

## Humic substances benefiting the development of *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 (forage peanut) cultivated on degraded soil

## Substancias húmicas que benefician el desarrollo de *Arachis pintoi* vc. Amarillo MG 100 (maní forrajero) cultivado en suelo degradado

D.M. Oliveira, C.C. Thiengo, Lenita J. Bolzan, E.S. Mendonça and D.L. Burak

*Department of Agronomy, Center for Agricultural Sciences and Engineering, Federal University of Espírito Santo, Alegre, 29500-000, Brazil.*

*Email: cassiocthiengo@usp.br*

D. M. Oliveira: <https://orcid.org/0000-0002-8195-0053>

C. C. Thiengo: <https://orcid.org/0000-0002-3564-7440>

E. S. Mendonça: <https://orcid.org/0000-0003-3284-7129>

D. L. Burak: <https://orcid.org/0000-0002-6758-3517>

Humic substances are increasingly being used as biostimulants and may even benefit the development of forage peanut (*Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100), a promising species for the recovery of degraded pastures. The study aimed to evaluate different concentrations of humic substances extracted from vermicompost from cattle manure on growth and nutrient content in forage peanut plants inoculated with *Bradyrhizobium spp.* The experiment was carried out in a greenhouse, in a randomized block design, with five concentrations of humic substance and five replications. The shoot dry matter, root dry matter, the number of nodules, the content of macronutrients in the shoot, total chlorophyll content, chlorophyll a/b ratio, and quantum efficiency of the photosystem II were evaluated. The addition of humic substances increased the yield and nutrient accumulation of the forage peanut plants. The shoot dry matter responded in a quadratic manner to the addition of humic substances. The concentration of 40 mg L<sup>-1</sup> of C increased 45.85% of the number of nodules compared to the control. There were improvements in efficiency of the photosystem II and the accumulation of nitrogen, potassium, calcium and magnesium by up to 12 % (37.1 to 41.5 mg pot<sup>-1</sup>), 8.6 % (35.3 to 38.3 mg pot<sup>-1</sup>), 13.5 % (21.8 to 24.7 mg pot<sup>-1</sup>) and 7.5 % (9.8 to 10.53 mg pot<sup>-1</sup>), respectively, in the shoot with the humic substances application, except for the phosphorus accumulation.

**Keywords:** *biostimulants, nodulation, soil of low fertility, photosystem II, Bradyrhizobium*

Predominantly in the agricultural production system, areas with pasture are occupied with plants from the *Poaceae* family, which require high doses of nitrogen fertilizers to enhance their yield. However, the high cost compromises the supply of this input, leading to low availability of nitrogen (N) for cultivation, which leads to degradation of pastures (Canto *et al.* 2016 and Vasques *et al.* 2019). The yield recovery in these areas requires sustainable alternatives (Dias-Filho 2017). In this sense, the introduction of forage legumes associated with biostimulants can be adopted, envisioning productive systems with less impact on the environment.

Fodder legumes, such as forage peanuts (*A. pintoi* cv. Amarillo MG 100), are efficient in biological

Las sustancias húmicas se utilizan cada vez más como bioestimulantes y pueden también beneficiar el desarrollo del maní forrajero (*Arachis pintoi* vc. Amarillo MG 100), una especie prometedora para la recuperación de pastos degradados. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sustancias húmicas extraídas del vermicompost de estiércol de ganado en el crecimiento y contenido de nutrientes en plantas de maní forrajero inoculadas con *Bradyrhizobium spp.* El experimento se realizó en un invernadero, con un diseño de bloques al azar, cinco concentraciones de sustancia húmica y cinco réplicas. Se evaluó la materia seca del brote, la materia seca de la raíz, el número de nódulos, el contenido de macronutrientes en el brote, el contenido de clorofila total, la relación clorofila a/b y la eficiencia cuántica del fotosistema II. La adición de sustancias húmicas aumentó el rendimiento y la acumulación de nutrientes de las plantas de maní forrajero. La materia seca de los brotes respondió de forma cuadrática a la adición de sustancias húmicas. La concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> de C aumentó en 45.85 % el número de nódulos en comparación con el control. Hubo mejoras en la eficiencia del fotosistema II y la acumulación de nitrógeno, potasio, calcio y magnesio hasta en 12 % (37.1 a 41.5 mg maceta<sup>-1</sup>), 8.6 % (35.3 a 38.3 mg maceta<sup>-1</sup>), 13.5 % (21.8 a 24.7 mg maceta<sup>-1</sup>) y 7.5 % (9.8 a 10.53 mg maceta<sup>-1</sup>), respectivamente, en el brote con la aplicación de sustancias húmicas, excepto en la acumulación de fósforo.

**Palabras clave:** *bioestimulantes, nodulación, suelo de baja fertilidad, fotosistema II, Bradyrhizobium*

En el sistema de producción agrícola, las áreas con pasto están ocupadas predominantemente por plantas de la familia *Poaceae*, que requieren altas dosis de fertilizantes nitrogenados para mejorar su rendimiento. Sin embargo, el alto costo compromete el suministro de este insumo, lo que lleva a baja disponibilidad de nitrógeno (N) para el cultivo, que produce la degradación de los pastos (Canto *et al.* 2016 y Vasques *et al.* 2019). La recuperación del rendimiento en estas áreas requiere alternativas sostenibles (Dias-Filho 2017). En este sentido, se pueden introducir leguminosas forrajeras asociadas a bioestimulantes para visualizar sistemas productivos con menor impacto en el ambiente.

Las leguminosas forrajeras, como el maní forrajero (*A. pintoi* vc. Amarillo MG 100), son eficientes en la

nitrogen fixation (BNF), have better nutritional quality, and can reduce production costs due to the acquisition and availability of N (Olivo *et al.* 2019). Also, this stoloniferous legume has a good adaptation to acid soils, resistance, and tolerance to pests and diseases (Simeão *et al.* 2017). Inoculation with diazotrophic bacteria of the *Bradyrhizobium* (BD) genus ensures more efficient nodulation and fixation, contributing to the yield and stability of pastures (Terra *et al.* 2019).

Complementary to BD effects in association with forage peanut, humic substances (HS) appear to be promising in stimulating plant growth. This benefit may be due to hormonal signaling that results in more structured root systems and thus greater nutrient uptake and final yield (dos Santos *et al.* 2021). In addition, they also act in osmotic regulation and promote better photosynthesis rates (Du Jardin 2015).

This study is based on the premise that the application of HS benefits the development of forage peanut when grown in soil at a stage of degradation. Considering the above, the authors aimed to evaluate the yield, nutritional and physiological parameters in these plants when subjected to applications of different concentrations of HS.

