



Isolation and identification of microorganisms with capacity to produce indole-acetic acid in onion crops of the state of Zacatecas

Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad de producción de ácido indol-acético en cultivos de cebolla del estado de Zacatecas

Hádrian González-Torres¹, Arturo Alejandro Rodríguez-Moreno¹, María Laura Eugenia Romero-Jaramillo¹, Veronica Segovia-Tagle^{1*}, Francisco Alejandro Paredes-Sánchez¹, Karol Karla García-Aguirre¹, Elsa Verónica Herrera Mayorga¹, Leticia Bravo-Luna².

¹Laboratorio de Biología, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería campus Zacatecas-Instituto Politécnico Nacional, Zacatecas, México. ²Departamento Interacciones Planta-Insecto, Centro de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional.

*Corresponding author.

E-mail address: vesetave@hotmail.com (V. Segovia-Tagle).

Article history:

Received: 8 December 2016 / Received in revised form: 24 May 2017 / Accepted: 17 June 2017 / Published online: 1 July 2017

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.151>

ABSTRACT

Growth promoting bacteria have the ability to function as biofertilizers that provide the plant nutrients, as well as the production of phytohormones such as indole-acetic acid (IAA). The evaluated strains were isolated from onion crops soil of the city of Fresnillo, Zacatecas, Mexico. Six strains positive for the production of indole-acetic acid were obtained. All six strains were identified by DNA extraction and subsequent bidirectional sequencing of the 16S gene. The strain identified as *Pseudomonas cedrina* was the largest producer of indole-acetic acid with a value of $174 \pm 0.06 \mu\text{g} / \text{mL}$; the bacteria identified have potential to be used in the formulation of biofertilizers.

Keywords: Indole-acetic acid, phytohormones, 16s gene.

RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento tienen la capacidad de fungir como biofertilizantes que proveen a la planta nutrientes, así como con la producción de fitohormonas como el ácido indol-acético (IAA, por sus siglas en inglés). Se evaluaron muestras aisladas de suelo rizosférico de cultivos de cebolla de la ciudad de Fresnillo, Zacatecas, México. Se obtuvieron 6 cepas positivas

para la producción de ácido indol-acético. Las seis cepas se identificaron mediante la extracción de ADN y la posterior secuenciación bidireccional del gen 16S. La cepa identificada como *Pseudomonas cedrina* fue la mayor productora de ácido indol-acético con un valor de $174 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$; las bacterias identificadas presentan potencial para ser usadas en la formulación de biofertilizantes.

Palabras clave: Ácido indol-acético, fitohormona, gen 16s.

