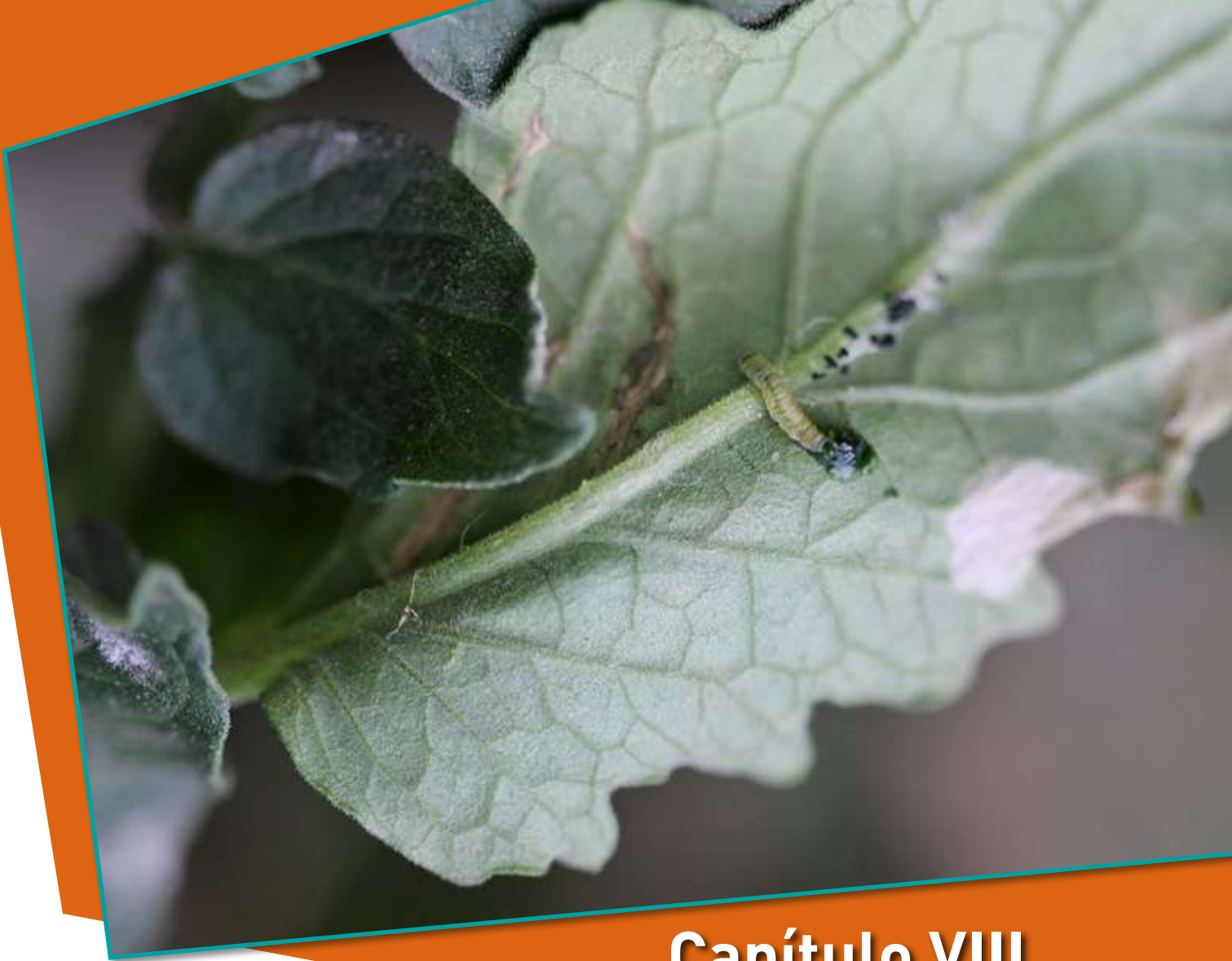




Capítulo VIII

151

Uso de invernaderos en la ejecución de investigaciones aplicadas a la evaluación de artrópodos plaga en Colombia

Stephanie Johana Numa-Vergel
Adriana Marcela Santos-Díaz

Introducción

La ejecución de investigaciones en condiciones semicontroladas (invernaderos) requiere de rigurosidad, desde el diseño del espacio, pasando por la planificación de áreas de trabajo para evitar la contaminación cruzada durante el desarrollo de los bioensayos, hasta el adecuado diseño experimental, factores cruciales en la obtención de resultados trazables y confiables para generar así estrategias de manejo de artrópodos de importancia agrícola.

Por eso, este capítulo aborda aspectos como los requerimientos básicos para el diseño de invernaderos (estructura interna y externa), las recomendaciones para buenas prácticas y el diseño de experimentos para la ejecución de bioensayos con artrópodos en invernadero. Finalmente, se mencionan algunas experiencias documentadas en la cría de artrópodos y en el desarrollo de bioensayos para la evaluación de microorganismos entomopatógenos en condiciones de invernadero.

Requerimientos básicos para el diseño de invernaderos útiles en la ejecución de bioensayos con artrópodos

El uso de invernaderos para la realización de bioensayos permite que se validen resultados de laboratorio en condiciones semicontroladas, con el fin de seleccionar, posteriormente, las estrategias con mayor potencial para el manejo de artrópodos en cultivos comerciales. Por eso el diseño de los invernaderos es crítico, siendo indispensable evaluar los componentes internos y externos de la infraestructura protegida, de tal manera que puedan ser útiles para establecer y optimizar las condiciones necesarias (principalmente ambientales) para cada tipo de bioensayo.

A continuación, se presentan algunos de los requerimientos básicos que un investigador debe tener en cuenta para el diseño de estructuras internas y externas de los invernaderos:

Infraestructura exterior

Para el diseño de esta estructura, se debe elegir el material de la cubierta de acuerdo con los requerimientos del bioensayo, debido a que influye en la generación del microclima dentro del invernadero. Entre tales requerimientos se encuentran las fluctuaciones en la temperatura, la humedad relativa y la radiación, entre otras variables que afectan directamente a las plantas,

a los artrópodos y, por supuesto, los resultados obtenidos en el bioensayo. Adicionalmente, como se presentó en el capítulo IV, “Materiales de cubierta y cerramiento para la construcción de invernaderos: criterios técnicos para su selección”, se deben contemplar las características propias del material de cubierta (tabla 23) y el tipo de estructura (figura 63), con el fin de definir el invernadero ideal según el diseño experimental y su uso.

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas presentadas en la tabla 23 y en la figura 63, en el trópico alto colombiano, el invernadero adecuado para este tipo experimentos correspondería al de arquitectura tipo venlo con cubierta de policarbonato, debido a que permite mantener en su interior condiciones ambientales homogéneas (temperatura, humedad relativa) para la ejecución de bioensayos (Lin et al., 2020). Además de esto, posibilita, por su estructura, que se instalen mallas que permiten limitar físicamente el ingreso y salida de artrópodos.

