

## Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp.

### Germination, growth and glucanase production in *Capsicum chinense* Jacq. inoculated with *Bacillus* spp.

Marino Sosa-Pech<sup>1</sup>, Esaú Ruiz-Sánchez<sup>1</sup>, José María Tun-Suárez<sup>1</sup>, Luis Leonardo Pinzón-López<sup>1</sup>, Arturo Reyes-Ramírez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Conkal, Avenida Tecnológico s/n, CP. 97345. Conkal, Yucatán, México.

\*Autor de correspondencia: arturo.reyes@itconkal.edu.mx

**Nota científica recibida:** 18 de abril de 2018 **aceptada:** 27 de julio de 2018

**RESUMEN.** Las rizobacterias promueven el crecimiento vegetal e inducen la acumulación de proteínas de defensa, por lo que el objetivo fue cuantificar la producción de ácido indolacético (AIA) en cinco aislados de *Bacillus* spp. Los aislados con mayor producción de AIA se usaron para evaluar la germinación, crecimiento e inducción de las B-glucanasas en plántulas de chile habanero. Los aislados CBRF5, CBRF12 y CBCC57 produjeron AIA desde las 24 h de incubación con 6.66, 7.95 y 7.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Los aislados CBCC57 y CBRF5 disminuyeron el porcentaje de germinación, mientras que CBRF12 no tuvo efecto significativo. Los aislados CBCC57 y CBRF12 aumentaron el área foliar y biomasa seca en las plántulas. Se observó aumento significativo en la actividad de B-glucanasas con el aislado CBCC57 en relación a CBRF12 y CBRF5. Los resultados muestran que *Bacillus* CBRF12 y CBCC57 tienen potencial como promotoras del crecimiento de plántulas de chile habanero.

**Palabras clave:** Ácido indolacético, chile habanero, índice de calidad, rizobacterias.

**ABSTRACT.** Rhizobacteria promote plant growth and induce accumulation of defense proteins, so the objective of this study was to quantify the production of indoleacetic acid (IAA) in five isolates of *Bacillus* spp. The isolates with the highest IAA production were used to evaluate germination, growth and induction of B-glucanases in habanero pepper seedlings. Isolates CBRF5, CBRF12 and CBCC57 produced IAA from 24 h of incubation with 6.66, 7.95 and 7.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Isolates CBCC57 and CBRF5 decreased the germination percentage, while CBRF12 had no significant effect. Isolates CBCC57 and CBRF12 increased leaf area and dry biomass in the seedlings. A significant increase in B-glucanase activity was observed with isolate CBCC57 in relation to CBRF12 and CBRF5. Results show that *Bacillus* CBRF12 and CBCC57 have potential as growth promoters of habanero pepper seedlings.

**Key words:** Indoleacetic acid, habanero pepper, quality index, rhizobacteria.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), es un producto de importancia económica, debido a su consumo fresco y como materia prima para la elaboración de productos industriales. Tradicionalmente su manejo agronómico se basa en el uso de fertilizantes de origen químico, así como en el control de plagas y enfermedades (Castillo-Aguilar *et al.* 2015). Un manejo de cultivo con menor impacto ambiental podría lograrse con el

uso de microorganismos rizosféricos, que son benéficos para las plantas; por ejemplo, varias especies de *Bacillus* son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Dentro de los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal, se encuentra la producción de fitoreguladores como las auxinas; principalmente el ácido indolacético (AIA). El AIA induce la deformación y el aumento de pelos radicales logrando mayor captación de nutrientes, promoviendo el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Park *et al.* 2005). Al respecto *Bacillus* pro-

duce AIA en niveles de entre 3.1 y 21.6  $\mu\text{mL}^{-1}$  a las 16 h de incubación (Ji *et al.* 2014), lo que permite considerarlos como potenciales RPCV. Se ha observado que *B. subtilis* aumenta el porcentaje de emergencia y promueve el crecimiento de la planta de tomate (Cabra-Cendales *et al.* 2017) y el crecimiento de chile (Peña-Yam *et al.* 2016).

