

## Contribución de fósforo al mejoramiento de calidad en *Lilium* y la relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*\*

### Phosphorus contribution to improving quality in *Lilium* and its relationship with *Glomus fasciculatum* and *Bacillus subtilis*

Martín Rubí Arriaga<sup>1§</sup>, Andrés González Huerta<sup>1</sup>, Víctor Olalde Portugal<sup>2</sup>, Basilio Gabriel Reyes Reyes<sup>3</sup>, Ana María Castillo González<sup>4</sup>, Delfina de Jesús Pérez López<sup>1</sup> y Luis Isaac Aguilera Gómez<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. UAEMEX. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México C. P. 50200. Tel. 01 722 2965518. Ext. 148 (agonzalezh@uaemex.mx), (djperetzl@uaemex.mx). <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología y Bioquímica. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato. Libramiento norte, carretera Irapuato-León, km 9.6. Irapuato, Guanajuato. C. P. 36500. Tel. 01 462 6239647. (v\_olalde@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), UAEMEX. Carretera Toluca-Atlaconulco, km 14.5. Toluca, Estado de México. C. P. 50200. Tel. 01 722 2965552. (b\_gabrielrr@yahoo.com.mx). <sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 36.5. C. P. 56230. Tel. 01 595 9521500. Ext. 6211. (anasofiacasg@hotmail.com). <sup>5</sup>Facultad de Ciencias. UAEMEX. Tel. 01 722 2965556. Ext. 121. (luishalc@mailcity.com). §Autor para correspondencia: mrubia@uaemex.mx.

## Resumen

*Lilium* sp. se ubica entre las especies de mayor importancia en la producción de flores de corte en México, pero su cultivo se basa en la utilización de cantidades importantes de fertilizantes químicos, por lo que es deseable minimizar el impacto sobre el ecosistema sin disminuir la calidad del producto. Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar los efectos principales y las interacciones de fósforo, *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*, sobre la calidad comercial de flores de *Lilium* híbrido oriental Showwinner en condiciones de invernadero. En dos ciclos consecutivos entre 2007 y 2008 se estudiaron 12 tratamientos bajo un arreglo factorial 2\*3\*2 aplicando análisis de varianza, comparación de medias de tratamientos con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS,  $p=0.05$ ) y análisis de componentes principales. *G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de fósforo y *B. subtilis* tuvieron correlación positiva con peso seco de raíz, altura de la planta, peso seco del tallo, ancho de pétalo, diámetro de la flor, peso seco de la flor, vida de la flor, período de floración y concentración en los tallos de zinc (Zn), cobre (Cu), potasio (K), nitrógeno (N), fósforo (P) y calcio (Ca). Estos

## Abstract

*Lilium* sp. is among the most important species in the production of cut-flowers in Mexico, but its cultivation is based on the use of significant amounts of chemical fertilizers, so it is desirable to minimize the impact on the ecosystem without compromising the product quality. This study was conducted to evaluate the main effects and interactions of phosphorus, *Glomus fasciculatum* and *Bacillus subtilis*, on the commercial quality of flowers of *Lilium* oriental hybrid Showwinner under greenhouse conditions. In two consecutive cycles between 2007 and 2008, 12 treatments in a factorial arrangement 2\*3\*2 were studied using analysis of variance, comparing treatment means with the test of least significant difference (LSD,  $p=0.05$ ) and main component analysis. *G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of phosphorus and *B. subtilis* were positively correlated with root dry weight, plant height, stem dry weight, petal width, flower diameter, flower dry weight, life of the flower, flowering time and concentration in the stems of zinc (Zn), copper (Cu), potassium (K), nitrogen (N), phosphorus (P) and calcium (Ca). These results show

\* Recibido: marzo de 2011

Aceptado: noviembre de 2011

resultados muestran que los microorganismos rizósfericos utilizados, pueden interactuar positivamente para promover el crecimiento y el desarrollo de la planta y mejorar la calidad de *Lilium* sp. con 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de fósforo.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, *Glomus fasciculatum*, *Lilium*, calidad de flor.

## Introducción

El *Lilium* es apreciado por la belleza de su extensa gama de colores y formas, vida prolongada en florero y por su utilidad en ramos, floreros, composiciones florales y jardines, por lo que se ha incrementado la demanda. La calidad de sus bulbos y las nuevas variedades y colores que el mercado ofrece, aunado a su fácil manejo y bajas exigencias en requerimientos ambientales, han permitido su amplio cultivo en países como México, Argentina, Chile y China, entre otros (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2008).

Los nutrientes del bulbo y las raíces de *Lilium* son insuficientes para obtener flor de alta calidad comercial, lo que hace necesario el uso de programas de nutrición intensiva, pero existen pocos estudios sobre nutrición en esta especie y las recomendaciones de fertilización, en su mayoría química, son limitadas y contradictorias (Ortega-Blu *et al.*, 2006). La fertilización inadecuada altera los componentes físicos, químicos y biológicos de los suelos e incrementa los costos de producción (Betancourt-Olvera *et al.*, 2005).

Una alternativa tecnológica para contrarrestar dicho problema es el uso de microorganismos que actúen coordinadamente con la interfase suelo-raíz (Jiménez-Delgadillo, 2004), como las rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR) y los hongos simbióticos formadores de micorrizas (HMA), que actúan sinérgicamente con las plantas e inciden en la absorción de nutrimentos (Artursson *et al.*, 2006), el metabolismo secundario (Maier *et al.*, 2000), en la arquitectura de la raíz (Jiménez-Delgadillo, 2004) y por tanto en el crecimiento, en el rendimiento y en la calidad de la flor (Scagel y Schreiner, 2006; Cárdenas-Flores *et al.*, 2007). La coinoculación documentada con PGPR y HMA en especies ornamentales es escasa, aún cuando se ha detectado mayor producción y calidad de flor, reducción en los días a cosecha e incrementos en materia seca y en los niveles de absorción de nutrientes (Cárdenas-Flores *et al.*, 2007; Rubí-Arteaga *et al.*, 2009).

that the rhizosphere microorganisms used, may interact positively to promote growth and development of the plant and improve the quality of *Lilium* sp. with 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of phosphorus.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, *Glomus fasciculatum*, *Lilium*, flower quality.

## Introduction

The *Lilium* is prized for its beautiful range of colors and shapes, prolonged vase life and its use in bouquets, vases, floral displays and gardens, for this its demand has increased. The quality of its bulbs and new varieties and colors offered by the market, combined with easy handling and low demands on environmental requirements, have allowed their widespread cultivation in countries such as Mexico, Argentina, Chile and China, among others (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2008).

The nutrients in the bulb and roots of *Lilium* are insufficient to obtain high-quality flower trade, which necessitates the use of intensive nutrition programs, but there are few studies on nutrition in this species and fertilizer recommendations, that most chemical are limited and contradictory (Blu-Ortega *et al.*, 2006). Inadequate fertilization alters the physical, chemical and biological soils and increases production costs (Betancourt-Olvera *et al.*, 2005).

An alternative technology to counter this problem is the use of microorganisms that are coordinated with the root-soil interface (Jiménez-Delgadillo, 2004), such as promoting rhizobacteria plant growth (PGPR) and mycorrhizal symbiotic fungi (AMF), which act synergistically with plants and affect nutrient absorption (Artursson *et al.*, 2006), secondary metabolism (Maier *et al.*, 2000), in the architecture of the root (Jiménez-Delgadillo, 2004) and therefore on growth, yield and quality of the flower (Scagel and Schreiner, 2006, Cárdenas-Flores *et al.*, 2007). The coinoculation with PGPR and AMF documented in ornamental species is scarce, even when detected increased production and flower quality, reduction in days to harvest and increases in dry matter and absorption levels of nutrients (Cárdenas-Flores *et al.*, 2007, Rubí-Arteaga *et al.*, 2009).

