



**DOCUMENTO GENERAL**

**Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas**

**PROTOCOLOS DE EFICACIA DE PRODUCTOS MICROBIANOS DE CONTROL DE PLAGAS**

## Tabla de contenidos

1. Ámbito de aplicación.....	4
2. Fundamento .....	4
3. Procedimiento.....	4
3.1 Antecedentes generales .....	4
4. Ensayos en área Fitopatológica. Requerimientos para estudios de eficacia ....	5
4.1 Organismo plaga .....	5
4.2 Sustancia a evaluar .....	6
4.3 Dosificación .....	6
4.4 Dosis .....	6
4.5 Uso de tratamiento control .....	6
4.6 Uso de plaguicida microbiano comercial .....	7
4.7 Uso de plaguicida químico comercial .....	7
4.8 Plaguicida microbiano evaluado.....	7
4.9 Condiciones experimentales.....	7
4.9.1 Ensayos de laboratorio.....	7
4.9.2 Ensayos de invernadero y campo .....	8
4.9.3 Antecedentes del huerto y/o invernadero .....	8
4.9.4 Información climática.....	8
4.9.5 Tratamientos .....	9
4.9.6 Diseño experimental .....	9
4.10 Aplicación de tratamientos.....	9
4.10.1 Momento de la aplicación de los tratamientos .....	9
4.10.2 Modo de aplicación de tratamientos .....	10
4.10.3 Modo de evaluación, registro y mediciones .....	10
4.11 Ensayos de Laboratorio .....	10
4.12 Ensayos de invernadero y campo .....	10
4.13 Obtención e interpretación de resultados.....	11
4.14 Plazos de ejecución de ensayos y entrega de informes finales .....	11

5. Ensayos en área Entomológica. Requerimientos para estudios de eficacia...	12
5.1 Organismo plaga .....	12
5.2 Entes de investigación .....	12
5.3 Uso de control sin tratamiento .....	12
5.4 Sustancia a evaluar .....	13
5.5 Dosificación .....	13
5.6 Dosis .....	13
5.7 Tiempo de exposición al plaguicida .....	13
5.8 Condiciones experimentales.....	13
5.9 Diseño experimental .....	13
5.10 Bioensayo de Laboratorio .....	14
5.10.1 Diseño experimental .....	14
5.10.2 Tratamientos .....	14
5.10.3 Metodología para plaguicida microbiano con acción ovicida y/o larvicida .....	14
5.11 Bioensayo de campo .....	15
5.11.1 Metodología para plaguicida microbiano con acción ovicida y/o larvicida .....	15
5.12 Modo de evaluación, registro y mediciones .....	17
5.12.1 Determinación de la eficacia de los plaguicidas.....	17
5.12.2 Interpretación de resultados .....	19
5.12.3 Formula de Henderson & Tilton .....	19
5.12.4 Formula de Abbott.....	20
5.13 Consideraciones en la aplicación.....	20
5.13.1 Aplicación de tratamientos.....	20
5.13.2 Plazos de ejecución de ensayos y entrega de informes finales .....	20
5.13.3 Información meteorológica .....	21

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>

## 1. **Ámbito de aplicación**

- a. El presente documento establece las metodologías para determinar las eficacias de PMCP de origen fúngico o bacteriano sobre enfermedades.
- b. Entregar las metodologías para determinar las eficacias de PMCP de origen fúngico o bacteriano sobre artrópodos considerados plaga.

## 2. **Fundamento**

Según FAO (2006) los ensayos de eficacia tienen como objetivo garantizar que las afirmaciones y recomendaciones de la etiqueta del producto registrado estén respaldadas por datos de prueba y reflejen el rendimiento real del producto y que proporcionen un beneficio claro para el usuario. En otras palabras, los ensayos de eficacia permiten el registro de productos suficientemente eficaces como para que el uso del producto sea mejor que no usarlo. Cuando los productos tienen eficacia insuficiente, existe el riesgo de que el usuario pueda aumentar la dosis o la frecuencia de aplicación, aumentando la exposición de los seres humanos y el medio ambiente a compuestos potencialmente peligrosos (FAO, 2006).

Actualmente, el manejo de las plagas y enfermedades de las plantas se ha basado en la aplicación de plaguicidas químicos, aunque, debido a la necesidad de buscar alternativas al uso de agroquímicos y disminuir los efectos adversos que ocasionan éstos al medio ambiente, los plaguicidas en base a microorganismos cada año cobran mayor importancia. En Chile, la eficacia de los plaguicidas microbianos es evaluada siguiendo directrices indicadas en la Resolución Exenta N° 9074 de 2018 del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) que establece condiciones y requisitos para autorizar plaguicidas microbianos para comercialización. Sin embargo, los protocolos estándar para la realización de ensayos de eficacia no son especificados, dejando al investigador responsable la metodología, existiendo baja armonización de las técnicas empleadas y con ello variaciones entre los resultados y conclusiones obtenidos. Por lo tanto, este documento tiene el objetivo de proporcionar directrices e información general de antecedentes sobre el diseño y análisis de evaluación de la eficacia para plaguicidas microbianos, particularmente para las condiciones chilenas bajo la normativa de FAO y estándares EPPO.

## 3. **Procedimiento**

### 3.1 Antecedentes generales

Los resultados del Estudio de Eficacia, deber ser presentados en tablas y con análisis estadísticos. Deben demostrar que el producto se utiliza de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, la calidad es satisfactoria, reduce el riesgo a especies no objetivo, como también actúa en forma efectiva contra la población plaga.

Todos los datos deben registrarse en un informe, el cual debe ser presentado de forma ordenada con la información exacta y completa.

- a. Identificación del ensayo (región, comuna, localidad, georreferenciación, etc)
- b. Se deberá evaluar los plaguicidas microbianos tanto en laboratorio (opcional) como en campo (obligatorio).
- c. Nombre de la entidad ejecutora del ensayo (particular y/o fiscal).
- d. N° de protocolo y fecha de emisión de éste.
- e. Fechas de inicio y término del ensayo.

