

Respuesta de plántulas de *Cedrela odorata* a la inoculación con *Rhizophagus intraradices* y diferentes niveles de defoliación*

Response of *Cedrela odorata* seedlings to inoculation with *Rhizophagus intraradices* and different defoliation levels

Iván Oros-Ortega^{1,2}, Alejandro Alonso-López¹, Jesús Pérez-Moreno³, Jorge C. López-Collado¹, Luis A. Lara-Pérez⁴, Sandra E. Martínez-Garza¹, Laura Y. Solís-Ramos⁵ y Antonio Andrade-Torres^{4§}

¹Colegio de Postgraduados-Campus Veracruz. Carretera Federal Veracruz-Xalapa, km 26.5 Predio Tepatates, Mpio. Manlio Fabio Altamirano, C. P. 91700, Veracruz, México. ²Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora. Gutiérrez Zamora, Prol. Dr. Miguel Patiño s/n. Colonia Centro, Gutiérrez Zamora, Veracruz, México. ³Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, km 36.5, C. P. 56230, Montecillo, Estado de México, México. ⁴INBIOTECA-Universidad Veracruzana, A. P. 250, C. P. 91000, Xalapa, Veracruz, México. CA-UVER-173 Ecología y Manejo de la Biodiversidad. ⁵Escuela de Biología-Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. [§]Autor para correspondencia: aandrادت@gmail.com.

Resumen

Respuesta de plántulas de *Cedrela odorata* a la inoculación con *Rhizophagus intraradices* y diferentes niveles de defoliación; el efecto de seis tratamientos (T) sobre la tasa de crecimiento en altura (TCA), diámetro (TCD), tasa de crecimiento relativo (TCR) y peso fresco y seco de plántulas de *C. odorata* se evaluaron en un vivero. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 x 3); TS consistió en una combinación de los factores: porcentaje de defoliación (0, 50 y 90) y la inoculación de *R. intraradices* (con y sin inoculación). Después de seis meses, las plántulas de TS con la inoculación, independientemente del porcentaje de defoliación aplicada, mostraron más TCD ($F= 100.45$, $p < 0,001$) que TS sin inoculación. Las TS inoculadas, con diferentes niveles de defoliación, mostró el mayor TCA ($F= 556.57$ $p < 0,001$) después de tres meses. Sin embargo los últimos tres meses la interacción de la inoculación/defoliación (50 y 90 %) indujo el mayor valor de TCA ($F= 4.22$ $p < 0.01$), y un crecimiento significativo en el peso fresco y seco de tallos, hojas y raíces. La inoculación produce altos niveles de micorrización en las raíces de *C. odorata* en el sexto mes. La defoliación al 90% reduce significativamente la colonización de hifas y vesículas. Durante los tres primeros

Abstract

Response of *Cedrela odorata* seedlings to inoculation with *Rhizophagus intraradices* and different defoliation levels; the effect of six treatments (T) on growth rate in height (TCA), diameter (TCD), relative growth rate (TCR) and fresh and dry weight of *C. odorata* seedlings were evaluated in a nursery. A completely randomized design with a factorial arrangement (2 x 3) was applied; the TS consisted of a combination of the factors: percentage of defoliation (0, 50 and 90) and inoculation of *R. intraradices* (with and without inoculation). After six months, the seedlings in TSS with inoculation, regardless of the percentage of defoliation applied, showed more TCD ($F= 100.45$, $p < 0.001$) than TSS without inoculation. The inoculated TSS, with different levels of defoliation, showed the highest TCA ($F= 556.57$ $p < 0.001$) after three months. However the last three months inoculation/defoliation interaction (50 and 90%) induced the highest value of TCA ($F= 4.22$ $p < 0.01$), and a significant growth in fresh and dry weight of stems, leaves and roots. Inoculation produces high levels of mycorrhizal colonization in roots of *C. odorata* at the sixth month. Defoliation at 90% significantly reduces hyphae and vesicle colonization. During the first three months, inoculated TSS

* Recibido: octubre de 2014
Aceptado: febrero de 2015

meses, las TS inoculadas mostraron el valor más alto de TCR, sin embargo, en los últimos tres meses los tratamientos sin inoculación y defoliación al 90% presentaron la mayor TCR. La interacción Inoculación / defoliación tiene efectos en el desarrollo de *C. odorata*, por lo que es conveniente considerar este tratamiento para la producción de plántulas en vivero.

Palabras clave: cedro español, micorrizas arbusculares, tasa de crecimiento relativo.

La especie *Cedrela odorata* (cedro amargo -Costa Rica-; cedro rojo -México-, Patiño, 1997; González *et al.*, 2013), es una especie maderable que se puede encontrar desde el norte de México, hasta el norte de Argentina, ya que tolera un rango variable de condiciones climáticas pero es más común en zonas con una época seca bien marcada y altitudes que van desde el nivel del mar hasta 1 200 m (Navarro *et al.*, 2005; Patiño, 1997; Navarro *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2007). Es un árbol caducifolio de hasta 45 m de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 2 m, en general su tamaño varía según las condiciones ambientales en las que se encuentre (Patiño, 1997; Hernández, 2008). Esta especie está sujeta a protección especial en México (NOM-059-SEMARNAT-2010); sin embargo, su madera es considerada el segundo producto más valioso obtenido de bosques tropicales, lo que la hace una especie de gran interés económico, con alta demanda internacional y por lo tanto puede contribuir localmente al desarrollo económico y social en México, Costa Rica y otros países de Centro América (Patiño, 1997; Ramírez *et al.*, 2012).

