

Aslamiento de bacterias benéficas de suelo del Cerro del Culiacán, Guanajuato. Una Área Natural Protegida

GÓMEZ-LUNA, Blanca Estela*†, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, VELÓZ-GARCÍA, Rafael Alejandro y DÍAZ-PÉREZ, César

Universidad de Guanajuato, Avenida Ing. Javier Barros Sierra 201, 38140 Celaya, Gto.

Recibido 11 de Octubre, 2017; Aceptado 15 de Diciembre, 2017

Resumen

Las Áreas Naturales Protegidas constituyen una gestión ambientalmente responsable de los gobiernos y la sociedad en su conjunto para la conservación de la biodiversidad. En la actualidad se está deforestando en el estado de Guanajuato las especies de mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) utilizadas como leña y carbón. Las bacterias benéficas del suelo con la capacidad de ser promotoras de crecimiento en plantas, son un grupo de bacterias que pueden mejorar el desarrollo de las plantas de forma directa proporcionando nutrientes o de forma indirecta como protección contra organismos patógenos. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de bacterias suelos árboles de mezquite y encino del cerro del Culiacán, Salvatierra. Se aislaron 100 cepas y se probaron 21 cepas en plantulas de cilantro (*Coriandrum sativum*), germinación con semilla de pepino (*Cucumis sativus*) y se confrontaron con hongos fitopatógenos. Las cepas que presentaron un mejor efecto en la planta y en la confrontación con los hongos fitopatógenos fueron las UG-V-023 y UG-V-01.

Bacterias, Áreas Naturales Protegidas, Suelo

Abstract

The declarations Protected Natural Areas are an environmentally responsible management of governments and society as a whole for the conservation of biodiversity, it seeks to ensure the ecological balance for the continuity of evolutionary and environmental processes of ecosystems. Today is being deforested in the state of Guanajuato species of mesquite (*Prosopis laevigata*) and oak (*Quercus rugosa*) used as firewood and charcoal. The promoting growth rhizobacteria in plants, are a group of several genera of bacteria that can increase plant growth. In this paper the isolation of promoting promoting growth rhizobacteria in soils mesquite trees (*Prosopis laevigata*) and oak (*Quercus rugosa*) in the Cerro de Las Cruces, Salvatierra was performed. About 100 strains were isolated and tested in cilantro (*Coriandrum sativum*), seed germination of cucumber (*Cucumis sativus*) and confrontation with phytopathogenic fungi. The strains that showed a better effect on the ground and in the confrontation with the plant pathogenic fungus were the UG-V-023 and UG-V-01.

Bacterias, Natural Protected Area, Soil

Citación: GÓMEZ-LUNA, Blanca Estela, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, VELÓZ-GARCÍA, Rafael Alejandro y DÍAZ-PÉREZ, César. Aslamiento de bacterias benéficas de suelo del Cerro del Culiacán, Guanajuato. Una Área Natural Protegida. *Revista de la Invención Técnica* 2017. 1-4:47-55

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: be.gomez@ugto.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

Áreas Naturales Protegidas

Las Áreas Naturales Protegidas son las zonas del territorio nacional y aquellas sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción en donde los ambientes originales no han sido significativamente alterados por la actividad del ser humano o que requieren ser preservadas y restauradas (CONANP, 2015). Para el Instituto Estatal de Ecología, las Áreas Naturales Protegidas son las zonas del territorio estatal en donde los ambientes originales no han sido significativamente alterados por la actividad del ser humano o bien requieren ser preservados o restaurados, y en el caso concreto de las catalogadas como áreas de Uso Sustentable, tiene por objeto producir bienes y servicios que respondan a las necesidades económicas, sociales y culturales de la población, con base en el aprovechamiento sustentable de usos compatibles, al ubicarse en zonas que comprenden cuencas hidrológicas, recursos forestales y elementos de flora y fauna silvestre, en la que existen desarrollos agropecuarios, potencial recreativo y poblaciones rurales (IEE, 2015). El cerro del Culiacán y la Gavia presentan especies vegetales de bosque de encino, selva baja caducifolia y matorral crasicaule, y cumplen una importante función en la recarga del sistema acuífero por la presencia de material altamente permeable constituido por basaltos fracturados a través de los cuales se originan flujos horizontales que alimentan los valles contiguos, satisfaciendo las necesidades de agua para los diferentes usos de la población. Uno de los principales problemas en el área es la deforestación, causada principalmente por cambios de uso de suelo, uso de árboles para leña, carbón y elaboración de artesanías, también ganadería extensiva, afectaciones por plagas e incendios forestales (IEEG, 2015).

