

Damian Wach

*nstytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

SUBSTANCJE HUMUSOWE JAKO STYMULATORY WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN*

Słowa kluczowe: substancje humusowe, struktura korzeni, wysięk korzeniowy, efekty fizjologiczne

Wstęp

Zmiany związane z ociepleniem klimatu i niekorzystnym rozkładem opadów w ciągu sezonu wegetacyjnego, szczególnie występowanie długotrwałych susz ma znaczący wpływ na produkcje roślinną. Jednocześnie ograniczenia siedliskowe wynikające z naturalnie niskiej żyzności gleby czy też jej degradacji wskutek nierównoważonych praktyk rolniczych również ograniczają plony roślin uprawnych. Naukowcy i producenci mają więc duże wyzwanie, którego celem jest zwiększenie plonów i poprawa żyzności gleby poprzez hodowlę roślin o większej tolerancji na stresy środowiskowe oraz rozwój nowych systemów nawożenia w oparciu o optymalizację procesów biologicznych i mikrobiologicznych (6). Głównymi adaptacjami roślin do naturalnych gleb o niskiej zasobności w składniki mineralne są zmiany anatomiczne, szczególnie w systemie korzeniowym, takie jak zwiększona ilość korzeni bocznych i włóśników, powodująca wzrost ich całkowitej długości i powierzchni. Zmiany w morfologii korzeni można powiązać ze zwiększonym wydzielaniem wysięku do przestrzeni okołokorzeniowej, zakwaszeniem w pobliżu ryzosfery i asocjacją z określonymi drobnoustrojami (5). We wszystkich tych procesach istotną rolę odgrywają rozpuszczalne substancje humusowe.

Glebova materia organiczna jest jednym z najważniejszych składników gleby. Jej cechy charakterystyczne zależą od wielu czynników biotycznych i abiotycznych ekosystemu, takich jak: klimat, tekstura gleby, skład mineralny czy ilość resztek organicznych (35). Substancje humusowe są głównym składnikiem materii organicznej, które decydują zarówno o jej właściwościach, jak i funkcjach. Stanowią też ważne

* Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.2 w programie wieloletnim IUNG-PIB.

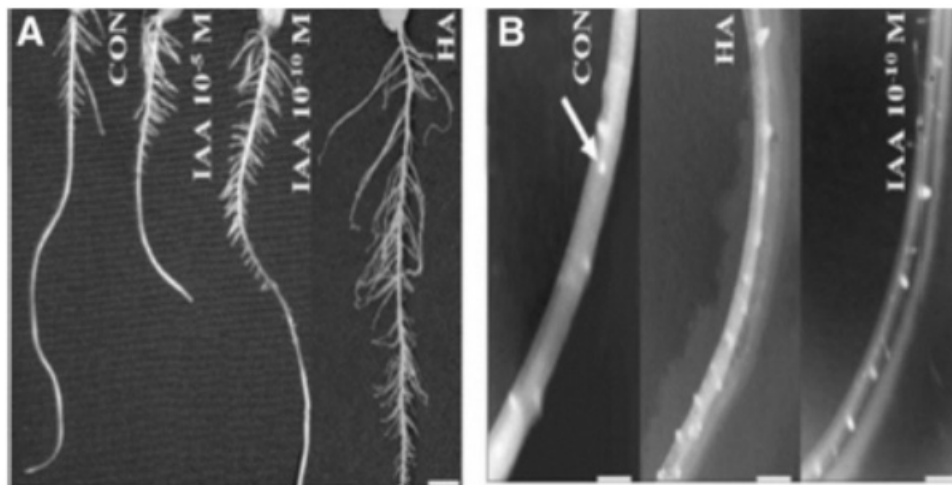
ogniwo w globalnym obiegu węgla (31). Substancje humusowe są supramolekularnymi strukturami heterogennych cząsteczek zawierających cukier, kwasy tłuszczowe, polipeptydy, łańcuchy alifatyczne i pierścienie aromatyczne, utrzymywane razem przez oddziaływania hydrofobowe (van der Waalsa, jonowe) i wiązania wodorowe (37).

