

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

**Evaluación del efecto de difenoconazole sobre poblaciones de
Rhizobium spp.**

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de licenciado en Agronomía.

Ricardo Andrés Schöbitz Gebauer

VALDIVIA – CHILE

2007

Profesor patrocinante: Luigi Ciampi P. _____
Ing. Agr., M.Sc., Ph.D.

Profesor informante: Ricardo Fuentes P. _____
Ing. Agr., M.Sc.

Profesor informante: Laura Böhm S. _____
Ing. Agr.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en forma muy sincera al profesor Luigi Ciampi y a los profesores Laura Böhm y Ricardo Fuentes, quienes colaboraron en la realización de este trabajo. También quiero agradecer al profesor Adolfo Estay, por su cooperación en la revisión de esta tesis.

Agradezco también a Syngenta en su constante búsqueda de soluciones para el agro y para el medioambiente, quién permitió y financió este estudio.

A la valiosa cooperación del personal del laboratorio de Fotoquímica y de Producción y Sanidad Vegetal.

A mis compadres y amigos quienes me brindaron su apoyo y amistad durante mis estudios y durante la realización de este trabajo.

A mi polola, por su incondicional apoyo y comprensión en los momentos más difíciles, y su especial cariño, a quién agradezco mucho su compañía.

A mis padres, a mi hermano y a mis omas y opas, quienes son y serán el pilar fundamental de mi vida en todo lo que yo realizo, sin los cuales no podría haber llegado a esta etapa de mi vida.

Y finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron y prestaron su apoyo, sin el cual no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El nitrógeno	3
2.2	Fijación biológica de nitrógeno	3
2.2.1	Simbiosis	4
2.2.2	Rhizobium spp.	4
2.3.3	Leguminosas	5
2.2.4	Asociación Rhizobium – leguminosa	5
2.2.5	Importancia de la asociación Rhizobium – leguminosa	6
2.3	Factores que afectan la nodulación	6
2.3.1	Factores climáticos	7
2.3.1.1	Temperatura	7
2.3.1.2	Humedad	8
2.3.1.3	Luminosidad	8
2.3.2	Factores edáficos	9
2.3.2.1	Acidez del suelo	9
2.3.2.2	Nitrógeno	10
2.3.3	Factores bióticos	10
2.3.4	Pesticidas	11
2.4	Fungicidas	13
2.4.1	Formas de acción	13
2.4.2	Grupos de fungicidas	14
2.4.3	Desinfección de semillas	14
2.4.4	Difenoconazole	14

Capítulo		Página
3	MATERIAL Y MÉTODO	17
3.1	Material	17
3.1.1	Ubicación del lugar de los ensayos	17
3.1.2	Material de laboratorio, de los ensayos y de levantamiento de los ensayos.	17
3.2	Método	18
3.2.1	Diseño experimental	18
3.2.1.1	Diseño experimental ensayo 1 y 2	18
3.2.1.2	Diseño experimental ensayo 3 y 4	20
3.2.2	Duración ensayos	21
3.2.3	Prueba de germinación	21
3.2.4	Esterilización semilla	21
3.2.5	Obtención de rizobios	22
3.2.6	Multiplicación rizobios	22
3.2.7	Inoculación	22
3.2.7.1	Dosis de difenoconazole	23
3.2.7.2	Tratamientos	24
3.2.8	Montaje de recipientes y elaboración de medios de sustrato	25
3.2.8.1	Preparación jarras de Leonard	25
3.2.8.2	Preparación de macetas	25
3.2.8.3	Preparación de medios de sustrato	25
3.2.9	Siembra	26
3.2.9.1	Siembra ensayos	26
3.2.10	Mantención ensayo	26
3.2.11	Levantamiento ensayo	26
3.2.11.1	Peso seco	27
3.2.11.2	Nodulación	27
3.2.12	Análisis estadístico	28

Capítulo		Página
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS	30
4.1	Resultados ensayo en jarras de Leonard con trébol rosado (Ensayo 1).	30
4.1.1	Materia seca	30
4.1.1.1	Materia seca radical	32
4.1.1.2	Materia seca aérea	34
4.1.1.3	Materia seca total	36
4.1.2	Nodulación	38
4.1.2.1	Número	38
4.1.2.2	Tamaño	40
4.1.2.3	Color	42
4.2	Resultados del ensayo en jarras de Leonard con arveja (Ensayo 2).	44
4.2.1	Materia seca	44
4.2.1.1	Materia seca radical	45
4.2.1.2	Materia seca aérea	47
4.2.1.3	Materia seca total	49
4.2.2	Nodulación	51
4.2.2.1	Número	52
4.2.2.2	Tamaño	53
4.2.2.3	Color	55
4.3	Resultados del ensayo en macetas con trébol rosado (Ensayo 3).	56
4.3.1	Materia seca	56
4.3.1.1	Materia seca radical	57
4.3.1.2	Materia seca aérea	59
4.3.1.3	Materia seca total	61
4.3.2	Nodulación	63
4.3.2.1	Número	64
4.3.2.2	Tamaño	66
4.3.2.3	Color	68

Capítulo		Página
4.4	Resultados del ensayo en macetas con arvejas (Ensayo 4).	69
4.4.1	Materia seca	68
4.4.1.1	Materia seca radical	70
4.4.1.2	Materia seca aérea	71
4.4.1.3	Materia seca total	73
4.4.2	Nodulación	75
4.4.2.1	Número	75
4.4.2.2	Tamaño	78
4.4.2.3	Color	79
4.5	Análisis del experimento	81
4.5.1	Materia seca	81
4.5.2	Nodulación	83
5	CONCLUSIONES	87
6	RESUMEN	88
	SUMMARY	90
7	BIBLIOGRAFIA	92
	ANEXOS	98

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Análisis de suelo utilizado como sustrato en los ensayos 3 y 4, tomado a una profundidad de 0 a 20cm	20
2	Tabla de coloración para clasificación de nódulos	28
3	Número de nódulos (nr) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	52
4	Tamaño de nódulos (mm) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	54

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	33
2	Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	35
3	Gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	37
4	Número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	39
5	Tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	41
6	Color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	43

Figura		Página
7	Gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	46
8	Gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	48
9	Gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	50
10	Color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos.	55
11	Gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	58
12	Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.	60
13	Gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	62

Figura		Página
14	Número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	65
15	Tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	67
16	Color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	68
17	Gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero en condiciones de invernadero	71
18	Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	72
19	Gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.	74
20	Número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	76

Figura	Página
21 Tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.	79
22 Color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	81

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Principales características del fungicida difenoconazole	99
2	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	99
3	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	100
4	Tabla ANDEVA para Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	100
5	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	101
6	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	101

Anexo		Página
7	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenconazole y tres testigos en condiciones de cámara	102
8	Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	102
9	Método de las variaciones múltiples para número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	103
10	Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	103
11	Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	104
12	Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	104

Anexo		Página
13	Test de Dunn para color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	105
14	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	105
15	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	106
16	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	106
17	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	107
18	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	107

Anexo		Página
19	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	108
20	Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	108
21	Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara	109
22	Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos	109
23	Test de Dunn para color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos	110
24	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	110

Anexo		Página
25	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	111
26	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	111
27	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	112
28	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	112
29	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	113
30	Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	113

Anexo		Página
31	Método de las variaciones múltiples para número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	114
32	Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	114
33	Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	115
34	Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	115
35	Test de Dunn para color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	116
36	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero en condiciones de invernadero	116

Anexo		Página
37	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	117
38	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	117
39	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	118
40	Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	118
41	Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	119
42	Tabla ANDEVA para número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	119

Anexo		Página
43	Método de las variaciones múltiples para número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	120
44	Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	120
45	Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	121
46	Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	121
47	Test de Dunn para color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero	122

1 INTRODUCCION

Para la agricultura moderna el uso de productos químicos es fundamental para el control y prevención de plagas y enfermedades, que pueden afectar el rendimiento y por lo tanto, la rentabilidad de los cultivos y praderas.

Es por esto y sin dejar de lado sus ventajas, se han investigado los efectos que implica su uso, con la preocupación y conciencia de lo que puedan provocar. Diversos estudios demuestran que estos afectan la flora y fauna que se desarrolla en el suelo, tal es el caso de los fungicidas, cuyo uso como productos preventivos y curativos de un sinnúmero de enfermedades causadas por hongos, es una práctica del día a día.

El mercado actual, ofrece una amplia variedad de fungicidas basados en distintos principios activos, que son utilizados en la desinfección semillas. Entre ellos, destaca el difenoconazole, fungicida de tipo preventivo y curativo de un amplio espectro de enfermedades fungosas que afectan a los cereales, pomáceas y leguminosas, entre otras.

En la agricultura existe gran preocupación el hacer esta práctica una actividad menos dependiente de insumos, es así que resulta de gran importancia investigar y encontrar nuevas tecnologías que permitan el desarrollo de una agricultura sustentable en el mediano y largo plazo. Es decir, una agricultura basada en recursos naturales renovables y no contaminantes.

Si bien, los fertilizantes nitrogenados cada vez más utilizados, permiten incrementar los rendimientos en cultivos y praderas, se pretende que sean reemplazados por un fenómeno natural que ocurre en el suelo denominado fijación biológica de nitrógeno. Proceso que es realizado por una serie de microorganismos de vida libre y otros de tipo simbiotes, como es el caso de *Rhizobium* spp. el que se asocia de manera natural a la familia de las leguminosas.

La aplicación de un fungicida a un vegetal puede afectar las poblaciones de *Rhizobium* del suelo, afectando posteriormente la asociación de estas bacterias con las leguminosas. Así, la hipótesis de la presente tesis corresponde a la siguiente: la aplicación de difenoconazole, afecta a las poblaciones naturales de bacterias del género *Rhizobium* en su asociación con leguminosas y por lo tanto en la fijación biológica de nitrógeno.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo general del presente trabajo es:

Determinar los efectos que tiene el difenoconazole sobre *Rhizobium* spp. asociado a trébol rosado y arveja.

Para poder dilucidar lo postulado, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el peso de la materia seca radical, aérea y total en gramos, de las plantas de trébol rosado y arvejas a una dosis baja, normal y alta de difenoconazole.
- Evaluar la nodulación de las plantas de trébol rosado y arvejas a una dosis baja, normal y alta de difenoconazole, medida a través del número, tamaño y color de los nódulos.
- Determinar diferencias en los efectos del difenoconazole sobre la nodulación entre un sustrato estéril y uno no estéril.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Nitrógeno.

Según BURTON (1985), el nitrógeno es la esencia de la vida vegetal y animal, es un elemento inerte y por lo tanto difícil de que se combine químicamente con otros. Por otro lado, POSTGATE (1987), señala que este gas compone el 78% de la atmósfera, pero a la forma de dinitrógeno (N_2) y no como nitrógeno monoatómico (N) como realmente se refiere el término nitrógeno.

Para HAMDÍ (1985), el nitrógeno, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos, en las proteínas y en la clorofila, es el elemento más importante para todas las formas de vida. Por consiguiente, ninguna bacteria, hongo, planta o animal, puede crecer y desarrollarse si no posee nitrógeno a su disposición.

Se ha demostrado que la vía común de ingreso de nitrógeno a las plantas es a través del suelo, el que para ser absorbido y utilizado, debe encontrarse mineralizado, como nitrato (NO_3) o amonio (NH_4). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización de nitrógeno, para dejarlo así, disponible para las plantas (GONZÁLEZ y LLUCH, 1992).

2.2 Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Para DELWICHE (1970), la fijación de nitrógeno es un fenómeno que dentro de la naturaleza corresponde al tercer proceso biológico de importancia, después de la respiración y la fotosíntesis. En este proceso, el nitrógeno molecular atmosférico es transformado a una forma inorgánica, caracterizándose por separar los átomos de nitrógeno que se hallaban unidos por un triple enlace.

Según NEYRA (1995), la fijación biológica de nitrógeno (FBN) corresponde al proceso por el cual algunos microorganismos usan el nitrógeno atmosférico para la

producción de proteínas, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa.

En este sentido, HAMDÍ (1985), señala que las especies y sistemas que realizan este fenómeno son organismos de vida libre, como bacterias y algas verde-azuladas y los sistemas simbiotes, como los de rizobio-leguminosa y angiosperma-actinomiceto. Al respecto señala además, que la FBN esta presente en las asociaciones y sistemas asociativos de algas verde-azuladas, como rizosfera, filosfera y líquenes. Todos estos sistemas, tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pero difieren en cuanto a su fisiología, estructura metabólica y características genéticas.

Respecto a la relevancia de la FBN atmosférico NEYRA (1995), señala que esta puede ser estimada en 175 millones de toneladas métricas por año. Esto equivale a alrededor del 70% de todo el nitrógeno fijado en la tierra cada año, con respecto al total, encontrándose en el restante 30% a la fijación industrial como fertilizantes, fijación atmosférica como rayos, combustión y ozonización.

2.2.1 Simbiosis. Para FISCHER (1994), corresponde a la asociación entre individuos los que se benefician mutuamente. Un ejemplo es el que señala CUBERO y MORENO (1983), donde la relación existente entre leguminosas y rizobios es de simbiosis. En ella la asociación de ambas es de beneficio mutuo, ya que la bacteria fija nitrógeno atmosférico, intercambiándolo con la planta por compuestos carbonados y electrones.

La relación de simbiosis se evidencia físicamente a través de la formación de nódulos radicales, que corresponde a crecimientos tumorales en las raíces los que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno (MADIGAN *et al.*, 1997).

2.2.2 *Rhizobium* spp. Corresponde a una bacteria Gram negativa de forma bacilar, con dimensiones de 1 -2 por 0,5 -1 micras, siendo móvil por la presencia de flagelos polares (ORIVE y TEMPRANO, 1983).

Estos organismos son unicelulares y sólo existen en forma vegetativa, no producen esporas, son aerobios y se multiplican por simple división. Los hay de dos tipos, los de crecimiento rápido, los llamados *Rhizobium* y los de crecimiento lento, conocidos como *Bradyrhizobium* (BURTON, 1985).

HAMDI (1985), señala que al genero *Rhizobium* pertenecen las bacterias capaces de inducir la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas. Además, menciona que estas bacterias pertenecen a la familia de las rizobiáceas, del orden eubacteriales.

2.2.3 Leguminosas. La familia de las leguminosas es un grupo de plantas que producen flores al inicio de su etapa reproductiva y que se pueden encontrar en zonas templadas y tropicales. Comprende desde plantas pequeñas, pero muy extendidas como el trébol, hasta árboles y arbustos, como los del género *Acacia* (HAMDI, 1985).

POSTGATE (1987), señala que esta familia comprende a tres subfamilias, las papilionáceas, las mimosáceas y las cesalpináceas. Entre el 80 y 90% de las especies de las papilionáceas forma nódulos, pero sólo alrededor de un cuarto de las mimosáceas y relativamente pocas de las cesalpináceas lo hacen. Además, menciona que se conocen sobre 12.000 especies de leguminosas, de las cuales la mayoría fijan nitrógeno, de estas menos de 50 son utilizadas en la agricultura y donde unas siete de las 50, son utilizadas comúnmente.

Por otro lado, las distintas especies de leguminosas y de rizobios muestran distintos grados de especificidad así, ciertos tipos de rizobios colonizan ciertos tipos de plantas (POSTGATE, 1987).

2.2.4 Asociación *Rhizobium* – leguminosa. Los beneficios recíprocos de esta simbiosis se basan en la asociación del rizobio con la mayoría de las leguminosas. De esta, resulta la formación de nódulos. La nodulación en leguminosas ocurre frecuentemente, sin embargo, algunas especies no pueden ser infectadas por *Rhizobium* y no fijan nitrógeno (HAMDI, 1985). Observaciones muestran que el 90% de

las papilionoideae y de las mimosoideae tienen nódulos, pero sólo el 30% de las cesalpinoideae los poseen (NEYRA, 1995).

POSTGATE (1987), señala que esta simbiosis ha sido estudiada en particular por ser de gran relevancia en el ciclo del nitrógeno y de gran importancia desde el punto de vista ecológico, agronómico y socioeconómico.

Dentro de las 175 millones de toneladas métricas de nitrógeno fijadas, unas 35 son realizadas por leguminosas (BURNS y HARDY, 1975). En este sentido URZÚA (1991), señala que dentro de las leguminosas la cantidad fijada varía según la especie y según las condiciones medioambientales; por ejemplo el trébol rosado puede fijar entre 100 y 480kg/ha/año y las arvejas entre 70 y 300kg/ha/año, pudiendo llegar a los 800kg/ha/año en el caso de la alfalfa.

2.2.5 Importancia de la asociación *Rhizobium* – leguminosa. Para NEYRA (1995), la importancia radica en que en las áreas cultivadas templadas, las asociaciones *Rhizobium* – leguminosa son las más importantes fuentes de nitrógeno fijado biológicamente. El componente leguminosa de la combinación comprende leguminosas de grano y forrajeras, donde los niveles promedios de fijación de nitrógeno de estos sistemas agrícolas son del orden de 100kg/ha/año. Sin embargo, mediante una adecuada selección de cepas de *Rhizobium*, variedades apropiadas de la planta huésped y adecuadas condiciones de crecimiento, se pueden obtener niveles promedios de 200kg/ha/año.

De esta manera la importancia principal radica en que ambos componentes de la asociación *Rhizobium* – leguminosa se benefician, por parte el *Rhizobium* a través de la obtención de fotoasimilados y por otra parte la leguminosa a través de la obtención de nitrógeno aprovechable (CUBERO y MORENO, 1983).

2.3 Factores que afectan la nodulación.

La nodulación, como evidencia física de la fijación de nitrógeno, está sujeta a una serie de factores que influyen en la eficiencia de este proceso. En este aspecto HAMDI (1985), señala que en la cantidad de nitrógeno fijado por simbiosis entre

rizobios y leguminosas influyen muchos factores físicos y químicos del ambiente, que también podrían afectar a la planta huésped, al *Rhizobium* y al desarrollo y buen funcionamiento de los nódulos.

Como menciona este autor, existen una gran cantidad de factores que influyen en la nodulación, es por esto y como una manera de agruparlos, estos corresponden a del tipo climáticos, edáficos, bióticos y pesticidas.

2.3.1 Factores climáticos. Dentro de los factores climáticos están considerados: la temperatura, la humedad y la luminosidad.

2.3.1.1 Temperatura. Este factor corresponde a uno de los más importantes que influyen en la supervivencia de los rizobios en el suelo. Algunas cepas de *R. meliloti* son relativamente tolerantes a las altas temperatura, entre límites que varían de 36,5 a 42°C (HAMDI, 1985). Según la ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO, 1983) este límite es de 40,5 a 42,5°C, llegando a sobrevivir 21 días a 40°C en un sustrato de turba, en cambio temperaturas superiores a 35 – 40°C son mortales para *Rhizobium trifolii* L. y *Rhizobium lupini* L.

BUSHBY (1982), menciona que altas temperatura en condiciones de humedad afectan más a los rizobios que altas temperaturas en condiciones secas, siendo el óptimo como temperatura para la nodulación y simbiosis en climas tropicales de 30°C y el óptimo como temperatura en climas templados unos 20°C.

Por otro lado, las temperaturas bajas producen un retardo en la infección radicular que realiza el rizobio (Gibson, 1980, citado por CISTERNAS, 1992). Lie (1974), citado por CISTERNAS (1992), señala que las leguminosas de zonas templadas nodulan a temperaturas tan bajas como 7°C, pero bajo éstas, la estructura del nódulo decrece por un menor crecimiento bacteriano.

BUSHBY (1982), menciona que la temperatura del aire ejerce menos influencia en la nodulación que la temperatura del suelo, donde la temperatura ambiental estaría más relacionada con el crecimiento del vegetal.

2.3.1.2 Humedad. Según Schmidt (1978), citado por HAMDÍ (1985), los rizobios tienen que estar rodeados de una capa acuosa en la cual la concentración de solutos no provoque problemas de ósmosis para la célula. La escasez de agua, más que el exceso, es una amenaza para su función y supervivencia.

MASLIACK (1976) y LIE (1982), señalan que una disminución en la disponibilidad de agua induce a una disminución en la tasa de fijación, pero la actividad puede reiniciarse con la rehidratación, siempre que las pérdidas no sean superiores al 20% del peso fresco del nódulo. Además, se ha observado que esta pérdida acarrea una reducción del 80% en la fijación de nitrógeno anual.

Con respecto a la disponibilidad de agua URZUA *et al.* (1984), señalan que en suelos con baja capacidad de retención de humedad, la fijación de nitrógeno baja ostensiblemente.

Sin embargo, un exceso de humedad puede restringir la difusión y disponibilidad de gases como el oxígeno, dificultando la fijación de nitrógeno debido al funcionamiento del nódulo en condiciones de bajos niveles de oxígeno o de anaerobiosis (LIE, 1982).

Respecto a esto FAO (1983), menciona que este factor además de deprimir la fijación de nitrógeno, afecta el número de nódulos, tamaño y contenido de materia seca.

2.3.1.3 Luminosidad. Según DIXON y WHEELER (1983), el desarrollo del nódulo y su funcionamiento está influenciado por la intensidad, calidad y duración de la luz. Así, cambios en la tasa fotosintética afectan el suministro de fotosintatos al nódulo, alterando la disponibilidad de reductantes, ATP y el esqueleto carbonado requeridos para la asimilación del nitrógeno.

FAO (1983) y HAMDÍ (1985), señalan que una iluminación adecuada se traduce en las plantas en una mayor disponibilidad de fotoasimilados y por lo tanto, una fijación

más eficiente, mejorando el desarrollo y funcionalidad de los nódulos, lográndose un aumento del nitrógeno total y materia seca.

2.3.2 Factores edáficos. Los suelos de la Décima Región poseen características nutricionales y de pH que pueden afectar la fijación simbiótica de nitrógeno, tales como la acidez del suelo y el nitrógeno susceptible a mineralizarse.

2.3.2.1 Acidez del suelo. Para ALEXANDER (1980), el pH óptimo de crecimiento de los rizobios se encuentra cercano a la neutralidad, donde los efectos deben considerarse sobre el macro y microsimbionte, así como también en su interacción.

La tolerancia a la acidez depende del rizobio de que se trate, es así como DIXON y WHEELER (1983), señalan que el pH crítico para la nodulación fluctúa entre 4,5 y 5,0. MORALES *et al.* (1973), aseguran que este valor fluctúa entre 4,3 y 4,9. Por ejemplo *R. trifolli*, puede nodular entre un pH de 4,5 y 6,5, donde a pH 5,0 se optimiza su funcionamiento (HAMDÍ, 1985).

RAMIREZ (1988), demostró que la nodulación en arveja se ve afectada por la acidez. En este aspecto FAO (1983), señala que *R. meliloti* es muy sensible a la acidez. *R. japonicum* tolera hasta un pH 3,5, siendo *R. trifolli* menos sensible a condiciones de acidez que *R. meliloti*.

BARRIENTOS *et al.* (1994), hacen mención a que la acidez disminuye la disponibilidad de algunos macro y micronutrientes tales como: fósforo (P), calcio (Ca), manganeso (Mn), boro (B), molibdeno (Mo), aluminio (Al) y cobre (Cu).

En algunos suelos ácidos la toxicidad del aluminio, puede perjudicar la simbiosis rizobio – leguminosa ya sea dañando directamente la planta hospedera, reduciendo la sobrevivencia del rizobio, o interfiriendo en la nodulación y funcionamiento de la simbiosis (BARRIENTOS *et al.*, 1994). Por otro lado FREIRE (1984), señala que el efecto de la toxicidad del aluminio pareciera ser indirecto, afectando el crecimiento de la raíz, la iniciación de la nodulación o en la fisiología de la planta hospedera, además puede afectar la capacidad de absorción y transporte de

calcio. Esto puede corregirse con enmiendas calcáreas como así también, aumentar la disponibilidad de los nutrientes cuya disponibilidad se ve reducida por efectos de la acidez.

Se ha demostrado la capacidad de ciertas cepas de rizobios de tolerar la acidez y altos niveles de aluminio en el suelo, pero la capacidad simbiótica y por lo tanto de fijación de nitrógeno son menores (KEYSER y MUNS, 1979).

2.3.2.2 Nitrógeno. Los suelos trumaos, contienen un alto porcentaje de materia orgánica y por lo tanto de nitrógeno susceptible a mineralizarse bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Esto hace disminuir la eficiencia de la fijación de nitrógeno, debido a la alta mineralización del nitrógeno (URZUA *et al.*, 1986).

En cuanto al suministro de nitrógeno FREIRE (1984), señala que entre el nitrógeno mineral y el fijado simbióticamente existe una relación inversa, esto se produce por una compensación de los fotosintatos. Por otro lado, señala que es posible obtener respuestas positivas al aplicar nitrógeno cuando existen condiciones de estrés o cuando la nodulación es baja, así como también puede ser beneficioso al establecimiento, dado que la fijación comienza luego de dos semanas ocurrida la germinación. Por último, señala que los fertilizantes con nitratos son más perjudiciales para la nodulación que los amoniacales y al parecer la urea es menos que el nitrato y el amonio.

2.3.3 Factores bióticos. Existen muchas hipótesis para explicar el hecho de que los rizobios no formen colonias con facilidad, o la disminución de las poblaciones presentes en los suelos o añadidas deliberadamente a ellos. Uno de los peligros más comunes para la formación de colonias son los microorganismos que producen toxinas, como los protozoos y los nemátodos (HAMDI, 1985).

Debido a la gran cantidad de cepas de rizobios existentes, algunas ocasiones se produce competencia entre estas por los sitios de nodulación, por lo tanto la nodulación puede verse afectada por competencia entre cepas de la misma especie (SPAINK, 2000). URZUA *et al.* (1986), lo demuestra en su investigación de

competencia entre cepas de *Rhizobium* por los puntos de infección en raíces de trébol blanco en macetas.

2.3.4 Pesticidas. Las semillas de leguminosas se tratan a menudo con insecticidas y fungicidas para protegerlas de insectos perjudiciales y de microorganismos del suelo durante su germinación y el desarrollo temprano de la plántula (BURTON, 1985). De este modo la toxicidad que pudiese ejercer los pesticidas sobre los sistemas de fijación biológica de nitrógeno a recibido especial atención.

TIYAGI *et al.* (2004), mencionan que la aplicación de varios pesticidas en distintas concentraciones de 0 a 100ppm en arvejas, mejoraron ciertos parámetros como longitud/peso, número de vainas, contenido de clorofila y nodulación con 5ppm, no mostrando signos de toxicidad. De estos, el carbofurano mostró ser superior, en cuanto al mejoramiento de estos parámetros, seguido de aldicarb, phorate, fenamifos y fensulfotión. Efectos negativos en la planta y nodulación se produjeron en concentraciones superiores a 25ppm.