### Material and Methods

The soil used was representative of a degraded pasture situation in the region of Jerônimo Monteiro-ES, collected in the 0-20 cm layer and classified as Ultisol (dystrophic Red-Yellow Argisol, Brazilian Classification System) (Santos *et al.* 2013). Subsequently, the soil was air-dried and sieved through a 2.0 mm mesh sieve to obtain the air-dried fine soil (ADFS) as well as the physical and chemical characterization (Teixeira *et al.* 2017) (table 1).

fijación biológica de nitrógeno (FBN), tienen mejor calidad nutricional y pueden reducir los costos de producción debido a la adquisición y disponibilidad de N (Olivo *et al.* 2019). Además, esta leguminosa estolonífera tiene buena adaptación a suelos ácidos, resistencia y tolerancia a plagas y enfermedades (Simeão *et al.* 2017). La inoculación con bacterias diazotróficas del género *Bradyrhizobium* (BD) asegura una nodulación y fijación más eficiente, contribuyendo al rendimiento y estabilidad de los pastos (Terra *et al.* 2019).

Las sustancias húmicas (SH) parecen ser prometedoras para estimular el crecimiento de las plantas como complemento de los efectos del BD asociado con el maní forrajero. Este beneficio puede deberse a la señalización hormonal que resulta en sistemas radiculares más estructurados y, por lo tanto, una mayor absorción de nutrientes y rendimiento final (dos Santos *et al.* 2021). Además, también actúan en la regulación osmótica y promueven mejores tasas de fotosíntesis (Du Jardin 2015).

Este estudio se basa en la premisa de que la aplicación de SH beneficia el desarrollo del maní forrajero cuando se cultiva en suelo en estado de degradación. Teniendo en cuenta lo anterior, los autores tuvieron como objetivo la evaluación del rendimiento, indicadores nutricionales y fisiológicos en estas plantas cuando se sometieron a la aplicación de diferentes concentraciones de SH.

### Materiales y Métodos

El suelo utilizado fue representativo de una situación de pastos degradados en la región de Jerônimo Monteiro-ES, recolectado en la capa 0-20 cm y clasificado como ultisol (argisol rojo-amarillo distrófico, Sistema de Clasificación Brasileño) (Santos *et al.* 2013). Posteriormente, el suelo se secó al aire y se tamizó a través de una malla de 2.0 mm para obtener el suelo fino secado al aire, así como su caracterización física y

Table 1. Physical and chemical characterization of the soil used in the experiment

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CEC	ECEC	OM
(H <sub>2</sub> O)	ppm		cmolc kg <sup>-1</sup>				%			
4.10	0.25	0.06	0.23	0.08	0.8	5.5	0.38	5.88	1.18	0.74
BS	m	S	B	Fe	Cu	Mn	Zn	Sand	Silt	Clay
%		ppm				%				
6.46	67.8	24.8	0.55	48.73	0.15	1.74	0.66	54.36	2.96	42.68

SB – sum of bases (SB = Ca +Mg + K); CEC – cation exchange capacity (at pH 7.0); ECEC – effective cation exchange capacity; OM – organic matter; BS – base saturation; m – aluminum saturation.

The experiment was conducted in a greenhouse at the Federal University of Espírito Santo (20° 45' S and 41°29' O) in the period January-March 2019. Daily maximum and minimum temperature values were recorded inside the greenhouse. Daily maximum temperatures reached 38.0 °C, with an average of 34.7 °C, and the daily minimum temperatures averaged 20.9 °C. The average humidity in this same period ranged

química (Teixeira *et al.* 2017) (tabla 1).

El experimento se realizó en un invernadero de la Universidad Federal de Espírito Santo (20° 45' S y 41° 29' W) en el período de enero a marzo de 2019. Se registraron valores diarios de temperatura máxima y mínima dentro del invernadero. Las temperaturas máximas diarias alcanzaron los 38.0 °C, con una media de 34.7 °C, y las mínimas diarias promediaron los 20.9 °C. La humedad

from 57 % (minimum) to 78 % (maximum).

The experimental design was in randomized blocks, with five HS concentrations (0, 20, 40, 60, and 80 mg L<sup>-1</sup> of C) and five replications, totaling 25 experimental units. Seedlings were obtained by seeds germinated in a tray. Ten days after emergence (DAE), six seedlings were transplanted, which presented greater homogeneity in force and size for each definitive pot (with a capacity of 5 dm<sup>3</sup>). Soil moisture was maintained at 60 % of maximum storage capacity (pre-determined by gravimetric analysis method), based on weight difference by precision balance and deionized water was applied to the pots daily.

Seeds were disinfected according to Hungria *et al.* (2010) after removing the pericarp. For inoculation with *Bradyrhizobium spp.* BR1433 (SEMIA 6440) performed in all treatments, the authors followed the recommendation of Purcino *et al.* (2000) to better adherence of the inoculants to the seeds, which were subsequently dried in the shade for 15 minutes.

The HS were extracted from vermicompost (Canellas *et al.* 2002) and presented pH (H<sub>2</sub>O): 6.29; C: 60.4 g kg<sup>-1</sup>; P: 987.50 mg dm<sup>-3</sup>; for K, Ca, Mg, Al, and H + Al, 2.57, 7.71, 8.25, 0.0, 1.80 cmolc dm<sup>-3</sup> were found, respectively; SB: 18.52 cmolc dm<sup>-3</sup> and CEC: 20.32 cmolc dm<sup>-3</sup>. The concentrations of HS were based on the carbon content (C). The chemical fractionation of humic substances was carried out according to the method adapted from Swif (1996). The percentages found through the chemical fractionation of vermicompost humic substances corresponded to 67% and 33% in the fraction fulvic acids and humic acids, respectively.

The first HS application was performed at 20 DAE and the second, at 40 DAE, between 6 and 7 p.m. A manual pressure sprayer with an adjustable nozzle was used. The plants received 2.0 mL in the first application and 4.0 mL in the second (largest shoot dry matter) per plant. This quantity was standardized, aiming at the total covering of the leaves during the application periods.

At 60 DAE, the total chlorophyll (Chl t), chlorophyll a (Chl a), and chlorophyll b (Chl b) content in fully expanded leaves (2 leaves/plant) was estimated by the portable chlorophyll meter, ClorofiLOG (Falker Agricultural Automation, Brazil), between 8 and 11 a.m. The total height (cm) was determined, and after root collection and washing, the active nodules (pinkish colors) were counted in each pot (NN). No high frequency of inactive nodules was observed.

Determinations of the chlorophyll a fluorescence were quantified using a portable modulated light fluorometer (PSI FluorPen, FP 100 model, Drasov, Czech Republic), from which the maximum quantum yield of PSII (FV/FM) was obtained after adaptation of the leaves to the dark for 15 minutes. The measurements were made simultaneously and on the

media en este mismo período osciló entre 57 % (mínimo) y 78 % (máximo).