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>

- f. Objetivos del ensayo.
- g. Fecha de recepción de la muestra.
- h. Nombre del producto ensayado. El nombre del producto debe corresponder al propuesto para la solicitud de registro.
- i. Principio activo (microorganismo) y concentración
- j. Formulación del plaguicida microbiano
- k. Diseño experimental (N° repeticiones, unidad experimental)
- l. Plagas objetivo: género y especie utilizada.
- m. Resumen
- n. Resultados del Estudio de Eficacia, con tablas y análisis estadísticos. Estos resultados deben demostrar que el producto, se usa de acuerdo con las indicaciones, posee una calidad satisfactoria, reduce el riesgo a especies no objetivo, como también actúa en forma efectiva contra la población plaga o enfermedad.
- o. Resumen de condiciones ambientales como: temperatura, humedad, velocidad del viento, precipitaciones, estación del año, luz solar; métodos de aplicación, dosis, condiciones específicas.
- p. Efectos adversos detectados y recomendaciones a considerar en el etiquetado, folletos técnicos y Hoja de Datos de Seguridad del producto.
- q. Conclusiones.
- r. Responsable (s) de la realización del estudio con su firma.

#### **4. Ensayos en área Fitopatológica. Requerimientos para estudios de eficacia**

##### 4.1 Organismo plaga

Se debe indicar claramente cual es plaga objetivo y el ciclo epidemiológico indicando claramente:

- a. Patógeno de suelo: Si/No
- b. Fuentes de inóculo: hojas senescentes, frutos momificados en el campo, etc.
- c. Forma de diseminación: maquinaria agrícola, herramientas agrícolas, tubérculos infectados, escorrentía superficial, etc.
- d. Estructura de resistencia: esporas de resistencia, micelio, esclerocios, etc.
- e. Condiciones favorables para la infección: presencia de agua libre, temperatura óptima, humedad relativa, etc.
- f. Rango de hospederos
- g. Principales órganos afectados: Raíz, tallo, hoja, flor o inflorescencia, fruto, etc.
- h. Momentos críticos de susceptibilidad del cultivo (hospedero): almácigo, brotación, floración, cosecha, etc.

Se deberá indicar la naturaleza del patógeno. Ej: patógeno de suelo, foliar, vascular.

Será responsabilidad de la Estación Experimental contar con material de calidad para la realización de los Estudios de Eficacia. Dado que existen organismos plaga que no pueden ser diferenciados morfológicamente, en el caso de pruebas donde se utilicen inoculaciones y/o infecciones artificiales, el organismo plaga debe ser identificado con su código interno, y debe estar molecularmente identificado a través de la secuenciación de al menos cinco genes usando un análisis de secuencias multilocus (MLSA, por su sigla en inglés) que logre diferenciarlo de especies molecularmente cercanas a través de la comparación de las

secuencias nucleotídicas de especies de referencia depositadas en bancos de secuencias como Mycobank and National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias obtenidas de las plagas objetivo deben ser ingresadas a una base de datos de secuencias genéticas pública como NCBI y los números de acceso deben ser indicados en el informe. Los cultivos puros deben ser depositados en una colección o banco de microorganismos reconocida internacionalmente como por ejemplo el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), con la finalidad de asegurar la reproducibilidad de los resultados.

La plaga debe ser patógena y virulenta. La edad del cultivo (hongo o bacteria) utilizado para la inoculación artificial en los ensayos de eficacia debe indicarse en el informe. Se recomienda utilizar cultivos nuevos, según el organismo plaga.

En el caso de inoculaciones naturales, se deberá indicar las características de síntomas y signos observados en la evaluación de los ensayos deben estar asociados a los ocasionados por el organismo plaga descritos en la literatura. Los síntomas pueden ser:

- Marchitez
- Necrosis: pudrición, formación de canchales, atizonamiento, manchas necróticas, etc.
- Crecimiento anormal: agallas, ampollamientos foliares, deformación, tilosis, gigantismo, etc.
- Pigmentación anómala: clorosis, moteados, estrías, enrojecimiento, etc.

Si existen antecedentes de tolerancia de ciertas cepas o especies a ciertos plaguicidas microbianos, en el estudio deberán usarse cepas resistentes a estos activos.

#### 4.2 Sustancia a evaluar

Debe corresponder al mismo producto que se desea registrar, en la o las dosis de uso recomendadas y en el envase definitivo.

#### 4.3 Dosificación

El producto deberá ser probado en distintas dosis, con las cuales se podrá obtener la dosis mínima recomendada, la cual debe ser consecuente con la dosis recomendada en los rótulos y ficha técnica del producto. Con esto se pretende asegurar que la dosis es efectiva, y que no se está utilizando el plaguicida microbiano en exceso (sobredosis).

#### 4.4 Dosis

Señalar contenido mínimo y máximo del microorganismo en el material utilizado, expresado en unidad de medida que corresponda, como el número de unidades activas (unidades formadoras de colonia, UFC) por volumen o peso, u otra forma que sea pertinente para el microorganismo.

#### 4.5 Uso de tratamiento control

Se deberá tener un tratamiento control dentro del Ensayo de Eficacia. El tratamiento control permite conocer la prevalencia de la enfermedad en el cultivo sin la aplicación de un plaguicida microbiano y es aquel con el cual se comparará el plaguicida microbiano testeado. A nivel de ensayo, el tratamiento control es el parámetro que indicará el éxito de la aplicación del plaguicida microbiano sobre la enfermedad causada por la plaga objetivo. Detalles en EPPO, 2012.

#### 4.6 Uso de plaguicida microbiano comercial

Se recomienda incorporar al estudio un tratamiento con un plaguicida microbiano de uso comercial de eficacia conocida en las (la) dosis recomendadas. El plaguicida de uso comercial se utiliza para evaluar la validez del ensayo y constatar el éxito del tratamiento con el plaguicida microbiano. Además, en el caso de no tener un tratamiento control, será más apropiado comparar el plaguicida microbiano con uno ya registrado y validado. Se debe utilizar la dosis recomendada en la etiqueta para el cultivo objetivo.

#### 4.7 Uso de plaguicida químico comercial

Se recomienda incorporar un tratamiento con un plaguicida químico de uso comercial de eficacia conocida en la (las) dosis recomendadas para el cultivo objetivo. En caso de no contar con un tratamiento control, o un plaguicida microbiano comercial, el plaguicida químico comercial puede ser apropiado para comparar la eficacia del plaguicida microbiano testado.

#### 4.8 Plaguicida microbiano evaluado

El plaguicida microbiano corresponde al mismo producto que se desea registrar, en la o las dosis de uso recomendadas y en el envase definitivo.