No obstante la rápida expansión del cultivo de cedro en el trópico, aun no existe un sistema de manejo adecuado para las plántulas, así como para otros puntos importantes en su desarrollo, lo cual influyen en la productividad de las plantaciones establecidas. Las investigaciones sobre *C. odorata* se han enfocado en el estudio de su diversidad genética, su filogenia y propagación *in vitro* (Pérez *et al.*, 2002, García-González *et al.*, 2011). Pero muy pocas han tenido como objetivo el estudio de las relaciones simbióticas que establece con microorganismos del suelo, por lo tanto, es poco lo que se sabe sobre sus efectos en el desarrollo del cedro, sea en condiciones naturales o en plantaciones.

Tampoco se ha estudiado si la simbiosis puede ayudar en la respuesta o resistencia de esta especie al ataque de insectos como el barrenador de las meliáceas (Shi *et al.*, 2006; Murata *et al.*, 2013). En la mayoría de las plantaciones se utiliza planta producida en vivero, pero con baja calidad, susceptible a enfermedades y plagas. La micorriza arbuscular

showed the highest value of TCR, however in the last three months the treatments without inoculation and defoliation at 90% showed the highest TCR. Inoculation/defoliation interaction has effects in the development of *C. odorata*, so it is convenient to consider this treatment for seedlings production in nursery.

Keywords: arbuscular mycorrhizal, relative growth rate, Spanish cedar.

Cedrela odorata (bitter cedar- Costa Rica; red cedar-Mexico-, Patiño., 1997; González *et al.*, 2013), is a timber species that can be found from northern Mexico to northern Argentina, since it tolerates a varying range of climatic conditions, but is most common in areas with really dry seasons and altitudes ranging from sea level to 1,200 m (Navarro *et al.*, 2005; Patiño, 1997; Navarro *et al.* 2005; Gomez *et al.*, 2007). It is a deciduous tree of up to 45 m high with a diameter at breast height of up to 2 m, overall size varies depending on environmental conditions in which they are in (Patiño, 1997; Hernández, 2008). This species is subject to special protection in Mexico (NOM-059-SEMARNAT-2010); however, its wood is considered the second most valuable product obtained from tropical forests, making it of great economic interest, with high international demand and therefore may contribute locally to economic and social development in Mexico, Costa Rica and other countries of Central America (Patiño, 1997; Ramírez *et al.*, 2012).

However, the rapid expansion of cedar in the tropics, there is not yet a proper management system for seedlings, as well as other important points in its development, which affects the productivity of established plantations. Research on *C. odorata* has focused on the study of genetic diversity, phylogeny and *in vitro* propagation (Pérez *et al.*, 2002, García-González *et al.*, 2011). But very few have focused on the study of symbiotic relationships established with soil microorganisms, therefore, little is known about its effects on the development of cedar, either in natural conditions or in plantations.

Neither has been studied, whether symbiosis can help in the response or resistance of this species to insect attacks like the borer from Meliaceae (Shi *et al.*, 2006; Murata *et al.*, 2013). Most plantations use plants produced in nurseries, but with low quality, susceptible to diseases and pests. The arbuscular mycorrhizal (MA) helps in a better development and growth of tropical plants during early stages (Alvarado

(MA) influye en un mejor desarrollo y crecimiento de las plantas tropicales durante los primeros meses de desarrollo (Alvarado *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2006). Algunas especies del género *Cedrela* son potencialmente formadoras de micorriza con los géneros *Glomus* y *Acualospora*, (Lovelock y Ewel, 2005; Souza *et al.*, 2006).

Recientemente, Méndez-Cortés *et al.* (2013), obtuvieron alta colonización micorrízica al inocular plántulas de *C. odorata* con esporas nativas procedentes de selva alta perennifolia y selva mediana subperennifolia. No obstante, en la producción de plantas con fines productivos se ha ignorado la inoculación micorrízica. Por lo tanto es importante generar información del proceso de desarrollo de las plántulas bajo condiciones de invernadero así como realizar estudios sobre las interacciones simbióticas. Los resultados de estos estudios pueden contribuir a mejorar la productividad de las plantaciones.

Aunado a esto, por la naturaleza caducifolia de *C. odorata* la defoliación es otro factor que influye en el crecimiento de dicha especie (Rodgers, 1995; Gerhardt, 1998). Los carbohidratos producidos en una planta, a través del tiempo, se traslocan en diferentes proporciones a la parte aérea y radical, además si la planta es podada se balancea tal repartición entre los diferentes órganos (Poorter y Nagel, 2000). Cuando existe buena disponibilidad de agua y la parte aérea de plantas de *C. odorata* se daña o una porción se defolia, el almidón almacenado en la raíz se asigna al rebrote de hojas para reajustar la relación existente entre parte aérea/raíz (Rodgers *et al.*, 1995; Poorter y Hayashida-Oliver, 2000); también es probable que en campo las reservas de almidón sean importantes durante la estación seca y el inicio del crecimiento vegetativo y reproductivo después que caen las hojas (Rodgers *et al.*, 1995) y que la defoliación disminuya la presencia y el porcentaje de colonización micorrízica (Saito *et al.*, 2004).