El diseño experimental fue en bloques al azar, con cinco concentraciones de SH (0, 20, 40, 60 y 80 mg L<sup>-1</sup> de C) y cinco réplicas, para un total de 25 unidades experimentales. Las plántulas se obtuvieron mediante semillas germinadas en bandeja. Diez días después de la emergencia (DDE), se trasplantaron seis plántulas, las cuales presentaron mayor homogeneidad en fuerza y tamaño para cada maceta definitiva (con una capacidad de 5 dm<sup>3</sup>). La humedad del suelo se mantuvo al 60 % de la capacidad máxima de almacenamiento (predeterminada por el método de análisis gravimétrico), basado en la diferencia de peso mediante una balanza de precisión y se aplicó agua desionizada a las macetas diariamente.

Las semillas se desinfectaron según Hungria *et al.* (2010) después de extirpar el pericarpio. Para la inoculación con *Bradyrhizobium spp.* BR1433 (SEMIA 6440) realizado en todos los tratamientos, los autores siguieron la recomendación de Purcino *et al.* (2000) para una mejor adherencia de los inoculantes a las semillas, que posteriormente se secaron a la sombra durante 15 minutos.

Los SH se extrajeron de vermicompost (Canellas *et al.* 2002) y presentaron pH (H<sub>2</sub>O): 6.29; C: 60.4 g kg<sup>-1</sup>; P: 987.50 mg dm<sup>-3</sup>; para K, Ca, Mg, Al y H + Al, se encontraron 2.57, 7.71, 8.25, 0 y 1.80 cmolc dm<sup>-3</sup>, respectivamente; suma de bases (SB): 18.52 cmolc dm<sup>-3</sup> y capacidad de intercambio catiónico (CIC): 20.32 cmolc dm<sup>-3</sup>. Las concentraciones de SH se basaron en el contenido de carbono (C). El fraccionamiento químico de sustancias húmicas se realizó según el método adaptado de Swif (1996). Los porcentajes encontrados a través del fraccionamiento químico de las sustancias húmicas del vermicompost correspondieron al 67 % y 33 % en la fracción ácidos fúlvicos y ácidos húmicos, respectivamente.

La primera aplicación de SH se realizó a los 20 DDE y la segunda a los 40 DDE, entre las 6 y las 7 p.m. Se utilizó un pulverizador de presión manual con una boquilla ajustable. Las plantas recibieron 2.0 mL en la primera aplicación y 4.0 mL en la segunda (mayor materia seca del brote) por planta. Esta cantidad se estandarizó, con el objetivo de cubrir la totalidad de las hojas durante los períodos de aplicación.

A los 60 DDE, se estimó el contenido total de clorofila (Chl t), clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) en hojas completamente expandidas (2 hojas/planta) mediante el medidor de clorofila portátil, ClorofiLOG (Falker Agricultural Automation, Brasil), entre las 8 y las 11 a.m. Se determinó la altura total (cm), y luego de la recolección y lavado de raíces, se contaron los nódulos activos (colores rosáceos) en cada maceta (NN). No se observó una alta frecuencia de nódulos inactivos.

Las determinaciones de la fluorescencia de la clorofila a se cuantificaron con un fluorómetro de luz modulada portátil (PSI FluorPen, modelo FP 100, Drasov, República Checa), a partir del cual se obtuvo el rendimiento cuántico

same leaves in which the chlorophyll content was read.

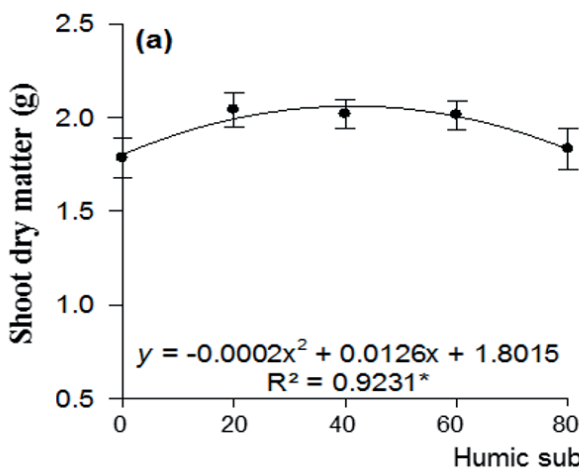
The plants were separated into roots and shoots, stored in paper bags, and placed in an oven at 65 °C for 72 hours (until reaching constant weight) to determine the shoot dry matter (SDM) and root dry matter (RDM). The samples were subjected to grinding in a knife mill for later determination of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), and magnesium (Mg).

For chemical analysis of leaf N, sulfuric digestion was performed, followed by Kjeldahl distillation, according to Carmo *et al.* (2000). For foliar chemical analysis of the other nutrients, nitric digestion was performed, and the reading was performed according to Malavolta *et al.* (1997).

The data were analyzed for normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (ANOVA). Regression analysis was performed for the quantitative factors, where the models were chosen based on the significance of the regression coefficients using student t-test at the 5 % significance level and the coefficient of determination ( $R^2$ ). For plotting the graphics, SigmaPlot® software, 10 version (Systat Software Inc 2006) was used.

### Results and Discussion

The application of different concentrations of HS in forage peanuts increased the SDM by around 10.98 % ( $p \leq 0.05$ ). It was estimated that the maximum yield of SDM would be obtained with the concentration of 31 mg L<sup>-1</sup> of C (figure 1).



máximo del fotosistema II (PSII) (FV/FM) después de la adaptación de las hojas a la oscuridad por 15 minutos. Las mediciones se realizaron simultáneamente y en las mismas hojas en las que se leyó el contenido de clorofila.

Las plantas se separaron en raíces y brotes, se almacenaron en bolsas de papel y se colocaron en una estufa a 65 °C durante 72 horas (hasta alcanzar peso constante) para determinar la materia seca del brote (MSB) y la materia seca de la raíz (MSR). Las muestras se trituraron en un molino de cuchillas para posterior determinación de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg).

Para el análisis químico del N foliar, se realizó digestión sulfúrica, seguida de destilación Kjeldahl, según Carmo *et al.* (2000). Para el análisis químico foliar de los demás nutrientes se realizó la digestión nítrica y la lectura se realizó según Malavolta *et al.* (1997).

Los datos se analizaron para determinar la normalidad (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (ANOVA). Se realizó un análisis de regresión para los factores cuantitativos, donde los modelos se eligieron en función de la significación de los coeficientes de regresión mediante la prueba t de Student al nivel de significancia del 5 % y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Para trazar los gráficos, se utilizó el software SigmaPlot®, versión 10 (Systat Software Inc 2006).