The association fungus mycorrhizal-rhizobacterium-*Lilium* opens up prospects of great interest since they could have a model related to the optimal combination of AMF, PGPR

La asociación hongo micorrízico-rizobacteria-*Lilium* abre perspectivas de gran interés ya que podría plantearse un modelo relacionado con la combinación óptima de HMA, PGPR y fertilización con fósforo, así como la interacción de dichos factores con las variables registradas, las cuales podrían evaluarse e interpretarse con la técnica multivariada descrita por Sánchez (1995) y aplicada por González-Huerta *et al.* (2007). El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos del fósforo, de *Bacillus subtilis* y de *Glomus fasciculatum*, así como sus interacciones sobre la calidad comercial de flores de *Lilium* híbrido oriental Showwinner.

## Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en invernadero de agosto 2007 a enero 2008 y de mayo a octubre de 2008, en el municipio de Coatepec Harinas, Estado de México, México; ubicado a una altitud de 2 169 m. La temperatura promedio día/noche fue de 35 °C/10 °C.

En contenedores de plástico se plantaron bulbos vernalizados, importados de Holanda, calibre 16/18 de *Lilium* híbrido oriental Showwinner, lavados y desinfectados previamente con Cloramina T al 2% durante 5 min y enjuagados con agua estéril. Como sustrato se utilizó una mezcla 1:1 de suelo con arena de río, con pH de 5.9, 2.1% de materia orgánica y 18.4 µg ml<sup>-1</sup> de P, esterilizado a una presión de 120 kg cm<sup>-2</sup> por una hora en tres días consecutivos.

La inoculación micorrízica se realizó al plantar el bulbo. Se utilizaron 100 g de inóculo constituido de un suelo limoso con 73 esporas g<sup>-1</sup> de *Glomus fasciculatum* y fragmentos de raíz con 50% de colonización. En cada contenedor se colocaron 250 g de sustrato y se aplicaron 50 g de inóculo; del bulbo se retiraron las raíces primarias para evitar la presencia de hongos micorrízicos nativos, se plantó a 10 cm de la superficie y se cubrió con 500 g de sustrato; el resto del inóculo se depositó al nivel donde se emite el sistema radical secundario, finalmente se adicionaron 250 g del sustrato.

La rizobacteria se aplicó 30 días después de la plantación utilizando 1 ml de una suspensión con 1\*10<sup>7</sup> ufc ml<sup>-1</sup> de *B. subtilis* BEB-*ISbs* (BS-13) (absorbancia 0.1 a 535 nm) por contenedor, donada por el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados

and phosphorus fertilization, and the interaction of these factors with the variables recorded, which could be assessed and interpreted with multivariate technique described by Sánchez (1995) and applied by González-Huerta *et al.* (2007). The aim of this study was to analyze the effects of phosphorus, *Bacillus subtilis* and *Glomus fasciculatum* and their interactions on the commercial quality of flowers of *Lilium* oriental hybrid Showwinner.

## Materials and methods

The greenhouse experiment was conducted in August 2007 to January 2008 and from May to October 2008 in the town of Coatepec, Mexico State, Mexico, located at an elevation of 2169 m. The average temperature day/night was 35 °C/10 °C.

In plastic containers vernalized bulbs were planted, imported from The Netherlands, size 16/18 of *Lilium* oriental hybrid Showwinner, washed and disinfected prior to 2% chloramine T for 5 min and rinsed with sterile water. As substrate we used a 1:1 mixture of river sand soil with pH of 5.9, 2.1% organic matter and 18.4 µg ml<sup>-1</sup> of P, sterilized at a pressure of 120 kg cm<sup>-2</sup> for an hour in three consecutive days.

Mycorrhizal inoculation was done by planting the bulb. We used 100 g of inoculum consisting of a loamy soil with 73 spores g<sup>-1</sup> and fragments *Glomus fasciculatum* root colonization with 50%. In each container we placed 250 g of substrate and 50 g of inoculum applied; bulb taproots were removed to avoid the presence of native mycorrhizal fungi, 10 cm from the surface and covered with 500 g of substrate; the remainder of the inoculum was deposited at the level where the root system is emitted secondary finally added 250 g of substrate.

The rhizobacterium was applied 30 days after planting using 1 ml of a suspension with 1\*10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup> of *B. subtilis* BEB-*ISbs* (BS-13) (0.1 to 535 nm absorbance) per container, donated by the Laboratory of Biochemistry Ecological Research Center and Advanced Studies (CINVESTAV) National Polytechnic Institute (IPN) Irapuato Unit. The plants were watered with 100 ml of distilled water every four days after planting and fertilized weekly with 200 ml per pot with the Long Ashton nutrient solution (LANS), phosphorus modified by treatment (Hewitt, 1966).

(CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Irapuato. Las plantas fueron regadas con 100 ml de agua destilada cada cuatro días a partir de la plantación y fertilizadas semanalmente con 200 ml por maceta de la solución nutritiva Long Ashton (LANS), modificada en fósforo según el tratamiento (Hewitt, 1966).

Los 12 tratamientos fueron evaluados en un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial 2\*3\*2. En el factor A se consideraron plantas con y sin *G. fasciculatum*, en el factor B se evaluaron 0, 22 y 44  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de fósforo en LANS y en el factor C se incluyeron plantas con y sin *B. subtilis*. Para altura de planta y diámetro del tallo se utilizaron 10 unidades experimentales por tratamiento y cada contenedor con una planta fue una unidad experimental.

Las variables evaluadas fueron altura de planta (cm), diámetro de tallo (mm), días a anthesis (siete repeticiones), período de floración (10 repeticiones), vida de la flor (15 repeticiones), diámetro de la flor (cm, 10 repeticiones), ancho de pétalo (cm, 30 repeticiones), colonización de raíz por *G. fasciculatum* [se determinó en porcentaje en una muestra de raíces constituida por tres unidades experimentales por tratamiento (Phillips y Hayman, 1970)]. Al final del experimento se cuantificó *B. Subtilis* Beb-13, para lo cual se muestreó suelo de la rizósfera, realizándose diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-7}$  y se sembraron por la técnica de dispersión en la superficie en cajas de petri, que contenían papa dextrosa agar y se incubaron a 37 °C por 48 h para cuantificar las ufc.

Se determinó en tres repeticiones por tratamiento la concentración en ppm de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B en la parte aérea vegetativa (Alcántar y Sandoval, 1999); el N se determinó con el método micro Kjeldahl, con un espectrofotómetro de esfera X-Rite modelo SP 62, se obtuvieron los valores de tres repeticiones por tratamiento de cromaticidad (c) y ángulo Hue o matiz (h) para determinar el color de la flor (Kabelka *et al.*, 2004). La tasa fotosintética estimada en tres repeticiones por tratamiento, se registró en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con el sistema portátil (SPF) LI-6400 (LI-COR), a 115 días de la plantación. A 170 días de plantado el bulbo, después de secarse a 75 °C por 72 h en un horno de circulación forzada (Ríos Rocha, modelo HSCF), se determinaron los pesos secos en raíz, parte aérea vegetativa y flores, se registraron en g, empleando siete repeticiones por tratamiento.

The 12 treatments were evaluated in a completely randomized design with factorial arrangement 2\*3\*2. In factor A is considered plants with and without *G. fasciculatum*, in factor B were evaluated 0, 22 and 44  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of phosphorus in LANS and factor C is included plants with and without *B. subtilis*. For plant height and stem diameter using 10 experimental units per treatment and each container with a plant was an experimental unit.

The variables evaluated were plant height (cm), stem diameter (mm), days to anthesis (seven repeats), flowering period (10 reps), life of the flower (15 reps), flower diameter (cm, 10 repetitions), petal width (cm, 30 repetitions), root colonization by *G. fasciculatum* [was determined as a percentage of roots in a sample consisting of three experimental units per treatment (Phillips and Hayman, 1970)]. At the end of the experiment was quantified *B. Subtilis* Beb-13, for which it was sampled from the rhizosphere soil, performing serial tenfold dilutions to  $10^{-7}$  and seeded by the technique of surface-spread on petri dishes, containing potato dextrose agar and incubated at 37 °C for 48 h to quantify the cfu.

