

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA

BIBLIOTECA CENTRAL-USAC
DEPOSITO LEGAL
PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO

EFFECTO DE CINCO INSECTICIDAS SISTEMICOS SOBRE LA
VIABILIDAD DEL Rhizobium japonicum Y EL DESARROLLO
NODULAR EN PLANTAS DE SOYA (Glicine max)

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva de la
FACULTAD DE AGRONOMIA
de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

CARLOS ENRIQUE GODOY HELGUERO

Al conferírsele el título de
INGENIERO AGRONOMO
En el grado académico de
LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

Guatemala, mayo de 1984

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D. L.
01
T(750)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. Eduardo Meyer Maldonado

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO :	Ing. Agr. César Castañeda
VOCAL I :	Ing. Agr. Oscar René Leiva
VOCAL II :	Ing. Agr. Gustavo Méndez
VOCAL III :	Ing. Agr. Rolando Lara A.
VOCAL IV :	Prof. Heber Arana
VOCAL V :	Prof. Leonel Gómez Leonardo
SECRETARIO :	Ing. Agr. Rodolfo Albizuárez

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO :	Dr. Antonio Sandoval S.
EXAMINADOR :	Ing. Agr. Gustavo Méndez
EXAMINADOR :	Ing. Agr. Amílcar Dávila M.
EXAMINADOR :	Ing. Agr. Carlos Aguirre
SECRETARIO :	Ing. Agr. Carlos Fernández



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia

Asunto

24 de abril de 1984

Ingeniero Agrónomo
César Castañeda
Decano Fac. Agronomía

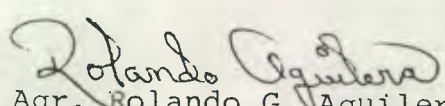
Señor Decano:

De manera atenta me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que en esta fecha he finalizado la asesoría del trabajo de investigación de tesis del estudiante Carlos Enrique Godoy Helguero con carnet No. 21059 quien efectuó el trabajo titulado "EFECTO DE CINCO INSECTICIDAS SISTEMICOS SOBRE LA VIABILIDAD DEL Rhizobium japonicum Y EL DESARROLLO NODULAR EN PLANTAS DE SOYA (Glicine max)".

El presente trabajo considero que llena los requisitos científicos obligatorios y constituye además un aporte importante al paquete tecnológico nacional e internacional en el uso de inoculantes, por lo que sugiero su aprobación.

Sin otro particular me suscribo deferentemente de usted.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Ing. Agr. Rolando G. Aguilera M.
ASESOR

ROLANDO G. AGUILERA MEJIA
INGENIERO AGRONOMO
Colegiado: 157

Guatemala,
Marzo de 1984.

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

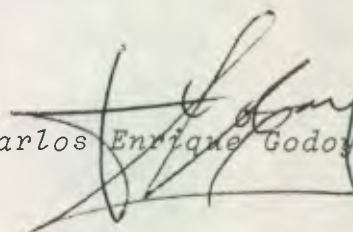
De conformidad a lo que establece la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

"EFECTO DE CINCO INSECTICIDAS SISTEMICOS SOBRE LA VIABILIDAD DEL Rhizobium japonicum Y EL DESARROLLO NODULAR EN PLANTAS DE SOYA (Glicine max)

Presentándolo como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Deferentemente,

Prof. Carlos Enrique Godoy Helguero



AGRADECIMIENTO

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a mi Asesor, Ingeniero Agrónomo Rolando Gustavo Aguilera Mejía, por su interés, dedicación y guía durante el desarrollo de mi tesis.

TESIS QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES

*José Antonio Godoy Meza
Martha Lilia Helguero de Godoy*

A MI ESPOSA

Blanca Mélida López de Godoy

A MIS HIJOS

*Karin Marleny Godoy López
Carlos Alberto Godoy López*

A LA FACULTAD DE AGRONOMIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA

A MI QUERIDA PATRIA GUATEMALA

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	i
I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS	3
III. REVISION DE LITERATURA	
III.1 Microbiología General del <u>Rhizobium</u> y requerimientos nutricionales.	4
III.2 Ecología General del <u>Rhizbium</u> .	6
III.3 Efecto de las Sustancias Químicas.	6
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV.1 Localización.	11
IV.2 Material Experimental.	11
IV.3 Metodología.	12
A. Fase de Invernadero.	12
A.1 Análisis y preparación del suelo.	12
A.2 Recuperación de bacterias liofi- lizadas.	14
A.3 Medio utilizado para el cultivo del <u>Rhizobium</u> .	15
A.4 Inoculación de la semilla.	15
A.5 Tratamientos estudiados.	16
A.6 Diseño experimental.	16
A.6.1 Irrestricto azar	16
A.6.2 Modelo estadístico	17

	Pag.
A.7 Datos que se tomaron.	17
A.8 Análisis estadístico.	18
A.9 Manejo del experimento.	18
B. Fase de laboratorio.	20
B.1 Metodología.	20
B.2 Preparación de la bacteria para las diluciones.	20
B.3 Tratamientos estudiados.	21
B.4 Diseño experimental.	21
B.4.1 Irrestricto azar.	21
B.4.2 Modelo estadístico.	22
B.5 Dato que se tomó.	22
B.6 Análisis estadístico.	22
B.7 Manejo del experimento.	22
V. CUADROS DE INTERPRETACION	24
VI. DISCUSION DE RESULTADOS	29
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. RECOMENDACIONES	38
IX. BIBLIOGRAFIA	39
X. APENDICE	40
A. Fase de invernadero.	40
B. Fase de laboratorio.	48

RESUMEN

La investigación que a la fecha se ha hecho a nivel nacional como internacional, sobre el uso de los insecticidas en leguminosas es poco, pues no existen referencias muy abundantes que indiquen el efecto que pueden provocar a la nodulación.

Por esta razón, el presente estudio se ha efectuado con el fin de establecer el efecto de los insecticidas sistémicos en leguminosas, para que puedan ser usados con confianza.

El experimento se desarrolló en dos fases: en la fase de invernadero, se evaluó el efecto de los insecticidas sistémicos: carbofuran, demeton methyl, metamidophos, formation y monocrotofos, en plantas de soya de la línea AGS No. 15, inoculadas con la cepa CIAT 51 y en la fase de laboratorio, la supervivencia del Rhizobium, se evaluó usando el método de diluciones y conteo en cajas de petri, con medio de cultivo tratado con los insecticidas.

La investigación se efectuó en el invernadero y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El diseño experimental en el invernadero fué un irrestricto azar, que constó de 11 tratamientos con cuatro repeticiones, lo que dió un total de 44 unidades experimentales.

Los parámetros utilizados en la evaluación fueron los siguientes:

- a. Peso de nódulos.
- b. Porcentaje de nódulos grandes.
- c. Peso de materia seca de planta.
- d. Altura de planta.

El análisis estadístico y la interpretación de los cuadros de resultados, demostraron diferencias importantes en los distintos parámetros de medición, los que en resumen se pueden indicar así: la simbiosis Rhizobium japonicum - *Glicine max*, no es afectada significativamente por el uso de los insecticidas y dosis evaluadas. Esto es cuando la comparación se efectúa contra el tratamiento testigo, sin considerar al testigo, como comparador, se manifestaron diferencias altamente significativas entre tratamientos; siendo los insecticidas monocrotofos y metamidophos, los que manifestaron el mejor comportamiento; de los dos productos anteriores, el análisis de las interacciones indicó que el monocrotofos X dosis 1, fué superior a cualquiera de las otras interacciones analizadas.

Por otro lado, el experimento de supervivencia desarrollado en laboratorio, se efectuó en un diseño experimental de irrestricto azar, que constó de 11 tratamientos con 9 repeticiones (3 repeticiones X 3 diluciones = 9), lo cual da un total de 99 unidades experimentales.