### Resultados y Discusión

La aplicación de diferentes concentraciones de SH en maní forrajero aumentó la MSB en alrededor de 10.98 % ( $p \leq 0.05$ ). Se estimó que el rendimiento máximo de MSB se obtendría con la concentración de 31 mg L<sup>-1</sup> de C (figura 1).

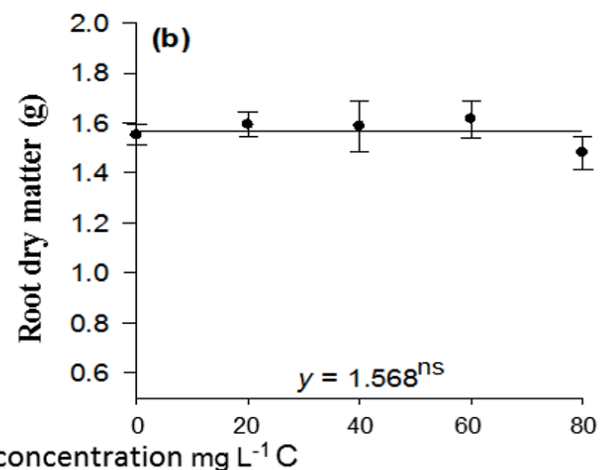


Figure 1. Shoot dry matter [SDM] (a) and root dry matter [RDM] (b) of forage peanut plants according to the application of HS concentrations. \*  $p \leq 0.05$ ; ns: not significant

Humic substances act similarly to hormones or alkaloids. They also stimulate a greater activity of H<sup>+</sup>-ATPases in the plasma membrane, which generates an electrochemical gradient with the extrusion of H<sup>+</sup>, therefore greater permeability of the cell wall (Canellas *et al.* 2015, Zandonadi *et al.* 2019). Besides, they promote greater emission of radicular hair and thin lateral roots, increasing the root system surface

Las sustancias húmicas actúan de manera similar a las hormonas o alcaloides. También estimulan una mayor actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas en la membrana plasmática, lo que genera un gradiente electroquímico con la extrusión de H<sup>+</sup>, y, por tanto, mayor permeabilidad de la pared celular (Canellas *et al.* 2015 y Zandonadi *et al.* 2019). Además, promueven una mayor emisión de pelo radicular y raíces laterales delgadas, lo que aumenta la



area and exuding low molecular weight organic acids (dos Santos *et al.* 2021). This activity improves the rhizosphere environment and increases nutrient absorption (Du Jardin 2015).

The regression was not significant ( $p > 0.05$ ) for RDM. Rosa *et al.* (2009) evaluated the same species and found the root system growth when applying HS concentrations from mineral coal in the nutrient solution. It can be inferred that the composition, as well as the HS concentrations, induce different stimuli. The presence of root hair has been observed with HS application; however, such modification is difficult to measure from the dry matter.

There was an increase in NN (figure 2) up to the C concentration of 40 mg L<sup>-1</sup> (52.8 nodules pot<sup>-1</sup>), about 25.41 to 45.85 % compared to the control treatment (36.2 nodules pot<sup>-1</sup>). Note that the variation obtained in this parameter is highly related to HS concentrations ( $R^2 = 0.968$ ). Capstaff *et al.* (2020) demonstrated, employing transcriptional RNA analysis, that leguminous forages treated with humic acid have positive regulation of many important genes in nodulation.

superficie del sistema radicular y exuda ácidos orgánicos de bajo peso molecular (dos Santos *et al.* 2021). Esta actividad mejora el ambiente de la rizosfera y aumenta la absorción de nutrientes (Du Jardin 2015).

La regresión no fue significativa ( $p > 0.05$ ) para la MSR. Rosa *et al.* (2009) evaluaron la misma especie y encontraron crecimiento del sistema radicular al aplicar concentraciones de SH de carbón mineral en la solución nutritiva. Se puede inferir que la composición, así como las concentraciones de SH, inducen diferentes estímulos. Se ha observado la presencia de pelos radicales con la aplicación de SH. Sin embargo, dicha modificación es difícil de medir a partir de la materia seca.

Hubo aumento en NN (figura 2) hasta la concentración de C de 40 mg L<sup>-1</sup> (52.8 nódulos maceta<sup>-1</sup>), alrededor de 25.41 a 45.85 % en comparación con el tratamiento control (36.2 nódulos maceta<sup>-1</sup>). Nótese que la variación obtenida en este parámetro está altamente relacionada con las concentraciones de SH ( $R^2 = 0.968$ ). Capstaff *et al.* (2020) demostraron, a través del análisis de ARN transcripcional, que los forrajes leguminosos tratados con ácido húmico tienen una regulación positiva de muchos genes importantes en la nodulación.

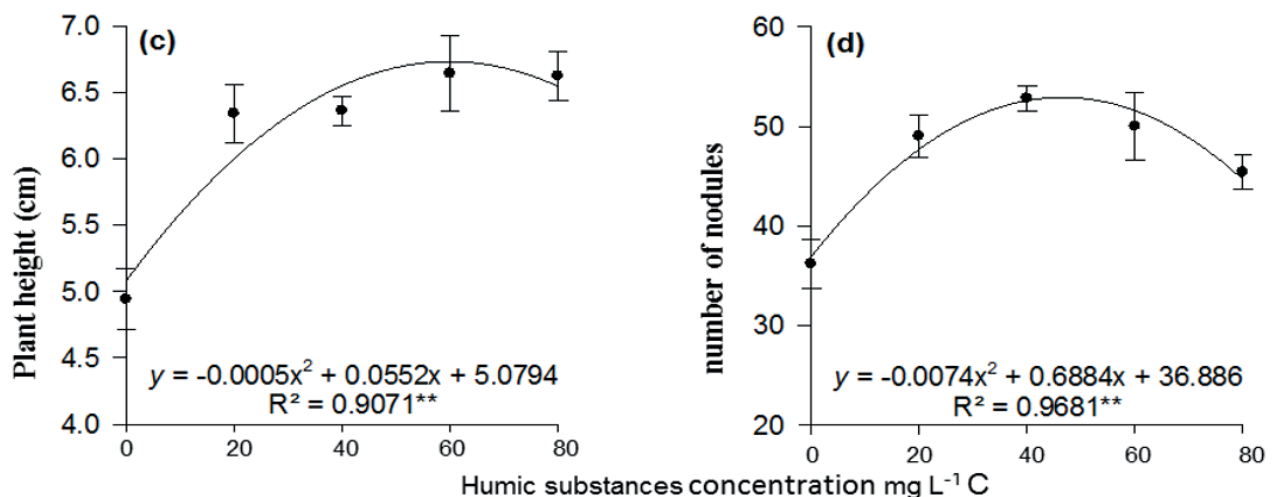


Figure 2. Plant height (c) and number of nodules (d) of forage peanut plants according to the application of HS concentrations  $p \leq 0.01$

The quadratic model ( $R^2 = 0.90$ ;  $p \leq 0.01$ ) (figure 2) reveals that the concentration of 55 mg L<sup>-1</sup> of C of HS provides the best result of plant height. This result can be associated with the hormonal effect of HS when applied in low concentration. A reduction in plant height was observed at the HS concentration of 80 mg L<sup>-1</sup> of C, classifying this concentration as inhibitory to plant growth.