URZUA *et al.* (1986), destacan que el uso masivo del DDT hace algunos años, para el control de determinadas plagas alcanzaba los 25ppm en suelos de la Décima Región a 10cm de profundidad, afectando la germinación, producción de materia seca, acumulación de nitrógeno y nodulación de plantas de trébol, así como también la viabilidad de *Rhizobium*.

Es probable que en cierto grado, todos los plaguicidas sean tóxicos para los rizobios. Por lo tanto, cuando haya que tratar al hospedero con fungicidas y al mismo tiempo, inocularlo con rizobios, se deberá elegir cuidadosamente los fungicidas a fin de que ambos puedan equilibrarse (HAMDI, 1985).

Compuestos que tienen metales tóxicos, como el mercurio, cobre y zinc, presentan siempre un grave riesgo, como también compuestos aromáticos no halogenados (HAMDI, 1985).

Los fungicidas orgánicos son generalmente menos tóxicos que los constituidos por metales pesados (BURTON, 1985), pero la mayoría de ellos también son tóxicos. En algunos casos el agente químico mata los rizobios. En otros, estos pueden permanecer viables y producir colonias, pero pierden la habilidad de inducir nodulación. Algunos de los fungicidas que son tóxicos para el rizobio corresponden a los siguientes: Captan, Carboxin, Chloranil, Thiabendazole y Thiram.

FISHER y HAYES (1982), señalan que el efecto del triazol diclobutrazol sobre trébol blanco y en la fijación de nitrógeno realizada por *R. trifolii*, reduce el tamaño de las plantas incluso en concentraciones de 0,25ppm. Además, el mismo compuesto afecta la nodulación en concentraciones de 1 y 5ppm. Con respecto a la fijación de nitrógeno medida como la reducción de acetileno, también se ve afectada en concentraciones superiores a 0,5ppm.

HUSSEIN (1999), determinaron que Captan reduce la nodulación y la fijación de nitrógeno en *T. repens*. Al respecto también menciona que el Thiram es dañino para la nodulación en la mayoría de las leguminosas de grano y forrajeras.

Los herbicidas también tienen influencias en el crecimiento de los rizobios, algunos como el sulfentrazone (triazol) tienen efectos negativos (ARRUDA *et al.*, 2001), en cambio otros como la trifluralina, el EPTC no han mostrado tener estos efectos (Martensson y Nilson 1989, Sprout *et al.*, 1992, Yueh y Hensly, 1993 y Gonzalez *et al.*, 1996, citado por SINGH y WRIGHT, 2002).

Los efectos de los herbicidas en la nodulación y fijación de nitrógeno han sido estudiados por SINGH y WRIGHT (2002), manifestando algunos de estos efectos negativos en la nodulación, actividad de la nitrogenasa y por lo tanto el crecimiento del hospedero. Esto queda demostrado por TORRALBA *et al.* (1986), en una investigación hecha con el herbicida atrazina, donde este redujo el número de nódulos formados sobre sus leguminosas huéspedes.

Por otro lado, algunos estudios demuestran que algunos herbicidas como el amitrol ejercen una acción estimulante sobre el crecimiento de *Rhizobium* spp. en concentraciones de hasta 1000ppm, tal como lo señala FLORES y MORENO (1980).

Los datos sobre los niveles de inhibición para los herbicidas son en general confusos, por el hecho de que las especies y variedades dentro de estas, tienen sensibilidades muy diferentes, incluso para un solo herbicida y porque las condiciones locales y el momento de inoculación influirían en los resultados (HAMDI, 1985).

En este sentido TORRALBA *et al.* (1986), señalan también que la sensibilidad del *Rhizobium* hacia los herbicidas es una característica variable, que depende de la especie o incluso de las estirpes de una misma especie.

2.4 Fungicidas.

Corresponden a productos químicos los cuales pueden tener efectos preventivos como de control, capaces de producir la muerte y/o inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos causantes de un sinnúmero de enfermedades en plantas, frutos o semillas (FUNDACION PARA EL DESARROLLO FRUTICOLA (FDF), 2002).

Para GLADSTONE (2002), son compuestos de acción sistémica o de contacto que inhiben la proliferación de hongos fitopatógenos del suelo o en el sector aéreo de las plantas. Estos pueden ser usados de manera directa sobre las plantas, partes de estas o en sus frutos o semillas, como medida curativa o preventiva. Por otro lado, para asegurar un buen establecimiento de un cultivo es común desinfectar las semillas, para así obtener buenos resultados optimizando el uso de estas.

2.4.1 Formas de acción. Existen dos tipos de fungicidas, los de contacto y los sistémicos.

Los de contacto, actúan en el exterior y no son capaces de penetrar al interior del vegetal. Estos son usados como desinfectantes cuando se usan en el exterior de las semillas, evitando la acción de los hongos que las puedan afectar (EDGINGTON, 1981).

Los desinfectantes de semillas son capaces de proteger a ésta, de infección de hongos, destruyendo los posibles inóculos presentes en el entorno de la semilla (FDF, 2002).

Los sistémicos, corresponden a productos translocables dentro del vegetal y se desplazan en dirección de la evapotranspiración o con los fotosintatos o en ambas direcciones (EDGINGTON, 1981).

2.4.2 Grupos de fungicidas. Para MADIGAN *et al.* (1997), existen dos grupos importantes de compuestos antifúngicos. Los que funcionan interaccionando con el ergosterol o bien, los que inhiben su síntesis.

El ergosterol es un esteroles que reemplaza al colesterol que se encuentra en las membranas celulares de los eucariotas superiores. Este brinda rigidez a la membrana, estabilizando a la célula debido a su mayor tamaño y a tensiones físicas superiores en comparación con las células de los procariotas (SPAINK, 2000).

El primer grupo incluye a los polienos, un grupo de antibióticos producidos por especies de *Streptomyces*. Los polienos se unen al ergosterol, lo que altera la función de la membrana y causan la pérdida de la permeabilidad de la membrana y muerte de la célula (MADIGAN *et al.*, 1997).

El segundo grupo, corresponde a agentes antifúngicos que incluye a los azoles y a las alilaminas, los cuales inhiben selectivamente la biosíntesis del ergosterol y por tanto una gran actividad antifúngica (MADIGAN *et al.*, 1997).

2.4.3 Desinfección de semillas. La aplicación de productos químicos como desinfectantes a las semillas se realiza con el fin de prevenir daños provocados por organismos del suelo que ocurren durante la etapa más vulnerable de la planta que corresponde a la germinación (ANDRADE, 1984).

2.4.4 Difenoconazole. Es un compuesto que pertenece al grupo de los triazoles y corresponde al principio activo de un fungicida sistémico elaborado por Syngenta Crop

Protection AG., utilizado en el tratamiento de semillas para el control preventivo y curativo de un amplio espectro de hongos causantes de enfermedades que afectan al trigo, cebada, avena (FDF, 2002).

Este producto no se utiliza en Chile para la desinfección de semillas de leguminosas, pero si en Brasil donde este es utilizado para la desinfección de semillas de soja (BUENO *et al.*, 2003) y porotos (BARROS *et al.*, 2001).

Sin embargo, el difenoconazole en Chile, también es utilizado como fungicida (aplicado al follaje) para el control de *Alternaria alternata* (Alternariosis), *Ascochita pisi* (Tizón de la arveja) y *Erysiphe poligoni* (Oidio) en arveja, poroto, haba, garbanzo y lenteja.

El difenoconazole, es absorbido por la semilla sin alterar la germinación y es translocado a la plántula, brindando protección contra hongos del suelo y de la semilla, favoreciendo el desarrollo de plántulas sanas y la obtención de una adecuada población desde el inicio del cultivo (FDF, 2002).

El modo de acción es inhibir la biosíntesis del ergosterol, perteneciendo de esta forma al segundo grupo de fungicidas, los cuales inhiben selectivamente la biosíntesis de este compuesto (MADIGAN *et al.*, 1997).

Esta clasificado como un compuesto persistente, móvil, con un coeficiente de adsorción a la materia orgánica (Koc) de 400 a 7734 y con una disminución de la concentración inicial del compuesto a la mitad (DT₅₀) de 110 días (COLOMBIA, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, 2005)

Es utilizado para la prevención y control de carbón hediondo (*Tilletia caries*), carbón volador (*Ustilago tritici*) y *Septoria nodorum*, además tiene acción complementaria sobre mal del pie (*Gaeumannomyces graminis*), fusariosis (*Fusarium spp.*) y control temprano de roya (*Puccinia graminis*) y oídio (*Erysiphe graminis*). También es utilizado para el control de oídio (*Erysiphe spp.*), venturia (*Venturia*

inequalis) y otras enfermedades en pomáceas, además posee acción complementaria en botrytis (*Botrytis cinerea*) en vides y berries, entre otras (FDF, 2002).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material.

Se trabajó con semillas de trébol rosado cv. Quiñequeli y arvejas cv. Perfected Freezer 400 como medios, para evaluar los efectos que pudiese tener el fungicida sobre *Rhizobium* spp. en su asociación con estas leguminosas.

3.1.1 Ubicación del lugar de los ensayos. Los ensayos se realizaron en un invernadero de 40m² con una humedad relativa media de un 70%, con una temperatura media de 24°C y con un fotoperíodo medio de 12horas y en una cámara de condiciones controladas, similares a las del invernadero. Ambas instalaciones pertenecientes al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Material de laboratorio, de los ensayos y de levantamiento de ensayos. Los materiales utilizados para la obtención y cultivo de los rizobios fueron los siguientes: Pala, bolsas de papel, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, agua destilada, placas Petri, asa de siembra, pipetas, probetas, matraces, vasos precipitados, incubadora, centrifuga, autoclave, alginato al 2%, hipoclorito de sodio al 10%, carbonato de calcio al 93%, Tween 80, agar rojo congo manitol, difenoconazole (150g/l solución), agua destilada estéril, semilla trébol rosado cv. Quiñequeli, semilla arveja consumo cv. Perfected Freezer 400, equipo peletizador de semillas eléctrico, cámara de germinación, balanzas, cámara de flujo, mechero de Bunzen.

Los materiales que se utilizaron para el ensayo en jarras de Leonard en cámara (Ensayo 1 y 2) fueron los siguientes: 60 jarras de Leonard estériles, arena lavada estéril, algodón para mecha, solución nutritiva KNOP estéril, urea granulada, matraces, pipetas, probetas, papel de envolver, elásticos.

Los materiales utilizados para el ensayo en macetas (Ensayo 3 y 4) que se realizaron en el invernadero fueron los siguientes: 60 macetas plásticas de 2,0L, suelo trumao serie Santa Rosa, agua destilada, bomba de espalda.

Los materiales que fueron utilizados para el levantamiento de los ensayos correspondieron a los siguientes: agua destilada, balanza, estufa y bolsas de papel.

3.2 Método.

La investigación se realizó en base a cuatro ensayos, donde el ensayo 1 fue montado en una cámara con condiciones controladas con plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y con solución nutritiva KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. El ensayo 2, fue montado en una cámara con condiciones controladas con plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y con solución nutritiva KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. El ensayo 3, fue montado en un invernadero con plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. El ensayo 4, fue montado en un invernadero con plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos

3.2.1 Diseño experimental. Corresponde al diseño de cada uno de los ensayos a realizar y que serán detallados en los siguientes puntos.

3.2.1.1 Diseño experimental ensayo 1 y 2. Estos ensayos fueron montados en jarras de Leonard en una cámara con condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo similares a las del invernadero, con semillas de trébol rosado cv. Quiñequeli y semillas de arveja cv. Perfected Freezer 400 respectivamente, ambos con una solución nutritiva completa KNOP estéril con seis tratamientos cada uno. De los seis tratamientos, cinco se inocularon con *Rhizobium* y a tres de ellos se les aplicó una dosis de fungicida. Al tratamiento D/25 se le aplicó una dosis baja, que corresponde a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla. Al tratamiento D/50 una dosis normal, que corresponde a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y al tratamiento

D/75 se le aplicó una dosis alta, que corresponde a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla.

Los tres tratamientos restantes, se utilizaron como tratamientos testigos. En el tratamiento Testigo, no se aplicó difenoconazole y no fue inoculado con *Rhizobium*. En el tratamiento Testigo más *Rhizobium* (T+Rh), no se aplicó difenoconazole, pero este fue inoculado con *Rhizobium*. Y en el tratamiento Testigo más *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), de igual manera que en los tratamientos testigos anteriores, tampoco se aplicó difenoconazole, pero este fue inoculado con *Rhizobium* y además se le agregó una dosis equivalente a 10kg N₂/ha como urea.

El *Rhizobium*, fue inoculado a las semillas con un equipo peletizador de semillas eléctrico con una solución de alginato y posteriormente cada semilla con alginato fue impregnada manualmente en una placa Petri con carbonato de calcio para formar el pelet.

El difenoconazole fue aplicado en cada uno de los tratamientos en el alginato con *Rhizobium* según la dosis respectiva.

El número de semillas por jarra fue de una (1), sembradas a una profundidad del doble del tamaño de la semilla.

El sustrato utilizado fue arena de río lavada y estéril, con una granulometría de entre 1 y 2mm de diámetro.

La diferencia entre ambos ensayos es, que el ensayo 1 se hizo con semillas de trébol y el ensayo 2 con semillas de arveja. Ambos ensayos fueron montados en una cámara con condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y ventilación.

La característica fundamental de estos ensayos es, que el sustrato es inerte y estéril, y los nutrientes absorbidos por las plantas fueron obtenidos de una solución estéril elaborada en laboratorio. Por otro lado, el fungicida fue inoculado a la semilla tanto de arveja como de trébol donde por lo tanto, el compuesto estuvo en contacto

directo tanto con la semilla como con el rizobio. De este modo, se estudió el efecto que tiene esta situación.

Estos ensayos constaron de seis tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento y por tipo de semilla, es decir cada ensayo constó con 30 jarras.

3.2.1.2 Diseño experimental ensayo 3 y 4. Estos ensayos fueron montados en el invernadero del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal en macetas de polietileno con suelo trumao serie Santa Rosa, de textura franco limosa, cuyo uso anterior fue suelo de una pradera mejorada de las siguientes características:

Cuadro 1 Análisis de suelo utilizado como sustrato en los ensayos 3 y 4, tomado a una profundidad de 0 a 20cm.

pH agua	5,7
M.O. (%)	14,8
N (ppm)	20
P Olsen (ppm)	16,3
K inter. (ppm)	121
Suma bases (cmol + / kg)	12
S (ppm)	10
Sat. Al (%)	6,9

Al igual que en los ensayos 1 y 2, en los ensayos ensayos 3 y 4, se utilizaron semillas de trébol rosado cv. Quiñequeli y semillas de arveja cv. Perfected Freezer 400 respectivamente. De igual modo, en estos ensayos de los seis tratamientos, cinco se inocularon con *Rhizobium* y a tres de ellos se les aplicó una dosis de fungicida. Al tratamiento D/25 se le aplicó una dosis baja, que corresponde a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla. Al tratamiento D/50 una dosis normal, que corresponde a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y al tratamiento D/75 se le aplicó una dosis alta, que corresponde a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla.

Los tres tratamientos restantes, se utilizaron como tratamientos testigos. En el tratamiento Testigo, no se aplicó difenoconazole y no fue inoculado con *Rhizobium*. En el tratamiento Testigo más *Rhizobium* (T+Rh), tampoco se aplicó difenoconazole, pero

si fue inoculado con *Rhizobium*. Y en el tratamiento Testigo más *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), de igual manera que en los tratamientos testigos anteriores, tampoco se aplicó difenoconazole, pero si fue inoculado con *Rhizobium* y además se le agregó una dosis equivalente a 10kg N₂/ha como urea.

El *Rhizobium*, fue inoculado a las semillas con un equipo peletizador de semillas eléctrico con una solución de alginato y posteriormente cada semilla con alginato fue impregnada en cal para formar el pelet.

El difenoconazole fue aplicado en cada uno de los tratamientos en el alginato con *Rhizobium* según la dosis respectiva.

El número de semillas por maceta fue de una (1), sembradas a una profundidad del doble del tamaño de la semilla.

Cabe destacar que estos ensayos asemejaron las condiciones de una pradera mejorada, por lo tanto el suelo no se esterilizó y los nutrientes fueron absorbidos de este sustrato, donde sólo se aplicó nitrógeno en uno de los tratamientos testigos (T+Rh+N₂).

En cuanto a los tratamientos, estos fueron los mismos es decir, seis tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento y por tipo de semilla, por lo tanto estos ensayos constaron con 30 macetas cada uno.

3.2.2 Duración ensayos. La duración de los ensayos 1 y 2 realizados en jarras de Leonard en la cámara y de los ensayos 3 y 4 realizados en macetas en el invernadero, fue de cuatro meses, para de esta manera lograr un avanzado estado de desarrollo de las plantas y de nodulación.

3.2.3 Prueba de germinación. A las semillas de trébol rosado y de arveja se les realizó una prueba de germinación para determinar el porcentaje de germinación, el cual fue de 92% para las semillas de arveja y de un 91% para las semillas de trébol.

Pudiéndose de esta manera determinar las semillas a colocar por maceta y jarra, que fue de una.

3.2.4 Esterilización semilla. Para los ensayos 1, 2, 3 y 4 se esterilizaron 240g de trébol y 480g de arveja por separado en vasos precipitados con una solución de hipoclorito de sodio al 10% más 2mL de Tween 80 por 15 minutos. Luego de esto, se hicieron dos enjuagues por cinco minutos cada uno con agua destilada estéril para cada tipo de semilla. Posteriormente se almacenó la semilla en vasos precipitados en una cámara a 4°C con un 70% de humedad relativa.

3.2.5 Obtención de rizobios. El *R. trifolli* fue obtenido a partir de nódulos de plantas de trébol rosado que se encontraron en las dependencias del predio Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile.

Para el caso del *R. leguminosarum*, este fue obtenido de nódulos de plantas de arvejas que fueron cultivadas en el predio Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile.

3.2.6 Multiplicación rizobios. Luego de obtenidos los nódulos de los rizobios respectivos, estos fueron lavados en agua destilada para así obtener nódulos limpios, los cuales fueron posteriormente macerados en placas Petri para luego ser multiplicados y así obtener el inoculante.

El siguiente paso, consistió en incubarlos a 30°C a 150rpm por 24h. Se obtuvo una solución de rizobios con una densidad óptica superior a la requerida, la cual se diluyó a una densidad óptica, es decir para obtener 1×10^9 UFC para ambos rizobios. Luego se centrifugó las soluciones con los rizobios respectivos a 2000rpm, a una temperatura de 4°C y por una hora, para así obtener un pellet. Obtenido los pellets, se eliminó el líquido sobrenadante y se procedió al inoculado de estos en las semillas.

3.2.7 Inoculación. Una vez desinfectada la semilla se procedió al inoculado con los rizobios respectivos y con difenoconazole en el equipo peletizador de semillas eléctrico.

Se vertió al interior del cilindro giratorio del equipo una proporción de la solución alginato - rizobio con la semilla respectiva para los tratamientos testigos con rizobio (T+Rh y T+Rh+N₂) y se hizo trabajar el equipo hasta que la semilla quedó cubierta por la solución, esto fue por unos 5 minutos aproximadamente. El alginato se agregó como adherente para peletizar la semilla de trébol y de arveja con el rizobio respectivo.

Luego se le agregó a la proporción restante de la solución alginato – rizobio el difenoconazole con la dosis correspondiente a cada tratamiento, partiendo con la dosis baja hasta la dosis alta. Este procedimiento se hizo por lo tanto tres veces por tipo de semilla, una con la dosis baja, otra con la dosis normal y una última con la dosis alta.

Para evitar la contaminación entre un tratamiento y otro, con las distintas dosis de difenoconazole, el cilindro era lavado con un jabón de pH neutro y luego enjuagado con agua destilada.

Posteriormente se finalizó el peletizado de la semilla, recubriendo cada semilla de cada tratamiento en carbonato de calcio (cal) depositado en una placa Petri, cambiando el carbonato de calcio y la placa Petri entre cada tratamiento para evitar contaminación.

Una vez inoculadas las semillas con la respectiva dosis de rizobio y/o difenoconazole, la semilla fue refrigerada a 4°C y a un 70% de humedad relativa en placas Petri hasta su siembra.

3.2.7.1 Dosis de difenoconazole. Para los ensayos 1, 2, 3 y 4, se utilizaron tres dosis de difenoconazole, una dosis baja en relación a la comúnmente utilizada para la desinfección de semillas, una dosis normal y una dosis alta en relación a la normal.

La dosis baja (D/25) corresponde a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, utilizando 0,005mL de fungicida para las semillas de trébol y 0,01mL de fungicida para las semillas de arveja.

La dosis normal (D/50) utilizada, que corresponde a la utilizada comercialmente para la desinfección de semilla, corresponde a 50mL de producto por cada 100kg de semilla, utilizando 0,01mL de fungicida para las semillas de trébol y 0,02mL de fungicida para las semillas de arveja.

La dosis alta (D/75) utilizada, corresponde a 75mL de producto por cada 100kg de semilla, utilizando 0,015mL de fungicida para las semillas de trébol y 0,03mL de fungicida para las semillas de arveja.

Estas dosis corresponden a las utilizadas para desinfectar semillas de cereales, las cuales fueron propuestas por el proyecto para evaluar el producto en semillas de leguminosas.

3.2.7.2 Tratamientos. Los ensayos 1, 2, 3 y 4 constaban con cinco repeticiones por tratamiento. En el tratamiento 1 se empleó una dosis baja de difenoconazole (D/25), para el tratamiento 2 se utilizó una dosis normal (D/50), para el tratamiento 3 se usó una dosis alta (D/75), el tratamiento 4 no se inoculó la semilla con rizobio, ni con difenoconazole, correspondiendo a este al tratamiento testigo (Testigo standardt). Para el tratamiento 5 se inoculó la semilla sólo con el rizobio respectivo (T+Rh), correspondisnto este al tratamiento de comparación frente a los tratamientos con difenoconazole y en el tratamiento 6 se empleó una dosis equivalente a 10kg N₂/ha como starter, más rizobio (T+Rh+N₂), tratamiento usado como comparativo de la efectividad de la cepa empleada.

Para los ensayos 1 y 2, el nitrógeno se aplicó como urea al sustrato (arena) de cada jarra, dosificando la cantidad a emplear, de tal manera de aplicar un equivalente a 10kg N₂/ha, homogenizando la urea y la arena posteriormente. De igual modo, para los ensayos 3 y 4, el nitrógeno también se aplicó como urea. Se aplicó una dosis equivalente a 10kg N₂/ha de tal manera, de que este elemento actué como estándar y no interfiera en la nodulación. La cantidad de nitrógeno a aplicar se dosificó para cada maceta, homogenizándola con el suelo.

3.2.8 Montaje de recipientes y elaboración de medios de sustrato. Correspondió al montaje de las jarras de Leonard y macetas de polietileno para el cultivo de las plantas de trébol rosado y de arvejas, con su respectivo medio de sustrato.

3.2.8.1 Preparación jarras de Leonard. Las jarras, las cuales fueron utilizadas para el ensayo en cámara, consisten en una botella que es cortada por la mitad e insertada al revés, quedando el gollete hacia abajo. Una vez listas las jarras de Leonard, se esterilizaron en un autoclave del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

En la parte de abajo de la jarra de Leonard, se colocó la solución nutritiva, la cual permitió mantener el sustrato arena húmedo a través de una mecha de algodón que fue colocada en el gollete de la botella. Luego de colocada la mecha, se llenó la mitad superior de la botella con 250g de arena lavada y estéril.

3.2.8.2. Macetas. Las macetas utilizadas en el ensayo fueron de polietileno negro con una capacidad de 2,0L, las cuales fueron previamente lavadas con una solución clorada.

3.2.8.3 Elaboración de medios de sustrato. Como medio de las jarras de Leonard, se utilizó solución KNOP, solución que corresponde a un medio nutritivo completo, solución que se elaboró sin los componentes nitrogenados.

Esta solución se elaboró según la fórmula de ALEXANDER (1980), con los siguientes compuestos que se encontraban sólidos y en polvo: 0,25g de $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25g de KH_2PO_4 , trazas de FeSO_4 , trazas de Mo, 0,25g de $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,40g de $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,6g de $\text{B}(\text{OH})_3$ y trazas de oligoelementos.

Pesados los compuestos, se agregaron a un matraz con 100ml de agua destilada, luego de esto se aforó a un litro con una probeta, esto es debido a que esta es más precisa. Más tarde, las soluciones fueron agitadas en un agitador magnético por 15min, luego de los cuales se procedió a esterilizarlas.

Se hicieron 12L de solución KNOP, considerando que cada jarra tiene una capacidad de 200mL, más 1L de solución para relleno de las jarras. Una vez elaborada la solución, esta se refrigeró a 4°C hasta su uso.

En la macetas, el sustrato utilizado fue suelo trumao correspondiente a la serie Santa Rosa, previamente homogeneizado y arnereado. Este fue extraído del predio del mismo nombre perteneciente a la Universidad Austral de Chile. A cada maceta se le agregó 1,2kg de suelo seco no esterilizado.

3.2.9 Siembra. Esta se realizó depositando la semilla inoculada con un asa de siembra en la jarra o maceta respectiva, lavando y esterilizando el asa en un mechero de Bunzen cada vez que esta se utilizaba, para no contaminar con difenoconazole y/o rizobio la semilla de un tratamiento con la de otro.

3.2.9.1 Siembra ensayos. Una vez lista las macetas, jarras y las semillas inoculadas, se procedió a la siembra de estas. Por cada maceta y jarra respectiva se sembró una semilla de arveja y una semilla de trébol rosado, a fin de obtener una planta de trébol y de arveja por repetición. Estas fueron sembradas a una profundidad del doble del diámetro de la semilla correspondiente.

3.2.10 Mantención ensayo. Para los ensayos 1 y 2, realizados en cámara y montados en jarras de Leonard con trébol y arveja respectivamente, se debió rellenar cada jarra con la solución correspondiente, cuando existía como mínimo unos 50mL aproximadamente de solución. Cada vez que esto ocurría, la jarra pertinente era rellenada hasta su volumen máximo (200mL).