La superficie que comprende el APN es de 32,664.04 ha, de las cuales 2,383.09 hectáreas se ubican en el municipio de Celaya que representa el 7.25%; 18,437.30 ha pertenecen al municipio de Cortázar lo que representa el 56.44%; 2,541.05 ha al municipio de Jaral del Progreso que corresponde al 7.77%; 9,174 ha al municipio de Salvatierra el 28.0% y 128.32 ha al municipio de Tarimoro le que corresponde al 0.39 % (Rincón, 2015).

Biofertilizantes

Una estrategia agrobiotecnológica para mejorar la producción vegetal de forma más amigable con el medio ambiente es el uso de biofertilizantes. Los biofertilizantes, bioactivadores y biocontroladores son preparados de microorganismos aplicados a suelo y/o planta con el fin de sustituir de forma parcial o totalmente la fertilización derivada de compuestos sintéticos o minerales. Dentro de los microorganismos utilizados en los biofertilizantes se encuentran las bacterias y hongos o productos derivados de estos, se agregan desde la siembra de la semilla inducen su germinación para luego colonizar la raíz, en donde al transformar sus exudados radicales en sustancias promotoras de crecimiento vegetal causan un efecto similar a las fitohormonas, esto quiere decir que a mayor proliferación de los pelos radiculares se incrementa una mejor y eficiente absorción mineral como Nitrógeno, Fósforo, Hierro, Potasio, etc (Villegas-Espinoza, 2014). Es importante indicar que los microorganismos hongos o bacterias empleados como biofertilizantes o sus productos se encuentran de manera natural en el suelo, sin embargo, pueden estar en baja población y al agregarlos de forma externa lograr aumentar el efecto benéfico.

De las ventajas que tiene en el uso de biofertilizantes comparado con el uso de fertilizantes de síntesis química están: permitir una producción vegetal a bajo costo, protección del medio ambiente, mantienen la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Grageda-Cabrera, et al., 2012; Martínez-Romero, et al., 2013).

Bacterias promotoras de crecimiento

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas son un grupo de bacterias que habitan en la raíz de las plantas y suelo adherido a ésta, este espacio es conocido como rizósfera (Cassán et al., 2009). En la rizósfera se producen una variedad de ácidos orgánicos que pueden ser metabolizados por las rizobacterias.

Las bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y desarrollo. De acuerdo con varios autores (Ahmad et al., 2006) se conocen mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. Los mecanismos directos se relacionan con la producción de fitohormonas de tipo auxinas y giberelinas o la regulación de la producción de hormonas por parte de la planta. Así mismo pueden afectar la disponibilidad de nutrientes por la intervención directa en los ciclos biogeoquímicos. Indirectamente las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden contribuir mediante la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos, el control biológico de enfermedades, la producción de antibióticos y de sideróforos (Glick, 1995 y Esquivel-Cote et al., 2013).

Este grupo de bacterias benéficas incluye diversos generos y especies, están presentes como simbioses o de vida libre.

