

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Tratamiento Combinado a Base de Esporas y Cristales de *Bacillus thuringiensis* en
la Mortalidad de *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus
officinalis* L. “espárrago verde”**

MAYRA LIZETH VARGAS GIL

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Asesor: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú

2019

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Tratamiento Combinado a Base de Esporas y Cristales de *Bacillus thuringiensis* en
la Mortalidad de *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus
officinalis* L. “espárrago verde”**

MAYRA LIZETH VARGAS GIL

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Asesor: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú

2019

Dedicatoria

A mis padres, Hermenegildo Vargas Horna y Margarita Práxides Gil Limas, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron incondicionalmente. Papas gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto se lo debo a ustedes, los amo.

A mi hermano, David Mitchel Vargas Gil y a mi cuñada Evelyn Verónica Sencia Osco, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi enamorado, Gilmer Joel Agreda Cortéz, por apoyarme y recordarme todos los días que debo concluir este proyecto.

Y a todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto, pero saben que los quiero.

Agradecimiento

Agradezco a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.

A mi Alma Mater, la Universidad Ricardo Palma, por haberme otorgado lo mejor en enseñanza, docentes excelentes y calidad educativa.

A mi asesor de tesis, Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña por la paciencia de guiarme para realizar y concluir esta investigación.

Al Ing. Alberto Giovanni Victoria Iparraguirre y al Mg. Orlando Tipismana Neyra, por ayudarme en los cuadros estadísticos.

A los jefes encargados de los diferentes fundos pertenecientes al departamento de Ica, el señor Jesús Bardales Bernal “Fundo Chapi” y al señor Jack Chumpitaz Diego “Fundo San Jorge”, quienes me permitieron el ingreso a sus respectivos fundos y me facilitaron el apoyo de sus trabajadores para la recolección de los *Heliolithis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparragus officinalis* L. “espárrago verde”.

Al Dr. Abad Flores Paucarima quien lidera el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por proporcionar las variedades de bioinsecticidas comerciales de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*.

A todos que de una u otra manera me apoyaron, brindaron las facilidades y conocimientos necesarios para realizar esta investigación

Índice	
Contenido	Página
Carátula	I
Contraportada	III
Página de mérito académico	IV
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Resumen	X
Abstract	XI
Índice	
1. Introducción	1
1.1. Problema del Problema	3
1.1.1. Formulación del Problema	4
1.2. Justificación de la investigación	5
1.3. Objetivo	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos Específicos	5
2. Marco Teórico	6
2.1. Características del espárrago verde (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	6
2.2. Uso de Bioinsecticidas en el espárrago verde (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	6
2.3. <i>Heliothis virescens</i> F. (gusano perforador) y su respuesta ante los Bioinsecticidas.	9
2.4. El papel de la Biopotencia y los <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	12
2.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>	12
2.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Aizawai</i>	13
3. Antecedentes	13
4. Hipótesis	15
5. Materiales y Métodos	16
5.1. Lugar de Ejecución	16
5.2. Tipo y Diseño de la Investigación	16
5.2.1. Tipo de estudio	16
5.2.2. Diseño del estudio	16
5.3. Variables	17
5.4. Operación de la Variable	17
5.5. Muestreo	17
5.5.1. Población	17
5.5.2. Muestra	18
5.5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión	18
5.6. Procedimiento	19
5.6.1. Material Biológico	19
5.6.2. Recolección de <i>Heliothis virescens</i>	19
5.6.3. Acondicionamiento de las larvas en el laboratorio	20
5.6.4. Preparación del tratamiento combinación a base de esporas y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
5.6.5. Alimentación	22
5.7. Análisis de Datos	22
5.8. Aspectos éticos	23
6. Resultados	24

6.1. Análisis descriptivo de los datos de <i>Heliothis virescens</i> F “gusano perforador” frente a los tratamientos a base de esporas y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	24
6.2. Análisis inferencial de los datos	25
7. Discusión	32
8. Conclusiones	34
9. Recomendaciones	35
10. Referencias Bibliográficas	36
11. Anexos	39

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla.01.	Proceso de análisis de los datos.	23
Tabla.02.	Porcentaje de la tasa de mortalidad del <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”, según intervalo de tiempo.	25
Tabla.03.	Tiempo medio de supervivencia de <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”, a los diferentes tipos de tratamientos.	28
Tabla.04.	Medias de tiempo de supervivencia de Kaplan Meier, a la exposición de <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” frente a los diferentes tratamientos.	29
Tabla.05.	Prueba de Log Rank (Mantel-Cox), para determinar la significancia de los cuatro diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	30

ÍNDICE DE GRÁFICOS		Página
Figura N°01.	Heliothis virescens F en su forma larvar alimentándose del interior de la corteza del Asparagus officinalis L “espárrago verde” y su forma adulta	9
Figura N°02.	Recolección del <i>Heliothis virescens</i> F. “gusanos perforadores” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”	20
Figura N°03.	Distribución de los <i>Heliothis virescens</i> F. “gusanos perforadores” depositadas en contenedores de plástico transparente, los cuales fueron adaptados previamente con tul fino en las tapas para facilitar la ventilación	20
Figura N°04.	Botellas de plástico rociadoras transparentes, que contienen los diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , tanto de manera individual y combinada.	21
Figura N°05.	Gusano perforador <i>Heliothis virescens</i> F., alimentándose de turiones del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”	22
Figura N°06.	Mortalidad del <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”, según intervalo de tiempo de 0 a 72 horas.	26
Figura N°07.	Tiempo mínimo de exposición en el cual los tratamientos a base de esporas y cristales surgen efecto al <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”.	27
Figura N° 08.	Supervivencia de la media del <i>Heliothis virescens</i> F. “gusano perforador” del <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago verde”, frente a los diferentes tratamientos.	31

Resumen

Bajo el enfoque de la **Biopotencia**, se determinó el efecto del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var., *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* sobre el *Heliothis virescens* F “gusano perforador”. El ensayo experimental se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, para los cuatro tratamientos se utilizó 80 gusanos distribuidos en 8 contenedores de plásticos los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, los tres primeros tratamientos los cuales consistieron en *Bacillus thuringiensis* var., *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* fueron de manera individual, mientras que el cuarto tratamiento es la combinación de las tres variedades. El tiempo de exposición para los cuatro tratamientos fueron de 0 - 72 horas, en el transcurso de ese periodo de tiempo se observó que la tasa de mortalidad del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki + Israelensis + Aizawai) fue de un 95%, mientras que para los tratamientos individuales fue de 40% para *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* y 60% *Bacillus thuringiensis* var., *Aizawai* y *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Se utilizó el estadístico Kaplan Meier con su prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para demostrar que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* y que estos, si ejercen un efecto inhibitorio en la supervivencia de los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores”, debido a que su nivel de significación es de 0.028 el cual es menor a 0.05, (p-valor $0,028 < 0.05$).

Palabras Claves: *Bacillus thuringiensis*, gusano perforador, espárrago verde.

Abstract

Under the **Biopower** approach, the effect of the combined treatment based on spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var., Aizawai, *Bacillus thuringiensis* var israelensis, *Bacillus thuringiensis* var kurstaki on *Heliothis virescens* F "worm driller" was determined. The experimental test was carried out in the laboratory of the Faculty of Biological Sciences of the Ricardo Palma University. For the four treatments, 80 worms distributed in 8 plastic containers were used, which were subjected to different treatments based on spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*, the first three treatments, which consisted of *Bacillus thuringiensis* var., Aizawai, *Bacillus thuringiensis* var israelensis, *Bacillus thuringiensis* var kurstaki were individually, while the fourth treatment is the combination of the three varieties. The exposure time for the four treatments was 0 - 72 hours, in that period of time, it was observed that the mortality rate of the combined treatment based on spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki + Israelensis + Aizawai) was 95%. %, while for individual treatments it was 40% for *Bacillus thuringiensis* var kurstaki and 60% *Bacillus thuringiensis* var., Aizawai and *Bacillus thuringiensis* var israelensis. Se utilizó el estadístico Kaplan Meier con su prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para demostrar que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* y que estos, si ejercen un efecto inhibitorio en la supervivencia de los *Heliothis virescens* F. "gusanos perforadores", debido a que su nivel de significación es de 0.028 el cual es menor a 0.05, (p-valor 0,028 < 0.05).

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, borer worm, green asparagus.

1. Introducción

Hasta fines del siglo pasado, no se conocía la producción de insecticida de origen microbiano para combatir plagas de insectos de valor médico y veterinario, pero a partir del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (1913, citado por Jenkins R, 1999), que ha sido considerado el agente de control biológico más exitoso del mundo; demostrando ser sumamente efectivo para el control de plagas de importancia agrícola y médico-veterinario, principalmente en insectos del orden Coleóptera, Díptera y Lepidóptera. Su uso ha permitido disminuir considerablemente la aplicación de insecticidas químicos en los ecosistemas naturales, siendo la razón de su éxito, la gran efectividad y selectividad contra plagas y su baja residualidad que impide o retrasa la aparición de resistencia (Sauka DH, & Benintende GB, 2008).