La temperatura fluctuó entre los 20 y 28°C aproximadamente entre las horas de oscuridad y luz. Las horas de luz fueron 12 y se obtuvo de tubos fluorescentes dispuestos en el techo de la cámara. La ventilación se realizó durante una hora cada seis horas mediante un extractor dispuesto en la pared de la cámara.

Los ensayos 3 y 4, realizados en el invernadero y montados en macetas con trébol y arveja respectivamente, eran regados con agua destilada cada vez que la

situación lo ameritaba, tratando de mantener el suelo dentro de su capacidad de campo.

3.2.11 Levantamiento ensayo. El levantamiento de los ensayos 1, 2, 3, y 4, correspondiendo a los realizados en jarras de Leonard en cámara y a los realizados en macetas en el invernadero con trébol y arveja respectivamente, se hizo una vez cumplido el plazo estipulado (4 meses) desmontando las plantas de cada una de las macetas y jarras, lavando con agua destilada las raíces y tomando especial cuidado de no desprender los nódulos para determinar las variables de nodulación a medir, correspondiendo estas a el número, tamaño y color de los nódulos.

Luego se procedió a pesar la parte aérea y radical de las plantas por separado, para así determinar el peso fresco. Más tarde, se colocaron las partes aéreas y radicales de las plantas en bolsas de papel para ser introducidas en una estufa de secado para determinar la materia seca.

3.2.11.1 Peso seco. Para su determinación se colocó el sistema radical y el aéreo por separado, los cuales fueron cortados a nivel de la base del tallo, en bolsas de papel para así ser puestas en una estufa a 105°C por 72h. Pasado el tiempo estipulado, se pesaron en una balanza con tres decimales, para determinar la materia seca en gramos a nivel radical, aéreo y total.

3.2.11.2 Nodulación. Se determinaron las variables que corresponden al número, tamaño y color de los nódulos de cada sistema radical de la respectiva repetición de cada ensayo.

En cuanto al número, se contabilizó el número de nódulos obtenidos en cada sistema radical y de todo el sistema, independiente de su ubicación.

Con respecto al tamaño, este corresponde a la longitud de estos es decir, se midió la longitud existente entre los polos del nódulo con un pie de metro.

Por último para el color, se trabajó con una tabla de colores donde según el color del nódulo, este se calificó con un número. Representando y colocando en evidencia a través de estos colores la madurez del nódulo es decir, la actividad y por ende de manera indirecta la fijación de nitrógeno realizada por el nódulo.

De esta manera, un número mayor significa mayor madurez del nódulo y una mayor fijación de nitrógeno, por lo tanto el número 5 (rosado) representó a un nódulo maduro. El número 1 representó un nódulo menos maduro, encontrándose este en fase de crecimiento y desarrollo, y con una actividad baja o nula en cuanto a fijación biológica de nitrógeno se refiere. En el cuadro 2 se indica la escala de coloración de los nódulos para su clasificación.

CUADRO 2 Tabla de coloración para clasificación de nódulos.

Color	Escala
Blanco	1
Verde	2
Verde con rojo	3
Rojo	4
Rosado	5

3.2.12 Análisis estadístico. El modelo que se utilizó para realizar el análisis estadístico, corresponde al diseño completamente al azar con seis tratamientos y cinco repeticiones para los ensayos 1, 2, 3 y 4.

Los datos fueron analizados con el Test de Bartlett para la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se realizó una ANDEVA (análisis de varianza) para determinar las diferencias existentes entre los tratamientos dentro de los parámetros a medir. Finalmente se realizó el Test de Tukey con un 95% de confianza, para determinar las medias que son significativamente distintas. Estos análisis estadísticos fueron realizados de manera manual y respaldados con el programa computacional Statgraphics versión 5.1 plus.

Por otro lado, para el análisis de los datos no paramétricos, que para este caso fue el color de los nódulos medidos en una escala del 1 al 5, estos fueron analizados mediante el Test de Kruskal y Wallis, a través del programa computacional

Statgraphics versión 5.1 plus, para determinar las diferencias existentes entre los tratamientos. Finalmente se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 4, para realizar el Test de Dunn, con intervalos de 95% de confianza, para determinar las medias que son significativamente distintas.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Resultados del ensayo en jarras de Leonard con trébol rosado (Ensayo 1).

Estos datos corresponden a los resultados obtenidos del ensayo realizado en cámara con trébol rosado cv. Quiñequeli montado en jarras de Leonard con arena y con solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. Los datos están expresados en peso seco como gramos de materia seca (g) y como número (nr), tamaño (mm) y color de los nódulos, como parámetros de nodulación.

4.1.1 Materia seca. Este parámetro fue medido a nivel aéreo, radical y total, expresado en peso seco como gramos de materia seca (g).

En el ensayo realizado en cámara con trébol se obtuvo un bajo crecimiento y desarrollo de las plantas, reflejándose esto en el menor tamaño de las hojas y en la menor longitud de los tallos alcanzados, lo que se hacía evidente al comparar estas plantas, con las plantas cultivadas en macetas en el invernadero.

El menor crecimiento y desarrollo del trébol pudo haber sido causa del poco volumen disponible en la jarra para que las raíces se desarrollen, existiendo para esto en volumen de 200mL de sustrato en la parte superior, más 200mL de solución en la parte inferior, lo que corresponde en conjunto a $0,0004\text{m}^3$.

Las raíces de trébol pueden desarrollarse hasta 1m de longitud aproximadamente, ocupando un volumen estimado de $0,064\text{m}^3$ en condiciones de campo, tal como lo indica TORRES (1991), en relación a las características y necesidades del trébol rosado. Por lo tanto, esto podría haber sido la causal de lo ocurrido, destacando en este sentido una gran cantidad de raíces enmarañadas tanto en el sustrato como en el medio.

Por otro lado, durante el ensayo se observó clorosis en las hojas más jóvenes. Además, en las últimas semanas antes del levantamiento del ensayo se observó

senescencia de hojas, en general de las hojas más jóvenes. En este sentido, estos síntomas pudieron haber sido causa de la deficiencia de algunos microelementos en la solución, donde microelementos como el fierro (Fe), molibdeno (Mo), manganeso (Mn) y boro (B) se encontraban en las concentraciones adecuadas para un buen crecimiento y desarrollo de las plantas y nódulos. Por otro lado microelementos como el zinc (Zn), y el níquel (Ni), se habrían encontrado en una concentración demasiado baja, tal como lo demuestran los síntomas mostrados por las plantas. Esto es debido, a que probablemente la cantidad de oligoelementos agregados a la solución como trazas fue insuficiente para un buen crecimiento y desarrollo de las plantas aquí cultivadas. Esto estaría dado a que trazas de un elemento es una cantidad pequeña y variable, sujeta al criterio de cada persona claro esta, dentro de ciertos rangos.¹

Estos microelementos, tal como lo señalan TORRES y URZUA (1985), respecto a la efectividad de cepas de *Rhizobium trifolii*, son importantes para que exista una buena infección por parte del rizobio indicando además, que la deficiencia de micronutrientes tales como el molibdeno, zinc y boro producen una disminución en el grado de efectividad en el rizobio, lo que también afectaría el desarrollo y crecimiento de la planta.

El zinc, tal como lo señalan STEVENSON y COLE (1999), es importante en la síntesis de triptofano, precursor de auxinas y por lo tanto la deficiencia de este microelemento genera bajo crecimiento y desarrollo en la planta, colocándose en evidencia la falta de este micronutriente, al observar el bajo crecimiento logrado por las plantas.

Con respecto a la deficiencia de níquel STEVENSON y COLE (1999), indican que produce trastornos en el metabolismo del nitrógeno, además de clorosis en hojas jóvenes. Síntoma observado luego del segundo mes establecido el cultivo en los tratamientos con difenoconazole y en el tratamiento testigo.

¹ MANQUIAN, N. (2006). Ing. Comercial. Químico laboratorista. Docente Universidad Austral de Chile. Valdivia. Comunicación personal.

Este síntoma fue detectado durante el ensayo, pero fue asociado a problemas en la nodulación es decir, a una fijación de nitrógeno deficiente. De esta manera la clorosis se asoció a problemas en la nodulación, más que a deficiencias de micronutrientes.

4.1.1.1 Materia seca radical. A este nivel tal como se observa en la figura 1, los tratamientos con difenoconazole en dosis baja (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100 kg de semilla, dosis normal (D/50), equivalente a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y dosis alta (D/75), equivalente a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, obtuvieron una mayor acumulación de materia seca existiendo diferencias significativas entre estos y los tratamientos testigos (Testigo, T+Rh y T+Rh+N₂). Esta diferencia se pudo producir, debido a que el difenoconazole para generar resistencia a los hongos de los cuales protege a la planta, genera un engrosamiento de la corteza de las raíces actuando como un promotor de crecimiento en grosor de estas, haciéndolas de esta manera raíces más vigorosas y resistentes frente a un posible ataque de un hongo, acumulando así más biomasa.² De esta manera, esto explicaría que al aumentar la dosis del fungicida, se genera un mayor engrosamiento de la corteza de la raíz, aumentando la biomasa de estas.³

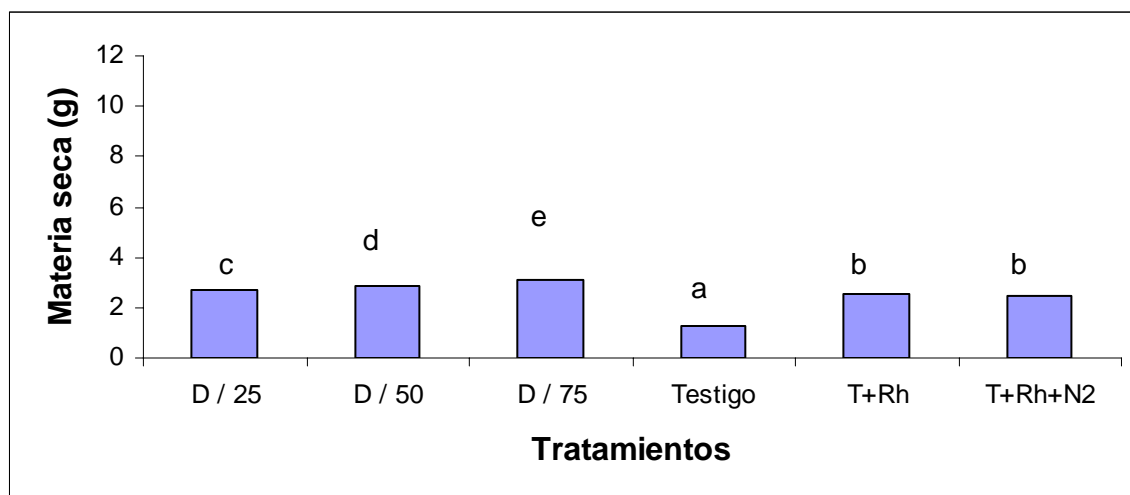
Sin embargo, es claro el efecto que el fungicida produce a nivel radical, ya que incluso la adición del difenoconazole a dosis baja (D/25), produce un significativo aumento de la materia seca en comparación con el tratamiento testigo T+Rh, siendo esta comparativamente un 7,8% superior.

El tratamiento con dosis normal de difenoconazole (D/50), produjo un aumento de un 14,4% en comparación con el tratamiento T+Rh y el tratamiento con la dosis alta (D/75), produjo un aumento en la biomasa radicular de un 24,3% más que el

² SCHNETTLER, E. (2006). Ing. Agrónomo. Jefe zonal Syngenta X^a Región. Osorno. Comunicación personal.

³ CIAMPI, L. (2006). In Agr. M. Sc. Ph.D. Docente Universidad Austral de Chile. Valdivia. Comunicación personal.

tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 1 Gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

En el tratamiento testigo con rizobio (T+Rh) y con nitrógeno (T+Rh+N₂) no se registraron diferencias estadísticamente significativas, esto demuestra que a este nivel, el nitrógeno no ejercería ningún efecto desde el punto de vista de una mayor o menor acumulación de materia seca.

Es importante señalar además que al comparar el tratamiento Testigo con los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂, destaca el efecto que el *Rhizobium* produce a este nivel, aumentando la biomasa radical existiendo diferencias significativas entre el Testigo y los testigos T+Rh y T+Rh+N₂. Diferencias que corresponden respectivamente a un 102,6 y un 98,7% más de biomasa radical por el sólo hecho de inocular esta leguminosa.

A nivel de testigos, como se puede observar en la figura 1, no se registró diferencias al agregar nitrógeno al sustrato, quedando en evidencia que este elemento y a esta dosis equivalente a 10kg N₂/ha no afecta la biomasa radical.

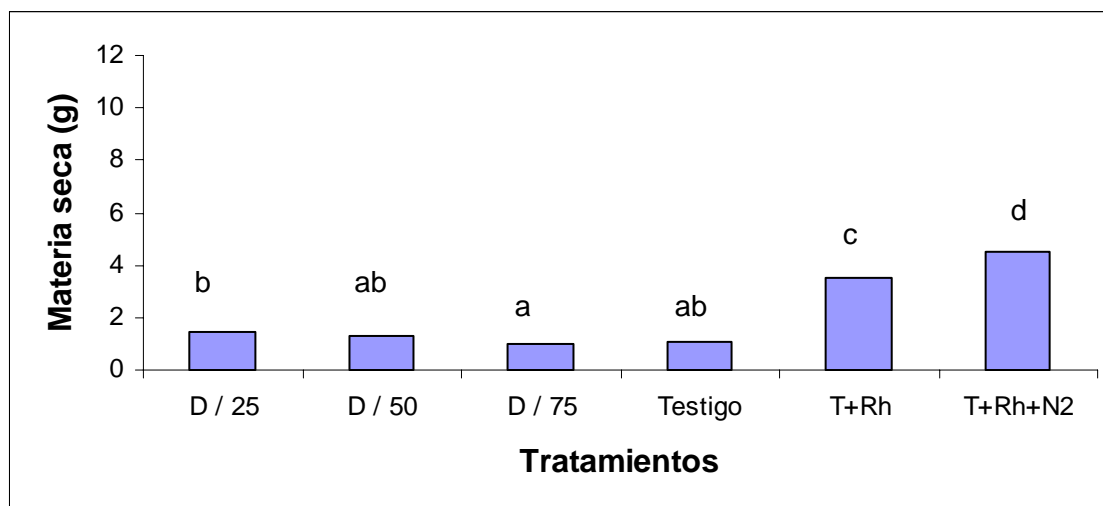
De esta manera a nivel radical y bajo las condiciones de este ensayo este fungicida afecta el contenido de materia seca, aumentando significativamente la biomasa radical en comparación con los testigos, tanto en los tratamientos con dosis baja (D/25) y con dosis normal (D/50) como en el tratamiento con dosis alta (D/75) de difenoconazole. Por ende, al aumentar la dosis de fungicida, mayor es la acumulación de materia seca bajo estas circunstancias.

4.1.1.2 Materia seca aérea. En este parámetro, tal como se muestra en la figura 2, se registraron diferencias significativas en los tratamientos testigos con *Rhizobium* (T+Rh) y en los tratamientos con difenoconazole. Donde sólo a dosis baja de difenoconazole (D/25), equivalente a 25 mL de difenoconazole por cada 100 kg de semilla, la biomasa se reduce en un 57,8% en comparación con el testigo T+Rh. Sin embargo, el efecto de una dosis alta (D/75), equivalente a una dosis de 75 mL por cada 100kg de semilla, genera una disminución de biomasa mayor, reduciendo un 77,8% la materia seca en comparación con el testigo T+Rh. En este sentido destaca además, que no existe una mayor disminución en la materia seca aérea de las plantas al utilizar una dosis mayor a la normal (D/50).

Respaldando estos resultados BARROS *et al.* (2001), señalan que dentro de los fungicidas utilizados en su ensayo, el difenoconazole produjo disminuciones estadísticamente significativas en la materia seca aérea del poroto en comparación con su testigo. Que en este caso el testigo principal utilizado para hacer las comparaciones fue el testigo con *Rhizobium*.

Destaca el tratamiento T+Rh+N₂ el cual obtuvo la mayor acumulación de biomasa, esto se debería a que en la plantas el nitrógeno aportado como fertilizante habría sido cuantitativamente superior a lo aportado por la simbiosis con *Rhizobium*.

Esto se concluye al comparar este tratamiento con el tratamiento T+Rh, al cual no se le adicionó nitrógeno, produciendo este un 22,7% menos gramos de materia seca.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 2 Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

De igual manera que a nivel de materia seca radical, el inocular el trébol genera importantes aumentos en la biomasa aérea. Donde el tratamiento testigo, que no fue inoculado, obtuvo un 69,8% menos materia seca que el tratamiento testigo T+Rh.

De esta manera y bajo las condiciones de este ensayo, el fungicida reduciría la materia seca aérea incluso en la dosis considerada como baja (D/25). Donde a dosis alta (D/75) el efecto detrimental generado por el difenoconazole en la materia seca es mayor, no existiendo por otro lado diferencias significativas entre este tratamiento y el tratamiento con dosis normal (D/50) de difenoconazole.

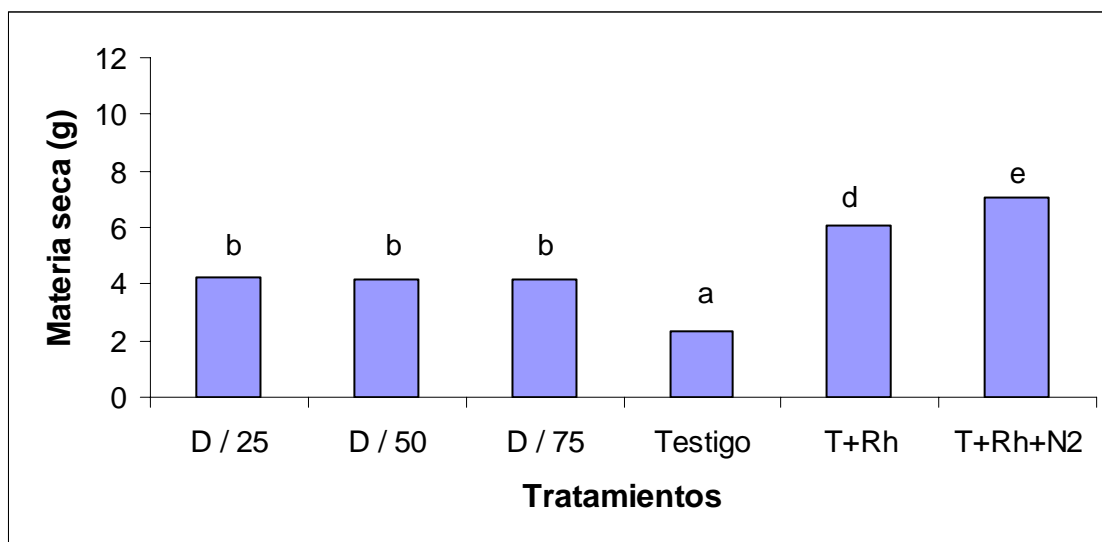
4.1.1.3 Materia seca total. A nivel de este parámetro, tal como se puede observar en la figura 3, denota el claro efecto negativo que el difenoconazole ejerce sobre la materia seca total de la planta. Esta disminución se registró incluso en la dosis baja de difenoconazole (D/25), que corresponde a 25mL de fungicida por cada 100kg de semilla, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre este tratamiento y el tratamiento testigo T+Rh, donde la disminución de la materia seca fue de un 30,38%.

En los tratamientos con dosis normal de difenoconazole (D/50), equivalente a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y con dosis alta (D/75), equivalente a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, se observa (figura 3) una reducción en la materia seca total, existiendo diferencias significativas en comparación con el tratamiento testigo T+Rh, las cuales fueron de un 31,13 y un 31,33% respectivamente.

En relación a la disminución de la materia seca que un azol genera a dosis baja FISHER y HAYES (1982), indican que los azoles ejercen sobre *Rhizobium trifolii* efectos negativos en la materia seca, donde el diclobutrazol un azol utilizado en este ensayo, disminuyó el contenido de materia seca del trébol a una dosis de 0,25kg/ha, la cual corresponde a una dosis baja para este producto.

En este sentido FISHER y HAYES (1985), indican que el triazol, paclobutrazol utilizado en su ensayo, produce una marcada disminución en la materia seca del trébol al aplicar 0,125kg/ha (dosis normal) de este compuesto.

Sin embargo, no hubo diferencias entre los tratamientos con difenoconazole. Esto demostraría que dosis mayores no generan una mayor disminución en la materia seca total.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 3 Gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Por otro lado, la aplicación de nitrógeno aumentó la materia seca total, existiendo diferencias significativas con los demás tratamientos. Relacionado con esto, el hecho de inocular y agregar nitrógeno coinciden con lo señalado por URZUA *et al.* (1987), donde estos observaron que el techo de producción de materia seca no se alcanzó sólo con la inoculación, pero si con inóculo y nitrógeno, pudiendo atribuirse esto a la calidad de la cepa empleada. Donde una fijación de nitrógeno deficiente que no supe las necesidades totales de este elemento, produce que la adición de nitrógeno genere un incremento en la materia seca.

De esta manera, a nivel de materia seca total y bajo las condiciones de este ensayo se observa (figura 3) que el fungicida disminuye el contenido de materia seca de esta leguminosa al utilizar incluso una dosis baja (D/25), disminución que no es

mayor al utilizar una dosis normal (D/50) y/o alta (D/75) de fungicida. Es decir, el efecto de aplicar una dosis alta en comparación con una dosis baja, no pareciera tener un efecto mayor en lo que a materia seca se refiere.

Por otro lado, es importante interpretar estos resultados a través de lo ocurrido a nivel de materia seca radical, donde el fungicida provocó un aumento en la materia seca y un incremento al aumentar la dosis. Por otro lado, a nivel aéreo el difenoconazole produjo una disminución de la materia seca, disminución que fue prácticamente igual en los tratamientos con dosis normal (D/50) y dosis alta (D/75) de difenoconazole. Por ende, al sumar la materia seca radical y la materia seca aérea se obtuvo los resultados de la figura 3.

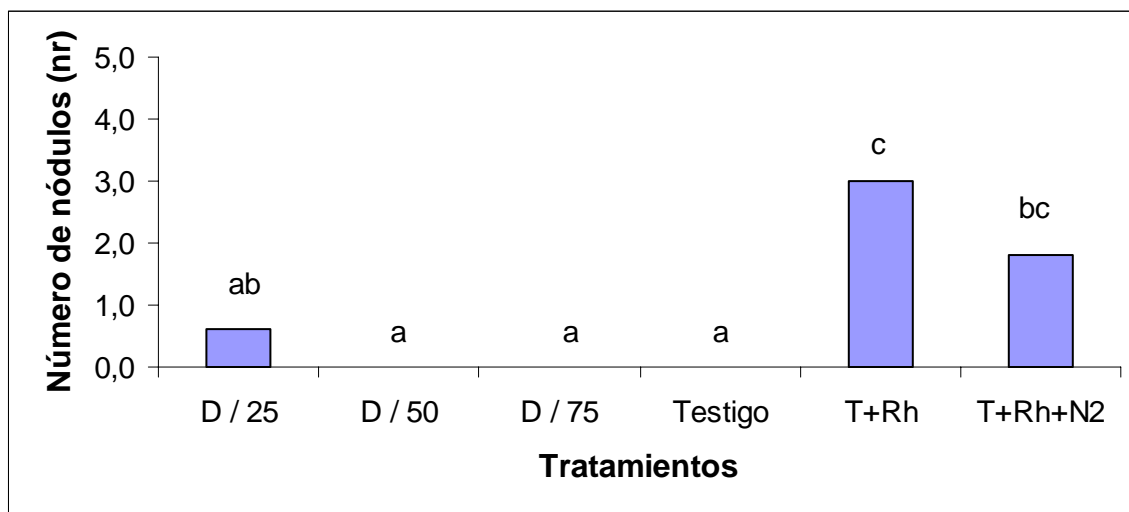
Es importante señalar además que la deficiencia de zinc y de níquel, pudo haber distorsionado en cierta medida los resultados, tal como indica TORRES y URZUA (1985).

4.1.2 Nodulación. En cuanto a este parámetro se analizará el número de nódulos (nr), el tamaño en milímetros (mm) y su coloración a través de una escala, nódulos que fueron extraídos de todo el sistema radical de la planta de trébol.

4.1.2.1 Número. Para este parámetro tal como se muestra en la figura 4, el tratamiento testigo T+Rh obtuvo la mejor respuesta logrando desarrollar 3 nódulos, sin embargo, en los tratamientos con difenoconazole la nodulación es afectada, siendo esta muy baja (0,6 por planta) en el tratamiento con dosis baja de fungicida (D/25) e inhibiéndose en la dosis normal (D/50) y alta (D/75). De este modo, al comparar la dosis baja (D/25) con el tratamiento testigo T+Rh se obtuvo diferencias estadísticamente significativas, donde el número de nódulos baja ostensiblemente por efecto del fungicida, siendo esta nula a concentraciones normales (D/50) y altas (D/75) del fungicida.

El efecto del difenoconazole sobre la nodulación podría compararse con lo señalado por FISHER y HAYES (1982), quienes evaluaron los efectos del fungicida diclobutrazol, un triazol sobre trébol blanco, observando estos que este compuesto en dosis de 0,5kg/ha y 2,5kg/ha afecta el número de nódulos.

ARRUDA *et al.* (2001), evaluó los efectos del sulfentrazone, un triazol sobre la nodulación en soja (*Glicine max L.*). Estos señalan que este compuesto redujo entre un 33 y un 82,6% el número de nódulos en una dosis considerada baja (0,72kg/ha).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 4 Número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Por otro lado, FISHER y HAYES (1985), señalan que el paclobutrazol, un triazol, no tiene efectos negativos sobre la nodulación a una dosis normal (0,125kg/ha), pero si lo hizo a una dosis alta (0,25kg/ha). Cuya aplicación fue hecha de manera homogénea en los primeros 5cm de suelo.

Por otro lado, cabe destacar el efecto detrimental que produce la adición de nitrógeno, disminuyendo en un 40% en el número de nódulos con respecto al tratamiento testigo T+Rh. Sin embargo, no hubo mayores diferencias entre este

tratamiento (T+Rh+N₂) y el tratamiento con dosis baja de difenoconazole (D/25). En este sentido la adición de nitrógeno tendría un efecto similar en la disminución de la nodulación al adicionar fungicida en una dosis baja (D/25).

En relación al testigo, destaca la importancia de la inoculación donde para este caso, el hecho de no inocular y ser un sustrato estéril, la nodulación fue nula. Esta no existió debido a la imposibilidad de que los rizobios nativos, como los presentes en el suelo, infecten la raíz de la planta.