Sin embargo, el efecto de la interacción de la inoculación micorrízica y la defoliación pueden contribuir a obtener plantas con mejor calidad en vivero y alta supervivencia al transplantar a campo. El presente estudio evalúa el efecto de dichos factores en el desarrollo y tasas de crecimiento de plántulas de *C. odorata* en fase de vivero.

El experimento se desarrolló en vivero en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Veracruz (19° 16' latitud norte y 96° 16' longitud oeste), a una altitud de 20 m. El clima es cálido subhúmedo, con una temperatura media de 26.5 °C y 1 230 mm de precipitación. Las lluvias se distribuyen entre los meses de mayo a octubre (García,

et al., 2004; Souza *et al.*, 2006). Some species of the *Cedrela* genus are potentially formers of mycorrhizae with *Glomus* and *Acualospora* genera (Lovelock and Ewel, 2005; Souza *et al.*, 2006).

Recently, Méndez-Cortés *et al.* (2013) obtained high mycorrhizal colonization by inoculating seedlings of *C. odorata* with native spores from evergreen forest and evergreen tropical forest. However, in the production of plants with productive purposes, mycorrhizal inoculation has been ignored. Therefore it is important to generate information on the development process of seedlings, under greenhouse conditions, as well as studies on symbiotic interactions. The results of these studies can contribute to improve the productivity of plantations.

Added to this, the deciduous nature of *C. odorata*, defoliation is another factor that has an effect on growth (Rodgers, 1995; Gerhardt, 1998). Carbohydrates produced in a plant, over time, are translocated in different proportions to shoots and roots, also if the plant is pruned such distribution is balanced between the different organs (Poorter and Nagel, 2000). When there is good availability of water and the aerial parts of *C. odorata* is damaged or a portion is defoliated, the starch stored in the root is assigned to the regrowth of leaves to reset the relationship between aerial part / root (Rodgers *et al.*, 1995; Poorter and Hayashida-Oliver, 2000); is also likely that on field conditions starch reserves are important during dry season and beginning of vegetative and reproductive growth after leaves fall (Rodgers *et al.*, 1995) and that defoliation decreases the presence and percentage of mycorrhizal colonization (Saito *et al.*, 2004).

However, the effect of mycorrhizal inoculation and defoliation interaction can contribute to obtain plants with better quality in nursery and high survival when transplanted on field. This study evaluates the effect of these factors on development and growth rates of *C. odorata* seedlings in nursery.

The experiment was conducted at the nursery from the Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Veracruz (19° 16' north latitude and 96° 16' west longitude), at an altitude of 20 m. The climate is warm humid, with an average temperature of 26.5 °C and 1 230 mm of precipitation. The rains are distributed between the months of May to October (García, 1988). Seeds of different trees from *C. odorata* in sterilized soil (4 hours at 125 °C and 1.5

1988). Se germinaron semillas de diferentes árboles de *C. odorata* en suelo esterilizado (4 h a 125 °C y 1.5 kg cm⁻² en autoclave). Las plántulas de ochenta días de edad se transplantaron a bolsas de plástico de 21 cm alto x 10 cm ancho, con 570 g de suelo seco estéril y se inocularon con una cepa de *Rhizophagus intraradices*, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Las plantas permanecieron en vivero, a temperatura ambiente (promedio 27 °C, con máxima de 36.4 °C), humedad relativa de 33 a 96%, y la intensidad de luz máxima fue de 805 lum/sqft (datos obtenidos con Data Logger Hobo H8 Pro Series RH). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un arreglo factorial para evaluar los factores defoliación e inoculación (3 x 2 respectivamente) (Cuadro 1). Para determinar los porcentajes de defoliación, se estimó el área foliar total de las plántulas utilizando el programa Adobe Photoshop Cs3 Extended y se procedió con el corte de hojas para cada tratamiento.

Se evaluó: 1) tasa de crecimiento en diámetro (TCD) (Villar *et al.*, 2004); 2) tasa de crecimiento en altura (TCA) (Villar *et al.*, 2004); 3) peso seco total en gramos (PST); 4) peso seco de raíz en gramos (PSR); 5) área foliar; 6) porcentaje de colonización micorrízica (Phillips y Hayman (1970) modificado por Kormanik *et al.*, 1980); y 7) tasa de crecimiento relativo (TCR) (Poorter, 1989) y tasa de asimilación neta (TAN) (Evans, 1972). El suelo utilizado como sustrato se analizó al inicio del experimento: a) textura del suelo: arena 52.8%, arcilla 10% y limo 37.2%; b) pH: 6.24; c) materia orgánica (2.96 %); d) nitrógeno inorgánico: 24.5 ppm; e) fósforo (13 ppm); f) potasio rico (ppm); g) capacidad de campo (29.65%); y h) punto de marchitez permanente: 16.12%. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos Las variables de las variables TCD, TCA, TAN.

Se aplicó un análisis de varianza y separación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos de porcentaje de colonización micorrízica fueron modificados a la transformación angular o arco seno. Las variables peso seco total y tasa de crecimiento relativo se compararon con el análisis no paramétrico de la varianza Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 5%. Se utilizó el paquete Statistica (Stat Soft, Inc. 2011).