#### 4.9 Condiciones experimentales

Los Ensayos de Eficacia deberán realizarse bajo condiciones controladas (laboratorio) y bajo condiciones comerciales en el campo.

##### 4.9.1 Ensayos de laboratorio

Se deberán realizar ensayos *in vitro* bajo condiciones controladas favorables al crecimiento o reproducción del patógeno. Se debe indicar:

- a. Técnica empleada
- b. Medio de cultivo: Agar papa dextrosa, B de King, agar nutritivo, Luria Bertani, etc. Indicar receta del medio de cultivo y/o marca. El medio de cultivo no deberá interactuar con el pesticida microbiano, lo cual debe ser indicado en el informe.
- c. Tipo de medio de cultivo: líquido, sólido.
- d. Tipo de inóculo: Micelio, esporas, esclerocios, etc.
- e. Concentración de inóculo: diámetro de disco de agar (mm), suspensión conidial (conidias/mL), unidad formadora de colonia (UFC)/mL.
- f. Tiempo de incubación: horas (h), días (d).
- g. Condiciones ambientales: temperatura ambiental (°C), humedad relativa (%), luminosidad (ciclo horas luz/oscuridad).

En el caso de no utilizar medio de cultivo, se podrá utilizar tejido vegetal previamente desinfectados con alcohol (75%) o hipoclorito de sodio (1%) por 2 min, enjuagados 2 veces en agua destilada estéril por 1 min y secados en ambiente estéril (ej. Cámara de flujo laminar). Posteriormente, aplicar los tratamientos, dejar secar por 24 h e inocular con el organismo plaga. Se debe mantener el tratamiento control con la misma cantidad de unidades experimentales que el tratamiento con plaguicida microbiano.

Se deberá utilizar la temperatura o rango de temperatura óptima de crecimiento e infección del organismo plaga para la ejecución de los experimentos, información que debe estar respaldada con estudios previos y deberá ser indicado en el informe. Plaguicidas microbianos formulados para ser usados a bajas temperaturas, como postcosecha a 0°C,

se deberá realizar un ensayo que contemple esa temperatura. Para corroborar los resultados, cada ensayo *in vitro* se deberá realizar al menos veces.

#### 4.9.2 Ensayos de invernadero y campo

Un plaguicida microbiano puede disminuir su eficacia debido las condiciones climáticas o ambientales, por lo tanto, los ensayos deben realizarse en lugares que representen el rango de condiciones agronómicas, fitosanitarias, ambientales y climáticas que probablemente se encuentren en la práctica en el área de uso propuesto.

Los experimentos deberán realizarse en parcelas comerciales o experimentales donde pueda ser reproducida la enfermedad mediante infecciones naturales o artificiales. Debido a que el desarrollo de la enfermedad depende de las condiciones ambientales y las infecciones artificiales son menos exitosas se recomienda utilizar parcelas con historial de alta presión de la plaga objetivo. Los cultivos deberán ser manejados bajo condiciones comerciales, lo cual incluye sistema de conducción, marco o densidad de plantación, manejos culturales, etc. Las condiciones de las parcelas deberán ser indicadas en el informe.

El tamaño del área deberá ser el suficiente para permitir el uso de los equipamientos señalados en la etiqueta del producto. A menos que se especifique de otra forma, es preferible presentar los resultados en forma de recuentos pre y post tratamiento, así como también los resultados de las áreas sin tratamientos.

#### 4.9.3 Antecedentes del huerto y/o invernadero

En el informe deben indicarse claramente los antecedentes del huerto y/o invernadero:

- a. Georreferenciación: Nombre del huerto, cuartel, nave, comuna, provincia, región.
- b. Especie y cultivar.
- c. Sistema de conducción si es frutal.
- d. Superficie del ensayo y/o cuartel.
- e. Marco de plantación: distancia entre hilera (m) x distancia sobre hilera (m).
- f. Plan de manejo para otras plagas.
- g. Tipo de riego.

#### 4.9.4 Información climática

Se deberán registrar los datos climáticos que puedan afectar la calidad y la persistencia del tratamiento. Esto incluye registrar las condiciones ambientales desde al menos tres días antes de la aplicación de los tratamientos hasta el término del experimento. Se deberá registrar al menos precipitaciones (cantidad en mm), temperatura (media, máxima, mínima en °C), humedad relativa (%) en el cuartel, hora de inicio y término de la aplicación y estado fenológico del cultivo. El viento sólo se medirá el día de la aplicación. Siempre debe resguardarse que no haya deriva del plaguicida microbiano a probar, hacia sitios no tratados.

En caso de presencia de alguna condición meteorológica de riesgo para el ensayo, como temperaturas altas extremas, precipitaciones, etc, queda bajo criterio del investigador la suspensión o eliminación de las actividades.

#### 4.9.5 Tratamientos

El número de tratamientos en un ensayo debe ser el menor posible. A mayor número de tratamientos, aumentará la variabilidad y por tanto será menor la repetitividad al comparar diferentes tratamientos. Sin embargo, el número de tratamientos ayudará a tener una estimación apropiada de la acción del plaguicida microbiano, aunque se produzca una alta variabilidad (por ejemplo, al realizar pruebas de campo en diferentes zonas).

Se debe incluir en el experimento al menos una tasa inferior a la recomendada. Idealmente, se debe evaluar la dosis recomendada y aproximadamente el 75% y el 50% de esta dosis. Por lo tanto, en el ensayo de eficacia se deben tener los siguientes tratamientos:

- a. Tratamiento plaguicida microbiano en dosis recomendada.
- b. Tratamiento plaguicida microbiano en dosis inferior a la recomendada (50 y/o 75% de la dosis recomendada)
- c. Tratamiento control
- d. Plaguicida microbiano comercial de eficacia conocida.
- e. Plaguicida químico comercial de eficacia conocida.

#### 4.9.6 Diseño experimental

El diseño experimental debe estar claramente definido y seleccionado de acuerdo con el objetivo del estudio, el cual debe ser acorde al ámbito de aplicación y recomendaciones de uso del producto. Para mayores detalles, referirse a las indicaciones de EPPO (2012).

Debe diseñarse un ensayo de eficacia que permita un análisis estadístico, el cual debe incluir el número de repeticiones y la confianza debiera ser >95%, cuando sea posible.