Justificación

Las actividades humanas agricultura, ganaderia, comercio, cambio de uso de suelo, industria y extensión de las ciudades pueden ser una amenaza a la extensión de las zonas naturales, pensando que será progreso y desarrollo de las comunidades; sin embargo también es sumamente importante conservar y restaurar las zonas naturales ya que estas amortiguan los cambios en el clima, retienen agua, purifican el aire y son el habitat de gran número de especies de aves, animales y plantas de los cuales también se obtiene bienes y servicios. Los recursos naturales que mantienen estas zonas son realmente muy valiosos calidad del aire, retención de agua y suelos fértiles ricos en materia orgánica y comunidades microbianas asociadas a la vegetación del lugar que tienen un papel importante en el funcionamiento del ecosistema de estas zonas y una adecuada cobertura vegetal conserva el lugar del deterioro por factores climáticos y amortigua el impacto de las actividades humanas. Ante este panorama es importante planear estategias de conservación, recuperación y uso adecuado de estas zonas que son fuente potencial de productos biotecnológicos. Entre los productos varios de uso biotecnológico esta gran diversidad de plantas con uso etnomédico y en el suelo también una diversidad de microorganismos benéficos asociados a la vegetación que pueden ser utilizados para recuperar especies del lugar o para producción vegetal en general.

Problema

La expansión y desarrollo de las ciudades y comunidades ejercen una presión sobre las extensiones de los territorio denominados como zonas naturales, al igual que otras actividades antropocéntricas como es la agricultura, ganaderia e industria.

Estas actividades traen en consecuencia pérdida de la biodiversidad (plantas, animales, hongos y microorganismos), contaminación y pérdida de recursos naturales como son agua y suelo y mala calidad del aire. Ante esta situación es requerido pensar en planes de desarrollo sustentables para la conservación, recuperación y uso de los recursos naturales a mediano y largo plazo. Planterar estrategias de cooperación entre academia, sociedad y autoridades es requerida para mantener y hacer uso responsable de los recursos naturales.

Hipótesis

Las zonas naturales se han mantenido por muchos años generando microclimas que favorecen su conservación, asociada a la vegetación de cada zona natural se establecen microorganismos benéficos que propician el desarrollo vegetal y presentan un potencial biotecnológico.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas aisladas de zonas naturales y conocer la función ecológica de las rizobacterias nativas de suelos de zonas naturales para la conservación y recuperación de varias zonas naturales.

Objetivos específicos

- Aislar de la rizósfera de árboles de zonas naturales cepas bacterianas que muestren actividad de promotoras de crecimiento de plantas en medios selectivos.

- Llevar a cabo la caracterización microscópica, fisiológica y metabólica de los aislados, determinando la presencia de metabolitos involucrados en la promoción del crecimiento de plantas, en medio de cultivo.
- Probar los efectos de promoción de crecimiento en plantas en biomasa y producción de raíz, con las cepas nativas con características de promotoras de crecimiento de plantas.
- Determinar la capacidad de las cepas con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos.

Marco Teórico

El suelo es un ecosistema con una gran variedad y cantidad de microorganismos benéficos. La fracción del suelo donde influye la proliferación de estos microorganismos por la presencia del sistema de raíces de las plantas se le conoce como rizósfera (Cassán et al., 2009). Se muestra el espacio de suelo 5mm, raíz de las plantas y los microorganismos asociados, Figura 1.

En la rizósfera existe un flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis que son exudados por la raíz. Estos son determinantes para la selección del tipo de bacterias y hongos que existen en la rizósfera de cada planta, ya que las especies microbianas difieren en su capacidad para metabolizar y conseguir distintas fuentes de carbono. También hay algunos exudados radiculares que tienen la capacidad de seleccionar microorganismos al preferir algunas especies, lo que aumenta la capacidad competitiva de los que han sido seleccionados. Estos exudados son metabolitos secundarios entre los cuales destacan aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, alcaloides, flavonoides entre muchos otros.

Mediante investigaciones realizadas se ha podido comprobar que la actividad de la población de la rizósfera parece ser entre dos y cuatro veces más elevada que la del resto del suelo (Marschner, P., et al., 2004; Lugtenberg, B. y Kamilova F., 2009).