In three replicates per treatment, the concentration in ppm of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn and B in the vegetative shoot were determined (Alcántar and Sandoval, 1999), the N was determined with the micro method Kjeldahl with a sphere spectrophotometer X-Rite model SP62, values were obtained from three replicates per treatment cromaticidad (c) and Hue angle or hue (h) to determine the color of the flower (Kabelka *et al.*, 2004.) The photosynthetic rate estimated at three replicates per treatment was recorded in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  with the portable (SPF) LI-6400 (LI-COR), 115 days after planting. A 170 days after planting the bulb, after drying at 75 °C for 72 h in a forced circulation oven (Ríos Rocha, model HSCF), dry weights were determined in root, vegetative shoot and flower, were recorded in g, using seven replicates per treatment.

Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test with the least significant difference (LSD) at a significance level of 5%. The data of colonization (%) is transformed to arcsin and of macro-ppm. It also used principal components analysis, which employs approximate variances and correlations, the treatments were assigned to the rows and columns to the variables. The main component analysis was generated with the program developed by Sanchez (1995), and the biplot graphic was published from Excel (Rubí-Arriaga *et al.*, 2009).

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y a la comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significancia del 5%. Los datos de colonización (%) se transformaron a  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  y los de macroelementos a ppm. Además se usó el análisis de componentes principales, que emplea varianzas y correlaciones aproximadas; los tratamientos fueron asignados a las hileras y las variables a las columnas. El análisis de componentes principales se generó con el programa desarrollado por Sánchez (1995), y la gráfica del biplot se editó desde Excel (Rubí-Arriaga *et al.*, 2009).

## Resultados y discusión

### Indicadores de crecimiento

La promoción del crecimiento originada por *G. fasciculatum*, coincide con los resultados de Anushri *et al.* (2002); Rubí-Arriaga *et al.* (2009), quienes señalaron que los hongos HMA favorecen el crecimiento en *Lilium* sp. El mayor peso seco de raíz, reflejado por un incremento de 48% en las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* (Cuadro 1), ratifica lo señalado acerca del incremento que los hongos HMA provocan en el sistema radical de las plantas y que en conjunto con el abundante micelio intra y extraradical que desarrollan, circunda la raíz y constituye un enlace entre las plantas y el suelo, donde actúan como una extensión de la superficie radical, que provoca un marcado incremento en los procesos de absorción y translocación de agua, nutrientes como P, N, Mg, Ca y micronutrientes (Azcón *et al.*, 2008), así como de reguladores de crecimiento (Artursson *et al.*, 2006); por lo que con la micorrización resulta factible la sustitución, al menos parcial del aporte de nutrientes en forma de fertilizantes minerales.

El efecto mostrado por *B. subtilis* sobre altura de la planta coincide con lo reportado por Cárdenas-Flores *et al.* (2007), quienes demostraron la capacidad de promoción de crecimiento de *B. subtilis* BEB-13, en *Tagetes erecta* L, por su participación en la síntesis de moléculas como auxinas y secreción de pequeños péptidos de actividad deaminasa ACC (Jiménez-Delgadillo, 2004). La significancia estadística que se observó en las variables de crecimiento para años (Cuadro 2), indica un comportamiento diferencial entre ciclos, atribuido a las condiciones ambientales que se presentaron. Marulanda *et al.* (2009) señalaron un efecto directo de la humedad, la temperatura y la luminosidad entre otros factores sobre el funcionamiento de los microorganismos.

## Results and discussion

### Growth indicators

Growth promotion caused by *G. fasciculatum*, coincides with the results of Anushri *et al.* (2002), Rubí-Arriaga *et al.* (2009), who pointed out that fungi favor the growth HMA in *Lilium* sp. The greatest root dry weight, reflected by an increase of 48% in plants inoculated with *G. fasciculatum* (Table 1), confirms what is stated on the increase causing the fungus to AMF in the root system of plants, which together with the abundant intra- and extraradical mycelium that develop, surrounding the root and forms a link between plants and soil, where they act as an extension of the root surface, which causes a marked increase in the processes of absorption and translocation of water, nutrients such as P, N, Mg, Ca, and micronutrients (Azcón *et al.*, 2008), as well as growth regulators (Artursson *et al.*, 2006) so that mycorrhization is feasible to replace at least part of the nutrients in the form of mineral fertilizers.

The effect shown by *B. subtilis* on the plant's height coincides with that reported by Cárdenas-Flores *et al.* (2007), who demonstrated the ability to promote growth of *B. subtilis* BEB-13, *Tagetes erecta* L, for its part in the synthesis of molecules such as auxin and secretion of small peptides ACC deaminase activity (Jiménez-Delgadillo, 2004). Statistical significance was observed in the growth variables for years (Table 2), indicating a differential behavior between cycles, attributed to environmental conditions that were presented. Marulanda *et al.* (2009) reported a direct effect of humidity, temperature and brightness among other factors on the operation of the microorganisms.

### Reproductive effort and flower quality

The effects of *G. fasciculatum* on petal width, dry weight, color and life of the flower (PE, PF, CH, VF) (Table 1) agree with Scagel and Schreiner (2006) in *Zantedeschia* inoculated with AMF, who found an increase in the quality of flowers attributable to the ability of AMF to modify the architecture of the root system throughout the development of hyphae in the soil, favoring the transfer of mineral elements and water to plants.

The expansion of the external mycelium of the fungus allows uptake beyond the depletion zone created around the roots, the plant uptake itself and would enhance the

**Cuadro 1. Comparación de medias entre niveles de *Glomus fasciculatum* (Factor B) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ).  
Table 1. Comparison of means between levels of *Glomus fasciculatum* (Factor B) with the DMS test ( $p=0.05$ ).**

Factor B	Variables evaluadas												
	AP	DT	PT	PR	RT	AN	FL	DF	PE	PF	VF	CC	CH
CM	42.36 a	8.7 a	11.06 a	13.42 a	1.16 a	130.17 a	28.3 a	19.55 a	4.27 a	7.7 a	8.39 a	41 a	4.99 a
SM	40.8 b	8.36 b	9.54 b	9.04 b	0.96 b	131.41 a	27.44 a	19.27 a	4.08 b	6.95 b	7.61 b	42.4 a	2.29 b

CM= con micorrizas; SM= sin micorrizas; AP= altura de planta; DT= diámetro de tallo; PT= peso seco de la parte aérea vegetativa; PR= peso seco de raíz; RT= relación peso seco de raíz/parte aérea; AN= días a antesis; FL= periodo de floración; DF= diámetro de flor; PE= ancho de pétalo; PF= peso seco de la flor; VF= vida de la flor; CC= color de la flor (croma); CH= color de la flor (Hue).

**Cuadro 1. Comparación de medias entre niveles de *Glomus fasciculatum* (Factor B) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 1. Comparison of means between levels of *Glomus fasciculatum* (Factor B) with the DMS test ( $p=0.05$ ) (Continuation).**

Factor B	Variables evaluadas												
	CM	TF	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B	
CM	41.54 a	8.44 a	17884 a	1620 a	14500 a	11955 b	3442 b	320 b	4 a	45.3 a	36.3 b	125 b	
SM	0 b	7.19 b	18273 a	1570 a	14074 a	12874 a	3879 a	365 a	3.8 a	44.9 a	61.6 a	135 a	

CM= con micorrizas; SM= sin micorrizas; CM= colonización en raíz; TF= tasa fotosintética; N= Nitrógeno; P= Fósforo; K= Potasio; Ca= Calcio; Mg= Magnesio; Fe= Hierro; Cu= Cobre; Zn= Zinc; Mn= Manganeso; B= Boro.

**Cuadro 2. Comparación de medias entre años (Factor A) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ).**

**Table 2. Comparison of means between years (Factor A) with the DMS test ( $p=0.05$ ).**

Factor A	Variables evaluadas													
	AP	DT	PT	PR	RT	AN	FL	DF	PE	PF	VF	CC	CH	CM
A1	46.2 a	8.2 b	12.2 a	14.95 a	1.23 a	140.11 a	27.2 a	19.45 a	4.2 a	8 a	7.58 b	45.95 a	4.64 a	20.63 a
A2	37 b	8.9 a	8.39 b	7.51 b	0.88 b	121.47 b	28.5 a	19.38 a	4.1 a	6.6 b	8.41 a	37.44 b	2.64 b	20.91 a

A1= año 1; A2= año 2; AP= altura de planta (cm); DT= diámetro de tallo (mm); PT= peso seco de la parte aérea vegetativa (g); PR= peso seco de raíz (g); RT= relación peso seco de raíz/parte aérea (g); AN= días a antesis; FL= periodo de floración; DF= diámetro de flor (cm); PE= ancho de pétalo (cm); PF= peso seco de la flor (g); VF= vida de la flor; CC= color de la flor (croma); CH= color de la flor (Hue); CM= colonización en raíz (%).