La agricultura orgánica y los aspectos éticos, se orienta a proporcionar un medio ambiente limpio y balanceado, potenciar la capacidad productiva y fertilidad natural de los suelos, optimizar el reciclaje de los nutrientes, el control natural de plagas y enfermedades donde los agroquímicos sintéticos, todos tóxicos en mayor o menor grado, son excluidos definitivamente (Fait, et al, 2004). Por ello, es preciso promover e implementar las técnicas y prácticas de la agricultura orgánica en beneficio de la salud humana, animal, y protección del ambiente en general.

La oferta mundial del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde” ha llegado a ser de 421 000 mil toneladas métricas por año, de las cuales el 80% provinieron de Europa y América, principalmente de España, Francia, Italia y EE.UU.; en el resto del mundo, ha sobresalido Taiwán en Asia, Australia y Nueva Zelandia en Oceanía y algunos países de Sudáfrica, por lo que su crecimiento a nivel mundial se ha incrementado alrededor del 8% durante los últimos 10 años, pasando de 4.5 millones de toneladas en el año 2000 a 6.67 millones al año 2005 (Agrobanco, 2007).

Los espárragos son considerados un artículo de lujo en los países consumidores. Alrededor del 65% del total de la demanda de Europa corresponde al *Asparagus officinalis* L “espárrago verde”, que es más sabroso, menos fibroso, se aprovecha más y es más barato, en relación al espárrago blanco. Algunos países de Sur y Centro América, principalmente, México, Colombia, Ecuador, Chile, Perú, Guatemala y Costa Rica, han desarrollado la producción, lo que ha permitido aumentar la demanda del espárrago verde en estado fresco (Agrobanco, 2007).

En el 2018 las exportaciones peruanas de espárragos (frescos, en conserva y congelado) ascendieron a 169.807.000 kilos, mostrando un crecimiento de 15% respecto a los 147.708.000 kilos despachados el 2017 (Agraria.pe, 2019). En la actualidad el Perú es el primer país exportador

de espárragos del mundo, habiendo logrado desplazar a importantes países productores como China y Estados Unidos, y ser reconocido mundialmente por la calidad de su producto.

El principal mercado destino del espárrago fresco procedente de Perú fue Estados Unidos, quien adquirió dicho producto por US\$ 227.360.000, representando el 60.6% del total. Le siguen Países Bajos con US\$ 41.165.000, Reino Unido con US\$ 40.975.000, España con US\$ 28.705.000, entre otros. (Agraria.pe, 2019)

La situación fitosanitaria del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde” en el verano del 2001, era realmente crítica pues las plagas y sus daños eran abrumadores; entre las plagas principales estaban la mosquilla de los brotes, *Prodiplosis longifila* y la mosca blanca, *Bemisia argentifolii*; los gusanos del follaje, *Spodoptera ochrea* y *Pseudoplusia includens*, y el gusano perforador *Heliothis virescens*.

Se han dado casos que, para controlar estas plagas se han hecho grandes usos excesivos de insecticidas, teniendo como ejemplo a la mosquilla del brote, en donde los productores emplean dos aplicaciones de metamidofos para proteger el primer brote de espárrago y de dos a cinco aplicaciones adicionales para el segundo brote. En dicho caso los productores observaron que dicha plaga desarrollaba resistencia al insecticida utilizado, teniendo como consecuencia la necesidad de usar dosis mayores y aplicaciones más frecuentes. En total, los productores empleaban alrededor de USA\$ 1,200.00/ha/año para combatir las plagas. Con los riesgos de que quedaran residuos de insecticidas, inaceptables por los países importadores.

El espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.) al ser aceptado en mayor demanda en el mercado nacional e internacional; los estándares internacionales, exigen que el tratamiento del cultivo sea con productos orgánicos; por tal motivo, según las Normas sanitaria, establece Límites Máximos de Residuos de plaguicidas de uso agrícola para alimentos de consumo humano (Anexo 1); por lo que, se hace necesario investigar en qué medida, el uso de este bioinsecticida como el *Bacillus thuringiensis* impacta en el control del *Heliothis virescens* F “gusano perforador”, asegurando con ello, que la calidad e inocuidad del producto cumpla con esos estándares internacionales para su exportación (NOS USDA, OGM, citado por Vásquez Q., W, 2014).

Por las razones mencionadas anteriormente esta investigación se orientó a evaluar el tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* en la mortalidad de *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”. El objetivo central del estudio fue determinar la eficacia del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai, *Bacillus thuringiensis* var. Israelensis y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki, en la mortalidad del *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L “esparrago verde”.

1.1. Planteamiento del Problema

A nivel mundial la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos aumento desde los inicios del siglo XX, debido al desarrollo de la industria petrolera. Además, la producción y uso de estos compuestos, así como de lubricantes, solventes, gasolinas u otros, han aumentado la carga de estas sustancias en la atmósfera, hidrósfera, suelos y sedimentos, lo que ha provocado episodios críticos de contaminación en el ambiente (Galán-Huertos et al., 2003). El uso agrícola de plaguicidas es un subconjunto del espectro más amplio de productos químicos industriales utilizados en la sociedad moderna.

Estos plaguicidas que son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas (FAO, 2003). Sin embargo, se reconoce que son sustancias químicamente complejas, que una vez aplicadas en el ambiente, están sujetas a una serie de transformaciones a nivel físico, químico y biológico (fenómenos de adsorción y absorción sobre suelos y plantas). Además, que también pueden ser arrastrados por las corrientes de aire y agua que permiten su transporte a grandes distancias y por ende afectar a los trabajadores agrícolas los cuales utilizan dichos insecticidas químicos ocasionándoles problemas respiratorios, trastornos de memoria, enfermedades de la piel depresión, abortos, cáncer y enfermedades neurológicas tales como Enfermedad de Parkinson. (López-Geta et al., 1992). A su vez la ingesta de sustancias químicas a través de los alimentos es sumamente perjudicial para la salud humana produciendo intoxicaciones agudas como náuseas, dolores abdominales, diarrea, mareos, ansiedad y confusión, efectos que pueden llegar a ser graves pero que suelen ser reversibles.

Para el control de estas plagas se hacía los usos excesivos de insecticidas, especialmente el uso de metamidofos, el cual es un plaguicida prohibido por ser nocivo para la salud humana y el medio ambiente, este insecticida es utilizado para proteger el primer brote del espárrago y de dos a cinco aplicaciones adicionales para el segundo brote. El gran problema es la resistencia debido a que se requiere dosis mayores y aplicaciones más frecuentes de insecticidas, generando grandes costos, alrededor de USA\$ 1,200.00/ha/año para combatir plagas con los consiguientes riesgos que se generaba en el ecosistema.

En lo particular el gusano perforador *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lep: Noctuidae). Esa es una especie distribuida ampliamente en América Latina, ataca a diversos cultivos perforando tallos y frutos. En espárragos, perfora tallos y come frutos, pero también roe la corteza de la

planta como otro noctuidos del follaje. Es evidente, que las necesidades de utilizar estrategias de control no resultaban óptimas, teniendo en cuenta las consideraciones de desarrollar cultivos orgánicos exigidos por el mercado internacional. Ante esta disyuntiva, se plantea la necesidad de usar Bioinsecticidas.

De acuerdo a las regulaciones internacionales, la necesidad de una mayor demanda de productos orgánicos es mayor por lo que el control biológico se hace un rasgo esencial de las exportaciones.

Por tanto, se ha demostrado que el uso de bacterias esporógenas es muy importante en el control de mosquitos vectores debido al alto grado de actividad letal que presenta; una de ellas es el *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria gram positiva produce toxinas altamente específicas contra insectos. Al esporular produce cristales paraesporales formados por la glicoproteína delta-endotoxina y que causa parálisis del epitelio intestinal, ruptura de las microvellosidades, cambios en las organelos citoplasmáticos y, finalmente, la muerte de la larva. Los productos que contienen *Bacillus thuringiensis* (Bt) son notablemente seguros, hasta ahora no se han registrado efectos dañinos en ensayos de seguridad con abejas, vertebrados y humanos, además de que el Bt es un larvicida eficaz y muy seguro para los trabajadores de salud, así como los moradores y animales domésticos.

Desde esa perspectiva biológica es que el incremento de la agricultura orgánica y los aspectos éticos se orienta a proporcionar un medio ambiente limpio y balanceado, que permita potenciar la capacidad productiva y fertilidad natural de los suelos; optimizar el reciclaje de los nutrientes, el control natural de las plagas y enfermedades donde los agroquímicos sintéticos (todos tóxicos) en mayor o menor grado, son excluidos definitivamente. Esta necesidad de excluirlos, requiere de promover e implementar técnicas y prácticas de la agricultura orgánica en beneficio del ecosistema, la salud humana, animal y la protección general del sistema ecológico que rodea al hombre y los cultivos en general.

Y, considerando que el cultivo del espárrago representa una alternativa no tradicional de producción con fines de exportación y, de acuerdo con los resultados de la oferta mundial se considera esencial desarrollar estudios que evidencien que el uso de estos tipos de Bioinsecticidas son una garantía de calidad e inocuidad del producto que se desea exportar.