Tabla 23. Materiales utilizados para cubierta de invernadero

Material de cubierta	Costo	Durabilidad	Instalación	Fotoestable	Fragilidad	Lugares ideales para instalación
Plástico de polietileno.	Bajo	Baja	Fácil	Sí	Alta	Baja precipitación y sin climas extremos.
Plástico de policarbonato.	Medio	Alta	Fácil	Sí	Baja	Versátil en climas extremos por la resistencia de la estructura al impacto de altas precipitaciones de lluvia.
Vidrio.	Alto	Alta	Medio	Sí	Alta	Climas con extremos fríos.

Fuente: Elaboración propia con base en Đević y Dimitrijević (2008), Román-Roldán et al. (2019) y Villagrán et al. (2019)

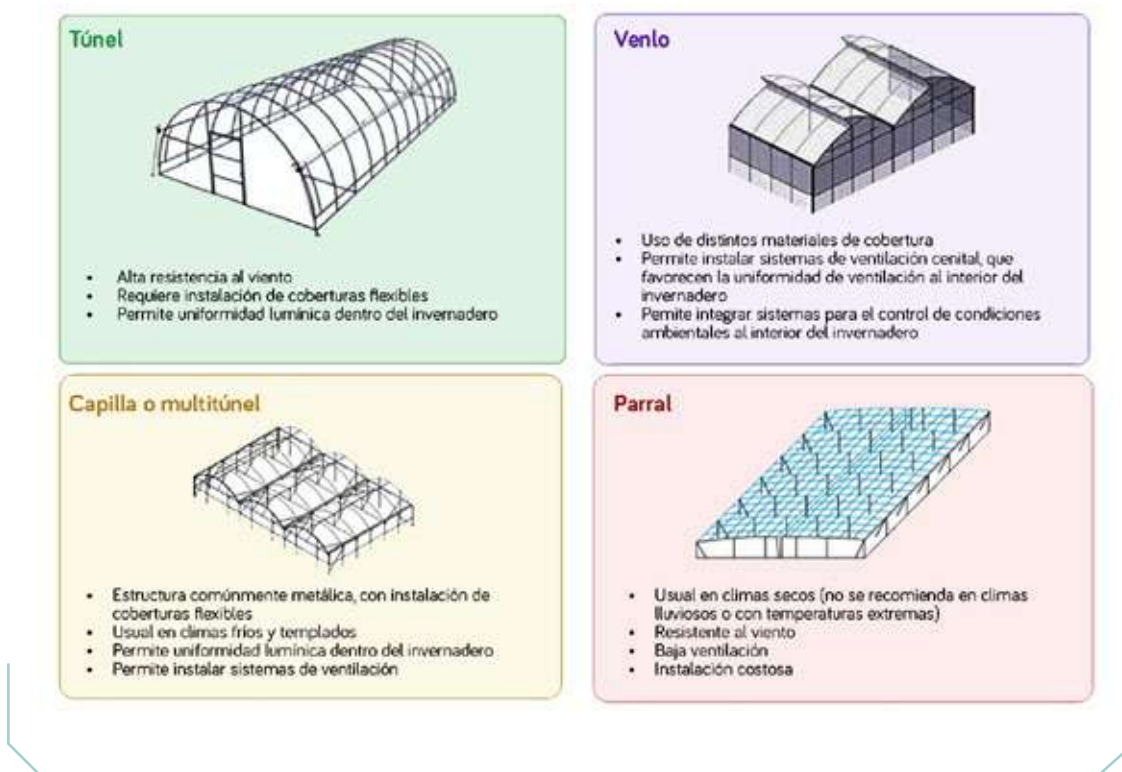


Figura 63. Tipos de estructura de invernaderos más comunes.

Fuente: Elaboración propia con base en Baeza et al. (2006), Baille et al. (2002), Lin et al. (2020), Parra et al. (2004), Senhaji et al. (2019) y Yu et al. (2022)

Infraestructura interior

El diseño del interior del invernadero es también fundamental para el éxito de los bioensayos, así como para la confiabilidad de los resultados obtenidos. Por esta razón, se deben contemplar las áreas básicas para que dentro de la estructura se puedan realizar procesos como lavado y alistamiento de material, y las áreas que prevengan la contaminación cruzada en las unidades experimentales. A continuación, se describen las áreas que debe contener un invernadero enfocado en la evaluación de artrópodos.

Área de ingreso

Se encuentra en la entrada del invernadero, en donde se debe ubicar, como mínimo, un área de *transfer* con doble puerta con prediluvio (poceta baja con cal o con un desinfectante líquido) para desinfección de calzado y cortina de aire en el medio de las dos puertas. Lo anterior, con el propósito de minimizar

el ingreso y salida de artrópodos u otros contaminantes. Después de la cortina de aire, se debe disponer de un área que pueda ser utilizada por los trabajadores, especialmente para colocarse los elementos de protección personal (EPP) requeridos para la ejecución, el seguimiento y la lectura del bioensayo (figura 64).



Figura 64. Área de ingreso en invernadero tipo venlo con cubierta de policarbonato.

Fotos: Stephanie Numa-Vergel

Área de preparación de muestras

Se recomienda que esta área cuente con punto de agua potable, un espacio para la siembra de plantas e, incluso, con un mesón para el alistamiento del material y demás elementos utilizados en el montaje de los ensayos (figura 65).



Figura 65. Área de preparación de muestras en invernadero tipo venlo con cubierta de policarbonato.

Fotos: Stephanie Numa-Vergel

Área de experimentación

Esta área debe estar provista de mesones metálicos, sistema de riego (p. ej., goteo o microaspersión), sistema de iluminación artificial, y sistema retráctil para la apertura y cierre de una malla térmica para sombrero o polisombra. Dentro de esta área se pueden ubicar sistemas automatizados y acoplados para la programación de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), y ventilación tipo cenital y lateral. Adicionalmente, dentro de la misma área, se recomienda ubicar los sensores de alta precisión que permitan el monitoreo de las condiciones ambientales, así como del encendido de los sistemas integrados (figura 66). Los sistemas anteriormente mencionados del invernadero automatizado permiten que sean áreas útiles para la ejecución de bioensayos según el diseño experimental, y generan las condiciones óptimas para los niveles tróficos evaluados para la generación de estrategias de manejo integrado de plagas (Choab et al., 2019; Kittas et al., 2008; Shipp et al., 2003).



Figura 66. Área de experimentación en invernadero tipo venlo con cubierta de policarbonato.

Fotos: Stephanie Numa-Vergel

Buenas prácticas en la ejecución de investigaciones bajo invernaderos

En este apartado se explicarán, de manera sucinta, dos condiciones mínimas para la aplicación de las buenas prácticas requeridas en la ejecución de investigaciones en invernaderos. La primera corresponde a lineamientos básicos para la aplicación de buenas prácticas y la segunda, al diseño adecuado de experimentos en invernaderos.

Buenas prácticas en invernaderos

Las buenas prácticas agrícolas en invernaderos están encaminadas a reducir la pérdida de material vegetal y animal, así como a evitar la contaminación cruzada. Dentro de las prácticas más importantes se pueden encontrar las mencionadas a continuación.