La estación experimental deberá seleccionar el diseño dependiendo de la condición del huerto seleccionado, cuando se trate de ensayos de campo o invernadero. El diseño experimental podrá corresponder a:

- a. Diseño completamente al azar (DCA), con al menos cuatro (4) repeticiones. Se deben asignar los tratamientos al azar, a través de una tabla de números aleatorios u otro método azaroso.
  
- b. Bloques completos al azar (BCA), con al menos cuatro (4) repeticiones, correspondiendo el bloque a una o más hileras, dependiendo del lugar del ensayo. Se deberá utilizar BCA en el caso que exista un elemento perturbador, en donde la estación experimental deberá definir cuál será el factor de bloque que influirá en la variable respuesta.

#### 4.10 Aplicación de tratamientos

##### 4.10.1 Momento de la aplicación de los tratamientos

La aplicación de los tratamientos debe realizarse en el período fenológico de mayor susceptibilidad del cultivo a la plaga y de mayor efectividad del plaguicida sobre la plaga. Él o los momentos de aplicación deben estar indicados en la etiqueta y/o ficha técnica del producto y deben estar respaldados por estudios epidemiológicos previos. Los antecedentes epidemiológicos deben ser adjuntados en el dossier biológico. En el caso de estudios realizados en plantas de proceso, se deberá indicar momento del proceso en el cual se incluye la aplicación, por ejemplo: baño de inmersión, ducha, aspersión acuosa en línea, aspersión acuosa en línea de encerado, etc.

#### 4.10.2 Modo de aplicación de tratamientos

Es muy importante que la técnica de aplicación, en el tipo de prueba de eficacia que se presenta. Esto debe ser explicitado en los resultados de la prueba y deben estar acordes a lo que indica la etiqueta y/o ficha técnica del producto.

El producto se aplicará a la dosis propuesta por el fabricante del plaguicida microbiano o la empresa representante en Chile, bajo condiciones de Buenas Prácticas Agrícolas. Para todos los casos se utilizará la dosis recomendada por el fabricante, considerando que no se produzcan incumplimientos a los límites máximos de residuos (LMR) nacionales en el caso de utilizar plaguicidas químicos comerciales. Esto se debe expresar en kg (o litros) de producto formulado por ha., también debe indicarse la dosis en gr. de ingrediente activo por ha. y en gr. o cc de producto comercial e i.a. por hectolitro.

Para determinar el volumen de aplicación, (VDA) se debe calcular el TRV (tree row volumen). En período de plena vegetación el factor de dosificación (D) fluctuará entre 80 y 90. En donde:

$$VDA (l/ha) = TRV/m^3 \times D (L)/1000m^3$$

Se deberá informar el tipo de maquinaria a utilizar, la cual sólo podrá corresponder a una nebulizadora o bomba de espalda con motor, debiendo presentar un perfecto estado de mantención (mangueras, manómetro, agitador hidráulico, boquillas, otros). La aplicación será chequeada utilizando papel hidrosensible en tres plantas escogidas al azar por tratamiento, donde se demuestre una distribución uniforme del producto en todas las plantas de cada parcela. En plantas de proceso, se deberá indicar el tipo de maquinaria utilizada (modelo, marca), tipo de boquilla, gasto, temperatura y tiempo de exposición.

#### 4.10.3 Modo de evaluación, registro y mediciones

Independientemente del tipo de evaluación elegida, la metodología de muestreo o evaluación debe ser descrito con suficiente detalle, para que el método sea reproducible basado en la información proporcionada en el informe.

Todos los resultados del estudio de eficacia deber ser presentados en tablas y con análisis estadísticos cuyo respaldo debe estar adjunto en el informe. Deben demostrar que el producto se utiliza de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta, la calidad es satisfactoria, reduce el riesgo a especies no objetivo, como también actúa en forma efectiva contra la población plaga.

#### 4.11 Ensayos de Laboratorio

Los resultados deberán expresarse como:

- a. Porcentaje de inhibición respecto a un tratamiento control
- b. Disminución del crecimiento micelial
- c. Disminución de la germinación conidial
- d. Efecto sobre el largo del tubo germinativo
- e. Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>)
- f. Disminución de UFC/mL

#### 4.12 Ensayos de invernadero y campo

Los resultados deben ser expresados en términos de incidencia y severidad de la plaga objetivo. Además, se podrán adjuntar resultados como producción, altura de planta, masa

radical si fuese necesario para enrobustecer los resultados. Para mayores detalles referirse a las directrices de EPPO (2012).

La incidencia debe estar expresada en porcentaje (%) como el número de observaciones o plantas enfermas ( $X$ ) dividido por el número total de observaciones ( $Y$ ) según la fórmula (Madden y Hughes, 1995):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{X}{Y} 100$$

Para la determinación de la severidad se puede utilizar la estimación de porcentaje de daño sobre las estructuras a evaluar (hojas, tallos, raíces, frutos, flores y la planta en general). La severidad se podrá estimar con un análisis de imágenes y/o de forma visual usando escalas ordinales y categóricas, como escalas de severidad, que permiten aglutinar las estructuras de evaluación por grados de daño. En el caso de utilizar escalas de daño, ésta debe estar adjunta en el informe de resultados y debe contar con un respaldo visual.

Tanto la incidencia como la severidad podrán ser expresados como eficacia o control de la enfermedad utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), considerando como eficacia media a baja valores de 50% a 70% (FAO, 2006).

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{C - T}{C} 100$$

$C$  = Incidencia o severidad (%) en la parcela testigo absoluto

$T$  = Incidencia o severidad (%) en la parcela tratada con el plaguicida microbiano.

#### 4.13 Obtención e interpretación de resultados

Los resultados obtenidos deberán ser sometidos a un análisis estadístico. Basado en el análisis de los resultados, el investigador a cargo del estudio entregará las conclusiones del ensayo. Las conclusiones deben ser claras, precisas, y basadas en datos representativos. Se podrán usar análisis paramétricos como el análisis de varianza, regresión lineal y análisis probit, como análisis no paramétricos para el caso de variables con resultados cualitativos u otra prueba estadística que asegure la confiabilidad de los datos. Se deberá respetar el principio de normalidad y homocedasticidad de varianza de los resultados, indicar tipo de transformación de los datos en el caso de requerirlo, indicar el software y fabricante utilizado para realizar el análisis de resultados. Se recomienda utilizar una confianza  $\geq 95\%$ .

