ból a Q10 koenzimbe, és segíti a protonok áttelepítését a belső mitokondriális membránon (Brandt 2005). Az EC 7.1.1.9 az utolsó enzim az elektrontranszport láncban. A mitokondriális rendszerben található négy citokróm-c molekula mindegyike elektront adományoz az enzimnek, amely továbbítja azokat egy oxigén molekulára és négy protonra, végül két vízmolekulát képezve (Zhang et al. 1998). Gao et al. 2024-ben kimutatták, hogy a huminsavak elektronközvetítőként működnek, és fokozzák az elektronátvitelt az élő rendszerekben, fenntartva és elősegítve a sejten belüli energiaoptimalizálást.

A kezelést követően a biokémiai ciklus további négy génje is indukálódott, nevezetesen az ND2, ND4 és az ndhD, melyek a NADH-dehidrogenáz enzim fehérje alegységei, valamint az ATPáz ATPeF1A alegysége.

Az oxidatív foszforilációs lépés biztosítja a legtöbb energiát a homeosztázis fenntartásához és ennek aktiválásához. A folyamat a terméshozadékot is befolyásolja (Wilson 2017). Yang et al. (2023) azt találta, hogy a HS-kezelés pozitív befolyásolta az oxidatív foszforilációs folyamatokat kukoricában stresszes körülmények között.

Kezeléseink 2 és 4 riboszómális fehérjét indukáltak a nagy és kis alegységekben. Roomi et al. (2018) is pozitív változásokat mutatott ki a riboszómális fehérjék indukációjában huminsavas kezelés hatására. Az

enzimek aktiválása az oxidatív foszforilációs biokémiai útvonalon és a riboszómális fehérje alegységek génszintű felülexpresszációja az energia-anyagcsere és a fehérjeszintézis stimulációját jelezte.

Mindezek mellett megjegyzendő, hogy néhány anyagcsereút egyes génjeiben alulexpresszációkat tapasztaltunk a kezelések hatására. Az érintett útvonalak a kén anyagcsere, a piroszőlősav, porfirin, inozitol-foszfát, metán, glutation, tiamin, purin és linolénsav metabolizmus voltak. Ezek az eredmények ellentmondanak számos tanulmánynak, amelyek például többek között a HS-k stresszoldó hatásairól számoltak be. A bevezető részben bemutatott, más kutatócsoportok által előzetesen publikált eredmények közül a stresszoldó, az antioxidáns enzimaktivitást fokozó, hormonhatás közvetítő stb., illetve a hozzáadott makro- és mikroelem egyedi vagy a kombinációból adódóan elvárható együttes élettani hatásainak (pl. a kén stresszoldó vagy a bőr virágzás alatti jótékony hatása) egyikét sem tudtuk génszinten igazolni.

Következtetések

Jelen vizsgálatunkban kukoricánövények kondicionálását végeztük el HS+B+S kombinált kezelésekkel. Célunk az volt, hogy az előzetes irodalmi forrásokban, terepi vizsgálatok során feltárt ellentmondásos hatásokat bioinformatikai módszerekkel igazoljuk vagy cáfoljuk. Ezáltal mélyebb, génszintű információkat nyerhetünk a huminsavak makro- és mikroelemekkel kombinált hatásairól. Vizsgálatunk igazolja, hogy a huminsav tartalmú szerves növénykondicionáló vegyületek jótékony hatással vannak a kukorica egyes növényélettani paramétereire, amelyhez hozzájárulhatnak a hozzáadott makro- és mikroelemek, de ezek együttes, szinergista hatását génexpressziós szinten nem tudtuk bizonyítani. Genomszintű transzkriptomikai vizsgálataink mélyebb összefüggéseket tártak fel, amelyek szerint a huminsav bórral, valamint kénnel kiegészített kombinált kijuttatása jelentős jótékony hatással van a fotoszintetikus és sejtlégzési folyamatokra, valamint a riboszómák működésére. Emellett nem tudtuk megerősíteni az egyes korábbi irodalmi hivatkozások által leírt további jótékony hatásokat (stresszoldó képesség, antioxidáns hatások stb.), valamint az alkalmazott makro- és mikroelem egyedi élettani hatásaira sem találtunk génszintű bizonyítékot. Összegezve elmondható, hogy mindezen eredmények ismeretében a huminsavas termékek egyéb tápelemekkel történő kombinált

alkalmazása javasolható, hiszen génszinten igazolható szignifikáns pozitív élettani hatásai mellett kiválóan használhatók akár környezetbarát gazdálkodási formában is, ezzel támogatják a fenntartható és regeneratív mezőgazdasági termelést.

