



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DEL SUR DEL ESTADO DE YUCATÁN

Organismo Descentralizado del Gobierno del Estado de Yucatán


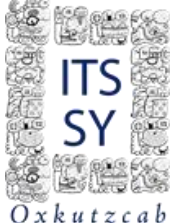
INGENIERÍA EN DESARROLLO COMUNITARIO



Manual de Prácticas de Laboratorio

Biotecnología

Oxkutzcab Yucatán

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Revisión: 1	

Manual de Práctica de Laboratorio

Título: Uso de microorganismos benéficos para el control biológico de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola.


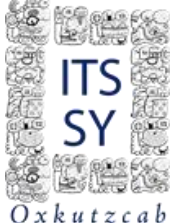
Objetivo o Competencia a Desarrollar:

- Evaluar la actividad de control *in vitro* de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. contra hongos fitopatógenos de cultivos agrícolas
- Evaluar la actividad bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas del orden coleóptera.
- Producir el hongo *Metarhizium anisopliae* en sustratos de arroz para producción masiva
- Evaluar medios de cultivo para *Bacillus* sp. y evaluar la actividad como biofertilizante en cultivos agrícolas de importancia económica.

Introducción

Uno de los problemas fitosanitarios más importante en los cultivos agrícolas son las que se representan por causa de las enfermedades, ocasionadas por hongos fitopatógenos tales como: *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. entre otros (Pal y Gardener, 2006). Los cuales pueden ser controladas con métodos biológicos como la aplicación de hongos y bacterias biocotroladores, *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. por diferentes mecanismos de acción como micoparasitismo en el caso de *Trichoderma* sp. y por producción de enzimas líticas (quitinasas y β -1-3 glucanasa), antibiosis y producción de metabolitos secundarios con *Bacillus* sp. (Rodas *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013).

De la misma forma de la existencia de enfermedades en los cultivos hortícolas existen plagas fitófagas que causan daños al mismo, como son diversas especies de plagas de la orden lepidóptera, coleóptera, entre otras. Que éstas pudieran ser controladas con hongos entomopatógenos (HE), estos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, encontrándose presentes en forma natural en el medio


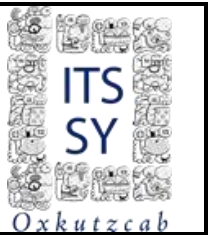
	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 12		

ambiente, en el suelo, en restos de cultivos, sobre los cadáveres de insectos, obteniendo su nutrición de otros organismos, existiendo diversas especies en estudio destacando *Metarhizium anisopliae* (Gómez *et al.*, 2014). La producción de entomopatógenos para la obtención de productos y sus derivados, que implica una serie de acciones con la finalidad de la obtención eficaz y eficiente de los productos biológicos, de muy bajo o nulo impacto ambiental, pero sobre todo con una alta reducción de las plagas para las cuales serán utilizadas. Para poder obtener los productos biológicos deseados, se requiere de una multiplicación masiva eficiente del hongo para lograr la obtención de sus estructuras reproductivas (conidias), en un sustrato natural muy eficiente.

Así mismo existen microorganismos que son utilizados para la biofertilización de los cultivos agrícolas. Debido a que la fertilización es una de las prácticas de la que depende en gran medida el rendimiento y calidad de los cultivos agrícolas, es por ello que optimizar la cantidad de fertilizante a utilizar es una medida utilizada para evitar el deterioro de los suelos y disminuir el impacto de la fertilización en el ambiente (Noh *et al.*, 2010). El uso de microorganismos del género *Bacillus* con capacidad de solubilizar elementos minerales como el fósforo, es una alternativa viable para hacer eficiente el uso de estos recursos minerales (Souchie *et al.*, 2006).