Tomándose como parámetro, el número de rhizobios/ Cm^3 de caldo nutritivo.

El análisis demostró que la supervivencia del Rhizobium japonicum, que no está en simbiosis, disminuye entre un 1 y 10%, cuando está en contacto directo con la dosis 5ppm de cualquier insecticida probado y un 37% con dosis de 10ppm.

I. INTRODUCCION

La investigación que a la fecha se ha hecho a nivel nacional como internacional, en el amplio campo de la Rhizobiología, aún es poca, esto da lugar a que existan muchas dudas, por ejemplo: el uso de los insecticidas sistémicos en leguminosas ha sido objeto de pocos estudios y es posible que estos productos químicos puedan causar daño a la nodulación, ya que los mismos son absorbidos y traslocados dentro de la planta.

Los insecticidas son numerosos y las leguminosas también, ésto hace difícil el estudio, pero si se selecciona un grupo de insecticidas de los más importantes y una leguminosa de las más empleadas por el hombre, es posible obtener información de utilidad práctica y con posibilidad de ser orientadora general de la reacción que en el fenómeno de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, puedan causar los insecticidas evaluados.

Por otro lado, más y más insecticidas llegan al país para el control de plagas, producto de la investigación continuada y de los esfuerzos de desarrollo dirigidos hacia la producción de insecticidas más seguros y más efectivos. Seguros, por la selectividad que éstos manifiestan para determinadas especies de insectos y efectivos, por el control inmediato que con ellos se logra en un momento dado; pero en ninguno de los casos en los que estos insecticidas se recomiendan para uso en leguminosas, se hace referencia de los posibles efectos negativos que se pueda provocar

en la viabilidad y nodulación de *Rhizobium*.

Las evaluaciones que para el caso nos ocupan, se hicieron a nivel de laboratorio e invernadero, usando los insecticidas sistémicos más empleados para el control de plagas en leguminosas, pretendiendo con ello dos cosas importantes:

- A. Determinar en plantas vivas, bajo condiciones mismas de invernadero, el efecto de los insecticidas sistémicos: carbofuran, metamidophos, demeton methyl, formation y monocrotofos en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas y en su caso específico *Rhizobium japonicum* - *Glicine max*.
- B. Determinar en el laboratorio el efecto que tienen los insecticidas sistémicos, sobre la viabilidad del *Rhizobium* y en su caso específico *Rhizobium japonicum*.

II. HIPOTESIS

Los insecticidas sistémicos: carbofuran, demeton methyl, matemidophos, formation y monocrotofos:

II.1 No causan ningún efecto en la bacteria en relación simbiótica con plantas de soya.

II.2 No causan ningún efecto a la bacteria en medio artificial de cultivo.

III. REVISION DE LITERATURA

III.1 Microbiología General del Rhizobium y Requerimientos Nutricionales.

Las bacterias del género Rhizobium son aquellas capaces de formar nódulos morfológicamente distintos en las raíces de las plantas de la familia Leguminosaceae; el Manual Bergey (8a. edición), las caracteriza como bacilos gram negativos, con 0.5 - 0.9 por 1.2 - 3.0 A, conteniendo gránulos de polibeta hidroxibutirato. Es una bacteria generalmente móvil, cuando joven posee de dos a seis flagelos peritricos o un flagelo polar o subpolar y no es formadora de esporas. Es una bacteria aerobia, quimio-organoeterotrófica, su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30° C puede utilizar fuentes de nitrógeno diversas como por ejemplo: NO₃, NH₄, aminoácidos y nitrógeno molecular, cuando estan en simbiosis con plantas. Es capaz de crecer en tensiones de oxígeno menores que 0.0001 atmósferas, crece pobremente en un medio peptona agar, crece muy poco en leche litmus, ocasionalmente provoca una reacción alcalina o ácida y reacciona positivamente en la proteolisis, hidroliza la caseína, algunas estirpes comunmente poseen gránulos metacromáticos; ejemplo: R. leguminosarum. (4)

Las especies rhizobius son reunidas en dos grupos de acuerdo a sus características de crecimiento en medio de extracto de levadura; en el grupo uno, están las de crecimiento rápido o productoras de ácido y contienen de dos a seis flagelos peritricos,

aquí se pueden mencionar las siguientes especies: Rhizobium leguminosarum, phaseoli, trifoli, melitoli. En el grupo dos están las especies de crecimiento lento, las cuales solo poseen un flagelo polar o subpolar, aquí están: Rhizobium japonicum y lupini.
(4)

El grupo uno presenta un tiempo de generación de dos a cuatro horas, forma colonias relativamente grandes de dos a cuatro mm. de diámetro y tienen un poder formador de gomas abundante. El grupo dos presenta un tiempo de generación de seis a ocho horas, sus colonias son pequeñas, menores o iguales a 1 mm.

De acuerdo con Vincent (11) los requerimientos nutricionales requeridos por el *Rhizobium* son los siguientes:

ELEMENTO	REQUERIMIENTO - 3 10 M
Fe.	0.005 - 0.1
Mg.	0.1
Ca.	0.025
Mg. $\neq$ Ca.	0.5
Co.	0.00001
Zn.	0.0001 - 0.001
Mn.	0.0001 - 0.01
K.	

III.2 Ecología General del Rhizobium.

Según Ruschel (8) el rhizobio se encuentra distribuido en diferentes nichos ecológicos, no solo en la rhizosfera y rizoplasma de las leguminosas, sino también de otras plantas, en agregados y coloides del suelo. Generalmente vive saprofiticamente, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio. No solo la bacteria debe sobrevivir sino precisa multiplicarse, competir con la microflora nativa, colonizar la rhizosfera y además poseer la habilidad de formar nódulos y principalmente ser eficiente en la fijación de nitrógeno (Roughley, 1976), Alaidés (8) cita a Gibson (1971) en donde éste propone una serie de factores capaces de influenciar la nodulación y sobrevivencia del Rhizobium entre otros menciona: temperatura diurna y nocturna, intensidad de la luz, oxígeno y temperatura de la rhizosfera.

III.3 Efecto de las Sustancias Químicas.

En general las sustancias químicas pueden tener tres funciones para las bacterias: 1. servir como nutriente; 2. prevenir el crecimiento en un ambiente que de otra forma le sería favorable, función bacteriostática; y 3. causar la muerte de la bacteria, función bactericida.

Una sustancia, en una concentración definida, puede ser un agente bactericida poderoso, para una especie de bacterias y nutriente para otra especie. Ejemplo: el H_2S .

El efecto de una sustancia química sobre una bacteria puede ser evaluado cuantitativamente, en términos de su influencia sobre la tasa de crecimiento o muerte. El método de conteo del número de células vivas es muy usado para esa evaluación (1).

Las condiciones físico-químicas del ambiente, pueden tener efectos en la viabilidad y en las actividades de las bacterias u otros microorganismos y el conocimiento de los efectos de esos factores permite el desenvolvimiento de métodos para el control de las actividades de los microorganismos. (1).

El efecto de los fungicidas, insecticidas y herbicidas, pueden muchas veces perjudicar la formación de nódulos y por lo tanto, el rendimiento. Podría ser el caso de un experimento con diferentes dosis de insecticida; con dosis crecientes a un determinado nivel, mejora el control de los insectos, pero a la vez puede reducir el rendimiento. El investigador menos avisado, no sabe a que atribuir este efecto negativo, cuando una simple observación del sistema radicular daría la respuesta. (3)

Actualmente, con el aumento intensivo de ciertos cultivos de leguminosas en grandes áreas, como por ejemplo: la soya en Brasil, ha habido un incremento de problemas fitosanitarios, el que implica el uso de pesticidas.