Związki humusowe mają szerokie i wielostronne funkcje w roślinach (6, 9). Wiele badań wykazało, że rośliny uprawiane na glebach zawierających optymalną ilość substancji humusowych lub poddawane opryskom dolistnym preparatami zawierającymi te substancje były zdrowsze; lepiej rozwijały się w niekorzystnych warunkach środowiskowych i wydawały większe plony o wysokich parametrach jakościowych (7, 32, 35). Związki humusowe mają zdolność wiązania nierozpuszczalnych jonów metali, tlenków i wodorotlenków i powolnego ich uwalniania w miarę zapotrzebowania roślin. Zwiększają dzięki temu dostępność składników pokarmowych dla roślin (zmniejszają ich wypłukiwanie i zatrzymują w strefie korzeniowej), stymulują rozwój systemu korzeniowego oraz pożytecznych mikroorganizmów w glebie. Dodatkowo, substancje humusowe wiążąc się z minerałami ilastymi, kationami i polisacharydami z udziałem mikroorganizmów, nadają glebie gruzełkową strukturę, tworząc dobre stosunki wodne, powietrzne i lepszą przepuszczalność gleb. Tworząc natomiast kompleksy chelatowe z mikro- i makroelementami sprawiają, że składniki pokarmowe są łatwiej przyswajalne dla roślin. Niska zawartość kwasów humusowych, szczególnie w glebach piaszczystych, skutkuje słabym zatrzymywaniem w niej wody i składników mineralnych, które migrując w głąb profilu glebowego, stają się niedostępne dla korzeni roślin uprawnych (12, 14).

W prezentowanej pracy przedstawiono mechanizmy związane ze wzrostem korzenia, wchłanianiem wody i składników odżywczych, w których pośredniczą rozpuszczalne związki humusowe stosowane bezpośrednio na roślinę w niskim stężeniu. Scharakteryzowano ponadto wpływ związków humusowych na metabolizm pierwotny i wtórny roślin.

Substancje humusowe a struktura i morfologia korzeni

Głównym dowodem biologicznej aktywności substancji humusowych jest indukcja wzrostu korzeni bocznych, który zachodzi w strefie wydłużenia i różnicowania się korzeni. Strefy te obejmują małe, gęste komórki merystematyczne, które charakteryzują się ciągłą aktywnością metaboliczną, dzięki czemu są zdolne do tworzenia korzeni bocznych. Stwierdzono, że substancje humusowe mają znaczący wpływ na pojawianie się korzeni bocznych i obserwuje się hiperindukcję miejsc powstawania tychże korzeni po aplikacji związków humusowych (Rys. 1).



Rys. 1. Indukcja korzeni bocznych (A) i miejsc mitotycznych (B) przez kwasy humusowe (HA) lub auksyny (IAA)

Źródło: Canellas i Olivares, 2014 (6)

