

Aislamiento e identificación de bacterias cultivables de la zona de raíz de granada roja (*Punica granatum*) en un huerto del Tephé Ixmiquilpan, Hidalgo, México

Campoy Otero Emelia¹, Santana Vázquez Armando¹ Estrada Bárcenas Daniel², Estrada Mora Juan Carlos², Hernández Moreno Mayra Mónica¹, Aguilar Ayala Ismael¹

¹Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, C.P. 54090, Estado de México.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV, IPN. Avenida IPN 2508, San Pedro Zacatenco, GA Madero, C.P. 07360, Ciudad de México.

*Autor para correspondencia: ecojc@unam.mx

Recibido:

18/marzo/2020

Aceptado:

31/octubre/2020

Palabras clave:

Piocianina,
bacteriocinas,
rizobacterias

Keywords:

Pyocyanin,
bacteriocins,
rhizobacteria

RESUMEN

La microbiota bacteriana asociada a la zona de raíz sintetiza ácidos orgánicos, fitohormonas, péptidos, pigmentos y metabolitos bioactivos. Se determinó la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) del suelo, textura y pH. Los aislamientos bacterianos se identificaron mediante pruebas morfológicas y el metabolismo a través del sistema API20NE para el género *Pseudomonas*. El análisis molecular de PCR utilizando iniciadores universales para la secuenciación del gen 16s ARNr. La secuencia consenso resultante de cada una de los aislados se comparó con el programa nBLAST del Centro Nacional NCBI. El suelo resulto ser Franco-arenoso con un pH de ligeramente a moderadamente alcalino y una CICT de bajo a medio. Se identificaron las especies *Bacillus subtilis*, *Erwinia bilingea* en la zona de raíz y *Pseudomonas soli*, *P. oryzihabitans*, *P. putida* y *P. chlororaphis* como endofíticas. *P. soli* ha sido descrita recientemente (2014), con nuevo registro. *P. oryzihabitans*, es nativa de la rizosfera.

ABSTRACT

The bacterial microbiota associated with the root zone synthesizes organic acids, phytohormones, peptides, pigments and bioactive metabolites. The Cation Exchange Capacity (CEC) of the soil, texture and pH were determined. Bacterial isolates were identified by morphological tests and metabolism through the API20NE system for the genus *Pseudomonas*. Molecular PCR analysis using universal primers for 16s rRNA gene sequencing. The consensus sequence resulting from each of the isolates was compared with the NCBI National Center's nBLAST program. The soil was found to be sandy loam with a pH of slightly to moderately alkaline and a CICT of low to medium. The species *Bacillus subtilis*, *Erwinia bilingea* in the root zone and *Pseudomonas soli*, *P. oryzihabitans*, *P. putida* and *P. chlororaphis* were identified as endophytic. *P. soli* has been described recently (2014), with a new record. *P. oryzihabitans*, is native to the rhizosphere.



Introducción

frutales domesticados, se originó en el sur de Asia y fue ampliamente cultivada desde la India hasta el Mediterráneo durante tiempos antiguos (4000 a 3000 años antes de Cristo). En América fue introducida por los españoles durante la conquista, adaptándose a zonas cálidas y áridas de México y Estados Unidos. Los principales países productores y exportadores incluyen a China, India e Israel, Egipto, España. En América del Sur Perú, Chile, Argentina y Brasil son los principales productores. El rendimiento habitual por árbol es de 40 a 50 kg con un promedio de 15 a 20 Ton/hectárea, en plantaciones tecnificadas se logran productividades de 25 a 30 Ton/hectárea, dependiendo de la variedad (Espinoza et al., 2017)

La planta se caracteriza por crecer como arbusto o en forma de árbol con alturas que van de los 5 a 10 metros, aunque algunos son enanos de 1 a 2 metros con raíces nudosas, sus frutos son globosos climatéricos de 5–12 cm de diámetro, los cuales maduran unos seis a siete meses después de la floración, alcanzando un peso de 200 a 700 gramos, las flores pueden presentarse solitarias, en parejas o racimos. Los óptimos rendimientos del cultivo se dan en suelos bien drenados, arcillosos con mínima profundidad de 30 centímetros, además de ser tolerante a suelos calcáreos y pH alcalino.