Uso de elementos de protección personal (EPP)

En los invernaderos, se debe asegurar que el personal utilice los EPP requeridos para evitar incidentes laborales al momento de realizar actividades de preparación de suelo, lavado de material e, incluso, aplicación o liberación de agentes patógenos o controladores biológicos, pues el uso inadecuado de los EPP es uno de los factores que ocasionan contaminaciones cruzadas en los experimentos, ya que los patógenos son transportados en la ropa y el calzado. Por eso es necesario contar con botas, overol, batas y demás elementos de uso exclusivo dentro del invernadero (Martínez, 2014), y que deben ser usados por el personal antes de ingresar a las áreas mencionadas en la sección anterior.

Microclima

Este es uno de los factores que afectan drásticamente la generación de resultados confiables, ya que al presentarse microclimas diferentes en el área de experimentación, es posible que se obtengan resultados contradictorios. En el interior de esta área, se debe contar con sensores para monitorear continuamente, en distintas ubicaciones, las condiciones ambientales, con el complemento de la incorporación de sistemas de ventilación natural o forzada que permitan una recirculación homogénea dentro del invernadero, así como otros sistemas de climatización para regular el microclima a valores deseados (Li et al., 2018; Teitel, 2007).

Manejo de residuos de cosecha

Otro factor que incide en las poblaciones de plagas que afectan (directa o indirectamente) los bioensayos es el inadecuado manejo de los residuos de cultivos, o de las unidades experimentales, en el caso de bioensayos. Aunque existen pocas publicaciones al respecto, varios autores (Forcella et al., 2018; Murrell, 2017; Surekha et. al., 2003) han demostrado que en los residuos de cosechas quedan artrópodos e, incluso, nematodos o microorganismos patógenos, que, al no ser tratados a tiempo, pueden contaminar futuros experimentos en el invernadero. Existen varios métodos para el manejo de residuos de cosecha, dentro de los que se encuentra la solarización, que consiste en ubicar dichos residuos debajo de plástico delgado transparente y utilizar la radiación solar para destruir a la mayoría de los patógenos y arvenses (Stapleton, 2000).

Medidas de seguridad y limpieza

Se recomienda que, al inicio de cada bioensayo, se realice en el invernadero la limpieza y la desinfección con las herramientas y productos químicos necesarios. En general, los equipos y los materiales para el montaje, seguimiento y toma de datos (cuchillos, recipientes, mesas, cestas, materiales de empaque, tijeras, cepillos, etc.) se deben usar de forma adecuada y mantener siempre limpios, para disminuir la contaminación cruzada (Somoza et al., 2019). Respecto a la seguridad, es importante cerciorarse de que las condiciones de trabajo sean las adecuadas para el personal y contar con procedimientos para identificar y atender los riesgos o posibles accidentes de trabajo que se puedan presentar (Díaz, 2008).

Diseño de experimentos biológicos en invernadero

El diseño de experimentos (DOE, por su sigla en inglés) en condiciones de invernadero es uno de los factores más críticos para asegurar la confiabilidad de los resultados. En general, el objetivo del DOE es obtener datos confiables para establecer diferencias y comparaciones entre tratamientos que se aplican en espacios, parcelas o unidades experimentales, y que posteriormente permiten cuantificar las respuestas obtenidas (Marín Rodríguez & García Mendoza, 2019).

En general, los experimentos en invernadero se pueden clasificar según diferentes criterios. Por ejemplo, Trapero-Casas et al. (2015) los clasifican en tres:

- Experimentos preliminares: aquellos en los que se prueba un número grande de tratamientos, con el objetivo de realizar una selección rápida (*screening*).
- Experimentos críticos o definitivos: aquellos en los cuales se comparan las respuestas de diferentes tratamientos y que buscan detectar diferencias estadísticamente significativas para establecer conclusiones.
- Experimentos demostrativos: aquellos que permiten establecer visualmente una respuesta positiva de un tratamiento versus un tratamiento control o convencional, para demostrar dicha respuesta.

El proceso de diseño y experimentación tiene diferentes etapas. Brevemente, se relacionan a continuación: definición de problema a resolver, establecimiento de objetivos, selección de tratamientos a evaluar, selección de material vegetal, definición de diseño experimental, toma correcta de datos, análisis, representación y presentación correcta de los resultados (Trapero-Casas et al., 2015).

Como factores críticos en el DOE, se destaca la definición de las unidades experimentales y de los tratamientos. La unidad experimental se define como la mínima unidad de material a la que se aplica un tratamiento, por ejemplo, puede ser una planta o varias plantas. El tratamiento corresponde al procedimiento cuyo efecto se cuantifica y se compara con otro procedimiento. Al seleccionar de forma correcta los tratamientos y las unidades, se busca disminuir el error experimental, dado que este es una variación que existe entre las observaciones de las unidades experimentales de un mismo tratamiento (Gupta et al., 2008).

En condiciones de invernadero, casas de malla o espacios controlados, se busca que un experimento cumpla con los principios básicos de réplica, aleatorización y bloqueo (Marín Rodríguez & García Mendoza, 2019). Las *réplicas* corresponden a repeticiones de los tratamientos que se pueden realizar en el tiempo o al mismo tiempo. Este proceso permite suministrar una estimación válida del error experimental. La estimación del error experimental posibilita la inferencia estadística, por ejemplo, al realizar pruebas de significancia u obtención de intervalos de confianza. La *aleatorización* corresponde a una asignación aleatoria de las condiciones “tratamientos” a las unidades experimentales, para asegurar que todas tengan las mismas probabilidades, y evitar el sesgo sistemático y subjetivo en un experimento. El *bloqueo* permite generar ciertas restricciones sobre la selección aleatoria y disminuir el error experimental, es decir que bloquear un experimento es dividir las unidades experimentales en

grupos o bloques de unidades similares, de tal manera que las observaciones de cada bloque se recopilen en condiciones relativamente similares. Este diseño es útil para experimentos en los que no es muy alto el número de tratamientos que se evalúan y en los que el área experimental tiene un gradiente (p. ej., luz solar, radiación ultravioleta, aireación, riego, salinidad).

En condiciones de invernadero, se deben aplicar mínimo dos principios de los tres expuestos anteriormente (aleatorización, repetición y bloqueo), y para esto se utilizan frecuentemente dos tipos de diseño de experimentos: *diseño completo al azar* (DCA) y *diseño de bloques al azar* (DBA).

El DCA es el más simple y utiliza los principios de aleatorización y de réplica. En este diseño, no se utiliza el bloqueo, debido a que se asume que las unidades experimentales son homogéneas y pueden ser asignadas a los tratamientos de forma aleatoria (Santos Díaz et al., 2022). La única causa identificable de variabilidad son los tratamientos, y la parte restante de la variabilidad es el error experimental (Gupta et al., 2008). En este caso, la cantidad de unidades experimentales y tratamientos depende de la disponibilidad de recursos y de las necesidades de precisión y reproducibilidad de las comparaciones. Es decir que, si el material experimental para algunos tratamientos está limitado por la cantidad, se reduce el número de repeticiones en ellos. Sin embargo, este tipo de decisiones afecta la precisión del ensayo y, por lo tanto, su error. Esta clase de diseño se utiliza en bioensayos en donde se evalúan microorganismos (hongos, bacterias y virus) contra insectos de interés agrícola.