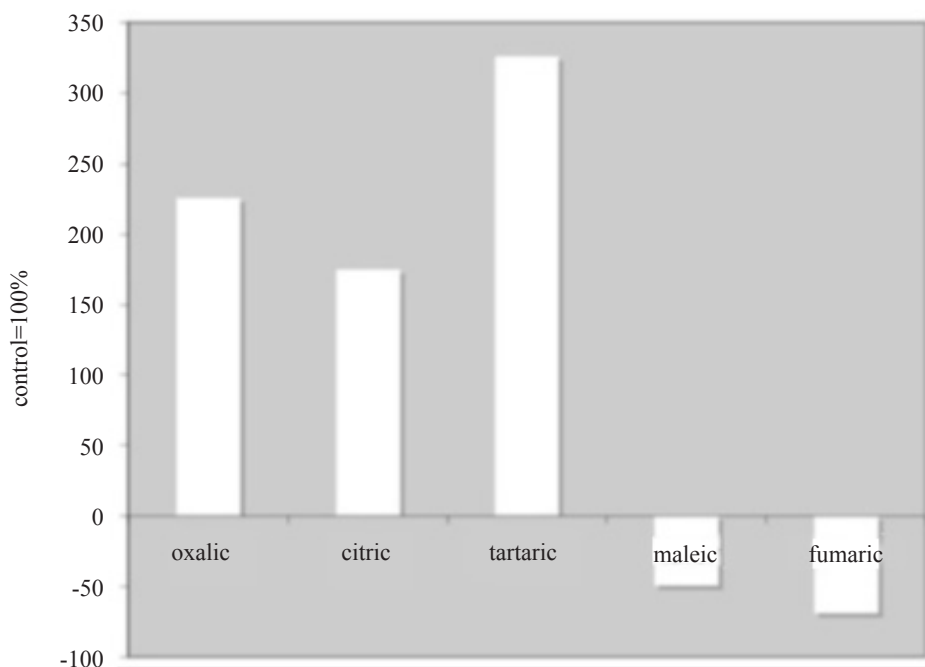
Endogennymi związkami w roślinach, które są odpowiedzialne za kształtowanie pokroju całej rośliny, są fitohormony – auksyny. Dobrze znaną naturalną auksyną jest kwas indolo-3-octowy (IAA), endogennie wytwarzany w wierzchołkowym merystemie pędu i szybko transportowany do korzeni przez łyko. Korzenie boczne powstają z dojrzałych, niedzielących się komórek perykulacyjnych w korzeniu macierzystym. Jednak to auksyny są zdolne wywołać w grupach komórek perykulacyjnych kaskadę reakcji, która w efekcie pozwala tym komórkom ponownie wejść w cykl komórkowy (zyskują zdolność podziałów). W wyniku tego ustalają się miejsca mitotyczne, w których tworzą się korzenie boczne (10). Teoria mechanizmu działania auksyn tzw. teoria wzrostu kwasowego (ang. *acid growth theory*) zakłada, że ostatecznym celem działania tego fitohormonu jest H^+ -ATPaza błony komórkowej, która przenosi jony H^+ do przedziału ściany komórkowej. Zwiększony przez auksyny transport jonów H^+ obniża pH ścian komórkowych, aktywuje enzymy i białka wrażliwe na pH w ścianie. W konsekwencji tego następuje poluzowanie i rozszerzenie struktur ściany komórkowej, a to z kolei umożliwia wzrost komórek korzeni bocznych (20). Jednak aby auksyny mogły wypełniać swoje biologiczne funkcje, niezbędne jest występowanie na błonach komórkowych odpowiednich receptorów oraz szlaków sygnałowych w komórkach (11). Nie musi to oznaczać, że morfologia korzenia znajduje się tylko i wyłącznie pod kontrolą endogennej auksyny. Canellas i in. (7) wykazali, że fragmenty błony komórkowej wyizolowane z korzeni kukurydzy, traktowane związkami humusowymi pochodzącym z wermikompostu charakteryzowały się wyraźnym wzrostem aktywności ATPazy, co świadczy o obecności swoistych małych bioaktywnych cząsteczek, takich jak auksyna w układzie supramolekularnym substancji humusowych, które mogą być związane zarówno z indukcją powstawania bocznego korzenia, jak i ze wzrostem aktywności H^+ -ATPazy.

Zandonadi i in. (43) wykazali, że zarówno związki humusowe, jak i niskie stężenia auksyny (10^{-10} i 10^{-15} M), sprzyjały aktywacji nie tylko H^+ -ATPazy ulokowanej w błonie komórkowej, ale także wakuolarnych H^+ -ATPaz i H^+ -pirofosfatazy (wspomaga transport jonów H^+). Stanowi to uzupełnienie powyżej opisanego mechanizmu wzrostu kwasowego, w którym zgodna aktywacja pomp H^+ w błonie komórkowej i tonoplaście odgrywa kluczową rolę w procesie ekspansji komórek korzeniowych, który jest sterowany przez egzogenne cząsteczki o aktywności podobnej do auksyn – związki humusowe. Co więcej, aktywacja błonowych H^+ -ATPaz poprawia także odżywanie roślin poprzez zwiększenie elektrochemicznego gradientu protonów, który jest niezbędny w transporcie jonów przez błony komórkowe za pośrednictwem wtórnych systemów transportowych (26). Wielu autorów obserwowało również wzrost zawartości makro i mikrośladników u różnych roślin uprawnych traktowanych substancjami humusowymi: pszenicy (2, 16), kukurydzy (34) tytoniu (33,40), w bakłażanach (15) czy ananasach (3). Wzrost zawartości składników mineralnych w częściach nadziemnych wynosił od 30% do nawet 90% w obiektach poddawanych działaniu substancji humusowych w stosunku do obiektów kontrolnych.

Substancje humusowe mogą również indukować tlenek azotu (NO) w miejscach powstawania korzeni bocznych, co stwierdzili Zandonadi i in. (45). Tlenek azotu to bioaktywna cząsteczka sygnalizacyjna, która bierze udział w wielu procesach fizjologicznych roślin, w tym między innymi w rozwoju korzeni (22). Lombrado i in. (23) wykazali, że NO uczestniczy w tworzeniu włośników u *Arabidopsis* zarówno w trakcie procesu inicjacji, jak i wydłużania. Natomiast Mora i in. (25) stwierdzili, że zastosowanie substancji humusowych na korzeniach ogórka pierwotnie spowodowało wzrost akumulacji NO, a następnie prowadziło do ekspresji następujących zmian morfologicznych korzeni: wzrost liczby korzeni wtórnych, które były mierzone w środkowej części systemu korzeniowego, wzrost grubości korzenia i wzrost świeżej masy korzeni.