En los países donde se siembra granada los cultivos se desarrollan en suelos con arcillas pesadas, franco arcilloso, francos, arcilloso-arcilloso, arenosos ricos en humus, tierra negra (Chernozem), suelos amarillos (Zheltozen), suelos aluviales, colinas rocosas secas, suelos alcalinos, suelos ricos en cal, en podzol-arcilla, arenas costeras y gravas; no obstante, los mejores suelos para su cultivo considerados fértiles son aquellos ricos en humus, con buen drenaje (Teixeira da Silva et al., 2013). Es un frutal estrictamente de riego, siendo más tolerante al exceso de humedad que a las sequías (Velázquez, 2017).

En México, crece en un clima subtropical, tropical seco o semiárido con verano lluvioso, a altitudes que van de 740 m.s.n.m. en Cuatro Ciénegas, Coahuila hasta los 1850 m.s.n.m., en Apaseo el Alto Guanajuato, en Sonora, Baja California y Chihuahua (Mondragón y Juárez, 2008; Mondragón, 2012), en Hidalgo (Escudero, 2016). En Guanajuato, uno de los principales cultivares comerciales es 'Apaseo', que se caracteriza por tener frutos grandes color amarillo-anaranjado y sabor dulce, y el 'Apaseo tardía' (Velázquez, 2017).

La mayor parte de la granada mexicana se consume como fruta fresca, se utiliza como materia prima para fabricar licores a nivel artesanal, como bebida refrescante, jugos (Mondragón, 2012, Espinoza et al., 2017).

El conocimiento que se tiene es sobre su importancia económica, cultural, nutritiva y fitoquímica. Es rica en vitaminas, principalmente vitamina K, lípidos, azúcares y fibra, minerales como potasio y fósforo, es fuente mediana de folatos, con un alto contenido en antioxidantes como fenoles, polifenoles y antocianinas, se le atribuyen propiedades nutraceuticas y farmacológicas (López-Mejía et al., 2010).

Desde el punto de vista microbiológico, existen pocos estudios relacionados con especies fitopatógenas, asociadas a los cultivos de granada, se ha reportado la presencia de hongos en suelo, hoja, tallo y raíz, y en fruto, sobre todo cuando éste se encuentra almacenado o en anaquel, con grandes pérdidas económicas en cosecha o postcosecha, entre los géneros de importancia que se cita, se encuentra al género *Xantomonas Pseudomonas*, *Erwinia* y *Agrobacterium* entre otros (Rodríguez, et al., 2019).

Raupach y Kloepper (1998), reportan que una consorcio integrado por *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Curtobacterium faccumfaciens*, favorecieron la resistencia a patógenos en el pepino. En maíz se ha visto que éste incrementa su resistencia a la sequía cuando se exponen a un consorcio de *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas* sp, *Azospirillum brasilense* y *Acinetobacter* sp. (Molina-Romero et al., 201), la resistencia de *A. thaliana* contra hongos patógenos aumenta con la inoculación de *Xanthomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., y *Micobacterium* sp. (Berendsen et al., 2018). *P. agglomerans* E325, mediante la acción antibiótica es capaz de suprimir el crecimiento del fitopatógeno *Erwinia amylovora* en flores de manzana (Schlechter et al., 2019).

Sobre el conocimiento de la microbiota asociada a la zona de la rizosfera en el cultivo de la granada, hemos encontrado que es un área poco explorada, son casi nulos los estudios, la mayoría de los trabajos han descrito algunas especies bacterianas, pero en otro tipo de cultivos, no en granada. El papel que juegan estos microorganismos en estos microhabitats, ya sea como endosimbióticos o asociados en la zona de la rizosfera, juegan un papel fundamental como promotores del crecimiento vegetal (PGPB) y como biocontroladores de poblaciones externas.