El DBA aplica los tres principios (aleatorización, repetición y bloqueo) y consiste en que las unidades experimentales se pueden agrupar de forma lógica, formando bloques (Trapero-Casas et al., 2015). Los bloques pueden contener el mismo número de unidades experimentales y los tratamientos se distribuyen de manera aleatoria. Si el bloque se realiza correctamente, se reduce el error experimental. Es importante que durante el curso del experimento todas las unidades experimentales de cada bloque sean tratadas de manera uniforme en todos los aspectos, por ejemplo, el riego, la recolección de material, la evaluación de síntomas, la aplicación de fertilizantes, entre otros. Estas prácticas permiten controlar la variación entre los bloques y obtener resultados confiables. Este diseño experimental es equilibrado, es decir que cada tratamiento cuenta con un número igual de unidades experimentales en cada bloque y cada bloque tiene todos los tratamientos (Hartung et al., 2019).

Idealmente, los tratamientos dentro del bloque deben ser aleatorios, pero a menudo el *bloque 1* se ordena de manera consecutiva con el número de tratamientos (p. ej., del uno al cinco), ya que esto brinda la ventaja de tener

una fila de demostración. Un ejemplo de DBA con cuatro tratamientos y cinco bloques se describe en la figura 67.

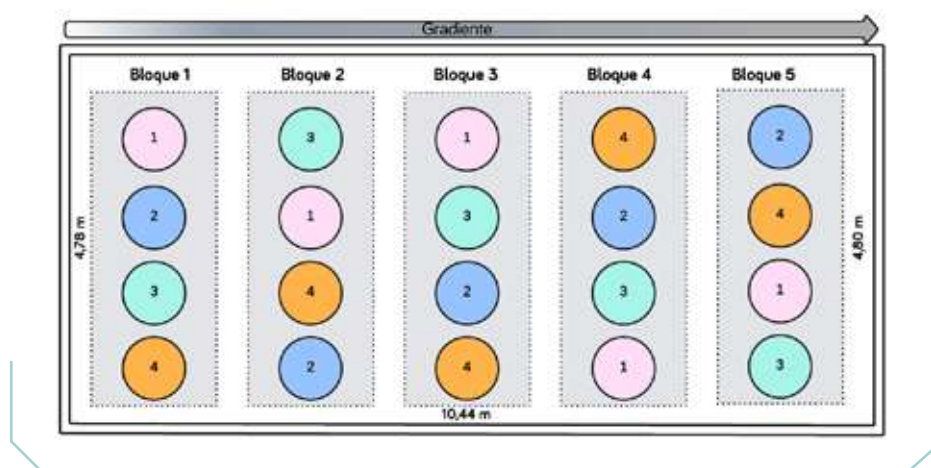


Figura 67. Diseño de bloques al azar. Ejemplo de distribución de cuatro tratamientos en cinco bloques.

Fuente: Elaboración propia

Entre las ventajas de la utilización de este tipo de diseño se presentan las siguientes: permite aumentar el número de unidades experimentales o de réplicas dentro de cada bloque para los tratamientos que lo requieren, y si se eliminan unidades experimentales por condiciones externas (p. ej., el clima), se puede estimar su valor teniendo en cuenta las unidades experimentales restantes (Santos Díaz et al., 2022).

Existen otros diseños experimentales que se pueden utilizar en condiciones de invernadero, pero con más frecuencia en condiciones de campo. Uno de estos es el diseño de cuadrado latino (CL), el cual se puede utilizar en los experimentos en los que existen dos fuentes de variación, por ejemplo, la iluminación y la temperatura, o fuentes de variación, como el gradiente de fertilidad en suelo y el gradiente de humedad. La característica principal de este modelo es que los tratamientos se organizan de dos maneras diferentes: por filas y por columnas (Trapero-Casas et al., 2015). También se pueden aplicar los experimentos factoriales, que corresponden a una forma simultánea de estudiar los efectos que tienen varios factores sobre una respuesta, en donde se combinan los niveles de un factor con los niveles de otro factor, formando lo que se denomina *tratamiento*. Este diseño permite, con mayor precisión y ahorro en tiempo y material, el establecimiento de inferencias entre los factores que se evalúan (Marín Rodríguez & García Mendoza, 2019).

A continuación, se describen algunas experiencias de uso de invernadero en el manejo integrado de plagas, enfocándose en dos temas: crías de insectos y bioensayos enfocados en la búsqueda, selección y aplicación de microorganismos contra plagas de interés agrícola.

Experiencias en el mantenimiento de crías de artrópodos bajo invernadero

Uno de los factores críticos para el éxito de investigaciones en la entomología moderna es la disponibilidad continua, y en las cantidades requeridas, de los artrópodos necesarios para la ejecución de bioensayos encaminados a generar estrategias de manejo cuando aquellos se convierten en plaga (Parra, 2013). Por esta razón, las crías de artrópodos en laboratorio e invernadero se han convertido en un insumo fundamental para la investigación enfocada en la generación de estrategias para el manejo integrado de plagas en cultivos de importancia agrícola.

Cuando se habla de crías de artrópodos en invernadero, no solo se evalúan dos niveles tróficos (planta-plaga), sino también del hospedero-presa y de parasitoide-depredador, es por esto que según Parra (2013), en programas de control biológico de plagas, se deben tener en cuenta las siguientes etapas:

Etapas 1. Selección del cultivo: se refiere a la planta que será el hospedante de la plaga o, en muchos casos, la dieta natural (planta completa, tubérculo, entre otras partes). Esta planta puede ser aquella sobre la cual se realizará un control en cultivo comercial o un hospedante alternativo del que se alimente el artrópodo de estudio. Es necesario que su mantenimiento sea más económico por unidad de área (Parra, 2013). La selección del cultivo debe realizarse soportada por investigaciones de tablas de vida del artrópodo con distintas plantas hospedantes (figura 68).

Etapas 2. Cría del hospedero y enemigo natural: en esta etapa se deben tener conocimientos previos del hospedero natural o alternativo del enemigo natural (parasitoide o depredador), para elegir el hospedero más adecuado y así proceder al escalamiento de la cría del controlador biológico en cultivos de importancia agrícola (figura 68).

Etapas 3. Cría masiva: el éxito de esta etapa depende de investigaciones previas en las cuales se determinen parámetros como densidad de siembra, respuesta funcional y demás variables que afectan el crecimiento de las

poblaciones. Es importante aclarar que no se debe iniciar una cría masiva sin antes tener las instalaciones adecuadas, lo que, para el caso de artrópodos en invernaderos, se refiere a la infraestructura adecuada para evitar contaminaciones cruzadas, tanto desde el exterior del invernadero como dentro de este. Así, la delimitación de espacios de cría de presas-hospederos y depredadores-parasitoides evitará que se contaminen. Se recomienda que las crías se encuentren en módulos de invernaderos separados, que cada módulo cuente con mínimo malla antitrips y que en cada uno existan las áreas mencionadas en la sección “Infraestructura interior de los invernaderos”, del presente capítulo (figura 68).