Korzenie wydzielają ogromny „wachlarz” związków do otaczającej gleby. Ilość i jakość wydzielin korzeniowych zależy od gatunku i wieku poszczególnych roślin, ale również od czynników zewnętrznych, takich jak stresory biotyczne i abiotyczne. Wydzieliny korzeniowe odgrywają decydującą rolę w rozpuszczaniu i mobilizowaniu składników odżywczych w glebie, zwiększają w ten sposób pobieranie składników odżywczych przez rośliny, unieruchamiają pierwiastki toksyczne, przez co chronią przed ich negatywnym wpływem oraz poprawiają dostępność substratów dla mikroorganizmów w ryzosferze (4). Canellas i in. (8) zaobserwowali zmiany w profilu kwasów organicznych wydzielanych przez siewki kukurydzy poddane działaniu substancji humusowych (Rys. 2). Wydzielanie kwasów organicznych do roztworu glebowego zachodzi zarówno na drodze powolnej dyfuzji biernej jak również poprzez transport aktywny z wykorzystaniem błonowych kanałów białkowych. Działanie tych kanałów zależy od potencjału elektrochemicznego w poprzek błony, który jest utrzymywany przez aktywność H^+ -ATPaz błonowych (związki humusowe

mogą zwiększając ich aktywność). Autorzy ci wykazali istnienie specyficznego układu transportu kwasów organicznych w błonach plazmatycznych wierzchołka korzenia kukurydzy tzw. cytrynian-zależnego kanału anionowego (ang. *citrate-permeable anion channel*). Zwiększone wydzielanie kwasów organicznych (cytrynowego, szczawiowego i winowego) może zmienić konformacje substancji humusowych zasocjowanych na powierzchni korzeni, przez co umożliwia im wiązanie się z receptorami błonowymi (szczególnie małym fragmentom – podobnym do auksyn) i wywoływanie odpowiedzi komórkowej np. wzmaganie aktywności H^+ -ATPaz (8).



Rys. 2. Zróżnicowany profil kwasów organicznych w wysięku korzeniowym siewek kukurydzy poddanych działaniu kwasów humusowych

Źródło: Canellas i Olivares, 2014 (6)

Substancje humusowe a odżywianie mineralne

Obecność substancji humusowych w glebie stymuluje wzrost korzeni i pędów poprzez poprawę pobierania składników mineralnych. Aktywność tych substancji można najlepiej ocenić na podstawie wzrostu i plonu końcowego roślin uprawnych (44). Związki humusowe mogą regulować wzrost roślin i pobieranie składników mineralnych bezpośrednio i pośrednio (42). Pośredni wpływ substancji humusowych na pobieranie związków mineralnych zależy przede wszystkim od ich cech strukturalnych, grup funkcyjnych i ich tendencji do oddziaływania z jonami nieorganicznymi

i organicznymi oraz cząsteczkami obecnymi w podłożu glebowym. Wpływają one głównie na biodostępność składników pokarmowych na drodze tworzenia kompleksów z jonami metali, co zwiększa dostępność mikroelementów (cynku, manganu, miedzi i żelaza) i makroskładników (fosfor), zwłaszcza gdy gleba jest uboga w te składniki (18). Bezpośrednie działanie substancji humusowych jest związane z ich ukierunkowanym i nieukierunkowanym działaniem na błony komórkowe roślin, które mogą inicjować procesy biochemiczne i molekularne na poziomie potranskrypcyjnym w korzeniach i pędach (39). Vaughan i Malcom (40) zastosowali związki humusowe znakowane ^{14}C i stwierdzili, że niewielka frakcja tych substancji, szczególnie o mniejszej masie cząsteczkowej, wchodzi do szlaku apoplastycznego korzenia. Zatem mogą one wpływać na zwiększenie pobierania substancji odżywczych przez układy białkowe i ścieżki sygnałowe obecne w błonach komórek korzenia (29). Jednak pełna regulacja bezpośredniego wpływu związków humusowych działanie na pobieranie składników mineralnych nie jest jeszcze znana.