A los seis meses la TCD fue mayor en los tratamientos con micorriza y no se observaron efectos por la defoliación para ninguno de los tratamientos ($F = 100.45, p < 0.001$) (Figura

kg cm⁻² in autoclave) were germinated. Seedlings eighty days old were transplanted into plastic bags of 21 cm high x 10 cm wide, with 570 g of dry sterile soil and inoculated with a strain of *Rhizophagus intraradices*, provided by the Microbiology Laboratory of the Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Plants remained in the nursery, at room temperature (average 27 °C, with maximum at 36.4 °C), relative humidity 33 to 96%, and the maximum light intensity was 805 lum/sqft (data from Data Logger Hobo H8 Pro Series RH). A completely randomized design was used with a factorial arrangement to evaluate defoliation and inoculation (3 x 2 respectively) (Table 1). To determine percentage defoliation, total leaf area of seedlings was estimated using Adobe Photoshop Cs3 Extended program and proceeded to cut leaves for each treatment.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados en el experimento.

Table 1. Treatments description, applied in the experiment.

Tratamientos (n= 24)	Inoculación con <i>R. intraradices</i>	Defoliación (%)
-M/0	No	0
+M/0	Si	0
-M/50	No	50
+M/50	Si	50
-M/90	No	90
+M/90	Si	90

It was evaluated: 1) growth rate in diameter (TCD) (Villar *et al.*, 2004); 2) growth rate in height (TCA) (Villar *et al.*, 2004); 3) total dry weight in grams (PST); 4) root dry weight in grams (PSR); 5) leaf area; 6) percentage of mycorrhizal colonization (Phillips and Hayman (1970) modified by Kormanik *et al.*, 1980); and 7) relative growth rate (TCR) (Poorter, 1989) and net assimilation rate (TAN) (Evans, 1972). The soil used as substrate was analyzed at the beginning of the experiment: a) soil texture: sand 52.8%, clay 10% and silt 37.2%; b) pH: 6.24; c) organic matter (2.96%); d) inorganic nitrogen: 24.5 ppm; e) phosphorus (13 ppm); f) high potassium (ppm); g) field capacity (29.65%); and h) wilting point: 16.12%. To determine significant differences between treatments of variables TCD, TCA, TAN.

1-A). La TCA fue mayor en los tratamientos con micorriza (+M/0, +M/50 y +M/90), en comparación con los tratamientos -M/0 y -M/50. Se observó que la defoliación a 90% incrementa la TCA con diferencia significativa en ausencia de micorriza. Sin embargo, la interacción de los factores micorriza/defoliación al 50% (+M/50) producen mayor TCA con diferencia significativa ($F= 4.34, p < 0.01$) (Figura 1-C). Los tratamientos con micorriza (+M) presentaron mayor peso seco comparados con los tratamientos sin micorriza; sin embargo, solo el tratamiento +M/50 presentó diferencia significativa ($F=209.24, p < 0.001$) (Figura 1-B). Tanto para la TCR y la TAN los tratamientos con micorriza presentaron los mejores valores, no se encontraron efectos por la interacción defoliación/micorriza entre tratamientos (Figura 1-D, E). Se observó que la defoliación tiene un efecto negativo en el porcentaje de colonización por hifas y vesículas, no afecta el porcentaje de colonización por arbuscúlos (Figura 1-F).

An analysis of variance and mean separation with Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied. The percentages of mycorrhizal colonization were modified to angular transformation or arcsine. Total dry weight and relative growth rate variables were compared with Kruskal Wallis one way analysis of variance, with a significance level of 5%. Statistica software (StatSoft, Inc. 2011) was used.

At six months TCD was higher in treatments with mycorrhizal and no effects were observed by defoliation for any of the treatments ($F= 100.45, p < 0.001$) (Figure 1-A). TCA was higher in treatments with mycorrhizal (+M/0, +M/50 and +M/90), compared with treatments -M/0 and -M/50. It was noted that defoliation at 90% increases TCA with significant difference in absence of mycorrhiza. However, mycorrhiza/defoliation interaction at 50% (+M/50) produce higher TCA with significant difference