Las RPCV tienen la capacidad de inducir mecanismos de resistencia sistémica inducida (RSI), que depende de la señalización de ácido jasmónico y etileno, y la resistencia sistémica adquirida (RSA) mediada por el ácido salicílico, cuya acción principal se refleja en la disminución de síntomas de las enfermedades (Samaniego-Gómez *et al.* 2017). En el caso de *Bacillus* las evidencias indican que puede activar la RSI, *B. cereus* activa mecanismos de RSI y RSA en *Arabidopsis thaliana* por medio de la señalización simultánea del jasmonato y el etileno, y la activación de la ruta del ácido salicílico (Niu *et al.* 2011). Por otra parte, *Bacillus* también induce acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (PR), en ensayos enzimáticos en remolacha tratada con *B. mycoides* incrementó la actividad de las proteínas PR, como las quitinasas,  $\beta$ -1, 3-glucanasas y peroxidasas, lo que es un indicador de resistencia sistémica (Bargabus *et al.* 2002). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres aislados nativos de *Bacillus* como promotores del crecimiento en plántulas de chile habanero y determinar su efecto en la actividad enzimática de las glucanasas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos utilizados

Se utilizaron cinco cepas de *Bacillus* aisladas de muestras de suelos en el estado de Yucatán, México. Las bacterias se sembraron en agar nutritivo (AN) y se verificó las características de la clase Bacilli, morfología de forma bacilar, Gram positivas, formación de esporas y reacción catalasa positivo.

### Producción de ácido indolacético

Se determinó la producción de auxinas, como equivalente de ácido indolacético (AIA) de cinco ais-

lados de *Bacillus* spp., las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo (CN) suplementado con L-triptófano a una concentración final de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , a 30 °C y 200 rpm durante 72 h. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante cada 24 h por centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min. Al sobrenadante obtenido se le cuantificó la producción de AIA utilizando el reactivo de Salkowski (98.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 1.5 mL de 0.5 M  $\text{FeCl}_3$ ). A 1 mL del sobrenadante se le adicionó 2 mL del reactivo y se incubó en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min (Meudt y Gaines 1967). Se realizaron tres repeticiones por aislado bacteriano. La concentración se determinó en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 535 nm utilizando una curva estándar de AIA.

### Pruebas de germinación de semillas de chile habanero

Para la prueba de germinación, las semillas se sumergieron en 2% de  $\text{HClO}_4$  durante 3 min seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se inocularon con la suspensión de cada aislado bacteriano ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) y se mantuvo en agitación a 120 rpm durante 1 h, se retiró y dejó secar. Se utilizaron tres aislados bacterianos y un testigo sin inoculación bacteriana que consistió de solución salina estéril. Posteriormente, se colocaron 20 semillas en cajas Petri de 90 x 15 mm con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, considerando 10 repeticiones por tratamiento y la caja como la unidad experimental. Con el conteo de semillas que presentaron protrusión se calculó el porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación y la velocidad media de germinación de acuerdo con Ranal *et al.* (2009). Los tratamientos se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar, para el análisis de los datos los resultados en porcentaje se transformaron con la fórmula  $\arccos \sqrt{x}/100$ .

### Promoción de crecimiento en chile habanero

Para las pruebas de promoción del crecimiento, las semillas de chile habanero se inocularon por inmersión en una suspensión de bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) a 30 °C y 120 rpm durante 1 h. Las semillas inoculadas se sembraron en charolas de

poliestireno de 200 cavidades con una mezcla estéril de suelo y cosmopaet (50:50), a los 30 días se determinó el diámetro del tallo, altura de la planta, biomasa seca y el área foliar con un Medidor de Área Li-Cor 3100. Posteriormente, las plántulas se trasplantaron de forma individual en vasos de poliestireno de 900 mL que contenía 120 g de la mezcla de suelo y cosmopaet (50:50), realizando una segunda inoculación en la base del tallo de la plántula con 5 mL de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Como testigo se utilizaron plántulas sin inoculación bacteriana, en todos los tratamientos se utilizaron cinco repeticiones. Estas plantas se utilizaron para determinar los índices de calidad y la producción de B-glucanasas.

### Índice de calidad

Para integrar los valores obtenidos en el crecimiento de las plantas, a los 45 días después del trasplante se determinó el Índice de Calidad de Dickson (ICD) calculado como el cociente entre el peso seco total y la sumatoria del índice de esbeltez (IE, cociente entre la altura y el diámetro del tallo), y el peso seco aéreo/peso seco radical (Dickson *et al.* 1960).