Para asegurar la correcta comprensión de la lectura de los resultados en el informe, se deberá indicar claramente el porcentaje de control o efectividad del plaguicida microbiano sobre el organismo plaga o enfermedad y si existe alguna diferencia estadística tanto con el tratamiento control como con el tratamiento con el plaguicida comercial (microbiano o químico).

#### 4.14 Plazos de ejecución de ensayos y entrega de informes finales

Los ensayos deberían tener una duración máxima de 180 días. Se podría extender el plazo de ejecución del ensayo por un mes dependiendo de la epidemiología de la enfermedad.

## 5. Ensayos en área Entomológica. Requerimientos para estudios de eficacia

### 5.1 Organismo plaga

El estado y estadio a controlar dependerá de las características del plaguicida microbiano a evaluar: ovicida, larvicida o adulticida. En el caso de plaguicidas microbianos con efecto ovicida deberá utilizarse sobre el 90% de huevos recién ovispuestos o maduros o, adultos machos y hembras para ovipostura.

Será responsabilidad de cada Estación Experimental autorizada, contar con material de calidad para cumplir con el número de estadios mínimos exigidos en este protocolo para realizar los ensayos de eficacia.

El tamaño de la muestra debería reflejar, el tamaño de la población, con el fin de que exista seguridad respecto de la eliminación efectiva de las plagas objetivo.

Según su modo de acción, los datos deberán demostrar el efecto del plaguicida microbiano de prueba en un estadio específico o varios estados de ciclo de vida de las plagas. Además, deberá ser probado evitando distintas falencias como derrames, errores al mezclar, deriva en la aplicación, etc., evitando de esta manera deficiencias técnicas en los ensayos de control. Los datos deberán demostrar claramente el modo de acción: repelencia, destrucción, eliminación de huevos, larvas y/o adultos, cese de alimentación, entre otros.

En general, los artrópodos presentan una amplia variedad de nichos ecológicos y muestran diversos patrones biológicos, fisiológicos y de comportamiento, así como también diferentes estados larvarios que deben ser tomados en consideración para el control. Si se trata de larvas, puede nombrarse el estadio larval en que se encuentran (si no se dispone de fechas exactas de muda). Como la determinación de sexo no es fácil, es deseable que se cuente con este dato, pero no exigible.

### 5.2 Entes de investigación

Los resultados deben provenir de fuentes confiables, como laboratorios reconocidos en su país de origen, que cuenten con un sistema de gestión de calidad reconocido.

La autorización del laboratorio para la realización del ensayo tendrá una duración máxima de una temporada), renovables a solicitud del interesado previo cumplimiento de los requisitos solicitados por el SAG, y debe estar acreditado para tal efecto, por lo tanto, se requiere:

- a. Identificación de la Institución o empresa responsable de la realización del ensayo, en caso de que fuera distinta a la empresa o institución solicitante. Nombre, razón social, RUT, nombre y RUT del representante legal, teléfonos, correo electrónico, dirección.
- b. Nombre del profesional que actuará como la Contraparte de la Institución o empresa ante el SAG
- c. Nombre y dirección de la(s) empresa(s) u organización(es) que actúen como proveedores de los plaguicidas microbianos para la ejecución del ensayo *in vitro* y/o campo.

### 5.3 Uso de control sin tratamiento

Este punto es de vital importancia, ya que permite conocer el grado de infestación existente antes de la aplicación del plaguicida microbiano. En aquellos casos, en que no es posible el

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>

uso de un control no tratado, el plaguicida microbiano deberá ser probado de otra forma, por ejemplo, usando un plaguicida microbiano de eficacia conocida.

#### 5.4 Sustancia a evaluar

Debe corresponder al mismo producto que se desea registrar, en la o las dosis de uso recomendadas y en el envase definitivo.

#### 5.5 Dosificación

El producto deberá ser probado en distintas dosis, con las cuales se podrá obtener la dosis mínima recomendada, la cual debe ser consecuente con la dosis recomendada en los rótulos y ficha técnica del producto. Con esto se pretende asegurar que la dosis es efectiva, y que no se está utilizando el plaguicida microbiano en exceso (sobredosis).

#### 5.6 Dosis

Señalar contenido mínimo y máximo del microorganismo en el material utilizado, expresado en unidad de medida que corresponda, como el número de unidades activas (unidades formadoras de colonia (UFC) o por unidades internacionales de toxicidad (UIT)) o por volumen o peso, u otra forma que sea pertinente para el microorganismo.

#### 5.7 Tiempo de exposición al plaguicida

Será importante de acuerdo a los objetivos planteados y alcanzar un máximo control de las plagas objetivo. Los datos deben entregarse en períodos de 0-12; 0-24; 0-48 hrs., u otros.

#### 5.8 Condiciones experimentales

Los estudios realizados *in vitro* (laboratorio), deben estar realizados considerando el lugar geográfico donde serán utilizados los plaguicidas microbianos, encontrándose diferencias de temperatura, humedad, pH del suelo, luminosidad, etc., las cuales deben ser registradas en el análisis.

Debe tenerse en cuenta que la temperatura, luz solar y humedad son factores muy importantes en relación a la densidad de la población de la plaga objetivo y a la degradación del plaguicida microbiano.

Para que los resultados sean acordes a lo esperado, es importante elegir las condiciones adecuadas, dependiendo de cada producto o formulación para los respectivos estudios, los que variarán de acuerdo a:

- a. Características de calidad. Selección del mejor aislamiento (cepa): Facilidad de multiplicación, alta virulencia o patogenicidad (esporulación, colonización, parasitismo, otros), amplio rango de hospederos.
- b. Tipo de formulación (líquido, polvo, tabletas, etc).
- c. Plaga objetivo (biología, fisiología, comportamiento).
- d. Esquema de uso.
- e. Métodos y frecuencia de aplicación.

#### 5.9 Diseño experimental

El diseño experimental debe estar claramente definido y seleccionado de acuerdo al objetivo del estudio, el cual debe ser acorde al ámbito de aplicación y recomendaciones de uso del producto.

Debe diseñarse un ensayo de eficacia que permita un análisis estadístico, el cual debe incluir el número de repeticiones y la confianza debiera ser >95%, cuando sea posible.