1. INTRODUCCIÓN

México es el doceavo productor de cebolla ocupando el 1% tanto de la superficie mundial como del volumen global. En 2013, la superficie sembrada de cebolla (*Allium cepa*) en México alcanzó las 44 mil hectáreas con un volumen estimado de 1.3 millones de toneladas. De la producción nacional, el 90% corresponde a cebolla blanca, 7% es morada, 2% amarilla y 1% cebollines. Zacatecas obtuvo una participación nacional de 13.1% en el 2012 con un estimado de 162.2 mil toneladas (SIAP-SAGARPA 2014). En el ámbito de la agricultura existe el desafío de aumentar el rendimiento y calidad en la producción en frutas y vegetales con el propósito de satisfacer las necesidades del consumidor evitando efectos adversos en el medio ambiente (Mader 2002). El suelo contiene diferentes grupos de microorganismos como bacterias, hongos, actinomicetos y algas que afectan la calidad y la salud de las tierras. La rizósfera es la región de intensa actividad microbiana, impulsado por la exudación de la raíz. La utilización de biofertilizantes se ha convertido en una práctica factible y se ha extendido su uso. Muchos biofertilizantes comerciales están basados principalmente en bacterias promotoras de crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés), que son microorganismos que benefician el desarrollo de la planta usualmente relacionado al incremento de nutrientes y a la disponibilidad de nitrógeno a la planta. Los beneficios que ofrecen consisten en incrementar los nutrientes en la zona de la raíz de la planta, la supresión de la muerte de las plantas (Zehnder *et al.*, 2001), a través de la producción de metabolitos como sideróforos que secuestran la producción de hierro, péptidos que actúan como bioestimulantes, síntesis de antibióticos, producción de fitohormonas (como el ácido indol-acético), enzimas y otras actividades asociadas, así como una mayor solubilización de fosfatos, competencia y colonización de la raíz y el suelo (Glick 1998). Todos estos factores contribuyen al incremento de la velocidad de germinación (Ahmad 2008). Las simbiosis planta-microorganismo son influenciadas por cambios ambientales en la tierra, como el estrés hídrico, salinidad, deficiencias de nutrientes, alcalinidad y acidez (Hungria 2000). La aplicación de PGPR en los cultivos es atractivo ya que reduce el uso de fertilizantes químicos y pesticidas que usualmente contaminan el medio ambiente y reducen la sustentabilidad. Esto tiene un alto impacto tanto en el suelo como en los seres vivos, ya que se evita la posible contaminación de agua, tierra y efectos en las cadenas tróficas. Entre las cepas reportadas como PGRP se encuentran los géneros de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, y *Bacillus*, estas pueden afectar la germinación de la semilla. Las bacterias son requeridas para la biosíntesis de la celulosa en la cubierta de la semilla. El objetivo de este estudio fue el aislamiento e identificación de cepas nativas del estado de Zacatecas que presenten producción de ácido indol-acético con la intención de ser usadas en la producción biotecnológica de biofertilizantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo de suelo y aislamiento de bacterias

Se realizó un muestreo al azar en un campo de cultivo de cebolla del municipio de Fresnillo, Zacatecas, México. Se tomaron 3 muestras de suelo rizosférico en cultivo de cebolla blanca (identificadas como C1 y C2) y 1 de cebolla morada (identificada como C3) a un diámetro de 5 cm de la raíz de la planta. Las muestras se transportaron en bolsas de polietileno al vacío protegidas del calor y de la luz solar hasta su llegada al laboratorio de Biología de la UPIIZ-IPN. Para el aislamiento se pesaron 10 g de muestra en condiciones asépticas diluyéndolos en 90 mL de solución salina 0.85% (10^{-1}). A partir de la primera dilución se realizaron diluciones hasta 10^{-4} . Las diluciones se sembraron por duplicado en agar nutritivo (MCD LAB®) y se incubaron por 24 h a 35°C. Se realizó la tinción de Gram para descartar las colonias que presentaban forma de coco ya que no se tienen reportadas como PGPR. Se seleccionaron las colonias que presentaron una morfología microscópica bacilar para su aislamiento. Una vez obtenido el cultivo puro se sembraron por estría simple en tubos con agar nutritivo y se incubaron a 35°C por 24 horas. Al término del periodo de incubación los tubos se refrigeraron a 4°C para su conservación.

2.2 Cinética de crecimiento bacteriano

Se realizó una curva de crecimiento para determinar los tiempos viables para realizar la medición de producción de IAA. Se prepararon matraces con 250 mL de caldo nutritivo enriquecido con 5 g de glucosa y se etiquetaron con el código de la cepa correspondiente; se inocularon con una suspensión de células igual al tubo número 3 de Nefelómetro de McFarland. Se colocaron en una agitadora a 120 rpm, 37°C por un periodo de 30 horas, midiendo la absorbancia cada hora en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda XLS a una longitud de onda de 540nm.