1.1.1. Formulación del Problema

¿Cuál es la eficacia del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai; *Bacillus thuringiensis* var. Israelensis y *Bacillus thuringiensis*

var. *Kurstaki* sobre el *Heliothis virescens* F (gusano perforador) del *Asparagus officinalis* L (espárrago verde.)?

1.2. Justificación de la Investigación

El diseño de tecnología biológica que conserve la propiedad productiva del ecosistema para el desarrollo de cultivos orgánicos altamente beneficioso para la salud humana, es una de las alternativas que surge de la demostración palpable de la ciencia por encontrar estrategias cada vez más sólidas que aseguren la calidad de las cosechas y pueda ésta ser puesta a disposición del consumo humano con preservación de la integridad de su salud. Además, esta tecnología, está marcada por un mercado globalizado que exige estándares de calidad e inocuidad para este fin.

El uso de metodologías apropiadas para la demostración de la efectividad de los Bioinsecticidas está demostrado en los laboratorios que especialmente se han diseñado con ese fin. Basado en métodos y técnicas experimentales, para el presente estudio se utilizó cuatro tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, tres de manera individual y una de manera combinada) para demostrar la efectividad del tratamiento combina sobre el *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L “espárrago verde”, buscando así nuevas maneras de reducir el uso de insecticidas químicos perjudiciales para la salud y el ambiente.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar la eficacia del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, en la mortalidad del *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L “espárrago verde”.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer la eficacia en la mortalidad y supervivencia del *Heliothis virescens* F, por la acción de las esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*, *Bacillus*

thuringiensis var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, **según el tiempo de exposición.**

- Determinar el nivel de significación de la eficacia en la mortalidad y supervivencia del *Heliothis virescens* F. por la acción de las esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, **según el tiempo de exposición**

2. Marco Teórico

2.1. Características del espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.)

El espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.) es una hortaliza de la familia de las Liliáceas (*Liliaceae*), originaria de la flora de las regiones de la cuenca del Mediterráneo. En sí, es una planta vivaz con una vida de seis y ocho años y está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea constituida por raíces yemas, que es lo que comúnmente se le denomina “garra” o “zarpa”. Es de tipo perenne que se utiliza para consumo humano, el brote o tallo tierno por lo general es denominado “turión”. Este tallo puede ser verde o blanco; ambos productos se distinguen según su calidad, frescura, inocuidad y abastecimiento (Shimizu, 2008, citado por León Castillo J.V. 2011) esta característica agronómica motiva que su comercialización se presenta en conserva, congelado y fresco.

Su potencial alimenticio, es de contenido calórico bajo, rico en carbohidratos y fibra, cantidades significativas de vitamina A y Riboflavina, bajo en grasa, colesterol y tener un nivel aceptable de Vitamina C, se le considera un alimento “Gourmet”.

Por otro lado, al ser el espárrago es una verdura altamente perecible; los turiones son partes vivientes de la planta, en los cuales los procesos metabólicos naturales continúan después de la cosecha por lo que se puede observar que el crecimiento continúa después del corte, lo mismo que el proceso de lignificación o enfibramiento. (Gardé Adrián A. 2010). (Anexo 1)

2.2. Uso de Bioinsecticidas en el espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.)

Los peligros de los plaguicidas, no sólo comprometen al organismo nocivo, sino que también su uso indiscriminado afecta el entorno de otros organismos como en particular al ser humano. Estos peligros, en las persona puede generar serias intoxicaciones sean estas agudas o crónicas

y se asume que el riesgo de que al consumir este tipo de producto por sus residuos químicos que alberga la planta, generaría serios daños, también pueden contaminarse por otras vías como en el consumo de otros productos del suelo o el subsuelo, como las aguas superficiales, además de crear serias resistencias de los insectos a aquellos insecticidas que son usados para exterminar o controlar las plagas existentes (Rölling and van de Fliert, 1998).

Por otro lado, el uso indiscriminado de los plaguicidas de amplio espectro trae como consecuencia una reducción, que en algunos casos es eliminación de las poblaciones de insectos benéficos. Por todos los riesgos mencionado, se hace necesario romper con el esquema convencional de controlar las plagas basándose solamente en el control químico, utilizando exclusivamente insecticidas y, reemplazarlo con un manejo holístico, que nace del reconocimiento de que los cultivos crezcan como parte del agroecosistema. En síntesis, es posible aportar al control de las plagas manejando bien el agroecosistema (Cañedo V, Alfaro A, Kroschel J. 2011).

Entre las plagas más significativas que se relaciona con el espárrago es el escarabajo, sin control de este insecto, el escarabajo puede dañar gravemente al producto en poco tiempo.

Vega Ravello R. (2013) destaca que, entre los más frecuentes en nuestro contexto, el gusano de tierra comprende varias especies del orden de los Lepidópteros, familia Noctuidae como *Feltia spp*, *Agrotis spp* y *Prodenia spp*. Las larvas o gusanos miden hasta 4-5 cm de largo, tienen un cuerpo cilíndrico y pueden ser de color gris, marrón plumizo o negro con algunas manchas oscuras. Durante el día permanecen enterrados en el suelo al pie de la planta y se caracterizan porque al ser recogidos se doblan en forma de rosca. Son muy activos durante la noche donde causan los mayores daños. A nivel de plántulas en el almacigo cortan los tallos tiernos. En campos de cosecha muerden los turiones antes de su emergencia causando deformaciones y en ataques severos se obtienen turiones con orificios redondos y grandes. En campos ya instalados su daño puede controlarse aplicando cebos tóxicos al suelo o base de afrecho (100 Kg), melaza (4 galones) mezclado con Dipterex (300 gr).

Entre otras plagas importantes se encuentran la Cantora o Cantadora (*Diceriprocta spp.*) cuya larva se ancla a las raíces de la planta de espárrago o se desarrolla hasta emerger del suelo en la muda de adulto, aun cuando se ha determinado que ser eficazmente combatida con procedimientos químicos, es más importante considerar la aplicación de protección biológica debido a que se evita disminuir las poblaciones nativas de especies benéficas en los campos de producción de espárrago (Flor J.A, 2011).

Los hongos entomopatógenos son una gran posibilidad y aquí la recomendación de uso frecuente es utilizar hongos como *Breuveria bassiana* o *Metharizum spp.* Por otra parte, y debido a que el efecto indirecto es *Fusarium spp.* Como patógeno destructor de la corona, la recomendación para el uso de productos biológicos está por demás justificado, se evita en estos casos el uso químico para combatirlo sin afectar a las especies protectoras nativas como *Cordyceps spp.*

Desde la perspectiva del control de las plagas y enfermedades, la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio refiere la necesidad de una regulación atmosférica y climática, el ciclo hidrológico y el mantenimiento de la calidad del agua, a la regulación de la erosión y al mantenimiento de la calidad del suelo y el control de pestes y enfermedades (Roberts *et al.*, 2012, citado por Gómez-Flores, 2015).

En este sentido el control de contaminantes químicos y, en particular, de los agroquímicos que se recomiendan según los límites máximos de residuos (LMR). (Anexo 2)

En Perú, el control biológico (controles de pestes utilizando especies benéficas) y la posesión de reservorios o embalse son importantes dentro del control de los servicios ecosistémicos, usando un riego tecnificado, la aplicación de insecticidas biológicos (pesticidas de origen natural derivados de plantas, minerales, bacterias o animales (Environmental Protection Agency, EPA y Gómez-Flores, 2015), en este mismo apartado Gómez-Flores en la que por necesidad de mantener los estándares internacionales de control de calidad para la exportación, uso exclusivo o combinado, de control biológico y la venta al exterior son claves. La exigencias de los estándares mínimos de calidad, la estricta evaluación sanitaria de los productos y el rechazo hacia los pesticidas, vinculado a la creciente preferencia por productos orgánicos, fuerzan a desarrollar mejores estrategias para el uso de Bioinsecticidas que no generan impactos nocivos al ecosistema donde se desarrollan las siembras del espárrago verde, demostrándose que el uso de controles biológicos, a ser una práctica importante para los agricultores, permitirá realizar una adecuada exportación y aceptación en el mercado internacional (López-Flores, 2015).

En concordancia en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) hay dos elementos claves que se deben enfatizar. Es que, en el MIP, se debe realizarse en forma armoniosa con las leyes de la naturaleza siendo la base primordial, especialmente en los trópicos, la biodiversidad local. En los trópicos y subtropicos tenemos que aprovechar, como parte estratégica del MIP, el control biológico natural y el uso de la diversidad funcional (Cañedo, Alfaro y Kroschel, 2011).

2.3. *Heliothis virescens* F. (gusano perforador) y su respuesta ante los Bioinsecticidas.

El gusano perforador *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lep. Noctuidae) en su forma adulta son polillas tienen una envergadura que va desde 2.5 a 3.5 cm de color pajizo con tres franjas transversales paralelas en las alas anteriores. Las larvas varían de color desde verde claro hasta casi negro con franjas dorsales y laterales, más claras o más oscuras. Sobre el dorso presenta tubérculos setíferos oscuros característicos (Cisneros Fausto, 2007).