**Cuadro 2. Comparación de medias entre años (Factor A) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 2. Comparison of means between years (Factor A) with the DMS test ( $p=0.05$ ) (Continuation).**

Factor A	Variables evaluadas											
	TF	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B	
A1	8.22 a	14091 b	1063 b	12384 b	13811a	3507 b	289 b	164 b	37.4 b	44.31 b	79.5 b	
A2	7.41 b	22066 a	2127 a	16190 a	11018 b	3814 a	396 a	624 a	52.8 a	53.68 a	181.3 a	

A1= año 1; A2= año 2; TF= tasa fotosintética ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$ ); N= Nitrógeno; P= Fósforo; K= Potasio; Ca= Calcio; Mg= Magnesio; Fe= Hierro; Cu= Cobre; Zn= Zinc; Mn= Manganeso; B= Boro (ppm).

### Esfuerzo reproductivo y calidad de la flor

Los efectos de *G. fasciculatum* sobre ancho de pétalo, peso seco, color y vida de la flor (PE, PF, CH, VF) (Cuadro 1) concuerdan con Scagel y Schreiner (2006) en *Zantedeschia* inoculados con HMA, quienes encontraron un incremento en la calidad de las flores atribuible a la

cleavage of the reserve substances present in the bulb. Aboul-Nasr (1996) states that it is essential to consider the changes that AMF have on photosynthetic activity. In this paper the inoculated plants photosynthetic rate reached 17.38% higher than in uninoculated plants. Marulanda *et al.* (2009) noted that it is important to consider the stimulus in the synthesis of hormones that these AM fungal originate.

capacidad de los HMA para modificar la arquitectura del sistema radical a través del desarrollo de hifas en el suelo, favoreciendo la transferencia de elementos minerales y agua a las plantas.

La expansión del micelio externo del hongo permite la captación más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces, por la propia absorción de la planta, además de favorecer el desdoblamiento de las sustancias de reserva presentes en el bulbo. Aboul-Nasr, (1996) establece que es fundamental considerar los cambios que los HMA ejercen sobre la actividad fotosintética. En el presente trabajo las plantas inoculadas alcanzaron una tasa fotosintética 17.38% superior al de las plantas no inoculadas. Marulanda *et al.* (2009) señalaron que es importante considerar el estímulo en la síntesis de hormonas que estos micosimbiontes originan.

*B. subtilis* disminuyó en dos días la antesis de las plantas inoculadas (Cuadro 3), lo que significa una menor estancia en invernadero y menos aplicación de productos químicos, que se traducen en menores costos de producción y menor daño al ambiente. Las plantas inoculadas presentaron un peso seco de la flor 7.3% mayor que el de las no inoculadas. El color basado en el ángulo hue fue 24.69% superior al control y la vida de la flor fue 9% mayor. Efecto que puede atribuirse a su modo de acción, el cual plantea que probablemente más de un mecanismo está involucrado en la asociación planta-microorganismo, para operar simultáneamente o en sucesión en el aumento en la incorporación de agua y nutrientes, como fósforo por diferentes vías o mecanismos (Artursson *et al.*, 2006) o para suministrar sustancias activas de crecimiento (Jiménez-Delgadillo, 2004).

La calidad se mejoró por diferentes vías, el mayor valor en ancho de pétalo y diámetro de la flor reflejan mayor vistosidad de la flor cuando ésta se encuentra totalmente abierta y el incremento en peso seco responde a un mayor tamaño de flor. El valor superior del ángulo Hue indica una mayor intensidad del color rosa, debido a una mayor concentración de antocianinas (Schwinn y Davies, 2004). La mayor vida de la flor se traduce en mayor tiempo en que la flor presenta buenas condiciones. Estas modificaciones pueden significar que la inoculación con *G. fasciculatum* y *B. subtilis* genera ventajas en la comercialización de *Lilium*, al constituirse en características esenciales para alcanzar la satisfacción del consumidor y el éxito comercial.

*B. subtilis* decreased by two days to anthesis of inoculated plants (Table 3), which means a shorter stay in the greenhouse and less application of chemicals, resulting in lower production costs and less environmental damage. The inoculated plants had a dry weight of the flower 7.3% higher than the uninoculated. The color based on hue angle was 24.69% higher than the control and the life of the flower was 9% longer. This effect can be attributed to their mode of action, which suggests that probably more than one mechanism is involved in plant-microbe association, to operate simultaneously or in succession to the increase in the incorporation of water and nutrients such as phosphorus in different ways or mechanisms (Artursson *et al.*, 2006) or to deliver active substances of growth (Jiménez-Delgadillo, 2004).

The quality was improved by different routes, the highest value in petal width and diameter of the flower show greater looking of the flower when it is fully open and the dry weight increase corresponds to a larger flower. The upper value of Hue angle indicates a higher intensity of the color pink, because a higher concentration of anthocyanins (Schwinn and Davies, 2004). The longer life of the flower results in greater time that the flower has good conditions. These modifications can mean that inoculation with *G. fasciculatum* and *B. subtilis* has advantages in marketing *Lilium*, the features become essential to achieving customer satisfaction and business success.

### Nutrient concentration

Statistical significance detected in the analyzed nutrients for years (Table 2), can be attributed to environmental conditions prevailing in each crop cycle. Chang *et al.* (2010) suggested that they exert a direct effect on growth and development of plants in response to g\*e interaction, which affects the variation in absorption, translocation and utilization of nutrients, added this to a possible effect of vernalization, bulbs undergoing pre-market, which could present variations between cycles, each cycle because the bulbs are imported from The Netherlands.

The differential effect of inoculation sources presented on this parameter can be related to the variability in function of both organisms. In Ca, Mg, Fe, Mn and B plants inoculated with *G. fasciculatum* showed statistical significance, but they had lower concentrations than those without inoculation, results that could be attributed to increased consumption of

**Cuadro 3. Comparación de medias entre niveles de *Bacillus subtilis* (Factor D) con la prueba de la DMS ( $\alpha=0.05$ ).**  
**Table 3. Comparison of means between levels of *Bacillus subtilis* (Factor D) with the DMS test ( $\alpha=0.05$ ).**

Factor D	Variables evaluadas							
	AP	DT	PT	PR	RT	AN	FL	DF
CB	42.51 a	8.63 a	10.1 a	11.5 a	1.1 a	129.8 b	28.36 a	19.64 a
SB	40.65 b	8.46 a	10.5 a	10.9 a	1 a	131.8 a	27.38 a	19.19 b

CB= con *B. subtilis*; SB= sin *B. subtilis*. AP= altura de planta; DT= diámetro de tallo; PT= peso seco de la parte aérea vegetativa; PR= peso seco de raíz; RT= relación peso seco de raíz/parte aérea; AN= días a antesis; FL= periodo de floración; DF= diámetro de flor.

**Cuadro 3. Comparación de medias entre niveles de *Bacillus subtilis* (Factor D) con la prueba de la DMS ( $\alpha=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 3. Comparison of means between levels of *Bacillus subtilis* (Factor D) with the DMS test ( $\alpha=0.05$ ) (Continuation).**

Factor D	Variables evaluadas								
	PE	PF	VF	CC	CH	CM	TF	N	P
CB	4.26 a	7.58 a	8.33 a	41.23 a	4.04 a	23.78 a	8.19 a	18264 a	1600 a
SB	4.1 b	7.06 b	7.66 a	42.17 a	3.24 b	17.76 b	7.43 b	17893 a	1590 a

CB= con *B. subtilis*; SB= sin *B. subtilis*; PE= ancho de pétalo; PF= peso seco de la flor; VF= vida de la flor; CC= color de la flor (croma); CH= color de la flor (Hue); CM= colonización en raíz; TF= tasa fotosintética; N= Nitrógeno; P= Fósforo.

