

Glomus fasciculatum IN DEFENSE RESPONSES TO STOP THE ROT OF *Arachis hypogaea* L.

Glomus fasciculatum EN LAS RESPUESTAS DE DEFENSA PARA DETENER LA PUTREFACCIÓN DE *Arachis hypogaea* L.

Khirood Doley*, Mayura Dudhane, Mahesh Borde

¹Department of Botany, Mycology Laboratory, University of Pune, Maharashtra, India.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can play the potential role of bio-control agent, which will enable a putative perspective in bio-protection and intensive organic agricultural practices since chemical pesticides are associated with several health hazards. The objective of this pot culture research was to study the roles played by AM fungi (*Glomus fasciculatum*) in the biocontrol of pathogen *Sclerotium rolfsii*, which is a causal agent of stem-rot in groundnut plant. The experimental design was randomized complete block with four treatments and three replicates per treatment; data were analyzed with ANOVA and treatments means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). Groundnut plants were treated with AM *S. rolfsii* or both after 30, 60 and 90 d of planting. The soil based AM fungi were inoculated before pathogen inoculation. Results showed that *S. rolfsii* caused stem-rot disease in groundnut plants as expected, but the AM fungi inoculation significantly enhanced host plant endurance by decreasing stem-rot severity, and increased growth variables of inoculated plants. Besides, the effect of AM fungi was noticeable in root colonization and mycorrhizal dependency percentage, and there was a significant increase in content of total chlorophyll, protein, total phenols and polyphenol activities in mycorrhizal groundnut plants inoculated with pathogen. The antioxidant related response such as peroxidase was higher, reflecting a possible defense resistance mechanism induced upon by the AM fungi colonization by reducing the harmful effects of reactive oxygen species produced during the growth of groundnut plants due to *S. rolfsii*.

Keywords: AM fungi, anti-oxidant enzymes, biocontrol, *G. fasciculatum*, groundnut, *S. rolfsii*.

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) pueden tener la función potencial de agente de biocontrol, lo cual permitirá tener una perspectiva supuesta sobre la bioprotección y las prácticas agrícolas orgánicas intensivas, dado que los pesticidas químicos están asociados con daños serios a la salud. El objetivo de esta investigación fue el cultivo en maceta para estudiar la función que tiene el hongo MA (*Glomus fasciculatum*) en el biocontrol del patógeno *Sclerotium rolfsii*, que es un agente causal de la pudrición del tallo en la planta de cacahuete. El diseño experimental fue bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres réplicas por tratamiento; los datos se analizaron con ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las plantas de cacahuete se trataron con hongo MA *S. rolfsii* o ambos después de 30, 60 y 90 d de plantar. Los hongos MA del suelo fueron inoculados antes de la inoculación con el patógeno. Los resultados mostraron que *S. rolfsii* causó enfermedad de pudrición del tallo en plantas de cacahuete, como se esperaba, pero la inoculación con hongos MA mejoró significativamente la resistencia de la planta al disminuir la severidad de la pudrición del tallo y aumentar las variables de crecimiento de las plantas inoculadas. Además, el efecto de los hongos MA fue notable en la colonización de las raíces y en el porcentaje de dependencia micorrízica, y hubo un aumento significativo en el contenido de clorofila total, proteína, fenoles totales y actividades de polifenoles en las plantas de cacahuete micorrízicas inoculadas con el patógeno. La respuesta relacionada con antioxidantes como la peroxidasa fue mayor, reflejando un posible mecanismo de resistencia de defensa inducido por la colonización del hongo MA al reducir los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento de las plantas de cacahuete, debido al *S. rolfsii*.

Palabras clave: Hongos MA, enzimas antioxidantes, biocontrol, *G. fasciculatum*, cacahuete, *S. rolfsii*.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: September, 2014. Approved: June, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 669-678. 2015.

INTRODUCTION

The peanut or groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is an important oilseed crop and food legume grown on about 20 million ha in warm tropical or subtropical areas throughout the world (Wyne and Beute, 1991). Among producers of groundnut India ranks second, but the rate of production does not keep pace with the domestic demand, despite the increase in production of groundnut; thus, India imported 5 million Mg soybean oilcake meals 5 during 2003-2007 (Birthal *et al.*, 2010). The main cause of this situation is a severe yield decrease in groundnut growth and production caused by bacterial, viral or fungal pathogens (Roy and Shiyani, 2000). *Sclerotium rolfsii* Sacc. (teleomorph: *Athelia rolfsii*) (Curzi), a soil-borne fungal pathogen, shows destructive ability in groundnut plants and it is the causal agent of stem-rot (Narain and Kar, 1990). In crop debris *S. rolfsii* survives in the form of sclerotia and is found in the tropics, subtropics and other warm temperate regions (Punja, 1985).

Several chemicals compounds are available against soil-borne plant pathogens, but the employment of biological control agents is inevitable due to environment protection (Naseby *et al.*, 2000). Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi belonging to phylum Glomeromycota, which inhabits ubiquitously in all known terrestrial ecosystems in symbiotic associations within the root system of most plants (Smith and Read, 2008), are studied for their potential benefits in sustainable agricultural production (Rooney *et al.*, 2009).

Arbuscular mycorrhizal fungi show potential role in growth promotion by improving nutrition and disease resistance (Demir and Akkopru, 2007). Among the reported underlying mechanisms of AM interaction in plant resistance against pathogens are the specific competition against pathogen, root alterations and other defense related responses (Wu *et al.*, 2013). Thus, the aim of this investigation was to determine the role of *Glomus fasciculatum* in the biological control of *S. rolfsii* and identify the defense related responses triggered by the AM-fungi in groundnut cultivar JL-24 sown on sterile soil.