IRODALOM

- Albiach, R.–Canet, R.–Pomares, F.–Ingelmo, F.*: 2001. Organic Matter Components and Aggregate Stability after the Application of Different Amendments to a Horticultural Soil. *Bioresour. Technol.* 76: 125–129.
- Ali, I. N.*: 2014. Assessment of various humic acid and sulfur levels for higher yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sarhad Journal of Agriculture.* 47. 30: 1.
- Al-Shahrouf, F.–Díaz-Uriarte, R.–Dopazo, J.*: 2004. FatiGO: A Web Tool for Finding Significant Associations of Gene Ontology Terms with Groups of Genes. *Bioinformatics.* 20: 578–580.
- Aly, M. K. A.–Ahmed, E. T.–Mohamed, M. A. H.–Kasem, M. T. H.*: 2022. Response of Anise Plants to Humic Acid, Amino Acids and Thiamine Treatments. *Sci. J. Flowers Ornam. Plants.* 9: 153–165.
- Belal, E. E.–El Soufy, D. M.–Rady, M. M.*: 2019. Integrative Soil Application of Humic Acid and Sulfur Improves Saline Calcareous Soil Properties and Barley Plant Performance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 50. 15: 1919–1930.
- Billingham, K.*: 2015. Humic Products: Potential or Presumption for Agriculture. NSW Agriculture – Sydney, Australia. ISBN 978-1-74256-257-5.
- Bishop, C. L.–Ulas, S.–Baena-Gonzalez, E.–Aro, E. M.–Purton, S.–Nugent, J. H.–Mäenpää, P.*: 2007. The PsbZ subunit of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 modulates electron flow through the photosynthetic electron transfer chain. *Photosynthesis Research.* 93: 139–147.
- Bolger, A. M.–Lohse, M.–Usadel, B.*: 2014. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 30: 2114–2120.
- Brandt, U.*: 2006. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75: 69–92.
- Bybordi, A.–Ebrahimi, E.*: 2013. Growth, Yield and Quality Components of Canola Fertilized with Urea and Zeolite. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 44: 2896–2915.
- Canellas, L. P.–Balmori, D. M.–Médici, L. O.–Aguiar, N. O.–Campos, R. C. C.–Façanha, A. R.–Olivares, F. L.*: 2013. A Combination of Humic Substances and *Herbaspirillum seropedicae* Inoculation Enhances the Growth of Maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil.* 366: 119–132.

- Chen, Y.-Clapp, C. E.-Magen, H.: 2004. Mechanisms of Plant Growth Stimulation by Humic Substances: The Role of Organo-Iron Complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1089-1095.
- Chen, Q.-Qu, Z.-Ma, G.-Wang, W.-Dai, J.-Zhang, M.-Wei, Z.-Liu, Z.: 2022. Humic acid modulates growth, photosynthesis, hormone and osmolytes system of maize under drought conditions. *Agricultural Water Management.* 263: 107447.
- Decsi K.: 2023a. A bór növényélettani szerepe. *Mezőhí r – Országos Agrárinformációs Szaklap.* 27. 8: 50-51.
- Decsi K.: 2023b. A kén növényélettani szerepe. *Mezőhí r – Országos Agrárinformációs Szaklap.* 27. 7: 40-41.
- Decsi, K.-Ahmed, M.-Rizk, R.-Abdul-Hamid, D.-Tóth, Z.: 2024. Analysis of Plant Physiological Parameters and Gene Transcriptional Changes Under the Influence of Humic Acid and Humic Acid-Amino Acid Combinations in Maize. *International Journal of Molecular Sciences.* 25. 24: 13280.
- Delfine, S.-Tognetti, R.-Desiderio, E.-Alvino, A.: 2005. Effect of Foliar Application of N and Humic Acids on Growth and Yield of Durum Wheat. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 183-191.
- de Melo, B. A. G.-Motta, F. L.-Santana, M. H. A.: 2016. Humic Acids: Structural Properties and Multiple Functionalities for Novel Technological Developments. *Mater. Sci. Eng. C.* 62: 967-974.
- Eaton-Rye, J. J.-Vermaas, W. F.: 1991. Oligonucleotide-Directed Mutagenesis of psbB, the Gene Encoding CP47, Employing a Deletion Mutant Strain of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 17: 1165-1177.
- El-Bassiouny, H. S. M.-Bakry, B. A.-Attia, A. A. E. M.-Allah, M. M. A.: 2014. Physiological Role of Humic Acid and Nicotinamide on Improving Plant Growth, Yield, and Mineral Nutrient of Wheat (*Triticum durum*) Grown under Newly Reclaimed Sandy Soil. *Agric. Sci.* 5: 687-700.
- El-Hoseiny, H. M.-Helaly, M. N.-Isheery, N. I.-Alam-Eldein, S. M.: 2020. Humic acid and boron to minimize the incidence of alternate bearing and improve the productivity and fruit quality of mango trees. *Hort. Science.* 55. 7: 1026-1037.
- Fabregat, A.-Jupe, S.-Matthews, L.-Sidiropoulos, K.-Gillespie, M.-Garapati, P.-Haw, R.-Jassal, B.-Korninger, F.-May, B.: 2018. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 46: D649-D655.
- Fan, H.-Wang, X.-Sun, X.-Li, Y.-Sun, X.-Zheng, C.: 2014. Effects of Humic Acid Derived from Sediments on Growth, Photosynthesis and Chloroplast Ultrastructure in *Chrysanthemum*. *Sci. Hortic.* 177: 118-123.