Materiales a utilizar durante el desarrollo de la actividad en las prácticas:

- Medios de cultivo Agar bacteriológico
- Medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA)
- Cajas Petri Desechables o de cristal
- Tubos Falcon[®] de 15 y 50 mL (tubos de Ensaye) (10 pz)
- Puntillas de 10, 200 µL
- Tubos Eppendorf[®]
- Pipetas 10 y 200 µL
- Matraces de 250 (4 pz), 500 (2 pz) y 1000 (1 pz) mL
- Embudos de cristal (3 pz)
- Asas bacteriológicas (2 pz)
- Microscopio óptico (1)


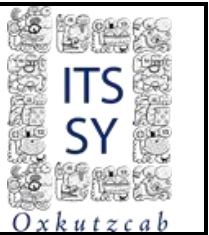
	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 12	

- Cámara de Neubauer (1)
- Sanitas (servilletas una de 100 piezas)
- Gasas (10 pz)
- Alcohol (500 mL)
- Cloro (250 mL)
- Algodón (1 Bolsas de 300 g)
- Papel aluminio (1 rollo)
- Jeringas de 10 o 20 mL (5 pz nuevas)
- Arroz y cebada (1 kg de cada uno)
- Topper de 2 L capacidad (2 pz)
- Cinta Masking Tape (cinta delgada 1 pz)
- Un rollo de Plastipack
- Guantes
- Cubre bocas
- Agua destilada o purificada

Práctica 1: Evaluación de la actividad antagonistas *in vitro* de *Bacillus* sp. Contra hongos fitopatógenos de cultivos agrícolas

Los bioensayos *in vitro* de confrontación bacteria antagonista-hongos fitopatógenos se llevaron a cabo en medio cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Secciones de 0.5 cm de diámetro de crecimiento activo de los patógenos se sembraron en el centro de cajas Petri, y se inocularon suspensiones (1×10^7 UFC) de las cepa bacteriana antagonista en cuatro puntos alrededor de los hongos a una distancia de 2 cm, como lo indica Torres (2001). Como testigo se usaron cajas Petri donde se colocaron los patógenos sin la presencia de antagonistas. Las siembras se incubaron a 29 °C y se midió el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos en diferentes intervalos de tiempo como lo indica Mojica-Marín *et al.* (2009) hasta que el testigo llene por completo la caja Petri.

Se evaluará:

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Revisión: 1	

- 1) El porcentaje de inhibición que presenta el crecimiento micelial del hongo mediante la siguiente fórmula propuesta por Orberá *et al.* (2009).

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

PICR = es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial,

R1 = es valor promedio del radio de la colonia control


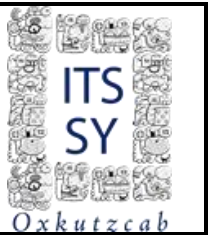
R2 = es el valor promedio del radio de la colonia inhibida por las bacterias.

- 2) Halo de inhibición

Para esta variable se medirá la zona de inhibición con la formación de halo entre la colonia fúngica y las cepas bacterianas sembradas alrededor del hongo. Las mediciones se realizaron en mm de la zona de inhibición (sin crecimiento micelial) con la ayuda de un vernier.

Práctica 2: Evaluación de la actividad antagonistas *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra hongos fitopatógenos de cultivos agrícolas

Se realizarán pruebas de antagonismo de con cepas de *Trichoderma* sp. en cultivo dual. En las pruebas *in vitro* se siguió el método de cultivo dual de acuerdo con Dennis y Webster (1971) en donde se hacen cortes del antagonista de siete días de crecimiento, secciones de 0.5 cm que se siembran en una extremo de la caja con medio de cultivo PDA a una distancia de 1 cm del borde de la caja y del mismo modo se hacen cortes del fitopatógeno de siete días de crecimiento, el cual se deposita en el lado opuesto del antagonista a una misma distancia del borde. Para cada aislamiento se establecieron cuatro réplicas. La incubación se realizó a 25°C. Para las evaluaciones se tomaron las medidas de

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 12		

diámetro de colonias después de 120 h de incubación y mediante observaciones de la formación de una zona de demarcación entre los inóculos. Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula:

Donde:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1: Diámetro del testigo

R2: Diámetro del organismo ensayado

También se compararon las cepas con respecto a la capacidad antagonista, de acuerdo con la escala de notas establecida por Bell *et al.* (1982):

Características:

Clase 1. Sobre crecimiento de *Trichoderma*, que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno

Clase 2. Sobre crecimiento de *Trichoderma*, que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio


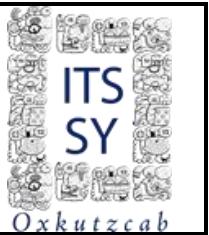
Clase 3. *Trichoderma* y patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno no se sobrepuso al otro

Clase 4. Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por *Trichoderma*

Clase 5 Sobre crecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio

Práctica 3: Evaluación de la actividad bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas del orden coleóptera.