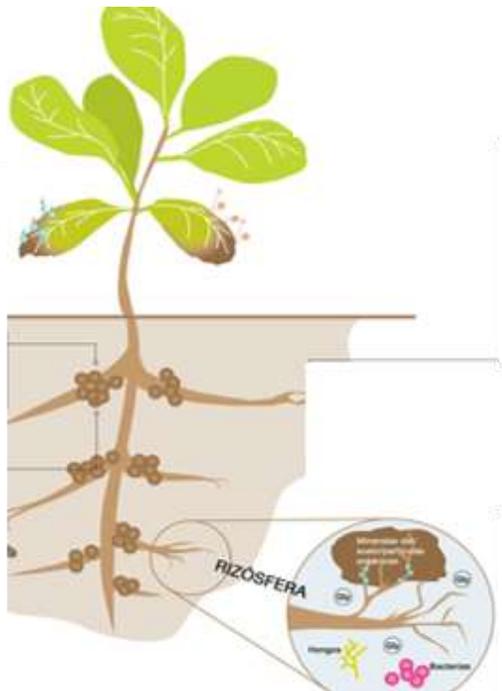


Figura 1 Rizósfera, espacio de suelo adherido a la raíz e influenciado por los metabolitos producidos por la raíz y los microorganismos asociados a la raíz de la planta.

Ciertos microorganismos del suelo pueden incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Otros producen compuestos, tales como vitaminas, hormonas y antibióticos que contribuyen a la salud vegetal y a la obtención de altos rendimientos agrícolas. Siendo estas las bacterias edáficas benéficas de vida libre o simbióticas que se denominan Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas o PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Esta clasificación se da por la promoción de crecimiento y/o reducción de las enfermedades producidas por patógenos (Antoun H. y Prévost D., 2005).

Las bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y desarrollo. De acuerdo con varios autores (Ahmad et al., 2006) se conocen mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. Los mecanismos directos se relacionan con la producción de fitohormonas de tipo auxinas y giberelinas o la regulación de la producción de hormonas por parte de la planta. Así mismo pueden afectar la disponibilidad de nutrientes por la intervención directa en los ciclos biogeoquímicos. Indirectamente las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden contribuir mediante la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos, el control biológico de enfermedades, la producción de antibióticos y de sideróforos (Camelo, R. M. y et al., 2011).

Metodología de Investigación

Muestreo de suelo

Se seleccionaron dos árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) para la toma de muestra de suelo de la rizósfera a una profundidad de 15 cm, ubicada en la comunidad “Las Cruces” con coordenadas geográficas, 20° 55’ 5” latitud Norte, 100° 58’ 38” longitud Oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 metros, en Salvatierra, Guanajuato. En cada uno de los árboles se tomaron 2 muestras de suelo, el muestreo se realizó el día 20 de Junio de 2015.

Aislamiento y purificación de bacterias promotoras de crecimiento de plantas

Las muestras de suelo se utilizaron para aislar bacterias en medio selectivo para actividad de la encima ACC (1-acido carboxílico -1- amino ciclopropano) desaminasa (Penrose y Glick, 2003), el cual contiene las sales minerales del medio Dworkin y Foster cuya composición por litro es la siguiente: 4 g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 mg H_3BO_3 , 10 mg MnSO_4 , 50 mg CuSO_4 , 10 mg MoO_3 , 70 mg MgSO_4 , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2% y agar bacteriológico al 2% y ACC 3 mM (Sigma) como única fuente de nitrógeno. Se incubaron a 28°C por 5 días. Las bacterias que presentaron actividad de ACC desaminasa (crecimiento en el medio selectivo) se procedió a purificarlas en medio PDA, por la técnica de estría cruzada y se caracterizaron por Tinción de Gram.

Prueba de desarrollo de la planta

Se probaron 21 cepas de las bacterias aisladas en el efecto del crecimiento en plántulas de cilantro (*Coriandrum sativum*) y de rábano (*Rabhanus sativus*), a las plantas se le midió la altura de la planta y el número de hojas.

Prueba de germinación

Se probaron 21 cepas para prueba de germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus*).

Prueba de control biológico

A los 21 aislados seleccionados se les realizó una prueba de antibiosis contra hongos fitopatógenos. En este caso usamos *Bipolaris sp.* La prueba duro 6 días y se monitoreaba cada 24 horas.