**Cuadro 3. Comparación de medias entre niveles de *Bacillus subtilis* (Factor D) con la prueba de la DMS ( $\alpha=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 3. Comparison of means between levels of *Bacillus subtilis* (Factor D) with the DMS test ( $\alpha=0.05$ ) (Continuation).**

Factor D	Variables evaluadas							
	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
CB	14300 a	12292 a	3639 a	335 a	3.88 a	46.6 a	49.9 a	132 a
SB	14275 a	12537 a	3681 a	350 a	4.01 a	43.6 a	48 a	128 a

CB= con *B. subtilis*; SB= sin *B. subtilis*; K= Potasio; Ca= Calcio; Mg= Magnesio; Fe= Hierro; Cu= Cobre; Zn= Zinc; Mn= Manganeseo; B= Boro.

### Concentración nutricional

La significancia estadística detectada en los elementos nutritivos analizados correspondiente a años (Cuadro 2), se puede atribuir a las condiciones ambientales imperantes en cada ciclo de cultivo. Chang *et al.* (2010) sugirieron que éstos ejercen un efecto directo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en respuesta a una interacción genotipo ambiente, que afecta la variación en la absorción, traslocación y aprovechamiento de nutrientes, aunado esto a un posible efecto de la vernalización, que se someten los bulbos previa a la comercialización, que pudo presentar variaciones entre ciclos, pues los bulbos cada ciclo son importados de Holanda.

El efecto diferencial que presentaron las fuentes de inoculación sobre este parámetro, puede relacionarse con la variabilidad en funciones de ambos microorganismos.

these elements in plants inoculated in the stages of vegetative growth and reproductive effort, to participate directly in processes related to quality and cut-flower life. Chang and Miller (2004) noted that in *Lilium*, nutrient demand is accentuated by the appearance of flower buds, when it was performed nutritional analysis in this paper.

Calcium plays a major role in the life of the flower of *Lilium*. Chang and Miller (2004), Álvarez-Sánchez *et al.* (2008), indicated that this significantly promotes an increased production of dry matter. In the present study, it had higher inoculated plants in root dry weight, stems and flowers than the control plants, due to the greater speed than the N advantage plants, thereby increasing the photosynthetic activity and therefore the production of sugars. The inoculated plants showed a higher photosynthetic rate 17.38% to the uninoculated plants, because of their greater height, which means a larger number of leaves for



En Ca, Mg, Fe, Mn y B las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* mostraron significancia estadística, pero éstas presentaron menor concentración que aquellas sin inocular, resultados que podrían atribuirse a un mayor consumo de estos elementos en las plantas inoculadas en las etapas de crecimiento vegetativo y esfuerzo reproductivo, al participar de manera directa en procesos relacionados con calidad de corte y vida de la flor. Chang y Miller (2004) señalaron que en *Lilium* la demanda nutrimental se acentúa con la aparición del botón floral, momento en que se realizó el análisis nutrimental en el presente trabajo.

El calcio juega un papel preponderante en la vida de la flor de *Lilium*. Chang y Miller (2004); Álvarez-Sánchez *et al.* (2008), indicaron que promueve significativamente la mayor producción de materia seca. En el presente estudio las plantas inoculadas presentaron mayor peso seco en raíz, tallo y flores que las plantas testigo, debido a la mayor velocidad que las plantas aprovechan el N, aumentando así la actividad fotosintética y con ello la producción de azúcares. Las plantas inoculadas presentaron una tasa fotosintética superior 17.38% a las plantas no inoculadas, debido a su mayor altura, que significa un mayor número de hojas, para realizar fotosíntesis, para producir, traslocar y acumular carbohidratos de reserva durante el crecimiento y que estarán disponibles para las flores en poscosecha (O'Donoghue *et al.*, 2002), esto pudo favorecer una mayor vida de la flor del híbrido oriental Showwinner.

El Ca es un ión relacionado con la estabilidad y fuerza mecánica de la pared celular, la cual se debe a la unión de éste con la pectina de la lámina media. En el caso de *Lilium* híbrido oriental Showwinner el Ca pudo estar confiriendo mayor rigidez a las paredes y lamina media del tejido fundamental de los tépalos y retrasar su degradación, lo que es una característica deseable y muy apreciada por los floricultores y comercializadores de flores. El retraso en el debilitamiento de los tépalos podría relacionarse con el mantenimiento de la turgencia de las células.

El Ca interviene en la regulación del metabolismo intracelular, permeabilidad de las membranas y es un mensajero secundario en el citoplasma, el cual se une a proteínas moduladoras de calcio, tales como la calmodulina y la kinasa (Sanders *et al.*, 2002). La proteína kinasa se encuentra en la membrana plasmática, la cual junto con el complejo calcio-calmodulina fosforila otras enzimas como la ATPasa, por lo que al calcio es un regulador del crecimiento y de la senescencia (Chang y Miller, 2004).

photosynthesis, to produce, translocate and accumulate carbohydrate reserves during growth and that will be available for flowers in postharvest (O'Donoghue *et al.*, 2002), this might promote greater life of the oriental hybrid flower Showwinner.

Ca is an ion associated with the stability and mechanical strength of the cell wall, which is due to the junction thereof with the pectin of the middle lamella. In the case of *Lilium* oriental hybrid Showwinner, Ca might be giving greater rigidity to the walls and sheet mean fundamental fabric of the tepals and delay its degradation, which is a desirable feature and much appreciated by growers and traders of flowers. The delay in the weakening of the tepals may be related to the maintenance of cell turgor.

The Ca is involved in the regulation of intracellular metabolism, membrane permeability and is a second messenger in the cytoplasm, which binds to calcium modulating proteins such as calmodulin and the kinase (Sanders *et al.*, 2002). Protein kinase is found at the plasma membrane, which together with the calcium-calmodulin complex phosphorylates other enzymes such as ATPase, so that calcium is a regulator of growth and senescence (Chang and Miller, 2004).

Magnesium is involved as a cofactor in enzymatic reactions acting on phosphorylated substrates (kinases), favoring the chelating type coupling between the structure and the enzyme pirofosfatic or the substrate, especially the ATP, besides being part of the chlorophyll and ribosomes and participates in the regulation of RuBP carboxylase in the chloroplast stroma (Sharma, 2006). Manganese is a constituent of some enzymes, ribosomes and chlorophyll, and is directly involved in photosystem II of photosynthesis and the synthesis of secondary metabolites, such as chloroplast pigments (phytol and carotenoids) and gibberellins (Sharma, 2006).

Boron is involved in metabolism of carbohydrates, N, P, lipids and hormone (auxin) and in the synthesis of nucleic acids, proteins and the use of phosphate to increase the ATPase activity. Actively involved in the cell's wall synthesis, so it is considered a formative element of plant structures and tissues, the active absorption of salts and photosynthesis (Sharma, 2006).

The iron is an essential element for the maintenance of chlorophyll and the chloroplast function and structure is essential as a component of many enzymes and transporters

El magnesio participa como cofactor en reacciones enzimáticas que actúan sobre sustratos fosforilados (cinasas), favoreciendo el acoplamiento de tipo quelatante entre la estructura pirofosfatada y la enzima o bien el sustrato, principalmente al ATP, además de ser componente de la clorofila y de los ribosomas, y participa en la regulación de la RuBP carboxilasa en el estroma del cloroplasto (Sharma, 2006).

El manganeso es constituyente de algunas enzimas, ribosomas y de la clorofila, y está involucrado directamente en el fotosistema II de la fotosíntesis y en la síntesis de metabolitos secundarios, como pigmentos de cloroplastos (fitol y carotenoides) y giberelinas (Sharma, 2006).

El boro está involucrado en el metabolismo de los carbohidratos, de N, P, de lípidos y de hormonas (auxinas) y en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y en la utilización de fosfato al incrementar la actividad de la ATPasa. Participa activamente en la síntesis de la pared celular, por lo que se considera un elemento formativo de las estructuras vegetales como tejidos, la absorción activa de sales y en la fotosíntesis (Sharma, 2006).