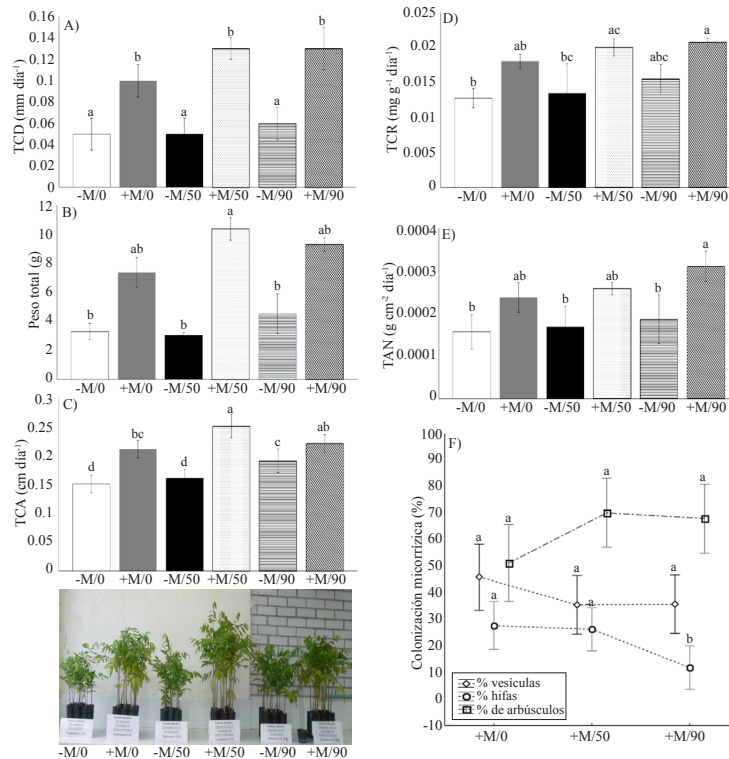


Figura 1. Respuestas de las plántulas de *C. odorata* a los seis meses. A) tasa de crecimiento en diámetro (TCD), ANOVA ($F=94.26, p < 0.001$, Tukey); B) peso seco total, Kruskal Wallis: $H(5, N=45) = 26.62, p < 0.0001$; C) tasa de crecimiento en altura (TCA) e imagen de las plántulas, ANOVA ($F= 4.34, p < 0.01$, Tukey); D) tasa de crecimiento relativo, Kruskal-Wallis: $H(5, N=34) 20.369, p < 0.001$; E) tasa de asimilación neta, ANOVA ($F=44.53, p < 0.0001$, Tukey); y F) porcentaje de colonización, ANOVA ($p < 0.05$, Tukey). En todas las gráficas: letras diferentes indican diferencia significativa; mm: milímetros; +M: con micorriza; -M: sin micorriza; 0, 50 y 90: niveles de defoliación.

Figure 1. Responses of *C. odorata* seedlings at six months. A) growth rate in diameter (TCD), ANOVA ($F= 94.26, p < 0.001$, Tukey); B) total dry weight, Kruskal Wallis: $H(5, N=45) = 26.62, p < 0.0001$; C) growth rate in height (TCA) and seedlings image, ANOVA ($F= 4.34, p < 0.01$, Tukey); D) relative growth rate, Kruskal-Wallis: $H(5, N=34) 20.369, p < 0.001$; E) net assimilation rate, ANOVA ($F= 44.53, p < 0.0001$, Tukey); and F) percentage of colonization, ANOVA ($p < 0.05$, Tukey). In all graphs: different letters indicate significant difference; mm: millimeters; +M: with mycorrhiza; -M: without mycorrhiza; 0, 50 and 90 defoliation levels.

La inoculación micorrízica, bajo las condiciones de este estudio, es el factor principal para promover el crecimiento vegetal. Lone y Khan (2007), encontraron que defoliar plantas de *Brassica juncea* a 50% antes y después de la floración (40 y 60 días de siembra), mejora la eficiencia fotosintética en las hojas restantes e incrementa la biomasa seca. Este incremento es atribuido al aumento en la asimilación de CO₂ debido a las altas tasas de fotosíntesis por las hojas jóvenes (Lone y Khan, 2007). Las plantas de *C. odorata* tuvieron mejor crecimiento cuando se defoliaron al 50%, se observa una rápida recuperación después del corte.

Cuando se aplican defoliaciones de menor intensidad en *Acacia mangium* se favorece el crecimiento de la raíz (principal fuente de carbohidratos de reserva), esto puede ser resultado de la división y elongación celular activadas para reponer tejidos removidos (Rodríguez-Pettit y Razz, 2003). Medhurst *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la defoliación en la tasa fotosintética de *Acacia melanoxylon* de 5 años de edad creciendo bajo *Pinus radiata*, observaron un incremento de 50% en la capacidad fotosintética entre las 2 y 6 semanas en plantas defoliadas respecto al control, estos aumentos son promovidos principalmente por la asignación de carbono.

Lovelock *et al.* (1999) encontraron que la defoliación de plántulas del árbol tropical *Copaifera aromatica*, incrementa la fotosíntesis en niveles normales de CO₂, la defoliación también incrementó el área foliar, no obstante después de 41 días las plantas defoliadas no compensaron el tejido perdido por la defoliación. Honkanen *et al.* (1994) consideran que cuando las hojas jóvenes son defoliadas se incrementa la concentración de auxinas o de carbohidratos. Niveles altos de TAN pueden ser resultado de una alta tasa fotosintética, esto requiere una gran cantidad de luz y enzimas, lo cual disminuye las tasas de crecimiento (Poorter, 1989).

Existe, por tanto, un compromiso para la planta entre una mayor asignación de biomasa a hojas, con la consecuente mayor capacidad para captar luz y dióxido de carbono, redundando en su mayor tasa de crecimiento o bien, en una mayor asignación de biomasa a las raíces, consiguiendo así captar más agua y nutrientes minerales del suelo, pero a expensas de un menor crecimiento (Villar *et al.*, 2004).

En esta captación de nutrimentos es importante la presencia de micorriza y se ve reflejado en las diferencias significativas en el crecimiento de los diferentes tratamientos. Méndez-Cortés *et al.* (2013) obtuvieron alto porcentaje de colonización en plántulas de *C. odorata* aplicando suelo rizosférico con hifas

($F= 4.34, p < 0.01$) (Figure 1-C). Mycorrhizal treatments (+M) had higher dry weight compared with treatments without mycorrhizal; however, only the treatment +M/50 showed significant difference ($F=209.24 p < 0.001$) (Figure 1-B). For both TCR and TAN, treatments with mycorrhizal had the best values, no effects were observed by defoliation/mycorrhizal interaction between treatments (Figure 1-D, E). It was found that defoliation has a negative effect on the percentage of colonization by hyphae and vesicles, does not affect the percentage of colonization by arbuscles (Figure 1-F).