INTRODUCCIÓN

El cacahuete o maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo importante de oleaginosa y leguminosa alimenticia cultivada en unos 20 millones ha en áreas cálidas tropicales o subtropicales en el mundo (Wyne y Beute, 1991). Entre los productores de cacahuete, India tiene el segundo lugar, pero la tasa de producción de cacahuete no mantiene el ritmo de la demanda doméstica, a pesar del aumento en la producción; así, India importó 5 millones Mg de harina de pasta de soya durante 2003 a 2007 (Birthal *et al.*, 2010). La causa principal de esta situación es la disminución severa del rendimiento en el crecimiento y la producción de cacahuete causada por patógenos bacterianos, virales o fúngicos (Roy y Shiyani, 2000). *Sclerotium rolfsii* Sacc. (teleomorfo: *Athelia rolfsii*) (Curzi), un patógeno fúngico del suelo, tiene capacidad destructora en las plantas de cacahuete y es el agente causal de la pudrición del tallo (Narain y Kar, 1990). En detritos de cultivos *S. rolfsii* sobrevive en forma de esclerocios y se encuentra en los trópicos, los subtrópicos y otras regiones cálidas templadas (Punja, 1985).

Varios compuestos químicos están disponibles contra los patógenos de plantas del suelo, pero el uso de agentes de control biológico es inevitable debido a la protección ambiental (Naseby *et al.*, 2000). Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) del filo Glomeromycota, que habitan ubicuamente en todos los ecosistemas terrestres conocidos, en asociaciones simbióticas dentro de los sistemas de raíces de la mayoría de las plantas (Smith y Read, 2008), se estudian por sus potenciales beneficios para la producción agrícola sustentable (Rooney *et al.*, 2009).

Los hongos MA tienen una función potencial en la promoción del crecimiento al mejorar la nutrición y la resistencia a las enfermedades (Demir y Akkopru, 2007). Entre los mecanismos subyacentes reportados de interacción de los hongos MA en la resistencia de las plantas contra los patógenos están la competencia específica al patógeno, las alteraciones de las raíces y otras respuestas relacionadas con la protección (Wu *et al.*, 2013). Así, el objetivo de esta investigación fue determinar la función de *Glomus fasciculatum* en el control biológico de *S. rolfsii* e identificar las respuestas relacionadas con la protección, estimuladas por el hongo MA, en el cultivar de cacahuete JL-24 plantado en suelo estéril.

MATERIALS AND METHODS

Plant and fungal material

Four groundnut seeds (*Arachis hypogaea* L.) of a local susceptible cultivar (var. Phule Pragati-JL 24) were used in pots containing sterile soil. The pots were watered at regular intervals with no addition of chemicals or fertilizers in a greenhouse at the Department of Botany, University of Pune, India. In the greenhouse, the relative humidity was 30 %-70 %, the pots were adequately spaced, the dead leaves or debris were removed regularly and average daily temperature was 28 °C with a photoperiod of 12 h.

The AM fungi *G. fasciculatum* (Thaxter Senu Gerd.) was isolated (Gerdeemann and Nicolson, 1963) and identified (Schenck and Perez, 1987). The AM inoculum was prepared using guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) grown in an open pot culture system where soil consisting of spores (Gillmore, 1968) and colonized roots was used for AM inoculum; 20 g were applied under groundnut seeds before sowing in the pots.

The pathogen *S. rolfii* was isolated from the fields of Pune, Maharashtra, and was identified through the Division of Mycology, ARI, Pune. The pure culture of *S. rolfii* was maintained on potato dextrose agar (PDA) medium. The pathogen inoculum was prepared by using sterilized sorghum seeds, which were inoculated with pure culture of *S. rolfii* and incubated for three weeks. This served as pathogen inoculum and after 15 d of plant growth a treatment set was inoculated with 5 g around the roots of groundnut plants. The control treatment received sterilized soil instead of pathogen inoculum.

Observations

The plants were harvested after 30, 60 and 90 d of planting (DAP) and variables measured were shoot length, root length, pod number, leaf number, fresh weight and dry weight. The severity of disease was measured by using a 0-5 scale: 1= healthy plant; 2= lesions on stems only; 3 up to 25 % of the plant symptomatic (dying, wilted and dead); 4= 26-50 % of the plant symptomatic; 5= 50 % of the plant symptomatic (Shokes *et al.*, 1996). The variables determined were: percent of root colonization of *G. fasciculatum* by using the Grid-line intersects methods (Giovannetti and Mosse, 1980), mycorrhizal dependency (Plenchette *et al.*, 1983), total chlorophyll content (Arnon, 1949), total phenols (Malick and Singh, 1980), protein content (Lowry *et al.*, 1951), polyphenol oxidase (PPO) activity (Mahadevan and Shridhar, 1982), and antioxidant enzyme activity of peroxidase (PER) (Putter, 1974).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y fúngico

Cuatro semillas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) de una variedad local susceptible (var. Phule Pragati-JL 24) se usaron en macetas con suelo estéril. Las macetas se regaron con intervalos regulares, sin añadir compuestos químicos o fertilizantes, en un invernadero del Departamento de Botánica, Universidad de Pune, India. En el invernadero, la humedad relativa fue 30 % a 70 %, las macetas tenían espacio adecuado, las hojas muertas o desechos se eliminaron regularmente y la temperatura promedio diaria fue 28 °C con un fotoperiodo de 12 h.

El hongo MA *G. fasciculatum* (Thaxter Senu Gerd.) se aisló (Gerdeemann y Nicolson, 1963) e identificó (Schenck y Perez, 1987). El inóculo de MA se preparó usando pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) cultivado en un sistema de maceta abierta, con suelo consistente de esporas (Gillmore, 1968) y raíces colonizadas, para el inóculo de MA; se aplicaron 20 g bajo las semillas de cacahuete antes de plantarlas en las macetas.