Los insecticidas aplicados en pulverizadores aéreos, tienden a depositarse en los suelos. Además de esto algunos autores han

dado gran enfoque al estudio de la acción de los pesticidas sobre el Rhizobium y las posibles implicaciones que pueden ocurrir en función de los productos utilizados. (2)

Dentro de las investigaciones específicas con químicos de moda en años anteriores, que fueron revisados previo a este trabajo, cabe destacar los trabajos de los siguientes investigadores:

Vincent (1959) citado por Ruschel y Da Costa, usando Aldrin, dieldrin, chlordan, DDT y BHC, notó que solamente éste último fué perjudicial para la nodulación del trebol subterráneo y el DDT, solamente contribuía disminuyendo el número de nódulos de las plantas. ' 9)

Otras pruebas similares efectuadas mostraron que en Rhizobium japonicum el BHC y parathion provocaron una acción inhibidora y que en el Rhizobium del trebol, se presentaba sensibilidad al lindano, aldrin y parathion. (2)

También Bordella, Eno y Everett han reportado el efecto adverso del BHC sobre la nodulación y crecimiento de frijoles a nivel de macetas. (7)

Los investigadores Apleman y Sear, reportaron también, que 100 libras por acre de DDT grado técnico, inhibían ligeramente el crecimiento de leguminosas y que 100 libras por acre reducían la nodulación. (7)

Similarmente Wilson y Choudhuri dicen que bajas dosis de DDT no causaba efecto dañino sobre la nitrificación, nodulación y crecimiento del Rhizobium Sp. (7)

Observaciones sobre el desarrollo de la planta también indican que el DDT a una tasa de aplicación de 1, 1.5 y 10 ppm, no tiene efecto en el peso seco de la planta, con 4 semanas de crecimiento, pero esta concentración fué encontrada ligeramente dañina para las raicillas más pequeñas. Lo observado en vainas y grano indica que 1 ppm del insecticida no fué dañina para el rendimiento. Además 5 ppm de DDT incrementó la producción de grano en un 30% sobre el testigo. (7)

Payne y Fults, 1947 en un estudio en el que trabajaron con herbicidas e insecticidas, tales como el 2,4D, DDT y colorado 9 reportaron que el número de nódulos bacteriales de la raíz del frijol común era afectada de la siguiente manera: El compuesto 2,4D en pequeñas cantidades (2 a 16 ppm de suelo) y DDT en concentraciones un poco mayores (127 ppm) decrecieron la nodulación. El insecticida colorado 9, a la misma concentración, no tuvo efecto decreciente en el número de nódulos.

En pruebas donde estos químicos fueron aplicados en plantas de crecimiento rápido, hubo un pequeño cambio en el número de los nódulos de cualquier forma cuando estos nódulos fueron seccionados, muchos de ellos manifestaron ser suaves y delgados, aunque la planta de donde se recolectaron parecían estar normales.

Esto sugiere que pueden haber significantes cambios morfológicos y fisiológicos en la bacteria. (1)

Alaides Puppin Ruschel y Walter Francisco Da Costa, trataron semilla de frijol (Phaseolus vulgaris), con gerasol 33, carumchol 50, arasan 75, malagran, uspulum, semesan y phostoxis, con la finalidad de ver los efectos de estos productos sobre la inoculación de semillas de frijol Rhizobium phaseoli.

Los resultados obtenidos demostraron que los insecticidas aplicados no mostraron ninguna influencia sobre el Rhizobium, no habiendo incompatibilidad de los mismos con la inoculación, aunque recomendaron que los fungicidas semesan y neantina no deban ser usados en la desinfección de la semilla de frijol, cuando se pretende inocularlas con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. En este experimento, el carumchol 50 a pesar de ser a base de BHC, no mostró ninguna influencia para la fijación simbiótica del nitrógeno del aire, el que se atribuye al bajo porcentaje de BHC. También el gerasol 33, producto a base de DDT, no interfiere en la nodulación. (9)

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 Localización:

El estudio del efecto de los insecticidas sistémicos en la viabilidad del Rhizobium japonicum y el desarrollo nodular en plantas de soya, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología y en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en la Ciudad Universitaria, Zona 12, Ciudad Capital. Para tal efecto la viabilidad se efectuó en el Laboratorio de Microbiología y el efecto sobre la nodulación se determinó en el invernadero.

IV.2 Material Experimental:

- a. Rhizobium japonicum, cepa CIAT 51, proporcionada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, Colombia.
- b. Plantas de soya, de la línea AGS No. 15, proporcionada por el ICTA, variedad recomendada por la institución como altamente rendidora y precoz.
- c. Insecticidas sistémicos: carbofuran (furadan 10 G), demeton methyl (metasystox), metamidophos (tamarón 600 SL), formation (anthio 33) y monocrotofos (nuvacron 400), recomendados por las casas comerciales que los distribuyen,

para el control de plagas en leguminosas.

- d. Tubos de ensayo.
- e. Cajas de petri.
- f. Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- g. Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- h. Pipetas Pasteur.
- i. Autoclave.
- j. Incubadora.
- k. Cámara de Petroff.
- l. Potenciómetro.
- m. Medio de cultivo especial para Rhizobium (VIMA).
- n. Bolsas de Polyetileno.
- o. Suelo.
- p. Invernadero.

IV.3 Metodología:

La metodología de investigación conlleva una serie de pasos enmarcados, en forma separada, en dos grandes fases:

- A. Fase de Invernadero.
- B. Fase de Laboratorio.

A. Fase de Invernadero:

A.1 Análisis y Preparación del Suelo.

Al suelo que se empleó, se le agregó un tercio de arena blanca, fué homogenizado, tamizado y empaquetado en papel periódico para esterilizarse en el autoclave, durante 30 minutos, a 120° C. y 15 libras de presión. Para evitar con ello la interferencia de cualquier otro microorganismo en la fase inicial de la simbiosis.

Previo a colocarse el suelo en bolsas de polyetileno, se envió una muestra al laboratorio de suelos del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. El análisis mostró un nivel bajo de fósforo, potasio y calcio, por lo que fué necesario enmendar el suelo a niveles adecuados para el desarrollo de la planta. Las enmiendas se hicieron agregándose diversos nutrientes a excepción de nitrógeno, de acuerdo a la siguiente tabla:

COMPUESTO	APLICADOS EN SOLUCION	APLICADOS EN SOLIDO	GRS./BOLSA
Triple Superfosfato		+	0.25
CaCO_3		+	1.0
KCl		+	0.10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+		0.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	+		0.03
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	+		0.0074
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+		0.0074
H_2SO_4	+		0.0039
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	+		0.002

Luego de haberse aplicado las sustancias nutritivas, se dejó secar el suelo durante 5 días, el que una vez seco, se homogenizó, para lo cual se usó una bolsa plástica grande.

A.2 Recuperación de Bacterias Liofilizada.

La metodología empleada para lograr la multiplicación de la bacteria, partiendo de ampollas con *Rhizobios* liofilizados, fué la que recomienda Vincent (11), aunque para abrir las mismas se modificó brevemente la técnica, haciéndose lo siguiente: con una lima se hizo una marca a la altura de la mitad de la ampolla sobre el tapón de algodón, para poder romperla, se eliminó el tapón que cubría las bacterias liofilizadas y se agregó con una pipeta Pasteur 0.5 ml. de caldo nutritivo para *Rhizobium* (mismo del inciso A.3 sin agar), se mezcló la bacteria con el caldo y luego se trasladó la cepa a cajas de petri con medio de cultivo sólido. Las cajas de petri se incubaron a 28° C. en posición invertida y se observó cuidadosamente para registrar la formación de las colonias. Una vez que aparecieron las colonias con las características de la cepa de *Rhizobium* requeridas, se procedió a su subcultivación y multiplicación.

A.3 Medio Utilizado para el Cultivo del Rhizobium.