Bajo estas premisas, de la existencia de escasos o nulos reportes sobre la microbiota asociada a cultivos de granada, nos dimos a la tarea de estudiar de manera exploratoria como una primera fase del proyecto, el aislar e identificar las bacterias cultivables en muestras

de suelo y raíz asociadas a la rizosfera de un cultivo en el Tephé, Ixmiquilpan, en el estado de Hidalgo, que junto con los municipios de Chilcuahutla, Meztitlán y Tasquillo representan una de las regiones de mayor importancia económica en el cultivar "Apaseo tardía". Cerca de 200 huertos están certificados por SENASICA, producen anualmente 170 toneladas de granada beneficiando a 300 productores de la región (SAGARPA, 2014). Pero enfrentan una serie de problemáticas relacionadas con la tecnología para poda y el riego, y la nula aplicación de tecnología para la fertilización y el control de plagas e infecciones microbianas, lo que trae consigo una baja calidad en frutos, que reduce la posibilidad de que el producto sea exportado, sumado a que la producción es estacional, con solo 30 días al año, que hace que los productores malbaraten su producto con tal de venderla (Velázquez, 2017).

Metodología

Ubicación de la zona de estudio

El huerto comercial de granada roja cultiva "Apaseo tardía", se ubica en la comunidad el Thepé, en el kilómetro uno de la carretera 30 municipio de Ixmiquilpan, estado de Hidalgo, México, localizado a una altura de 1682 m.s.n.m. y en las coordenadas 20° 26' 11.8" Latitud Norte y 99° 10' 21.5" Longitud Oeste. Ixmiquilpan está dentro del Eje Neovolcánico, su orografía está compuesta de lomeríos y su geología es propia del periodo cuaternario. En cuanto a hidrografía, se posiciona en la región del Pánuco, en la cuenca del río Moctezuma del cual derivan los ríos Chicavasco y Tula que atraviesan el municipio (INEGI, 2014).

El clima presente es Seco semicálido, con temperatura media anual de 19.3 °C, siendo diciembre y enero los meses más fríos con una temperatura media anual de 14.6 °C, mientras que mayo y septiembre son los meses más cálidos con una temperatura media anual de 24.5 °C, todo esto con registros de la estación meteorológica de Ixmiquilpan que van de 2002 a 2013. Para la precipitación anual, el nivel promedio observado es de 362.9 mm siendo los meses de julio y septiembre con mayor precipitación media anual de 74.2 mm y los meses de enero y diciembre con menor precipitación media anual de 2.3 mm (Velázquez, 2017).

Análisis edafológicos

Se eligieron tres árboles al azar en el huerto de granada, se tomaron muestras de suelo y raíz hasta una profundidad de aproximadamente 10 cm., se conservaron en bolsas de plástico a temperatura ambiente.

Análisis bacteriológico

Se determino la textura, capacidad de intercambio catiónico y pH siguiendo las técnicas descritas por Muñoz et al. (2013).

Determinación de bacterias en suelo

Se preparó una muestra compuesta de suelo por cada repetición, se tamizó con una malla de 2 mm de diámetro poro y se pesaron 5 g, se homogenizó en 50 ml de agua destilada estéril, se dejó reposar por diez minutos y se resembró en agar nutritivo, agar YDC y Muller Hinton, todos a pH 7, se incubó 24 hr a 30°C.

Se obtuvieron cultivos puros y se realizó la caracterización morfológica de cada una de las colonias bacterianas, su identificación celular se realizó mediante la tinción de Gram y la caracterización morfológica de las colonias.

Determinación de bacterias en raíz

Se tomaron muestras de raíz a 10 cm de profundidad, se cortaron pequeños trozos de 5 mm de longitud y se sumergieron durante dos minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagaron con agua destilada estéril por cinco minutos, se cortaron trozos de 1-2 cm de largo, y sumergió en la parte superior de una columna de agua estéril, se dejaron a temperatura ambiente por 72 horas, se realizaron siembras placas de agar nutritivo, BHI y agar YDC, colocando una gota de la suspensión y distribuyendo sobre la caja realizando un rayado típico.