El hierro es un elemento fundamental para el mantenimiento de la clorofila y para el funcionamiento y estructura del cloroplasto, es esencial como componente de muchas enzimas y transportadores y participa en la transferencia de electrones en los fotosistemas, en la biosíntesis de giberelinas, etileno y ácido jasmonico, participa en un mecanismo de osmoprotección y antioxidativo manteniendo la estructura e integridad de la membrana plasmática (Sharma, 2006).

Las funciones de estos elementos pueden relacionarse con los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la calidad y vida de la flor, a las cuales se puede atribuir menores niveles encontrados y en cuya absorción y traslocación los HMA participan activamente. Podrían estar relacionados con el eficiente sistema de enzimas antioxidantes, sobre la estructura celular y la integridad del tejido. Los niveles de antioxidantes en las flores pueden ser directamente influenciados por los niveles de expresión y actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa (Ahn *et al.*, 2005), por lo que las micorrizas además de mejorar la absorción de nutrimentos como P, también lo hacen en los niveles de antioxidantes donde participan los demás elementos referidos.

La ausencia de significancia estadística en los elementos nutritivos estudiados, en las plantas que recibieron *B. subtilis* no coincidió con lo reportado por otros autores, donde se ha

and is involved in electron transfer in photosystems in the biosynthesis of gibberellins, ethylene and hydrogen jasmonic, participates in osmoprotection and antioxidative mechanism maintaining the structure and integrity of the plasma membrane (Sharma, 2006).

The functions of these elements can be related to the results obtained in this study on the quality and life of the flower, which can be attributed to lower levels found and whose absorption and translocation of active HMA could be related to the efficient system of antioxidant enzymes on cell structure and tissue integrity. Antioxidant levels in the flowers can be directly influenced by the levels of expression and activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase (Ahn *et al.*, 2005), so in addition to improving mycorrhizal uptake nutrients such as P, so levels of antioxidants with the participation of the other elements mentioned.

The absence of statistical significance in the studied nutrients in plants receiving *B. subtilis* did not coincide with those reported by other authors, where it is established that the improvement in the nutrition of the plant may be a mechanism by which rhizobacteria increased the yield and quality (Marulanda *et al.*, 2009).

The ability of promoting growth of *B. subtilis* BEB-13, is related to the secretion of small peptides ACC deaminase and the synthesis of molecules such as auxin (Jiménez-Delgado, 2004), which could be responsible for the results obtained in this study. Phytohormones produced by PGPR are capable of changing patterns of distribution or duplication of assimilates in plants, altering root growth and surface absorption of water and nutrients and the processes of fruiting and fruit development. These results, coupled with the effects that led to the HMA reflect a propelling effect, beneficial for growth, development and quality of plants *Lilium* oriental hybrid Showwinner.

### Main component analysis (treatment variable)

The best treatment was T3 (*G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, with *B. subtilis*), followed by T4 (*G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, without *B. subtilis*), T2 (*G. fasciculatum*, 00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, without *B. subtilis*) and T5 (*G. fasciculatum*, 44  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, with *B. subtilis*), which allowed the best expression of 19 of the 25 variables. Petal width (PE), diameter (DF), dry weight (PF), life (VF) and flower color (CH) and period of flowering (F) are linked to improved commercial quality, the larger

establecido que el mejoramiento en la nutrición de la planta puede ser un mecanismo, por el cual la rizobacteria incrementa el rendimiento y la calidad (Marulanda *et al.*, 2009).

La capacidad de la promoción del crecimiento de *B. subtilis* BEB-13, está relacionada con la secreción de pequeños péptidos ACC deaminasa y con la síntesis de moléculas como auxinas (Jiménez-Delgado, 2004), las cuales pudieran ser las responsables de los resultados obtenidos en el presente estudio. Las fitohormonas producidas por PGPR son capaces de cambiar los patrones de distribución o desdoblamiento de asimilados en las plantas, alterando el crecimiento de raíces y la superficie de absorción de agua y nutrientes así como los procesos de fructificación y desarrollo del fruto. Estos resultados, sumados a los efectos que originaron los HMA reflejan un efecto potencializador, benéfico para el crecimiento, desarrollo y calidad de las plantas de *Lilium* híbrido oriental Showwinner.

#### **Análisis de componentes principales (tratamiento por variable)**

El mejor tratamiento fue T3 (*G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, con *B. subtilis*), seguido de T4 (*G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, sin *B. subtilis*), T2 (*G. fasciculatum*, 00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, sin *B. subtilis*) y T5 (*G. fasciculatum*, 44  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, con *B. subtilis*); que permitieron la mejor expresión de 19 de las 25 variables evaluadas. Ancho de pétalo (PE), diámetro (DF), peso seco (PF), vida (VF) y color de la flor (CH) y período de floración (F) están vinculadas a una mejor calidad comercial; a mayor tamaño de flor, expresado por (PE) y (DF), mayor peso seco de este órgano. Una mayor intensidad en el color expresa flores con mayor pigmentación; a mayor vida de la flor se amplía el rango en que las flores presentan condiciones aceptables para su comercialización.

El incremento en el período de floración señala mayor tiempo en que las plantas florecen, parámetro significativo en el valor de la producción de *Lilium* sp., resultado que concuerda con los de Cárdenas-Flores *et al.* (2007), quienes trabajaron con los mismos inóculos en *T. erecta* y detectaron mejoras significativas en la calidad de la flor. Estos resultados se explican por las estrechas correlaciones que se observaron entre las variables señaladas con el peso seco de la raíz y la relación peso seco de raíz/parte aérea vegetativa. Estas correlaciones también sugieren una mayor colonización por *G. fasciculatum* en presencia de *B. subtilis*, así como una mejora en la tasa fotosintética, lo cual concuerda con lo indicado por Aboul-Nasr (1996).

the flower expressed by (PE) and (DF), greater dry weight of this organ. A more intense flower color expresses more pigmentation, the greater the life of the flower extending the range in which the flowers are acceptable conditions for marketing.

The increase in the flowering period as long as states in which the plants bloom, significant parameter in the production value of *Lilium* sp., A finding consistent with Cardenas-Flores *et al.* (2007), who worked with the same inocula in *T. erecta* and found significant improvements in the quality of the flower. These results are explained by the close correlations were observed between the variables identified by the root dry weight and dry weight ratio of root/shoot vegetative. These correlations also suggest further colonization by *G. fasciculatum* in the presence of *B. subtilis*, as well as an improvement in the rate of photosynthesis, which is consistent with the observations of Aboul-Nasr (1996).

The highest percentage of colonization was associated with *G. fasciculatum*, 00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, *B. subtilis* with a value 56.1%, followed by *G. fasciculatum*, 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  P, *B. subtilis* with a value 51.2%, but these rates decreased significantly with increasing P concentration (Table 4). Anushri *et al.* (2002), Ruby-Arriaga *et al.* (2009), indicated that colonization was favored with medium levels of P. It is likely that *B. subtilis* developed a lead role in solubilizing soil P, making the contribution of this element.

The highest percentages of colonization obtained through the joint inoculation of both organisms, showing their beneficial interaction, since the root colonization by fungi stimulates the flow of carbohydrates from foliage to root exudate and which may become carbon source for growth of bacteria, while hormones and peptides produced by the bacterium (Jimenez-Delgado *et al.*, 2004), can stimulate the germination and hyphal growth of AMF, which favors the incorporation of P solubilized by the bacteria (Artursson *et al.*, 2006, Zaidi and Khan, 2006).

The close correlation between Zn and Cu with variable growth and flower quality and the best treatments (3 and 4) can be attributed to both are essential components and activators of many enzymes, including Cu-Zn superoxide dismutase, which provides protection against damage from reactive oxygen species (ROS) (Sharma, 2006). Zn is involved in the biosynthesis of chlorophyll and Cu is a constituent of plastocyanin that functions as a mobile carrier of electrons, ligand Photosystem II to Photosystem I.

El mayor porcentaje de colonización se asoció a *G. fasciculatum*,  $00 \mu\text{g ml}^{-1}$  P, con *B. subtilis* con un valor 56.1%, seguido por *G. fasciculatum*,  $22 \mu\text{g ml}^{-1}$  P, con *B. subtilis* con un valor 51.2%, pero estos porcentajes disminuyeron considerablemente al incrementarse la concentración de P (Cuadro 4). Anushri *et al.* (2002); Rubí-Arriaga *et al.* (2009), señalaron que la colonización se favoreció con niveles medios de P. Es probable que *B. subtilis* desarrolló un papel preponderante al solubilizar P del suelo, facilitando la aportación de este elemento.