La estación experimental deberá seleccionar el diseño dependiendo de la condición del huerto seleccionado, cuando se trate de ensayos de campo. El diseño experimental podrá corresponder a:

- a. Diseño completamente al azar (DCA), con al menos cuatro (4) repeticiones. Se deben asignar los tratamientos al azar, a través de una tabla de números aleatorios u otro método azaroso.
- b. Bloques completos al azar (BCA), con al menos cuatro (4) repeticiones, correspondiendo el bloque a una o más hileras, dependiendo del lugar del ensayo. Se deberá utilizar BCA en el caso que exista un elemento perturbador, en donde la estación experimental deberá definir cuál será el factor de bloque que influirá en la variable respuesta.

## 5.10 Bioensayo de Laboratorio

### 5.10.1 Diseño experimental

En cada repetición, un tratamiento deberá estar conformado por al menos diez (10) estados inmaduros o adultos seleccionados de la plaga objetivo, en un soporte sólido (hojas, por ejemplo) sobre placas petri y/o vasos plásticos (6 oz) con tierra esterilizada, por cada repetición. Cada tratamiento y repetición deberán quedar debidamente identificados en cada unidad experimental.

### 5.10.2 Tratamientos

El número de tratamientos en un ensayo debe ser el menor posible. A mayor número de tratamientos, aumentará la variabilidad y por tanto será menor la repetitividad al comparar diferentes tratamientos. Sin embargo, el número de tratamientos ayudará a tener una estimación apropiada de la acción del plaguicida microbiano, aunque se produzca una alta variabilidad (por ejemplo, al realizar pruebas de campo en diferentes zonas). Eso sí, no basta un sólo tratamiento. Siempre debe considerarse la repetitividad y un cálculo estadístico después.

Siempre los tratamientos deberían ser contrastados con:

- a. Utilizar un producto standard de eficacia conocida.
- b. Uso de un control sin tratamiento (testigo).
- c. Cantidad de individuos sobrevivientes y su condición.

### 5.10.3 Metodología para plaguicida microbiano con acción ovicida y/o larvicida

#### a. Plaguicida microbiano con acción ovicida

Si se utilizan adultos hembras de la plaga objetivo, para postura, la infestación se debe realizar al menos 10 días antes de la aplicación de los tratamientos. En cada placa petri y/o vasos plásticos (6 oz), se colocarán un mínimo de ocho (8) hembras y ocho (8) machos, las cuales para efecto del ensayo deberán oviponer un **mínimo de 20 huevos** por repetición en un plazo aproximado de 7 a 10 días, de acuerdo a condiciones del ambiente. Considerando 20 huevos por repetición y 80 huevos por tratamiento.

Si se desea trabajar con huevos sin adultos hembras y machos, se deberá contar con el número suficiente de huevos para cada repetición y tratamiento.

b. Plaguicida microbiano con acción larvicida

La infestación se debe realizar, 5 días previos a la aplicación de los tratamientos con huevos maduros y/o larvas. Para verificar el estado larvario antes de la aplicación, si se utiliza huevos, se requiere que por cada repetición se aísle una placa de 20 huevos, los cuales debidamente marcados, se mantendrán en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente verificando la eclosión y el tiempo en que se logra el estadio que se requiere evaluar (larva). Cada repetición se infestará con un mínimo de 20 huevos y/o larvas. Se debe, considerar que los huevos eclosarán aproximadamente a las 24 horas post instalación. Una vez verificada en laboratorio y corroborado en el tratamiento testigo la eclosión de larvas, y determinar bajo lupa el número de huevos eclosados, se calculará así el número de larvas presentes en cada repetición.

Si se utilizan larvas (determinar edad), cada repetición se infestará con un mínimo de 20 larvas. En el caso de no cumplir con esta exigencia, se puede reinfestar utilizando el material mantenido en condiciones de laboratorio y correspondiente al tratamiento en estudio.

c. Plaguicidas microbianos con acción adulticida

La infestación se debe realizar al menos 1 día antes de la aplicación de los tratamientos. En este caso no se deberán utilizar placas Petri, ya que es fácil que los adultos escapen, por lo que se debería utilizar vasos plásticos (6 oz), existiendo la posibilidad de aplicar el producto antes de la liberación de los adultos o después, dependiendo de la utilidad del producto. Se colocarán un mínimo de diez adultos (10) por repetición, considerando 40 adultos por tratamiento.

## 5.11 Bioensayo de campo

### 5.11.1 Metodología para plaguicida microbiano con acción ovicida y/o larvicida

#### 5.11.1.1 Condiciones experimentales

Cultivo: Los ensayos podrán ser realizados en cualquier frutal y/u hortaliza, dependiendo del plaguicida microbiano a evaluar y plaga objetivo, de acuerdo a la disponibilidad en cada Estación Experimental o huerto comercial.

Los estudios realizados en campo, deben considerar el lugar geográfico donde serán utilizados los plaguicidas microbianos, encontrándose diferencias de temperatura, humedad, pH del suelo, luminosidad, etc., las cuales deben ser registradas en el análisis.

Debe tenerse en cuenta que la temperatura, luz solar y humedad son factores muy importantes en relación a la densidad de la población de la plaga objetivo y a la degradación del plaguicida microbiano.

#### 5.11.1.2 Antecedentes del huerto

- a. Variedad
- b. Sistema de conducción si es frutal
- c. Superficie del ensayo y/o cuartel
- d. Marco de plantación frutal y/u hortaliza
- e. Plan de manejo para otras plagas

Un plaguicida microbiano puede verse en extremo afectado de acuerdo a las condiciones climáticas, superficies de uso, tipo de suelo, etc. Por ello, las pruebas de eficacia, debieran ser realizadas considerando las condiciones climáticas de la región donde se usará el producto.

Sin embargo, el número de ensayos dependerá de la accesibilidad de las infestaciones, la fluctuación estacional de las plagas, la conducta de éstas y otras consideraciones acerca de la biología propia del objetivo a controlar.

El tamaño del área, deberá ser el suficiente para permitir el uso de los equipamientos señalados en la etiqueta del producto. A menos que se especifique de otra forma, es preferible presentar los resultados en forma de recuentos pre y post tratamiento, así como también los resultados de las áreas sin tratamientos.