Etapas 4. Transferencia de tecnología al usuario: en esta etapa se informa al usuario sobre los beneficios de la adopción de la estrategia de manejo de plagas, aunque no debe ser la última, ya que, antes de iniciar la cría masiva, se deben realizar estudios de mercado para identificar las demandas del sector de interés. Esta transferencia se puede realizar de distintas formas, desde programas de vinculación de tecnología hasta tecnologías de la información y las comunicaciones (TIC). De esta etapa depende la continuidad de la estrategia de control biológico desarrollada.

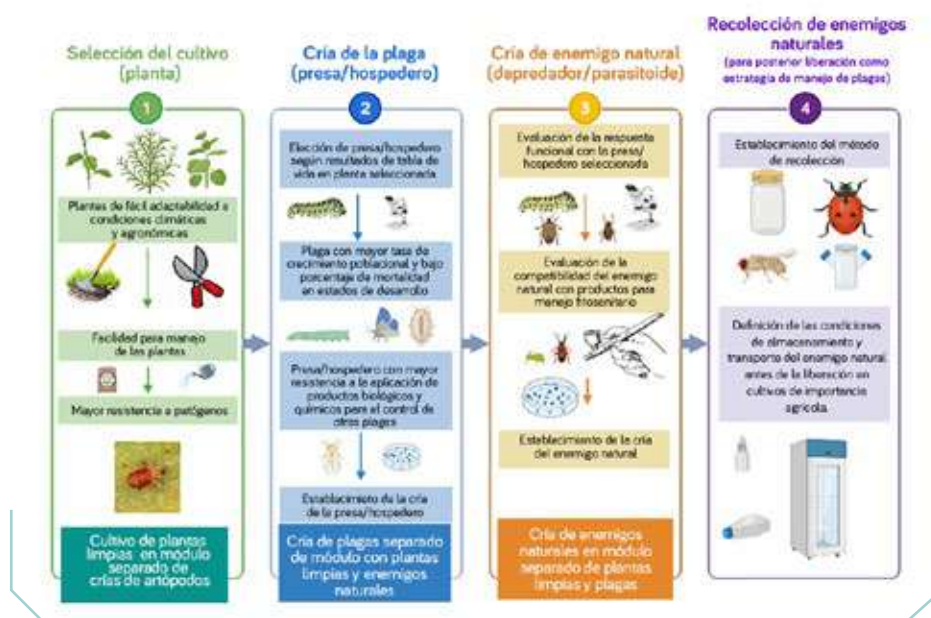


Figura 68. Pasos básicos para la producción de artrópodos en invernadero.

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se presentan los pasos básicos que se proponen para el mantenimiento de artrópodos bajo invernadero.

En Colombia, y especialmente en el trópico alto, se han realizado estudios para estandarizar las crías de plagas y los enemigos naturales en invernadero, los cuales han sido insumo fundamental para el suministro de artrópodos requeridos para la investigación y generación de estrategias de manejo en varios sistemas productivos, entre los que se destacan los cultivos de tomate y flores bajo cubierta.

Algunos casos de estudio de crías de plagas y de enemigos naturales en cultivos de tomate bajo invernadero son los siguientes:

- Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*): desde hace varios años se han publicado estudios en los que se definen parámetros para la cría de *T. vaporariorum* en invernadero, así como para la de su controlador biológico, el parasitoide *Encarsia formosa*. Dentro de estos estudios se ha encontrado que las tasas de consumo de *T. vaporariorum* no solo dependen del hospedante, sino también de las condiciones ambientales (Suárez et al., 2015), y que, por lo tanto, influyen en la producción de *E. formosa* en invernadero (Díaz et al., 2019; Díaz et al., 2011).

Además, se han estandarizado crías de parasitoides, como *Amitus fuscipennis*, que, al liberarse en conjunto con *E. formosa* en cultivos de tomate en invernadero, generan un mayor efecto para el manejo de *T. vaporariorum* (De Vis et al., 1999; De Vis et al., 2002).

- Cogollero del tomate (*Tuta absoluta*): la cría de este insecto se ha realizado principalmente en invernadero sobre plantas de tomate, y se han estimado desde los parámetros poblacionales de este microlepidoptero (Pérez-Marulanda & Giraldo-Sánchez, 2020) hasta las condiciones de la cría bajo invernadero (Bajonero et al., 2008; Morales et al., 2013) y las condiciones de almacenamiento (Morales-Perdomo et al., 2018) de su parasitoide, *Apanteles gelechiidivoris*, así como el potencial para el manejo de este con el uso en conjunto de feromonas sexuales para control de *T. absoluta* (Morales et al., 2014), entre otros enemigos naturales (Desneux et al., 2021).

A continuación, se presentan algunas de las crías que se realizan en invernadero para el control de ácaros plaga en cultivos de flores.

En Colombia, desde hace varias décadas, se han realizado estudios para generar estrategias de manejo de ácaros como *Tetranychus urticae*, el cual

genera importantes pérdidas económicas para la exportación de flores. Por esta razón, se han publicado trabajos que implementan crías tanto del ácaro plaga como de ácaros depredadores, y que van desde la simulación de parámetros para cría (Rodríguez et al., 2006; Bustos et al., 2009) hasta la optimización del proceso de producción de *T. urticae* sobre planta de frijol (como hospedero alternativo) (Bustos et al., 2016), así como sobre los criterios para la cría del ácaro depredador *Phytoseiulus persimilis* en invernadero (Daza et al., 2010).

Experiencias en el desarrollo de bioensayos para la evaluación de microorganismos entomopatógenos

El control biológico es una estrategia de manejo que consiste en la regulación de poblaciones de plantas y animales por enemigos naturales (agentes de mortalidad biótica) que normalmente se encuentran en el ambiente. Dentro de los enemigos naturales se pueden encontrar insectos, ácaros, arañas, hongos, virus, bacterias, nematodos, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, entre otros grupos que reducen las plagas (Parra, 2013).

Específicamente, para el control de plagas en cultivos de importancia económica, se utilizan métodos etológicos y culturales; aplicación de bioinsumos con ingredientes activos a base de hongos, bacterias y virus, así como liberaciones de artrópodos (parasitoides y depredadores). La evaluación de estas estrategias de manejo integrado de plagas inicia, normalmente, con la ejecución de bioensayos en laboratorio en los que se seleccionan los más eficaces controladores de plagas, y con la determinación de la compatibilidad con otras estrategias de manejo. Después de los ensayos en condiciones controladas (laboratorio), se procede a validar los resultados en condiciones semicontroladas de invernadero, momento en el que es crucial contar con un diseño experimental que permita obtener resultados que puedan ser validados luego en cultivos comerciales (Baron et al., 2019; Cotes et al., 2018), como se mencionó en las primeras partes de este capítulo.