Las placas se incubaron a 28° C por 72 h. a temperatura ambiente y la caracterización se realizó siguiendo el mismo procedimiento utilizado en suelo.

Identificación molecular de los aislamientos bacterianos en raíz

A partir de aproximadamente 500 mg de biomasa de cada aislamiento se procedió a la extracción de ADN, por medio del kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep. La cantidad de ADN obtenido se midió a partir del espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek).

Del ADN total obtenido, se hicieron alícuotas de 100 ng/μl, para la PCR y la amplificación del gen 16s ARNr con los oligonucleótidos 27F y 1492R de acuerdo con las condiciones previamente descritas por Lane (1991). Se utilizó un gel de agarosa al 1% para comprobar el tamaño del fragmento esperado (1500 nt) por una hora a 100V.

La secuenciación (SANGER) del gen 16s ARNr fue realizada por el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV con el cual se obtuvieron

dos secuencias (800 nt de cada secuencia) por cada oligonucleótido.

Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.4 (2012) conformando una secuencia consenso, por cada aislamiento. Las secuencias consenso de cada una de las muestras se comparó con el programa nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para encontrar similitudes entre secuencias biológicas y determinar la especie.

Resultados y discusión

Los análisis edafológicos mostraron que se trata de un suelo franco arenoso con un contenido de entre 43% y 80% de arena, 0% a 50% de limo y 0% a 20% de arcilla, un pH de neutro a ligeramente alcalino (7.52-8.31) y un intercambio catiónico de medio (255.31) a alto (38.5).

La textura del suelo es una propiedad indicadora de su fertilidad (Navarrete et al., 2011), los resultados muestran que el suelo en estudio presenta una clase textural franco arenosa, que provee condiciones físicas y químicas adecuadas para el establecimiento y nutrición de las plantas de granada roja (*Punica granatum*), al favorecer un ambiente de aireación y drenaje adecuados, la formación y desarrollo de una estructura moderadamente estable, que permite el paso de las raíces; así como la retención del agua, la oxigenación y regulación térmica necesarias para el desarrollo de los consorcios de microorganismos que, en función del pH de la solución del suelo, favorecen la nutrición vegetal.

El pH registrado, que va de ligera a moderadamente alcalino, corresponde con el de suelos de zonas de climas seco a semiseco, que presentan valores de precipitación menores a 400 mm anuales (INEGI, 2008), indica que la saturación de bases en el suelo pudiera limitar el desarrollo de los microorganismos de la rizósfera.

Por tratarse de un Calciol de textura media (INEGI, 2007), la capacidad de intercambio catiónico registrada es media, ya que el porcentaje de arcillas, que en promedio es menor de 20%, limita la cantidad de espacios disponibles para la retención de cationes intercambiables, asociado con el pH moderadamente alcalino.

En cuanto al análisis bacteriológico, se obtuvieron un total de 15 aislamientos en suelo y 16 en raíz. El morfotipo celular predominante en suelo fue la forma bacilar Gram negativos y algunos cocobacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos formadores de endospora (figura 1). La forma celular bacilar y la presencia de la endospora de acuerdo con la literatura concuerda con el género *Bacillus*, reportado como parte de la microbiota de la rizosfera, se le ha atribuido un

papel primordial como promotor del crecimiento, Mientras que en raíz, la forma bacilar fue la predominante y algunos cocobacilos, todos ellos Gram negativos.

Hasta el momento se han podido identificar algunos aislamientos que presentan características morfológicas de cultivo (figura 2), sus características bioquímicas primarias catalasas, oxidasa, peroxidasa, OF y mediante el sistema de identificación API 20 NE (Figura3), identificado de manera complementaria a través de la extracción y secuenciación de ADN del gen 16s ARNr por medio del kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep.