### Determinación de actividad B-glucanasas

El contenido de proteínas y la actividad enzimática de glucanasas en las plántulas de chile habanero se realizó a las 24 y 72 h después de la segunda inoculación. Para la extracción del extracto proteico se utilizó 1 g de hojas frescas que se maceró con nitrógeno líquido, adicionando 2 mL del amortiguador de extracción (0.1 M de acetato de sodio, pH 5.2) (Rodríguez *et al.* 2004). El macerado se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La actividad de la  $\beta$ -1,3-Glucanasa se determinó con la medición de azúcares reductores con 1% de laminarina como sustrato (Abeles y Forrence 1970), se utilizó 100  $\mu$ L de sustrato a un volumen final de 500  $\mu$ L en 0.05 M de citrato de sodio pH 5.0. Para el blanco el extracto se incubó a baño maría a 100° C durante 5 min. Las muestras se incubaron a 37° C, por 1 h. Posteriormente, se determinaron azúcares reductores (Miller *et al.* 1959), agregando 1.5 mL de DNS (ácido 3, 5-dinitrosalicílico), las

muestras se colocaron a baño maría a ebullición por 5 min y se enfriaron en hielo. Se leyó la absorbancia a 492 nm y la concentración se calculó con una curva estándar de glucosa. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976) utilizando como curva estándar albumina sérica bovina. Una unidad de actividad enzimática (UE) se expresó como  $\mu$ mol de glucosa producido por mg<sup>-1</sup> de proteína. Se utilizó un diseño completamente al azar, los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron cinco cepas de *Bacillus*, las cuales produjeron AIA entre 4.84 y 8.59  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Tabla 1). Los aislados CBRF12, CBCC57 y CBRF5 fueron los que mostraron mayor producción de AIA. La producción de AIA se observó desde las 24 h de incubación, en donde se mantuvo de forma constante, sin embargo, en el caso del aislado CBRF5 se observó una disminución significativa a las 72 h con relación a las 48 h. Los valores obtenidos están dentro del rango reportado para cepas de *Bacillus* (Luna *et al.* 2013). El AIA es uno de los metabolitos secundarios producidos por bacterias y es abundante durante la fase estacionaria del crecimiento celular (Wahyudi *et al.* 2011), la producción de AIA se detectó desde las 24 h de incubación, este tiempo puede ser suficiente para estudios preliminares en la detección de *Bacillus* productores de AIA. La producción de AIA es un indicador del potencial de las rizobacterias como promotores de crecimiento, ya que estimula el desarrollo del sistema radical de la planta hospedera (Patten y Glick 2002).

El porcentaje de germinación fue significativamente mayor en las semillas inoculadas con el aislado CBRF12 y el testigo, comparado con lo observado en las semillas tratadas con los aislados CBCC57 y CBRF5 en los que se detectó disminución del porcentaje de germinación. La inoculación con CBRF12 mostró menor tiempo de germinación y mayor velocidad de germinación en comparación con la inoculación de los aislados CBCC57 y CBRF5

**Tabla 1.** Cuantificación de ácido indol acético producido por aislados de *Bacillus* spp. en medio caldo nutritivo suplementado con L-triptófano.

Aislados	Ácido indolacético ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
	24 h	48 h	72 h
CBRF12	7.95 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	8.59 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	7.83 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
CBCC57	7.05 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	8.36 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>	7.57 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>
CBRM19	4.91 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	4.90 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	5.20 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
CBMT2	4.84 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	4.73 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	4.13 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
CBRF5	6.66 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	6.77 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	5.93 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

(Tabla 2). Al respecto, Luna *et al.* (2013) reportan que la aplicación de *Bacillus* sp. MA06 en pimiento aumentó el porcentaje de germinación en un 8.0%, pero tres cepas de *Bacillus* no mostraron diferencia significativa con relación a las semillas sin inocular. Mientras que Díaz-Vargas *et al.* (2001) reportaron el efecto de rizobacterias en la germinación de semillas de lechugas, incrementando la germinación el 76.6% de las cepas, 10% no tuvieron efecto y 13.3% la redujeron, por lo que las rizobacterias podrían tener otros mecanismos o metabolitos que afecten la germinación de semillas. En tanto que Wahyudi *et al.* (2011) reportan que las cepas de *Bacillus* spp. productoras de AIA podrían tener efectos negativos en la germinación de semillas, debido a la complejidad de la interacción entre la bacteria productora de AIA y el proceso de germinación, lo que puede dar estos resultados diferenciales en la germinación de semillas por la aplicación de rizobacterias. Al respecto, Shu *et al.* (2016) mencionan que el balance entre gibberelinas y ácido abscísico determina principalmente la inducción de la germinación de semillas y que el AIA inhibe la germinación al reprimir la acción del ácido giberélico (AG). Por lo que coinciden los resultados de inhibición de la germinación observados con los aislados CBCC57 y CBRF5. Esto puede deberse, a que las semillas no latentes como las utilizadas en este estudio (93% de germinación en el testigo), responden de manera diferente a la presencia de concentraciones externas de AIA y otros reguladores de crecimiento vegetal. Sin embargo, las pruebas de germinación nos permiten seleccionar cepas que no afecten de forma negativa este proceso y presentar un efecto posterior a la germinación de semillas.