2.3 Determinación de producción de ácido indol-acético (IAA)

La producción de ácido indol-acético (IAA) se midió utilizando la técnica colorimétrica de Ehmann (Ehmann 1977). Las bacterias aisladas fueron inoculadas en medio caldo soya tripticaseína (MCD LAB®) adicionado con 0.01 mg de L-triptófano (Sigma- Aldrich) y fueron incubadas a 30°C por 24 horas. Para la medición se tomaron 1.5 mL de los matraces y se vaciaron en tubos Eppendorf los cuales se centrifugaron a 6600 rpm por 5 minutos, se tomó 1 mL del sobrenadante y se colocaron en tubos de ensayo donde posteriormente se adicionaron 2 mL de reactivo de Salkowsky (0.01 FeCl₂ en HClO₄), se dejó actuar durante 20 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 530 nm.

2.4 Extracción de ADN

Se realizó mediante el Kit de extracción y purificación de ácidos nucleicos Wizard Genomic A1120, de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del proveedor, omitiendo la RNAsa. Se añadieron 1.2 mL del cultivo bacteriano con 24 h de incubación a un tubo Eppendorf de 1.5mL. Se centrifugó la muestra a 14,000 rpm durante 2 minutos, se removió el sobrenadante resultante. Para las bacterias Gram positivas se resuspendieron en 500 µL de EDTA 50 mM adicionado con

150 μ L de lisozima. Se incubaron a 37°C por 60 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm removiendo el sobrenadante resultante; para las Gram negativas se omitieron estos pasos y se continuó con la metodología a partir de los siguientes pasos. A la pastilla se le añadieron 600 μ L de buffer de lisis nuclear mezclando por inversión. Se incubó durante 5 minutos a 80°C para después enfriarlo en hielo. Se agregaron 200 μ L de solución de precipitación de proteínas y se mezcló con ayuda del vortex. La muestra se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio con 600 μ L de isopropanol a 4°C mezclándose por inversión hasta que se precipitó el ADN. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm y se decantó. A la pastilla se le agregaron 500 μ L de etanol al 70% a 4°C por inversión. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos y se decantó el etanol dejando secar a temperatura ambiente entre 30-45 minutos, posterior a esto se rehidrató con 50 μ L de solución de rehidratación por 1 h a 65°C y finalmente por 24h a 4°C.

2.5 Electroforésis

Se mezclaron 2 μ L de colorante Diamond 1x y 5 μ L del ADN aislado, colocando esta mezcla en el pocillo del gel de agarosa 1%. Se corrió la electroforesis durante 20 minutos a 80V. La visualización de la electroforesis se realizó en el fotodocumentador Cell Biosciences Alphamager HP para observar los resultados de la extracción de ADN.

2.6 Amplificación del gen 16s ribosomal

Se tomaron los oligonucleótidos universales reportados por Campos y colaboradores en 2012. Con un tamaño de amplicón de 1400 pb, el ID del oligonucleótido fue Bac1 FW 5'-AGAGTTTGATCAG-3' y 5'-GCGGTGTGTACAAGGCCCG-3'.

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las bacterias seleccionadas se colocaron en un Termociclador Labnet Multigene Mini. El volumen final fue de 30 μ L, la reacción de PCR contenía 50 ng/mL de ADN y las condiciones de la reacción fueron primers Bac1 FW y 16 s-1400 (0.1mM) dNTPs (0.2 mM), buffer 1x y GoTaq DNA Polimerasa Bioline (0.125 U). Los ciclos del termociclador fueron desarrollados bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos (1 ciclo), 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg, 72°C por 30 seg (30 ciclos) y finalmente 72°C por 3 min (1 ciclo).

Para evaluar el producto de la amplificación, se mezcló con 3 μ L del colorante Diamond 1x y 3 μ L del producto de PCR colocando esta mezcla en el pocillo del gel de agarosa 1.5% agregando marcador Ladder Plus 100 pb en el primer pocillo. Se corrió la electroforesis durante 1h y 15 min a 80V. La visualización de la misma se realizó en el fotodocumentador Cell Biosciences Alphamager HP.