El medio que se utilizó para este proceso, es el que anota Vincent (11) y el cual está preparado a partir de los siguientes materiales:

REACTIVO	GRS./LITRO
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$NaCl$	0.2
$CaCl_2$	0.2
$FeCl_3$	0.01
Manitol	10.00
Extracto de levadura	4.00
Agar	20.00
Agua destilada	necesaria para llevar a 1000 mls. de medio

Todo esto esterilizado a 120° C. y a 15 libras de presión, durante 20 minutos en el autoclave.

A.4 Inoculación de la semilla.

Se utilizaron semillas perfectamente desinfectadas con una solución de bicloruro de mercurio al 0.1% acidificado con HCL grado reactivo, según la técnica

que expone Vincent (11). Posteriormente, se hicieron a la semilla cinco lavados sucesivos con agua estéril.

La inoculación consistió en mojarse las semillas con una suspensión concentrada de bacterias, quedando así listas para la siembra.

A.5 Tratamientos Estudiados.

TRATAMIENTO		DOSIS	TIEMPO DE APLICACION
Carbofuran	(0)	0.075 Grs./bolsa	Al momento de sembrar
Carbofurán	(1)	0.125 Grs./bolsa	Al momento de sembrar
Demeton Methyl	(0)	0.075%	Cada 10 días
Demeton Methyl	(1)	0.1 %	Cada 10 días
Metamidophos	(0)	0.1 %	Cada 10 días
Metamidophos	(1)	0.15 %	Cada 10 días
Formation	(0)	0.1 %	Cada 10 días
Formation	(1)	0.2 %	Cada 10 días
Monocrotofos	(0)	0.12 %	Cada 10 días
Monocrotofos	(1)	0.3 %	Cada 10 días
Testigo			

A.6 Diseño Experimental.

A.6.1 Irrestricto Azar.

Constó de once tratamientos con cuatro repeticiones, lo cual da un total de 44 unidades experimentales.

A.6.2 Modelo Estadístico.

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la ij -ésima unidad experimental.

U = Efecto de la media general.

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

E_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la ij -ésima unidad experimental.

A.7 Datos que se tomaron.

Los datos que se tomaron y sobre los que versó la discusión del estudio, son los siguientes:

- a. Peso de nódulos.
- b. Porcentaje de nódulos grandes.
- c. Peso seco de la planta.
- d. Altura de planta.

A.8 Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó para cada una de las variables estudiadas, bajo el modelo de completo azar; pero además se realizaron otros análisis para conocer el efecto individual de dosis e insecticidas. Para estos análisis se usó un modelo de irrestricto azar con arreglo bifactorial, en el que no participó el testigo. Luego los resultados, se sometieron a la prueba de TUKEY con significancia del 5%, para establecer los tratamientos más favorables.

A.9 Manejo del Experimento.

Una vez colocadas y distribuidas las bolsas de polietileno en las mesas del invernadero, se inocularon con Rhizobium las semillas y se sembraron 5 granos por bolsa.

A los 10 días de la siembra, se realizó un raleo, procurando dejar las dos plantas más vigorosas con el fin de evitar la competencia en el desarrollo.

Inmediatamente después del raleo se efectuó la primera aplicación de los insecticidas: demeton methyl, metamidophos, formation y monocrotofos, a excepción

del carbofurán que fué colocado en la bolsa al momento de la siembra, siendo ésta la única vez que se aplicó. Los otros cuatro insecticidas se aplicaron dos veces más, con una diferencia de aplicación de 10 días.

El riego se realizó un día sí, un día no, procurando que cada bolsa recibiera aproximadamente 300 ml. de agua. Esta cantidad de agua fué necesario ir incrementandola conforme fueron desarrollando las plantas.

No se realizó ningún tipo de control con fungicidas, herbicidas u otros, para evitar una posible distorsión de los resultados. Unicamente se realizó un control manual, cuando fué necesario en el testigo por la presencia de algunos insectos.

A los 50 días de la siembra, cuando todas las plantas estaban en floración, se procedió a la cosecha. La que consistió en cortar la planta a nivel del cuello; esta parte de la planta fué colocada en bolsas de papel, identificadas con cada tratamiento y réplica, inmediatamente después se desenterró la raíz cuidadosamente y se colocaron en bolsas de plástico debidamente identificadas.

Ya en el laboratorio, se procedió a secar la parte aérea de las plantas y a tomar los datos de nodulación mencionados en el inciso A.7.

B. Fase de Laboratorio.

B.1 Metodología.

El método que se empleó para esta fase, es el conteo indirecto de bacterias en cajas de petri. La descripción de esta técnica se encuentra en el Manual de Rhizobiología de Vincent J. M. (11)

B.2 Preparación de la Bacteria para las Diluciones.

Para esta fase se preparó 1/2 litro de caldo nutritivo para Rhizobium, el cual se distribuyó en cuatro erlenmeyer de 250 ml., los que luego se esterilizaron en el autoclave a 120° C. y 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Se inoculó en el caldo estéril la cepa de Rhizobium CIAT 51, la que se incubó a temperatura ambiente, agitando el cultivo durante 8 días, en un agitador de tipo horizontal, el cual mantuvo las células oxigenadas y en suspensión. Luego de este tiempo se hizo

un conteo de la población bacteriana, utilizando para ello una cámara de conteo tipo Petroff (la población observada fué de 3×10^9 bacterias por c.c. de caldo), a continuación se realizó la prueba de Gram, para determinar la pureza del cultivo.

B.3 Tratamientos Estudiados.

TRATAMIENTO		DOSIS	TIEMPO DE APLICACION
Carbofuran	(0)	5 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Carbofuran	(1)	10 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Demeton Methyl	(0)	5 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Demeton Methyl	(1)	10 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Metamidophos	(0)	5 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Metamidophos	(1)	10 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Formation	(0)	5 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Formation	(1)	10 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Monocrotofos	(0)	5 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Monocrotofos	(1)	10 ppm/caja	Una vez, al sembrar
Testigo	-	-	-

B.4 Diseño Experimental.

B.4.1 Irrestricto Azar.

Constó de 11 tratamientos con nueve repeticiones (3 repeticiones $\times$ 3 diluciones = 9), lo cual da un total de 99 unidades experimentales.

B.4.2 Modelo Estadístico.

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la ij -ésima unidad experimental.

U = Efecto de la media general.

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

E_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la ij -ésima unidad experimental.

B.5 Dato que se tomó:

El dato que se tomó en esta fase de la investigación fué el número de Rhizobios/ Cm^3 de caldo nutritivo.

B.6 Análisis Estadístico.

Se efectuó un análisis estadístico para la variable estudiada, así como también un análisis para evaluar por separado los insecticidas y las dosis empleadas, para esto se realizó un análisis del tipo de irrestricto azar con arreglo bifactorial en el que no participó el testigo. Luego se sometieron los resultados a la prueba de TUKEY, con significancia del 5%, para establecer los tratamientos más favorables.

B.7 Manejo del Experimento.

Se prepararon 4 litros de medio, los cuales fueron dis-

tribuidos en 16 porciones de 250 ml. c/u, para ser esterilizados en el autoclave a 120° C. y 15 libras de presión durante 20 minutos.

Cada porción de medio estéril, y previo a su colocación en las cajas de petri, se trató con los insecticidas que fueron objeto de estudio.

Se identificaron las cajas de petri estériles con los tratamientos, la repetición correspondiente y la dilución empleada de bacterias.

Partiendo del caldo original de bacterias, que contenía 3×10^9 células por cc., se prepararon diluciones de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 .

Luego se colocó en las cajas de petri estériles 1 Ml. de las diluciones manifestadas de acuerdo a la identificación de la caja y posteriormente se adicionó una cantidad aproximada de 25 Ml. de medio de cultivo, tratado con los insecticidas bajo estudio.