**Tabla 2.** Efecto en la germinación de semilla de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Aislados	G (%)	$\bar{t}$ (d)	$\bar{v}$ (d <sup>-1</sup> )
CBCRF12	96.5 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	5.86 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	0.172 $\pm$ 0.013 <sup>ac</sup>
CBCC57	67.0 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>	7.16 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>	0.141 $\pm$ 0.015 <sup>bc</sup>
CBFR5	44.0 $\pm$ 15.6 <sup>c</sup>	7.37 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	0.136 $\pm$ 0.008 <sup>c</sup>
Testigo	93.5 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	6.52 $\pm$ 0.81 <sup>bc</sup>	0.155 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>

G = germinación,  $\bar{t}$  = tiempo medio de germinación,  $\bar{v}$  = tasa media de germinación, Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En los ensayos de promoción de crecimiento a nivel de plántulas de chile habanero, se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos, los aislados CBCC57 y CBRF12 promovieron el crecimiento en altura de planta y área foliar. Para la producción de biomasa seca se observó efecto significativo en el aislado CBCC57 con respecto al testigo (Tabla 3). Al respecto, Kokalis-Burelle *et al.* (2002) encontró que la formulación LS256 (*Bacillus subtilis* GBO3 y *B. pumilis* INR7) promovió el crecimiento del tallo, raíz y parte aérea en plántulas de chile. Con respecto al aislado *Bacillus* CBCC57 se observó un incremento del 33% en peso seco.

El índice de calidad de Dickson, es un parámetro que combina información del índice de esbeltez y la relación parte aérea y raíz con el peso total de la planta, por lo que un mayor índice representa plantas de mejor calidad (Díaz *et al.* 2013). En los aislados CBCC57 y CBRF12 que tuvieron un índice de Dickson mayor al testigo, indica que estos aislados promovieron el crecimiento (Tabla 3). Por lo que los índices de calidad podrían dar una estimación más confiable para determinar el efecto de bacteria en la promoción de crecimiento, ya que el peso fresco de la planta es impreciso (Huang *et al.* 2017). En la determinación de B-glucanasas, no se observaron diferencias significativas entre las plántulas inoculadas con *Bacillus* spp. y las plántulas testigos. Pero se observó un aumento significativo en la actividad enzimática de glucanasas con la inoculación del aislado CBCC57 en comparación con los aislados CBRF5 y CBRF12, a las 24 y 72 h después de la segunda inoculación (Tabla 4). Se tuvo mayor cambio en la glucanasas en los aislados CBCC57 y CBRF5 entre las 24 y 72 h, al respecto Seo *et al.* (2012) indica que las enzimas PR tienen variación con el tiempo. La inoculación

**Tabla 3.** Variables de crecimiento e índice de calidad en plántulas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Aislados	DT (mm)	AP (cm)	AF(cm <sup>2</sup> )	BS (mg)	IE	ICD <sup>1</sup>
CBCRF12	1.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.07 <sup>ab</sup>	6.19 ± 0.59 <sup>a</sup>	52.5 ± 8.13 <sup>ab</sup>	4.35 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.07 <sup>a</sup>
CBCC57	1.86 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.21 <sup>a</sup>	5.72 ± 0.49 <sup>a</sup>	56.14 ± 9.80 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.05 <sup>a</sup>
CBFR5	1.56 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.56 ± 0.18 <sup>ab</sup>	5.23 ± 0.55 <sup>ab</sup>	47.68 ± 8.06 <sup>ab</sup>	3.52 ± 0.51 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>b</sup>
Testigo	1.68 ± 0.08 <sup>ab</sup>	3.26 ± 0.33 <sup>b</sup>	4.42 ± 0.54 <sup>b</sup>	42.00 ± 3.92 <sup>b</sup>	3.96 ± 0.27 <sup>bc</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>b</sup>

Diámetro del tallo (DT), Altura de la planta (AP), Área foliar (AF), Biomasa seca (BM), Índice de esbeltez (IE), Índice de calidad de Dickson (ICD). Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05), <sup>1</sup>(Kruskal-Wallis, 0.05).

de *Bacillus* modifica la actividad de las enzimas PR en diferentes cultivos, incrementó la actividad de glucanasas en remolacha (Bargabus et al. 2002). Mientras que Neher et al. (2009) observaron que *Bacillus mycoides* indujo un 105% la actividad de las quitinasas y un 135% la glucanasas en pepino.