Mycorrhizal inoculation, under the conditions of this study, is the main factor to promote plant growth. Lone and Khan (2007) found that defoliating plants of *Brassica juncea* at 50% before and after flowering (40 and 60 days after sowing), improves photosynthetic efficiency in the remaining leaves and increases dry biomass. This increase is attributed to increased CO₂ uptake due to high rates of photosynthesis by young leaves (Lone and Khan, 2007). *C. odorata* plants had better growth when defoliated at 50%, a rapid recovery is observed after cutting.

When applied a less intense defoliation in *Acacia mangium*, root growth (main source of carbohydrate reserves) is favored, this may be a result of the division and cell elongation activated to replace removed tissue (Rodríguez-Pettit and Razz, 2003). Medhurst *et al.* (2006) evaluated the effect of defoliation on photosynthetic rate of *Acacia melanoxylon* 5 years old growing under *Pinus radiata*, observing an increase of 50% in photosynthetic capacity between 2 and 6 weeks in defoliated plants compared to control, these increases are promoted primarily by carbon allocation.

Lovelock *et al.* (1999) found that defoliation of *Copaifera aromatica* seedlings increases photosynthesis in normal levels of CO₂, defoliation also increased leaf area, however after 41 days defoliated plants did not offset the lost tissue by defoliation. Honkanen *et al.* (1994) consider that when young leaves are defoliated auxin or carbohydrate concentration increases. High levels of TAN may result from a high photosynthetic rate; this requires a large amount of light and enzymes, which reduces growth rates (Poorter, 1989).

Therefore there is a commitment for the plant between an increased allocation of biomass to leaves, with an increased capacity to capture light and carbon dioxide, resulting in its

y esporas como fuente de inóculo natural. En este trabajo, la inoculación de *R. intraradices* en cedro indujo altos porcentajes de colonización micorrízica, no obstante que se considera que la defoliación disminuye la colonización micorrízica (Allsop, 1998; Cortés, 2008), por lo tanto es claro que el cedro rojo es una especie micorrízica tal como lo propusieron Wang y Qiu (2006) en su revisión mundial de distribución filogenética y evolución de la micorriza.

Los resultados encontrados del efecto positivo de la inoculación micorrízica en el crecimiento de planta de cedro contrastan con lo hallado por Cortés (2008) en ilama (*Annona diversifolia* Saff.) donde encontró en campo mayor colonización total, porcentaje de arbusculos y vesículas en época de lluvias cuando las plantas tenían hojas.

También encontró altos porcentajes de micorrización (41-70%) inoculando *R. intraradices*, *Aucalospora delicata*, y el consorcio Zack 19 (constituido por *Glomus albidum*, *G. claroides* y *G. diaphanum*) pero no observó efecto en el crecimiento de las plantas. No obstante, encontró que plantas con follaje e inoculadas con Zack 19, presentaron significativamente mayor porcentaje de colonización total respecto a plantas sin follaje. En el presente estudio se observó que la defoliación a 90% disminuye significativamente el porcentaje de colonización por hifas. Estos resultados contrastan con el hecho de que se ha encontrado que las estructuras micorrízicas funcionalmente importantes se recuperan más rápido de la defoliación que el promedio de colonización total en la raíz (Klironomos *et al.*, 2004; Ilmarinen *et al.*, 2007).

Saito *et al.* (2004) observaron en *Miscanthus*, que la colonización micorrízica por *Glomus-Ac* y *Glomus-Ad* fue significativamente reducida por la defoliación, mientras que en *Zoysa* no es afectada por la defoliación. El hongo micorrízico arbuscular *R. intraradices* se ha probado en diferentes cultivos, en los cuales se ha demostrado que tiene una exitosa colonización; fue evaluado *in vitro* en raíces de *Agave salmiana* Otto transformadas genéticamente y se observó que tuvo 70% de colonización (Rodríguez *et al.*, 2007).

La mayoría de los estudios han reportado que la defoliación reduce las tasas de colonización por hongos MA en las raíces de las plantas (Gehring y Whitham, 1994). Lovelock *et al.* (1999) mencionan que los niveles nutrimentales en el suelo también pueden influenciar la respuesta de la planta a la defoliación, por ejemplo bajos niveles de nutrientes que no son rápidamente translocables (Ej. calcio) puede restringir el potencial de la fotosíntesis compensatoria y crecimiento después de la defoliación.

highest growth rate or in a larger allocation of biomass to roots, achieving to capture more water and mineral nutrients from the soil, but at the expense of a slower growth (Villar *et al.*, 2004).

During nutrients uptake is important the presence of mycorrhiza and it is shown with significant differences in growth at different treatments. Mendez-Cortés *et al.* (2013) obtained high percentage of colonization in seedlings of *C. odorata* applying rhizospheric soil with hyphae and spores as a source of natural inoculum. In this paper, inoculation of *R. intraradices* in cedar induced high percentages of mycorrhizal colonization, however it is considered that defoliation decreased mycorrhizal colonization (Allsop, 1998; Cortés, 2008); therefore it is clear that Red Cedar it is a mycorrhizal species as proposed by Wang and Qiu (2006) in their global review of phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizae.

The results found from the positive effect of mycorrhizal inoculation on cedar growth contrast with the findings by Cortés (2008) in ilama (*Annona diversifolia* Saff) finding on field higher colonization, arbuscules and vesicles percentage in rain season when plants had leaves.