Sin embargo, se obtuvo una baja nodulación aún en el tratamiento mejor, testigo más *Rhizobium* (T+Rh), ya que según lo obtenido por TORRES y URZUA (1984), el número de nódulos obtenidos fue de aproximadamente 80 por planta para este cultivar.

Los bajos valores obtenidos, pueden ser causa de las condiciones de estrés micronutricional a las cuales estuvieron sometidas las plantas. Esto podría haber producido problemas de infectividad, tal como lo señala VINCENT (1975), indicando que para que exista una buena infección por parte de *Rhizobium*, es necesario que existan buenas y favorables condiciones tanto para la planta como para la bacteria.

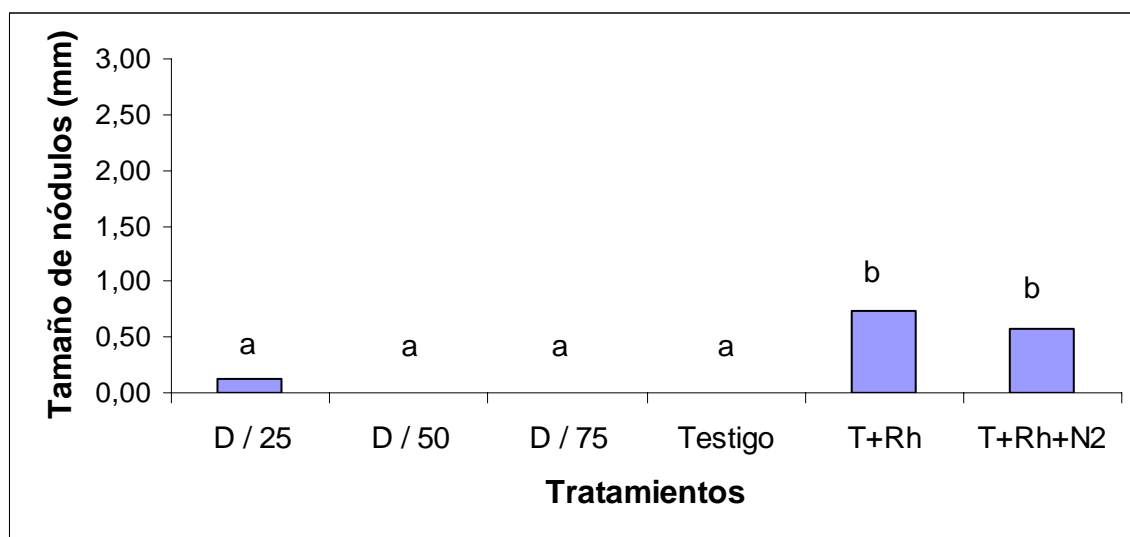
Destaca además, la condición de esterilidad del sustrato que no permitió que rizobios presentes en el suelo infecten posteriormente a la planta, lo que muestra la relevancia de la existencia de estas bacterias en el suelo, donde además no se ve afectada la verdadera acción del fungicida, acción que puede variar en el suelo por la acción de agentes biodegradadores, tal como se señala en COLOMBIA, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL (2005).

De esta manera, bajo las condiciones de este ensayo el fungicida afectaría la nodulación reduciéndola, en la dosis baja (D/25) e incluso sería inhibida en la dosis normal (D/50) y alta (D/75) de difenoconazole.

4.1.2.2 Tamaño. En este parámetro existieron diferencias significativas entre el tratamiento con dosis baja (D/25) y los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂ (figura

5). De igual manera que en el parámetro anterior analizado, los tratamientos que se encuentran bajo el efecto del fungicida, además de nodular menos, su tamaño es notoriamente menor.

De esta manera, se demuestra (figura 5) que bajo las condiciones de este ensayo el difenoconazole tiene efectos negativos en cuanto a tamaño y número de nódulos se refiere, reduciéndolos. Donde probablemente sumado a las condiciones de deficiencia micronutricional, el efecto detrimental producido en los tratamientos con fungicida, fue mayor. Esto es observable (figura 5) a nivel de la dosis baja (D/25), donde para las dosis mayores no se puede analizar este parámetro, debido a que no existió nodulación



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 5 Tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Esto concuerda con lo señalado por FISHER y HAYES (1982) y ARRUDA *et al.* (2001), donde según sus investigaciones a dosis de 0,5kg/ha de diclobutrazol y de 0,36kg/ha de sulfentrazone, se ve afectado el tamaño y número de estos, incluso inhibiendo la nodulación en dosis cuatro veces superiores a estas.

Por otro lado, el hecho de adicionar nitrógeno no produce diferencias significativas en tamaño ni en el número al comparar los testigos T+Rh+N₂ y T+Rh, tal como fue discutido en el punto anterior.

Al comparar el tamaño de los nódulos logrados por estas plantas con lo obtenido por URZUA *et al.* (1987), en ensayos con trébol rosado con suelos de la décima región este fue bajo, obteniéndose nódulos de sólo 0,74mm en promedio como los nódulos más grandes, donde los nódulos obtenidos por estos alcanzaron tamaños promedios de entre 3 y 5mm.

El estar la planta bajo condiciones de estrés, hizo que esta produjera pocos fotoasimilados los que estuvieron destinados mayormente al metabolismo de la planta que al intercambio de estos por compuestos nitrogenados de los generados por los rizobios, tal como indican WONG y EVANS (1971). De esta manera, al haber pocos fotoasimilados disponibles, el intercambio de estos por compuestos nitrogenados es bajo. Por lo tanto, esto se traduce en una baja actividad en los nódulos y por ende en un bajo crecimiento y tamaño de estos.

De esta manera, el fungicida tiene efectos depresores en cuanto a tamaño se refiere, disminuyendo el tamaño de estos en un 37,84% en el tratamiento con dosis baja (D/25) en relación al testigo con *Rhizobium* (T+Rh).

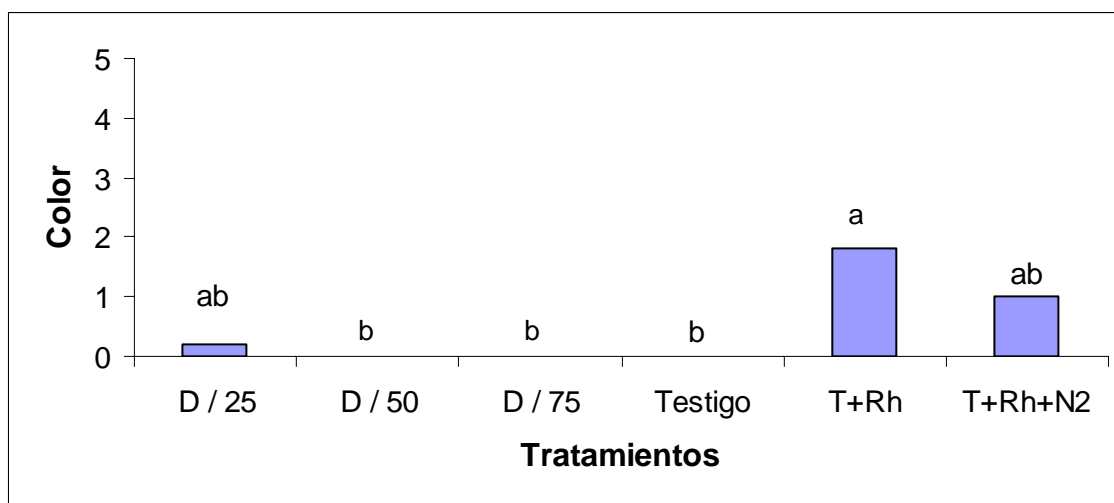
4.1.2.3 Color. En el color de los nódulos existieron diferencias significativas sólo entre el tratamiento testigo T+Rh y los tratamientos con fungicida en dosis normal (D/50) y alta (D/75), debido a que en estos tratamientos no existió nodulación (figura 6).

En cuanto al tratamiento con dosis baja (D/25), denota el efecto depresor que el fungicida posee, sin embargo no hubo diferencias significativas, al compararlo con el

testigo T+Rh. En este sentido FISHER y HAYES (1985), señalan que el paclobutrazol, un triazol, disminuye la fijación simbiótica de nitrógeno sólo en dosis de 0,25kg/ha, considerada como alta.

Por otro lado, estas diferencias no son tan claras al comparar los testigos T+Rh y T+Rh+N₂, pudiendo observar que la adición de nitrógeno para este ensayo no afecta mayormente la actividad del nódulo.

Es importante mencionar que para este ensayo la coloración lograda no sobrepasó el número 2, es decir del color verde. Esto indica que la actividad desarrollada en los nódulos no fue de mayor relevancia, logrando una baja actividad de fijación de nitrógeno y por ende un bajo intercambio de fotoasimilados por nitrógeno.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, DUNN.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 6 Color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Esta baja coloración podría haber ocurrido debido a lo señalado por VINCENT (1975), el que indica que la falta de micronutrientes tales como el zinc produce una disminución en el grado de efectividad en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Bajo las condiciones de este ensayo denota un leve efecto depresor del fungicida en las dosis utilizadas, a pesar del efecto que pudiera ejercer la deficiencia nutricional sobre la nodulación, produciendo incluso una inhibición de esta en la dosis normal (D/50) y alta (D/75) de fungicida. De esta manera a dosis baja de fungicida (D/25), se observa un menor número (figura 4) y tamaño de nódulos (figura 5), sin embargo, el color (figura 6) de los nódulos no fue afectado, existiendo diferencias no significativas, de este tratamiento en relación a los testigos T+Rh y T+Rh+N₂,

4.2 Resultados del ensayo en jarras de Leonard con arveja (Ensayo 2).

Estos datos corresponden a los resultados obtenidos del ensayo realizado en cámara con arvejas cv. Perfected Freezer 400 montado en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. Los datos están expresados en peso seco como gramos de materia seca (g) y como número (nr), tamaño (mm) y color de los nódulos, como parámetros de nodulación.

4.2.1 Materia seca. Este parámetro fue medido a nivel aéreo, radical y total, expresado en peso seco como gramos de materia seca (g).

Al igual que para el ensayo anterior, las plantas lograron un menor crecimiento colocándose en evidencia esta situación al compararlas con las plantas de arvejas cultivadas en macetas en el invernadero. Esto ocurrió por deficiencias de algunos micronutrientes, tales como níquel y zinc, que provocaron alteraciones en estas plantas expresadas a través de un menor crecimiento, longitud de entrenudos y una menor altura tal como señalan STEVENSON y COLE (1999), sin embargo, estos parámetros no fueron medidos por no encontrarse dentro de los objetivos planteados, sólo fueron apreciados de manera visual.

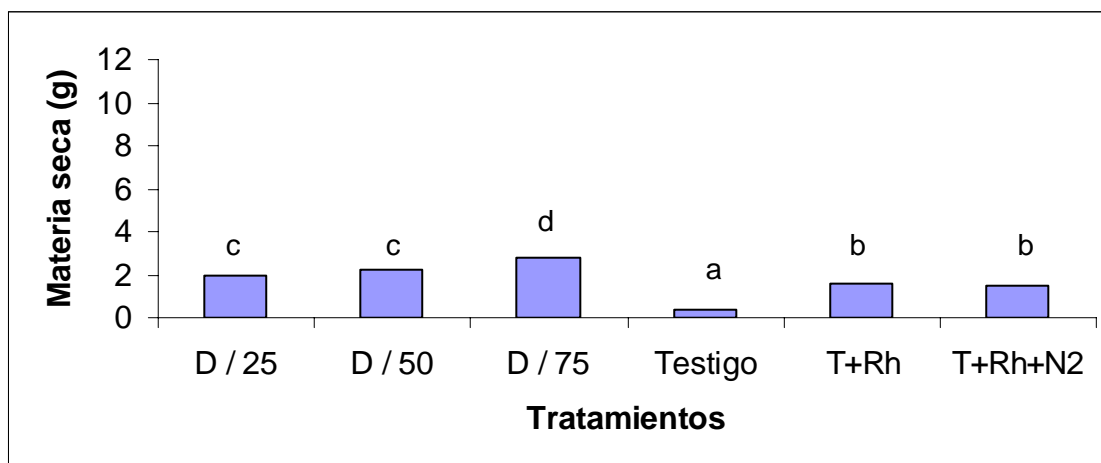
Por otro lado, tal como ocurrió en el ensayo 1, nuevamente el fungicida tuvo efectos secundarios en las plantas, pero esta vez sobre plantas de arvejas, efectos que se señalan a continuación.

4.2.1.1 Materia seca radical. En cuanto a este parámetro, el difenoconazole afectó la biomasa radicular aumentándola, tal como se observa en la figura 7. Existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con fungicida y los tratamientos testigos sin fungicida.

Nuevamente tal como ocurrió a nivel de materia seca radical con el ensayo de trébol rosado var. Quiñiqueli montado en jarras de Leonard (figura 1), denota el aumento de la materia seca radical que el difenoconazole produce incluso a dosis baja (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla (figura 7). Este aumento de biomasa radical fue de un 23% en comparación con el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh). Sin embargo, no se obtuvo diferencias entre este tratamiento (D/25) y el tratamiento con dosis normal (D/50), donde este último registró un aumento de un 40,9% en comparación con el mismo tratamiento testigo (T+Rh).

En el tratamiento con dosis alta (D/75), el difenoconazole también produjo un aumento en la biomasa radical, sin embargo, esta diferencia fue de tipo significativa con los tratamientos con dosis baja (D/25), normal (D/50) y los tratamientos testigos. En valores porcentuales, este aumento fue de un 75,8%, en comparación con el tratamiento testigo T+Rh, lo que demuestra que a este nivel de dosis, la biomasa radical aumenta significativamente más que a dosis baja (D/25) y normal (D/50).

Tal como se mencionó a nivel de materia seca radical en el ensayo anterior, realizado con trébol rosado var. Quiñiqueli montado en jarras de Leonard (Ensayo 1), este aumento de biomasa radical se debería al engrosamiento de la corteza radical que el fungicida produce como estrategia de defensa frente a un eventual ataque de hongos⁴. Afirmación que se pudo confirmar observando las raíces de los tratamientos con difenoconazole y las raíces de los tratamientos testigos.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 7 Gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Al igual que en el ensayo anterior (ensayo 1), la adición de nitrógeno equivalente a 10kg/ha no produjo diferencias a nivel de materia seca radical, tal como se puede observar en la figura 7, al compararlo con el tratamiento testigo T+Rh.

En el tratamiento testigo, nuevamente se observa (figura 7) el efecto que el rizobio genera en la biomasa radical existiendo diferencias entre este tratamiento testigo y los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂. Diferencias que fueron del orden de un 78,6 y un 77,6% menor respectivamente.

De esta manera a nivel radical y bajo las condiciones de este ensayo el

⁴ SCHNETTLER, E. (2006). Ing. Agrónomo. Jefe zonal Syngenta X^a Región. Osorno. Comunicación personal.

difenoconazole afecta el contenido de materia seca, aumentando significativamente la biomasa radical en comparación con los testigos, tanto en los tratamientos con dosis baja (D/25), normal (D/50) y dosis alta (D/75) de difenoconazole. Sin embargo, a dosis baja y normal el aumento no es significativamente mayor entre estos, pero si a dosis alta.

4.2.1.2 Materia seca aérea. En este parámetro no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con difenoconazole tal como se observa en la figura 8, registrando contenidos de 0,91, 0,95 y 0,96g para los tratamientos con dosis baja (D/25), dosis normal (D/50) y dosis alta (D/75) respectivamente, esto implica que dosis mayores o menores por sobre la dosis considerada como normal, es decir a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, no afectan el contenido de materia seca aérea.

Por otro lado, tampoco hubo diferencias entre los tratamientos con dosis baja (D/25) y dosis normal (D/50) de difenoconazole en comparación con el tratamiento testigo con rizobio (T+Rh). Esto demuestra que bajo las condiciones de este ensayo la arveja, no presenta una disminución estadísticamente significativamente en la materia seca aérea bajo estos tratamientos.

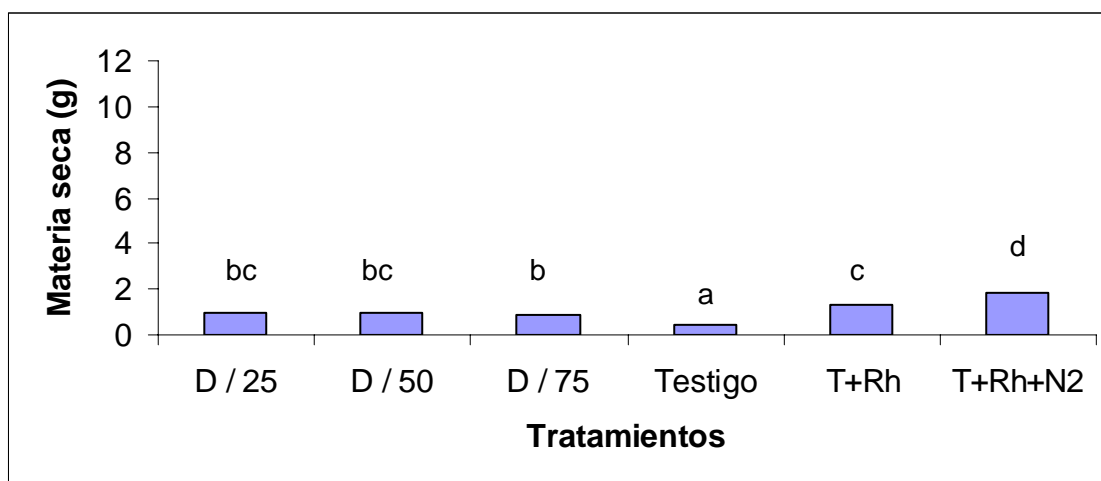
En referencia a la similitud de estos resultados TOLEDO (1977), señala que la arveja posee un mayor grado de resistencia a los pesticidas. Por lo tanto, esta se habría afectado menos que el trébol rosado y sería menos susceptible al efecto del difenoconazole.

Al comparar el tratamiento con dosis alta (D/75) con los tratamientos testigos (figura 8), denota que el difenoconazole si produce una disminución en el contenido de materia seca, existiendo diferencias estadísticamente significativas que corresponden a un 31,47% en comparación con el tratamiento testigo con rizobio (T+Rh) y a un 49,52% en comparación con el tratamiento testigo con rizobio y nitrógeno (T+Rh+N₂).

Estos resultados concuerdan nuevamente con BARROS *et al.* (2001), quienes registraron que el tratamiento con difenoconazole afectó la biomasa aérea del poroto

en comparación con el tratamiento testigo y los demás desinfectantes de semillas utilizados, como el fludioxonil y el carboxin.

Sin embargo, las arvejas parecieron ser más resistentes al difenoconazole que las plantas de trébol, esto es porque en los tratamientos con dosis baja (D/25) y normal (D/50) no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos con fungicida. Estas registraron sólo una disminución en el contenido de materia seca al comparar la dosis alta (D/75) con el tratamiento testigo con rizobio (T+Rh) siendo esta un 49,52% menor, donde por otro lado en el ensayo 1 con plantas de trébol, esta diferencia fue de un 71,27%. Registrándose además diferencias entre el tratamiento con dosis baja y los tratamientos con dosis normal y alta de fungicida (figura 2).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 8 Gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Tal como ocurrió en el ensayo anterior (figura 2), la adición de nitrógeno produjo nuevamente diferencias significativas entre este y los demás tratamientos testigos y con difenoconazole (figura 8). Esto demuestra que la adición equivalente a 10kg N₂/ha fue cuantitativamente superior a lo aportado por la asociación simbiótica con el *Rhizobium*, siendo la acumulación de materia seca aérea un 26,34% menor en el tratamiento testigo con rizobio (T+Rh). Además, destaca la importancia de la inoculación con *Rhizobium*, donde la acumulación de materia seca fue paupérrima en el tratamiento Testigo en comparación con los demás tratamientos testigos e incluso con los tratamientos con difenoconazole, existiendo diferencias estadísticamente significativas.

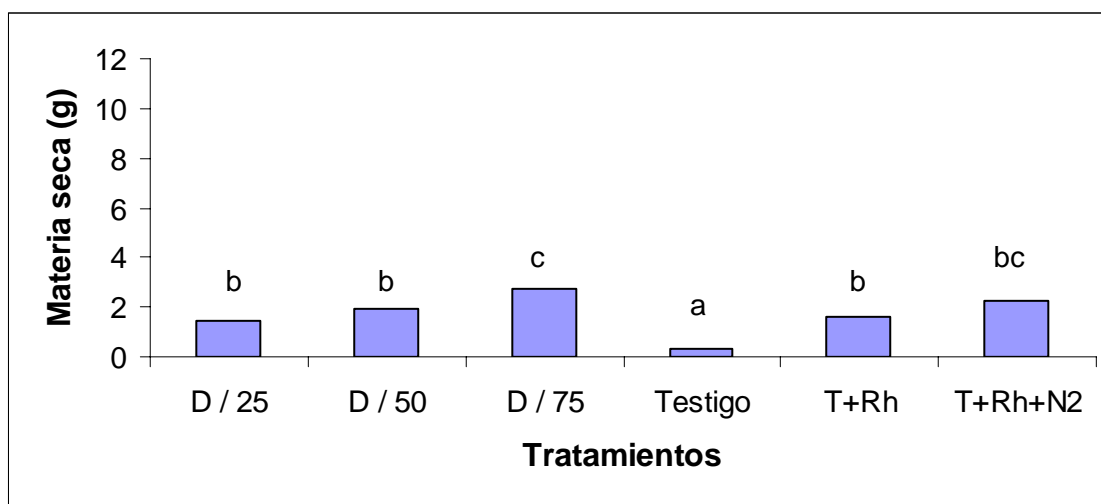
De esta manera y bajo las condiciones de este ensayo, la materia seca aérea no registró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con difenoconazole, sin embargo, si las hubo entre el tratamiento con dosis alta (D/75) y los tratamientos testigo, por lo tanto a este nivel las arvejas sólo son afectadas con la dosis alta, disminuyendo la materia seca.

4.2.1.3 Materia seca total. En este parámetro se puede observar (figura 9) que entre los tratamientos con difenoconazole, sólo existieron diferencias significativas con el tratamiento con dosis alta (D/75) de fungicida. En donde el tratamiento D/75 obtuvo un 75,75% más de materia seca, que el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh), influenciado principalmente por el aumento de materia seca radical al utilizar la dosis alta de fungicida, engrosando este las raíces de las arvejas y por lo tanto aumentando la materia seca de las mismas. Esto demostraría que sólo la dosis considerada como alta (D/75) para este ensayo, que corresponde a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, afectaría las plantas de arveja. Por otro lado, al comparar los tratamientos con difenoconazole y los tratamientos testigos, no existieron diferencias significativas, salvo con el testigo (sin *Rhizobium* y sin nitrógeno) y en el caso puntual entre el tratamiento con dosis alta (D/75) y el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh).

La no existencia de diferencias entre los tratamientos con difenoconazole (D/25 y D/50) y tratamientos testigos, se debe al aumento que el difenoconazole produce a

nivel de materia seca radical y a la disminución de materia aérea en estos tratamientos. Por lo tanto, para analizar esto es necesario observar lo ocurrido en las figuras 7 y 8. Por este motivo, la diferencia mencionada en el párrafo anterior del tratamiento con dosis alta (D/75) y el tratamiento testigo es sólo una diferencia numérica estadística y que fue del tipo significativa por el gran aumento que el difenoconazole produjo a nivel radical en este tratamiento.

El aumento de materia seca total de las arvejas por efectos de este triazol obtenido en este ensayo no concuerda con lo señalado por FISHER y HAYES (1982), quienes indican que al utilizar el diclobutrazol, un triazol sobre trébol, la materia seca disminuye incluso a dosis baja (0,25kg/ha).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 9 Gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Este efecto probablemente no se observó en las arvejas de este ensayo, ya que estas presentaron a nivel radical un gran aumento en la materia seca, producto del difenoconazole, lo que produjo que a nivel de materia seca total, haya también un incremento.

Al analizar el tratamiento testigo con nitrógeno y *Rhizobium* (T+Rh+N₂), se observa (figura 9) que este no obtuvo un aumento en la materia seca considerable, ya que no hubo diferencias significativas entre este tratamiento y el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh). Por lo tanto, a nivel de materia seca total, el incremento de materia seca por la adición de nitrógeno equivalente a 10kg/ha no fue estadísticamente superior al tratamiento testigo T+Rh. Esto es por que este cultivo no responde mayormente a la adición de este elemento, tal como lo indica FAIGUENBAUM (1987), con respecto a las necesidades nutricionales de este cultivo. Incluso el tratamiento testigo T+Rh+N₂, fue inferior al tratamiento con dosis alta de difenoconazole (D/75), lo que demuestra la mayor influencia del fungicida que del nitrógeno sobre las plantas de arveja.

De esta manera, para este cultivo la acción depresora del fungicida en cuanto a materia seca no denota de igual manera como lo ocurrido en trébol, donde este cultivo (arveja) pareciera ser menos susceptible frente al difenoconazole si se analiza a nivel de materia seca total. Sin embargo, es necesario analizar lo ocurrido a nivel de materia seca radical y aérea para comprender los verdaderos efectos del fungicida sobre la planta. Por otro lado, se observa (figura 9) que el fungicida ejerció un aumento de la materia seca a nivel de dosis alta (D/75), esto producto de un menor efecto en la disminución de materia seca aérea (figura 8) de las arvejas y a un gran aumento a nivel de la materia seca radical (figura 7). Es importante señalar además que la deficiencia de zinc y de níquel, pudo haber distorsionado en cierta medida los resultados, tal como indica TORRES y URZUA (1985).

4.2.2 Nodulación. En cuanto a este parámetro se analizará el número de nódulos (nr), el tamaño en milímetros (mm) y su coloración a través de una escala, nódulos que fueron extraídos de todo el sistema radical de la planta de arveja.

4.2.2.1 Número. Para este ensayo no se registraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, no existiendo nodulación en los tratamientos con difenoconazole (cuadro 3). Incluso con la dosis más baja no la hubo, donde para el ensayo con trébol en jarras de Leonard se obtuvieron 3 nódulos (figura 4) como mayor valor en el tratamiento testigo T+Rh.