Substancje humusowe a metabolizm pierwotny

Metabolizm pierwotny odnosi się do podstawowych procesów biochemicznych niezbędnych do przetrwania, wzrostu i reprodukcji roślin. Zaangażowane w nim cząsteczki nazywane są metabolitami pierwotnymi i generalnie składają się z białek, węglowodanów i lipidów. Według doniesień literaturowych substancje humusowe mogą wpływać na skład ilościowy i jakościowy metabolitów pierwotnych.

Glikoliza jest podstawowym procesem metabolicznym o kluczowym znaczeniu dla roślin, ponieważ stanowi ona główną ścieżkę, która dostarcza substratów do procesu oddychania roślin. Nardi i in. (27) wykazali, że związki humusowe wpływają na aktywność enzymatyczną związaną z glikolizą i cyklem kwasów trójkarboksylowych na różne sposoby, zależnie od wielkości cząsteczek humusowych, ich charakterystyki molekularnej i stężenia. Spośród enzymów zaangażowanych w proces glikolizy Nardi i in. (27) badali glukokinazę, izomerazę fosfoglukozową, fosfofruktokinazę zależną od pirofosforanu i kinazę pirogronianową, natomiast z enzymów cyklu Krebsa – syntazę cytrynianową, dehydrogenazę jabłczanową oraz dehydrogenazę izocytrynianową. Wykazali istotny wzrost aktywności wszystkich powyższych enzymów po zastosowaniu różnych frakcji substancji humusowych wyizolowanych z gleby. Ertani i in. (17) stwierdzili natomiast pozytywny wpływ związków humusowych na główny metabolizm fotosyntetyczny liści kukurydzy, gdzie zmniejszeniu zawartości skrobi towarzyszył wzrost zawartości cukrów rozpuszczalnych. Wzrost zawartości sacharozy, która jest syntetyzowana z węglowodanów wytwarzanych w procesie fotosyntezy poprzez szlak pentozofosforanowy (Calvin-Benson) i jednocześnie stanowi wyjściowy związek w procesie oddychania, należy tłumaczyć zwiększeniem o 40% aktywności rubisco (karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu) w roślinach traktowanych związkami humusowymi pochodzącymi z leonardyty. U większości roślin skrobia i sacharoza są głównymi produktami końcowymi fotosyntezy. Ważnymi

enzymami w kontroli tworzenia sacharozy są syntazy fruktozo-1,6-bisfosforanu i fosfosacharozy, podczas gdy pirofosforylaza ADP-glukozy odgrywa kluczową rolę w szlaku biosyntezy skrobi. Merlo i in. (24) zaobserwowali, podobnie jak Ertani i in. (17), że zawartość skrobi w liściach kukurydzy zmniejszyła się w roślinach traktowanych substancjami humusowymi, podczas gdy poziom rozpuszczalnych cukrów równocześnie wzrastał. Spadkowi zawartości skrobi towarzyszyła zwiększona aktywność amylazy (enzym rozkładający skrobię), podczas gdy nie obserwowano wzrostu aktywności pirofosforylazy ADP-glukozy (enzym syntezujący skrobię). Oznacza to, że związki humusowe mogą zmieniać zarówno poziom, jak i rozkład procentowy cukrów z liści kukurydzy, wpływając na aktywność enzymów związanych z metabolizmem węglowodanów.

Metabolizm azotu jest podstawą tworzenia aminokwasów, białek, enzymów i nukleotydów. Wpływ substancji humusowych na gospodarkę azotową (pobieranie i przemiany N) jest stosunkowo dobrze poznany. Piccolo i in. (31) oraz Albuizio i in. (1) wykazali, że siewki jęczmienia charakteryzowały się znacznie większym pobraniem NO_3 po aplikacji preparatów zawierających substancje humusowe w porównaniu do kontroli. Nie wpływały one bezpośrednio na transportery błonowe odpowiedzialne za pobieranie jonów azotanowych, jednak wywoływały opisaną we wcześniejszym rozdziale zmianę aktywności H^+ -ATPaz. To z kolei powodowało obniżenie pH na powierzchni korzenia, ułatwiając w ten sposób transport jonów azotanowych na zasadzie symportu z jonami wodorowymi (H^+/NO_3^-). Inne badania wskazują, że związki humusowe, oprócz wpływu na pobieranie NO_3^- , oddziałują również na przemiany azotu w komórkach. Ertani i in. (17) w kukurydzy opryskiwanej substancjami humusowymi oceniali aktywność syntetazy glutaminowej i glutaminianowej – kluczowych enzymów zaangażowanych w asymilację N. Wykazali, w porównaniu do kontroli, 65% wzrost aktywności syntetazy glutaminowej w korzeniu oraz 176% i 204% syntetazy glutaminianowej odpowiednio w korzeniu i liściu kukurydzy. Wpływ związków humusowych na pobieranie NH_4^+ z gleby był badany przez Panuccio i in. (30) u dwóch różnych gatunków roślin iglastych. Mierzyli oni aktywność innych istotnych enzymów biorących udział w metabolizmie N, takich jak dehydrogenaza jabłczanowa i glutaminianowa oraz karboksylaza fosfoenolopirogronianowa. Zaobserwowali, że aktywność tych enzymów zwiększała się równocześnie z pobraniem jonów amonowych, natomiast nie zmieniała się z pobraniem azotanów.