2.7 Secuenciación

Los fragmentos de ADN obtenidos se purificaron utilizando el protocolo de ExoSap-IT, la reacción se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 37°C por 30 min y 80°C por 15 min. Los productos purificados de PCR se secuenciaron por medio de la tecnología

Sanger en un secuenciador automático por capilaridad ABI PRISM 3100 en el laboratorio LANGEBIO-CINVESTAV.

2.8 Identificación molecular

Con las secuencias nucleotídicas se realizó la construcción de las secuencias consenso y la corrección de los cromatogramas utilizando el programa SeqMan V7.0.0 de la Suite Lasergene DNASTAR. Posteriormente las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos nr/nt del NCBI utilizando el programa BLASTn para la identificación de las bacterias aisladas.

3. RESULTADOS

3.1 Curva estándar de IAA

En total se aislaron 39 cepas de microorganismos, de las cuales 17 corresponden a bacterias y 22 a hongos los cuales se mantuvieron en congelamiento para posteriores análisis.

Se realizó una curva estándar para determinar la concentración de IAA producido ($\mu\text{g/mL}$).

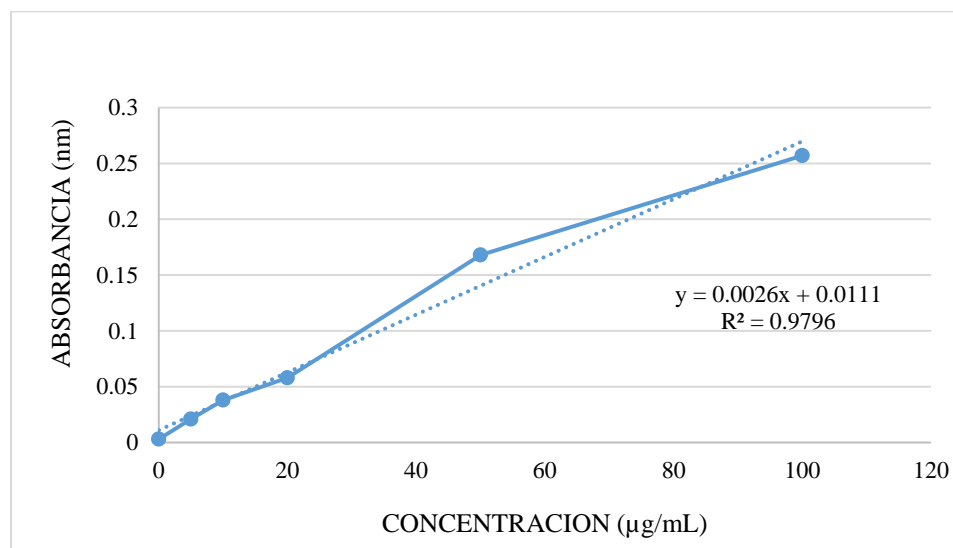


Fig. 1. Curva estándar de IAA.

3.2 Producción de IAA

Las cepas bacterianas que se consideraron positivas en la producción de IAA después de 24 horas de incubación se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de producción de IAA positivos.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
C3B3	13.42
C3B1	46.30 \pm 0.01
C1B3	174 \pm 0.06
C1B1	73.42
C2B4	49.76 \pm 0.01
C2B2	88.23 \pm 0.02

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para cada una de las bacterias aisladas a partir de la muestra de suelo que mostraron producción de IAA, fueron amplificadas mediante PCR punto final del gen 16s ribosomal. El tamaño teórico del amplicón es de 1400 pb.

En la figura 2 se muestran la amplificación de bacterias 1:C2B4; 2:C2B2; 3:C3B3; 4:C1B1; 5:C1B3; 6:T2B1; 7:C3B1.