- Faralli, M.-Matthews, J.-Lawson, T.: 2019. Exploiting Natural Variation and Genetic Manipulation of Stomatal Conductance for Crop Improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 49: 1-7.
- Gao, X.-Liu, K.-Zhang, C.-Cao, X.-Sakamaki, T.-Li, X.: 2024. Diversity in Mechanisms of Natural Humic Acid Enhanced Current Production in Soil Bioelectrochemical Systems. *Bioresour. Technol.* 406: 131057.
- Götz, S.-García-Gómez, J. M.-Terol, J.-Williams, T. D.-Nagaraj, S. H.-Nueda, M. J.-Robles, M.-Talón, M.-Dopazo, J.-Conesa, A.: 2008. High-Throughput Functional Annotation and Data Mining with the Blast:GO Suite. *Nucleic Acids Res.* 36: 3420-3435.
- Grabherr, M. G.-Haas, B. J.-Yassour, M.-Levin, J. Z.-Thompson, D. A.-Amit, I.-Adiconis, X.-Fan, L.-Raychowdhury, R.-Zeng, Q.: 2011. Full-Length Transcriptome Assembly from RNA-Seq Data without a Reference Genome. *Nat. Biotechnol.* 29: 644-652.
- Hager, M.-Hermann, M.-Biehler, K.-Krieger-Liszkay, A.-Bock, R.: 2002. Lack of the Small Plastid-Encoded PsbJ Polypeptide Results in a Defective Water-Splitting Apparatus of Photosystem II, Reduced Photosystem I Levels, and Hypersensitivity to Light. *J. Biol. Chem.* 277: 14031-14039.
- Hasan, S.-Yamashita, E.-Baniulis, D.-Cramer, W. A.: 2013. Quinone-Dependent Proton Transfer Pathways in the Photosynthetic Cytochrome b₆ Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 4297-4302.
- Huerta-Cepas, J.-Szkłarczyk, D.-Forsslund, K.-Cook, H.-Heller, D.-Walter, M. C.-Rattei, T.-Mende, D. R.-Sunagawa, S.-Kuhn, M.: 2016. EggNOG 4.5: A Hierarchical Orthology Framework with Improved Functional Annotations for Eukaryotic, Prokaryotic and Viral Sequences. *Nucleic Acids Res.* 44: D286-D293.
- Gao, X.-Wen, X.-Esser, L.-Quinn, B.-Yu, L.-Yu, C. A.-Xia, D.: 2003. Structural Basis for the Quinone Reduction in the bc₁ Complex: A Comparative Analysis of Crystal Structures of Mitochondrial Cytochrome bc₁ with Bound Substrate and Inhibitors at the Qi Site. *Biochemistry.* 42: 9067-9080.
- Imran, A.-Amanullah, A.-Al Tawaha, A. R.: 2023. Humic acid and sulfur integration enhance growth and yield-related traits of *Brassica napus* L. *Journal of Plant Nutrition.* 46. 10: 2303-2314.
- Iyanagi, T.: 2022. Roles of Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase and Flavodoxin in NAD(P)H-Dependent Electron Transfer Systems. *Antioxidants.* 11: 2143.
- Kandil, A. A.-Sharief, A. E. M.-Seadh, S. E.-Altai, D. S. K.: 2017. Physiological Role of Humic Acid, Amino Acids and Nitrogen Fertilizer on Growth of Wheat under Reclaimed Sandy Soil. *IJEAB.* 2. 2: 238724.
- Kanehisa, M.-Goto, S.: 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28: 27-30.