Según ensayos realizados de crecimiento en placa bajo el efecto del difenoconazole con distintas cepas de *Rhizobium* en el Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal, este no afecta el crecimiento de estos. Sin embargo, en la investigación realizada por TORRALBA *et al.* (1986), sobre la acción de diversos pesticidas sobre la nodulación en dos estirpes de *Rhizobium*, señalan que la acción de estos sobre cultivos puros de *Rhizobium*, no es indicativo de su comportamiento en simbiosis.

Respecto a esto, es probable que *Rhizobium leguminosarum*, sea más susceptible al fungicida que la especie *trifolii* bajo estas condiciones de ensayo, por lo tanto debido a esta razón y en conjunto a la falta de micronutrientes, la nodulación en los tratamientos con fungicida se pudo haber afectado aún más, produciendo la inhibición de esta.

CUADRO 3 Número de nódulos (nr) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Tratamiento	D / 25	D / 50	D / 75	Testigo	T+Rh	T+Rh+N ₂
Número	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	1,20

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

En el testigo no existió nodulación como era de esperarse por la esterilidad del medio y por la falta de inoculación. En cambio, en los testigos con *Rhizobium* (T+Rh) y

con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂) si hubo nodulación, la que fue mayor en el tratamiento testigo T+Rh con una media de 1,4 nódulos.

Por otro lado, el tratamiento testigo T+Rh+N₂ mostró una pequeña diferencia pero no significativa con respecto al testigo T+Rh. Probablemente por el efecto depresor del nitrógeno como lo ya señalado anteriormente.

Al comparar este ensayo con el anterior, es evidente la menor nodulación probablemente porque la arveja es más susceptible a las deficiencias nutricionales que el trébol y a características propias de la planta que produjeron esta disminución en este parámetro. En relación a la baja nodulación BOULDIN *et al.* (1979), señalan que el número de nódulos es un carácter predeterminado para cada especie y está dado por el número de puntos disponibles en la raíz en el momento que ocurre la infección bacteriana.

Por otro lado el número de nódulos obtenidos en el mejor tratamiento, fue de 1,4 como media, lo cual es bajo al compararlo con lo obtenido por PADILLA (1985). Según lo obtenido por este autor, el número de nódulos bajo condiciones de inoculación son de cinco por planta.

En base a esto, la baja nodulación obtenida puede ser causa de la falta de micronutrientes a la cual estuvieron sometidas las plantas, lo que afectaría indirectamente en la infección de la bacteria.

De esta manera, bajo las condiciones de este ensayo, el fungicida inhibió la nodulación incluso a la dosis baja (D/25), pero es necesario incluir en este efecto la falta de micronutrientes que pudo haber afectado el proceso infectivo.

4.2.2.2 Tamaño. Al igual que en el parámetro anterior no se observó diferencias significativas entre los distintos tratamientos (cuadro 4). El hecho de no haber nodulación en los tratamientos con fungicida y el testigo, no es posible discutir si este fungicida afecta el tamaño de los nódulos bajo las condiciones de este ensayo.

Por otro lado, en los tratamientos inoculados y sin fungicida el testigo T+Rh fue el que obtuvo el mayor tamaño de nódulos. Sin embargo, el menor tamaño de nódulos lo obtuvo el tratamiento testigo T+Rh+N₂, dado el efecto detrimental que el nitrógeno produce, tal como lo señalan URZUA *et al.* (1986).

CUADRO 4 Tamaño de nódulos (mm) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Tratamiento	D / 25	D / 50	D / 75	Testigo	T+Rh	T+Rh+N ₂
Tamaño (mm)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,32

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

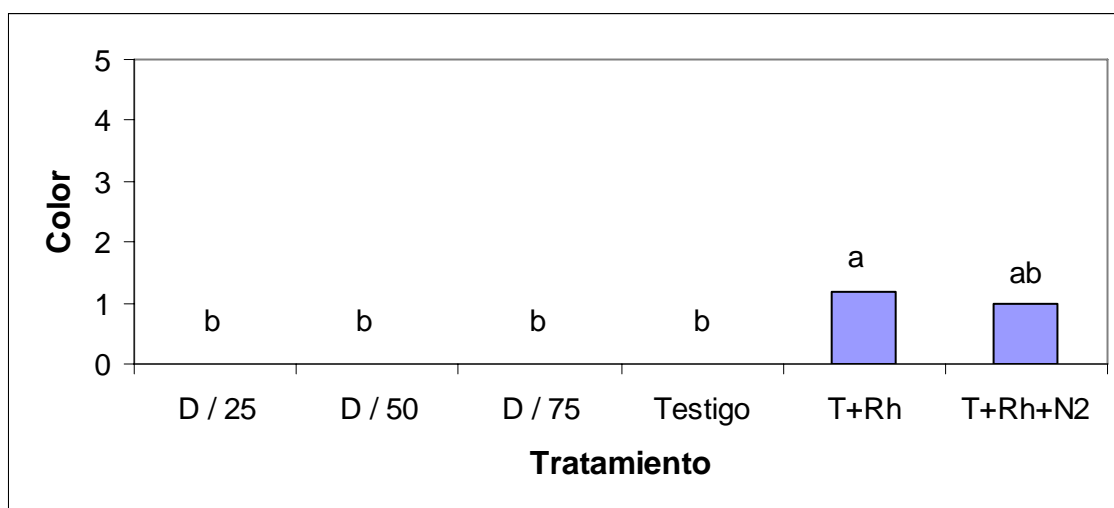
Cabe destacar el pequeño tamaño alcanzado por los nódulos, donde el mejor tratamiento fue un 45,95% más pequeño (cuadro 4) que los nódulos obtenidos para las mismas condiciones de ensayo pero con trébol (figura 5).

El tamaño de los nódulos fue bajo si se compara con lo obtenido por PADILLA (1985), en su estudio de nodulación de arvejas bajo el efecto de un bioestimulante, quién obtuvo tamaños de nódulos del orden de entre 6 y 7mm.

De igual manera que para el parámetro anterior y el ensayo anterior, el bajo tamaño alcanzado, esta en función de las condiciones de estrés que estuvo sometida la planta. Donde la producción de fotoasimilados tendría relación con la actividad del vegetal, que para el caso fue baja. De esta manera, al haber poco fotoasimilados para el intercambio con el rizobio, el tamaño de los nódulos se reduce, tal como lo señalan HUNGRIA y NEVES (1986), en su trabajo de la manipulación de fotosintatos en la fijación biológica de nitrógeno con el poroto (*Phaseolus vulgaris L.*).

De esta manera, al no haber nodulación en los tratamientos, no se pudo observar el efecto del fungicida sobre el tamaño de estos bajo las condiciones de este ensayo.

4.2.2.3 Color. En cuanto a este parámetro, al no haber nodulación en los tratamientos con fungicida y el testigo, no se puede discutir los efectos que pudiera tener el fungicida sobre la actividad de los nódulos expresada por el color de estos.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, DUNN.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 10 Color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos.

El mejor tratamiento fue el testigo con *Rhizobium* (T+Rh) el cual mostró el mejor color (Figura 10), entre blanco y verde (1,2 en escala). Esto si se compara con el testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), ya que este sólo obtuvo una media de uno, es decir blanco. En este mismo sentido se observa una pequeña diferencia entre

ambos tratamientos, probablemente por la acción depresora del nitrógeno en la fijación de este elemento como ya se ha discutido.

Por otro lado, el color logrado por el tratamiento mejor (T+Rh) fue más baja, más cercano al blanco, que el color verde logrado por los nódulos para el ensayo con trébol rosado en jarras de Leonard.

De esta manera, para el caso de la nodulación en arveja el rizobio se vio más afectado, siendo esta inhibido en los tratamientos con fungicidas. Por lo tanto, entre el ensayo de arveja y el de trébol en jarras de Leonard, el *Rhizobium leguminosarum L.* es más afectado que el *R. trifolii L.*

4.3 Resultados del ensayo en macetas con trébol rosado (Ensayo 3).

Estos datos corresponden a los resultados obtenidos del ensayo realizado en invernadero con trébol rosado cv. Quiñequeli montado en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. Los datos están expresados en peso seco como gramos de materia seca (g) y como número (nr), tamaño (mm) y color de los nódulos, como parámetros de nodulación.

4.3.1 Materia seca. Este parámetro fue medido a nivel aéreo, radical y total, expresado en peso seco como gramos de materia seca (g).

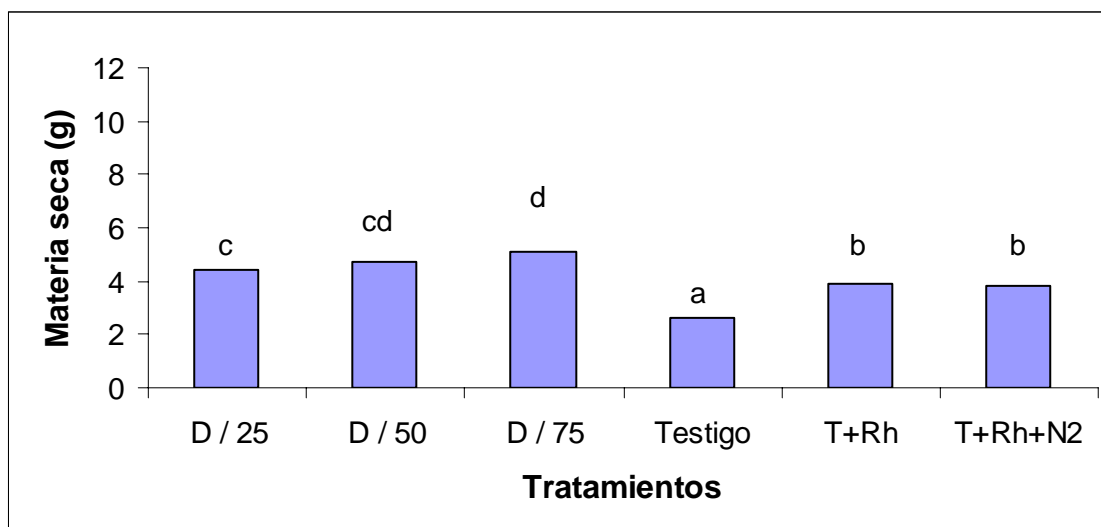
En los ensayos realizados en macetas existió un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas, observación que fue apreciada al levantamiento de los ensayos al ser comparados estos con los ensayos realizados en jarras de Leonard pero que no fue registrada por no estar dentro de los parámetros a medir dentro de los objetivos. Este mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de trébol como de arveja, fue producto del mayor espacio para el desarrollo radical (TORRES, 1991) y además de la mejor nutrición mineral obtenida del suelo (STEVENSON y COLE, 1999). El hecho de utilizar suelo como sustrato, permite satisfacer de mejor manera la demanda de nutrientes como el nitrógeno y en mayor grado los micronutrientes, como el níquel y el zinc, los cuales se encontraban deficitarios en la solución KNOP elaborada como medio para los ensayos anteriores realizados en jarras de Leonard.

La utilización de suelo como sustrato, permitió a las plantas crecer y desarrollarse mejor, en comparación con los ensayos realizados de jarras de Leonard. Además, las plantas lograron una mejor coloración de hojas, tamaño y desarrollo de los tallos.

4.3.1.1 Materia seca radical. Tal como lo obtenido en el ensayo con trébol pero montado en jarras de Leonard (figura 1), en este ensayo la biomasa radical aumentó, existiendo diferencias estadísticamente significativas (figura 11) entre los tratamientos con difenoconazole y los tratamientos testigos (Testigo, T+Rh, T+Rh+N₂). En comparación con el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh), los tratamientos con difenoconazole fueron superiores a este en un 78,81% para el tratamiento con dosis alta de difenoconazole (D/75), equivalente a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, un 43,95% superior en el tratamiento con dosis normal (D/50), equivalente a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y un 26,83% superior en el tratamiento con dosis baja (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla.

Nuevamente se pudo apreciar de manera visual en este ensayo al levantamiento de este, que las raíces eran levemente más gruesas en los tratamientos con difenoconazole que en los tratamientos testigos, eso explicaría las diferencias obtenidas. Este mayor engrosamiento de las raíces, se habría producido por el efecto que el fungicida produciría como una barrera de protección frente a un eventual ataque de hongos, como señaló SCHNETTLER a través de su comunicación personal.

Entre los tratamientos con difenoconazole, hubo diferencias significativas sólo entre el tratamiento con dosis baja (D/25) y el tratamiento con dosis alta (D/75). Sin embargo, el tratamiento con dosis normal (D/50), fue un 11,89% superior al tratamiento con dosis baja (D/25) y el tratamiento con dosis alta (D/75) fue un 19,5% superior al tratamiento con dosis normal (D/50). Por lo tanto, según estos resultados, al aumentar de una dosis normal (D/50) a una alta (D/75) no genera diferencias, así como tampoco las hay al aumentar de una dosis baja (D/25) a una normal (D/50). Pero al aumentar de una dosis baja (D/25) a una alta (D/75), produce una mayor acumulación de biomasa radicular, por un mayor efecto del fungicida sobre el engrosamiento radical.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 11 Gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Entre los tratamientos testigos: T+Rh y T+Rh+N₂, no se registraron diferencias estadísticas. Esto es debido principalmente al sustrato suelo utilizado, el que suplió las necesidades de nitrógeno y de macro y microelementos lo que no generó que hubiera diferencias entre estos tratamientos. A pesar, de la adición de nitrógeno al tratamiento T+Rh+N₂, no hubo diferencias, ya que el nitrógeno no fue una limitante para el desarrollo radical, debido a la mineralización de este elemento de la materia orgánica del suelo, por efecto de la temperatura y humedad, tal como señala TORRES y URZUA (1985).

Sólo a nivel del tratamiento Testigo, hubo diferencias con los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂, los cuales estaban inoculados con *Rhizobium* y que por ende demostraría la importancia de la inoculación.

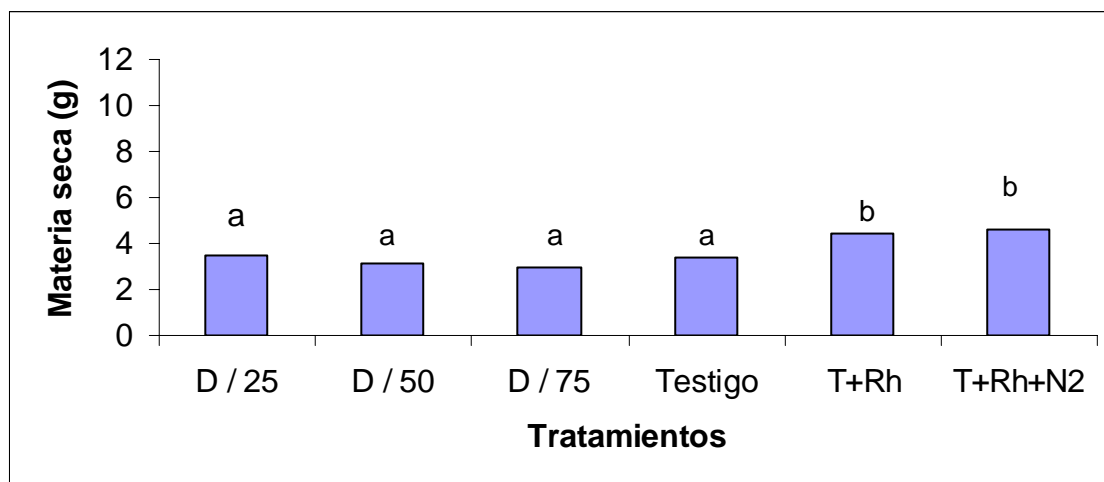
De esta manera, el difenoconazole aumenta la materia seca radical y la incrementa sólo al aumentar de una dosis baja a una alta, demostrándose esto a través del análisis estadístico el cual arrojó diferencias significativas entre los respectivos tratamientos con difenoconazole y entre estos y los tratamientos testigos.

4.3.1.2 Materia seca aérea. A nivel de este parámetro, se observaron diferencias entre los tratamientos con difenoconazole (figura 12) y los tratamientos testigos, en especial con el tratamiento con *Rhizobium* (T+Rh) y el tratamiento con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂). Esto indicaría que el fungicida afectaría la biomasa aérea, reduciéndola. Esto queda demostrado comparando entre el tratamiento testigo T+Rh y los tratamientos con difenoconazole, esta reducción fue de un 21,55%, un 29,62% y un 33,86% en los tratamientos con dosis baja (D/25), dosis normal (D/50) y dosis alta (D/75) respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por BARROS *et al.* (2001), quienes obtuvieron que dentro de los fungicidas evaluados por ellos, el difenoconazole produjo la mayor reducción en la biomasa aérea de las plantas de porotos utilizadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los demás tratamientos.

Entre las distintas dosis utilizadas en los tratamientos con difenoconazole, no hubo diferencias, lo que indicaría que independiente de la dosis el efecto detrimental sobre la biomasa es la misma, existiendo pequeñas diferencias porcentuales entre la dosis baja, normal y alta, pero que, sin embargo, no son diferencias estadísticamente significativas. No así como lo obtenido en el ensayo 1 con plantas de trébol montadas en jarras de Leonard (figura 2), donde si se obtuvieron diferencias entre los tratamientos con fungicida.

En relación a la disminución de la biomasa seca aérea por efecto de los triazoles FISHER y HAYES (1982), señalan que estos disminuyen la materia seca al utilizar dosis superiores a las recomendadas. Indicando además, que afectan el tamaño de las plantas produciendo enanismo y un follaje más oscuro, efectos que para este ensayo no se ejercieron con tal magnitud como lo indicado por estos autores. Sin embargo, en algunas plantas de las repeticiones del tratamiento con dosis alta de fungicida (D/75), las hojas se tornaron de un color más oscuro, no afectando

significativamente la biomasa aérea en comparación con el tratamiento con dosis normal (D/50) y baja (D/25).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 12 Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

El utilizar nitrógeno en este ensayo no incrementó la materia seca aérea (figura 12). Estas diferencias se hicieron menos notorias por el hecho de que se utilizó suelo como sustrato, teniendo las plantas la posibilidad de obtener nitrógeno mineralizado del suelo, donde la dosis utilizada equivalente a 10kg/ha sólo actuaría como un starter y no produciría aumentos notables en el rendimiento como lo señala URZÚA (1991), al utilizar una dosis baja de nitrógeno.

El tratamiento testigo (Testigo), no registró diferencias con los tratamientos con difenoconazole pero, si con los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂, esto es debido a la falta de inoculación. Esto demuestra la importancia de la inoculación y del efecto

de la simbiosis con *Rhizobium* sobre la biomasa (TORRES y URZÚA, 1984), a pesar de haber nitrógeno disponible en el suelo producto de la mineralización de este.

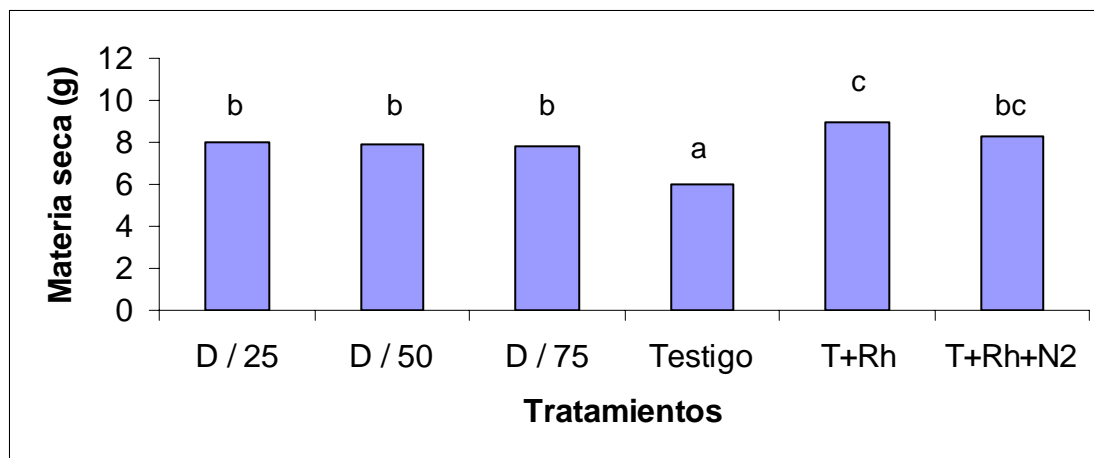
De esta manera, a nivel de materia seca aérea, el difenoconazole produce un efecto indirecto sobre la biomasa aérea de los tréboles, reduciendo significativamente la materia seca en comparación con los testigos, disminución que afectó en un grado similar a los tratamientos con dosis baja (D/25), normal (D/50) y alta (75) de difenoconazole, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

4.3.1.3 Materia seca total. Al analizar este parámetro, destaca la influencia que tiene de el difenoconazole sobre la materia seca total, reduciéndola. Esto se comprueba a través de la diferencia estadísticamente significativa (figura 13) que existe entre los tratamientos con difenoconazole y el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh). En el tratamiento con dosis baja de difenoconazole (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, disminuyo un 10,83% la materia seca total en comparación con el testigo T+Rh, en el tratamiento con dosis normal (D/50) un 11,31% y en el tratamiento con dosis alta (D/75) un 12,04%.

Por otro lado, entre el tratamiento testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂) y los tratamientos con difenoconazole la situación es compleja porque no hubo diferencias, por lo que se podría concluir que a este nivel, el difenoconazole no produciría efectos indirectos detrimentales en la materia seca total. Sin embargo, es necesario analizar los efectos que este fungicida produce tanto a nivel radical como aéreo para comprender la similitud de los resultados en los tratamientos con y sin difenoconazole. La similitud de los resultados, se debió al engrosamiento radical que produjo el fungicida en los tratamientos con difenoconazole, aumentando de esta manera la materia seca a este nivel y debido a la disminución de la materia seca que el fungicida produjo a nivel aéreo, lo que a nivel de materia seca total no produjo mayores variaciones.

Por lo tanto, según lo anteriormente señalado, el fungicida afecta a la planta de trébol en cuanto a materia seca se refiere, esto se demuestra al comparar los tratamientos con difenoconazole con el tratamiento testigo T+Rh y al analizar y

observar lo ocurrido tanto a nivel radical (figura 11) como aéreo (figura 12). Esto se asemeja a los resultados obtenidos por ARRUDA *et al.* (2001), indicando estos que el compuesto además de tener acción negativa sobre la nodulación y fijación de nitrógeno en la dosis normal y superior a la recomendada, este tuvo además una acción depresora sobre la materia seca e incluso sobre el crecimiento.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 13 Gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Esto también concuerda con lo señalado por URZUA *et al.* (1986), donde estos señalan que algunos pesticidas a dosis altas afectan la materia seca del trébol blanco en hasta un 40% con respecto al testigo. En este sentido a nivel de este ensayo, el fungicida utilizado afectó reduciendo en entre un 10,83 y un 12,04% la materia seca total.

BARROS *et al.* (2001), en su investigación de la compatibilidad de un insecticida con fungicidas como el difenoconazole inoculados en semillas de poroto

(*Phaseolus vulgaris*), demostraron que esta combinación era compatible, pero que la utilización del difenoconazole afecta la materia seca de esta especie y no así el insecticida, reflejándose esto a través de las diferencias estadísticamente no significativas que existieron entre el testigo y el tratamiento con el insecticida utilizado.

Por otro lado, entre los tratamientos con difenoconazole no hubo diferencias significativas, lo que demuestra que al aumentar o disminuir la dosis (figura 13) no se producen diferencias en la biomasa total.

La adición de nitrógeno al tratamiento testigo T+Rh+N₂, no produjo un aumento de la biomasa total, como lo ya observado tanto a nivel radical (figura 11) como a nivel aéreo (figura (12), debido a la disponibilidad de nitrógeno que se mineralizó del suelo y a la mejor nodulación (figura 14) del tratamiento testigo T+Rh.

De esta manera, a nivel de este ensayo el fungicida afecta la materia seca del trébol rosado reduciéndola, tanto a nivel de dosis baja (D/25) como a nivel de dosis normal (D/50) y alta (D/75), sin embargo, el incremento de la dosis no produce diferencias en la materia seca total.

4.3.2 Nodulación. En cuanto a este parámetro se analizará el número de nódulos (nr), el tamaño en milímetros (mm) y su color a través de una escala, nódulos que fueron extraídos de todo el sistema radical de la planta de trébol.

4.3.2.1 Número. Para este parámetro, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los tratamientos con difenoconazole en dosis baja (D/25), normal (D/50) y alta (D/75), con el tratamiento testigo T+Rh (figura 14). En la dosis baja (D/25), la nodulación se redujo en un 72,53%, pero más aún al utilizar la dosis normal (D/50) y alta (D/75) de fungicida, donde esta se inhibió.

En relación a estas dosis de fungicida HAMDÍ (1999), indica que ciertos fungicidas afectan la nodulación, generalmente a dosis altas y que por ende son peligrosos para la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa.

Esto concuerda con lo demostrado por ARRUDA *et al.* (2001), quienes observaron una disminución en el número de nódulos con la dosis normal recomendada y superiores a esta, al aplicar sulfentrazone en soja.

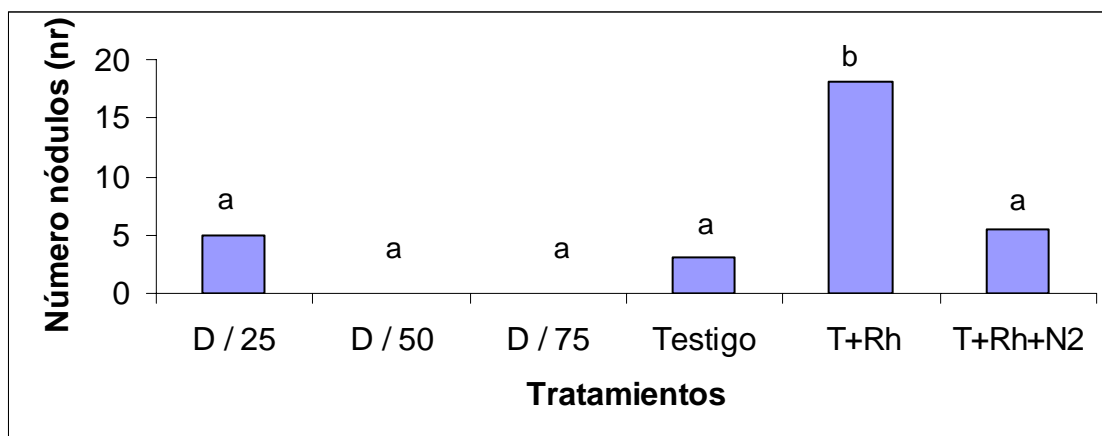
En este sentido FISHER y HAYES (1982), señalan que algunos triazoles reducen la nodulación, reducción que se manifestó en la dosis baja (D/25), produciendo una disminución de aproximadamente un 70% en el número de nódulos en relación al testigo T+Rh.