En algunos casos, las áreas de ensayo pueden ser grandes extensiones. Siempre debe resguardarse que no haya deriva del plaguicida microbiano a probar, hacia sitios no tratados.

Dependiendo de la plaga objetivo, existen dos formas de realizar los ensayos de eficacia:

- En huertos con infestación natural de la plaga objetivo
- En huertos limpios con infestación artificial de la plaga objetivo

En el caso donde se utilice infestación artificial, se utilizará para enmallar racimos, frutas y/u hortalizas malla tipo "manto térmico" que se compra por rollo o tipo "velo liso" (muselina), con lo que se generará una bolsa de tamaño variable dependiendo del hospedero a utilizar. Se deberá incluir un espiral de alambre para evitar que los hospederos queden en contacto con el tul o el manto térmico. El material de la espiral puede ser alambre grueso, corresponde alambre N°10.

#### 5.11.1.3 Plaguicidas microbianos con acción ovidica y/o larvicida en huertos con infestación natural de la plaga objetivo

En los huertos donde se encuentre la plaga objetivo presente, y una vez decidido el estado a controlar (huevo o larva), en cada repetición, un tratamiento deberá estar conformado por al menos diez (10) plantas, donde se seleccionarán 10 racimos, frutas y/u hortalizas, etc., (40 en total).

#### 5.11.1.4 Plaguicidas microbianos con acción adulticida en huertos con infestación natural de la plaga objetivo

En cada repetición, se elegirán al menos diez (10) plantas, donde se seleccionarán 10 racimos, frutas y/u hortalizas, etc., (40 en total) que tengan la plaga objetivo presente.

#### 5.11.1.5 Plaguicidas microbianos con acción ovidica y/o larvicida en huertos con infestación artificial de la plaga objetivo

La repetición de cada tratamiento deberá estar conformada, por ejemplo, de al menos diez (10) racimos, frutas y/u hortalizas, donde se infestarán 15 racimos, con el fin de asegurar la ovipostura mínima en los 10 racimos que deben ser evaluados en laboratorio. En cada repetición, se colocarán un mínimo de ocho (8) hembras y ocho (8) machos, las cuales para efecto del ensayo deberán oviponer un mínimo de 20 huevos por repetición en un plazo aproximado de 7 a 10 días, de acuerdo a condiciones del ambiente. Considerando 20 huevos por repetición, se exigirá un mínimo de 20 huevos por repetición y 80 por tratamiento.

En el caso que se utilicen larvas, en cada repetición, se colocarán un mínimo de ocho (8) hembras y ocho (8) machos, las cuales para efecto del ensayo deberán oviponer un mínimo de 20 huevos por repetición en un plazo aproximado de 7 a 10 días, de acuerdo a condiciones del ambiente. Considerando 20 huevos por repetición, se exigirá un mínimo de 20 huevos por repetición y 80 por tratamiento, para emergencia de larvas, determinando así el estadio a controlar (L1, L2, L3...etc.).

#### 5.11.1.6 Plaguicidas microbianos con acción adulticida en huertos con infestación artificial de la plaga objetivo

Cuando se utilicen adultos de la plaga objetivo, se deberá enmallar inmediatamente los los tratamientos. En cada repetición, se colocarán un mínimo de 10 adultos (10) por plantas, donde se seleccionarán 10 racimos, frutas y/u hortalizas, etc., (40 en total). Se deberá aplicar el plaguicida microbiano un día (1) antes de liberar los adultos.

Para todos los casos anteriores (laboratorio y campo), tanto las plantas como los racimos, frutos u hortalizas infestados, deberán quedar debidamente identificados en cada unidad experimental.

Para cualquiera de las metodologías utilizadas, el SAG tendrá la facultad de suspender en cualquier momento el estudio y exigir que el predio se incorpore a un plan de manejo, si se determina un posible riesgo para los predios vecinos o el no cumplimiento de alguna de las medidas dispuestas en el presente protocolo.

#### 5.12 Modo de evaluación, registro y mediciones

##### 5.12.1 Determinación de la eficacia de los plaguicidas

En caso de productos con efecto ovicida, la evaluación de eficacia considerará la medición de los parámetros y frecuencia, según se detallan en el siguiente Tabla 33:

**Tabla 33. Parámetros y Frecuencia de medición, para la evaluación de eficacia de plaguicidas microbianos con efecto ovicida.**

Nº Evaluación	Tipo infestación	Frecuencia DDA*	Registro	Número de repeticiones	Observaciones
1	Natural	Pre aplicación (inspección en laboratorio)	Número de huevos vivos /repetición	80** huevos/tratamiento	Infestar con hembras y machos de 2 a 3 días de edad
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de huevos vivos /repetición	80** huevos/tratamiento	
1	Artificial	Pre aplicación (inspección en laboratorio)	Número de huevos vivos /repetición	80** huevos/tratamiento	Infestar con hembras y machos de 2 a 3 días de edad
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de huevos vivos /repetición	80** huevos/tratamiento	

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>

\*días después de la aplicación \*\* 20 huevos mínimo/repetición

Para productos con efecto larvicida, la evaluación de eficacia considerará la medición de los parámetros y frecuencia, según se detallan en el siguiente Tabla 34:

**Tabla 34. Parámetros y frecuencia de medición, para la evaluación de eficacia de plaguicidas microbianos con efectolarvicida.**

Nº Evaluación	Tipo infestación	Frecuencia DDA*	Registro	Número de repeticiones	Observaciones
1	Natural	Pre aplicación (inspección de huevos mantenidos en laboratorio)	Porcentaje de huevos eclosionados	Se evalúa cada placa de cada repetición	Infestar con huevos y/o larvas
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de larvas vivas/repetición Número larvas muertas	80 ** larvas / tratamiento	
1	Artificial	Pre aplicación (inspección de huevos mantenidos en laboratorio)	Porcentaje de huevos eclosionados	Se evalúa cada placa de cada repetición	Infestar con huevos y/o larvas
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de larvas vivas/repetición Número larvas muertas	80 ** larvas / tratamiento	

\*días después de la aplicación; \*\* 20 larvas/ repetición/ tratamiento

Para productos con efecto adulticida, la evaluación de eficacia considerará la medición de los parámetros y frecuencia, según se detallan en el siguiente Tabla 35:

**Tabla 35. Parámetros y Frecuencia de medición, para la evaluación de eficacia de plaguicidas microbianos con efectoadulticida.**