- Khodair, O. A.-Abd El-Rahman, M. M. A.*: 2021. Response of Manfalouty Pomegranate Trees to Foliar Application of Humic Acid and Amino Acids. *SVU-Int. J. Agric. Sci.* 3: 10–17.
- Li, B.-Dewey, C. N.*: 2011. RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinform.* 12: 1–16.
- Mosa, W. F. A. E.-El-Megeed, N. A. A.-Paszt, L. S.*: 2015. The effect of the foliar application of potassium, calcium, boron and humic acid on vegetative growth, fruit set, leaf mineral, yield and fruit quality of 'Anna'apple trees. *American Journal of Experimental Agriculture.* 8. 4: 224–234.
- Laskosky, J. D.-Mante, A. A.-Zvomuya, F.-Amarakoon, I.-Leskiw, L.*: 2020. A Bioassay of Long-Term Stockpiled Salvaged Soil Amended with Biochar, Peat, and Humalite. *Agrosyst. Geosci. Environ.* 3: e20068.
- Liu, M.-Wang, C.-Quan, X.*: 2024. Transcriptome Analysis on Responses of Leaf Photosynthesis and Nitrogen Metabolism of *Larix gmelinii* to Environmental Change. EBSCOhost. <https://openurl.ebsco.com/contentitem/doi:10.13287%2Fj.10019332.202203.008?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:doi:10.13287%2Fj.1001-9332.202203.008> (accessed on 21 October 2024).
- Meng, Q.-Yan, M.-Zhang, J.-Zhang, Q.-Zhang, X.-Yang, Z.-Luo, Y.-Wu, W.*: 2023. Humic acids enhance salt stress tolerance associated with pyrroline 5-carboxylate synthetase gene expression and hormonal alteration in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Front. Plant Sci.* 14: 1272987.
- Morsomme, P.-Boutry, M.*: 2000. The Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase: Structure, Function and Regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1465: 1–16.
- Munekage, Y.-Hashimoto, M.-Miyake, C.-Tomizawa, K. I.-Endo, T.-Tasaka, M.-Shikanai, T.*: 2004. Cyclic Electron Flow around Photosystem I Is Essential for Photosynthesis. *Nature.* 429: 579–582.
- Mukherjee, A.-Lal, R.-Zimmerman, A. R.*: 2014. Impacts of 1.5-Year Field Aging on Biochar, Humic Acid and Water Treatment Residual Amended Soil. *Soil Sci.* 179. 7: 333–339.
- Nardi, S.-Schiavon, M.-Francioso, O.*: 2021. Chemical Structure and Biological Activity of Humic Substances Define Their Role as Plant Growth Promoters. *Molecules.* 26: 2256.
- Net1*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR30037659>
- Net2*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR30037656>
- Net3*: https://timkahlke.github.io/LongRead_tutorials/QC_F.html (letöltve: 2024. augusztus 1-jén)
- Net4*: <http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic> (hozzáférés: 2024. augusztus 2.)
- Net5*: <http://TrinityRNASeq.sourceforge.net> (elérés dátuma: 2024. augusztus 2.)
- Net6*: <https://www.blast2go.com/> (hozzáférés: 2024. augusztus 3.)