El inóculo y el medio se agitaron con movimientos rotativos y lineales, para distribuir la bacteria, se esperó media hora para que el medio solidificara y luego se colocaron las cajas de petri en una incubadora a 28° C. A los ocho días se observó y contó el número de colonias desarrolladas.

V. CUADROS DE INTERPRETACION

CUADRO No. 1

RESULTADOS SINTETICOS DE SIGNIFICANCIA DE LAS VARIABLES ANALIZADAS
EN INVERNADERO Y LABORATORIO PARA CONOCER EL EFECTO DE LOS INSECTI-
CIDAS SOBRE EL RHIZOBIUM

FUENTES DE VARIACION	VARIABLES				
	PESO DE NODULOS	MATERIA SECA DE PLANTA	ALTURA DE PLANTA	% DE NO DULOS GRANDES	No. DE COLONIAS POR CAJA DE PETRI
INSECTICIDA (A)	++	++	++	++	N.S.
DOSIS (B)	++	N.S.	++	++	++
INTERACCION (AXB)	++	N.S.	+	++	N.S.

++ Altamente significativo al 1%

+ Significativo al 5%

N.S. No significativo

CUADRO No. 2

COMPARACION DE LOS VALORES MEDIOS DE LAS VARIABLES ANALIZADAS, POR EFECTO DE LOS INSECTICIDAS SOBRE NODULOS Y PLANTAS

Sub-Cuadro No. 2.1

PESO DE NODULOS (Grs.)		
INSECTICIDA	$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	0.761	A
METAMIDOPHOS	0.550	A
DEMETON METHYL	0.481	AB
FORMATION	0.384	B
CARBOFURAN	0.333	B

Sub-Cuadro No. 2.2

PORCENTAJE DE NODULOS GRANDES		
INSECTICIDA	$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	17.18	A
METAMIDOPHOS	14.49	AB
DEMETON METHYL	13.05	AB
CARBOFURAN	7.91	AB
FORMATION	5.23	B

Sub-Cuadro No. 2.3

PESO SECO DE PLANTA (Grs.)		
INSECTICIDA	$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	4.68	A
METAMIDOPHOS	4.25	A B
DEMETON METHYL	3.76	A B C
CARBOFURAN	3.24	B C
FORMATION	2.66	C

Sub-Cuadro No. 2.4

ALTURA DE PLANTA (Cms.)		
INSECTICIDA	$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	46.37	A
METAMIDOPHOS	43.37	A B
DEMETON METHYL	40.87	B C
FORMATION	38.44	C
CARBOFURAN	38.31	C

CUADRO No. 3

COMPORTAMIENTO DE LOS VALORES MEDIOS DE LAS VARIABLES ANALIZADAS POR EFECTO DE TRATAMIENTOS INDIVIDUALES (INSECTICIDA $\neq$ DOSIS) SOBRE NODULOS Y PLANTAS

Sub-Cuadro No. 3.1				Sub-Cuadro No. 3.2			
PESO DE NODULOS (Grs.)				PORCENTAJE DE NODULOS GRANDES			
INSECTICIDA		$\bar{X}$	DIF.	INSECTICIDA		$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	(1)	0.999	A	MONOCROTOFOS	(1)	23.87	A
TESTIGO		0.780	A B C	METAMIDOPHOS	(1)	20.97	A B
METAMIDOPHOS	(1)	0.718	A B C	DEMETON METHYL	(0)	18.08	A B C
DEMETON METHYL	(0)	0.594	A B C	TESTIGO		13.36	A B C
MONOCROTOFOS	(0)	0.523	A B C	FORMATION	(1)	11.36	A B C
CARBOFURAN	(1)	0.446	B C	MONOCROTOFOS	(0)	10.49	A B C
FORMATION	(1)	0.438	B C	CARBOFURAN	(1)	10.31	A B C
METAMIDOPHOS	(0)	0.382	B C	DEMETON METHYL	(1)	8.03	B C
DEMETON METHYL	(1)	0.369	B C	METAMIDOPHOS	(0)	8.02	B C
FORMATION	(0)	0.330	B C	CARBOFURAN	(0)	5.51	C
CARBOFURAN	(0)	0.221	C	FORMATION	(0)	3.87	C

Sub-Cuadro No. 3.3				Sub-Cuadro No. 3.4			
MATERIA SECA DE PLANTA (Grs.)				ALTURA DE PLANTA (Cms.)			
INSECTICIDA		$\bar{X}$	DIF.	INSECTICIDA		$\bar{X}$	DIF.
MONOCROTOFOS	(1)	5.20	A	MONOCROTOFOS	(1)	50.8	A
METAMIDOPHOS	(1)	4.60	A B	METAMIDOPHOS	(1)	46.0	A B
TESTIGO		4.27	A B C	TESTIGO		43.3	B C
MONOCROTOFOS	(0)	4.15	A B C	MONOCROTOFOS	(0)	42.0	B C
DEMETON METHYL	(0)	3.95	A B C	DEMETON METHYL	(0)	41.1	B C
METAMIDOPHOS	(0)	3.90	A B C	METAMIDOPHOS	(0)	40.75	B C
CARBOFURAN	(1)	3.60	A B C	DEMETON METHYL	(1)	40.60	B C
DEMETON METHYL	(1)	3.57	A B C	CARBOFURAN	(1)	39.60	B C
CARBOFURAN	(0)	2.87	B C	FORMATION	(0)	38.90	C
FORMATION	(1)	2.68	C	FORMATION	(1)	38.0	C
FORMATION	(0)	2.65	C	CARBOFURAN	(0)	37.0	C

NOTA: Observar cuadro A.5 de tratamientos estudiados, en sección IV Metodología para establecer (0) Dosis mínima
(1) Dosis máxima

CUADRO No. 4
COMPARACION DEL EFECTO, DOSIS DEL INSECTICIDA Y DE LAS INTERACCIONES
INSECTICIDA X DOSIS

Sub-Cuadro No. 4.1			Sub-Cuadro No. 4.2		
PESO DE NODULOS (Grs.)			PORCENTAJE DE NODULOS GRANDES		
INSECTICIDA	DOSIS		INSECTICIDA	DOSIS	
	MINIMA (0)	MAXIMA (1)		MINIMA (0)	MAXIMA (1)
	B C	A		B C	A
MONOCROTOFOS	0.523	0.999	MONOCROTOFOS	10.49	23.87
	B C	A B		C	A B
METAMIDOPHOS	0.382	0.718	METAMIDOPHOS	8.02	20.97
	C	B C		C	A B C
CARBOFURAN	0.221	0.446	FORMATION	3.87	11.36
	C	B C		C	B C
FORMATION	0.330	0.438	CARBOFURAN	5.51	10.31
	B	B C		A B C	B C
DEMETON METHYL	0.594	0.369	DEMETON METHYL	18.08	8.03

Sub-Cuadro No. 4.3		
ALTURA DE PLANTA (Cms.)		
INSECTICIDA	DOSIS	
	MINIMA (0)	MAXIMA (1)
	B C	A
MONOCROTOFOS	42	50.8
	B C	A B
METAMIDOPHOS	40.7	46
	C	B C
CARBOFURAN	37	39.6
	C	C
FORMATION	38	38.9
	B C	B C
DEMETON METHYL	41.1	40.6

CUADRO No. 5

EFFECTO DE LAS DOSIS DE INSECTICIDAS SOBRE EL NUMERO DE RHIZOBIOS/
Cm³ DE CALDO NUTRITIVO (MULTIPLICADO X 10⁵)

INSECTICIDA	5ppm	Porcentaje de disminución con relación al testigo	10ppm	Porcentaje de disminución con relación al testigo
	A		B	
DEMETON METHYL	3995	7	2780	35
	A		B	
CARBOFURÁN	3992	7	2802	34
	A		B	
METAMIDOPHOS	3976	8	2695	37
	A		B	
MONOCROTOFOS	3952	8	2779	35
	A		B	
FORMATION	3866	10	2732	36
	A			
TESTIGO	4277			