El patógeno *S. rolfii* se aisló de los campos de Pune, Maharashtra, y se identificó en la División de Micología, ARI, Pune. El cultivo puro de *S. rolfii* se mantuvo en medio papa-dextrosa agar (APD). El inóculo con patógeno se preparó en semillas de sorgo esterilizadas, las cuales fueron inoculadas con el cultivo puro de *S. rolfii* e incubadas por tres semanas. Esto sirvió como inóculo del patógeno y después de 15 d de crecimiento de la planta, se inoculó un grupo de tratamiento con 5 g alrededor de las raíces de plantas de cacahuete. El tratamiento testigo recibió suelo esterilizado en lugar del inóculo con el patógeno.

Observaciones

Las plantas se cosecharon después de 30, 60 y 90 d de plantadas (DDP) y las variables medidas fueron longitud del tallo, longitud de la raíz, número de vainas, número de hojas, peso fresco y peso seco. La gravedad de la enfermedad se midió con una escala 0-5: 1 = planta saludable; 2 = lesiones en tallos solamente; 3 = hasta 25 % de la planta con síntomas (muriendo, marchitada y muerta); 4 = 26-25 % de la planta con síntomas; 5 = 50 % de la planta con síntomas (Shokes *et al.*, 1996). Las variables determinadas fueron: porcentaje de colonización de la raíz de *G. fasciculatum* usando los métodos de intersecciones de línea de cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980), dependencia micorrízica (Plenchette *et al.*, 1983), contenido total de clorofila (Arnon, 1949), fenoles totales (Malick y Singh, 1980), contenido proteínico (Lowry *et al.*, 1951), actividad de polifenol oxidasa (PPO) (Mahadevan y Shridhar, 1982), y actividad de enzima antioxidante de peroxidasa (PER) (Putter, 1974).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized block, with four treatments: 1) Control uninoculated (C); 2) inoculated with pathogen *S. rolfii* (Sr); 3) inoculated with AM fungi *G. fasciculatum* (Gf); 4) inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfii* (Gf+Sr). Data were used to perform a one-way ANOVA and treatments means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). The values are the mean of three replications $\pm$ S.E. (four plants per pot).

RESULTS AND DISCUSSION

Growth variables

The results (Table 1) show that after 60 and 90 d of growth, the morphological variables shoot, root length, fresh, dry weight and pod and leaf number were significantly increased by inoculating the groundnut plants with *G. fasciculatum* (Gf), as compared to non-inoculated control (C). In the presence of *S. rolfii*, the *G. fasciculatum* inoculated groundnut plants (Gf+Sr) showed significant increase in growth variables as compared to non-mycorrhizal diseased (Sr) plants. The marked increase in growth response

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue bloques completamente al azar con cuatro tratamientos: 1) Testigo sin inocular (C); 2) inoculado con patógeno *S. rolfii* (Sr); 3) inoculado con hongo MA *G. fasciculatum* (Gf); 4) inoculado con *G. fasciculatum* y *S. rolfii* (Gf+Sr). Los datos se usaron para realizar un ANDEVA de un sentido y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores son la media de tres réplicas $\pm$ D.E. (cuatro plantas por maceta).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de crecimiento

Los resultados (Cuadro 1) muestran que después de 60 y 90 d de crecimiento, las variables morfológicas de tallo, longitud de la raíz, peso fresco y seco, y número de vainas y hojas, aumentaron significativamente al inocular las plantas de cacahuate con *G. fasciculatum* (Gf), en comparación con el testigo no inoculado (C). En presencia de *S. rolfii*, las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* (Gf+Sr) mostraron un aumento significativo en las variables de crecimiento en comparación con las plantas enfermas sin

Table 1. Growth responses in groundnut plant (var. JL-24) due to *G. fasciculatum* inoculation and *S. rolfii* during 30, 60 and 90 days of planting.

Cuadro 1. Cuadro 1. Respuestas de crecimiento en planta de cacahuate (var. JL-24) como resultado de la inoculación con *G. fasciculatum* y *S. rolfii* durante 30, 60 y 90 días de plantar.

DAP	Treatments	Leaf (no.)	Pod (no.)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
30	Control	52.67 $\pm$ 14.82a	1.00 $\pm$ 0.00a	18.17 $\pm$ 1.43bc	17.33 $\pm$ 1.25b	2.66 $\pm$ 0.49bc	1.07 $\pm$ 0.18b
	C+Sr	46.67 $\pm$ 13.30a	0.00 $\pm$ 0.00b	17.00 $\pm$ 2.16c	11.33 $\pm$ 1.25c	1.22 $\pm$ 0.37c	0.49 $\pm$ 0.04c
	Gf	72.67 $\pm$ 20.42a	1.33 $\pm$ 0.47a	28.33 $\pm$ 1.25a	29.00 $\pm$ 0.82a	4.63 $\pm$ 0.81a	1.76 $\pm$ 0.20a
	Gf+Sr	54.00 $\pm$ 13.95a	1.00 $\pm$ 0.00a	22.67 $\pm$ 1.25b	19.00 $\pm$ 0.82b	3.25 $\pm$ 0.43ab	1.10 $\pm$ 0.15b
60	Control	62.33 $\pm$ 2.05b	1.67 $\pm$ 0.47ab	18.00 $\pm$ 0.82bc	24.67 $\pm$ 1.70b	4.80 $\pm$ 0.10ab	2.21 $\pm$ 0.07b
	C+Sr	52.67 $\pm$ 2.05c	0.33 $\pm$ 0.47b	11.33 $\pm$ 2.62c	13.00 $\pm$ 2.16c	4.36 $\pm$ 0.17b	1.83 $\pm$ 0.22b
	Gf	79.67 $\pm$ 3.68a	2.67 $\pm$ 0.47a	28.33 $\pm$ 4.78a	40.00 $\pm$ 1.63a	7.13 $\pm$ 1.09a	3.88 $\pm$ 0.50a
	Gf+Sr	69.33 $\pm$ 2.49bc	2.67 $\pm$ 0.47a	22.00 $\pm$ 0.82ab	33.67 $\pm$ 2.62a	4.43 $\pm$ 1.10b	4.38 $\pm$ 0.41a
90	Control	64.00 $\pm$ 2.83c	2.33 $\pm$ 0.47b	28.00 $\pm$ 0.82c	27.00 $\pm$ 1.63b	13.10 $\pm$ 1.14c	3.39 $\pm$ 0.22b
	C+Sr	47.67 $\pm$ 1.70c	0.67 $\pm$ 0.47b	15.67 $\pm$ 2.49d	15.33 $\pm$ 5.56c	10.70 $\pm$ 1.48c	1.32 $\pm$ 0.04c
	Gf	333.00 $\pm$ 10.71a	7.00 $\pm$ 0.82a	57.33 $\pm$ 2.05a	48.33 $\pm$ 1.70a	23.25 $\pm$ 1.62a	7.79 $\pm$ 2.27a
	Gf+Sr	263.33 $\pm$ 12.47b	5.00 $\pm$ 0.82a	40.67 $\pm$ 3.30b	41.00 $\pm$ 1.63a	18.22 $\pm$ 1.26b	4.31 $\pm$ 0.20b