Resultados

Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas

De los 100 aislados con actividad ACC desaminasa se seleccionaron 21 cepas a las cuales del realizamos tinción de Gram, de los cuales obtuvimos: 19 Gram (+), que presentaron forma de bacilos UG-V-091, UG-V-054, UG-V-104, UG-V-093, UG-V-056, UG-V-104, UG-V-10, UG-V-097, UG-V-06, UG-V-07, UG-V-023, UG-V-043, UG-V-043, UG-V-051, UG-V-024, UG-V-019, UG-V-091, UG-V-024, UG-V-10 y 2 Gram (-) UG-V-032, UG-V-035 [Figura 2].

Prueba de desarrollo de la planta

Se calculó el promedio de crecimiento de 10 réplicas de cada tratamiento para Cilantro (*Coriandrum sativum*). La altura de las plantas en el tratamiento con agua fue de 6.2 cm, el tratamiento con fertilizante fue de 6.5 cm, en el caso de las cepas UG-V-023 de 7.2 cm y UG-V-01 de 7.7 cm la altura fue mayor la comparado con los tratamientos de agua y el fertilizante, las cepas UG-V-010 de 6.5 cm, UG-V-019 de 6.5 cm, UG-V-056 de 6.7cm, UG-V-06 de 6.6 cm, UG-V-07 de 6.7 cm, presentaron altura similar al fertilizante. La cepa UG-V-024 de 6.2 cm obtuvo el mismo valor que el control agua [Figura 3]. Las plantas de rábano (*Rabhanus sativus*) también presentaron efecto positivo por el efecto de la inoculación de las bacterias que mostraron diferencia con el control agua (6.6 cm) e incluso con el fertilizante (7.0), su promedio de crecimiento fue cepas UG-V-043 7.4 cm, UG V-051 7.2 cm, UG-V-035 7.0 cm, estos son los que obtuvieron mayor promoción de crecimiento. El número total de las hojas fue de 4 en todos los tratamientos.

Prueba de germinación

Se obtuvo un mejor efecto en las semillas inoculadas con las cepas seleccionadas en comparación con las semillas control que solo fueron inoculadas con caldo de papa estéril, después de 24 horas se obtuvo un 100% de germinación en las semillas inoculadas con la cepa UG-V-01, donde el control solo obtuvo un 80% de germinación [Figura 3]. Además aumento en el porcentaje de germinación, también se apreciaron mayor formación de pelos radiculares y reducción en tiempo de germinación [Figura 4].

Prueba de control biológico

Los resultados obtenidos en esta prueba nos demuestran que la mayoría de los 21 aislados seleccionados presentaron características que ayudan a inhibir o prevenir el efecto de los hongos fitopatógenos [Figura 5].

Por observación de la distancia del crecimiento radial del hongo y el espacio intermedio entre el desarrollo del hongo y el crecimiento de la bacteria, se agruparon por efecto de mayor efectividad, medio y sin ningún efecto. Las cepas con mayor actividad antifúngica fueron UG-V-01, UG-V-023, UG-V-037 y UG-V-032. Las cepas con actividad media de inhibición fueron: UG-V-024, UG-V-07, UG-V-06, UG-V-10, UG-V-024, UG-V-019, UG-V-056, UG-V-051, UG-V-054, UG-V-035, UG-V-104, UG-V-091, UG-V-104, UG-V-097 y UG-V-091. Las cepas sin ningún efecto contra el hongo fitopatógeno fueron: UG-V-043 y UG-V-035.

Algunos aislados presentaron capacidades tanto de promoción de crecimiento en las plantas probadas en este trabajo, determinado por la altura y desarrollo de la raíz, como de control biológico frente a un hongo fitopatógeno. capacidades de promotoras de crecimiento por los dos mecanismos directo e indirecto.

Pueden ser adecuadas para utilizar en un programa de recuperación y conservación de Áreas Naturales Protegidas.