Rosa *et al.* (2009), when applying 11 mg L<sup>-1</sup> of C in *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*), observed an increase in SDM. For Pinheiro *et al.* (2018), there was an increase of 44 % in plant height and 196 % in the production of SDM from *Urochloa decumbens* (*Poaceae*) when 60 mg L<sup>-1</sup> of C was applied. According to Gao *et al.* (2015), HS stimulates cell metabolism and

El modelo cuadrático ( $R^2 = 0.90$ ;  $p \leq 0.01$ ) (figura 2) revela que la concentración de 55 mg L<sup>-1</sup> de C de SH proporciona el mejor resultado de altura de planta. Este resultado puede estar asociado con el efecto hormonal de SH cuando se aplica en concentraciones bajas. Se observó reducción en la altura de la planta a la concentración de SH de 80 mg L<sup>-1</sup> de C, y esta se clasificó como inhibidora del crecimiento de la planta.

Rosa *et al.* (2009), al aplicar 11 mg L<sup>-1</sup> de C en *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*), observaron un aumento en la MSB. Pinheiro *et al.* (2018) encontraron aumento del 44 % en la altura de la planta y del 196% en la producción de MSB a partir de *Urochloa decumbens* (*Poaceae*) cuando se aplicaron 60 mg L<sup>-1</sup> de C. Según Gao *et al.* (2015), SH estimula el metabolismo celular

nutrient transport, generating increased cell density of *Bradyrhizobium spp.*, in addition to promoting the expression of BNF-related proteins.

The concentrations of HS were significant in the regression analysis for N and Ca ( $p \leq 0.01$ ) and K and Mg ( $p \leq 0.05$ ) (figure 3). For P, there was no adjustment to the linear and quadratic models.

y el transporte de nutrientes, generando una mayor densidad celular de *Bradyrhizobium spp.*, además de promover la expresión de proteínas relacionadas con FBN.

Las concentraciones de SH fueron significativas en el análisis de regresión para N y Ca ( $p \leq 0.01$ ) y K y Mg ( $p \leq 0.05$ ) (figura 3). No hubo ajuste a los modelos lineal

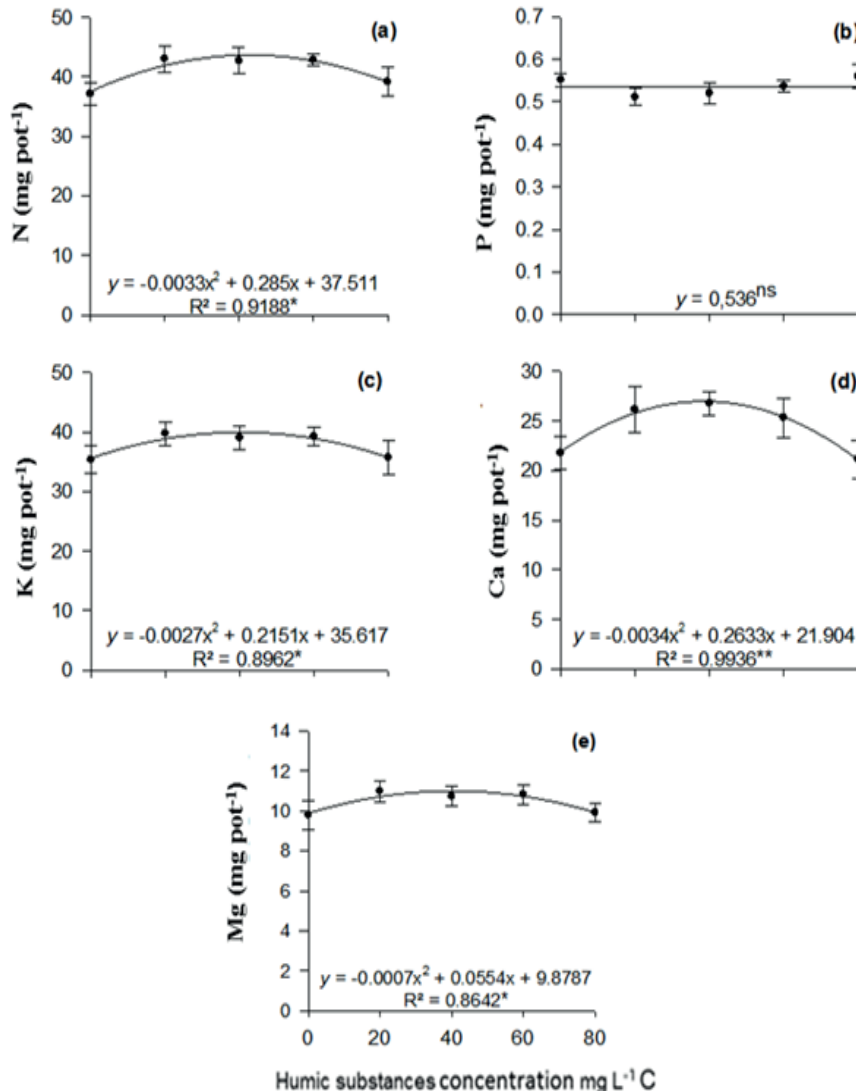


Figure 3. Accumulation of N (a), P (b), K (c), Ca (d), and Mg (e) in the shoot of forage peanut plants according to the HS concentrations (0, 20, 40, 60 and 80 mg L<sup>-1</sup> C). Significant \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: not significant.

The applied HS concentrations increased the nutrient content in the shoot of the forage peanut plants compared to the control. Increases of 12 % N (37.1 to 41.5 mg pot<sup>-1</sup>), 8.6% K (35.3 to 38.3 mg pot<sup>-1</sup>), 13.5 % Ca (21.8 to 24.7 mg pot<sup>-1</sup>), and 7.5 % Mg (9.8 to 10.53 mg pot<sup>-1</sup>) were found (figure 3). The largest increments in N and K accumulation based on the regression adjustment would be obtained at C concentrations of 43 and 41 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The concentration of 38 mg L<sup>-1</sup> of C would be the best for Ca and Mg accumulation.