Means ($\pm$ SE) with different letter in a column are statistically different ($p \leq 0.05$). The values represent the mean of three replications. C= control uninoculated, C+Sr= control with *S. rolfii*, Gf = inoculated with *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfii*, DAP = days after planting ♦ Medias ($\pm$ SE) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores representan la media de tres réplicas. C= testigo sin inocular, C+Sr= testigo con *S. rolfii*, Gf= inoculadas con *G. fasciculatum*, Gf+Sr= inoculadas con *G. fasciculatum* y *S. rolfii*, DAP= días después de plantar.

of groundnut plants inoculated with *G. fasciculatum* may be explained by its role in improvement of nutritional benefits (Smith and Read, 2008). Also, growth responses by *G. fasciculatum* inoculation in the presence of *S. rolfii* (Gf+Sr) were increased, which would be due to the ability of AM fungi for inducing various defense resistance against pathogen infection (Cameroon *et al.*, 2013), irrespective of nutritional benefits of the AM fungi. That is why the increased growth responses by inoculation with *G. fasciculatum* signify their role in growth promotion in groundnut plants.

Disease severity

The symptoms of disease severity were reduced by 50.00 % in groundnut plants (Gf+Sr) treated with *G. fasciculatum*, as compared to non-mycorrhizal control ones (80.56 % in C+Sr) after 90 d of plantation. The severity of disease showed continuous reduction due to mycorrhizal inoculation in groundnut plants, as compared to non-inoculated diseased control (Figura 1). The mechanism of AM fungi in reducing severity of disease might be due to competition for resources or spaces with the pathogens (Maherali and Klironomos, 2007). The AM fungi establish themselves in the roots of host

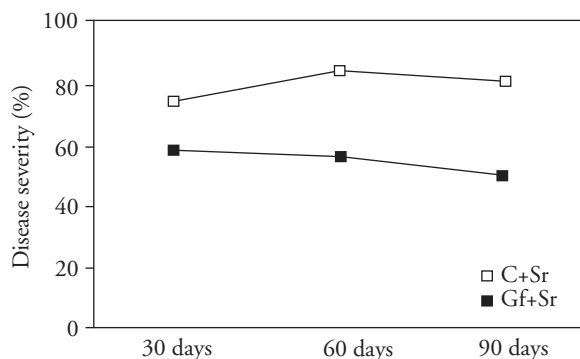


Figure 1. Disease severity (%) in groundnut plant (var. JL-24) after 30, 60 and 90 days of planting. The values are the mean of three replications. C+Sr = control with *S. rolfii*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfii*.

Figura 1. Severidad de la enfermedad (%) en plantas de cacahuate (var. JL-24) después de 30, 60 y 90 días de plantar. Los valores son la media de tres réplicas. C+Sr = testigo con *S. rolfii*, Gf+Sr = inoculada con *G. fasciculatum* y *S. rolfii*.

micorrizas (Sr). El aumento marcado en la respuesta de crecimiento de las plantas de cacahuate inoculadas con *G. fasciculatum* puede explicarse por su función en la mejoría de los beneficios nutrimentales (Smith y Read, 2008). Además, la respuesta en crecimiento por inoculación de *G. fasciculatum* en presencia de *S. rolfii* (Gf+Sr) aumentó, lo cual se debe a la habilidad del hongo MA para inducir diversas resistencias de defensa contra la infección por el patógeno (Cameroon *et al.*, 2013), sin importar los beneficios nutrimentales del hongo MA. Por esto, las respuestas mayores de crecimiento por inoculación con *G. fasciculatum* indican su función en la promoción del crecimiento en plantas de cacahuate.

Severidad de la enfermedad

Los síntomas de la severidad de la enfermedad se redujeron 50.00 % en plantas de cacahuate (Gr+Sr) tratadas con *G. fasciculatum*, en comparación con el testigo sin micorriza (80.56 % en C+Sr), después de 90 d de plantarse. La severidad de la enfermedad mostró una reducción continua debido a la inoculación micorrízica en plantas de cacahuate, comparada con el testigo no inoculado con enfermedad (Figura 1). El mecanismo del hongo MA para reducir la severidad de la enfermedad puede deberse a la competencia por recursos o espacios con los patógenos (Maherali y Klironomos, 2007). El hongo MA se establece en las raíces de las plantas huésped y el aumento en el largo de la raíz de las plantas de cacahuate tratadas con micorrizas puede también estar correlacionado con la reducción de la severidad de la enfermedad.

Porcentaje de colonización de la raíz

La inoculación con *G. fasciculatum* resultó en la formación de estructuras típicas micorrízicas como arbuscúlos y vesículas, lo cual fue su establecimiento. Por ende, el porcentaje de colonización de la raíz fue el más alto, en $90.00 \pm 3.27a$ %, únicamente en plantas de cacahuate tratadas con *G. fasciculatum* (Gf) en comparación con $52.67 \pm 9.53b$ % en presencia del patógeno (Gf+Sr) después de 90 d de plantarse (Figura 2). Los resultados mostraron que el patógeno *S. rolfii* redujo significativamente la colonización de la raíz a $41.00 \pm 4.32b$ % (Gf+Sr) después de 30 d comparada con $58.33 \pm 2.36a$ % en el tratamiento Gf. Esta reducción puede deberse al mecanismo de com-

plants and the increase in root length of mycorrhiza treated groundnut plants may also be correlated with reduction of disease severity.