Para las pruebas de virulencia H.E se logra realizando pruebas de patogenicidad utilizando insectos de crianza en laboratorio, pudiendo utilizarse también otros insectos del orden coleóptera, que se tengan por su facilidad de crianza en laboratorio como los Tenebrios.


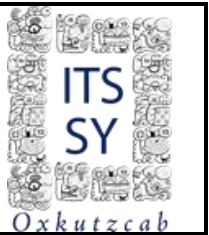
	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Revisión: 1	
			Página 7 de 12	

Esta prueba de virulencia se puede realizar mediante dos métodos, uno asperjando los insectos con una solución de esporas de una concentración conocida y el segundo sumergiendo los insectos en la solución de esporas.

1. Para ambos métodos los insectos se tienen que desinfectar en una solución de hipoclorito de sodio (100 µL/L de agua) por un minuto.
2. Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril, poner sobre un papel toalla absorbente estéril para eliminar el exceso de humedad.
3. Colocar 10 insectos por tratamiento con cuatro repeticiones. Se usan placas de Petri, frascos de vidrio, tapers o jaulas según el insecto con el cual se va a trabajar
4. Preparar una dilución a una concentración de 1×10^8 conidias/gramo, se completa a 100 mL, teniéndose así una concentración de 1×10^7
5. Asperjar los insectos o sumergirlos en la solución de esporas por un minuto, acondicionándolos luego en una cámara húmeda o en su caso en salvado de trigo previamente esterilizado.
6. Incubar a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ y revisar a partir del tercer día, retirando los insectos que muestren signos de infección. Las evaluaciones son diarias, durante 10 días. *El tiempo de evaluación puede variar, debido al tipo de insecto tratado o su estadio de vida, al igual que depende del ciclo biológico del hongo en el insecto y de la supervivencia del insecto no tratado bajo las condiciones del ensayo.
5. Se pone una caja como testigo sin asperjar con el hongo (Gómez *et al.*, 2014).

Con el registro diario, se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre el insecto evaluado, el porcentaje de mortalidad y el promedio del tiempo de mortalidad, que constituyen criterios importantes en la calidad biológica del hongo en estudio. El porcentaje de mortalidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% M = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Revisión: 1	

Donde:

% M = Porcentaje de mortalidad

Pi = Población inicial

Pf = población final

Sin embargo se realiza la corrección de datos utilizando fórmula de Abbott:

$$MC = \frac{\% MT - \% Mt}{100 - \% Mt} * 100$$

Donde:

MC = Mortalidad corregida


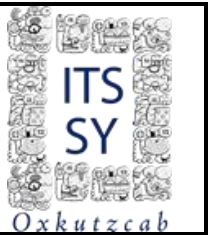
% MT = Mortalidad en el tratamiento

% Mt = Mortalidad en el testigo

Práctica 4. Producir el hongo *Metarhizium anisopliae* en sustratos de arroz para producción masiva

Para realizar pruebas de producción masiva de H.E en sustratos sólidos, se utilizará granos de arroz entero como medio de cultivo para producción a mayor volumen. Se realizará un doble lavado con agua de la llave, posteriormente se deja remojando por lapso de 20 min en una solución del antibiótico Furax[®] 23 g L⁻¹. Se deja escurrir por 15-30 min, para luego embolsar adicionando 150 (*Isaria javanica*) y 200 g (*M. anisoplie*) en bolsas de polipropileno, las cuales se sellan y se esterilizan en la autoclave, a 121°C por 20 min (Méndez *et al.*, 2009). Después del tiempo de esterilización se procede a descompactar el arroz, para que no se formen grumos. Las bolsas se dejan enfriar y antes de continuar con el paso siguiente de la inoculación del sustrato se debe limpiar el área de inoculación, la campana de flujo laminar, con cloro al 2 % y alcohol.