Un bioensayo puede ser utilizado para determinar y cuantificar las relaciones huésped-patógeno y el efecto de los parámetros bióticos y abióticos. Los bioensayos con microorganismos entomopatógenos se han utilizado ampliamente en cinco componentes: i) determinación de la virulencia, ii) comparación de la virulencia entre los diferentes microorganismos de interés, iii) determinación y establecimiento del rango de huéspedes (plaga), iv) determinación del potencial de uso y v) estudios sobre los efectos de factores bióticos y abióticos, como el estadio del insecto plaga, la planta, la temperatura,

la humedad y la formulación-bioinsumo a evaluar (Torres-Torres et al., 2020). Debido a esto, la actividad biológica mediante un bioensayo se convierte en una herramienta de importancia para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas.

Teniendo en cuenta lo descrito, este apartado se enfocará en describir de manera práctica los requerimientos y la experiencia en el diseño y ejecución de bioensayos para estimar y cuantificar el desempeño del microorganismo biocontrolador en condiciones de invernadero, información que sirve para predecir el comportamiento en campo.

Hay diferentes pruebas disponibles para la evaluación de la actividad biológica, sin embargo, no existen métodos estandarizados y específicos para cada tipo de microorganismo e insecto plaga (Torres-Torres et al., 2020). En los bioensayos diseñados para predecir el desempeño del microorganismo biocontrolador contra el insecto plaga en condiciones de invernadero, se deben tener en cuenta los parámetros ambientales pertinentes (p. ej., temperatura, fotoperiodo), las condiciones de aplicación (aspersión o goteo), entre otros factores.

Existen lineamientos básicos para el desarrollo de bioensayos, los cuales se describen a continuación (Brownbridge & Buitenhuis, 2017; Navon & Ascher, 2000; Santos Díaz et al., 2022; Torres-Torres et al., 2020):

1. Todos los bioensayos deben incluir un control *sin tratamiento* para monitorear y cuantificar la supervivencia de los insectos en las condiciones establecidas en el bioensayo.
2. La selección del tamaño de la muestra y la concentración de dosis depende del sistema patógeno-huésped a evaluar. Por ejemplo, Gulzar et al. (2021) establecieron, al evaluar hongos entomopatógenos contra trips, que los factores con mayor influencia en la precisión del ensayo fueron el tamaño de la muestra y la posibilidad de realizarlo a través del tiempo.
3. Selección adecuada del método de inoculación: en condiciones de invernadero, es posible realizar la inoculación del entomopatógeno de diferentes formas, siendo las más utilizadas la aspersión, el espolvoreo y la inoculación directa en suelo o en hoja. Como recomendación, es importante determinar la viabilidad del entomopatógeno antes de realizar el bioensayo (Santos Díaz et al., 2022), con el fin de garantizar la eficacia del microorganismo.

4. Se recomienda que la mortalidad se cuantifique a través del tiempo del montaje del bioensayo, no solo al final. Este tiempo de incubación o de seguimiento depende de los tipos de insecto y de entomopatógeno que se estén evaluando.
5. Es necesario tener en cuenta que, en bioensayos en donde se requiera inocular el suelo con los diferentes estadios del insecto, se deben considerar las características químicas, físicas y microbiológicas del suelo (textura, humedad, indicadores biológicos, entre otros).
6. Para insectos que presenten el estadio de ninfas, como opción de inoculación se utiliza la contaminación de la superficie de las hojas de la planta.
7. Para todos los bioensayos realizados en condiciones de invernadero, se recomienda realizar la verificación de síntomas en condiciones de laboratorio. Para ello, se pueden muestrear de forma aleatoria insectos con sintomatología y verificar en laboratorio el microorganismo.

En Colombia, se han desarrollado diversos trabajos (artículos, tesis, participación en congresos) en los que se evalúan microorganismos entomopatógenos contra insectos plaga en condiciones de invernadero. A continuación, se describe un ejemplo de bioensayo en el que se aplican las recomendaciones anteriormente descritas.

Modelo hongo biocontrolador-insecto plaga

La mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae) es una plaga que tiene gran impacto en la agricultura actual, debido a su amplia distribución, la gran cantidad de plantas hospederas y el número de cultivos que afecta. Para su control, se han desarrollado varias estrategias que se enfocan en el uso de hongos entomopatógenos, como *Akanthomyces lecanii* (anteriormente *Lecanicillium lecanii*) y *Beauveria bassiana* (De Barro et al., 2011; Sani et al., 2020). Uno de los bioensayos más utilizados es el descrito en varios trabajos del Grupo de Control Biológico de Plagas Agrícolas de AGROSAVIA, el cual consiste en evaluar la actividad biológica de cepas de hongos de interés y de bioplaguicidas sobre ninfas en segundo instar de *Trialeurodes vaporariorum*, mantenidas en la planta hospedera de frijol en condiciones de invernadero. En general, se evalúan tres tratamientos: testigo absoluto, muestra a evaluar y control relativo (agua). Como variable de respuesta se determina el porcentaje de eficacia mediante la mortalidad. A continuación, se describe la metodología.

Se siembran semillas de fríjol de la variedad ICA-Calima en materas con capacidad de dos kilogramos de suelo. Una vez la planta emerge y tiene mínimo dos trifolios formados, se realiza la infestación con adultos de *T. vaporariorum*. Para esto, se ubican 30 insectos dentro una jaula pinza dispuesta en cada foliolo (figura 69) y, transcurridas 48 horas, se lleva a cabo la desinfestación, mediante la recolección de los adultos por medio de un aspirador bucal. Una vez se evidencian las ninfas de segundo instar, se hace el conteo en cada foliolo. Posteriormente, se aplican los tratamientos a evaluar mediante aspersiones sobre el envés del foliolo. Se realiza el seguimiento del bioensayo cada tres días, hasta alcanzar el cuarto instar o hasta evidenciar exuvias en el testigo absoluto. Finalmente, se hace el conteo de los insectos vivos y muertos sobre cada foliolo y se calcula la eficacia (Espinel, Lozano et al., 2008; Espinel, Torres et al., 2008; Espinel et al., 2009; Cotes et al., 2009; Santos-Díaz et al., 2022).