Percent root colonization

The *G. fasciculatum* inoculation resulted into formation of typical mycorrhizal structures such as arbuscules and vesicles, which was their establishment. Thus, the percent root colonization was highest by $90.00 \pm 3.27a$ % only in *G. fasciculatum* treated groundnut plants (Gf) as compared to $52.67 \pm 9.53b$ % in presence of pathogen (Gf+Sr) after 90 d of planting (Figure 2). The results showed that the pathogen *S. rolfii* significantly reduced root colonization to $41.00 \pm 4.32b$ % (Gf+Sr) after 30 d as compared to $58.33 \pm 2.36a$ % in Gf treatment. This reduction may be due to the mechanism of competition among *G. fasciculatum* and *S. rolfii* in groundnut plants.

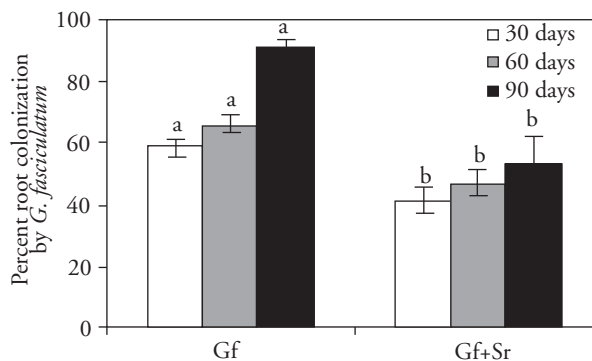


Figure 2. Root colonization (%) by *G. fasciculatum* in groundnut plants (var. JL-24) after 30, 60 and 90 days of planting in presence or absence of *S. rolfii*. Means ($\pm$ SE) with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). The values represent the mean of three replications $\pm$ SE. Gf = inoculated with *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfii*.

Figura 2. Colonización de la raíz (%) por *G. fasciculatum* en plantas de cacahuate (var. JL-24) después de 30, 60 y 90 días de plantarse en presencia o ausencia de *S. rolfii*. Medias ($\pm$ SE) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores representan la media de tres réplicas $\pm$ SE. Gf= inoculadas con *G. fasciculatum*, Gf+Sr= inoculadas con *G. fasciculatum* y *S. rolfii*.

petencia entre *G. fasciculatum* y *S. rolfii* en plantas de cacahuate.

Dependencia micorrízica

El intervalo de dependencia micorrízica fue mayor en $54.40 \pm 5.69a$ después de 30 d, $58.34 \pm 1.83a$ después de 60 d y $69.29 \pm 0.94a$ después de 90 d para plantas de cacahuate inoculadas con *G. fasciculatum* en presencia de patógeno (Gf+Sr), comparado con plantas micorrízicas saludables ($38.42 \pm 13.71ab$ después de 30 d, $42.14 \pm 6.52b$ después de 60 d y $56.17 \pm 2.75b$). Sin embargo, en ausencia del patógeno, la dependencia micorrízica mostró un intervalo menor, de 38.42 - 56.17 % (Figura 3). Los resultados mostraron la importancia de *G. fasciculatum* durante el estrés biótico causado por *S. rolfii*. El resultado en términos de la dependencia de la planta de cacahuate en las asociaciones micorrízicas para la protección contra el patógeno puede estar correlacionado con el establecimiento de su competidor en las raíces de la planta (Harrier y Watson, 2004). Además, la aplicación del hongo MA disminuyó la severidad de la enfermedad (Figura 1).

Clorofila total

La clorofila absorbe y usa la energía luminosa durante la fotosíntesis, y la habilidad fotosintética de las plantas se regula (Taiz y Zeiger, 2002). En nuestro experimento, hubo más clorofila total en las plantas de cacahuate saludables con micorriza (Gf) en comparación con las enfermas sin micorriza (C+Sr) o las de control, después de 30, 60 o 90 d de plantarse (Figura 4). El contenido de clorofila fue el menor en plantas de cacahuate enfermas sin micorriza (C+Sr), pero el tratamiento con *G. fasciculatum* (Gf+Sr) aumentó el contenido de clorofila a pesar de la presencia del patógeno. Los resultados pueden también estar relacionados con el número mayor de hojas con tratamiento micorrízico, que pueden influir en la tasa de fotosíntesis.

Variables bioquímicas

El contenido de proteína fue mayor en las plantas de cacahuate enfermas con micorrizas (Gf+Sr) y las plantas de cacahuate saludables con micorriza (Gf) mostraron más proteína que el testigo sin micorriza

Mycorrhizal dependency

The range of mycorrhizal dependency was higher by $54.40 \pm 5.69a$ after 30 d, $58.34 \pm 1.83a$ after 60 d and $69.29 \pm 0.94a$ after 90 d for *G. fasciculatum* inoculated groundnut plants in presence of pathogen (Gf+Sr), compared to healthy mycorrhizal plants ($38.42 \pm 13.71ab$ after 30 d, $42.14 \pm 6.52b$ after 60 d and $56.17 \pm 2.75b$). But, in the absence of pathogen the mycorrhizal dependency showed lower range of 38.42 - 56.17 % (Figure 3). The results showed the significance of *G. fasciculatum* during biotic stress caused by *S. rolfii*. The result in terms of the dependence of groundnut plant on mycorrhizal associations for protection against pathogen may be correlated to their competitor establishment in plant roots (Harrier and Watson, 2004). Besides, the application AM fungi decreased disease severity (Figure 1).