El ciclo de desarrollo siguiendo los diferentes estadios: huevecillo (2-5 días), seguido por las larvas (14-30 días), que son las responsables por el daño a las plantas, y que pasan por 5 a 6 estadios y alcanzan 4 a 5 cm en su máximo desarrollo hasta alcanzar el estado de pupas (10-18 días) (Serrano Miguel, 2015), en altas temperaturas y presencia de flores favorecen el incremento del *Heliothis virescens* F. Las hembras ponen sus huevos en forma aislada de preferencia en flores y tejido tierno. Tiene numerosos enemigos naturales. Los huevos son parasitados por especies de *Trichogramma*. Las larvas son parasitadas por avispas de las familias *Ichneumonidae* y *Braconidae*.



Figura N°01. *Heliothis virescens* F en su forma larvar alimentándose del interior de la corteza del *Asparagus officinalis* L “esparrago verde” y su forma adulta.

Como se puede observar en la Figura N°01, la evolución del *Heliothis virescens* F., implica una actuación clara y precisa para su control, por lo que toda hortaliza al constituirse en una de las principales alimentos de la población mundial en su dieta, resulta esencial su control contra estas plagas de nematodos fitoparásitos, que en muchos casos es causa fundamental de

las pérdidas de las cosechas. (León Sánchez M, Samaniego Fernández LM, Rodríguez Barrera RC. 2006).

Este combate con los fitonematodos no es una tarea fácil y se torna particularmente difícil en la agricultura alternativa. En muchos países las experiencias con organismos biocontroladores, han demostrado su efectividad en la reducción de población de *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919); (Chitwood, 1999) entre lo que destaca la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner. (Márquez *et al.* 2004).

Las preparaciones de las esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* se han utilizado durante aproximadamente 60 años para el control de insectos perjudiciales para el cultivo de las plantas y los bosques y, también, para el control de insectos vectores de enfermedades. Hasta el año 2002, formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* eran disponibles en el mercado brasileño (Azevedo, Barros y Serafini, 2002, citado por da Silva M, Furigo Junio A, Furland SA, Souza O. 2011).

El aumento de la demanda de los bioproductos en comparación con los productos químicos es debido a sus ventajas. Azevedo *et al.*, (2002), menciona que algunos de estas ventajas están en: la producción a través de bioprocesos, uso de los mismos equipos utilizados para la aplicación de insecticidas químicos, inocuidad a mamíferos y otros vertebrados, y el amplio espectro de acción combinada y su alta especificidad. (Polanczyk 2004), entre las principales limitaciones de los bioproductos son la competencia con los productos químicos y la falta de inversión de los sectores públicos y privado en el desarrollo y formulaciones de los bioproductos.

Sin embargo, en temas de tratamiento del gusano perforador del espárrago, la 8-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* es letal, principalmente para las larvas de insectos lepidópteros y coleópteros. Su modo de acción es a nivel intestinal provocando la lisis de las células epiteliales. Esta toxina es una proteína que consta de tres dominios estructurales que podrían tener un rol diferente en el mecanismo de acción molecular. Las proteínas al ser digeridas con tripsina, y aunque resultan ligeramente propensas a proteólisis se obtienen fragmentos proteicos del tamaño esperado para las toxinas activas. Con las toxinas activas y purificadas, se han realizado bioensayos con larvas neonatas de lepidóptero como el gusano falso medidor "*Trichoplusia ni*"; dando como resultado que al reemplazar el dominio I no sería capaz de alterar la actividad insecticida en las toxinas quiméricas, lo que descarta su participación en la especificidad de las toxinas (Damas Buenrostro, 1998).

Damas Buenrostro (1998), concluye que la sustitución del dominio II o III alteró notablemente la actividad biológica de las quimeras, lo que demuestra que ambos dominios están

involucrados en la especificidad. Estos resultados permiten proponer un modelo para el mecanismo de acción a nivel molecular, donde el dominio I participa exclusivamente en la toxicidad mientras que los dominios II y III son, en conjunto, responsables de la especificidad.

También Vázquez-Pineda A, *et al.* (2012) arguye que la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* produce cristales proteicos con actividad citotóxica en contra de insectos y nematodos. La toxicidad de *B. thuringiensis* en plagas agrícolas es ampliamente conocida, pero poco se conoce acerca de su actividad en contra de nematodos parásitos. Por ejemplo, recientemente, la actividad nematicida de las proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* se demostró en parásitos de mamíferos como *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Nippostrongylus*, y *Ancylostoma* y en nematodos de plantas, *Globodera* y *Meloidogyne*. Entre el grupo de *B. thuringiensis* con efecto nematicida, las proteínas de la cepa IB-16 han mostrado actividad letal de 50 a 100% en contra de diferentes estadios del principal género de rumiantes, *Haemonchus contortus*. Asimismo, los géneros de nematodos de vida libre, *Panagrellus redivivus* y *Caenorhabditis elegans* han sido blanco de estudios de la acción nematicida de *Bacillus thuringiensis*.

Por ejemplo, el efecto tóxico de la proteína *Cry5B* de *Bacillus thuringiensis* se observó en las células intestinales de *C. elegans*, además esta acción parece involucrar receptores celulares específicos, similares a los que se han notificado en contra de plagas agrícolas. También, la unión de la proteína *Cry5B* ocurre en receptores específicos, como moléculas de carbohidratos, las cuales están presentes en la membrana de las células de intestino de los nematodos, ocasionando daño y muerte. A través de este tipo de estudio, los derivados de *Bacillus thuringiensis* podrían considerarse una alternativa de control de nematodos que afectan los animales domésticos, como rumiantes, así como en contra de otros nematodos patógenos de mamíferos e incluso de plantas agrícolas.

2.4. El papel de la Biopotencia y los *Bacillus thuringiensis*

El manejo integrado de las plagas, en hortalizas de impacto global, evidencian la gran importancia que tienen los Bioinsecticidas en este proceso de sembrío, cosecha y postcosecha para la exportación del espárrago en general y, en lo particular, en el *Heliothis virescens* (gusano perforador) *Asparagus officinales L.* (espárrago verde).

Al ser los *Bacillus thuringiensis* una bacteria común en muchas regiones del mundo, consideramos que su uso en el Manejo de Integrado de Plagas (MIP), implica no sólo controlar

la relación insectos-objetivo, mediante un agente con base biológica, también, implica el control del ecosistema, o la conservación de su equilibrio (Anexo 3).

Por último, algunas especies de plagas son difíciles de controlar solamente con la toxina. Las esporas de *Bacillus thuringiensis* al germinar proporcionan un mecanismo de control adicional. Se explica este proceso de la siguiente manera:

- Las esporas germinan en el intestino medio y se dispersan por todo el cuerpo causando finalmente septicemia y muerte.
- Mortalidad adicional (efecto sinérgico) es particularmente evidente en larvas de gusano soldado, las cuales pueden ser difíciles de controlar con toxinas.
- Productos con esporas viables, poseen una clara ventaja sobre los que no contienen esporas.

2.5. *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*

Es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970, lo que constituye un hito en la historia del uso de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* como larvicida, ya que fue la responsable de que los productos a base de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* puedan competir con los insecticidas químicos en términos de eficiencia. Esta cepa resultó ser hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros que las otras cepas utilizadas en los productos de aquella época (Sauka Diego, 2008).

2.6. *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*

Bacillus thuringiensis var. *israelensis*, es altamente específico para larvas de culícidos y simúlidos vectores de enfermedades endémicas como el dengue, la fiebre amarilla, la malaria y la oncocercosis. La alta especificidad de esta bacteria garantiza la integridad de la fauna de los criaderos, lo cual no siempre sucede con la aplicación de insecticidas químicos (Delgado Neira, 2005).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* fue aislado por primera vez por Goldberg y Margalit (1977), pero fue de Barjac (1978) quien reconoció que esta bacteria gram-positiva durante su esporulación se producen cristales proteicos constituidos por δ -endotoxinas (Margalit 1989).

La bacteria, al estar suspendida en el agua es ingerida por la larva durante el proceso de alimentación, por lo que la eficacia o el efecto letal de la toxina bacterial sobre la larva dependerá básicamente de la cantidad de toxina ingerida en un tiempo determinado (World Health Organization, 1989)

2.7. *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai

Constituido por cristales de diversas endotoxinas y esporas *Bacillus thuringiensis* var Aizawai, resulta efectiva sobre *Autographa gamma* (gusano gris), *Earias insulana* (oruga espinosa del algodón), *Eupoecilia ambiguella* (polilla de racimo), *Helicoverpa armígera* (oruga verde del tomate) y otros Lepidópteros en cultivos de algodón, arroz, hortalizas del genero brassica, horticolas, olivo, pimiento, esparrago, tomate resultando prácticamente inocuo para el resto de la entomofauna, dando mejores resultados cuando se aplica sobre los primeros estadios larvarios.