Do oceny wpływu substancji humusowych na metabolizm roślin stosowane jest również podejście proteomiczne. Jannin i in. (21) wykorzystali analizę mikromacierzy do oceny genów zaangażowanych w odpowiedź fizjologiczną rzepaku na związki humusowe i zidentyfikowali zwiększoną ekspresję genów w dziewięciu klastrach, które obejmowały główne funkcje metaboliczne rośliny: przemiany węgla i fotosyntezę, ogólny metabolizm komórkowy, kwasy tłuszczowe, przemiany azotu i siarki, fitohormony, rozwój roślin, starzenie, reakcje na stres oraz transport jonów

i wody. Potwierdza to zatem, że związki humusowe mogą wpływać nie tylko na metabolizm węgla i azotu, ale również na wiele procesów komórkowych, zwiększając lub zmniejszając ich intensywność.

Substancje humusowe a metabolizm wtórny

Rośliny wytwarzają niezwykle zróżnicowany zestaw metabolitów wtórnych. Szacuje się, że do tej grupy związków zalicza się ponad 100 000 naturalnych produktów o niskiej masie cząsteczkowej. Różnią się one od metabolitów pierwotnych głównie tym, że są zasadniczo mało istotne dla podstawowych procesów metabolicznych. Według Dixon'a (13) większość metabolitów wtórnych pochodzi ze szlaków izoprenoidowych, fenylpropanoidowych, alkaloidowych lub tłuszczowych/poliketydowych i są produkowane w celu poprawy i zwiększenia możliwości obrony roślin przed stresami biotycznymi i abiotycznymi. Schiavon i in. (36) wykazali, że stosowanie substancji humusowych na kukurydzę wzmacnia ekspresję amoniakolizazy fenylalaniny (tyrozyny), która katalizuje pierwszy etap biosyntezy związków fenolowych, przekształcając fenylalaninę w kwas trans-cynamonowy i tyrozynę do kwasu p-kumarowego. Dodatkowo ekspresji amoniakolizazy towarzyszyła akumulacja fenolu w liściu. Takie stymulujące działanie związków humusowych na metabolizm wtórny roślin daje możliwości nowego podejścia do badania reakcji roślin na stres. Podobny wpływ związków humusowych na aktywność enzymów związaną z ochroną komórek został zaobserwowany przez Muscolo i in. (27) i był powiązany ze zmianami aktywności enzymów: peroksydazy (przemiany rodników tlenowych) i esterazy (przemiany tłuszczów). Garcia i in. (18) przedstawili natomiast możliwość wykorzystania substancji humusowych wyekstrahowanych z kompostu w celu ochrony roślin w uprawie ekologicznej przed stresem oksydacyjnym. Otwiera to możliwości stosowania ich jako stymulatora metabolitów wtórnych w celu poprawy właściwości leczniczych, aromatycznych i przyprawowych z jednoczesnym ograniczeniem stosowania syntetycznych środków ochrony roślin.