HS maximize nutrient uptake, even at low concentrations in the soil. Pinheiro *et al.* (2010) found that N accumulation showed a quadratic performance

y cuadrático para P.

Las concentraciones aplicadas de SH aumentaron el contenido de nutrientes en el brote de las plantas de maní forrajero en comparación con el control. Se encontraron incrementos de 12 % de N (37.1 a 41.5 mg maceta<sup>-1</sup>), 8.6 % de K (35.3 a 38.3 mg maceta<sup>-1</sup>), 13.5 % de Ca (21.8 a 247 mg maceta<sup>-1</sup>) y 7.5 % de Mg (9.8 a 10.53 mg maceta<sup>-1</sup>) (figura 3). Los mayores valores en la acumulación de N y K, basados en el ajuste de regresión, se obtendrían en concentraciones de C de 43 y 41 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de 38 mg L<sup>-1</sup> de C sería la mejor para la acumulación de Ca y Mg

Las SH maximizan la absorción de nutrientes, incluso a bajas concentraciones en el suelo. Pinheiro

in response to different humic acid concentrations application in eucalyptus seedlings (*Myrtaceae*). The increase in the macronutrient content was also reported by Savita and Girijesh (2018), studying the soybean (*Glycine max* L.) (*Fabaceae*) and, Júnior *et al.* (2019) in mangosteen plants (*Garcinia mangostana*) (*Clusiaceae*) when humic acid is applied.

Humic acids act in the soil-microbiota-plant interaction, mainly in the availability and nutrient assimilation (Hayes and Swift, 2020). The BNF contribution to forage peanut can reach almost the totality of their N nutritional demand (Longhini *et al.* 2021). The higher N accumulation and nodulation rate may be correlated. This is due to the stimulation in root hair emission resulting from the addition of HS. Furthermore, Quaggiotti (2004) shows that application of humic acids increases  $\text{NO}_3^-$  uptake in maize due to mRNA regulation of its principal  $\text{H}^+$ -ATPase.

K accumulation was elevated with increasing concentrations of HS up to  $40 \text{ mg L}^{-1}$  of C, in contrast to Rosa *et al.* (2009), who observed a decrease in the uptake rates of this element in beans. Although the Ca and Mg content was low in the soil, HS application raised their uptake rate, according to Pinheiro *et al.* (2010).

There was a slight decrease in P accumulation compared to the control, varying from 2.71 to 7.42 % depending on HS concentration application. These reductions were more expressive in the C concentrations of 20 and  $40 \text{ mg L}^{-1}$  and rising in the C concentration of  $80 \text{ mg L}^{-1}$ . These findings can be attributed to these nutrients' dilutions due to higher SDM in the referred concentrations, besides the low P content available in the soil.

There was an effect of HS concentrations only for FV/FM, among the evaluated physiological parameters (figure 4). Values that run out of the 0.75-0.85 range indicate photoinhibition damage in the PSII reaction center (Guidi *et al.* 2019).

The values of FV/FM ranged from 0.802 to 0.834, and the HS concentrations promoted an average increase of 2.99 % compared to the control (0.802), highlighting the applications of  $80 \text{ mg L}^{-1}$  of C (0.834). Only about 10 % of the FV/FM variability was not attributed to the HS concentrations effect ( $R^2=0.89$ ;  $p \leq 0.01$ ) (figure 4). Regardless of the treatment, there was no damage to the PSII reaction center.

Additionally, we showed in the course of the study, higher SDM results in improved nutrient uptake. This enhanced nutritional status may culminate in plants that are less susceptible to stresses ( $> \text{Fv/Fm}$ ) (Fan *et al.* 2014). Perhaps antioxidant enzyme analyses could explore this point better, than chlorophyll contents.

The values of the Chl t, Chl a, Chl b, and Chl a/Chl b ratio did not fit into the regression models evaluated ( $p>0.05$ ), showing a slight increase due to the HS applications (3.53; 3.91 and 3.58 %, respectively)

*et al.* (2010) encontraron que la acumulación de N mostró un comportamiento cuadrático como respuesta a la aplicación de diferentes concentraciones de ácido húmico en plántulas de eucalipto (*Myrtaceae*). Savita y Girijesh (2018) también informaron el aumento del contenido de macronutrientes, quienes estudiaron la soya (*Glycine max* L.) (*Fabaceae*) y, Júnior *et al.* (2019) en plantas de mangostán (*Garcinia mangostana*) (*Clusiaceae*) cuando se aplica ácido húmico.

Los ácidos húmicos actúan en la interacción suelo-microbiota-planta, principalmente en la disponibilidad y asimilación de nutrientes (Hayes y Swift 2020). La contribución de FBN al maní forrajero puede cubrir casi la totalidad de su demanda nutricional de N (Longhini *et al.* 2021). La mayor tasa de nodulación y acumulación de N puede estar correlacionada. Esto se debe a la estimulación de la emisión de pelos radiculares que resulta de la adición de SH. Además, Quaggiotti (2004) muestra que la aplicación de ácidos húmicos aumenta la absorción de  $\text{NO}_3^-$  en el maíz debido a la regulación del ARNm de su principal  $\text{H}^+$ -ATPasa.

La acumulación de K aumentó con concentraciones crecientes de SH hasta  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de C, en contraste con Rosa *et al.* (2009), quienes observaron una disminución en las tasas de absorción de este elemento en frijoles. Aunque el contenido de Ca y Mg fue bajo en el suelo, la aplicación de SH elevó su tasa de absorción, según Pinheiro *et al.* (2010).

Hubo ligera disminución en la acumulación de P en comparación con el control, que varió de 2.71 a 7.42 % dependiendo de la concentración de SH aplicada. Estas reducciones fueron más expresivas en las concentraciones de C de 20 y  $40 \text{ mg L}^{-1}$  y aumentaron en la concentración de C de  $80 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos hallazgos se pueden atribuir a las diluciones de estos nutrientes debido a una mayor MSB en las concentraciones referidas, además del bajo contenido de P disponible en el suelo.

Las concentraciones de SH tuvieron efecto solo para FV/FM, entre los parámetros fisiológicos evaluados (figura 4). Los valores que se encuentran fuera del rango de 0.75-0.85 indican daño por fotoinhibición en el centro de reacción del PSII (Guidi *et al.* 2019).

Los valores de FV/FM variaron de 0.802 a 0.834, y las concentraciones de SH promovieron un incremento promedio de 2.99 % respecto al control (0.802), destacando las aplicaciones de  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de C (0.834). Solo alrededor del 10 % de la variabilidad FV/FM no se atribuyó al efecto de las concentraciones de SH ( $R^2=0.89$ ;  $p \leq 0.01$ ) (figura 4). Independientemente del tratamiento, no hubo daños en el centro de reacción del PSII.