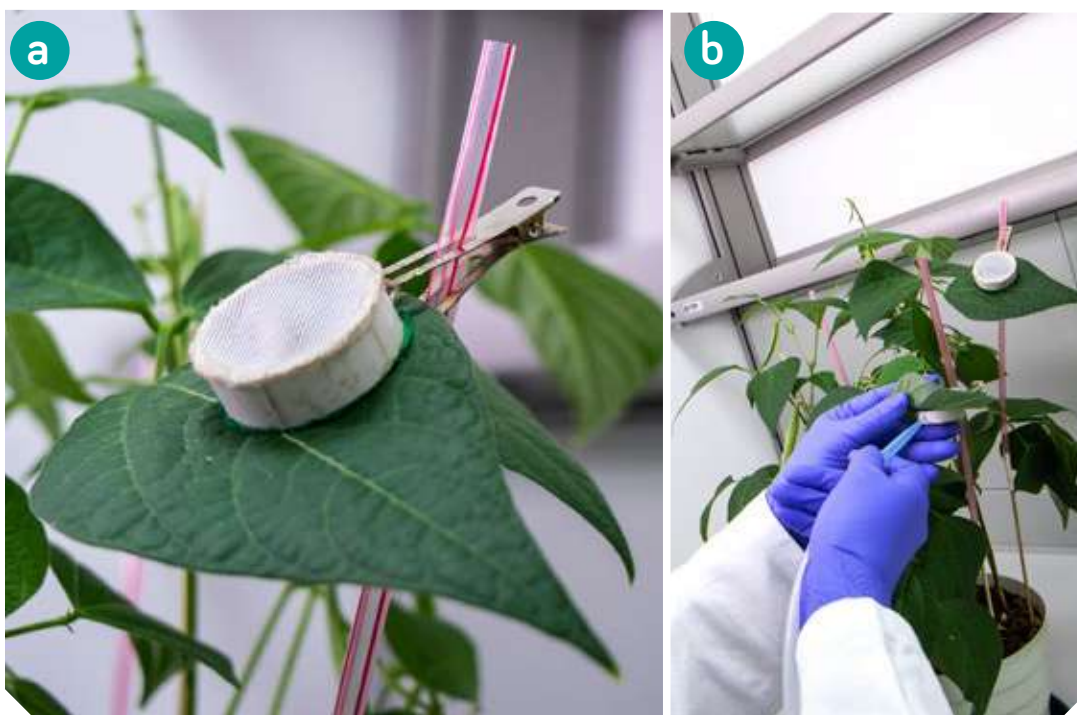


Figura 69. Bioensayo *in vivo*. a. Jaula pinza en hoja de fríjol utilizada para bioensayo con *T. vaporariorum*. b. Proceso de aspiración para remoción de insectos de *T. vaporariorum*.

Fotos: Mónica Páramo

Conclusiones

Los espacios en invernadero son fundamentales para el desarrollo exitoso de bioensayos aplicados a la evaluación de artrópodos plaga. La validez de los resultados de estos bioensayos para la producción o cría de artrópodos depende del diseño y uso adecuado del invernadero, así como de la ejecución, el análisis y la interpretación correcta de los resultados.

La utilización de invernaderos en investigación con artrópodos permite generar información que puede usarse para predecir o estimar comportamientos en condiciones de campo. Por esta razón, el diseño y las buenas prácticas en invernaderos deben mejorarse constantemente para proporcionar una mayor precisión y validez en dicha información. La inclusión de equipos de monitoreo de condiciones ambientales permite el diseño de metodologías para crías de artrópodos y de bioensayos acordes a la realidad y a las necesidades actuales.

En este capítulo se han proporcionado algunos parámetros que se consideran importantes y que se deben tener en cuenta para el desarrollo y ejecución de un bioensayo con artrópodos de interés agrícola. También se brindaron varios ejemplos de crías de artrópodos y de bioensayos para ilustrar algunos métodos que se han utilizado con una variedad de especies de interés. Se espera que esta información estimule y facilite el uso de invernaderos bajo conceptos de buenas prácticas, que incluyan el uso adecuado de la infraestructura, para obtener resultados válidos por medio del diseño de experimentos adecuados.

Referencias

- Baeza, E. J., Pérez-Parra, J. J., López, J. C., & Montero, J. I. (2006). CFD study of the natural ventilation performance of a parral type greenhouse with different numbers of spans and roof vent configurations. *Acta Horticulturae*, 719(719), 333-340. https://www.actahort.org/books/719/719_37.htm
- Baille, A., González-Real, M. M., López, J. C., Cabrera, J., & Pérez-Parra, J. (2002). Characterization of the solar diffuse component under "Parral" plastic greenhouses. *Acta Horticulturae*, 614(614), 341-346. https://www.actahort.org/books/614/614_51.htm
- Bajonero, J., Córdoba, N., Cantor, F., Rodríguez, D., & Cure, J. R. (2008). Biology and life cycle of *Apanteles gelechiidivoris* (Hymenoptera: Braconidae) parasitoid of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agronomía Colombiana*, 26(3), 417-426.
- Baron, N. C., Rigobelo, E. C., & Zied, D. C. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(June), 307-315. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307>

- Brownbridge, M., & Buitenhuis, R. (2017). Integration of microbial biopesticides in greenhouse floriculture: the Canadian experience. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 4-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.013>
- Bustos, A., Cantor, F., Cure, J. R., & Rodríguez, D. (2009). Standardization of a rearing procedure of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on Bean (*Phaseolus vulgaris*): plant age and harvest time. *Neotropical Entomology*, 38, 653-659.
- Bustos, A., Rodríguez, D., Cure, J. R., & Cantor, F. (2016). A simulation model of the mass rearing of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on beans. *Neotropical Entomology*, 45(3), 291-299.
- Choab, N., Allouhi, A., El Maakoul, A., Kousksou, T., Saadeddine, S., & Jamil, A. (2019). Review on greenhouse microclimate and application: design parameters, thermal modeling and simulation, climate controlling technologies. *Solar Energy*, 191, 109-137.
- Cotes, A. M., Villamizar, L., Espinel, C., García, J., Jiménez, L., Garzón, I., & López-Ávila, A. (2009). Bioplaguicida con base en *Lecanicillium lecani* para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. *Innovación y Cambio Tecnológico*, 4, 17-23.
- Cotes, A. M., Fargetton, X., & Köhl, J. (2018). Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores. En A. Cotes (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (vol. 2). AGROSAVIA.
- Daza, M., Cantor, F., Rodríguez, D., Bustos, A., & Cure, J. R. (2010). Criteria for the production of *Phytoseiulus persimilis* (Parasitiformes: Phytoseiidae) under greenhouse conditions. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 37-46.
- De Barro, P. J., Liu, S.-S., Boykin, L. M., & Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56, 1-19.
- Desneux, N., Han, P., Mansour, R., Arnó, J., Brévault, T., Campos, M. R., ... & Biondi, A. (2021). Integrated pest management of *Tuta absoluta*: practical implementations across different world regions. *Journal of Pest Science*, 95, 1-23.
- Đević, M., & Dimitrijević, A. (2008). Energy consumption for different greenhouses' structures. *Journal of Agricultural Sciences*, 53(1), 71-78.
- De Vis, R., Fuentes, L. E., & Van Lenteren, J. C. (1999). Development of biological control of *Trialeurodes vaporariorum* with *Encarsia formosa* and *Amitus fuscipennis* on greenhouse tomato in Colombia. *IOBC-WPRS Bulletin*, 22, 267-270.
- De Vis, R., Fuentes, L. E., & Van Lenteren, J. C. (2002). Life history of *Amitus fuscipennis* (Hym., Platygastridae) as parasitoid of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae) on tomato as function of temperature. *Journal of Applied Entomology*, 126(1), 24-33.
- Díaz, A. (2008). *Buenas prácticas agrícolas: guía de pequeños y medianos agroempresarios*. IICA.
- Díaz-Tapias, M. A. D., Rincón, F. C., & Caicedo, D. R. (2011). Análisis estadístico de la producción de un biocontrolador de la mosca blanca en plantas de frijol bajo invernadero. *Comunicaciones en Estadística*, 4(2), 95-107.