- Net7*: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/NOISeq.html> (hozzáférés: 2024. augusztus 3.)
- Net8*: <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/tsa/SUB14644426/overview>.
- OmicsBox*: 2019. Bioinformatics Made Easy; BioBam Bioinformatics: Valencia, Spain. www.biobam.com › 03 › OmicsBox_Brochure_2019_A5BIOINFORMATICS MADE EASY - BioBam
- Orsi, M.*: 2024. Molecular Dynamics Simulation of Humic Substances. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1: 10.
- Putnam-Evans, C.-Bricker, T. M.*: 1994: Site-Directed Mutagenesis of the CP47 Protein of Photosystem II: Alteration of the Basic Residue 448R to 448G Prevents the Assembly of Functional Photosystem II Centers under Chloride-Limiting Conditions. *Biochemistry.* 33: 10770-10776.
- Rehab, I.-El Maghraby, S. S.-Kandil, E. E.-Ibrahim, N. Y.*: 2019. Productivity and quality of sugar beet in relation to humic acid and boron fertilization under nubaria conditions. *Alexandria Science Exchange Journal.* 40: 115-126.
- Roomi, S.-Masi, A.-Conselvan, G. B.-Trevisan, S.-Quaggiotti, S.-Pivato, M.-Arrigoni, G.-Yasmin, T.-Carletti, P.*: 2018. Protein Profiling of Arabidopsis Roots Treated With Humic Substances: Insights Into the Metabolic and Interactome Networks. *Front. Plant Sci.* 9: 1812.
- Rose, M. T.-Patti, A. F.-Little, K. R.-Brown, A. L.-Jackson, W. R.-Cavagnaro, T. R.*: 2014. Chapter Two - A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. [In: Sparks, D. L. (ed.) *Advances in Agronomy.*] Academic Press. Cambridge. MA. USA. 124: 37-89.
- Shalaby, O. A. E. S.-Messairy, M. M.*: 2018. Humic acid and boron treatment to mitigate salt stress on the melon plant. *Acta Agriculturae Slovenica.* 111. 2: 349-356.
- Shehata, S. A.-Gharib, A. A.-El-Mogy, M. M.-Gawad, K. F. A.-Shalaby, E. A.*: 2011. Influence of Compost, Amino Acids and Humic Acid on the Growth, Yield and Chemical Parameters of Strawberries. *J. Med. Plants Res.* 5: 2304-2308.
- Shehata, S. A.-Abdel-Wahab, A.*: 2018. Influence of Compost, Humic Acid and Amino Acids on Sweet Pepper Growth, Productivity and Storage-Ability. *Middle East J. Appl. Sci.* 8: 922-927.
- Shen, J.-Guo, M.-Wang, Y.-Yuan, X.-Dong, S.-Song, X.-Guo, P.*: 2020. An Investigation into the Beneficial Effects and Molecular Mechanisms of Humic Acid on Foxtail Millet under Drought Conditions. *PLoS ONE.* 15: e0234029.
- Sherin, G.-Aswathi, K. P. R.-Puthur, J. T.*: 2022. Photosynthetic Functions in Plants Subjected to Stresses Are Positively Influenced by Priming. *Plant Stress.* 4: 100079.
- Simkin, A. J.-Faralli, M.-Ramamoorthy, S.-Lawson, T.*: 2020. Photosynthesis in Non-Foliar Tissues: Implications for Yield. *Plant J.* 101: 1001-1015.

- Subramanian, A.-Tamayo, P.-Mootha, V. K.-Mukherjee, S.-Ebert, B. L.-Gillette, M. A.-Paulovich, A.-Pomeroy, S. L.-Golub, T. R.-Lander, E. S.:* 2005. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 15545-15550.
- Souza, A. C.-Olivares, F. L.-Peres, L. E. P.-Piccolo, A.-Canellas, L. P.:* 2022. Plant hormone crosstalk mediated by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 9: 29.
- Suorsa, M.-Regel, R. E.-Paakkariinen, V.-Battchikova, N.-Herrmann, R. G.-Aro, E. M.:* 2004. Protein Assembly of Photosystem II and Accumulation of Subcomplexes in the Absence of Low Molecular Mass Subunits PsbL and PsbJ. *Eur. J. Biochem.* 271: 96-107.
- Suorsa, M.-Sirpio, S.-Allahverdiyeva, Y.-Paakkariinen, V.-Mamedov, F.-Styring, S.-Aro, E. M.:* 2006. PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. *Journal of Biological Chemistry.* 281. 1: 145-150.
- Swiatek, M.-Regel, R. E.-Meurer, J.-Wanner, G.-Pakrasi, H. B.-Ohad, I.-Herrmann, R. G.:* 2003. Effects of Selective Inactivation of Individual Genes for Low-Molecular-Mass Subunits on the Assembly of Photosystem II, as Revealed by Chloroplast Transformation: The psbEFLJ Operon in *Nicotiana Tabacum*. *Mol. Gen. Genom.* 268: 699-710.
- Tahir, M.-Ali, A.-Khalid, F.-Naeem, M.-Fiaz, N.-Waseem, M.:* 2012. Effect of Foliar Applied Boron Application on Growth, Yield and Quality of Maize (*Zea mays* L.): Foliar Applied Boron for Maize Growth. *Biological Sciences - PJSIR.* 55. 3: 117-121.
- Tarazona, S.-Furió-Tarí, P.-Turrà, D.-Pietro, A. D.-Nueda, M. J.-Ferrer, A.-Conesa, A.:* 2015. Data Quality Aware Analysis of Differential Expression in RNA-Seq with NOISeq R/Bioc Package. *Nucleic Acids Res.* 43: e140.
- Tarazona, S.-García-Alcalde, F.-Dopazo, J.-Ferrer, A.-Conesa, A.:* 2011. Differential Expression in RNA-Seq: A Matter of Depth. *Genome Res.* 21: 2213-2223.
- Tikhonov, A. N.:* 2024. The Cytochrome b₆f Complex: Plastoquinol Oxidation and Regulation of Electron Transport in Chloroplasts. *Photosynth. Res.* 159: 203-227.
- Tsai, K. W.-Chang, B.-Pan, C. T.-Lin, W. C.-Chen, T. W.-Li, S. C.:* 2015. Evaluation and Application of the Strand-Specific Protocol for Next-Generation Sequencing. *BioMed Res. Int.* 2015: e182389.
- Vaccaro, S.-Ertani, A.-Nebbioso, A.-Muscolo, A.-Quaggiotti, S.-Piccolo, A.-Nardi, S.:* 2015. Humic Substances Stimulate Maize Nitrogen Assimilation and Amino Acid Metabolism at Physiological and Molecular Level. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2: 1-12.