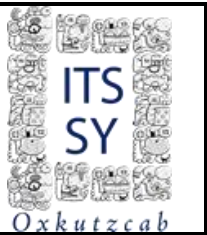
Una vez frío el material se prosigue a la inoculación, con la ayuda de una jeringa estéril de 10 mL, inyectando en la bolsa 20 mL de de una suspensión conidial de 1 X 10⁸ mL⁻¹. Se sella la punción de la bolsa con un fragmento de cinta adhesiva (Navitek[®]) y se

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 9 de 12		

agita vigorosamente la bolsa para homogenizar el inóculo con el sustrato (Barajas *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2014). Después de inoculadas las bolsas se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C con humedad relativa del $70-80 \pm 5$ % a con fotoperiodo natural en el laboratorio (12:12 h L-O) de 14-21 días; sin embargo se recomienda la oscuridad los primeros tres días para favorecer el desarrollo micelial. Al finalizar el tercer día iniciar con el fotoperiodo. Al cuarto día de incubación, las bolsas son quebradas suavemente para favorecer la oxigenación de todo el sustrato, realizando este procedimiento cada tercer día hasta finalizar la incubación, con suficiente esporulación del hongo (Barajas *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2014). En esta etapa se revisan las bolsas diariamente, eliminando las que se presenten poco homogéneas, así como las bolsas con presencia de contaminantes.

Según Gómez y Mendoza (2004) y Gómez *et al.* (2014), para llevar a cabo el control de calidad del producto final se deben realizar las siguientes actividades:

1. Pesar la cantidad total de polvo cosechado por bolsa o por kilogramo de arroz utilizado.
2. Determinar la concentración de conidias del polvo cosechado, para lo cual se debe contar el número de conidias por gramo de polvo cosechado utilizando una cámara Neubauer.
3. Preparar diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del hongo, hasta obtener una dilución que permita realizar el conteo. Las diluciones se preparan de la siguiente manera:
 - a) Colocar un gramo del polvo cosechado en un tubo de ensayo que contenga 9 mL de agua destilada estéril con solución salina (10^{-1}).
 - b) Transferir por pipeteo 1 mL de la primera dilución a un tubo que contiene 9 mL de agua destilada estéril con solución salina (10^{-2}), éste se agita vigorosamente durante un minuto, hasta lograr obtener una tercera dilución de 10^{-3} de esta manera se va procediendo hasta encontrar la dilución adecuada (10^{-5} , 10^{-6}).

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 10 de 12	

c) De la dilución seleccionada, tomar con una pipeta Pasteur una alícuota de 10 μL de la suspensión y llenar la cámara de conteo.

4. Hacer el conteo de conidias a través del microscopio, utilizando el cuadro central y principal, el cual está dividido en 25 cuadrillos secundarios. Se contabiliza cinco cuadrantes enumerándolos. En donde se saca el promedio se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{Número de esporas/mL} = (\bar{X} \text{ de esporas}) (5) (\text{ID}) (10,000)$$

\bar{X} = promedio de esporas contadas (de 5 cuadrantes)

5= número de cuadrantes contados


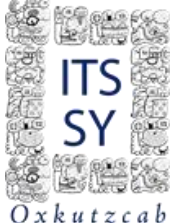
ID = Inversa de la dilución

10,000 = factor de cámara (constante)

Con ello se tienen el Rendimiento Total (RT) de la muestra.

Práctica 5. Evaluar medios de cultivo para *Bacillus* sp. y evaluar la actividad como biofertilizante en cultivos agrícolas de importancia económica.

Se utilizará una cepa *Bacillus* sp. del laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico del Sur del Estado de Yucatán, aisladas de muestras de suelo que presentan actividad *in vitro* contra diferentes hongos fitopatógenos y con propiedades en la promoción de crecimiento en cultivos agrícolas. Los inóculos bacterianos se obtuvieron en medio de cultivo, caldo nutritivo® (CN). Se preparará caldo nutritivo en matraces con 200 mL de capacidad, en cual se depositará 50 mL de C.N que será esterilizado previo a su uso. Una vez teniendo el medio de cultivo se inoculará por picadura (Palillo de dientes esterilizado) las muestras de bacterias a utilizar. Se dejan en agitación por cinco días en agitación a 200 rpm a 29 °C, el tiempo utilizado fue para permitir la formación de esporas, lo cual fue verificado con ayuda de un microscopio óptico. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8,000 x g por 10 min, al paquete celular se le realizó un lavado con solución 0.9 % de NaCl, y se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC mL^{-1} con la ayuda de una cámara de Neubauer. Se realizará una inoculación inicial al momento del trasplante, con