Total chlorophyll

Chlorophyll absorbs and utilizes light energy during photosynthesis and the photosynthetic ability of plants are regulated (Taiz and Zeiger, 2002). In our experiment there was more total chlorophyll in mycorrhizal healthy groundnut plants (Gf) as compared to non-mycorrhizal diseased (C+Sr) or control after 30, 60 or 90 d of planting (Figure 4). The chlorophyll content was lowest in non-mycorrhizal diseased groundnut plants (C+Sr) but treatment with *G. fasciculatum* (Gf+Sr) increased the chlorophyll content in spite of pathogen's presence. The results may also be related with the increased number of leaves by mycorrhizal treatment, which may influence the rate of photosynthesis.

Biochemical variables

The protein content was highest in mycorrhizal diseased groundnut plants (Gf+Sr) and the healthy mycorrhizal groundnut plants (Gf) showed more protein than non-mycorrhizal control (C) (Table 2). The presence of pathogenesis-related (PR) proteins in plant tissues is associated as a mechanism of host plants for inhibiting pathogens (Wasternack *et al.*, 2006). Hence, the increased protein content in our study may be due to pathogen invasion and the colonization by *G. fasciculatum* may have assisted in this defense in the groundnut plants.

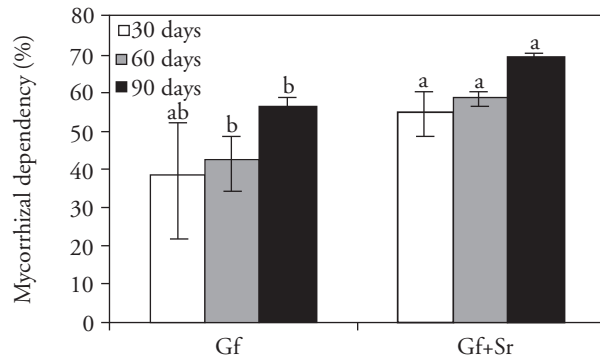


Figure 3. Mycorrhizal dependency in groundnut plant (JL-24) 30, 60 and 90 days after planting. Means ($\pm$ SE) with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). The values represent the mean ($\pm$ SE) of three replications. Gf = inoculated with *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfii*.

Figura 3. Dependencia micorrízica en plantas de cacahuete (JL-24) 30, 60 y 90 días después de plantar. Medias ($\pm$ SE) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores representan la media ($\pm$ SE) de tres réplicas. Gf = inoculadas con *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculadas con *G. fasciculatum* y *S. rolfii*.

(C) (Cuadro 2). La presencia de proteínas relacionadas con patogénesis (RP) en tejidos vegetales está asociada como un mecanismo de las plantas huésped para inhibir los patógenos (Wasternack *et al.*, 2006). Por lo tanto, el contenido mayor de proteína en nuestro estudio puede deberse a la invasión por patógenos y la colonización por *G. fasciculatum* puede haber ayudado en esta defensa en las plantas de cacahuete.

Este estudio muestra (Cuadro 2) distintos niveles de contenido de fenoles totales debido a las inoculaciones con *S. rolfii* y *G. fasciculatum*. Los fenoles totales fueron más altas en las plantas de cacahuete enfermas con micorriza (Gf+Sr), seguidas de las de inoculación única con *G. fasciculatum* (Gf) y *S. rolfii* (C+Sr). Aquí, el nivel mayor de fenoles en plantas micorrízicas indica la función del hongo MA en el refuerzo de la pared celular como respuesta de defensa contra la infección por *S. rolfii*. Además, las asociaciones micorrízicas inducen los ácidos fenólicos ligados a la pared celular para regular el mecanismo de defensa de la planta (López-Ráez *et al.*, 2010).

El PPO mostró actividad mayor en plantas de cacahuete enfermas sin micorrizas (C+Sr) que en plantas saludables con micorriza (Gf) (Cuadro 2). Las

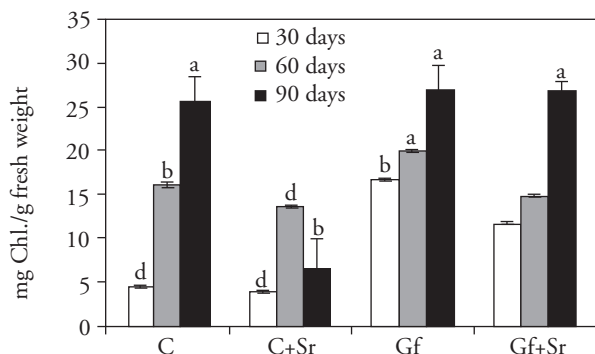


Figure 4. Total chlorophyll content in groundnut plant (JL-24) 30, 60 and 90 days after planting. Means ($\pm$ SE) with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). The values represent the mean of three replications. C= control uninoculated, C+Sr = control with *S. rolfsii*, Gf = inoculated with *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfsii*.

Figura 4. Contenido total de clorofila en planta de cacahuate (JL-24) 30, 60 y 90 días después plantar. Medias ($\pm$ SE) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores representan la media de tres réplicas $\pm$ SE. C = control sin inocular, C+Sr = testigo con *S. rolfsii*, Gf = inoculadas con *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculadas con *G. fasciculatum* y *S. rolfsii*.

This study shows (Table 2) different levels of total phenol content due to *S. rolfsii* and *G. fasciculatum* inoculations. The total phenols were highest in diseased mycorrhizal groundnut plants (Gf+Sr) followed by single inoculation of *G. fasciculatum* (Gf) and *S. rolfsii* (C+Sr). Here, the higher level of phenolics in mycorrhizal plants indicates the role of AM fungi in cell wall reinforcement as defense response against *S. rolfsii* infection. Moreover, the mycorrhizal associations induce cell wall bound phenolic acids for regulation of plant defense mechanism (López-Ráez *et al.*, 2010).