Podsumowanie

Substancje humusowe są główną częścią materii organicznej gleby, stanowiącą ostatni etap złożonej interakcji między nieożywioną materią organiczną, a działalnością mikroorganizmów. Związki humusowe wywierają kluczowy wpływ na fizyczne, chemiczne i biologiczne właściwości gleby oraz odgrywają istotną rolę w utrzymaniu wzrostu roślin. Ostatnio wiele danych eksperymentalnych pokazało, że substancje humusowe oraz ich różne frakcje mogą wpływać na wzrost i rozwój roślin, wywołując ich określone reakcje strukturalne i fizjologiczne. Mają ponadto ogromny wpływ na modyfikację struktury korzenia, szczególnie na indukcję korzeni bocznych i włośników, mogą też towarzyszyć w przemianach biochemicznych związanych z wytwarzaniem

energii oraz w systemie transportu przez błony plazmatyczne. Uważa się, że związki humusowe wpływają na pierwotny i wtórny metabolizm roślin, zarówno części nadziemnej jak i korzeni. W związku z tym systematyczne i skoordynowane badania łączące różne podejścia z pogranicza genomiki, transkryptomiki i metabolomiki mogą pomóc zrozumieć złożoność wpływu substancji humusowych na biologię roślin, co może umożliwić rozwój nowych technologii i badań w celu poprawy wzrostu i plonowania roślin w oparciu o substancje humusowe.

Literatura

1. Albuzio A., Ferrari G., Nardi S.: Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. 1986. *Can. J. Soil Sci.*, **66**: 731–736.
2. Asik B.B., Turan M.A., Celik H., V. Katkat A. V.: Effects of humic substances on plant growth and mineral nutrients uptake of wheat (*Triticum durum* cv. Salihi) under conditions of salinity. *Asian J. Crop. Sci.*, 2009, **1**: 87–95.
3. Baldotto L.E.B., Baldotto M.A., Giro V.B., Canellas L.P., Olivares F.L., Bressan-Smith B.: Performance of 'vitória' pineapple in response to humic acid application during acclimatization. *R. Bras. Ci. Solo.*, 2009, **33**: 979–990.
4. Baldri D.V., Vivanco J.M.: Regulation and function of root exudates. *Plant. Cell Environ.* 2009, **32**: 666–681.
5. Brown L.K., George T.S., Dupuy L.X., White P.J.: A conceptual model of root hair ideotypes for future agriculture environments: what combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? *Ann. Bot.*, 2013, **112**: 317–330.
6. Canellas L.P., Olivares F.L.: Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2014, **1**: 3.
7. Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Façanha A.L., Façanha A.R.: Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 2002, **130**: 1951–1957.
8. Canellas L.P., Teixeira Junior L.R.L., Dobbss L.B., Silva C.A., Medici L.O., Zandonadi D.B., Façanha A.R.: Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.*, 2008, **153**: 157–166.
9. Canellas L.P., Piccolo A., Dobbss L.B., Spaccini R., Olivares F.L., Zandonadi D.B.: Chemical composition and bioactivity properties of sizefractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 2010, **78**: 457–466.
10. Casimiro I, Marchant A, Bhalerao R.P., Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero P.J., Benett M.: Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*, 2001, **13**: 843–852.
11. Correa-Aragunde N., Lanteri M.L., García-Mata C., Have A., Laxalt A.M., Graziano M., Lamattina L.: Nitric Oxide Functions as Intermediate in Auxin, Abscisic Acid, and Lipid Signaling Pathways. W: Lamattina L, Polacco JC (ed) *Nitric Oxide in Plant Growth Plant Cell Monogr*, 6th edition) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006: 21.
12. Cwojdzinski W., Nowak K.: Wybrane właściwości gleby w prowadzonym od 28 lat statycznym doświadczeniu nawozowym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 2002, **484**: 87-94.
13. Dixon R.A.: Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 2001, **411**: 843–847
14. Dobrzański B., Zawadzki S.: *Gleboznawstwo*, PWRiL, Warszawa, 1999.
15. Ebrahim, A., Mohammad K.M., Maral M., Hamid R., Bozorgi M.: Effects of bio, mineral nitrogen fertilizer management, under humic acid foliar spraying on fruit yield and several traits of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Afr. J. Agric. Res.* 2012, **7**: 1104–1109.
16. El-Bassiouny H.S.M., Bakry A.B., Abd El-Monem Attia A., Abd Allah M.M.: 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. *Agricultural Sci.*, 2014, **5**: 687-700.