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 11 de 12		

suspensión bacteriana ajustada a 1×10^8 UFC mL⁻¹ (Luna *et al.*, 2013). Una segunda aplicación se realizará ocho días después del trasplante. La siembra de las plántulas se hará en vasos de unisel de 32 onzas. El sustrato utilizado será una mezcla de suelo (Luvisol) mezclado con bovinaza en proporción 2:1. Las evaluaciones se realizarán a los 21 días después del trasplante, las variables de respuesta serán: altura, diámetro de tallo, número de hojas, volumen radical, longitud de la raíz, biomasa fresca y seca de la parte aérea y raíz (Luna *et al.*, 2013).

Competencia esperada:


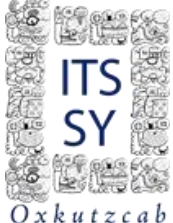
Mediante los temas desarrollados en clase sobre el uso de microorganismos para el control biológico de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas, se pretende que el alumno ponga en práctica lo aprendido en el salón de clases, empleando técnicas de la biotecnología agrícola para la producción masiva de microorganismo benéficos, así como su aplicación directa para el control de plagas y enfermedades de plantas.

Integración de los resultados:

El alumno realizará en equipos el reporte de la práctica, con los análisis correspondientes en donde realizará integración de: sus materiales y métodos, los resultados, discusión, conclusiones y literatura citada.

Fuentes:

- Barajas C. G., Del Pozo E. M., García, I. y Méndez, A. 2010. Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. Rev. Protección Vegetal, 25 (3): 174-180.
- Bell, D. K.; H. D. Wells; C. R. Markham. 1982. «In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», *Phytopathology*, 72:379-382.
- Dennis, C., J. Webster. 1971. «Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma* I. Production of Non-Volatile Antibiotics», *Transactions British Mycological Society*, 57:25-39.

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Campos de Ingeniería en Desarrollo Comunitario		Código: ITSSY-0525-03	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 12 de 12		

- Gómez, R. H., Zapata, G. A., Torres del A. E. y Tenorio, C. M. 2014. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), Perú. SCB – SENASA. p. 5-37.
- Gómez, P. P. y Mendoza, M. J. 2004. Guía para la Producción de *Metarhizium anisopliae*. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE). Publicación Técnica No. 5. El Triunfo, Guayas, Ecuador. p. 1-13.
- Luna, M. L., P. R. A. Martínez, I. M. Hernández, M. S. M. Arvizu, y A. J. R. Pacheco. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Rev. Fitotec. Mex. 36: 63-69.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 28 (1): 1-11.
- Méndez A., Del Pozo E. y García I. 2009. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. Rev. Protección Vegetal, 24 (3): 156-161.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H.A., Sandoval-Coronado C.F., Pereyra-Alfárez., B., Morales-Ramos, L.H., González-Aguilar, N.A., Hernández-Luna., C.E., Alvarado-Gómez O.G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Revista Internacional de Botánica Experimental.
- Noh, M. J., G. L. Borges, y F. M. Soria. 2010. Composición nutrimental de biomasa y tejidos conductores en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Trop Subtrop. Agroeco. 12: 219-228.
- Pal, K.K. y B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. En: The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHIA-2006-1117-02.
- Torres, L. A., Wong, W., Miguel, A., Fernández, A., Amat, Z. 2001. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp contra *Rizhoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanidad.
- Rodas, J.B.A., Magaña, S.H.F., Tun, S.J.M., Reyes, R.A. 2009. Antifungal Activity *in vitro* of Native *Bacillus* sp. strain Against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Rev. Research Journal of Biological Sciences 4(9): 985-989, 2009.
- Souchie, E. L., O. J. Saggin-Júnior, E. M. R. Silva, E. F. C. Campello, R. Azcón, and J. M. Barea. 2006. Communities of P-Solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. Anis Acad. Brasil. Ciên. 78: 183-193