3. Antecedentes

Sarmiento y Rázuri (1978) estudiaron los efectos de *Bacillus thuringiensis* sobre *Spodoptera frugiperda*, en comparación con los insecticidas tradicionales usados, Carbaryl y Thrichlorfon, a partir de los meses de verano a invierno de 1978 en el valle de Huaral. Considerando el porcentaje de plantas infestadas, el *B. thuringiensis* tuvo un relativo control sobre *Spodoptera frugiperda*, siendo superado por el Thrichlorfon, más no por el Carbaryl. Asimismo, se discuten los resultados sobre enemigos naturales y rendimiento.

Flores (2000) evaluó el efecto de la variedad de maíz sobre el desarrollo y la susceptibilidad de larvas de *S. frugiperda* a la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner), variedad Kenyae, serotipo 007. En total se evaluaron 13 variedades, 6 criollos y 7 híbridos; se encontró que cuando las larvas se alimentaron con hojas de los criollos Uruapeño y Grano ancho, los valores de CL50 de *B. thuringiensis* fueron 0,087 y 0,097 mg/mL, respectivamente y cuando las larvas fueron alimentadas con los criollos Grano Rojo, Grano pinto, Tampiqueño olote delgado y Grano negro, los valores de CL50 oscilaron entre 0,101 y 0,180 mg/mL. Cuando las larvas se alimentaron con follaje de los híbridos V-526, P-3288 y P-3086, los valores de CL50 de Bt fueron 0.072, 0,073 y 0,095 mg/mL respectivamente; con los híbridos B-810, Ceres 7, H-910 y amarillo forrajero, los valores de CL50 encontrados fluctuaron entre 0.109, 0,181 mg/mL.

Malo et al., (2001) desarrollaron un nuevo bioinsecticida basado en una cepa autóctona de la bacteria *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki*, eficaz para combatir orugas de lepidópteros plagas. Ese formulado ha de tener unas determinadas características físico-químicas y de estabilidad, que permitan una buena aplicación en campo y una composición, que aumente su eficacia al protegerlo de la degradación por la luz ultravioleta y al aumentar su atracción para las larvas de los insectos diana a los que va dirigido.

Hernández Soto (2002) preparó una colección de cepa de Bt con potencial para el combate de *H. hampei*. La hipótesis de este trabajo se basa en la premisa de que al realizar aislamientos de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras ambientales donde se presenta la interacción *Bacillus thuringiensis-Hypothenemus hampei*, existe una mayor probabilidad de aislar cepas efectivas para este insecto.

O'Brien y Díaz (2004) reconocieron la importancia de la normalización del espárrago para el desarrollo de la competitividad de las empresas y el aumento de la eficiencia y la transparencia en el mercado. Las Normas Técnicas Peruana del Espárrago son establecidas por el Comité Técnico de Normalización del Espárrago, en un marco de consenso y transparencia, con la participación de todos los actores de la cadena, elementos que establecen las bases para la aplicación voluntaria de las mismas. En este contexto, las Normas de Codex Alimentarius juegan un rol importante, toda vez que explícitamente se reconoce el papel que desempeñan en el plano internacional constituyendo el principal referente en la elaboración de las normas alimentarias. Por lo que, este estudio propuso mejorar el liderazgo de empresarios agrarios para asegurar la productividad, calidad y rentabilidad, así como a establecer mecanismos de concertación para la identificación y la solución de los principales problemas que afectan la exportación del espárrago y como respuesta a la demanda de los mercados internacionales por la calidad misma del producto y las nuevas tendencias en el mercado internacional del uso de alimentos saludables.

Ruiz de Escudero et al. (2004) determinaron la diversidad de los aislados de *B. thuringiensis* procedentes de suelos de las Islas Canarias e identificaron cepas que produzca proteínas Cry distintas a las conocidas. Para ello analizaron 306 muestras de tierra que fueron recogidas en distintos puntos de las islas del archipiélago Canario. De estas muestras obtuvieron un total de 684 nuevos aislado. Las proteínas del cristal paraesporal de los distintos aislados fueron analizadas en SDS-PAGE definiéndose el perfil proteico característico de cada uno de ellos.

Sauka & Beninende (2008) integraron diferentes progresos recientes sobre el estudio del *Bacillus thuringiensis* en un contexto de control biológico de insectos lepidópteros de importancia agrícola. Se establece que el *Bacillus thuringiensis* es el insecticida biológico más aplicado en el

mundo y se utiliza para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal y que transmiten patógenos humanos y animales. El *B. thuringiensis* constituyó en las últimas décadas un tema de investigación intensiva. Estos esfuerzos brindaron datos importantes sobre las relaciones entre la estructura, el mecanismo de acción y la genética de sus proteínas cristalinas pesticidas y una visión más clara y coherente sobre estas relaciones que han emergido gracias a ellos. También se concluye que, en otros estudios se han centrado en el rol ecológico de las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*, su funcionamiento en sistemas agrícolas y en otros sistemas naturales, además de destacar que el desarrollo de toxinas más útiles, bacterias recombinantes, formulaciones nuevas y plantas transgénicas que expresan actividad pesticida, son necesarios ser analizados para asegurar la eficacia y efectividad del producto.

Carrera Cabezas (2009) realizó la curva y crecimiento de los bioformulados líquidos de *Bacillus thuringiensis* del aislamiento de Alausí y Chambo presentan tres fases: fase de crecimiento hasta las 40 horas, la fase estacionaria presenta una concentración constante hasta las 160 horas y la fase de muerte a las 624 horas.

Flores et al. (2011) aislaron y caracterizaron fenotípica y molecularmente cepas de *B. thuringiensis* de interés biotecnológico en suelo agrícolas peruanos y evaluar su potencial entomotóxico para la producción de insecticidas biológicos.

Vásquez, Luisa et al (2018) pretendieron incentivar el estudio de las parasporinas en Colombia, país considerado megadiverso, a través del aislamiento y estudio de cepas nativas de Bt. Describen las principales características de las parasporinas a la fecha identificadas, la actividad citotóxica que han presentado frente a algunas líneas celulares de cáncer y el aislamiento de cepas nativas de Bt productoras de toxinas PS.

4. Hipótesis

El tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai, *Bacillus thuringiensis* var. Israelensis y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki; es más efectivo, por el tiempo de exposición empleado para la eliminación del *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “esparrago verde”

5. Materiales y Métodos

5.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología y genética molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicada en la Av. Benavides 5440, Urb. Las Gardenias en el distrito de Santiago de Surco, en la ciudad de Lima, Perú a unos 12° 08' 01.72" S y 76°58' 49.15" O.

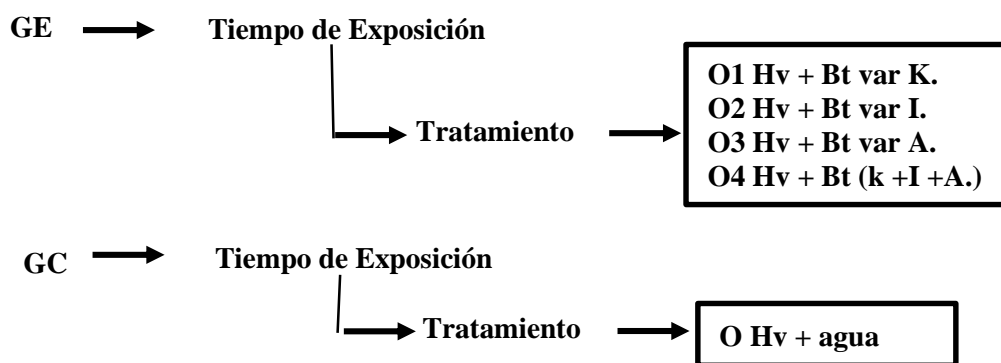
5.2. Tipo y Diseño de la Investigación

5.2.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo, según el tiempo de exposición del gusano perforador (*Heliothis virescens* F) del espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.) al tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai, *Bacillus thuringiensis* var. Israelensis y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki.

5.2.2. Diseño del estudio

Sera de diseño experimental monofactorial con cuatro tipos de concentraciones de *Bacillus thuringiensis* a base de esporas y cristales.



De donde: GE = Grupo Experimental

GC = Grupo Control

O = Observación

Hv = *Heliothis virescens* F

El ensayo fue replicado en dos oportunidades, obteniendo si el promedio para realizar esta investigación.

5.3. Variables

- Tiempo de exposición de las esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Heliothis virescens F*
- Efectividad de los cuatro diferentes tratamientos

5.4. Operación de la Variable

Variables	Indicadores	Valor Final	Tipo de Variable
Tiempo	Mortalidad Supervivencia	horas	Cuantitativa continua
Tratamientos	Mortalidad Supervivencia	Muerte de los <i>Heliothis virescens F</i> / cumplimiento del ciclo biológico del <i>Heliothis virescens F</i>	Cuantitativa discreta

5.5. Muestreo

5.5.1. Población

La población estuvo constituida por 100 larvas, obtenidas del Fundo Agrícola “Chapi” con el apoyo del Jefe de Cultivo Jesús Bardales Bernal y el jefe del Cultivo del Fundo “San Jorge el Sr. Jack Chumpitaz Diego, a partir del apoyo brindada se aseguró la obtención de esta población delimitada de *Heliothis virescens F*. “gusanos perforadores” del *Asparagus officinalis L.* “espárrago verde”.