Además, se demostró durante el estudio que mayor MSB produce mejor absorción de nutrientes. Este estado nutricional mejorado puede culminar en plantas que son menos susceptibles al estrés ( $> \text{Fv/Fm}$ ) (Fan *et al.* 2014). Probablemente los análisis de enzimas antioxidantes podrían explorar este punto mejor que el contenido de clorofila.

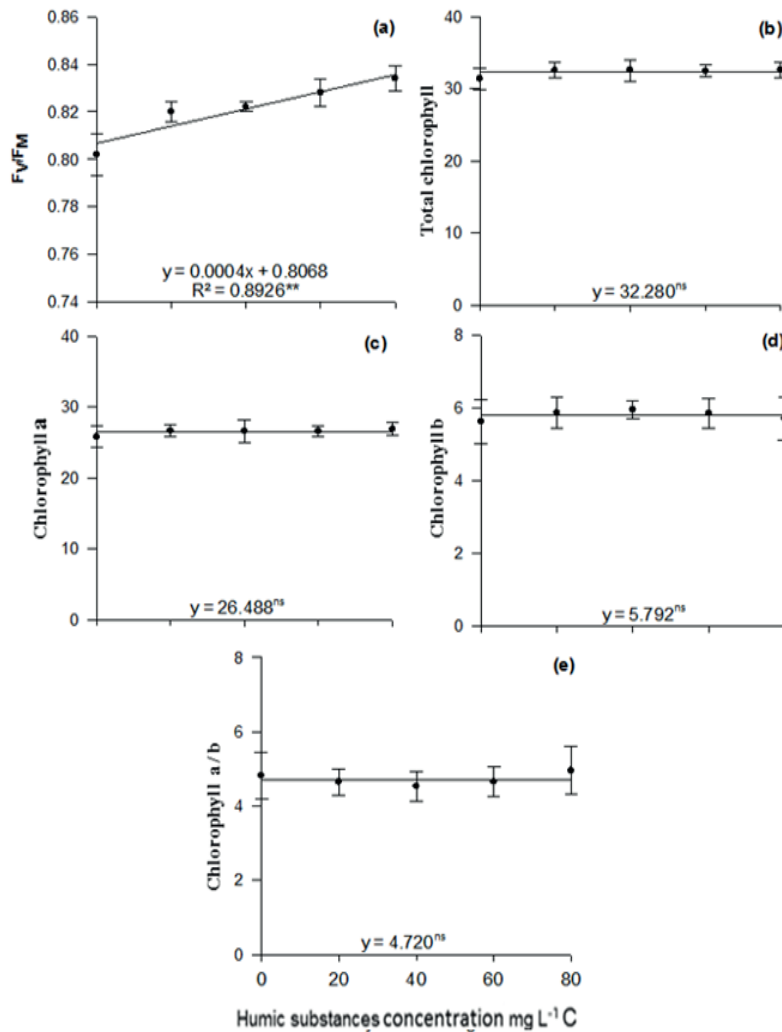


Figure 4. Quantum yield of photosystem II (a), total chlorophyll (b), chlorophyll a (c), chlorophyll b (d), and chlorophyll a/b ratio (e) of forage peanut plants according to the application of HS concentrations \*\*  $p \leq 0.01$ ; ns: not significant

compared to the control. The chlorophyll content was positively correlated with N content ( $r = 0.75$ ), showing that the increase in HS concentrations led to a greater contribution of this element and higher chlorophyll levels.

### Conclusions

The application of humic substances extracted from vermicompost increases the shoot dry matter, plant height, and the number of nodules, as well as the maximum quantum yield of the plants of *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100, indicating improvements in the PSII reaction center.

The application of  $40 \text{ mg L}^{-1}$  of humic substances is recommended to obtain maximum N, K, Ca, and Mg absorption in forage peanut plants.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

#### Author's contribution

D. M. Oliveira: Original idea, conducting the experiment, sampling, statistical analysis, writing the

Los valores de la relación Chl t, Chl a, Chl b y Chl a/Chl b no se ajustaron a los modelos de regresión evaluados ( $p > 0.05$ ), los cuales mostraron un leve incremento debido a las aplicaciones de HS (3.53; 3.91 y 3.58 %, respectivamente) en comparación con el control. El contenido de clorofila se correlacionó positivamente con el contenido de N ( $r = 0.75$ ), lo que demostró que el aumento en las concentraciones de SH condujo a un mayor aporte de este elemento y mayores niveles de clorofila.

### Conclusiones

La aplicación de sustancias húmicas extraídas del vermicompost aumentó la materia seca del brote, la altura de la planta y el número de nódulos, así como el rendimiento cuántico máximo de las plantas de *Arachis pintoi* vc. Amarillo MG 100, que indica mejoras en el centro de reacción de PSII.

Se recomienda la aplicación de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de sustancias húmicas para obtener la máxima absorción de N, K, Ca y Mg en plantas de maní forrajero.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflicto de



manuscript

C. C. Thiengo: Conducting the experiment writing the manuscript

Lenita Júlia Bolzan: Conducting the experiment, sampling, y paper revisión

E. S. Mendonça: Paper revisión

D. L. Burak: Paper revisión

intereses

Contribución de los autores

D. M. Oliveira: Idea original, realización del experimento, muestreo, análisis estadístico redacción del documento.

C. C. Thiengo: Realización del experimento, redacción del artículo

Lenita Júlia Bolzan: realización del experimento, toma de muestras y revisión final del artículo.