El análisis bacteriológico de las muestras de raíz, indican la presencia de dos géneros bacterianos, el género *Erwinia*, especie *billingiae* y el género *Pseudomonas* ambas son Gram negativas, reconocidas como agentes patógenos (Agrios 2005, Botero-Ospina et al 2013 y Trigiano et al 2008) (Tabla 4). El caso de *E. billingiae* puede colonizar el medio de la planta gracias a la síntesis de exopolisacáridos, a la formación de biofilm, motilidad y quimotaxis hacia extractos de la planta, tiene la capacidad de producir compuestos quelantes de hierro cuando éste hace falta en el suelo. Ha sido aislada en árboles de manzana y pera en Alemania, España y Polonia, también se le asocia con daños en cerezas, espinos y olmos, frutos inmaduros y copas de flores enfermas. Invade tejidos necróticos de plantas, se consideran invasores secundarios. Palacio-Bielsa et al (2012).

En cuanto al género *Pseudomonas*, el análisis molecular reveló la presencia de *Pseudomonas soli*, *P. oryzihabitans*, *P. putida* y *P. chlororaphis*. Está reportado que *P. chlororaphis* secreta piocianina, al parecer es la responsable de generar en mayor medida el efecto supresor en la zona de rizosfera, de acuerdo con la literatura, induce a las células a generar especies reactivas de oxígeno dando como resultado daños en el DNA, lípidos y proteínas, afectando su función y causando mutaciones (BRITIGAN, et al., 1999). *Pseudomonas chlororaphis*, está reportada como un hospedero no patógeno, produce rhamnolípidos con ácidos grasos con acción emulsificante y reductora de la tensión del agua con actividad antibacteriana y antifúngica (Gunter, 2004).

Pseudomonas soli es una especie de registro relativamente nuevo, produce una serie de lipopéptidos como la xantolisina A, a quien se le atribuye actividad antifúngica y antibiótica contra bacterias Gram positivas, juega un importante rol en la formación del biofilm, lo que le facilita la colonización de las superficies (Pascual et al 2014), hasta el momento no se ha reportado como agente patógeno de algún frutal. En tanto que *P. oryzihabitans*, se reporta con una amplia distribución,

que va desde suelos, ambientes húmedos, agua mineral embotellada, acuíferos, agua estancada, desagües, restos de petróleo, gasolina y formaldehidos, en ambientes hostiles, además de tolerar glifosato en concentraciones menores a 20 mM. Se considera nativa de rizosfera de guisante, mostaza india y *Galega orientalis*, aunque también se considera de interés hospitalario ya que se ha encontrado en desagües y equipo de terapia respiratoria. Tiene interés biotecnológico, ya que se aplica como biocontrol de larvas de nematodo y promotor de crecimiento en plantas, y en la industria, como alternativa en la producción de vitamina C, además de ser un excelente degradador de tolueno y pesticidas organoclorados (Gutierrez et al. 2009; Silva 2015).

Pseudomonas putida también se ha reportado en agua y suelo a temperatura ambiente y principalmente en suelos contaminados con altas concentraciones de hidrocarburo. Es un quimiótrofo aerobio y no es patógeno de plantas y animales, así que se considera ambientalmente inocuo. Se ha propuesto como una especie con alto potencial biotecnológico pues ese ha visto que es capaz de inhibir el crecimiento de *B. subtilis* (Timmis 2002, Tuleva 2002).

Los resultados obtenidos brindan la posibilidad de nuevas líneas de investigación, encaminadas hacia seguir explorando cómo se comportan las poblaciones bacterianas de la zona de raíz en el estado fenológico del cultivo. También sería conveniente analizar el potencial fitopatógeno de las especies de *Pseudomonas*, pues de acuerdo con la literatura algunas cepas pueden comportarse como tal y finalmente invita a estudiar el aislamiento e identificación de las moléculas bioactivas reportadas como antimicrobianos. En este sentido contamos con resultados preliminares sobre el efecto antagónico de *P. orizihabitans* y *P. clororaphis* en bacterias de interés médico como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* y *Salmonella*, un campo también no abordado, y poder también abordarlo con bacterias fitopatógenas de gran importancia agrícola.