N = 100

5.5.2. Muestra

La muestra fue de 100 larvas de *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” de las cuales se dividieron en cinco grupos de 20 larvas cada uno.

Tratamiento	Grupo Exp.
Control (Agua)	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Israelensis	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Aizawai	20
Combinación de las tres variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (K+I+A)	20
Total	n= 100

5.5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión

El procedimiento de asignación de los gusanos se realizó por criterio.

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
<ul style="list-style-type: none">▪ Gusanos que se alimentaban debidamente de las hojas y turiones del <i>Asparragus officinalis</i> L▪ Gusanos que mantuvieron su movilidad en condiciones óptimas	<ul style="list-style-type: none">▪ Se excluyeron todos los gusanos que no se alimentaban de las hojas y turiones de <i>Asparragus officinalis</i> L▪ Se excluyeron a todos los gusanos que evidenciaban deterioro en su motilidad.

5.6. Procedimiento

5.6.1. Material biológico

Para la presente investigación se utilizó tres soluciones formuladas a 10^{21} UFC/286ml a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* proporcionadas por el Dr. Abad Flores Paucarima quien lidera el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de San Marcos.

La primera recolección del *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde” se realizó en el mes de Enero del 2016 en el fundo Agrícola Chapi ubicado en Manuel Santana Chiri 135 del departamento de Ica – Perú. Y la segunda recolección se realizó en el mes de Marzo del 2016 en el fundo San Jorge ubicado en Cachiche S/N del departamento de Ica – Perú.

5.6.2. Recolección *Heliothis virescens*

La muestra fue recolectada gracias al apoyo del jefe de cultivo Jesús Bardales Bernal del fundo Agrícola Chapi y al jefe de cultivo Jack Chumpitaz Diego del fundo San Jorge quienes proporcionaron el apoyo de sus trabajadores para la recolección de los gusanos perforadores.

Para la recolección de los gusanos perforadores el equipo de apoyo realizo el método de sacudida del follaje, en floración del espárrago.

Durante la recolección se observó que las larvas de *Heliothis virescens* no podían ser almacenadas en contenedores de plástico, debido a que estos se calentaban por las altas temperaturas de las zonas ocasionándoles la muerte y al almacenarlos en recipientes pequeños, los gusanos realizan canibalismo. Por tal motivo se optó en almacenar los gusanos perforadores en contenedores de ternopol, con el follaje y frutos de espárrago necesarios para su alimentación, reduciendo así la muerte de los ejemplares y la reducción del canibalismo teniendo así un total de 100 gusanos perforadores en los dos viajes realizados.



Figura 02: Recolección del *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”

5.6.3. Acondicionamiento de las larvas en el laboratorio

Una vez en el laboratorio las larvas *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores”, fueron separados en grupo de 10 y por tamaños (\leq a 20 mm y $>$ a 20 mm) con el fin de evitar problemas de competencia y el canibalismo como lo recomienda (Hussien Amal, 2012).

Las larvas fueron depositadas en contenedores de plástico transparente, de 13 cm de largo, 15.2 cm de ancho y 5.2 cm de alto, se cortó 7 cm en el centro de la tapa a la cual se le colocó un tul fino para facilitar la ventilación.

Al iniciar con el experimento se anotaron las condiciones ambientales como, por ejemplo, la humedad que estaba a 53%, la temperatura que en el transcurso de la mañana se encontraba a 26°C, mientras que en las noches la temperatura descendía a 20°C, los datos fueron brindados por la página web de SENAMHI – Perú.



Figura 03: Distribución de los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” depositadas en contenedores de plástico transparente, los cuales fueron adaptados previamente con tul fino en las tapas para facilitar la ventilación

5.6.4. Preparación del tratamiento combinación a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*

El Dr. Abad Flores Paucarina proporcionó tres frascos de soluciones stocks puras de 286 ml de las tres variedades de *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki, Israelensis y Aizawai), cada uno de los frascos contenían una concentración bacteriana de Bt a 10^{21} UFC las cuales estaban resuspendidas en caldo nutritivo de la marca MERCK. La preservación de las soluciones stocks fue a 4 °C hasta su respectivo uso.

Para la preparación de las concentraciones del bioinsecticida de base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, se mezcló 33.33 ml de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki, 33.33 ml de *Bacillus thuringiensis* var. Israelensis y 33.33 ml de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai, la mezcla fue colocada en una botella rociadora de plástico transparente, teniendo así una concentración de 1.2^{20} UFC/33ml de cada una de las variedades de Bt en la respectiva mezcla.

Para las concentraciones individuales, se usó directamente de la solución stock a base de esporas y cristales de *Bacillus Thuringiensis*, los cuales fueron colocados en botellas rociadoras de plástico cada uno.

Se debe tener en cuenta que por cada *Bacillus thuringiensis* produce una espora y por ende un solo cristal.



Figura 04: Botellas de plástico rociadoras transparentes, que contienen los diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, tanto de manera individual y combinada.

5.6.5. Alimentación

La alimentación de las larvas fue realizada diariamente con follajes y turiones de espárrago los cuales fueron recolectados en los diferentes fundos (Agrícola Chapi y San Jorge). El follaje y los turiones una vez colocado en el interior de los recipientes de plástico transparente fueron roseados, mediante la técnica de aspersión simulando la técnica utilizada in situ, con los diferentes bioinsecticida a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, tanto de manera individual y combinada, además los respectivos controles fueron roseados con agua de grifo.

La limpieza de los recipientes de plástico transparente se realizó diariamente eliminando los desechos y cambiando el papel absorbente con la finalidad evitar la acumulación de bacterias y crecimiento de hongos.

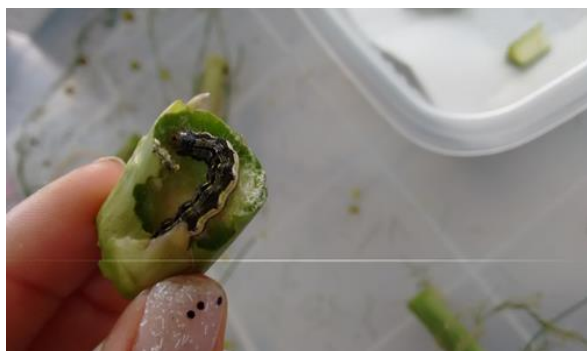


Figura 05: Gusano perforador *Heliothis virescens* F., alimentándose de turiones del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”.

5.7. Análisis de Datos

El análisis estadístico se llevará a cabo utilizando el programa SPSS v.23 Windows 2010 con un alto grado de confiabilidad. El estadístico de Kaplan-Meier con la prueba de Log Rank (Mantel-Cox), el cual evaluara si hay diferencias entre las curvas de supervivencia, si la significación de los cuatro tratamientos es < 0.005 . y la gráfica de Supervivencia precisaran y compararan los porcentajes de supervivencia, que confirma la mortalidad y significativa de los datos obtenidos.

Los instrumentos estadísticos empleados son:

Tabla N° 01. Proceso de análisis de los datos

Estadístico	Característica	Objeto de su Uso	Logro Obtenido
Tabla de Frecuencia	En una Hoja Excel se colocaron los datos de las concentraciones y sus respectivos sujetos de estudio	Controlar los tiempos medios a través de la exposición de las larvas en la solución	Contabilizar la tasa de mortalidad en cada ensayo
Gráfico de Barra	Describir el comportamiento de las larvas a la exposición según los tiempos.	Verificar su evolución a través de los ensayos el efecto del Bioinsecticida	Analizar las diferencias de mortalidad en ambos ensayos
Kaplan-Meier	Prueba de Log Rank (Mantel-Cox)	Evaluar si hay diferencias entre las curvas de supervivencia, si la significación es < 0.05 .	Comparando los cuatro tratamientos, demostrando la calidad del análisis de los datos.
Función Gráfica de Supervivencia	Comparar las curvas de exposición de la larva a cada tipo de Bioinsecticida	Visualizar la tendencia porcentual	Precisar y comparar los porcentajes de supervivencia, que confirma la mortalidad y significativa de los datos obtenidos.

5.8. Aspecto ético

Para el presente estudio se estimó por conveniente, teniendo en cuenta que el uso de los productos Bioinsecticidas en esta investigación se obtuvieron de la universidad Nacional Mayor de San Marcos, laboratorio de microbiología ambiental y biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, asegurando con ello la idoneidad y calidad del uso de productos certificados. Así mismo, se obtuvieron los gusanos de los fundos agrícolas “Chapi” y “San Jorge” Ica-Perú; mediante recolección manual en los campos de cultivo, preservando el entorno de cultivo donde se encontraban estos insectos.

Finalmente, se salvaguardó, todos los procedimientos de laboratorio para el proceso experimental, para asegurar la calidad de los resultados que aquí se presentan.

6. Resultados

6.1. Análisis descriptivo del comportamiento de *Heliothis virescens* F “gusano perforador” frente a los tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*.