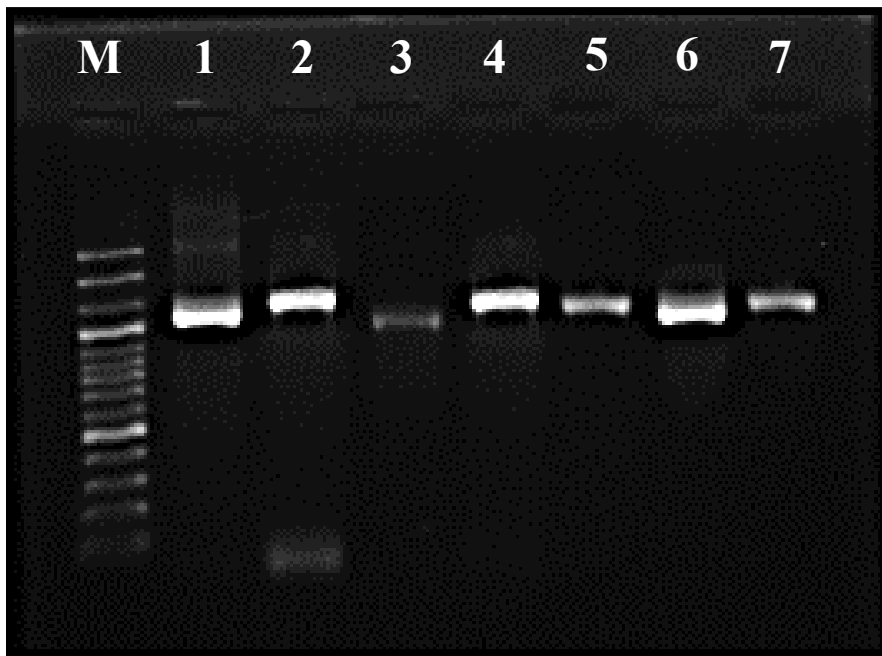


Fig. 2. Amplificación del gen 16s a 1200 pb Marcador Ldadder Plus 100 pb.

3.4 Construcción de los Contigs

El amplicón obtenido fue secuenciado bidireccionalmente con la tecnología Sanger con los mismos oligonucleótidos de la amplificación. A partir de los resultados de este último proceso se obtuvieron las secuencias consenso para cada una de las muestras.

3.5 Identificación molecular

Las secuencias consenso fueron comparadas con la base de datos nr/nt del NCBI, utilizando la herramienta BLASTn.

Tabla 2. Resultados de la Identificación Molecular.

Cepa	Contig (pb)	E-Value	% Similitud	Bacteria identificada
C2B4	1348	0.0	99% 1305/1307	<i>Bacillus megaterium</i>
C3B3	1356	0.0	99% 1303/1311	<i>Paenibacillus lautus</i>
C2B2	1345	0.0	94% 1212/1288	<i>Bacillus aryabhatai</i>
C1B3	1329	0.0	100% 1309/1309	<i>Pseudomonas cedrina</i>
C1B1	1347	0.0	99% 1314/1319	<i>Bacillus licheniformis</i>
C3B1	1342	0.0	99% 1306/1321	<i>Aeromonas salmonicida</i>

La tabla 2 muestra la identificación molecular de las cepas, seguido por los valores de e-value que representa la probabilidad de que el alineamiento realizado sea debido al azar, por lo que un valor de cero o cercano a este indica que entre la secuencia obtenida y la base de datos del NCBI la homología es verdadera.

4. DISCUSIONES

Las cepas bacterianas fueron sometidas a cinéticas de crecimiento para evaluar a que tiempo alcanzaban la fase estacionaria, donde el triptófano es metabolizado por la bacteria y genera el ácido indol-acético; dicha fase se presentó a las 24 horas de incubación. El IAA pertenece al grupo de fitohormonas que generalmente se consideran dentro de las auxinas más importantes. La auxina es una hormona reguladora de muchos aspectos en el crecimiento de la planta y su desarrollo, incluyendo división celular y elongación, diferenciación, tropismo, dominancia apical, senescencia, abscisión y florecimiento (Woodward & Bartel 2005).