The plastocyanin accepts electrons from complex cytochrome  $b_6/f$  and donates them to PSI, which are transferred to ferredoxin, enabling it to reduce NADP + also is involved in the transport cyclic electron associated with the PSI mediating the production of ATPase and favors the movement of plastoquinone molecules during electron transport in PSII, which explains the positive correlation that reflect these elements with the photosynthetic rate and growth variables and quality of flowers (Figure 1).

**Cuadro 4. Comparación de medias entre niveles de fósforo (Factor C) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ).**

**Table 4. Comparison of means between phosphorus levels (Factor C) with the DMS test ( $p=0.05$ ).**

Factor C	Variables evaluadas							
	AP	DT	PT	PR	RT	AN	FL	DF
F1	40.9 b	8.65 a	9.62 b	8.98 c	0.95 b	131 a	28.5 ab	18.64 b
F2	44.1 a	8.69 a	11.1 a	14.62 a	1.24 a	129.55 a	28.6 a	19.69 a
F3	39.6 b	8.3 b	10.1 b	10.09 b	0.99 a	131.75 ab	26.42 b	19.91 a

F1, F2, F3= 0, 22 y  $44 \mu\text{g ml}^{-1}$  P respectivamente; AP= altura de planta; DT= diámetro de tallo; PT= peso seco de la parte aérea vegetativa; PR= peso seco de raíz; RT= relación peso seco de raíz/parte aérea; AN= días a antesis; FL= período de floración; DF= diámetro de flor.

**Cuadro 4. Comparación de medias entre niveles de fósforo (Factor C) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 4. Comparison of means between phosphorus levels (Factor C) with the DMS test ( $p=0.05$ ) (Continuation).**

Factor C	Variables evaluadas							
	PE	PF	VF	CC	CH	CM	TF	N
F1	4.12 b	7.06 b	7.35 c	42.3 a	4.65 a	23.3 a	7.52 b	17852 a
F2	4.3 a	8.15 a	8.85 a	42.3 a	4.1 a	22.9 a	8.67 a	18229 a
F3	4.12 b	6.76 b	7.8 b	40.4 b	2.17 b	16.11 b	7.25 b	18154 a

F1, F2, F3= 0, 22 y  $44 \mu\text{g ml}^{-1}$  P respectivamente; PE= ancho de pétalo; PF= peso seco de la flor; VF= vida de la flor; CC= color de la flor (croma); CH= color de la flor (Hue); CM= colonización en raíz; TF= tasa fotosintética; N= nitrógeno.

**Cuadro 4. Comparación de medias entre niveles de fósforo (Factor C) con la prueba de la DMS ( $p=0.05$ ) (Continuación).**

**Table 4. Comparison of means between phosphorus levels (Factor C) with the DMS test ( $p=0.05$ ) (Continuation).**

Factor C	Variables estudiadas								
	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
F1	1375 b	13668 b	11688 b	3668 a	340 a	3.84 a	45.79 a	57.99 a	128.8 a
F2	1750 a	115046 a	13039 a	3761 a	350 a	4.04 a	48.83 a	40.74 c	132.9 a
F3	1660 a	14157 ab	12517 ab	3552 a	338 a	3.95 a	40.85 a	48.26 b	129.4 a

F1, F2, F3= 0, 22 y  $44 \mu\text{g ml}^{-1}$  P respectivamente; P= Fósforo; K= Potasio; Ca= Calcio; Mg= Magnesio; Fe= Hierro; Cu= Cobre; Zn= Zinc; Mn= Manganeseo; B= Boro.

Los mayores porcentajes de colonización obtenidos por medio de la inoculación conjunta de ambos microorganismos, muestran su interacción benéfica, ya que la colonización de las raíces por los hongos estimula el flujo de carbohidratos desde el follaje hasta la raíz, y que por exudación pueden constituirse en fuente de carbono para el crecimiento de la bacteria, en tanto que las

The strong relationship of K with the quality variables can be attributed to the diversity of functions in the metabolism of plants in which it participates, substantially as an activator of enzymes and osmoregulator also essential for the efficient use of N. The  $\text{NO}_3$  is taken up by plant roots via an active process and absorption can be affected by the influence of K on the translocation of

hormonas y péptidos producidos por la bacteria (Jiménez-Delgado *et al.*, 2004), pueden estimular la germinación y el crecimiento hifal de los HMA, lo que favorece la incorporación del P solubilizado por la bacteria (Artursson *et al.*, 2006; Zaidi y Khan, 2006).

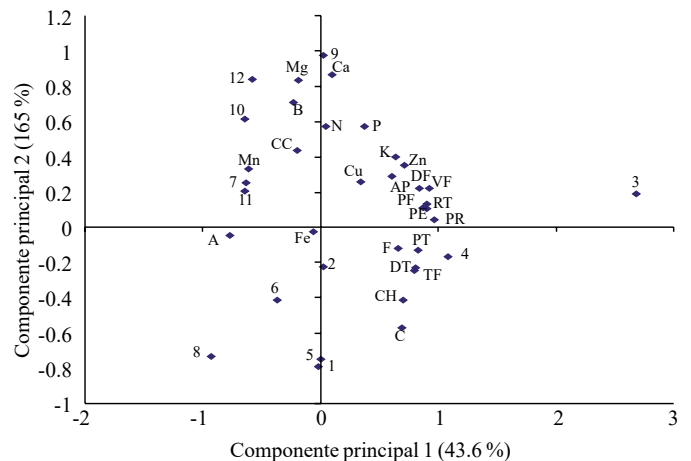
La estrecha correlación entre Zn y Cu con variables de crecimiento y calidad de flor y con los mejores tratamientos (3 y 4) puede atribuirse a que ambos son componentes esenciales y activadores de numerosas enzimas, entre ellas la Cu-Zn superóxido dismutasa, la cual ofrece protección contra el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sharma, 2006). El Zn interviene en la biosíntesis de clorofila y Cu es constituyente de la plastocianina que funciona como un acarreador móvil de electrones, ligando el Fotosistema II al Fotosistema I.

La plastocianina acepta electrones del complejo del citocromo  $b_6/f$  y dona éstos al PSI, los cuales son transferidos a la ferredoxina, capacitándola para reducir el  $NADP^+$ , además se involucra en el transporte cíclico de electrones asociados con el PSI mediando la producción de ATP, y favorece el movimiento de las moléculas de plastoquinona durante el transporte de electrones en el PSII, lo que explica la correlación positiva que reflejan estos elementos con la tasa fotosintética y con las variables de crecimiento y calidad de flor (Figura 1).

La fuerte relación del K con las variables de calidad se puede atribuir a la diversidad de funciones en el metabolismo de las plantas en las que participa, substancialmente como activador de enzimas y osmoregulador, además es esencial para el uso eficiente del N. El  $NO_3$  es tomado por las raíces de las plantas vía un proceso activo y la absorción puede ser afectada por la influencia del K en la traslocación de fotosintatos necesarios para soportar dicho proceso, lo que marca la relación con Zn y Cu que se aprecia en el biplot (Figura 1). Es preciso señalar que tiene efectos antagonistas en la absorción de P, Ca, Mg y B, el cual cuando está presente en altas concentraciones puede disminuir la absorción de otros iones (Chang *et al.*, 2010).

La disminución en la absorción de Ca cuando se incrementa la concentración de K, puede estar relacionada con la competencia entre ambos, debido a las propiedades fisiológicas de estos iones a lo que se puede atribuir la ubicación del Ca en el biplot que refleja una relación importante con las variables de calidad. El efecto depresivo

photosynthates needed to support this process, what makes the relationship with Zn and Cu is seen in the biplot (Figure 1). It should be noted that there are antagonistic effects on the absorption of P, Ca, Mg and B, which when present in high concentrations may decrease the absorption of other ions (Chang *et al.*, 2010).