The PPO showed higher activities in diseased non-mycorrhizal groundnut plants (C+Sr) than healthy mycorrhizal plants (Gf) (Table 2). The PPO activities were highest in mycorrhizal diseased plants (Gf+Sr). The reason for higher PPO activity is their involvement in oxidation of phenolic compounds into more toxic compounds, which creates adverse effects on the development of pathogens (Mohamed *et al.*, 2012). Moreover, the PPO activities were

actividades de PPO fueron las más altas en plantas enfermas con micorriza (Gf+Sr). El motivo de una mayor actividad PPO es su participación en la oxidación de compuestos fenólicos en compuestos más tóxicos, lo cual crea efectos adversos en el desarrollo de los patógenos (Mohamed *et al.*, 2012). Además, se observaron actividades PPO en asociaciones micorrízicas para la inhibición del patógeno (Jaiti *et al.*, 2008).

Actividades de enzima antioxidante

La enzima antioxidante (PER) en hojas de plantas de cacahuate fue mayor en las plantas de cacahuate enfermas sin micorriza (C+Sr) en comparación con las saludables con micorriza (Gf) o testigo (C) (Cuadro 2). La enzima PER fue mayor en las plantas de cacahuate enfermas con micorriza (Gf+Sr) en comparación con las enfermas sin micorriza o saludables con micorriza, o testigo. La alta actividad de PER indica que pudo ocurrir una explosión oxidativa debido al ataque del patógeno *S. rolfsii* en plantas de cacahuate. Como resultado, las especies de oxígeno reactivo (EOR) deberían ser un mecanismo de defensa, pero una acumulación excesiva de EOR puede dañar el ADN, las proteínas o los lípidos (Mendoza, 2011). Por lo tanto, hubo un aumento en enzima PER en plantas de cacahuate, la cual protege del daño por EOR.

CONCLUSIONES

El hongo MA (*G. fasciculatum*) redujo significativamente la enfermedad causada por el patógeno que se encuentra en el suelo (*S. rolfsii*) en el cultivar de cacahuate JL-24. Además, la respuesta mayor de crecimiento, actividades fisiológica, bioquímica y antioxidativa de las enzimas de clorofila, proteína, fenol total, PPO y enzima PER debida a la inoculación con hongo MA contra el patógeno *S. rolfsii*, muestra su función benéfica al aumentar el crecimiento de la planta, así como facilitar la posible inducción de actividades relacionadas con la defensa. Así, este experimento señala la importancia de la inoculación micorrízica en el biocontrol del patógeno que se encuentra en el suelo, de manera ecológica.

—Fin de la versión en Español—



Table 2. Biochemical and antioxidant enzyme activities in groundnut plant (JL-24) due to *G. fasciculatum* inoculation and *S. rolfsii* 30, 60 and 90 days after planting.

Cuadro 2. Actividades enzimáticas bioquímicas y antioxidantes en plantas de cacahuete (JL-24) como resultado de la inoculación con *G. fasciculatum* y *S. rolfsii* 30, 60 y 90 días después de plantación.

DAP	Treatments	Protein	Total phenols	PPO	PER
		(μ^{-1} g $^{-1}$ fresh weight)	(mg g $^{-1}$ fresh weight)	(min $^{-1}$ g $^{-1}$ fresh weight)	(min $^{-1}$ mg $^{-1}$ protein)
30	Control	0.047 $\pm$ 0.006b	0.146 $\pm$ 0.014c	0.083 $\pm$ 0.052c	0.0011 $\pm$ 0.0005c
	Sr	0.180 $\pm$ 0.016a	0.248 $\pm$ 0.016b	0.325 $\pm$ 0.025a	0.0028 $\pm$ 0.0005ab
	Gf	0.162 $\pm$ 0.006a	0.363 $\pm$ 0.012a	0.183 $\pm$ 0.038b	0.0023 $\pm$ 0.0005bc
	Gf+Sr	0.188 $\pm$ 0.012a	0.399 $\pm$ 0.013a	0.350 $\pm$ 0.025a	0.0041 $\pm$ 0.0003a
60	Control	0.161 $\pm$ 0.007c	0.212 $\pm$ 0.012c	0.125 $\pm$ 0.066b	0.0011 $\pm$ 0.0003c
	Sr	0.228 $\pm$ 0.017b	0.249 $\pm$ 0.025c	0.333 $\pm$ 0.063a	0.0043 $\pm$ 0.0007ab
	Gf	0.215 $\pm$ 0.022b	0.416 $\pm$ 0.001b	0.317 $\pm$ 0.029a	0.0041 $\pm$ 0.0007b
	Gf+Sr	0.273 $\pm$ 0.015a	0.466 $\pm$ 0.002a	0.425 $\pm$ 0.050a	0.0062 $\pm$ 0.0005a
90	Control	0.211 $\pm$ 0.006c	0.217 $\pm$ 0.015c	0.133 $\pm$ 0.014c	0.0015 $\pm$ 0.0003c
	Sr	0.267 $\pm$ 0.010b	0.418 $\pm$ 0.022b	0.392 $\pm$ 0.038ab	0.0043 $\pm$ 0.0007b
	Gf	0.257 $\pm$ 0.012b	0.639 $\pm$ 0.023a	0.325 $\pm$ 0.050b	0.0041 $\pm$ 0.0007b
	Gf+Sr	0.399 $\pm$ 0.015a	0.666 $\pm$ 0.047a	0.475 $\pm$ 0.075a	0.0062 $\pm$ 0.0005a

Means ($\pm$ SE) with different letter in a column are statistically different ($p \leq 0.05$). The values represent the mean of three replications. C= control uninoculated, C+Sr = control with *S. rolfsii*, Gf = inoculated with *G. fasciculatum*, Gf+Sr = inoculated with *G. fasciculatum* and *S. rolfsii*, DAP = days after planting ♦ Medias ($\pm$ SE) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores representan la media de tres réplicas. C= control sin inocular, C+Sr= control con *S. rolfsii*, Gf= inoculadas con *G. fasciculatum*, Gf+Sr= inoculadas con *G. fasciculatum* y *S. rolfsii*, DAP= días después de plantar.

observed in mycorrhizal associations for the inhibition of pathogen (Jaiti *et al.*, 2008).