Seis bacterias resultaron positivas en producción de IAA siendo estas las representadas en la tabla 1. La mayoría de los estudios recientes muestran que los organismos que producen IAA son en su mayoría Gram negativos (Lindow 1998). Se conocen pocas cepas Gram positivas que

produzcan IAA, una de ellas es el género *Bacillus* (Wahyudi *et al.*, 2011). Cuatro de las cepas aisladas resultaron ser Gram positivas.

Se ha reportado que la producción de IAA en las bacterias puede variar dependiendo de la especie y la cepa, y también está influenciada por la condición del medio de cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad del sustrato (Mutluru & Konada 2007).

El uso de la técnica de Van Urk Salkowski para la detección de IAA es una importante opción para determinaciones cualitativas y semi-cualitativas que aseguren la presencia de la hormona en el sobrenadante de los medios bacterianos. La cantidad de ácido indol-acético producido por la bacteria fue detectado por el reactivo de Salkowski (Ehmann 1997). El agente reacciona con IAA y no interactúa con otros isómeros que no sea el L-triptófano y N-acetil-L-triptófano (Vaghasiat *et al.*, 2011). Entre los positivos a la prueba las cepas C1B3 y C2B2 mostraron la mayor producción de IAA, 174 ± 0.06 y $88.23 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por otro lado los aislamientos C3B1, C1B1 y C2B4 mostraron una producción menor de IAA, en un intervalo de $13.42\text{-}73.42 \mu\text{g/mL}$, esto probablemente debido a la utilización de precursores de IAA en la síntesis de proteínas y la formación de otros compuestos de indol distintos del IAA (Dullaart 1970).

La producción de esta auxina se incrementa cuando el medio es suplementado con un precursor del IAA; el triptófano está confirmado como precursor por (Mutluru & Konada 2007). La propiedad de sintetizar IAA es considerada como una herramienta efectiva para evidenciar microorganismos benéficos en términos de producción de IAA y que tienen efectos en el crecimiento de las plantas (Wahyudi *et al.*, 2011). La inoculación con bacterias productoras de IAA inducen la proliferación de la raíz así como también muestran mejoras en la velocidad de germinación y velocidad de crecimiento de la planta, entre otras características de los PGPR (Zarrin *et al.*, 2009).

Uno de los genes más ampliamente utilizados en la identificación molecular de microorganismos es el 16s ribosomal, ya que es un gen muy corto, con solo 1,542 pares de bases, y que puede ser rápidamente secuenciado. Los oligonucleótidos empleados en este estudio fueron diseñados, alineando la secuencia nucleotídica del gen 16s ribosomal de organismos de distintos géneros, en particular de *Escherichia coli*; por lo que se consideran universales ya que se diseñaron en regiones conservadas en secuencia nucleotídica del gen 16s.

Es importante recalcar que BLASTn puede realizar un alineamiento local por lo que puede arrojar valores erróneos de similitud por lo que para todos los casos se tomó en cuenta que la longitud de la secuencia alineada fuera cercana a los 1400 pb. A partir de la secuenciación bidireccional se obtuvieron secuencias de longitudes de 1329 nucleótidos en la cepa C1B3, alineando 1309/1309 obteniendo el 100% de similitud. Esta muestra se identificó como *Pseudomona cedrina*. Para la muestra C3B1 se obtuvieron 1342 nucleótidos, alineando 1306/1321 obteniendo el 99% de similitud la cual arrojó 2 resultados los cuales fueron *Aeromona bestiarium* y *Aeromona salmonicida*, aunque realizando un análisis más profundo en la secuencia nucleotídica se encontró que la cepa era *Aeromona salmonicida* ya que posee una semejanza nucleotídica en las posiciones 978 y 495.

Para la muestra C1B1 a partir de la secuencia se obtuvieron 1,342 nucleótidos alineando 1306/1321 obteniendo el 99% de similitud y arrojando 6 opciones de cepas para esta muestra, las cuales fueron *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis* y *Bacillus subtilis*; por lo que se procedió a analizar la secuencia de nucleótidos, observando que la cepa *Bacillus licheniformis* poseía menor diferencia nucleotídica en comparación con las demás.