En relación al número máximo de nódulos obtenidos, esta fue de 18,2 en promedio para el tratamiento testigo T+Rh. Sin embargo, la nodulación lograda fue baja, ya que según lo obtenido por TORRES y URZUA (1984), el número de nódulos para este cultivar debería ser de aproximadamente de 80 por planta en similares condiciones.

En el testigo se observa que existió nodulación probablemente por el hecho de utilizar un sustrato no estéril el cual permite la infección del trébol con rizobios nativos, donde el número de nódulos obtenidos fue similar al tratamiento con dosis baja (D/25) de difenoconazole, ejerciendo el fungicida un efecto similar al no inocular la semilla con rizobio como lo observado en el tratamiento testigo. Sin embargo, la existencia de rizobios en este suelo aumenta también la competitividad por los puntos de infección, lo que podría afectar la nodulación.

En relación a la competitividad por los puntos de infección TORRES y URZUA (1985), indican que las cepas de rizobios además de ser efectivas, tienen que tener la capacidad de ser competitivas por los lugares de infección.

Por otro lado, los resultados revelan que el tratamiento testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), mostró un efecto negativo en la nodulación, existiendo diferencias significativas con el tratamiento testigo T+Rh. La disminución en la nodulación fue de aproximadamente un 75% menos. Este fenómeno es indicado por TORRES y URZUA (1985), quienes encontraron diferencias significativas entre el testigo inoculado y el testigo más nitrógeno.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 14 Número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Este resultado también concuerda con lo obtenido por URZUA *et al.* (1987), señalando que el exceso de nitrógeno mineral presente en el suelo, produce un efecto depresor sobre la nodulación. Este exceso de nitrógeno mineral es producto del alto contenido de materia orgánica de estos suelos y por tanto de nitrógeno susceptible a mineralizarse, lo cual sucede al aumentar la temperatura y cuando la humedad no es limitante.

Estas condiciones se produjeron en el suelo de las macetas que se encontraban en el invernadero, debido a que este no cuenta con sistemas de ventilación apropiados. Por lo tanto, las temperaturas que podían encontrarse durante los meses de Enero y Febrero, fácilmente podían alcanzar los 35°C en días calurosos, siendo además la humedad un factor no limitante porque las macetas eran regadas manteniendo el suelo dentro la capacidad de campo.

De esta manera, bajo las condiciones de este ensayo se demuestra el efecto negativo que produce el fungicida, reduciendo la nodulación incluso a dosis baja (D/25), y principalmente en dosis normal (D/50) y alta (D/75), donde la nodulación es inhibida.

4.3.2.2 Tamaño. El fungicida produjo efectos negativos en cuanto al tamaño de los nódulos se refiere. Este redujo el tamaño de los nódulos, registrándose diferencias de un 93,34% menos, al comparar el tratamiento con dosis baja de fungicida (D/25) con el tratamiento testigo T+Rh (figura 15).

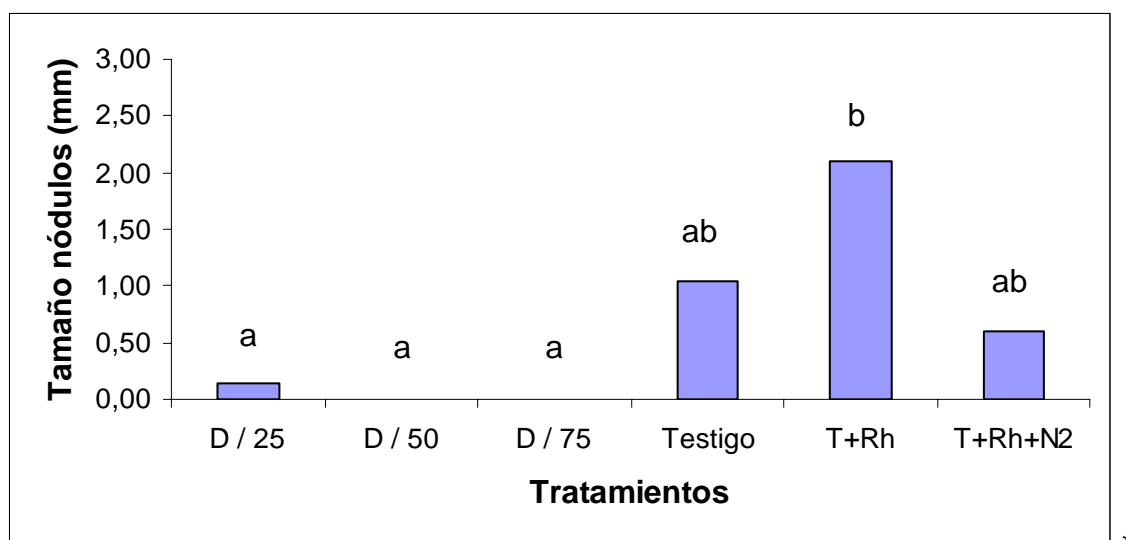
Nuevamente los resultados concuerdan con lo señalado por FISHER y HAYES (1982), quienes indican que algunos triazoles reducen el tamaño y por ende el peso de los nódulos, aún en dosis bajas. Sus resultados mostraron que a dosis altas se produjo una reducción de hasta un 60% en el peso de estos. Lo mismo ocurre en los nódulos de soja al aplicar un triazol (sulfentrazone) como lo indica ARRUDA *et al.* (2001), señalando además, que a dosis superiores se acentúa el efecto.

En el tratamiento testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂) las diferencias obtenidas con el testigo con *Rhizobium* (T+Rh) no fueron tan importantes como para el número de nódulos. Sin embargo, el tratamiento con dosis baja de fungicida (D/25) fue el que obtuvo el menor tamaño, siendo de esta manera el efecto del fungicida levemente más depresivo que la acción del nitrógeno, pero aún así las diferencias no fueron significativas entre el testigo T+Rh+N₂ y el tratamiento con dosis baja (D/25).

Por otro lado, el tamaño de los nódulos en los tratamientos testigo y en el testigo T+Rh+N₂ fue similar al tratamiento con dosis baja (D/25) de fungicida. Esto podría ocurrir debido que el testigo no fue inoculado pero, sin embargo, fue infectado por rizobios nativos del suelo que habría ocurrido más tarde y que por lo tanto los nódulos tendrían un menor tiempo en crecimiento que los tratamientos inoculados.

El tratamiento testigo T+Rh+N₂ obtuvo nódulos de menor tamaño que el tratamiento testigo T+Rh, debido al efecto detrimental que este elemento produce. Así, el nitrógeno afectaría más el tamaño de los nódulos que el número de estos, tal como

lo señala SPAINK (2000), debido a que el número de estos estaría en función de la infección de las bacterias que ocurre en las primeras semanas y que luego por la acción de la temperatura y de la humedad que gatillan la mineralización del nitrógeno, se afectaría la funcionalidad de los nódulos y por ende el crecimiento y tamaño de estos. Donde al aumentar el nitrógeno disponible para la planta, esta lo utiliza por sobre el intercambiado por fotosintatos con los rizobios, existiendo una relación inversa entre nitrógeno y fotosintatos intercambiados tal como lo señala FREIRE (1984).



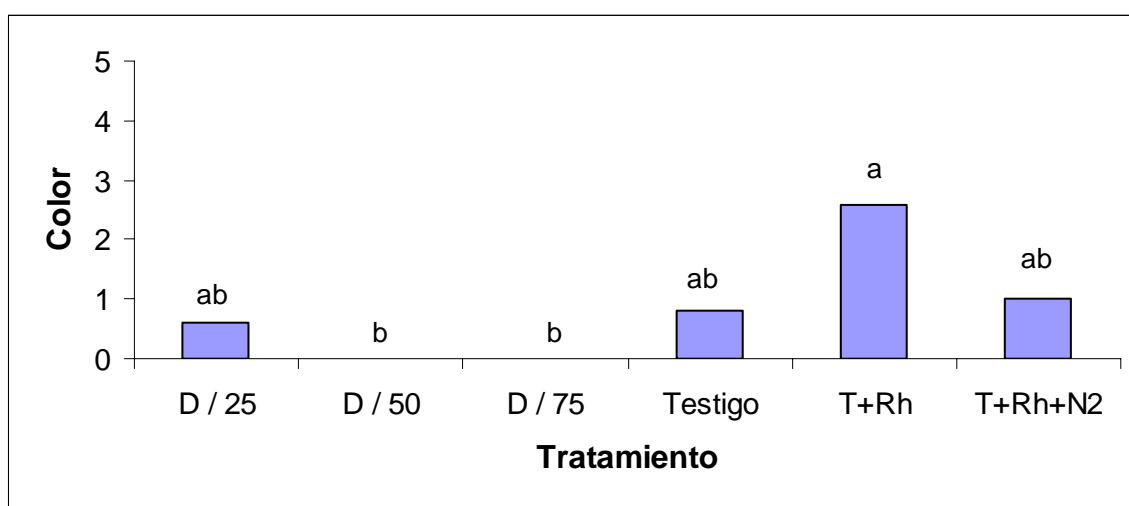
Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 15 Tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

De esta manera, al igual que para el número de nódulos, el fungicida a dosis baja (D/25) afecta el tamaño de los nódulos, reduciendo significativamente el tamaño de estos.

4.3.2.3 Color. En la figura 16, se observa que no existen diferencias entre el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh) y los tratamientos con dosis baja (D/25) de fungicida y el testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂). Obteniéndose el mejor color para el tratamiento testigo T+Rh con un valor de 2,6 en la escala, es decir un color verde. Para este parámetro el difenoconazole produjo un mayor efecto depresor (pero que no fue significativo) que el nitrógeno, siendo el color para la dosis baja (D/25) un 15% menor que para el tratamiento testigo T+Rh+N₂. A pesar de esto no existieron diferencias significativas entre estos dos tratamientos.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, DUNN.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 16 Color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Estos resultados, se asemejan con los obtenidos por FISHER y HAYES (1982), donde algunos de los triazoles evaluados sólo en dosis altas como el diclobutazol, afectaron la nodulación medido a través de la reducción de acetileno, aún en dosis

bajas. Por otro lado, ARRUDA *et al.* (2001), indican que sólo en concentraciones superiores a lo normal, los triazoles afectan el proceso de fijación de nitrógeno.

A diferencia con el ensayo anterior, donde para el testigo no hubo nodulación, el color no difirió significativamente entre este y el tratamiento testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), ni con el tratamiento con dosis baja (D/25). Esto es probablemente, por la infección de rizobios nativos que permitieron que estas plantas nodularan, pero estos no fueron tan eficaces como en el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh), donde los rizobios fueron inoculados.

De esta manera, para este ensayo se puede presumir que a dosis baja (D/25) de fungicida la actividad de los nódulos se ve levemente deprimida por la acción del difenoconazole, donde la adición de nitrógeno en el tratamiento testigo T+Rh+N₂ también la deprime, por el exceso de este elemento que estimula al vegetal a utilizar los compuestos nitrogenados del suelo por sobre los intercambiados por el rizobio con fotoasimilados, pero que, sin embargo, no representan reducciones importantes, ni significativas.

4.4 Resultados del ensayo en macetas con arvejas (Ensayo 4).

Estos datos corresponden a los resultados obtenidos del ensayo realizado en invernadero con arvejas cv. Perfected Freezer 400 montado en macetas con suelo trumao bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos. Los datos están expresados en peso seco como gramos de materia seca (g) y como número (nr), tamaño (mm) y color de los nódulos, como parámetros de nodulación.

4.4.1 Materia seca. Este parámetro fue medido a nivel aéreo, radical y total, expresado en peso seco como gramos de materia seca (g).

Este ensayo, realizado en macetas con arveja, mostró un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas, que el ensayo realizado en jarras de Leonard con arveja, debido a la capacidad del suelo de suplir los micronutrientes necesarios requeridos por las plantas, la mayor disponibilidad de nitrógeno mineral y a un mayor espacio para el desarrollo de las raíces.

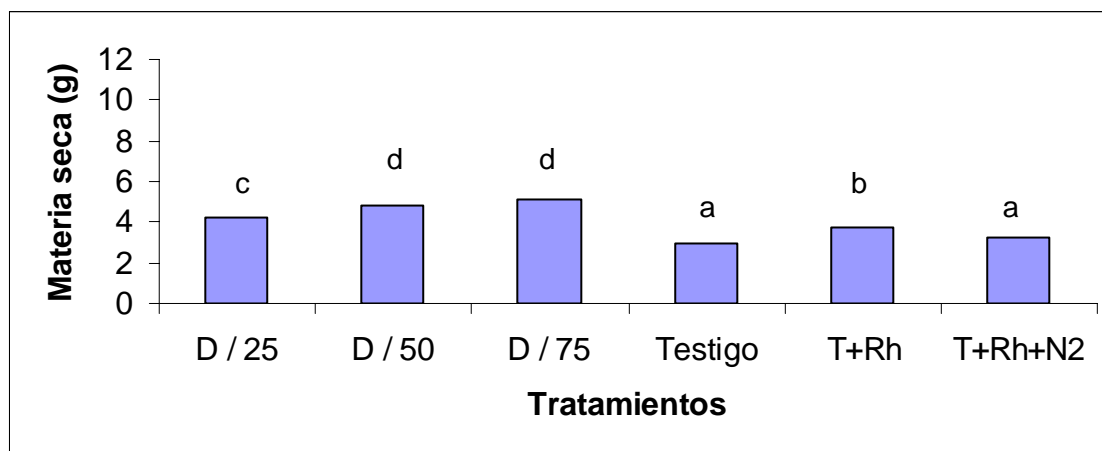
4.4.1.1 Materia seca radical. Al igual que en el ensayo anterior (ensayo 3) realizado con trébol rosado var. Quiñiqueli, se observa en este ensayo (figura 17) que el difenoconazole produjo el mismo efecto sobre el sistema radical aumentando la materia seca de las raíces en comparación con los tratamientos testigos.

Al comparar los tratamientos con difenoconazole con el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh), destaca que existieron diferencias estadísticamente significativas, donde tan sólo con la utilización de la dosis baja (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, el incremento de la materia seca radial fue de un 26,83%. En el tratamiento con dosis normal (D/50), equivalente a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, el incremento en la materia seca radical fue de un 43,95% y para el tratamiento con dosis alta (D/75), equivalente a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, el incremento en la materia seca radical fue de un 50,85%. Esto indicaría que a una mayor dosis de fungicida, mayor es la acumulación de biomasa radical, debido al engrosamiento radical que produce el difenoconazole, tal como lo señalado por SCHNETTLER en su comunicación personal.

Por otro lado, según el análisis estadístico realizado entre los tratamientos con difenoconazole, hubo diferencias significativas sólo entre el tratamiento con dosis baja (D/25) y los tratamientos con dosis normal (D/50) y alta (D/75). De este modo, el tratamiento con dosis normal (D/50), fue un 11,89% superior al tratamiento con dosis baja (D/25) y el tratamiento con dosis alta (D/75) un 15,93% superior. Por lo tanto, según estos resultados, al aumentar de una dosis normal (D/50) a una alta (D/75) no genera aumentos significativos en la biomasa radical.

Entre los tratamientos testigos sin *Rhizobium* (Testigo), con *Rhizobium* (T+Rh) y con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂), hubo diferencias significativas. Esto refleja la mejor nutrición proveída por el suelo, suministrando las necesidades de macro y micronutrientes requeridas (SAWICKA y SELWET, 1998). Incluso la adición de nitrógeno al tratamiento testigo (T+Rh+N₂) equivalente a 10kg/ha, no generó un aumento en la biomasa radical en comparación con el demás tratamiento testigo T+Rh, debido al mejor suministro proveniente del sustrato suelo producto de la mineralización

de la materia orgánica (URZUA *et al.*, 1986). Además el testigo T+Rh, obtuvo más materia seca, debido a que este logró una mejor nodulación (figura 20).



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

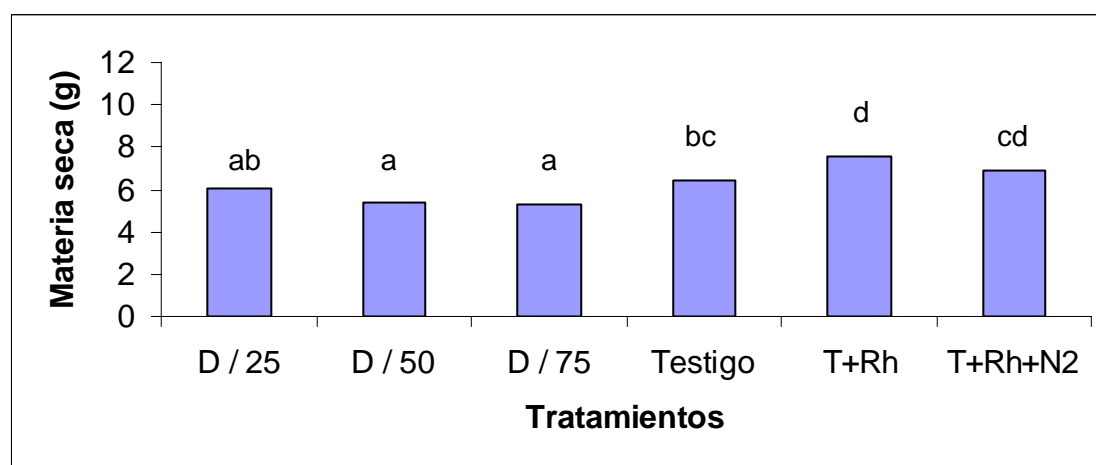
Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 17 Gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero en condiciones de invernadero.

De esta manera a nivel de materia seca radical, el difenoconazole aumenta la materia seca radical y la incrementa al utilizar dosis superiores a d/25, reflejándose estos resultados a través del análisis estadístico realizado.

4.4.1.2 Materia seca aérea. Los resultados obtenidos entre los tratamientos con difenoconazole (figura 18), se asemejan a los obtenidos el ensayo 2 con arvejas montados en jarras de Leonard (figura 8). Donde para el ensayo montado en jarras de Leonard y este (montado en macetas), no hubo diferencias estadísticas significativas que demostraran una mayor o menor influencia en la acumulación de materia seca aérea de estas plantas.

Por otro lado, existieron diferencias estadísticamente significativas entre casi todos los tratamientos con difenoconazole, donde la materia seca aérea se redujo por efectos del fungicida, en comparación con los tratamientos testigos sin *Rhizobium* (Testigo), con *Rhizobium* (T+Rh) y el testigo con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂). A excepción, entre el tratamiento con dosis baja (D/25), equivalente a una dosis de 25mL por cada 100kg de semilla y el tratamiento testigo (Testigo), pudiendo inferir que la dosis baja (D/25) y la falta de inoculación con *Rhizobium* (Testigo), producirían efectos similares sobre la biomasa aérea de las plantas de arveja, donde los valores obtenidos de materia seca fueron de 6,00 y 6,40g respectivamente.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 18 Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Las diferencia porcentuales entre los tratamientos con difenoconazole y el tratamiento testigo T+Rh (figura 18), fueron de un 20,78% inferior en el tratamiento con dosis baja (D/25), un 28,76% inferior en el tratamiento con dosis normal (D/50) y un 30,22% inferior en el tratamiento con dosis baja (D/25). Estos resultados concuerdan

con lo obtenido por BARROS *et al.* (2001), quienes obtuvieron en sus ensayos que el difenoconazole utilizado, afecta la materia seca aérea del poroto. Arrojando el análisis estadístico diferencias significativas entre el tratamiento con difenoconazole y el testigo.

Por otro lado, destaca que el tratamiento testigo T+Rh+N₂, obtuviera valores inferiores al tratamiento testigo T+Rh, sin embargo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. La razón de esto, se explicaría por la mejor nodulación obtenida en el tratamiento sin nitrógeno (T+Rh), como se observa en la figura 20 y a que según FAIGUENBAUM (1987), la adición de nitrógeno a este cultivo no aumenta el rendimiento de materia seca.

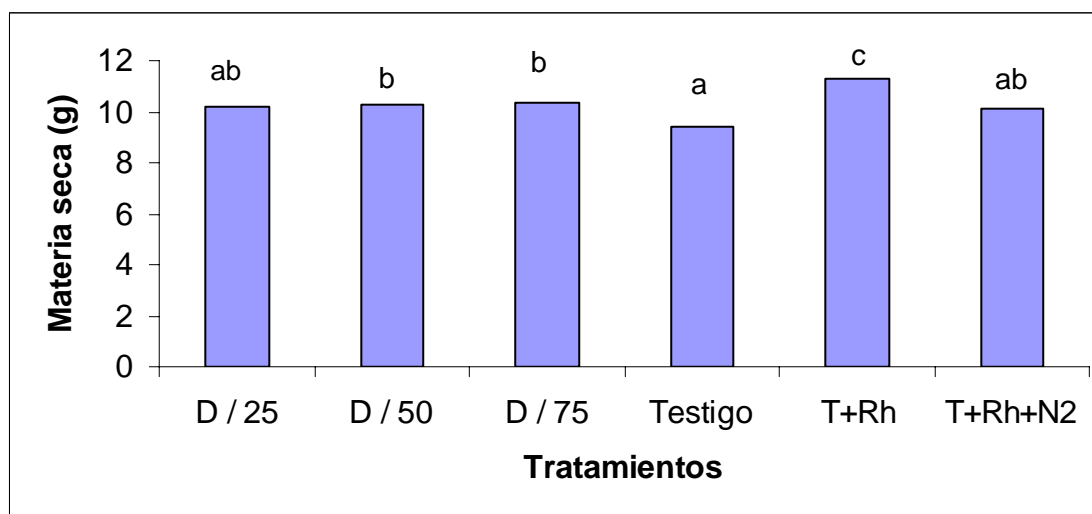
Por lo tanto, bajo las condiciones de este ensayo, la materia seca aérea es afectada por el difenoconazole reduciéndola en comparación con el testigo T+Rh, donde al aumentar la dosis del fungicida, el efecto detrimental sobre la materia seca no aumenta significativamente.

4.4.1.3 Materia seca total. El análisis estadístico de los tratamientos con difenoconazole, arrojó diferencias del tipo significativas con el tratamiento testigo sin *Rhizobium* (Testigo). Basada en esta comparación se podría inferir, que el difenoconazole reduciría la materia seca en arvejas bajo las condiciones de este ensayo, tal como se observa en la figura 19. Sin embargo, para comprender los resultados es necesario analizar lo ocurrido a nivel radical (figura 17) como a nivel aéreo (figura 18), tal como lo ocurrido en el ensayo anterior realizado con trébol rosado (ensayo 3).

A nivel radical se observó un aumento en la materia seca producto del fungicida, aumento que se incrementó al aumentar la dosis en comparación con la dosis baja (D/25). No así como lo ocurrido a nivel aéreo, donde el difenoconazole produjo una disminución de la materia seca, sin embargo, cuya reducción no fue significativa entre los tratamientos con difenoconazole. Por lo tanto, dado los efectos del fungicida sobre la materia seca radical y aérea, a nivel total no hubo mayores

diferencias entre los tratamientos con difenoconazole, no obstante, es clara la disminución sobre la materia seca total que el fungicida produce.

En los tratamientos con dosis baja (D/25), equivalente a 25mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, con dosis normal (D/50), equivalente a 50mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla y en el tratamiento con dosis alta (D/75), equivalente a 75mL de difenoconazole por cada 100kg de semilla, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas en comparación con el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh), diferencias que fueron de un 9,85, 9,40 y 8,33% respectivamente. Por lo tanto, basado en estos resultados el difenoconazole reduce la materia seca total, reducción que es menor con el aumento de la dosis.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 19 Gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

FISHER y HAYES (1982), obtuvieron resultados similares al evaluar un fungicida perteneciente al grupo de los triazoles, llamado diclobutrazol, sobre trébol blanco, donde este redujo la materia seca total incluso con la dosis baja (0,25kg/ha).

Estos resultados se asemejan a lo obtenido por ARRUDA *et al.* (2001), quienes al evaluar su ensayo demostraron que el sulfentrazone (triazol) utilizado, además de tener una acción depresora sobre la nodulación, la tuvo sobre materia seca e incluso sobre el crecimiento.

MACHADO (1986), señala respecto a la acción de ciertos fungicidas, que algunos reducen la germinación así como también la materia seca de las plantas tratadas.

Por otro lado, como se muestra en la figura 19, la adición de nitrógeno equivalente a una dosis de 10kg/ha en el tratamiento testigo T+Rh+N₂, no aumentó la biomasa total. Esto concuerda con FAIGUENBAUM (1987), el que señala que la adición de nitrógeno a este cultivo no genera incrementos importantes en el rendimiento de biomasa.

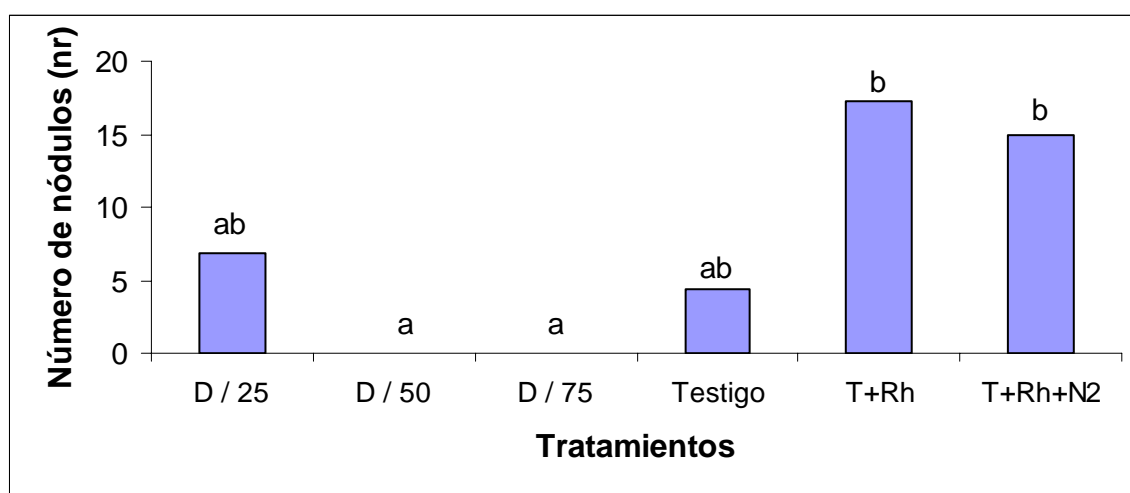
Así, bajo las condiciones de este ensayo y para este cultivo en particular el efecto del difenoconazole se demuestra nuevamente sobre este ensayo, donde la materia seca total es reducida, sin embargo, el aumento de dosis de fungicida sobre las semillas de las plantas no produce una mayor reducción de la biomasa total.