Antioxidant enzyme activities

The antioxidant enzyme (PER) in leaves of groundnut plants was higher in diseased non-mycorrhizal groundnut plants (C+Sr) when compared to healthy mycorrhizal (Gf) or control (C) (Table 2). The PER enzyme was highest in diseased mycorrhizal groundnut plants (Gf+Sr) as compared with non-mycorrhizal diseased or healthy mycorrhizal or control ones. The elevated PER activity indicates that oxidative burst may have occurred due to the attack of pathogen *S. rolfsii* in groundnut plants. As a result, reactive oxygen species (ROS) should be a defense mechanism, but excessive ROS accumulation may damage DNA, proteins or lipids (Mendoza, 2011). Therefore, the increase in PER enzyme was observed in groundnut plant, which protects from ROS damage.

CONCLUSIONS

The AM fungi (*G. fasciculatum*) significantly reduced disease caused by the soil-borne pathogen (*S. rolfsii*) in the groundnut cultivar (JL-24). Moreover, the increased growth responses, physiological, biochemical and anti-oxidative enzyme activities of chlorophyll, protein, total phenol, PPO and PER enzyme due to inoculation with AM fungi against pathogen *S. rolfsii* refers their beneficial role played in increasing the growth of plant as well as in bringing about possible induction of defense related activities. Thus, this experiment suggests the significance of mycorrhizal inoculation in bio-control of soil-borne pathogen in eco-friendly way.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by University Grants Commission, New Delhi, India, Rajiv Gandhi National Fellowship (No. F. 14-2(SC)/2009(SA-III).

LITERATURE CITED

- Arnon, D. J. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *J. Plant Cell Physiol.* 4: 29–30.
- Birthal, P. S., Parthasarathy, P. Rao, S. N. Nigam, M. C. S. Bantilan, and S. Bhagavatula. 2010. Groundnut and soybean economies in Asia. *In: Groundnut, Facts, Trends and Outlook.* Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp: 5–7.
- Cameroon, D. D., A. L. Neal, S. C. M. van Wees, and J. Ton. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.* 18: 539–545.
- Demir, S., and Akkopru. 2007. Using of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for biocontrol of soil borne fungal plant pathogens. *In: Chincholkar, S. B., and K. G. Mukerji, (ed). Biological Control of Plant Diseases.* Haworth Press, USA. pp: 17–37.
- Gerdemann, J. W., and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235–244.
- Gilmore, A. E. 1968. Phycomycetous mycorrhizal organisms collected by open pot cultures. *Hilgardia.* 39: 87–105.
- Giovannetti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *N. Phytol.* 84: 489–500.
- Harrier, L. A., and C. A. Watson. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manage. Sci.* 60: 149–157.
- Jaiti, F., A. Meddich, and I. El-Hadrami. 2008. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. *Physiol. Mole. Plant Pathol.* 71: 166–173.
- López-Ráez, J. A., V. Flors, J. M. García, and M. J. Pozo. 2010. AM symbiosis alters phenolic acid content in tomato. *Plant Signal. Behav.* 5: 1–3.
- Lowry, O. H., N. K. Rosenbrough, A. L. Far, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Mahadevan, A., and R. Shridhar. 1982. *Methods in Physiological Plant Pathology*, Second edition; Sivakami Publication, Madras. pp: 153–155.
- Maherali, H., and J. N. Klironomos. 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746–1748.
- Malick, C. P., and M. B. Singh. 1980. *Plant Enzymology and Histo-enzymology*. Kalyani Publishers, New Delhi. 286 p.
- Mendoza, M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotechnol. Vegetal* 11: 67–75.
- Mohamed, H., A. A. El-Hady, M. Mansour, El-Rheem, and A. El-Sawawy. 2012. Association of oxidative stress components with resistance to flax powdery mildew. *Trop. Plant Pathol.* 37: 386–392.
- Narain, A., and A. K. Kar. 1990. Wilt of groundnut caused by *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp. and *Aspergillus niger*. *Crop Res.* 3: 257–262.
- Naseby, D. C., J. A. Pascual, and J. M. Lynch. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol.* 88: 161–169.
- Plenchette, C., J. A. Fortin, and V. Furlan. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199–209.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 97–127.
- Putter, J. 1974. Peroxidase. *In: Bergmeyer, H. U. (ed). Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press, New York, USA. pp: 567–1124.
- Rooney, D. C., K. Killham, G. D. Bending, E. Baggs, M. Weih, and A. Hodge. 2009. Mycorrhizas and biomass crops: opportunities for future sustainable development. *Trends Plant Sci.* 14: 542–549.
- Roy, B. C., and R. L. Shiyani. 2000. Rainfed groundnut in India: Prioritizing production constraints and implication for future research. *Bangladesh J. Agric. Econ.* 33: 19–34.
- Schenck, N. C., and Y. Perez. 1987. *A manual for identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.* Gainesville, Florida. Synergistic Publications. pp: 1–245.
- Shokes, F. M., K. Rozaiski, D. W. Gorbet, T. B. Brenneman, and D. A. Berger. 1996. Techniques for inoculation of peanut with *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field. *Peanut Sci.* 23: 124–128.
- Smith, S. E., and D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press, Cambridge, UK. 800 p.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*, Third Edition. Sinauer, Sunderland. 690 p.
- Wasternack, C., I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J. Neumerkel, I. Feussner, and O. Miersch. 2006. The wound response in tomato–Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* 163: 297–306.
- Wu, F., W. Wang, Y. Ma, Y. Liu, X. Ma, L. An, and H. Feng. 2013. Prospect of beneficial microorganisms applied in potato cultivation for sustainable agriculture. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 2150–2158.
- Wyne, J. C., and M. K. Beute. 1991. Breeding for disease resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 279–303.