4277 = 100% de la población.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

Como el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de los insecticidas sistémicos en la nodulación y viabilidad del Rhizobium, iniciaremos esta discusión con un análisis individual y luego general de las variables consideradas y que en su orden son: peso de nódulos, porcentaje de nódulos grandes, materia seca de planta, altura de planta y número de bacterias/Cm³ de caldo nutritivo tratado. Como ya se explicó antes, las primeras cuatro variables corresponden a observaciones de plantas en invernadero y la última variable corresponde a observaciones en medio de cultivo artificial en el laboratorio. Pero antes de proceder a este análisis, es necesario que nos formemos una imagen amplia del efecto de los insecticidas sobre el Rhizobium. Para ello el cuadro sintético No. 1, nos muestra rápidamente en qué variables hubo un efecto significativo y en cuales la aplicación de insecticidas no tuvo significancia. Esta observación nos permitirá seguir un orden de discusión organizado y sencillo, así como también, nos evitará la presentación de cuadros innecesarios.

VI.1 Efecto de los Insecticidas sobre Nódulos y Plantas de Invernadero.

Los resultados de la comparación de las medias del peso de nódulos, porcentaje de nódulos grandes y el peso seco y altura de plantas, manifestaron efectos altamente significativos, por la aplicación de los insecticidas usados en el experimento (ver cuadro No.1)

Se podría decir que para todas las variables hay un patrón de ordenamiento en los insecticidas aplicados.

Si hacemos una agrupación en la cual consideremos los valores promedio que se interceptan con el límite superior e inferior, tendremos dos grupos definidos, ellos son: monocrotofos y metamidophos para las medias superiores, demeton methyl (el límite) y formation y carbofuran para las medias inferiores de éste.

El patrón observado en la respuesta a los insecticidas aplicados es interesante, ya que la disminución o incremento en la nodulación, así como la presencia de un mayor o menor porcentaje de nódulos grandes tienen una relación directa con el peso y altura de plantas, lo cual reconfirma el hecho ya manifestado en otras investigaciones (5) y (10), que establecen que el desarrollo y producción de plantas está en función directa al número y peso de nódulos y viceversa. Lo que implica que si un fenómeno cualquiera (para este caso insecticida) causa disminución o aumento en la nodulación, ésta se refleja en el rendimiento de la planta.

VI. 2 Efecto Individual del Tratamiento sobre Nódulos y Plantas.

El análisis del cuadro No. 3, presenta para cada variable estudiada, un ordenamiento de medias similar en cada caso. Se presenta un orden descendiente en los insecticidas monocrotofos, metamidophos, carbofuran y formation, en su dosis máxima, y luego aparecen casi en el mismo orden con su dosis mínima, a excepción del insecticida demeton methyl que no siguió el mismo patrón.

Ahora bien, si consideramos en todas las variables como comparador al testigo, notaremos que en ninguno de los mismos se manifestaron diferencias significativas, pues la media del tratamiento testigo es estadísticamente igual a la media de los demás tratamientos.

Sin considerar el testigo como un comparador, si existe diferencia significativa entre tratamientos y se podría interpretar que los tratamientos monocrotofos, dosis máxima y metamidophos, dosis máxima, aumentaron la producción de nódulos, ya que el valor de sus medias fueron superiores a las medias del testigo y significativamente diferentes a las medias de los otros tratamientos, lo que se puede comprobar observando el cuadro No. 3. Esta observación hace confiable su uso.

VI.3 Efecto de la Dosis y de la Interacción Insecticida X Dosis sobre los Nódulos y Plantas.

Una revisión del cuadro No. 4, nos indica que existe diferencia significativa por el efecto de la dosificación y de las interacciones insecticida X dosis, para las variables: peso de nódulos, porcentaje de nódulos grandes y altura de planta, no así para el peso de materia seca de planta.

De por sí, la dosis debe ser analizada dentro de cada uno de los insecticidas, ya que es notable que los nódulos de la planta, tanto en peso como en porcentaje (a excepción del demeton methyl),

casi duplicaron los valores de sus medias cuando se aplicó la dosis máxima de los insecticidas, aunque no sucede lo mismo con la altura de planta, pues la proporción de crecimiento del vegetal, aún cuando guarde relación directa con el peso y porcentaje de nódulos, no podría, fisiológicamente para este caso, duplicar su altura y peso.

La mejor interacción observada es la del tratamiento monocrotofos, dosis máxima y esto se puede notar claramente al observar los sub-cuadros 4.1, 4.2 y 4.3 que se refieren al peso de nódulos, porcentaje de nódulos y altura de planta respectivamente.

VI.4 Efecto de los insecticidas sobre el número de Rhizobios/Cm³ de Caldo Nutritivo.

Es necesario observar de nuevo el cuadro No.1, para poder visualizar qué efecto ocasionó el contacto directo de los insecticidas sobre el Rhizobium.

Esta experiencia se efectuó, como ya se indicó anteriormente, en el laboratorio, para conocer el efecto directo sobre la viabilidad de la bacteria en su estado no simbiótico.

Las respuestas obtenidas de la experiencia, nos indican que los insecticidas tienen el mismo comportamiento, es decir que no existe diferencia significativa dentro de ellos. Ahora bien, la comparación del tratamiento testigo contra la dosis aplicada, si marca muy

claramente un efecto detrimento cuando en cualquiera de los insecticidas su dosis se incrementa a 10ppm, pues la supervivencia disminuye en forma general entre un 34 y 37%.

VI.5 Análisis General.

Después de haber analizado en forma individual las distintas variables que fueron objeto de estudio en las dos fases del experimento, podemos decir que la bacteria Rhizobium japonicum en simbiosis con la soya, no sufre ningún efecto negativo visible, cuando se usa cualquiera de los insecticidas y dosis evaluadas, ya que con relación al testigo, todos los tratamientos fueron significativamente iguales a éste.

Algo importante de comentar es el hecho de que monocrotopos y metamidophos, superaron al testigo y sin considerar a éste, sus diferencias con los demás tratamientos se hacen significativas, lo que podría implicar, no solo una aceptación de la planta por el biocida empleado, sino también un efecto fisiológico positivo en su anabolismo.

Al hacer un enfoque general de las dosis empleadas en cada insecticida, se observó que la dosis máxima empleada en las plantas, mejoró en todos los casos, a excepción de demeton methyl, los promedios de todas las variables, lo que puede atribuirse, como en el caso anteriormente discutido, a un efecto fisiológico de tipo anabólico en la planta, provocado posiblemente por la utilización de

los productos de la hidrólisis del compuesto químico de cada insecticida (en su mayoría organofosforosos, a excepción de carbofuran, que es un carbamato y que ocupó el último lugar), productos tales como fosfatos, nitrofenoles y sulfonas. (6)

El efecto positivo observado en la nodulación y crecimiento de los nódulos sobre la planta, lo debemos atribuir, como ya se dijo, a un efecto directo de salud y nutrición del vegetal, pues plantas sanas, vigorosas y sin una fuente de nitrógeno, ha sido demostrado, forman nódulos abundantes y grandes.

Ahora bien, no se puede decir lo mismo cuando los insecticidas entran en contacto directo con las bacterias de vida libre, ya que se comprobó que conforme se incrementa la dosis de 5ppm a 10ppm se provoca un detrimento en la viabilidad de las mismas.

Aunque estadísticamente no se encontró diferencia entre el testigo y las 5ppm utilizadas como dosis mínima, sí se puede establecer que existe una disminución del 7 al 10% en el número de Rhizobios vivos, y aún más, a 10ppm el porcentaje aumenta entre el 34 y 37%.