17. Ertani A., Francioso O., Tugnoli V., Righi V., Nardi S.: Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. *Metabolism J. Agri. Food Chem.*, 2011, **59**: 11940–11948.
18. García A.C., Santos L.A., Guridi F., Sperandi M.V.L., Castro R.N., Berbara R.L.L.: Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect plant against oxidative stress. *Ecol. Eng.*, 2012, **47**: 203–208.
19. García A.C., Santos L.A., de Souza L.G.A., Tavares O.C.H., Zonta E., Gomes E.T.M.: Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.*, 2016, **192**: 56–63.
20. Hager A.: Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 2003, **116**: 483–505.
21. Jannin L., Arkoun M., Ourry A., Lainé P., Goux D., Garnica M., Fuentes M., Francisco S.S., Baigorri R., Cruz F., Houdusse F., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Etienne P.: Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil*, 2012, **359**: 297–319.
22. Lamattina L., García-Mata C., Graziano M., Pagnussat G.C.: Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 2003, **54**: 109–136.
23. Lombardo M.C., Graziano M., Polacco J.C., Lamattina L.: Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling Behav.*, 2006, **1**: 28–33.
24. Merlo L., Ghisari R., Rascio N., Passera C.: Effects of humic substances on carbohydrate metabolism of maize leaves. *Can. J. Plant Sci.*, 1991, **71**: 419–425.
25. Mora V., Baigorri R., Bacaicoa V., Zamarreño A., García-Mina J.M.: The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environ. Exp. Bot.*, 2012, **76**: 24–32.
26. Morsomme P., Boutry M.: The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1465**: 1–16.
27. Muscolo A., Felici M., Concheri G., Nardi S.: Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Biol. Fertil. Soils*, 1993, **15**: 127–131.
28. Nardi S., Muscolo A., Vaccaro S., Baiano S., Spaccini R., Piccolo A.: Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, **39**: 3138–3146.
29. Nardi S., Pizzeghello D., Schiavon M., Ertani A.: Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.*, 2016, **73**: 18–23.
30. Panuccio M.R., Muscolo A., Nardi S.: Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of pinus. *J. Plant Nutr.*, 2001, **24**: 693–704.
31. Piccolo A., Nardi S., Concheri G.: Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biol. Biochem.* 1992, **24**: 373–380.
32. Piłkuła D.: Rola substancji humusowych oraz innowacyjne produkty zwiększające ich zawartość w glebie. *Studia i Raporty IUNG-PIB, Puławy*, 2016, **48(2)**: 81–93.
33. Priya B.N.V., Mahavishnan K., Gurumurthy D.S., Bindumadhava H., Ambika P., Sharma K.: Fulvic Acid (FA) for Enhanced Nutrient Uptake and Growth: Insights from Biochemical and Genomic Studies. *J. Crop Improv.*, 2014, **28(6)**: 740–757.
34. Quaggiotti S., Ruperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S.: Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 2004, **55**: 803–813.
35. Ramos A.C., Dobbss L.B., Santos L.A., Fernandes M. S., Olivares F.L., Aguiar N.O.: Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2015, **2**: 3.
36. Schiavon M., Pizzeghello D., Muscolo A., Vaccaro S., Francioso O., Nardi S.: High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.*, 2010, **36**: 662–669.
37. Stevenson F.J.: *Humus Chemistry*. Wiley, Chichester, 1994.

38. Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., Nardi S.: Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signal. Behav.*, 2010, **5**: 635–643.
39. Van Oosten M. J., Pepe O., De Pascale S., Silletti S., Maggio A.: The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2017, **4**: 5.
40. Vaughan D., Malcom R. E.: Influence of humic substances on growth and physiological processes, W: *Soil Organic Matter and Biological Activity*, eds.: D. Vaughan and R. E. Malcom (Dordrecht: Martinus Nijhoff), 1985: 37–76.
41. Yaofu W.: Effect of irrigation and rate of humic acid on concentration of nutrients and yield and quality of flue-cured tobacco. *J. Anhui. Agric. Sci.*, 2005, **33**: 96–97.
42. Zandonadi D.B., Canellas L.P., Façanha A.R.: Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 2007, **225**: 1583–1595.
43. Zandonadi D.B., Santos M.P., Busato J.G., Peres L.E.P., Façanha A.R.: Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, 2013, **25**: 13–25.
44. Zandonadi D.B., Santos M.P., Caixeta L.S., Marinho E.B., Peres L.E.P., Façanha A.R.: Plant proton pumps as markers of biostimulant action. 2016. *Sci. Agric.* **73**: 24–28.
45. Zandonadi D.B., Santos M.P., Dobbss L.B., Olivares F.L., Canellas L.P., Binzel M.L., Okorokova-Facanha A.L., Facanha A.R.: Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 2010, **231**: 1025–1036.

Adres do korespondencji:

dr Damian Wach
Zakład Żywienia Roślin i Nawożenia
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
tel. 81 47 86 836
e-mail: dwach@iung.pulawy.pl