Día 1:

Para los gusanos sometidos a los cuatro diferentes tratamientos, se observó que la mortalidad de los *Heliothis virescens* F “gusano perforador” más pequeños (< a 20 mm) van aumentando, al igual que se observa una disminución en el ritmo de su alimentación. A diferencia de los gusanos que solo fueron sometidos a agua de grifo que no sufrieron reducción en su mortalidad ni sufrieron disminución en su alimentación.

Día 2:

Se observa que la mortalidad de los *Heliothis virescens* F “gusano perforador” medianos (= a 20 mm) y algunos de los grandes (> a 20 mm) sometidos a los diferentes tratamientos va en aumentos, a su vez que a alimentación de los gusanos tanto en las hojas como en los turiones del *Asparagus officinalis* “esparrago verde” es mínima, también se observa una disminución en su motilidad. Mientras que los gusanos sometidos solo a agua de grifo no evidencian ningún tipo de cambio, no hay disminución de la población, ni en la motilidad y tampoco hay cambios en el ritmo de la alimentación.

Día 3:

No se observa *Heliothis virescens* F “gusano perforador” de tamaño pequeño (< a 20 mm) ni medianos (= a 20 mm), la mortalidad de los *Heliothis virescens* F “gusano perforador” grandes (> a 20 mm) va en aumento, los pocos gusanos perforadores que quedan, tienen motilidad casi nula y no se alimentan de las hojas ni de los turiones del *Asparagus officinalis* “esparrago verde”, si no, de los cadáveres o de los gusanos moribundos realizando canibalismo. Caso contrario a los gusanos que no recibieron tratamiento alguno estos se desarrollaron de manera progresiva hasta completar todo su ciclo biológico.

6.2. Análisis inferencial de los datos

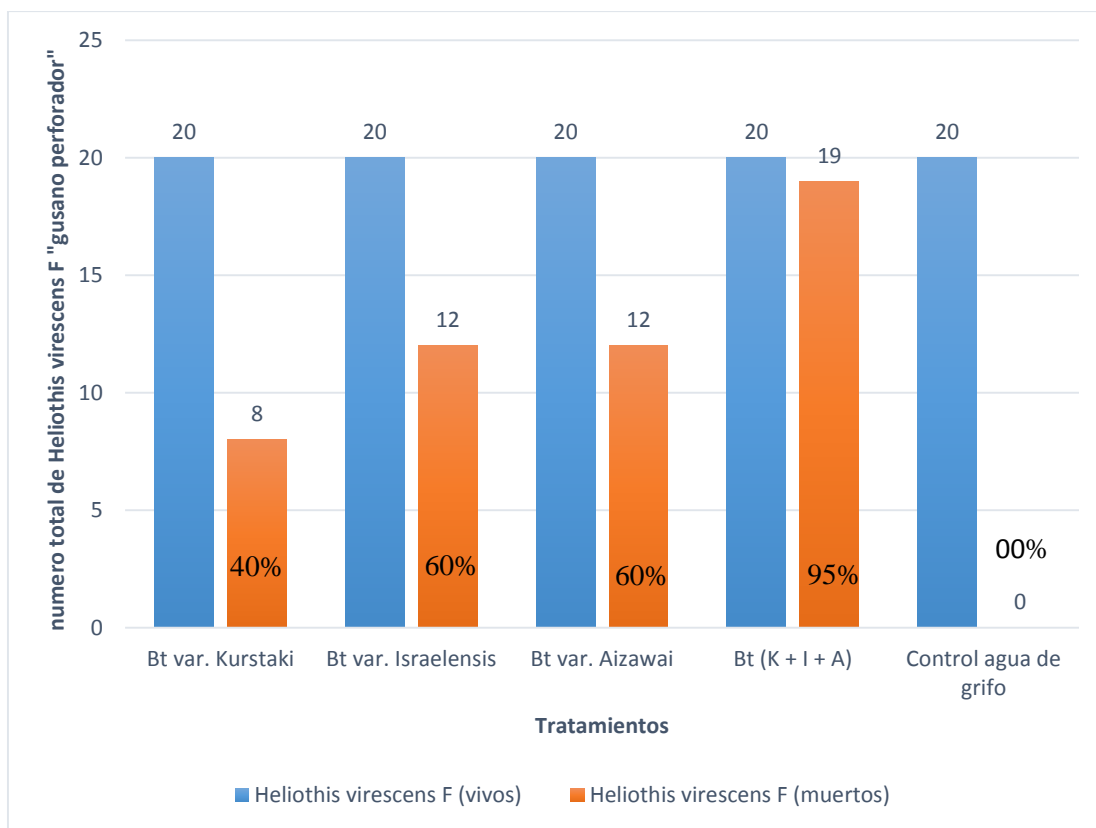
Porcentaje de la Mortalidad

Tabla N° 02 Porcentaje de la tasa de mortalidad del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”, según intervalo de tiempo.

Bioinsecticida	Hora de inicio del intervalo	Individuos			
		Vivos	Muertos	% de muertos	% de vivos
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>var. Kurstaki</i>	0 - 24	15	5	25%	75%
	24 - 48	15	0	00%	75%
	48 - 72	12	3	40%	60%
	Total	12	8		
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>var. Israelensis</i>	0 - 24	12	8	40%	60%
	24 - 48	09	3	55%	45%
	48 - 72	08	1	60%	40%
	Total	08	12		
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>var. Aizawai</i>	0 - 24	14	6	30%	70%
	24 - 48	09	5	55%	45%
	48 - 72	08	1	60%	40%
	Total	08	12		
<i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Kurstaki</i> + <i>Israelensis</i> + <i>Aizawai</i>)	0 - 24	10	10	50%	50%
	24 - 48	8	2	60%	40%
	48 - 72	1	7	95%	5%
	Total	1	19		
Agua (control)	0 - 24	20	0	00%	100%
	24 - 48	20	0	00%	100%
	48 - 72	20	0	00%	100%
	Total	20	0		

Se observa que la tasa de mortalidad de *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” incrementa con el tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*) a un 50% en un intervalo de 0 - 24 horas de exposición hasta un 95% de mortalidad de especímenes en el intervalo de 48 - 72 horas. Así mismo, en los tratamientos individuales la tasa de mortalidad varía entre el 40% y 60%, en intervalos de 48 - 72 horas. (Anexo 4). Mientras que en los gusanos controles no se evidencia tasa de mortalidad.

Figura N° 06: Mortalidad del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”, según intervalo de tiempo de 0 a 72 horas.



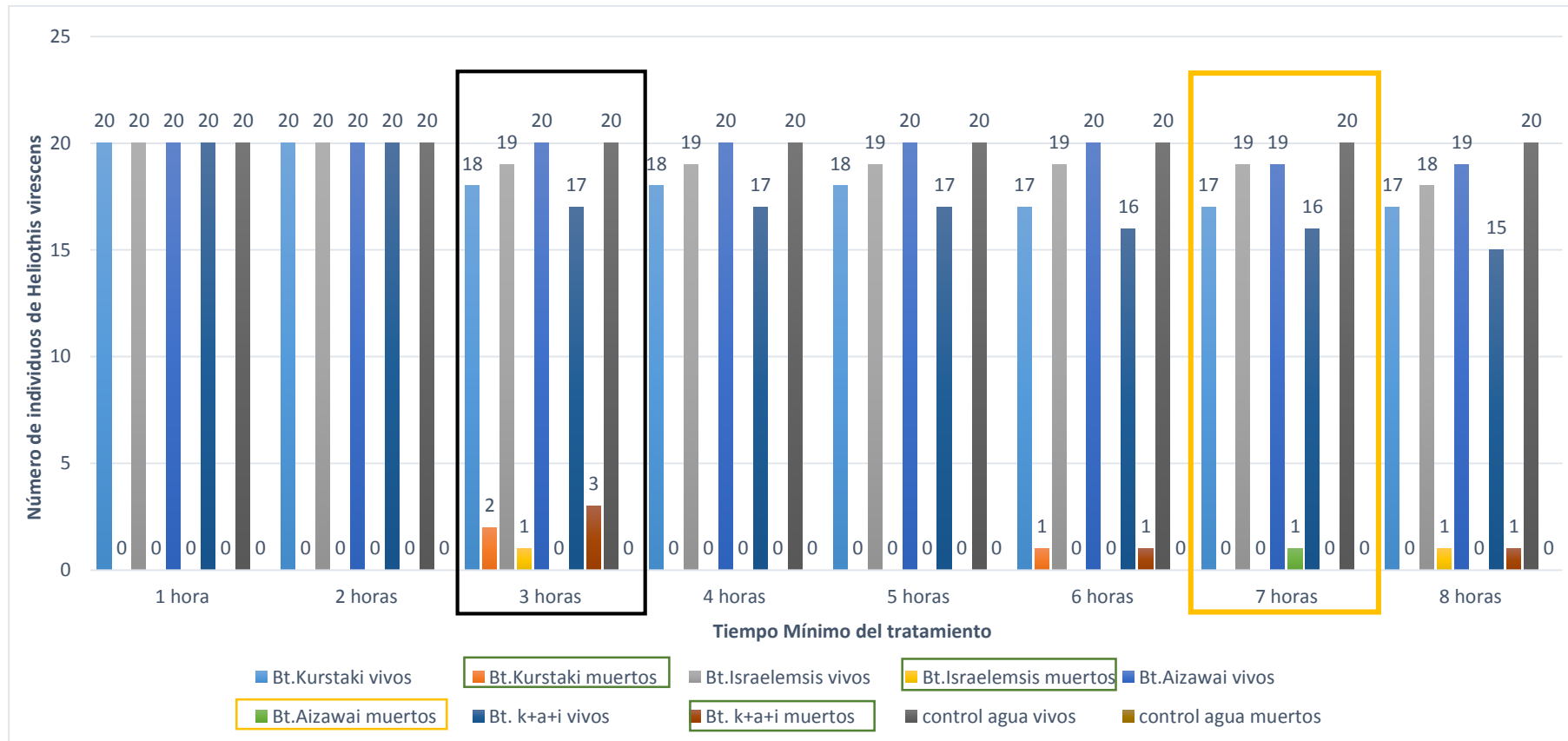
La figura número 06, nos confirma la mortalidad de los *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde” en un periodo total de 0 a 72 horas.