Las múltiples opciones que aparecieron en cada una de las comparaciones son debidas a que las especies del género *Bacillus*, están estrechamente relacionados, llegando a ser difícil distinguirlas mediante el análisis de secuencia del gen 16s ribosomal, ya que no hay suficiente divergencia en este gen, dificultando la identificación de estas especies (Wang *et al.*, 2007).

La mayoría de las bacterias rizosféricas como las *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* tienen alta capacidad de producción de ácido indol-acético, y solubilización de fósforo y potasio, así como atributos de biocontrol como lo es la producción de HCN, sideróforos, enzimas hidrolíticas y antibióticos (Verna 2012).

Existen fuertes evidencias que sugieren que el género *Paenibacillus* pertenecen al grupo de las bacterias PGPR, entre cuyas características destacan la producción de antibióticos y formación de biofilms (Timmusj, Grantcharova *et al.*, 2005). La *Aeromonas salmonicida* es una bacteria patógena para los seres humanos, sin embargo es una bacteria destacada en su capacidad de producción de IAA siendo utilizada como bacteria PGPR.

Las bacterias identificadas deben ser estudiadas interactuando con la planta de cebolla, para evaluar su posible uso en la producción biotecnológica de biofertilizantes, que contribuyan a disminuir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Ahmad F. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163(2): 173-181.

Bhowmick P. B. 1986. Production of indole acetic acid by *Rhizobium sp.* from root nodules of leguminous tree *Sesbania grandiflora* Pers. *Acta Microbial Polon.* 35: 181-190.

Datta C. B. 2000. Indole-acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub *Canajou cojan*. *Microbiological Research*. 155(2): 123-127.

Dullaart J. 1970. The auxin content of root nodules and roots of *alnus glutinosa*. *Journal of Experimental Botany*. 21(4): 975-984.

Ehmann A. 1977. The Van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography*. 132(2): 267-276.

- Glick B., Penrose D. & Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 190(1): 63-68.
- Hungria M. & Vargas M. 2000. Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*. 65(2): 151-164.
- Jimenez-Delgadillo M. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que codifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Phd Dissertation Cinvestav Unidad Irapuato.
- Lindow E., Desurmont C., Elkins R., McGourty G., Clark E. & Brandl M. Occurrence of Indole-3-acetic acid producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Phytopathology*. 88(11): 1149-1157.
- Mader P., Fliessbach A., Dubois D., Gunst L., Fried P. & Niggli U. 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*. 296(5573): 1694-1697.
- Mutluru S. & Konada V. 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of Green manure crop. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(3): 178-182.
- SIAP-SAGARPA 2014. Panorama de Cebolla. Obtenido de Dirección General de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la Información. www.finacierarural.gob.mx. (Consultado el 18 de Noviembre de 2016).
- Vaghasiat H., Pater G., Chudasama R. & Bhatt K. 2011. Screening of IAA from rhizospher microflora of field crops. *Bioscience Discover*. 2(1): 94-100.
- Verma J., Yadav J. & Nath T. 2012. Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous *Mesorrhizobium spp.* and plant growth promoting rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 43(2): 605-621.
- Wahyudi A., Puji r., Widyawati A., Meryandini A. & Nawangsih A. 2011. Characterization of *Bacillus sp. strains* isolated from rizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 3(2): 34-40.
- Wang L., Lee F., Tai C. & Kasai H. 2007. Comparison of gyrB gene sequences, 16s rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridiation in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(8): 1846-1850.
- Woodward A. & Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, action and interaction. *Annals of Botany*. 95(5): 707-735.
- Zarrin F., Saleemi M., Zia M., Sultan T., Aslam M., Rehman RU. & Chaudhary FM. 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African Journal of Biotechnology*. 8(2): 219-225.
- Zehnder G., Murphy J., Sikora E. & Kloepper J. 2001. Application to rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*. 107(1): 39-50.