4.4.2 Nodulación. En cuanto a este parámetro se analizará el número de nódulos (nr), el tamaño en milímetros (mm) y su color a través de una escala, nódulos que fueron extraídos de todo el sistema radical de la planta de arveja.

4.4.2.1 Número. Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con dosis normal (D/50) y alta (D/75) de difenoconazole y los tratamientos testigo con *Rhizobium* (T+Rh) y con *Rhizobium* y nitrógeno (T+Rh+N₂). De esta manera, el fungicida deprime la nodulación cuando este es utilizado en dosis baja (D/25) y cuando este es utilizado en dosis normal (D/50) y alta (D/75), inhibe la nodulación (figura 20).

En relación a la acción del fungicida FISHER y HAYES (1982), señalan que el diclobutrazol, el triazol utilizado, afectó la nodulación en las dosis normal recomendada (0,125kg/ha) y a dosis superiores a esta en cuanto al número de nódulos se refiere.

De la misma manera que en los ensayos anteriores, los resultados concuerdan con lo señalado por ARRUDA *et al.* (2001), donde estos indican que el triazol utilizado (sulfentrazone) afecta la nodulación tanto en el número de nódulos como en la simbiosis rizobio-planta.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, DUNN.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium*, T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 20 Número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Por otro lado, en el testigo existió nodulación, la cual se asemeja a la obtenida por el tratamiento con dosis baja (D/25). Esto ocurrió debido a la existencia de rizobios en el suelo que permitieron que ocurra la infección, denotándose el efecto de la falta de inoculación al comparar este con el tratamiento testigo T+Rh. No obstante, la

semejanza entre estos tratamientos es razón del efecto depresor del fungicida en el número de nódulos para el tratamiento con dosis baja (D/25).

En los tratamientos testigos T+Rh y T+Rh+N₂, no hubo diferencias significativas y además se obtuvo una mejor nodulación en comparación con el ensayo en jarras de Leonard. En este sentido denota en el tratamiento con nitrógeno un bajo efecto depresor de este elemento en cuanto a la nodulación se refiere, deprimiendo este elemento más en los parámetros de tamaño y color de los nódulos que en el número de estos.

Refiriéndose al efecto del nitrógeno sobre la nodulación TORRES y URZUA (1985), indican que existe una leve estimulación del número de nódulos al aplicar nitrógeno, resultados que se asemejan con lo obtenido pero, que no son mejores que el tratamiento testigo T+Rh.

En cuanto al testigo T+Rh, este tratamiento obtuvo el mayor número de nódulos con una media de 17,2 nódulos (figura 14), que al compararse con el ensayo en jarras de Leonard con arvejas (cuadro 3) este fue superior en un 91,86%. La nodulación obtenida sobrepasa a lo obtenido por PADILLA (1985), donde este obtuvo cinco nódulos por planta. Por otro lado PATE (1977), indica que una nodulación normal en el cultivo de arveja debería oscilar entre 25 y 200 nódulos por planta, rango que estaría dado por el grado de efectividad de las distintas cepas.

Por otro lado PATE (1980), señala que el número máximo de nódulos se obtiene en la mitad del crecimiento vegetativo, donde en la etapa de floración comienza la senescencia de estos y una vez iniciada la fructificación se produce un cambio de color y desintegración de los tejidos nodulares que más tarde se ablandan y desprenden de la raíz.

Es probable que debido a estas razones el número de nódulos obtenidos haya sido menor pero, que por razones de medición de materia seca de la planta, no se pudo levantar el ensayo tal como lo recomienda PATE (1980).

De esta manera, según estos antecedentes se puede inferir, que el fungicida afecta el número de nódulos en dosis baja (D/25) e incluso la inhibe a dosis normal (D/50) y alta (D/75).

4.4.2.2 Tamaño. En este ensayo el difenoconazole redujo el tamaño de los nódulos (figura 21), existiendo diferencias significativas entre el tratamiento con dosis baja (D/25) y el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh). Donde en el tratamiento con dosis baja (D/25) se obtuvieron nódulos un 72% más pequeños en relación al mejor tratamiento (T+Rh).

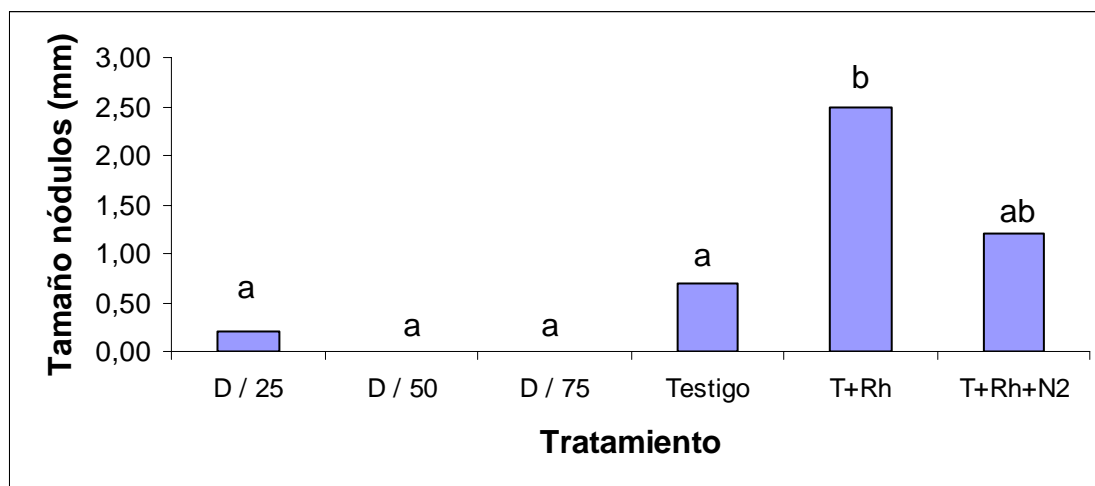
Nuevamente esto concuerda con lo señalado por FISHER y HAYES (1982), quienes indican que bajo condiciones similares el triazol utilizado (diclobutrazol), afectó la nodulación, reduciendo el peso de estos en hasta un 60% en los tratamientos con dosis altas (5kg/ha).

Por otro lado, destaca el tratamiento testigo T+Rh el cual obtuvo los nódulos más grandes, obteniendo como media un tamaño de 2,5mm. Al comparar este ensayo (en macetas con arveja) con el ensayo en jarras de Leonard con arveja, estos últimos fueron un 84% más pequeños. La causa de esto pudo haber sido la mejor nutrición mineral, lo que permitió una mayor producción de fotoasimilados por lo tanto, un mayor intercambio de estos por compuestos nitrogenados, tal como lo señalado por PATE (1980).

En cuanto al tamaño máximo alcanzado, este está por de bajo de lo alcanzado por PADILLA (1985), donde este obtuvo nódulos de entre 6 – 7mm. Es probable que para este caso la cepa utilizada haya sido menos efectiva que la utilizada por este autor, tal como lo indica PATE (1977), con respecto a la nodulación en arveja.

En el tratamiento testigo T+Rh+N₂, no se obtuvo diferencias significativas al compararlo con el tratamiento testigo T+Rh (figura 21), donde el tamaño de los nódulos de este tratamiento fue en promedio un 52% mayor en relación a T+Rh+N₂. Lo mismo ocurrió en el ensayo en jarras de Leonard con arveja, donde no hubo diferencias

significativas entre los tratamientos pero donde el nitrógeno también produjo un efecto depresor en cuanto a tamaño se refiere.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, TUKEY.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 21 Tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. **Perfected Freezer 400** cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Así, según los antecedentes de este ensayo realizado en macetas con arveja, el difenoconazole afecta el tamaño de los nódulos aún en la dosis baja (D/25), tal como se demuestra al comparar este tratamiento con el testigo T+Rh.

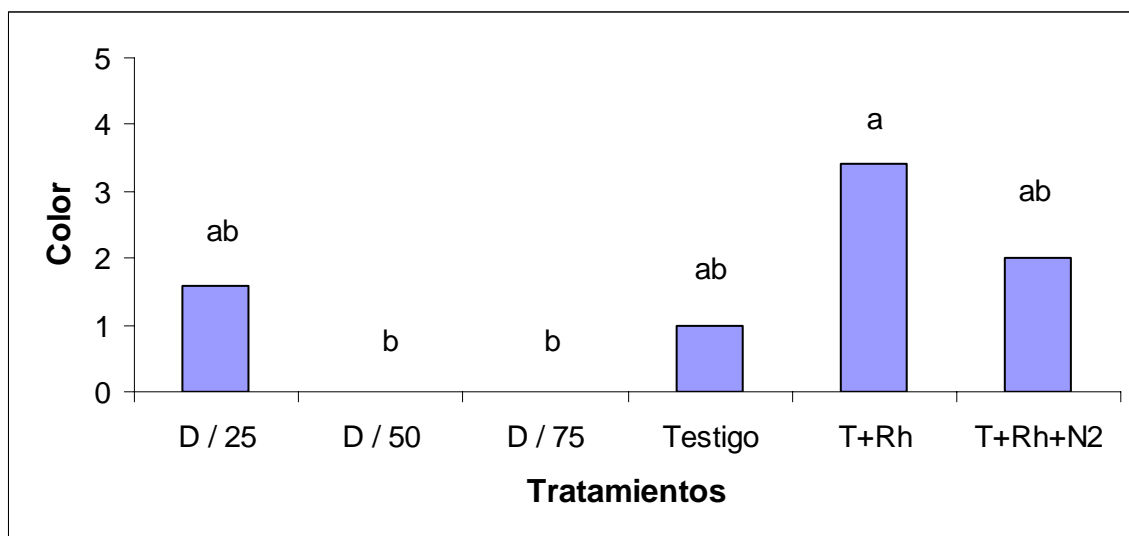
4.4.2.3 Color. Cabe destacar la mejor actividad alcanzada en los tratamientos para el color de los nódulos en este ensayo (en macetas con arvejas), donde esta fue mejor que en el ensayo montado en jarras de Leonard obteniéndose en este ensayo un 1,2 en la escala de color (figura 10). Los nódulos lograron un color mayor e incluso mejor (3,4 en la escala de color en el testigo T+Rh) que en el ensayo realizado en macetas

con plantas de trébol. Lográndose en este ensayo (en macetas con trébol) un 2,6 en la escala de color en el testigo T+Rh (figura 22).

No hubo diferencias entre el tratamiento con dosis baja (D/25) de fungicida y el tratamiento testigo T+Rh (figura 22), donde en este último el color logrado fue el mejor (3,4 en escala de color). En este sentido, denota nuevamente sólo un leve efecto depresor del fungicida en la actividad de fijación de nitrógeno, siendo esta un 52,94% menor al compararlo con el testigo T+Rh. Sin embargo, para este ensayo el color para el tratamiento con dosis baja (D/25), fue mejor que en todos los ensayos anteriores realizados, dado probablemente por el menor efecto que ejerce el fungicida sobre la planta, por lo tanto un menor estrés sobre esta y un mejor intercambio de fotoasimilados con el rizobio. De esta manera, el mayor intercambio de compuestos carbonados por nitrogenados fue mayor entre el nódulo y la planta, pudiendo tener este una actividad mayor.

Como lo ya visto en los ensayos anteriores, los datos son similares a los obtenidos por FISHER y HAYES (1982), donde el triazol utilizado, denominado diclobutrazol, afecto la nodulación reflejado a través de una menor reducción de acetileno, pero sólo a dosis altas. Por otro lado ARRUDA *et al.* (2001), indican que sólo en concentraciones superiores a lo normal el sulfentrazone afecta el proceso de fijación de nitrógeno.

Sin embargo, el efecto depresor en la dosis baja (D/25) fue el mismo que en el tratamiento testigo T+Rh+N₂, ejerciendo nuevamente el nitrógeno un efecto depresor sobre la nodulación, tal como lo señala URZUA *et al.* (1987), con respecto a los factores que afectan a la fijación de nitrógeno en praderas del sur de Chile. Sin embargo, el nitrógeno produce un menor efecto sobre la nodulación que el que produce el fungicida aún en dosis baja. En este caso, el efecto del fungicida fue un 11% mayor que el efecto del nitrógeno sobre la depresión en la actividad del nódulo. Por otro lado, al analizar el testigo se muestra el efecto de la falta de inoculación, pero que a pesar de esto no existieron diferencias significativas entre este y los tratamientos con dosis baja (D/25) y el testigo T+Rh+N₂.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%, DUNN.

Equivalencias: D/25: 25mL difenoconazole por 100kg semilla, D/50: 50mL difenoconazole por 100kg semilla, D/75: 75mL difenoconazole por 100kg semilla, Testigo: sin difenoconazole y sin *Rhizobium*, T+Rh: testigo con *Rhizobium* y T+Rh+N₂: testigo con *Rhizobium* y 10kg N₂/ha.

FIGURA 22 Color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

De esta manera, según estos antecedentes, el difenoconazole no ejercería efectos significativos sobre el color de los nódulos.

4.5 Análisis del experimento.

En resumen los efectos que ejerció el fungicida sobre la biomasa de la planta y los efectos que este produjo en la nodulación en base a lo obtenido en los resultados de los ensayos realizados se discutirán brevemente a continuación.

4.5.1 Materia seca.

Tanto en los ensayos montados en jarras de Leonard como los montados en macetas, el difenoconazole produjo un aumento en la biomasa radical. El incrementar de una dosis baja (D/25) a una dosis normal (D/50) no fue superior en todos los ensayos, pero si lo fue superior y de manera significativa al aumentar de una dosis baja

(D/25), a una dosis alta (D/75). Por lo tanto, el uso de difenoconazole aumenta la biomasa radical, incremento que es mayor al utilizar una dosis alta.

A nivel aéreo, la biomasa disminuyó en todos los tratamientos con difenoconazole. Esta disminución la produjo el fungicida tanto en la dosis baja (D/25) y normal (D/50), como en la dosis alta (D/75). Además, entre los distintos tratamientos con difenoconazole no hubo diferencias significativas, por lo tanto el aumento de la dosis no involucra una mayor disminución de la materia seca aérea.

La materia seca total, fue reducida por efectos del difenoconazole en los ensayos con trébol rosado montado en jarras de Leonard y los montados en macetas, tanto para el ensayo con trébol, como con arveja. Reducción que fue similar entre los tratamientos con difenoconazole y sin diferencias entre ellos.

Sin embargo en el ensayo con arvejas montadas en jarras de Leonard, la materia seca total de los tratamientos con difenoconazole fue similar a los tratamientos testigos e incluso aumentó en el tratamiento con dosis alta (D/75). Estos resultados, se produjeron debido a que la materia seca radical en este ensayo se incrementó más que en el ensayo con trébol montado en jarras de Leonard, incremento que fue de entre un 11,5 y un 23,5% entre la dosis baja (D/25) y alta de fungicida (D/75) en este ensayo, y que además fue superior a los montados en macetas, donde el incremento sobre estos fue de entre un 6 a un 20% aproximadamente entre la dosis baja (D/25) y alta (D/75) de difenoconazole.

Cabe destacar, la mayor influencia que ejercieron las condiciones desfavorables bajo las cuales estuvieron sometidas las plantas en cuanto a deficiencias micronutricionales, principalmente de níquel y zinc, y de espacio para el crecimiento radical en los ensayos con jarras de Leonard lo que influyeron en los resultados de materia seca. Sin embargo, la condición de no tener un control sobre la nutrición de las plantas, como lo ocurrido en las macetas, fue más favorable. Debido a que no hubo deficiencias micronutricionales, ya que el sustrato suelo fue capaz de suministrarlos por lo que los ensayos realizados en macetas reflejaron más fielmente lo realmente ocurrido.

Sin embargo, hubo una menor acumulación de biomasa en los ensayos realizados en jarras de Leonard, disminución que se puede explicar por la influencia del déficit micronutricional que afectó a ambos géneros de leguminosas, tal como señala STEVENSON y COLE (1999), respecto a la influencia del déficit micronutricional sobre la biomasa de los vegetales.

Finalmente, a nivel agrícola la importancia radica en la biomasa que es cosechada, correspondiendo a la materia seca aérea. Por lo tanto, basado en esta situación, el difenoconazole reduce la biomasa aérea. Reducción que no es superior al aumentar la dosis del fungicida.

Este resultado, es confirmado por la literatura. Diversos autores indican que muchos pesticidas aplicados al campo, reducen significativamente el crecimiento y rendimiento de las leguminosas (NIEWIADOMSKA, 2004).

4.5.2 Nodulación. La deficiencia de micronutrientes que se produjo en los ensayos con jarras de Leonard, condición poco favorable para la planta, también afectó al *Rhizobium*. Esto pudo haber afectado la infección de la planta con el *Rhizobium* y la efectividad de este, afectando de este modo la nodulación (TORRES y URZUA, 1984).

Según los resultados obtenidos, la nodulación a nivel de estos ensayos se perjudicaría más a nivel de arveja que de trébol, ya que en arveja la reducción en el número de nódulos fue entre un 100 y un 60,47% y en trébol entre un 80 y un 70,33% comparando la dosis baja (D/25) con el tratamiento testigo (T+Rh). Sin embargo, es necesario recordar, el estrés micronutricional a los cuales estuvieron sometidos las plantas de estos ensayos.

Sin embargo, a pesar de esta condición poco favorable para la nodulación, se comprobó que a dosis normal (D/50) y a dosis alta (D/75) la nodulación se inhibe, pero esta vez debido al propio efecto negativo que el fungicida produce, condición que se produjo en todos los ensayos.

En el parámetro tamaño de nódulos, el difenoconazole lo redujo significativamente en comparación con el tratamiento testigo con *Rhizobium* (T+Rh). Esta reducción se produjo en casi todos los ensayos realizados, no obstante, en el ensayo con arveja montado en jarras de Leonard este efecto no se pudo analizar, dado que en este ensayo un hubo nodulación.

La reducción que produjo el difenoconazole sobre el tamaño, fue del orden de un 83,8 a un 93,34% a la dosis baja (D/25). La menor reducción se obtuvo en los ensayos realizados en jarras, dado que la nodulación en estos fue paupérrima debido a la deficiencia micronutricional, siendo de esta manera los efectos del fungicida menos importantes que los obtenidos en los ensayos realizados en macetas.

Es importante considerar, que las plantas al estar bajo condiciones de déficit micronutricional producen menos fotoasimilados (WONG y EVANS, 1971). Por lo tanto, hay un menor intercambio de estas moléculas por compuestos nitrogenados generados por los rizobios, por ende un menor tamaño de los nódulos. De igual modo, esto afecta la actividad de los nódulos, reflejado en este caso a través del color de estos.

A pesar de la influencia de la deficiencia micronutricional, también se obtuvieron efectos negativos en el tamaño de los nódulos del ensayo con trébol cultivado en jarras de Leonard, obteniéndose un 83,8% menor tamaño en el tratamiento con dosis baja (D/25), en relación al testigo con *Rhizobium* (T+Rh) sin embargo, no hubo diferencias en el color de estos.

Esto también se demuestra en los ensayos en macetas, donde la nodulación obtenida fue la más exitosa, obteniéndose el mayor número de nódulos en los tratamientos testigos con *Rhizobium* (T+Rh) tanto para arveja como para trébol, lográndose también el mayor tamaño y mejor color de estos. En estos ensayos el fungicida a dosis baja (D/25) redujo entre un 60 y un 93,34% el tamaño en trébol y en arveja respectivamente, no obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el color tanto en trébol como en arveja, así bajo las condiciones de los ensayos en macetas, el difenoconazole afecta principalmente el número y tamaño de los nódulos en la dosis baja (D/25) y la inhibe a dosis normal (D/50) y alta (D/75).

En cuanto a las diferencias que pudieron haber existido debido a la esterilidad de los sustratos en los ensayos realizados en jarras de Leonard en comparación con el sustrato no estéril (suelo) en los ensayos realizados en macetas, se puede inferir que el difenoconazole bajo las condiciones de esterilidad afectó más la nodulación, disminuyendo en mayor magnitud el número, tamaño y color de los nódulos. Esto producto de la falta de una serie de microorganismos presente de manera natural en el suelo que pudieran degradar el difenoconazole, tal como señala el MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL COLOMBIANO (2005). Además, la influencia del estrés micronutricional bajo el cual estuvieron sometidas las plantas de este ensayo, fue un factor relevante y que pudo variar los resultados obtenidos en los ensayos.

Referente a estos resultados NIEWIADOMSKA (2004), señala que la efectividad del proceso de infección puede cambiar, por influencias de pesticidas sobre el hongo o sobre las fibras de las raíces de las plantas en donde ocurre la infección.

NIEWIADOMSKA (2004), señala que en presencia de algunos fungicidas, la nodulación se afecta, donde la actividad de los nódulos en trébol rojo puede caer en hasta un 80%. Además indica, que muchos desinfectantes y fungicidas de semillas pueden estimular o disminuir el crecimiento de *Rhizobium*. Donde al incorporarlos en el suelo, estos pueden modificar las secreciones de las raíces, lo cual conlleva a cambios microbiológicos en la rizósfera y al rededor de ella. Además, al examinar los mecanismos de ciertos pesticidas, este autor señala que estos pueden cambiar los procesos bioquímicas de los microorganismos o influenciar sus procesos enzimáticos. De esta manera, estos cambios en la microflora del suelo, pueden afectar estos hongos, dejando espacio para que otros hongos y bacterias colonicen estas zonas.

En Chile, este triazol también es utilizado como fungicida para el control de *Alternaria alternata* (Alternariosis), *Ascochita pisi* (Tizón de la arveja) y *Erysiphe poligoni* (Oidio) en arveja, poroto, haba, garbanzo y lenteja aplicado al follaje. Incluso a dosis y concentraciones superiores a las utilizadas en estos ensayos, lo que podría provocar algún efecto sobre la nodulación y/o biomasa de estas plantas.

Por otro lado, es importante señalar que al momento de utilizar un pesticida es necesario investigar acerca del grupo al cual pertenece el producto, para de esta manera determinar si este produce algún efecto y si es negativo, para poder utilizar aquella dosis que sea óptima en su acción principal y la de menor consecuencias negativas directas e indirectas. Tal es el caso de los efectos de algunos triazoles en leguminosas, donde algunos herbicidas como fungicidas, ejercen efectos sobre el vegetal, reduciendo su crecimiento, tamaño y biomasa, y sobre la nodulación, reduciendo el número, tamaño y funcionalidad de los nódulos.

5 CONCLUSIONES

- El difenoconazole incrementa el peso de la materia seca radical, aumento que es mayor al utilizar dosis altas. Por el contrario, el difenoconazole reduce el peso de la materia seca aérea, peso que no varía al incrementar la dosis. Por lo tanto el difenoconazole podría afectar el rendimiento de cosecha de estas leguminosas.
- El peso de la materia seca total estuvo afecta a la magnitud de incremento de la materia seca radical y a la magnitud de disminución de la materia seca aérea, variando el resultado según el ensayo. No obstante, la materia seca total disminuyó, salvo en el ensayo realizado con arvejas en jarras de Leonard, donde esta aumentó.
- El difenoconazole afecta la nodulación reduciendo el número y tamaño de los nódulos a dosis bajas y la inhibe en dosis superiores a esta. Sin embargo, la actividad de estos, expresada y medida a través del color, no es afectada por este fungicida. Por lo tanto el difenoconazole afectaría la cantidad de nitrógeno fijado, pudiendo incrementar los costos de fertilización nitrogenada para lograr iguales rendimientos de materia seca.
- Los efectos en la nodulación obtenida en los ensayos con sustrato estéril y no estéril fue similar sin embargo, en los ensayos con sustrato estéril la nodulación se deprimió más. De esta manera el difenoconazole afecta la capacidad infectiva de los rizobios peletizados en la semilla, no obstante rizobios presentes en el suelo son capaces de reinfectar al hospedero, pero en menor grado.

6 RESUMEN

Existen numerosos pesticidas que afectan la vida en el suelo y principalmente la simbiosis *Rizobio* – leguminosa. Para comprobar dicho fenómeno, se realizaron cuatro ensayos para determinar los efectos de tres dosis de difenoconazole sobre la materia seca y nodulación en trébol rosado cv. Quiñequeli y en arveja cv. Perfected Freezer 400 como medios de evaluación. La materia seca se determinó en gramos de materia seca radical, aérea y total. Y la nodulación se determinó a través del número de nódulos, el tamaño de estos en milímetros y su color a través de una escala.

Se montaron dos ensayos en jarras de Leonard, uno con semillas de trébol rosado y el otro con semillas de arveja, utilizando arena como sustrato y solución nutritiva KNOP como medio, en una cámara con condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y ventilación. Donde la característica principal de estos ensayos es que el sustrato y la solución fueron estériles, para descartar influencias de otros microorganismos, y que la nutrición fue controlada, específicamente el nitrógeno.

Se realizaron además, dos ensayos en macetas con suelo trumao, uno con semillas de trébol rosado y el otro con semillas de arveja. Ensayos que fueron montados en un invernadero, con riego con agua destilada. Donde la característica principal de estos ensayos es que el sustrato es suelo (no estéril) y el contenido de nitrógeno no se controló.

Si bien el difenoconazole no afecta el crecimiento de *Rhizobium* spp. en placas, este afecta la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, afectando también la biomasa del vegetal. Los resultados obtenidos demostraron que el difenoconazole, además de afectar la nodulación, afecta también al vegetal, alterando los gramos de materia seca de este.

En el análisis de la materia seca radical, se obtuvo que este aumenta con el uso de difenoconazole, incremento que fue superior al utilizar una dosis alta. Por el contrario, la materia seca aérea disminuyó, sin embargo, esta no se redujo más al incrementar la dosis de fungicida. Hecho que es importante a nivel agrícola, dado que disminuiría los rendimientos por unidad de superficie.

En la materia seca total, donde se encuentra incluida la materia seca radical y aérea, se obtuvo que el difenoconazole la redujo. Reducción que fue similar entre los tratamientos con difenoconazole y sin diferencias entre ellos.