- van Dijk, E. L.-Jaszczyszyn, Y.-Thermes, C.:* 2014. Library Preparation Methods for Next-Generation Sequencing: Tone down the Bias. *Exp. Cell Res.* 322: 12-20.
- Vanselow, C.-Weber, A. P. M.-Krause, K.-Fromme, P.:* 2009. Genetic Analysis of the Photosystem I Subunits from the Red Alga, *Galdieria sulphuraria*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787: 46-59.
- Wang, H.-Cui, S.-Fu, J.-Gong, H.-Liu, S.:* 2023. Sulfur application improves the nutritional quality of maize by regulating the amino acid balance of grains. *Agronomy.* 13. 12: 2912.
- Wilson, D. F.:* 2017. Oxidative Phosphorylation: Regulation and Role in Cellular and Tissue Metabolism. *J. Physiol.* 595: 7023-7038.
- Wu, J.-Putnam-Evans, C.-Bricker, T. M.:* 1996. Site-Directed Mutagenesis of the CP47 Protein of Photosystem II: 167W in the Lumenally Exposed Loop C Is Required for Photosystem II Assembly and Stability. *Plant Mol. Biol.* 32: 537-542.
- Xu, Q.-Chitnis, P. R.:* 1995. Organization of Photosystem I Polypeptides (Identification of PsaB Domains That May Interact with PsaD). *Plant Physiology.* 108. 3: 1067-1075.
- Yang, R.-Yang, Z.-Xing, M.-Jing, Y.-Zhang, Y.-Zhang, K.-Zhou, Y.-Zhao, H.-Qiao, W.-Sun, J.:* 2023. TaBZR1 Enhances Wheat Salt Tolerance via Promoting ABA Biosynthesis and ROS Scavenging. *J. Genet. Genom.* 50: 861-871.
- Zhang, Z.-Huang, L.-Shulmeister, V. M.-Chi, Y. I.-Kim, K. K.-Hung, L. W.-Crofts, A. R.-Berry, E. A.-Kim, S. H.:* 1998. Electron Transfer by Domain Movement in Cytochrome bc1. *Nature.* 392: 677-684.
- Zhi, Y.-Li, X.-Wang, X.-Jia, M.-Wang, Z.:* 2024. Photosynthesis Promotion Mechanisms of Artificial Humic Acid Depend on Plant Types: A Hydroponic Study on C3 and C4 Plants. *Sci. Total Environ.* 917: 170404

A szerzők levelezési címe - Address of the authors:

*Dr. Decsi Kincső - Mostafa Ahmed - Vaszily Zsolt -
Donia Abdul-Hamid - Dr. Tóth Zoltán
MATE Georgikon Campus
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Keszthely
Festetics u. 7.
H-8360
*szaszskone.decsi.eva.kincso@uni-mate.hu