Also found high mycorrhization percentages (41-70%) inoculating *R. intraradices*, *Aucalospora delicata*, and Zack 19 consortium (consisting of *Glomus albidum*, *G. claroides* and *G. diaphanum*) but did not observed effect on plant growth. However, found that plants with foliage and inoculated with Zack 19, had significantly higher percentage of total colonization compared to plants without foliage. In the present study was found that defoliation at 90% significantly decreases the percentage of colonization by hyphae. These results contrast with the fact that has been found that mycorrhizal structures functionally important recover faster from defoliation than average root colonization (Klironomos *et al.*, 2004; Ilmarinen *et al.*, 2007).

Saito *et al.* (2004) observed in *Miscanthus*, that mycorrhizal colonization by *Glomus-Ac* *Glomus-Ad* was significantly reduced by defoliation, while in *Zoysa* is not affected by defoliation. The arbuscular mycorrhizal fungi *R. intraradices* has been tested in different crops, in which, has shown to have a successful colonization; it was evaluated *in vitro* in *Agave salmiana* Otto genetically transformed and found that it had 70% of colonization (Rodríguez *et al.*, 2007).

Se ha estudiado poco la caracterización y porcentaje de colonización micorrízica en especies de planta tropicales (Lovelock, 1999; Alvarado *et al.*, 2004; Ewel y Lovelock, 2005; Chable, 2007; Cortés, 2008). Existen además pocos trabajos relacionados con el efecto de la defoliación en la presencia de hongos micorrízicos arbusculares, los cuales son importantes ya que estos hongos consumen una proporción substancial de los compuestos carbonados producidos por la planta (Smith y Read, 1997).

Conclusión

Este trabajo demuestra que la interacción de los factores micorriza/defoliación produce plantas de *C. odorata* con mayor tasa de crecimiento. Combinando estos resultados con lo reportado por Méndez-Cortés *et al.* (2013), es muy probable que se pueda encontrar un método simple y económico para producir plantas de *C. odorata* en vivero con mayor desarrollo y calidad de planta, mediante la aplicación de suelo rizosférico en bajo porcentaje y defoliación al 50%, lo cual puede favorecer el establecimiento y el desempeño de las plantas en campo al estar inoculadas con cepas nativas.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de posgrado (204524) del primer autor. Al PROMEP por el proyecto PROMEP/103.5/13/6998 (UV-EXB-491).

Literatura citada

- Allsop, N. 1998. Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant Soil*. 202:117-124.
- Alvarado, A.; Chavarria M.; Guerrero R.; Boniche, J. y Navarro J. N. 2004. Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L. f.) en Costa Rica. *Agron. Costarric.* 28 (1):89-100.
- Chable, C. O. 2007. Inoculación micorrízica arbuscular y uso de vermicomposta en la producción de plantas de cedro (*C. odorata* L.) en vivero. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas- Campus Campeche. Programa en Agricultura Tropical. Campeche, México. 79 p.

Most studies have reported that defoliation reduces colonization rates by MA fungi in roots of plants (Gehring and Whitham, 1994). Lovelock *et al.* (1999) note that nutrient levels in the soil could also influence plant response to defoliation, i.e. low levels of nutrients that are not rapidly translocated (i.e. Calcium) can restrict the potential for compensatory photosynthesis and growth after defoliation.

The characterization and percentage of mycorrhizal colonization in tropical plant species (Lovelock, 1999; Alvarado *et al.*, 2004; Ewel and Lovelock, 2005; Chable, 2007; Cortés, 2008) has not been studied enough. There are also a few studies related to the effect of defoliation in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi, which are important since these fungi consume a substantial proportion of carbon compounds produced by the plant (Smith and Read, 1997).

Conclusion

This study demonstrates that mycorrhiza/defoliation interaction produces *C. odorata* plants with higher growth rate. Combining these results with those reported by Méndez-Cortés *et al.* (2013), it is likely that a simpler and cheaper method could be found to produce *C. odorata* plants in nursery with higher development and plant quality, through the application rhizospheric soil at low percentage and defoliation at 50%, which can favor the establishment and performance of plants on the field by being inoculated with native strains.

End of the English version



- Cortés, J. 2008. Dinámica de microorganismos rizosféricos y filosféricos de *Annona diversifolia* Saff. como respuesta a la estacionalidad, fenología y defoliación en el trópico seco. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas- Campus Montecillo, Montecillo, Texcoco, México, 71 p.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT; Diario Oficial 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D. F.
- Evans, G. C. 1972. The quantitative analysis of plant growth. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 734 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México (UNAM). México, D. F. 252 p.