Se cuenta con un aislamiento fluorescente aislado de la raíz, identificado, como GRIX 1 (figura 2e), se encuentra aún en proceso de confirmarse su identificación, creemos que, dadas las características de cultivo y de ser bacilos Gram negativos con agregación celular característica probablemente se trate de *P. fluorescens*,

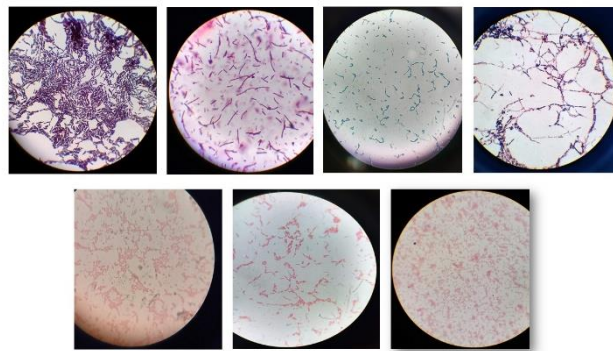


Figura 1. Morfotipos Gram positivos y Negativos aislados de la zona de la rizosfera.

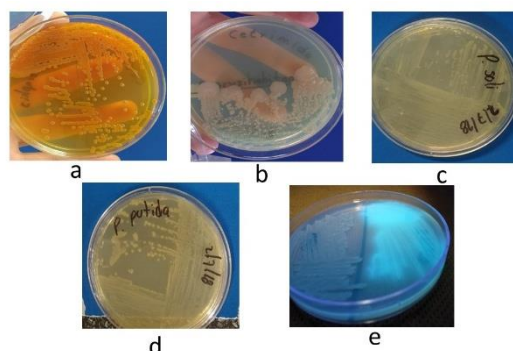


Figura 2. Cultivo del género *Pseudomonas*. A. *P. clororaphis* en medio Muller Hinton. B. *P. orizihabitans* en medio Cetrimida, C. *Pseudomonas soli* en medio BHI, D. *P putida* en medio Muller Hinton, E. Cultivo fluorescente en medio Cetrimida (aún no identificado).



Figura 3. Pruebas bioquímicas por API 20NE a los aislamientos del género *Pseudomonas*: A. *P. cloroaphis*, B *P. putida*, C. *P. orizihabitans*.

Conclusiones

La presencia de *P. chlororaphis*, *P. oryzihabitans*, *P. soli*, *P. putida* en las muestras de suelo y raíz, contribuyen al conocimiento sobre la microbiota de la rizosfera del cultivo de granada del Tephé, Ixmiquipan, Hidalgo, un campo poco explorado. La presencia de aislamientos Gram positivos, de forma bacilar y con la capacidad de formar edospora, y las características de cultivo, suponen la presencia del género *Bacillus*, también reportados en la literatura como parte de la microbiota de la zona de raíz con función relevante como promotoras del crecimiento vegetal.

Agradecimientos

Agadecemos las facilidades otorgadas a la asignatura de Procariotas y Virus por las facilidades otorgadas en el uso de sus instalaciones, así también al laboratorio de edafología de la Unidad de Prototipos (UBIPRO) FES Iztacala, UNAM y a la Colección de Cultivos Microbianos y al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV, IPN por la secuenciación de las especies y resguardo de las cepas respectivamente.

Referencias

Agrios G. N. (2005). Plant pathology. *Fifth Edition*. Elsevier Academia Press. P. 45-55.

Berendsen R.L., Vismans G., Yu, K., Song Y., De Jonge R., Burgman W.P., Burmolle M., Herschend J., Bakker P., Pieterse C.M.J. (2018). Disease-induced assemblage of a plantbeneficial bacterial consortium. *ISME J.* 12:1496–1507.

Britigan B.E., Railsback, M.A. Cox, C.D. (1999.) The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infection and immunity*, 67(3), p. 1207–1212

Botero-Ospina MJ, Castaño ZJ, Saldarriaga CA, Castro T.A M. (2013). Manual práctico de bacteriología vegetal. Práctica 16. Uso del esquema de Shaad para identificación de bacterias fitopatógenas. Editorial Universidad de Caldas. 146-154.