Conclusiones

Actualmente el uso de microorganismos del suelo, ha tomado gran relevancia debido a su aplicación en la en producción de plantas con especial importancia de las plantas de interés agronómico para mejorar el abastecimiento de alimentos, cada año con más demanda de ellos. Sin embargo se comienza a trabajar el uso de los microorganismos de suelo también en la recuperación y conservación de Áreas Naturales Protegidas y más aún con soporte en datos experimentales demostrando sus aportaciones en relación con la disponibilidad de nutrientes, capacidad de degradación de la materia orgánica, fitohormonas, así como la interacción simbiótica de las plantas con bacterias y hongos con sus múltiples beneficios, son alternativas más amigables con el medio ambiente. Con los aislados de cepas de bacterias promotoras de crecimiento de plantas que se tienen en colección se podrán proponer biofertilizantes, biocontroladores y bioactivadores que van a proporcionar un beneficio a la planta y al ecosistema. La gran biodiversidad de ecosistemas con que cuenta el país puede contener una gran variedad de productos biotecnológicos para usos desde las mismas plantas y en salud humana y animal con la obtención de derivados de compuestos con aplicación en medicina.

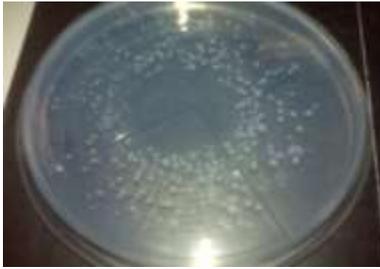


Figura 2 Crecimiento de colonias de cepas de bacterias en medio selectivo con ACC.



Figura 3 Efecto de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas seleccionadas en cilindro.



Figura 4 Muestra de germinación de semillas de pepino tratadas con las bacterias promotoras de crecimiento seleccionadas.



Figura 5 Muestra de formación de pelos radiculares, al germinar las semillas tratadas con las bacterias promotoras de crecimiento seleccionadas.

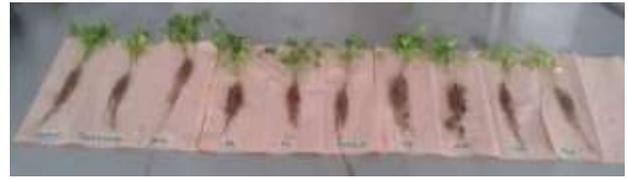


Figura 6 Efecto de control biológico por las bacterias promotoras de crecimiento seleccionadas.

Referencias

Ahmad, F., Ahmad, I. y Khan, M.S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163, 173 – 181.

Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. y Lalande, R., (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204, 57 – 67.

Camelo, M., Vera, S. P. y Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166.

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. y Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max*L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28 – 35.

Dirección de Comunicación y Cultura para la Conservación, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), 17 de Julio de 2015 <http://www.conanp.gob.mx/regionales/>

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.

Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., Vera-Nuñez, A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(6): 1261-1274.

Esquivel-Cote, Rosalba; Gavilanes-Ruiz, Mariana; Cruz-Ortega, Rocío; Huante, Pilar. (2013). Importancia Agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en Rizobacterias, Una Revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3)251-258.

Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 17 de Julio de 2015.

<http://ecologia.guanajuato.gob.mx/sitio/areas-naturales-protegidas>.

Lugtenberg, B. y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541 – 566.

Martínez-Romero, E., López-Guerrero, M.G., Ormeño-Orrillo, E., Morales, A.C. (2013). Manual teórico-práctico, Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura. SAGARPA-COFUPRO-UNAM. 15-22.

Marschner, P., Crowley, D.E. y Yang C.H. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*., 261, 199 – 208.

Rincón R. R. (2015). Actualización del programa de manejo del área natural protegida “Cerros el Culiacán y la Gavia” (2015). Instituto de Ecología del Estado, pp 637.

Villegas-Espinoza, J. A., Rueda-Puente, E. O., Murillo-Amador, B., Puente, M. E., Ruiz-Espinoza, F. H., Zamora-Salgado, S. y Beltrán Morales, F. A., (2014). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. vol.5 no.6 Texcoco ago./sep.