- García-González, R. G.; Delgado, M.; Gonzales, Y.; Gonzales, A.; Garriga, M.; Caligari, P.; Carrasco, B. and Quiroz, K. 2011. *In vitro* propagation of cedar (*Cedrela odorata*) from juvenile shoots. Chilean journal of agricultural research. 71(3):376-382.
- Gehring, C. A. and Whitham, T. G. 1994. Interaction between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Tree*. 9:251-255.
- Gerhardt, K. 1998. Leaf defoliation of tropical dry forest tree seedlings - implications for survival and growth. *Trees*. 13:88-95.
- Gómez, J.; Monterroso, A. y Tinoco, A. 2007. Distribución del cedro rojo en el estado de Hidalgo bajo condiciones actuales y escenarios de cambios climáticos. *Madera y Bosques*. 13(2):299-49.
- Hernandez, L. 2008. Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscape and primary forests. Tesis Mageister Scientiae, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 74 p.
- Honkanen, T.; Haukioja, E. and Suomela, J. 1994. Effects of simulated defoliation and debudding on needle and shoot growth in Scots pine (*Pinus sylvestris*): implications of plant source/sink relationship for plant-herbivore Studies. *Funct. Ecol.* 8:631-639.
- Ilmarinen, K.; Mikola, J. and Vestberg, M. 2008. Do interactions with soil organisms mediate grass responses to defoliation? *Soil Biol. Biochem.* 40:894-905.
- Klironomos, J. N.; McCune, J. and Moutoglis, P. 2004. Species of arbuscular mycorrhizal fungi affect mycorrhizal responses to simulated herbivory. *Appl. Soil Ecol.* 26:133-141.
- Kormanik, P. P.; Bryan, W. C. and Schultz, R. C. 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbiol.* 26:536-538.
- Lone, N. A. and Khan, N. A. 2007. The effect of rate and timing of N fertilizer on growth, photosynthesis, N accumulation and yield of mustard (*Brassica juncea*) subjected to defoliation. *Environ. Exp. Bot.* 60:318-323.
- Lovelock, E.; Posada, J. and Winter, K. 1999. Effects of elevated CO₂ and defoliation on compensatory growth and photosynthesis of seedlings in a tropical tree *Copaifera aromatica*. *Biotropica*. 31(2):279-287.
- Lovelock, E. and Ewel, J. 2005. Link between tree species, symbiotic fungal diversity and ecosystem functioning in simplified tropical ecosystems. *New Phytol.* 167:219-228.
- Medhurst, J. L.; Pinkard, E. A.; Beadle, C. L. and Worledge, D. 2006. Photosynthetic capacity increases in *Acacia melanoxylon* following form pruning in a two-species plantation. *Forest Ecol. Manag.* 233:250-259.
- Méndez-Cortés, H.; Marmolejo-Monsiváis, J. G.; Cantú-Ayala, C.; Olalde-Portugal, V.; Estrada-Castillón, E. and Posadas-Leal, C. 2013. Respuesta de *Cedrela odorata* L. a diversos inoculantes micorrízicos procedentes de dos ecosistemas tropicales. *Madera y Bosques*. 19(3):23-34.
- Mikola, J.; Nieminen, M.; Ilmarinen K. and Vestberg, M. 2005. Belowground responses by AM fungi and animal trophic groups to repeated defoliation in an experimental grassland community. *Soil Biol. Biochem.* 37:1630-1639.
- Murata, H.; Yamada, A.; Maruyama, T.; Endo, N.; Yamamoto, K.; Ohira, T. and Shimokawa, T. 2013. Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela odorata*, allowing *in vitro* synthesis of rhizospheric "shiro". *Mycorrhiza*. 23:235-242.
- Navarro, C.; Cavers, S.; Pappinen, A.; Tigerstedt, P.; Lowe, A. J.; and Merila, J. 2005. Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genetica*. 54(6):281-292.
- Patiño, F. 1997. Recursos genéticos de Swietenia y Cedrela en los neotrópicos. Propuestas para Acciones Coordinadas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma-Italia. 58 p.
- Pérez, J.; Mesen, F.; Hilje, L. and Aguilar, M. 2002. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. *Rev. Forest. Centroame.* 30:67-71.
- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Poorter, H. 1989. Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. *In: Lambers, H.; Cambridge, M. L.; Konings, H. and Pons, T. L. (Eds.). SPB Academic Publishing, The Hague. Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants.* 45-68 pp.
- Poorter, L. and Hayashida-Oliver, Y. 2000. Effects of seasonal drought on gap and understorey seedlings in a Bolivian moist forest. *J. Trop. Ecol.* 16(4):481-498.
- Poorter, H. and Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:595-607.
- Rodgers, H. L.; Brakke, M. P. and Ewel, J. J. 1995. Shoot damage effects on starch reserves of *Cedrela odorata* L. *Biotropica*. 27(1):71-77.
- Rodríguez, G.; Morales, F.; Gutiérrez, R.; Aguilar, S. y Pérez, E. 2007. Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* Otto y su colonización por *Glomus intraradices*. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(3):215-222.
- Rodríguez-Petit, A.; Clavero, T. y Razz, R. 2003. Características de crecimiento de *Acacia mangium* Willd en condiciones de bosque seco tropical. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5(1):60-62.
- Saito, K.; Suyama, Y. and Sato, A. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Micorrhiza*. 14:363-373.
- Shi, Z. Y.; Chen, Y. L.; Feng, G.; Liu, R. J.; Chritie, X. P. and Li, L. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China. *Mycorrhiza*. 16(2):81-87.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition. Academic Press. San Diego California, USA. 605 p.
- Souza, O. F.; Saggin, J. O. J.; Ribeiro da Silva, E. M. e Luís de Lima, W. 2006. Dependencia e resposta de mudas de cedro a fungos micorrízicos arbusculares. *Pesq. Agropec. Bras.* 41(1):77-84.
- StatSoft, Inc. 2011. *Statistica (Data analysis software system)*, version 10. www.statsoft.com.
- Villar, R.; Ruiz-Robledo, J.; Quero, J. L.; Poorter, H.; Valladares, F. y Marañón, T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. *In: Valladares, F. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid.* 191-227 pp.
- Wang, B. and Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16: 299-363.