- Díaz, M. A., Rodríguez, D., & Cantor, F. (2019). A scouting method for estimating insect populations in an *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) mass rearing system. *Neotropical Entomology*, 48(3), 476-483.
- Espinel, C., Torres, L., Grijalba, E., Villamizar, L., Cotes, A. (2008). Preformulados para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 22-27.
- Espinel, C., Lozano, M. D., Villamizar, L., Grijalba, E., & Cotes, A. M. (2008). Estrategia MIP para el control de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en melón y tomate. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 163-168.
- Espinel, C., Torres, L., & Cotes, A. M. (2009). Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35, 18-21.
- Forcella, F., Buhler, D. D., & McGiffen, M. E. (2018). Pest management and crop residues. En J. L. Hatfield (Ed.), *Crops residue management* (pp. 173-190). CRC Press.
- Gulzar, S., Wakil, W., & Shapiro-ilan, D. I. (2021). Potential use of entomopathogenic nematodes against the soil dwelling stages of onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman: laboratory, greenhouse and field trials. *Biological Control*, 161, 104677. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104677>
- Gupta, V. K., Parsad, R., Bhar, L. M., & Mandal, B. N. (2008). *Statistical analysis of agricultural experiments. Part I: single factor experiments*. ICAR-Indian Agricultural Statistics Research Institute.
- Hartung, J., Wagener, J., Ruser, R., & Piepho, H. P. (2019). Blocking and re-arrangement of pots in greenhouse experiments: which approach is more effective? *Plant Methods*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0527-4>
- Kittas, C., Katsoulas, N., Bartzanas, T., Mermier, M., & Boulard, T. (2008). The impact of insect screens and ventilation openings on the greenhouse microclimate. *Transactions of the ASABE*, 51(6), 2151-2165.
- Li, G., Tang, L., Zhang, X., Dong, J., & Xiao, M. (2018). Factors affecting greenhouse microclimate and its regulating techniques: a review. En *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 167(1), p. 012019. IOP Publishing.
- Lin, D., Zhang, L., & Xia, X. (2020). Hierarchical model predictive control of Venlo-type greenhouse climate for improving energy efficiency and reducing operating cost. *Journal of Cleaner Production*, 264, 121513.
- Marín Rodríguez, C., & García Mendoza, P. (2019). El diseño de experimentos en la investigación agrícola. *Tayacaja*, 1(2), 64-81. <https://doi.org/10.46908/rict.v1i2.28>
- Navon, A., & Ascher, K. (Eds.). (2000). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. CAB International.
- Martínez, L. D. O. (2014). Uso y manejo de plaguicidas en invernaderos de la región norte del estado de Puebla, México. *Acta Universitaria. Multidisciplinary Scientific Journal*, 24(3), 3-12.

- Morales, J., Rodríguez, D., & Cantor, F. (2013). Estandarización de la cría masiva de *Apanteles gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) para el control de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9(1), 20-37.
- Morales, J., Muñoz, L., Rodríguez, D., & Cantor, F. (2014). Acción combinada de feromona sexual y de avispa *Apanteles gelechiidivoris* para el control de *Tuta absoluta* en cultivos de tomate bajo invernadero. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 175-184.
- Morales-Perdomo, J. A., Rodríguez-Caicedo, D., & Cantor-Rincón, F. (2018). Effect of different temperatures and cold storage on pupae of *Apanteles gelechiidivoris* (Hymenoptera: Braconidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 44(2), 217-222.
- Murrell, E. G. (2017). Can agricultural practices that mitigate or improve crop resilience to climate change also manage crop pests? *Current Opinion in Insect Science*, 23, 81-88.
- Parra, J. P., Baeza, E., Montero, J. I., & Bailey, B. J. (2004). Natural ventilation of parral greenhouses. *Biosystems Engineering*, 87(3), 355-366.
- Parra, J. R. P. (2013). *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. Universidade de São Paulo.
- Pérez-Marulanda, J. A., & Giraldo-Sánchez, C. E. (2020). Parámetros poblacionales de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) y pérdidas asociadas en tomate de invernadero. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1025-1038.
- Rodríguez, A. A., Uscátegui, N. P., Díaz, L. T., Rincón, F. C., Rodríguez, A. B., & Caicedo, D. R. (2006). Evaluación de un método a campo abierto para la producción de *Tetranychus urticae*-Koch (Acari: Tetranychidae), como suministro de presas para *Phytoseiulus persimilis*-Athias. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 2(1), 117-122.
- Román-Roldán, N. I., López-Ortiz, A., Ituna-Yudonago, J. F., García-Valladares, O., & Pilatowsky-Figueroa, I. (2019). Computational fluid dynamics analysis of heat transfer in a greenhouse solar dryer "chapel-type" coupled to an air solar heating system. *Energy Science & Engineering*, 7(4), 1123-1139.
- Sani, I., Ismail, S. I., Abdullah, S., Jalinas, J., Jamian, S., & Saad, N. (2020). A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. *Insects*, 11(9), 619. <https://doi.org/10.3390/insects11090619>.
- Santos Díaz, A. M., Grijalba Bernal, E. P., Torres Torres, L., & Uribe Gutiérrez, L. A. (2022). *Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad*. AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7405125>
- Senhaji, A., Mouqallid, M., & Majdoubi, H. (2019). CFD assisted study of multi-chapels greenhouse vents openings effect on inside airflow circulation and microclimate patterns. *Open Journal of Fluid Dynamics*, 9(2), 119-139.
- Shipp, J. L., Zhang, Y., Hunt, D. W. A., & Ferguson, G. (2003). Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. *Environmental Entomology*, 32(5), 1154-1163.

- Somoza, A., Vázquez, P., & Zulaica, L. (2019). Implementación de buenas prácticas agrícolas para la gestión ambiental rural. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 44(7000), 398-423.
- Stapleton, J. J. (2000). Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19(8-10), 837-841.
- Surekha, K., Padma Kumari, A. P., Narayana Reddy, M., Satyanarayana, K., & Sta Cruz, P. C. (2003). Crop residue management to sustain soil fertility and irrigated rice yields. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 67(2), 145-154
- Suárez González, L. F., Díaz Tapias, M. A., Rodríguez Caicedo, D., & Cantor Rincón, F. (2015). Indirect measurement of the rate of consumption of adult and immature of *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) on common bean. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3), 99-109.
- Teitel, M. (2007). The effect of screened openings on greenhouse microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology*, 143(3-4), 159-175.
- Torres-Torres, L., Espinel-Correal, C., & Santos-Díaz, A. M. (2020). Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(2), e7678.
- Trapero-Casas, A., Escobar, R. F., & J. Domínguez. (2015). *Experimentación en agricultura*. Junta de Andalucía-Consejería de Agricultura y Pesca.
- Villagrán, E. A., & Bojacá, C. R. (2019). Determination of the thermal behavior of a Colombian hanging greenhouse applying CFD simulation. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 28(3), 1-10.
- Yu, G., Zhang, S., Li, S., Zhang, M., Benli, H., & Wang, Y. (2022). Numerical investigation for effects of natural light and ventilation on 3D tomato body heat distribution in a venlo greenhouse. *Information Processing in Agriculture*, 9(3), 343-474.