Sin embargo, en el ensayo con arvejas cultivadas en jarras de Leonard, la materia seca total de los tratamientos con difenoconazole fue similar a la de los tratamientos testigos e incluso aumentó en el tratamiento con dosis alta. Estos resultados pudieron estar influenciados por condiciones desfavorables en la nutrición de estas plantas, que pudieron afectarlas en mayor magnitud que las plantas de trébol bajo estas mismas condiciones.

La nodulación, también fue afectada por el difenoconazole. En esta se redujo el número de nódulos por planta a dosis baja de este fungicida, salvo en el ensayo con trébol cultivado en macetas donde el número de nódulos no obtuvo diferencias con el testigo. Es más, esta se inhibió al utilizar dosis superiores a esta, es decir, una dosis normal y/o alta. Además, en el parámetro tamaño, también se produjeron efectos negativos debido al difenoconazole, reduciendo significativamente el tamaño de estos. Por el contrario, el parámetro color, no fue afectado por el difenoconazole, siendo este similar a los tratamientos testigos.

Finalmente al analizar las diferencias existentes entre un sustrato estéril y uno no estéril en la nodulación, se obtuvo que no hubo diferencias tanto en el número, tamaño y color de los nódulos como pudiera haber sido por efectos de microorganismos que pudiesen haber afectado y degradado el difenoconazole.

La utilización de este compuesto debe ser exclusivamente para la desinfección de semillas de cereales tal como indica el fabricante, en caso de utilizarse en leguminosas este producto sólo debe usarse en dosis bajas o de lo contrario utilizar otros desinfectantes con otros principios activos.

SUMMARY

Numerous pesticides exist that affect life in the soil and mainly the Rizobio - legume symbiosis. To check this phenomenon, four rehearsals were carried out to determine the effects of three difenoconazole dose on the dry matter and nodulation in red clover cv. Quiñequeli and in pea cv. Perfected Freezer 400 as evaluation means. Dry matter was determined in grams of radical, aerial and total dry matter. Nodulation was determined through the number of nodules, the size of these in millimeters and its color through a scale.

Two rehearsals were mounted in jars of Leonard, one with seeds of red clover and the other one with pea seeds, using sand as substrate and KNOP nutritious solution as growth media, in a camera with controlled conditions of temperature, day length and ventilation. The main characteristic of these rehearsals is that the substrate and the solution were sterile, to discard influences of other microorganisms, and that the nutrition was controlled, specially in nitrogen.

Also two rehearsals were carried out in containers with trumao soil, one with seeds of red clover and the other one with pea seeds. The rehearsals were mounted in a hothouse, with watering with distilled water. The main characteristic of these rehearsals is that the substrate is soil and the nitrogen content wasn't controlled.

Although the difenoconazole doesn't affect the growth of *Rhizobium spp.* in badges, it affects the symbiosis *Rhizobium* - legume, also affecting the biomass of the vegetable. The obtained results demonstrated that the difenoconazole, besides affecting the nodulation, also affects the vegetable, altering the grams of dry matter of this.

In the analysis of the radical dry matter, it was obtained that this increases with the use of difenoconazole, increment that was superior when using a high dose. On the contrary, the aerial dry matter diminished, however, this didn't decrease more when

increasing the fungicide dose. Fact that is important at agricultural level, since it would diminish the yields for surface unit.

In the total dry matter, where the radical and aerial dry matter is included, it was obtained that difenoconazole reduced it. Reduction that was similar among the treatments with difenoconazole and without differences among them.

However, in the rehearsal with peas cultivated in jars of Leonard, the total dry matter of the treatments with difenoconazole went similar to that of the witness treatments and it even increased in the treatment with high dose. These results could be influenced by unfavorable conditions in the nutrition of these plants that could affect them in bigger magnitude that the clover plants under these same conditions.

Nodulation was also affected by the difenoconazole. It decreased the number of nodules per plant, at low dose of this fungicide, and it was inhibited when using a normal or high dose. Also, in the parameter size, negative effects also took place due to the difenoconazole, reducing the size of these significantly. On the contrary, the parameter colour, it was not affected by the difenoconazole, being this similar one to the witness.

Finally when not analyzing the existent differences between a sterile substrate and one sterile in the nodulación, it was obtained that there were no differences so much in the number, size and colour of the nodules like it could have been for effects of microorganisms that can have affected and degraded the difenoconazole.

The use of this compound should be exclusively for the disinfection of seeds of cereals just as the maker indicates, in the event of being used in legumes, this product should only be used at a low dose or otherwise use other disinfectants with different active principles.

7 BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. México, México. Editorial AGT. 492p.
- ANDRADE, O. 1984. Desinfección de semillas. IPA Carillanca. Chile. 3 (1): 15 -18.
- ARRUDA, J., LOPES, N. y BACARIN, M.A. 2001. Nodulacao e fixacao do nitrogenio em soja tratada com sulfentrazone. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasil. 36(2) 1 -8.
- BARRIENTOS, L., CAMPILLO, R. y MENDEZ, E. 1994. Impacto de la acidez del suelo sobre la fijación simbiótica de nitrógeno. IPA Carillanca. Chile. 12 (4): 8 - 10.
- BARROS, R., YOKOHAMA, M. y COSTA, J. 2001. Compatibilidad do insecticida Thiamethoxam com fungicidas utilizados no tratamento de sementes de frijoeiro. Pesquisa Agropecuaria Tropical. Brasil. 31(2): 153 – 157.
- BOULDIN, D. MUGHOGHO, S. y LATHWELL, J. 1979. Nitrogen fixation by legumes in the tropics. Cornell International Agriculture mimeograph. London, England. 75p.
- BUENO, C., MEYER, M. y DE SOUZA, N. 2003. Efeito de fungicidas na sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* e na nodulacao da soja. Maringá. Brasil. 25(1): 231 – 235.
- BURNS, R y HARDY, R. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springerverlag. Wilmington, United States. 189p.
- BURTON, J. 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. Roma, Italia. Tipo-Lito-SAGRAF-NAPOLI. 61p.

- BUSHBY, H. 1982. Ecology. In: Broughton, W. (Ed) Nitrogen Fixation. Clarendon Press. Oxford, Inglaterra. 2: 105 – 134.
- CISTERNAS, L. 1992. Respuesta de arveja (*Pisum sativum* L.) a la inoculación con seis cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Tesis Lic. Agr., Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Universidad Austral de Chile. 68p.
- COLOMBIA, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. 2005. Dictamen técnico ambiental para el producto formulado difenoconazol vecol 250 e.c. a partir del ingrediente activo grado técnico Difenconazole. Instituto Colombiano de Agropecuario ICA. Colombia. 16p.
- CUBERO, J. y MORENO, M. 1983. Leguminosas de grano. Madrid, España. Mundiprensa. 359p.
- DELWICHE, C. 1970. The nitrogen cycle. *Scientific American*. United States. 223: 136 – 147.
- DIXON, R. y WHEELER, C. 1983. Biochemical, physiological and environmental aspects of symbiotic fixation. In: Gordon, J and Wheeler, C. (Eds.) Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundation and applications. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers. The Hague, Netherlands. pp: 108 – 172.
- EDGINGTON, L. 1981. Structural requirements of systemic fungicides. *Ann. Rev. Phytopathology*. 19: 107 – 124.
- FAIGUENBAUM, H. 1987. Producción de cultivos en Chile. Cereales – Leguminosas e Industriales. Santiago, Chile. Ed. Publicitaria Torrelodones Ltda. 332p.
- FISCHER, H. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in bacteria. *Microbiological Reviews*. 58: 352 - 386.

- FISHER, D. y HAYES, L. 1982. Effects of some systemic imidazole and triazole fungicides on white clover and symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium trifolii*. *Annals of applied biology*. 101: 19 – 24.
- FISHER, D. y HAYES, L. 1985. Effects of plant growth regulators in soil on clover growth and nitrogen fixation. *Plant Growth Regulation*. 3: 71 – 78.
- FLORES, M. y MORENO, E. 1980. Acción del herbicida Amitrol sobre tres especies del género *Rhizobium*. *Anales de Edafología y Agrobiología*. Nr. 11 – 12: 2157 – 2164.
- FREIRE, J. 1984. Important limiting in soil for the *Rhizobium* – Legume symbiosis. In: Alexander, M. (Ed). *Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology*. New York, USA. Plenum Press. pp: 51 – 74.
- FUNDACION PARA EL DESARROLLO FRUTICOLA (FDF). 2002. *Manual Fitosanitario*. Santiago, Chile. Servicios de impresión Laser S.A. 800p.
- GLADSTONE, S. 2002. Contaminación de plaguicidas. Informe de consultoría preparado para PROARCA/SIGMA. Chile. 21p.
- GONZÁLEZ, J. y LLUCH, C. 1992. *Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo*. Madrid, España. Ed. Rueda. 208p.
- HAMDI, Y. 1985. Fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Hamdi y FAO. Roma, Italia. 188p.
- HUNGRIA, M y NEVES, M. 1986. Efeito da manipulacao de fotosintatos na fixacao biológica de nitrogenio em feijoeiro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 21: 127 – 140.

- HUSSEIN, H. 1999. Rhizobium – Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*. 63 (4) 968 – 989.
- KEYSER, H. y MUNS, D. 1979. Effects of calcium, manganese and aluminium on growth of Rhizobia in acid media. *Soil Science of America Journal*. 43 (3) 500 – 503.
- LIE, T. A. 1982. Ecology. pp 165 – 234. In: BROUGHTON, W. Nitrogen fixation. Oxford, England. V.2. Clarendon Press 350p.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. 1997. Brock. *Biología de los microorganismos*. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. 1064p.
- MASLIACK, E. 1976. *Fisiología vegetal: Nutrición y metabolismo*. Barcelona, España. Editorial Omega. 350p.
- MORALES, V., GRAHAM, P. y CAVALLO, R. 1973. Influencia del método de inoculación y el enclavamiento del suelo de Carimagua (Llanos orientales Colombia) en la nodulación de las leguminosas. *Turrialba*. 23: 52 – 55.
- NEYRA, M. 1995. *Manual técnico de la fijación simbiótica de nitrógeno. Leguminosa/Rhizobium*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. 208p.
- NIEWIADOMSKA, A. 2004. Effect of carbendazim, imazetapir y thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense*). *Polish journal of environmental studies*. 13(4): 403 – 410.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 1983. *Boletín de suelos de la FAO. El reciclaje de materias orgánicas en la agricultura de América Latina*. Italia. Foto-Tipo-lito SAGRAF 253p.

- ORIVE, R y TEMPRANO, F. 1983. Simbiosis Rhizobium Leguminosa. pp: 69 – 94. In: Cubero y Moreno (Ed). Leguminosas de grano. Madrid, España. Mundi- prensa. 210p.
- PADILLA, M. L. 1985. Nodulación en arvejas (*Pisum sativum* L.) sembradas en primavera y efecto de un bioestimulante. Tesis Ing. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 50p.
- PATE, J. 1977. Nodulation and N₂ fixation. In: J. Sutcliffe y J. Pate. The physiology of the garden pea. London, Academic Press. pp: 349 – 381.
- PATE, J. 1980. Pea. In: L. Evans. Crop physiology, some uses histories. London. Cambridge University Press. pp: 191 – 224.
- POSTGATE, JOHN. 1987. New studies in biology. Nitrogen Fixation. 2^a ed. Edward Arnold. Londres, Inglaterra. 73p.
- RAMIREZ, L. 1988. Respuesta de arveja (*Pisum sativum*) a inoculación en nodulación. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 60p.
- SPAINK, H. 2000. Root nodulation and infection factors produced by Rhizobial bacteria. Annual review of Microbiology. 54: 257 – 288.
- STEVENSON, F y COLE, M. 1999 Cycles of soil. United States. Wiley. 427p.
- TIYAGI, S., AJAZ, S. y AZAM, M. F. 2004. Effect of some pesticides on plant growth, root nodulation and chlorophyll content of chickpea. Archives of Agronomy and Soil Science. 50: 529 – 533.
- TOLEDO, F. 1977. Sementes: tecnologia de producao. Agronomica Ceres. Brasil. pp: 124 – 132.

- TORRALBA, B., FLORES, M. y VILLAR, A. L. 1986. Acción del herbicida Atrazina sobre el crecimiento y la nodulación de dos estirpes de *Rhizobium*. *Anales de Edafología y Agrobiología*. Nr. 5 – 6. pp 817 – 826.
- TORRES, A. 1991. Producción y utilización del trébol rosado: *Trifolium pratense*. Osorno, Chile. INIA. 98p.
- TORRES, M y URZUA, H. 1984. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. Selección de cepas de *R. trifolii* utilizando pruebas de efectividad en tubos. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*. 10: 223 – 230.
- TORRES, M y URZUA, H. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. II. Respuesta del trébol blanco y rosado a la inoculación con cepas efectivas de *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*. 12: 15 – 21.
- URZUA, H., PINILLA, H. y RUIZ, M. 1986. Factores del suelo limitantes de la fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*. 13: 257 – 262.
- URZUA, H., RUIZ, M. y BERNIER, R. 1987. Fijación de nitrógeno en praderas de la X Región. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*. 14: 217 – 223.
- URZÚA, H. 1991. Fijación de nitrógeno en leguminosas: importante herramienta para la producción agropecuaria. *Panorama Económico de la Agricultura (Chile)*. 78: 25-27.
- VINCENT, J. M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Pub. A.I.D., Ed. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur. 200p.
- WONG, P. y Evans, H. 1971. Poly-beta-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glicine max.*) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogease activity. *Plant physiology (Rockville)*. 47: 750 – 755.

ANEXOS

ANEXO 1 Principales características del difenoconazole.

NOMBRE COMERCIAL	Dividend® 150 FS
INGREDIENTE ACTIVO	Difenoconazole*
NOMBRE QUIMICO *	3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter
GRUPO QUIMICO	Triazol
CONCENTRACION	150 g/L FS
FORMULACION	(Suspensión concentrada para tratamiento de semillas)
MODO DE ACCION	Sistémico, preventivo y curativo
FABRICANTE	Syngenta Crop Protection AG, Basilea, Suiza y Filiales
DISTRIBUIDOR EN CHILE	SYNGENTA Agribusiness S.A.
TOXICIDAD	Grupo II. Moderadamente peligroso LD 50 oral (rata): > 5.000 mg/ kg LD 50 dermal (rata): > 2.000 mg/ kg

FUENTE: FDF, 2002

ANEXO 2 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,107758	4	0,0269395	0,60482748	NS
Tratamiento	18,56500	5	3,713	83,3617717	**
Interacción	0,890816	20	0,0445408		
Total (Corr)	19,56357	29			

ANEXO 3 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
Testigo	5	2,6302	a
T+Rh+N ₂	5	3,8546	b
T+Rh	5	3,909	b
D / 25	5	4,460	c
D / 50	5	4,6994	cd
D / 75	5	5,082	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,419677

ANEXO 4 Tabla ANDEVA para Gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,83436	4	0,20859	2,04243694	NS
Tratamiento	12,5714	5	2,51429	24,6190075	**
Interacción	2,04256	20	0,102128		
Total (Corr)	15,44832	29			

ANEXO 5 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
D / 75	5	1,0102	a
Testigo	5	1,0622	a
D / 50	5	1,2712	a
D / 25	5	2,484	b
T+Rh	5	3,5158	c
T+Rh+N ₂	5	4,5476	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,63549

ANEXO 6 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	1,16573	4	0,291432	1,73003906	NS
Tratamiento	21,9208	5	4,38417	26,0259181	**
Interacción	3,36907	20	0,168454		
Total (Corr)	26,45560	29			

ANEXO 7 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de Difenconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
Testigo	5	2,3088	a
D / 75	5	4,149	b
D / 50	5	4,1612	b
D / 25	5	5,206	c
T+Rh	5	6,0418	d
T+Rh+N ₂	5	7,024	e

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,720632

ANEXO 8 Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	7,53333	4	1,8833325	2,60367948	NS
Tratamiento	38,7	5	7,74	10,7004362	**
Interacción	14,4667	20	0,723335		
Total (Corr)	60,70003	29			

ANEXO 9 Método de las variaciones múltiples para número de nódulos (nr) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	5	0,00	a
D / 75	5	0,00	a
D / 50	5	0,00	a
D / 25	5	0,60	ab
T+Rh+N ₂	5	1,80	bc
T+Rh	5	3,00	c

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 1,69124

ANEXO 10 Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,325333	4	0,08133325	2,61241563	NS
Tratamiento	2,764	5	0,5528	17,7558791	**
Interacción	0,622667	20	0,03113335		
Total (Corr)	3,712	29			

ANEXO 11 Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 50	5	0,00	a
Testigo	5	0,00	a
D / 75	5	0,00	a
D / 25	5	0,12	a
T+Rh+N ₂	5	0,58	b
T+Rh	5	0,74	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,350872

ANEXO 12 Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Test de Kruskal-Wallis, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio
Testigo	5	10,5
T+Rh	5	27,0
T+Rh+N	5	21,5
D / 25	5	13,0
D / 50	5	10,5
D / 75	5	10,5

Test statistic = 23,1536 P-Value = 0,000315491 Significancia = **

ANEXO 13 Test de Dunn para color de nódulos en plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Test de Dunn

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
Testigo	0,0	b
T+Rh	1,8	a
T+Rh+N ₂	1,0	ab
D / 25	0,2	ab
D / 50	0,0	b
D / 75	0,0	b

ANEXO 14 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,184156	4	0,046039	1,13257073	NS
Tratamiento	18,2033	5	3,64065	89,5608856	**
Interacción	0,81235	20	0,04065		
Total (Corr)	19,1998	29			

ANEXO 15 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
Testigo	5	0,3378	a
D / 25	5	1,6576	b
T+Rh+N ₂	5	1,749	b
T+Rh	5	1,941	bc
D / 50	5	2,2228	c
D / 75	5	2,7726	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,400768

ANEXO 16 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,714026	4	0,1785	1,43557039	NS
Tratamiento	19,6541	5	3,9908	32,0947364	**
Interacción	2,4869	20	0,1243		
Total (Corr)	23,155	29			

ANEXO 17 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de arvejas cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
Testigo	5	0,3942	a
D / 75	5	0,9184	b
D / 50	5	0,9494	bc
T+Rh+N ₂	5	0,960	bc
T+Rh	5	1,3402	c
D / 25	5	1,8194	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,701214

ANEXO 18 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	1,35977	4	0,339943	1,8389114	NS
Tratamiento	9,32993	5	1,86599	10,0940166	**
Interacción	3,69721	20	0,184861		
Total (Corr)	14,38691	29			

ANEXO 19 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos Homogéneos
Testigo	5	0,732	a
D / 25	5	2,6178	b
D / 50	5	3,1722	bc
T+Rh+N ₂	5	3,281	c
T+Rh	5	3,5684	c
D / 75	5	3,691	c

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,854985

ANEXO 20 Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	2,53333	4	0,6333	0,7251885	NS
Tratamiento	11,3667	5	2,2733	2,6030561	NS
Interacción	17,4667	20	0,8733		
Total (Corr)	31,36673	29			

ANEXO 21 Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de cámara.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,198	4	0,0495	0,72262774	NS
Tratamiento	0,88	5	0,1760	2,56934307	NS
Interacción	1,37	20	0,0685		
Total (Corr)	2,448	29			

ANEXO 22 Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos.

Test de Kruskal-Wallis, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio
Testigo	5	13,0
T+Rh	5	19,4
T+Rh+N ₂	5	21,6
D / 25	5	13,0
D / 50	5	13,0
D / 75	5	13,0

Test statistic = 11,8793 P-Value = 0,0364802 Significancia = *

ANEXO 23 Test de Dunn para color de nódulos de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en jarras de Leonard con arena y solución KNOP estériles, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos.

Tratamiento	Media	Test de Dunn
Testigo	0,0	b
T+Rh	1,2	a
T+Rh+N ₂	1,0	ab
D / 25	0,0	b
D / 50	0,0	b
D / 75	0,0	b

ANEXO 24 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,107758	4	0,0269395	0,60482748	NS
Tratamiento	18,56500	5	3,713	83,3617717	**
Interacción	0,890816	20	0,0445408		
Total (Corr)	19,56357	29			

ANEXO 25 Método de las variaciones múltiples materia seca radical de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivado en macetas con suelo trumao en invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 50	5	2,630	a
D / 25	5	3,855	b
T+Rh+N ₂	5	3,909	b
D / 75	5	4,460	c
Testigo	5	4,699	cd
T+Rh	5	5,082	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,419677

ANEXO 26 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,83436	4	0,20859	2,04243694	NS
Tratamiento	12,5714	5	2,51429	24,6190075	**
Interacción	2,04256	20	0,102128		
Total (Corr)	15,44832	29			

ANEXO 27 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 75	5	2,932	a
D / 50	5	3,120	a
Testigo	5	3,354	a
D / 25	5	3,478	a
T+Rh	5	4,433	b
T+Rh+N ₂	5	4,644	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,63549

ANEXO 28 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	1,16573	4	0,291432	1,73003906	NS
Tratamiento	21,9208	5	4,38417	26,0259181	**
Interacción	3,36907	20	0,168454		
Total (Corr)	26,45560	29			

ANEXO 29 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	5	5,9838	a
D / 50	5	7,8190	b
D / 25	5	7,9422	bc
D / 75	5	8,0140	bc
T+Rh+N ₂	5	8,2878	bc
T+Rh	5	8,5528	c

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,720632

ANEXO 30 Tabla ANDEVA para número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	75,2	4	18,8	1,12980769	NS
Tratamiento	1139,87	5	227,974	13,7003606	**
Interacción	332,8	20	16,64		
Total (Corr)	1547,87	29			

ANEXO 31 Método de las variaciones múltiples para número de nódulos (nr) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 75	5	0,00	a
D / 50	5	0,00	a
Testigo	5	3,00	a
D / 25	5	5,00	a
T+Rh+N ₂	5	5,40	a
T+Rh	5	18,20	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 8,11172

ANEXO 32 Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	1,10133	4	0,2753325	0,43350233	NS
Tratamiento	16,8107	5	3,36215	5,29358325	*
Interacción	12,7027	20	0,635135		
Total (Corr)	30,61473	29			

ANEXO 33 Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 75	5	0,00	a
D / 50	5	0,00	a
D / 25	5	0,14	a
T+Rh+N ₂	5	0,60	ab
Testigo	5	1,04	ab
T+Rh	5	2,10	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 1,78198

ANEXO 34 Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Test de Kruskal-Wallis, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio
Testigo	5	15,6
T+Rh	5	26,1
T+Rh+N	5	16,4
D / 25	5	14,9
D / 50	5	10,0
D / 75	5	10,0

Test statistic = 15,1566 P-Value = 0,0097137 Significancia = **

ANEXO 35 Test de Dunn para color de nódulos de plantas de trébol rosado cv. Quiñequeli cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Media	Test de Dunn
Testigo	0,8	ab
T+Rh	2,6	a
T+Rh+N ₂	1,0	ab
D / 25	0,6	ab
D / 50	0,0	b
D / 75	0,0	b

ANEXO 36 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,0701695	4	0,0175424	0,75996396	NS
Tratamiento	16,9683	5	3,39366	147,018611	**
Interacción	0,461665	20	0,0230832		
Total (Corr)	17,5001345	29			

ANEXO 37 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca radical (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	5	0,338	a
T+Rh+N ₂	5	1,489	b
T+Rh	5	1,578	b
D / 25	5	1,941	c
D / 50	5	2,223	c
D / 75	5	2,772	d

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,302124

ANEXO 38 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,116052	4	0,0290	0,69688082	NS
Tratamiento	5,70327	5	1,1407	27,397869	**
Interacción	0,832656	20	0,0416		
Total (Corr)	6,65198	29			

ANEXO 39 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca aérea (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	5	0,3942	a
D / 75	5	0,9184	b
D / 50	5	0,9494	bc
D / 25	5	0,9602	c
T+Rh	5	1,3402	d
T+Rh+N ₂	5	1,8190	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,405746

ANEXO 40 Tabla ANDEVA para gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,295858	4	0,0739645	1,28576445	NS
Tratamiento	27,4531	5	5,49063	95,4465569	**
Interacción	1,15051	20	0,0575257		
Total (Corr)	28,899468	29			

ANEXO 41 Método de las variaciones múltiples para gramos de materia seca total (g) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	5	0,3378	a
D / 25	5	1,4890	b
T+Rh	5	1,5776	b
D / 50	5	1,9410	b
T+Rh+N ₂	5	2,2228	bc
D / 75	5	2,7726	c

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 0,476944

ANEXO 42 Tabla ANDEVA para número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	88,2	4	22,0500	0,49853041	NS
Tratamiento	1362,57	5	272,5140	6,16129324	**
Interacción	884,6	20	44,2300		
Total (Corr)		29			

ANEXO 43 Método de las variaciones múltiples para número de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 75	5	0,00	a
D / 50	5	0,00	a
Testigo	5	4,40	ab
D / 25	5	6,80	ab
T+Rh+N ₂	5	15,00	b
T+Rh	5	17,20	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 13,225

ANEXO 44 Tabla ANDEVA para tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

	SC	GL	CM	F- Calc	Significancia
Repetición	0,0813333	4	0,02032	0,4681501	NS
Tratamiento	23,555	5	4,7110	10,8465039	**
Interacción	8,68667	20	0,4343		
Total (Corr)	32,3230033	29			

ANEXO 45 Método de las variaciones múltiples para tamaño de nódulos (mm) de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao, bajo tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Método: Tukey, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio	Grupos homogéneos
D / 50	5	0,00	a
D / 75	5	0,00	a
D / 25	5	0,20	a
Testigo	5	0,70	a
T+Rh+N ₂	5	1,22	ab
T+Rh	5	2,50	b

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%, TUKEY.

DHS = 1,31053

ANEXO 46 Test de Kruskal - Wallis para color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Test de Kruskal-Wallis, 95% confianza

Tratamiento	Repetición	Promedio
Testigo	5	13,7
T+Rh	5	26,5
T+Rh+N ₂	5	18,9
D / 25	5	16,9
D / 50	5	8,5
D / 75	5	8,5

Test statistic = 18,3791 P-Value = 0,00250694 Significancia = **

ANEXO 47 Test de Dunn para color de nódulos de plantas de arveja cv. Perfected Freezer 400 cultivadas en macetas con suelo trumao bajo, tres dosis de difenoconazole y tres testigos en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Media	Test de Dunn
Testigo	1,0	ab
T+Rh	3,4	a
T+Rh+N ₂	2,0	ab
D / 25	1,6	ab
D / 50	0,0	b
D / 75	0,0	b