E. S. Mendonça : Revisión final del artículo.

D. L. Burak : Revisión final del artículo.

## References

- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P. & Piccolo, A. 2015. "Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture". *Scientia Horticulturae*, 196: 15-27, ISSN: 0304-4238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L. & Façanha, A.R. 2002. "Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots". *Plant Physiology*, 130(4): 1951-1957, ISSN: 1532-2548. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>.
- Canto, M.W., Almeida, G.M., Costa, A.C.S., Barth-Neto, A., Scaliante-Júnior, J.R. & Orlandini, C.F. 2016. "Seed production of Mombasa'grass subjected to different closing cut dates and nitrogen rates". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(6): 766-775, ISSN: 1678-3921. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000600009>.
- Capstaff, N.M., Morrison, F., Cheema, J., Brett, P., Hill, L., Muñoz-García, J.C., Khimyak, Y.Z., Domoney, C. & Miller, A.J. 2020. "Fulvic acid increases forage legume growth inducing preferential up-regulation of nodulation and signalling-related genes". *Journal of Experimental Botany*, 71(18): 5689-5704, ISSN: 1460-2431. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa283>.
- Carmo, C.A.F.S., Araujo, W.S., Bernardi, A.C.C. & Saldanha, M.F.C. 2000. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E). Available: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/337672>, [Consulted: November 30th, 2020].
- Dias-Filho, M.B. 2017. Degradação de pastagens: o que é e como evitar. Embrapa Amazônia Oriental- Cartilha (INFOTECA-E), Available: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1070416>, [Consulted: November 30th, 2020].
- Dos Santos, B. de M.S., Da Silva, M.S.R. de A., Chávez, D.W.H., De Oliveira, R., Santos, C.H.B., Oliveira, E.C. & Rigobelo, E.C. 2021. "K-humate as an agricultural alternative to increase nodulation of soybeans inoculated with *Bradyrhizobium*". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36: 102129, ISSN: 1878-8181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102129>.
- Du Jardin, P. 2015. "Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation". *Scientia Horticulturae*, 196: 3-14, ISSN: 0304-4238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.010>.
- 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". *Scientia Horticulturae*, 177: 118-123, ISSN: 0304-4238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.010>.
- Gao, T.G., Xu, Y.Y., Jiang, F., Li, B.Z., Yang, J.S., Wang, E.T. & Yuan, H.L. 2015. "Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium liaoningense* CCBau05525 in response to water-soluble humic materials". *Scientific Reports*, 5(1): 1-13, ISSN: 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/srep10836>.
- Guidi, L., Lo Piccolo, E. & Landi, M. 2019. "Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species?" *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-11, ISSN: 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>.
- Hayes, M.H. & Swift, R.S. 2020. "Vindication of humic substances as a key component of organic matter in soil and water". *Advances in Agronomy*, 163: 1-37, ISSN: 0065-2113. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.05.001>.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. & Pedrosa, F.O. 2010. "Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil". *Plant and Soil*, 331(1-2): 413-425, ISSN: 1573-5036. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.
- Júnior, G.A.G., Pereira, R.A., Sodr e, G.A. & Gross, E. 2019. "Humic acids from vermicompost positively influence the nutrient uptake in mangosteen seedlings". *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49: 1-8, ISSN: 1983-4063. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v49i5529>.
- Longhini, V.Z., Cardoso, A.S., Berça, A.S., Boddey, R.M., Reis, R.A., Dubeux Jr, J.C., & Ruggieri, A.C. 2021. "Could forage peanut in low proportion replace N fertilizer in livestock systems?" *PloS One*, 16(3): e0247931, ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247931>.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, A.S. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2nd Ed. Ed. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. Piracicaba, São Paulo, Brasil, p. 319.
- Olivo, C.J., Quatrin, M.P., Sauter, C.P., Silva, A.R., Sauthier, J.C. & Sauter, M.P. 2019. "Productivity and crude protein concentration of Tifton 85 pasture-based mixed with pinto peanut". *Ciência e Agrotecnologia*, 43: 1-8, ISSN: 1981-1829, DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943025518>.
- Pinheiro, G.L., Silva, C.A. & Furtini-Neto, A.E. 2010. "Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação

- de concentrações de ácido húmico". Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34(4): 1217-1229, ISSN: 1806-9657. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400021>.
- Pinheiro, P.L., Passos, R.R., Peçanha, A.L., Canellas, L.P., Olivares, F.L. & Mendonça, E.S. 2018. "Promoting the growth of *Brachiaria decumbens* by humic acids (HAs)". Australian Journal of Crop Science, 12(7): 1114-1121, ISSN: 1835-2707. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.07.PNE1038>.
- Purcino, H.M.A., Sá, N.M.H., Vargas, M.A.T. & Mendes, I.C. 2000. Novas estirpes de rizóbio para a inoculação do amendoim forrageiro (*Arachis pintoii*). Embrapa Cerrados-Recomendação Técnica (INFOTECA-E), Available: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/563925/1/rectec20.pdf>. [Consulted: October 18th, 2020].
- Quaggiotti, S. 2004. "Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.)". Journal of Experimental Botany, 55(398): 803-813, ISSN: 1460-2431. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh085>.
- Rosa, C.M., Castilhos, R.M.V., Vahl, L.C., Castilhos, D.D., Pinto, L., Bortolon, E.S.O. & Leal, O.A. 2009. "Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L". Revista Brasileira de Ciência do Solo, 33(4): 959-967, ISSN: 1806-9657. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000400020>.
- Santos, H.G., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C., Oliveira, V.A., Lubreras, J.F., Coelho, M.R., Almeida, J.A., Cunha, T.J.F. & Oliveira, J.B. 2013. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3rd Ed. Ed. Embrapa. Brasília, Brasil, p. 353.
- Savita, S.P. & Girijesh, G.K. 2018. "Effect of humic substances on nutrient uptake and yield of soybean". Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(2): 2167-2171, ISSN: 2278-4136.
- Simeão, R.M., Assis, G.M.L., Montagner, D.B. & Ferreira, R.C.U. 2017. "Forage peanut (*Arachis spp.*) genetic evaluation and selection". Grass and Forage Science, 72(2), 322-332. ISSN: 1365-2494. <https://doi.org/10.1111/gfs.12242>.
- Swift, R.S. 1996. Organic matter characterization. In: Methods of Soil Analysis Part 3 Chemical Methods. Ed. Soil Society of America and American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA, p. 1011-1069. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c35>.
- Systat Software, Inc. 2006. SigmaStat® version 3.5. Available: <http://www.statsoft.com>.
- Teixeira, P.C., Donagemma, G.K., Fontana, A. & Teixeira, W.G. 2017. Manual de métodos de análise de solo. 3rd Ed. Ed. Embrapa. Rio de Janeiro, Brazil, p. 573, ISBN: 978-85-7035-771-7.
- Terra, A.B.C., Florentino, L.A., Rezende, A.V. & Silva, N.C.D. 2019. "Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil". Revista de Ciências Agrárias, 42(2): 11-20, ISSN: 2183-041X. <https://doi.org/10.19084/rca.16016>.
- Vasques, I.C., Souza, A.A., Morais, E.G., Benevenuto, P.A., da Silva, L.D.C., Homem, B.G., Casagrande, D.R. & Silva, B. M. 2019. "Improved management increases carrying capacity of Brazilian pastures". Agriculture, Ecosystems & Environment, 282: 30-39, ISSN: 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.05.017>.
- Zandonadi, D.B., Matos, C.R.R., Castro, R.N., Spaccini, R., Olivares, F.L. & Canellas, L.P. 2019. "Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity". Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 6(1): 1-12, ISSN: 2196-5641. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0161-4>.

**Received: June 14, 2021**

**Accepted: October 8, 2021**