Escudero M., Y., E. (2016). Efecto del acigigib sobre el agrietamiento y la calidad del fruto de la granada roja cv. Apaseo tardia (*Punica granatum*). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNA, México.

Espinoza P., J., R., Díaz P., D., Ordoñez B., P., L., Mancilla F., P.F., Palma R. Y. (2017). Granada (*Punica granatum* L.) La nueva alternativa en la reconversión sustentable de cultivos en Chihuahua. Congreso Internacional de Investigación Científica Multidisciplinaria, Tecnológico de Monterrey, 5 (1): 4-18.

Gunter IV NW, Núñez A, Fett W, Salaiman D.K.Y. (2004). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Apl Env Mic.* 71(5): 2888-2293.

Gutierrez B.D.C, Hernández M.A.M., Corrales R.L.C. *Pseudomonas oryzihabitans*: un microorganismo de creciente interés científico. *Cie Biol.* 7(11): 103-112.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2007). Conjunto de datos vectoriales edafológicos escala 1:250 000, serie II. Aguascalientes, México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2008). Conjunto de datos vectoriales escala 1:1 000 000, unidades climáticas. Aguascalientes, México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

López-Mejía O.A., López-Malo A. Palou E. (2010). Granada (*Punica granatum* L): una fuente de antioxidantes de interés actual. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4 (1): 64-73.

Mondragon J.C. (2012). Breeding Mexican pomegranates to improve productivity and quality and increase versatility of uses. *Options Méditerranéennes A*, 103: 61-66.

Molina-Romero D., Baez A., Quintero-Hernandez V., Castaneda-Lucio M., Fuentes-Ramirez L.E., Bustillos-Cristales M.D.R., Rodriguez-Andrade O., Morales-Garcia Y.E., Munive A., and Munos-Rojas J. (2017). Compatible bacterial mixture, tolerant to esiccation, improves maize plants growth, *Plos One*, 12: 0187913.

Mondragón J.C., Juárez C.S. (2008). Granada Roja. Guía para su Producción en Guanajuato. Folleto Técnico Núm. 2 Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación del Centro Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

Muñoz I.D.J, Soler A.A., López G.F., Hernández M.M.M. (2013), Edafológica, Manual de métodos de análisis de suelos. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.

Navarrete S.A., Vela C.G., López B.J, Rodríguez G.M.L. (2011). Naturaleza y utilidad de los indicadores de calidad del suelo. *Contactos*, 80, 29–37, México

Palacio-Bielsa A., Rosella M., Llop P., López MM. (2012). *Erwinia* spp. from some fruit tres: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees*. 26: 13-29.

Raupach G.S., Kloepper J.W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88: 1159-1164.

Rodriguez P.A., Rothballer M., Chowdhary S.P., Nussbaumer T., Gutjahr C., Falter-Braun P. (2019). Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. *Molecular plant*, 12: 804-821.

Schlechter R.O., Miebach M., Remus-Emsermann M.N.P. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. *Journal of Advanced Research*, 19: 57-65.

Silva F. (2015). Pseudomonas (Flavimonas) oryzihabitans. *Rev Chil Infect.* 32(4): 445-446.

Teixeira da Silva J., A., Singh R., T., Narzary D., Verma N., Tarachand M., D., Ranade S., A. (2013). Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Sci Hort.* 160: 85-107.

Timmis K.N. (2002). Pseudomonas putida: a Cosmopolitan opportunist par excellence. *Env Micro.* 4 (12): 779-781.

Trigiano R., N., Windham M., T., Windham A.S. (2008). Plant pathology. Concepts and Laboratory Exercises. Chapter 6. Pathogenic prokaryotes. George Hlofy y Felix L. Lukezic. CRC Press. 45-56.

Tuleva B.K, Ivanov G.R., Christova N.E.. (2002). Biosurfactant production by a new Pseudomonas putida strain. *Z Naturforsch.* 57c: 356-360.

Velázquez Paniagua M.A. (2017). Evaluación del efecto del nitrato de potasio en la brotación de yemas y efecto del ácido giberélico en la calidad del fruto de granada roja (*Punica granatum*) 'Apaseo tardía'. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.