**Figura 1. Interrelación entre los tratamientos (combinación de *G. fasciculatum*, fósforo y *B.* con números) y las variables evaluadas (con letras).**

**Figure 1. Interrelation between treatments (combination of *G. fasciculatum*, phosphorus and *B.* with numbers) and the variables evaluated (with letters).**

The decrease in Ca absorption with increasing concentration of K may be related to competition between the two, due to the physiological properties of these ions to be attributed to the location of the Ca in the biplot reflecting an important relationship with the quality variables. The depressing effect of K on Mg absorption at high concentrations can be interpreted as resulting from competition for metabolic compounds produced, where a reduction in the translocation from the roots to the stem seems to be the source of the antagonism K/Mg, which may explain the position of the Mg in the biplot on Figure 1.

## Conclusions

The results presented in this paper suggest an association phosphorus-plant-microorganisms effective, mainly based on a favorable exchange between the root exudates and mycorrhiza promoted by the set of active compounds promoted by rhizobacteria.

de K en la absorción de Mg a altas concentraciones, puede ser interpretada como un resultado de la competencia por los compuestos metabólicos producidos, donde una reducción en la traslocación de las raíces al tallo parece ser la fuente del antagonismo K/Mg, lo que pudiera explicar la posición que ocupa el Mg en el biplot de la Figura 1.

## Conclusiones

Los resultados expuestos en este trabajo sugieren una asociación planta-microorganismos-fósforo efectiva, basada fundamentalmente en un intercambio favorable, entre los exudados radicales promovidos por las micorrizas y el conjunto de sustancias activas promovidos por la rizobacteria.

La combinación *Glomus fasciculatum*-*Bacillus subtilis*-fósforo a 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , se establece como una alternativa promisoriosa para la producción de *Lilium*.

La inoculación con *G. fasciculatum* incrementó altura, diámetro del tallo, peso seco de raíz y tallo, mejoró la calidad de las plantas y flores de esta especie.

La coinoculación con *G. fasciculatum* y *B. subtilis* ejerció un efecto positivo en la apariencia (ausencia de defectos, tamaño, forma y color), que resulta en mayores rendimientos comerciales de *Lilium* híbrido oriental Showwinner.

Elementos como Zn, Cu, K, N, P y Ca resultan de particular importancia en la producción de esta especie ornamental.

## Literatura citada

- Aboul-Nasr, A. 1996. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Tagetes erecta* and *Zinnia elegans*. *Mycorrhiza*. 6:61-64.
- Ahn, T.; Oke, M.; Schofield, A. and Paliyat, G. 2005. Effect of phosphorus fertilizer supplementation on antioxidant enzyme activities in tomato fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53:1539-1545.
- Alcántar, G. G. y Sandoval, M. V. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. Publicación Especial. Núm. 10. 156 p.

The combination *Glomus fasciculatum*-*Bacillus subtilis*-phosphorus to 22  $\mu\text{g ml}^{-1}$  is established as a promising alternative for the production of *Lilium*.

Inoculation with *G. fasciculatum* increased height, stem diameter, dry weight of root and stem, improved the quality of plants and flowers of this species.

The co-inoculation with *G. fasciculatum* and *B. subtilis* had a positive effect on the appearance (absence of defects, size, shape and color), resulting in higher commercial yields of *Lilium* oriental hybrid Showwinner.

Elements such as Zn, Cu, K, N, P and Ca are of particular importance in the production of this species ornamental.

*End of the English version*



- Álvarez-Sánchez, M. E.; Maldonado-Torres, R.; García-Mateos, R.; Almaguer-Vargas, G.; Rupit-Ayala, J. y Zavala-Estrada, F. 2008. Suministro de Calcio en el desarrollo y nutrición de *Lilium* asiático. *Agrociencia*. 42:881-889.
- Anushri, V. M.; Sharma, P.; Adholeya, A.; Dhawan, V. and Srivastava, P. S. 2002. Enhanced growth of micropropagated bulblets of *Lilium* sp. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi at different P fertility levels in an alfisol. *J. Hortic. Sci. Technol.* 77(3):258-263.
- Artursson, V.; Finlay, R. D. and Jansson, J. K. 2006. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8(1):1-10.
- Azcón, R.; Rodríguez, R.; Amora-Lazcano, E. and Ambrosano, E. 2008. Uptake and metabolism of nitrate of mycorrhiza plants as affected by water availability and N concentration in soil. *European J. Soil Sci.* 59(2):131-138.
- Betancourt-Olvera, M.; Rodríguez-Mendoza, M. N.; Sandoval-Villa, M. y Gaytan-Acuña, E. 2005. Fertilización foliar una herramienta en el desarrollo del cultivo de *Lilium* cv. Stargeizer. *Revista Chapingo. Serie Horticultura.* 11(2):371-378.
- Cárdenas-Flores, A.; Estrada-Luna, A. and Olalde-Portugal, V. 2007. Yield and quality enhancement of marigold flower by inoculation with *Bacillus subtilis* and *Glomus fasciculatum*. *J. Sus. Agric.* 31(1):21-31.

- Chang, Y. C.H. and Miller, W. B. 2004. The relationship between leaf enclosure, transpiration, and upper leaf necrosis on *Lilium* Star Gazer. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129:128-133.
- Chang, K. H.; Rung, Y. W.; Keng, Ch. Ch.; Ting, F. H. and Ren, S. Ch. 2010. Effects of chemical and organic fertilizer on the growth, flower quality and nutrient uptake of *Anthurium andreaeanum*, cultivated for cut flower production. *Sci. Hortic.* 345 p.
- González-Huerta, A.; Vázquez-García, L. M.; Sahagún-Castellanos, G. J.; Rodríguez-Pérez, J. E. y Pérez-López, D. J. 2007. Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Rev. Agric. Téc. Méx.* 33(1):33-42.
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Common wealth Agricultural Bureaux of Horticulture. Technical Communication. 22 p.
- Jiménez-Delgado, R. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Ph D Thesis. Cinvestav- Irapuato, Guanajuato, México.
- Kabelka, E.; Yang, W. and Francis, D. M. 2004. Improved tomato fruit color within an inbred backcross line derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* involves the interaction of loci. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129:250-257.
- Maier, W.; Schmidt, J.; Nimtz, M.; Wray, V. and Strack, D. 2000. Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry.* 54:473-479.
- Marulanda, M.; Barea, J. M. and Azcón, R. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganism (AM fungi and bacteria) from dry environment. Mechanism related to bacterial effectiveness. *J. Plant. Growth Reg.* 28:115-124.
- O'Donogue, E. M.; Somerfield, S. D. and Heyes, J. A. 2002. Vase solutions containing sucrose result in changes to cell walls of sandersonia (*Sandersonia auriantiacca*) flowers. postharvest. *Biol. Technol.* 26:285-594.
- Ortega-Blu, R.; Correa-Benguria, M. y Olate-Muñoz, E. 2006. Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. Para flor de corte. *Agrociencia.* 40:77-88.
- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of interaction. *Transactions of the British. Mycological Society.* 55:158-161.
- Rubí-Arriaga, M.; González-Huerta, A.; Castillo-González, A. M.; Olalde-Portugal, V.; Reyes-Reyes, B. G. y Aguilera-Gómez, L. I. 2009. Respuesta de *Lilium* sp. al fósforo y su relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*. *Phyton.* 78:91-100.
- Sánchez, G. J. J. 1995. El análisis biplot en clasificación. *Rev. Fitotec. Mex.* 18:188-203.
- Sanders, D.; Pelloux, J.; Brownlee, C. and Harper, J. F. 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell.* 4(2):401-417.
- Scagel, C. F. and Schreiner, R. P. 2006. Phosphorus supply alters tuber composition, flower production, and mycorrhizal responsiveness of container-grown hybrid *Zantedeschia*. *Plant. Soil.* 283:323-337.
- Schwinn, K. and Davies, K. M. 2004. Flavonoids. Plant pigment and manipulation. *In: Kevin D. (ed.). Edit Board. New Zealand. Annual Plant Reviews.* 14:92-107 pp.
- Sharma, C. P. 2006. Plant micronutrients. Science publishers. United States of America-India. 265 p.
- Zaidi, A. and Khan, M. S. 2006. Co-inoculation effect of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on Green Gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Turk J. Agric. For.* 30:223-230.