De acuerdo con los resultados obtenidos los aislados CBRF12 y CBCC57 (*Bacillus*) son bacterias productoras de AIA, aunque no incrementan de forma significativa el porcentaje y tiempo de germinación, tienen un efecto en el crecimiento de chile habanero en altura de la planta, área foliar y biomasa seca, por lo que la inoculación con *Bacillus* mejora la calidad de las plántulas, pero se requieren estudios a nivel de campo para valorar el efecto en el desarrollo y producción de chile habanero.

**Tabla 4.** Actividad de β-glucanasas en plántulas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Aislados	Actividad enzimática B-glucanasas (UE mg proteína <sup>-1</sup> )	
	24 h	72 h
CBRF12	8.41 ± 0.23 <sup>b</sup>	7.25 ± 1.94 <sup>b</sup>
CBCC57	12.82 ± 0.19 <sup>a</sup>	10.52 ± 0.11 <sup>a</sup>
CBRF5	9.15 ± 0.93 <sup>b</sup>	6.98 ± 0.84 <sup>b</sup>
Testigo	10.36 ± 1.76 <sup>ab</sup>	8.36 ± 0.5 <sup>ab</sup>

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento de este trabajo (Proyecto 6313.17-P).

## LITERATURA CITADA

- Abeles FB, Forrence LE (1970) Temporal and hormonal control of β-1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology 45: 395-400.
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE, Jacobsen BJ (2002) Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. Physiological and Molecular Plant Pathology 61: 289-298.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.
- Cabra-Cendales T, Rodríguez-González CA, Villota-Cuasquer CP, Tapasco-Alzate OA, Hernández Rodríguez A (2017) *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). Acta Biológica Colombiana 22: 37-44.
- Castillo-Aguilar C, Quej-Chi V, Coh-Méndez D, Carrillo-Ávila E, Monsalvo-Espinosa A (2015) Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agroproductividad 8: 73-78.
- Díaz P, Torres D, Sánchez Z, Arévalo L (2013) Comportamiento morfológico de cedro (*Cedrela odorata*) y caoba (*Swietenia macrophylla*) en respuesta al tipo de sustrato en vivero. Folia Amazonica 22: 25-33.
- Díaz-Vargas P, Ferrera-Cerrato R, Almaraz-Suárez JJ, Alcantar-Gonzalez G (2001) Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra Latinoamericana 19: 327-335.

- Dickson A, Leaf AL, Hosner IE (1960) Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *Forest Chronicle* 36: 10-13.
- Huang P, de-Bashan L, Crocker T, Kloepper JW, Bashan Y (2017) Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of crop plants. *Biology and Fertility of Soils* 53: 199-208.
- Ji SH, Gururani MA, Chuna SC (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research* 169: 83-98.
- Kokalis-Burelle K, Vavrina CS, Roskopf EN, Shelby RA (2002) Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* 238: 257-266.
- Luna ML, Martínez PRA, Hernández IM, Arvizu MSM, Pacheco AJR (2013) caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 63-69.
- Meudt WJ, Gaines TP (1967) Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes. I. Colorimetric determination of indole-3-acetic acid oxidation products. *Plant Physiology* 42: 1395-1399.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-8.
- Neher OT, Johnston MR, Zidack NK, Jacobsen BJ (2009) Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of Anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control* 48: 140-146.
- Niu DD, Liu HX, Jiang CH, Wang YP, Wang QY, Jin HL, et al. (2011) The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 24: 533-542.
- Park M, Chungwoo K, Yanga J, Hyoungseok L, Wansik S, Seunghwan K, et al. (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133.
- Patten CL, BR Glick (2002) Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- Peña-Yam LP, Ruiz-Sánchez E, Barboza-Corona JE, Reyes-Ramírez A (2016) Isolation of mexican *Bacillus* species and their effects in promoting growth of chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv Jalapeño). *Indian Journal of Microbiology* 56: 375-378.
- Ranal MA, Santana DG, Ferreira WR, Mendes-Rodriguez C (2009) Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 849-855.
- Rodríguez AT, Ramírez MA, Falcón AB, Guridi F, Cristo E (2004) Estimulación de algunas enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) obtenidas de semillas tratadas con quitosana. *Cultivos Tropicales* 25: 111-115.
- Samaniego-Gómez BY, Reyes-Ramírez A, Moreno-Valenzuela O A, Tun-Suárez JM (2017) Resistencia sistémica inducida hacia virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal* 32: 10-22.

- Seo DJ, Nguyen DMC, Song YS, Jung WJ (2012) Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 407-415.
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH (2016) Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant* 9: 34-45.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A, Meryandini A, Nawangsih AA (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40.