Todo lo anterior implica tres cosas básicas: a.) que se puede mejorar la nodulación usando los insecticidas que mostraron el mejor comportamiento que el testigo; b.) que si es imprescindible el uso de cualquier otro, puede hacerse, sin detrimento significativo en la nodulación; y c.) que debe tenerse mucho cuidado cuando

se manejen insecticidas y Rhizobios que aún no efectúan simbiosis, ya que se corre el riesgo de disminuir la población de los mismos y de inutilizar el inoculante o fuente natural de Rhizobium existente, si el insecticida entra en contacto con ellos.

VII. CONCLUSIONES

1. La disminución o incremento en la nodulación y la presencia de un menor o mayor porcentaje de nódulos grandes, disminuyen o aumentan el peso y altura de planta, en una relación directa.
2. La simbiosis Rhizobium japonicum - Glicine max, no fué afectada significativamente con el uso de los insecticidas y dosis evaluadas, cuando la comparación se efectuó contra el testigo, y aún más, el comportamiento de los insecticidas monocrotofos y metamidophos fué superior.
3. Sin considerar al testigo, hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos, siendo monocrotofos, dosis máxima y metamidophos, dosis máxima, los que manifestaron el mejor comportamiento.
4. Al incrementar la dosis de los insecticidas se mejoraron los valores promedio de las variables de los insecticidas monocrotofos, metamidophos, formation y carbofuran, a excepción del demeton methyl, donde sucedió lo contrario.
5. Las interacciones insecticida X dosis analizadas, establecen que el tratamiento monocrotofos, con su dosis máxima, supera a las demás.

6. La supervivencia del Rhizobium japonicum que no está en simbiosis, disminuye entre el 7 y 10%, cuando está en contacto directo con 5ppm de cualquiera de los insecticidas probados, y un 37% con niveles de 10ppm.

7. Los objetivos planteados fueron alcanzados, al haberse podido establecer el efecto que los insecticidas sistémicos y las dosis evaluadas pueden tener en el Rhizobium japonicum en su estado simbiótico y de vida libre.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos similares a este, probando otras cepas o bien otras leguminosas que tengan importancia económica o alimenticia en nuestro país.
2. Evaluar este experimento en condiciones de campo, para corroborar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.
3. Que se continúe con este tipo de investigaciones, probando el efecto que puedan tener otros biocidas como herbicidas y fungicidas, en la simbiosis Rhizobium-leguminosas.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. BOOGES, A. CH. Principios básicos de bacteriología, s.d.e., s.p.
2. CARDOSO, E. J. B. N. Efeitos de factores biológicos e nao biológicos sobre a nodulacao e fixicao de nitrogenio. Porto Alegre, Brasil, s.e., s.f.
3. KOLLING, J. Avalacao da nodulacao em leguminosas. Porto Alegre, Brasil, Secretaria de Agricultura, s.f. 12 p.
4. LEGUME RHIZOBIUM. Curso sobre Rhizobium. Brasil, Nardi y Niftal, 1980. 100 p.
5. MENDEZ BARRIOS, J. C. Evaluación en Guatemala de nueve cepas de Rhizobium phaseoli, seleccionadas para pruebas internacionales de fijación de nitrógeno atmosférico en frijol, probadas en la variedad ICTA-81. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, 1982. 42 p.
6. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Manejo y control de plagas de insectos. México, Limusa, 1980. V. 3.
7. PARREK, R. P. and GAUR, A. C. Efect. of docloro diphenyl trichloro ethane (DDT) on symbiosis of Rhizobium Sp. with Phaseolus aureus. Nueva Delhi, Indian Agricultural Research, Division of Microbiology. s.f., s.p.
8. RUSCHEL, P. A. Curso sobre leguminosas y Rhizobium. Brasil, Centro de Energía Nuclear de Agricultura, 1980. s.p.
9. _____ y DA COSTA, W. F. Fixicao simbiotica de nitrogeno atmosferico em feijao (Phaseolus vulgaris) III influencia de algunos insecticidas e fungicidas. Brasil, Instituto de Pesquisas e Experimentacao Agropecuarias do Centro Sul, s.d.e., s.p.
10. VELASQUEZ GODINEZ, P. E. Estudio en frijol del daño causado a la nodulación por insectosrhizobiofagos y del efecto de la inoculación de Rhizobium phaseoli con dos niveles de encalado al suelo. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, 1983. 55 p.
11. VINCENT, J. M. Manual práctico de rhizobiología. Buenos Aires, AID, 1975. 325 p.



[Handwritten signature]

X. APENDICE

A. FASE DE INVERNADERO

CUADRO No. 1

PESO DE NODULOS POR MACETA (2 PLANTAS) EXPRESADO EN Grs.

TRATAMIENTO	DOSIS	REPETICION				MEDIA
		I	II	III	IV	
CARBOFURAN	(0)	0.209	0.320	0.123	0.230	0.221
	(1)	0.476	0.403	0.405	0.501	0.445
	(0)	0.244	0.600	1.053	0.478	0.594
DEMETON METHYL	(1)	0.301	0.482	0.381	0.312	0.369
	(0)	0.348	0.417	0.451	0.312	0.382
	(1)	0.699	0.670	0.804	0.700	0.718
METAMIDOPHOS	(0)	0.455	0.223	0.331	0.312	0.330
	(1)	0.237	0.763	0.550	0.200	0.438
	(0)	0.443	0.831	0.378	0.439	0.523
FORMATION	(1)	1.308	0.730	0.927	1.030	0.999
	(0)	0.596	0.715	0.409	1.398	0.780
	(1)	0.596	0.715	0.409	1.398	0.780
MONOCROTOFOS	(1)	1.308	0.730	0.927	1.030	0.999
	(0)	0.596	0.715	0.409	1.398	0.780
	(1)	1.308	0.730	0.927	1.030	0.999
TESTIGO	(0)	0.596	0.715	0.409	1.398	0.780
	(1)	1.308	0.730	0.927	1.030	0.999
	(0)	0.596	0.715	0.409	1.398	0.780

CUADRO No. 2

TAMAÑO DE LOS NODULOS EXPRESADO EN % DE NODULOS GRANDES						
TRATAMIENTO	DOSIS	REPETICION				MEDIA
		I	II	III	IV	
CARBOFURAN	(0)	3.07	5.68	7.41	5.88	5.51
	(1)	14.52	3.44	8.22	15.07	10.31
	(0)	14.81	15.52	30.38	11.59	18.08
DEMETON METHYL	(1)	5.55	12.86	7.77	5.95	8.03
	(0)	5.50	11.86	8.77	5.95	8.02
METAMIDOPHOS	(1)	17.50	20.25	19.48	26.66	20.97
	(0)	5.36	-----	2.38	-----	3.87
FORMATION	(1)	3.64	20.64	9.80	-----	11.36
	(0)	5.26	27.27	4.00	5.45	10.49
MONOCROTOFOS	(1)	33.06	21.17	22.45	18.81	23.87
TESTIGO		12.63	17.14	8.97	14.70	13.36

NOTA: Observar cuadro A.5 de tratamientos estudiados en sección IV
 Metodología, para establecer (0) dosis mínima
 (1) dosis máxima

CUADRO No. 3

PESO SECO DE PLANTA POR MACETA (2 PLANTAS) EXPRESADO EN Grs.