Nº Evaluación	Tipo infestación	Frecuencia DDA*	Registro	Número de repeticiones	Observaciones

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>				
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>				

1	Natural	Post aplicación (inspección en laboratorio)	Porcentaje de adultos vivos	40 ** adultos / tratamiento	
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de adultos vivos/repetición Número de adultos muertos	40 ** adultos / tratamiento	
1	Artificial	Post aplicación (inspección en laboratorio)	Porcentaje de adultos vivos	40 ** adultos / tratamiento	Infestar con adultos
2		24 a 72h, hasta 7d(inspección en laboratorio)	Número de adultos vivos/repetición Número de adultos muertos	40 ** adultos / tratamiento	

\*días después de la aplicación; \*\* 20 larvas/ repetición/ tratamiento

Si los plaguicidas microbianos son utilizados de manera preventiva en etapa invernada (estados inmaduros o adultos), se deberá ajustar los tiempos, humedades y temperaturas de las condiciones invernadas para que el ensayo sea representativo en el caso de ser con infestación artificial. En caso de ser infestación natural y control preventivo en etapa invernada, se mantienen los requerimientos descritos en este documento.

### 5.12.2 Interpretación de resultados

Los resultados para plaguicidas de acción ovicida, larvicida o adulticida serán sometidos a un Análisis de Varianza y a una Prueba Rango Múltiple con una probabilidad del error  $\leq 0,05$

Los datos deben ser analizados en forma estadística. El análisis usado debe ser claro en el estudio. Basado en el análisis de los resultados, el investigador a cargo del estudio, entregará las conclusiones finales del ensayo. Las conclusiones deben ser claras, precisas, y basadas en datos representativos. Puede usarse el Análisis de Varianza, la fórmula de corrección de Henderson & Tilton, fórmula de Abbott, regresión lineal u otra prueba estadística que asegure la confiabilidad de los datos.

Considerando cuando la infestación tanto del tratamiento tratado y el testigo siempre presentarán diferencias, es que el cálculo del porcentaje de Eficacia se debe realizar utilizando la fórmula de Henderson & Tilton para individuos vivos con poblaciones desuniformes o heterogénea.

### 5.12.3 Formula de Henderson & Tilton

$$\% \text{ Eficacia} = [1 - (Ca/Ta) * (Td/Cd)] * 100$$

Adaptado de Henderson, CF y EW Tilton, 1955. J. Econ. Entomol. 48: 157-161

Donde:

Ta= Infestación en parcela **tratada antes del** tratamiento  
 Td=Infestación en parcela **tratada después del** tratamiento  
 Ca=Infestación en **la parcela testigo antes del** tratamiento  
 Cd=Infestación en **la parcela testigo después del** tratamiento

Considerando cuando la infestación tanto del tratamiento tratado y el testigo presenten infestación homogénea, el cálculo del porcentaje de Eficacia se debe realizar utilizando la fórmula de Abbott para individuos vivos con poblaciones uniformes u homogéneas.

#### 5.12.4 Formula de Abbott

$$\% \text{ Eficacia} = [1 - (T_d/C_d) * 100 = (C_d - T_d/C_d)] * 100$$

Td=Infestación en parcela **tratada antes** del tratamiento  
 Cd=Infestación en **la parcela testigo antes** del tratamiento

#### 5.13 Consideraciones en la aplicación

Es muy importante la técnica de aplicación, en el tipo de prueba de eficacia que se presenta. Esto debe ser explicitado en los resultados de la prueba y deben estar acordes a lo que indica la etiqueta y/o ficha técnica del producto.

##### 5.13.1 Aplicación de tratamientos

###### 5.13.1.1 Modo de aplicación

El producto se aplicará a la dosis propuesta por el fabricante del plaguicida microbiano o la empresa representante en Chile, bajo condiciones de Buenas Prácticas Agrícolas. Esto se debe expresar en kg (o litros) de producto formulado por ha., también debe indicarse la dosis en gr. de ingrediente activo por ha. y en gr. o cc de producto comercial e i.a. por hectolitro.

Para determinar el volumen de aplicación, (VDA) se debe calcular el TRV (tree row volumen). En período de plena vegetación el factor de dosificación (D) fluctuará entre 80 y 90. En donde:

$$VDA \text{ (l/ha)} = TRV/m^3 \times D \text{ (L)/}1000m^3$$

Se deberá informar el tipo de maquinaria a utilizar, la cual sólo podrá corresponder a una nebulizadora o bomba de espalda con motor, debiendo presentar un perfecto estado de mantención (mangueras, manómetro, agitador hidráulico, boquillas, otros). La aplicación será chequeada utilizando papel hidrosensible en tres plantas escogidas al azar por tratamiento, donde se demuestre una distribución uniforme del producto en todas las plantas de cada parcela. De acuerdo al tamaño y cantidad mínima recomendado para insecticidas el valor recomendado es de 275 micras con un cubrimiento entre 40 a 70 gotas por cm<sup>2</sup>. (Gil *et al.*, 2013; Porras, 2013).

##### 5.13.2 Plazos de ejecución de ensayos y entrega de informes finales

Los ensayos podrán iniciarse dependiendo del estado y si corresponde a periodo invernall, en la temporada primavera-verano y/u otoño-invierno. Los informes finales deberán entregarse hasta tres meses después de las evaluaciones.

	<b>DOCUMENTO GENERAL</b>
	<b>Protocolos de eficacia de productos microbianos de control de plagas</b>

### 5.13.3 Información meteorológica

Se deberán registrar los datos meteorológicos que puedan afectar la calidad y la persistencia del tratamiento. Esto incluye considerar las condiciones ambientales al momento del ensayo ya sea natural y o infestación artificial y al momento de la aplicación incluyendo al menos precipitaciones (cantidad en mm), temperatura (media, máxima, mínima en °C), humedad relativa en el cuartel, hora de inicio y término de la infestación o aplicación y estado fenológico del cultivo.

El viento sólo se medirá el día de la aplicación. La información meteorológica será registrada previa a la fecha de aplicación (a lo menos tres días antes y durante todo el tiempo que dure el ensayo).

En caso de presencia de alguna condición meteorológica de riesgo para el ensayo, como temperaturas altas extremas, precipitaciones, etc, queda bajo criterio del investigador la suspensión o eliminación de las actividades.