TRATAMIENTO	DOSIS	REPETICION				MEDIA
		I	II	III	IV	
CARBOFURAN	(0)	2.6	2.2	3.3	3.4	2.9
	(1)	3.6	3.2	3.6	4.0	3.6
	(0)	3.0	4.9	3.4	4.5	3.9
DEMETON METHYL	(1)	4.0	4.2	3.2	2.9	3.6
	(0)	3.7	4.0	3.6	4.3	3.9
	(1)	3.9	4.1	6.7	3.7	4.6
METAMIDOPHOS	(0)	2.3	2.2	2.9	3.3	2.7
	(1)	1.6	4.4	2.9	1.7	2.7
	(0)	4.1	4.2	3.4	4.9	4.2
FORMATION	(1)	5.6	5.2	4.8	5.2	5.2
	(0)	4.7	3.7	3.9	4.8	4.3
	(1)	5.6	5.2	4.8	5.2	5.2
MONOCROTOFOS	(0)	4.7	3.7	3.9	4.8	4.3
	(1)	5.6	5.2	4.8	5.2	5.2
	(0)	4.7	3.7	3.9	4.8	4.3
TESTIGO	(1)	5.6	5.2	4.8	5.2	5.2
	(0)	4.7	3.7	3.9	4.8	4.3
	(1)	5.6	5.2	4.8	5.2	5.2

CUADRO No. 4

ALTURA DE PLANTA POR MACETA (2 PLANTAS) EXPRESADO EN Cms.						
TRATAMIENTO	DOSIS	REPETICION				MEDIA
		I	II	III	IV	
CARBOFURAN	(0)	36	34	39	39	37
	(1)	41	35	42	40.5	39.6
	(0)	37.5	42	39	44	40.6
DEMETON METHYL	(1)	42.5	41.5	44	36.5	41.1
	(0)	36.5	43.5	40.5	42.5	40.8
METAMIDOPHOS	(1)	42.5	45	46	50.5	46
	(0)	35.5	36	44	40	38.9
FORMATION	(1)	34	42	39.5	36.5	38
	(0)	41.5	43.5	40.5	42.5	42
MONOCROTOFOS	(1)	51.5	50.5	49.5	51.5	50.8
TESTIGO		45.5	42.5	42	43	43.3

NOTA: Observar cuadro No. A.5 de tratamientos estudiados en sección IV Metodología, para establecer (0) dosis mínima
(1) dosis máxima

ANALISIS DE VARIANZA INCLUYENDO AL TESTIGO

CUADRO No. 5

PESO DE NODULOS

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	10	2.083	0.2083	4.52 ⁺⁺
ERROR	33	1.52	0.0461	
TOTAL	43	3.603		

CUADRO No. 6

PORCENTAJE DE NODULOS GRANDES

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	10	1806.67	180.67	4.90 ⁺⁺
ERROR	33	1215.68	36.84	
TOTAL	43	3022.25		

CUADRO No. 7

PESO SECO DE PLANTA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	10	26.02	2.602	4.41 ⁺⁺
ERROR	33	19.46	0.590	
TOTAL	43	45.48		

CUADRO No. 8

ALTURA DE PLANTA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	10	613.18	61.318	7.60 ⁺⁺
ERROR	33	266.1	8.063	
TOTAL	43	879.28		

⁺⁺ = Significativo al 1% de Probabilidad.

ANALISIS DE VARIANZA SIN INCLUIR AL TESTIGO

CUADRO No. 9

PESO DE NODULOS

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	9	1.802	0.2002	6.24 //
A	4	0.897	0.2243	6.99 //
B	1	0.339	0.339	10.56 //
AB	4	0.566	0.1415	4.41 //
ERROR	30	0.963	0.0321	
TOTAL	39	2.765		

CUADRO No. 10

PORCENTAJE DE NODULOS GRANDES

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	9	1795.09	199.45	5.07 //
A	4	767.01	191.75	4.87 //
B	1	306.42	306.42	7.79 //
AB	4	721.66	180.41	4.58 //
ERROR	30	1179.69	39.32	
TOTAL	39	2974.78		

// = Significativo al 1% de Probabilidad.

CUADRO No. 11

PESO SECO DE PLANTA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C
TRATAMIENTOS	9	24.88	2.76	4.47 $^{++}$
A	4	20.37	5.09	8.24 $^{++}$
B	1	1.72	1.72	2.78 NS
AB	4	2.79	0.698	1.13 NS
ERROR	30	18.54	0.618	
TOTAL	39	43.42		

CUADRO No. 12

ALTURA DE PLANTA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	9	601.75	66.86	7.75 $^{++}$
A	4	377.69	94.42	10.94 $^{++}$
B	1	105.65	105.65	12.24 $^{++}$
AB	4	118.41	29.60	3.43 $^{+}$
ERROR	30	258.85	8.63	
TOTAL	39	860.6		

$^{++}$ = Significativo al 1% de Probabilidad.

$^{+}$ = Significativo al 5% de Probabilidad.

NS = No Significativo.

B. FASE DE LABORATORIO

CUADRO No. 1

RESULTADOS DEL NUMERO DE COLONIAS DE RHIZOBIUM EN LAS DILUCIONES EMPLEADAS

INSECTICIDA	DOSIS	REPETICION Y DILUCION EMPLEADA									MEDIAS DE REPRESENTACION		
		I			II			III					
		1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^5	1×10^5	1×10^5
CARBOFURAN	0	4285	401	30	4602	374	41	4720	387	36	3765	4147	4063
	1	2541	345	20	2831	334	27	2944	311	23	2664	2957	2785
DEMETON METHYL	0	4909	380	33	4405	396	21	5345	384	43	4003	3488	4495
	1	3221	309	23	2606	339	15	3169	304	27	2870	2499	2970
METAMIDOPHOS	0	4797	325	34	4508	400	40	4988	374	31	3816	4169	3943
	1	2454	314	23	2642	308	27	2831	311	20	2631	2807	2647
FORMATION	0	4497	386	30	4305	348	36	4355	390	38	3786	3795	4018
	1	3147	309	20	2831	334	22	2202	328	25	2746	2790	2661
MONOCROTOFOS	0	4797	386	40	4720	348	33	4508	390	30	4219	3833	3803
	1	3040	355	27	2517	316	22	2552	339	19	3097	2626	2614
TESTIGO		5035	401	34	5623	374	40	4977	391	38	4148	4454	4229

CUADRO No. 2

RESUMEN DEL CUADRO No. 1 PARA EL NUMERO DE COLONIAS QUE SE PRESENTA-
RON POR EFECTO DE LOS INSECTICIDAS

TRATAMIENTO	DOSIS	REPETICION			MEDIA
		I 1×10^5	II 1×10^5	III 1×10^5	
CARBOFURAN	0	3765	4147	4063	3992
	1	2664	2957	2785	2802
DEMETON METHYL	0	4003	3488	4495	3995
	1	2870	2499	2970	2780
METAMIDOPHOS	0	3816	4169	3943	3976
	1	2631	2807	2647	2695
FORMATION	0	3786	3795	4018	3866
	1	2746	2790	2661	2732
MONOCROTOFOS	0	4219	3833	3803	3952
	1	3097	2626	2614	2779
TESTIGO		4148	4454	4229	4277

Dosis (0) = 5 ppm.

Dosis (1) = 10 ppm.

ANALISIS DE VARIANZA INCLUYENDO AL TESTIGO

CUADRO No. 3

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	10	13139935	1313993.5	28.21 $\neq$
ERROR	22	1189936	54088	
TOTAL	32	14329871		

ANALISIS DE VARIANZA SIN INCLUIR AL TESTIGO

CUADRO No. 4

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTOS	9	10831069	1203452	21.12 $\neq$
A	4	382445	95611	1.67 NS
B	1	10774815	10774815	189.08 $\neq$
AB	4	18009.8	4502	.08 NS
ERROR	20	1139662	56983	
TOTAL	29	11970731		

$\neq$ = Significativo al 1% de Probabilidad.

NS = No Significativo al 1% de Probabilidad.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia	
Asunto	
.....	

"IMPRIMASE"

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Cesar A. Castañeda S.



ING. AGR. CESAR A. CASTAÑEDA S.
D E C A N O