Para el tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki + Israelensis + Aizawai), se observa que de los 20 *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” que se tenían en un inicio, solo sobrevive uno al transcurrir un tiempo determinado, dando como resultado la mortalidad de 19 *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” en un tiempo de 72 horas. Para los tratamientos individuales como *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, solo se observa una mortalidad de 8 *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores”, mientras que para *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* se observa una mortalidad de 12 *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” en un tiempo transcurrido de 72 horas.

Para el grupo control, los 20 *Heliothis virescens* F “gusanos perforadores” sobrevivieron al tiempo transcurrido de 72 horas, cumpliendo incluso su ciclo biológico llegando a pupa y a polilla.

Tiempo mínimo de Exposición

Figura N° 07: Tiempo mínimo de exposición en el cual los tratamientos a base de esporas y cristales surgen efecto al *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”.



En la figura número 7 se observa, que en las dos primeras horas ninguno de los tratamientos sea de manera individual o combinada hacen efecto, el efecto se observa a las 3 horas de exposición en donde los tratamientos individuales *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y el tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*) surgen efecto teniendo una disminución de 2, 1 y 3 *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” respectivamente. Para el caso de *thuringiensis* var. *Aizawai* se observa que el efecto recién inicia a las 7 horas de exposición teniendo solo 1 individuo de *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” muerto.

Para el caso control, los 20 individuos sobrevivieron a las 8 primeras horas de exposición y a lo largo de todo el experimento.

Tiempo medio de supervivencia

Tabla N° 03. Tiempo medio de supervivencia de *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”, a los diferentes tipos de tratamientos.

Bioinsecticida	Tiempo Medio de Supervivencia
	Ensayo N°02 Horas
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	48.00
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>	40,00
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Aizawai</i>	43,20
<i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Kurstaki</i> + <i>Israelensis</i> + <i>Aizawai</i>)	24,00

Se observa que el tiempo medio de supervivencia del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” al tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*) es de 24 horas, a diferencia de los tratamientos individuales en donde se puede observar que el tiempo medio de supervivencia para *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* es de 48 horas, para *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* es de 40 horas y para *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* es de 43.20 horas.

Teniendo en cuenta que la supervivencia es la probabilidad que tienen los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” en alcanzar un respectivo tamaño larval o en concluir su ciclo de vida después que ser sometidos a los tratamientos individuales y tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*).

Media de supervivencia

Tabla N° 04. Medias de tiempo de supervivencia de Kaplan Meier, a la exposición de *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” frente a los diferentes tratamientos.

Bioinsecticida	Ensayo			
	Estimación de la media de supervivencia	Error estándar	Intervalo de confianza de 95%	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	41,150	4,144	33,028	49,272
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>	30,850	4,637	21,761	39,939
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Aizawai</i>	34,250	3,952	26,503	41,997
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)	29,400	4,253	21,064	37,736
Global	34,500	1,842	30,889	38,111
	a. La estimación está limitada al tiempo de supervivencia más largo, si está censurado.			

Teniendo en cuenta que el método de Kaplan-Meier, calcula las probabilidades de supervivencia mediante el producto de las estimaciones de las probabilidades condicionadas de supervivencia correspondientes a cada uno de los diferentes intervalos de tiempo.

En la tabla 04, se observa que la media de tiempo de supervivencia de *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” después que ser sometidos al tratamiento combinados a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki + Israelensis + Aizawai), es de 29.40 horas. A diferencia de los tratamientos individuales en donde la media de supervivencia para *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* es de 41,150 horas, para *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* es de 30,850 horas y para *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* es de 34,250 horas.

Comprobando que los *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” tienen un tiempo de supervivencia menor al ser sometidos al tratamiento combinados a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (Kurstaki + Israelensis + Aizawai).

Significancia

Tabla N° 05. Prueba de Log Rank (Mantel-Cox), para determinar la significancia de los cuatro diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*.

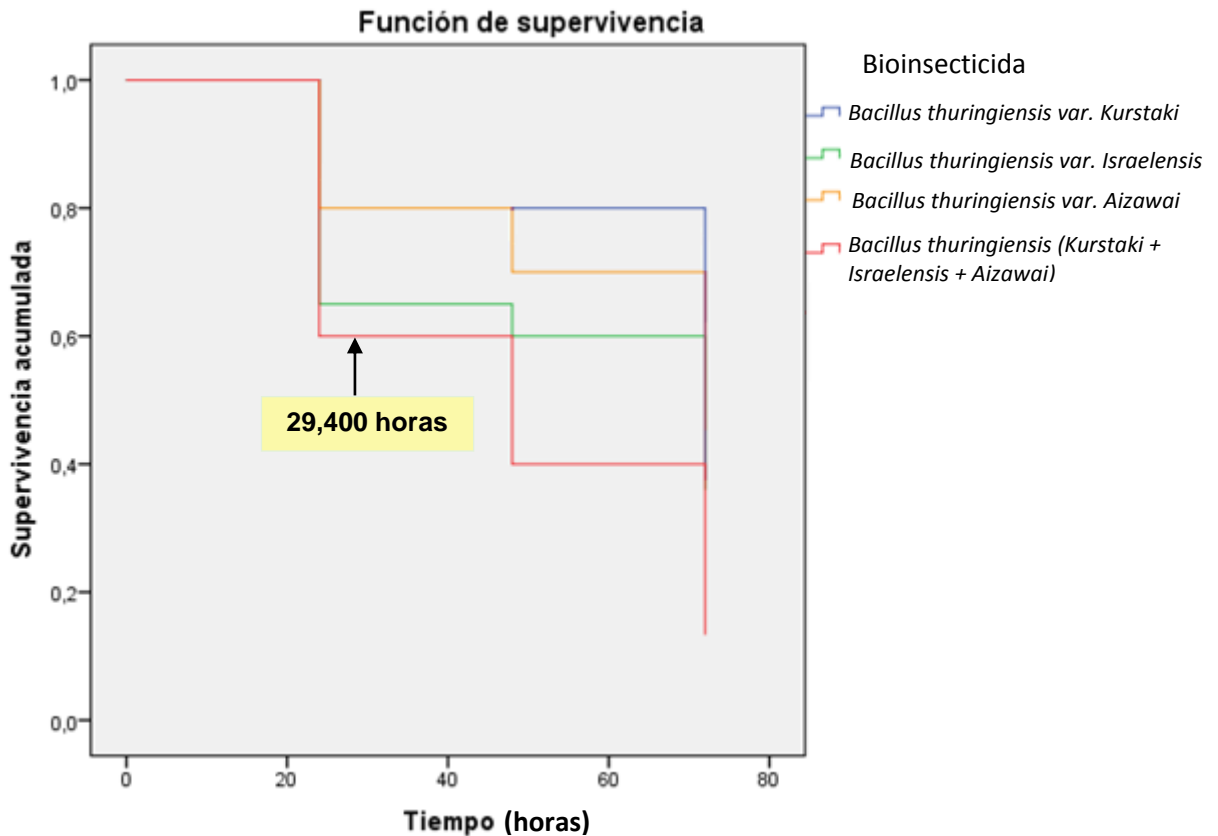
	Comparaciones Globales Ensayo		
Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-cuadrado	gl	Sig.
	10,913	4	0.028
	Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de bioinsecticida		

En la tabla 05 se presenta la prueba de Log Rank (mantel-Cox), el cual realiza las comparaciones globales de los cuatro diferentes tratamientos a base de esporas y cristales, con la finalidad de aceptar o rechazar la hipótesis nula, en este ensayo la hipótesis nula se refiere a la igualdad de los tratamientos y de que estos no generan ningún efecto inhibitorio en la supervivencia de los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores”, como se aprecia en la tabla, se puede concluir que se rechaza la hipótesis nula porque si existen diferencias significativas entre los cuatro diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* y que estos si ejercen un efecto inhibitorio en la supervivencia de los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores”, debido a que su nivel de significación es de 0.028 el cual es menor a 0.05, (p-valor $0,028 < 0.05$). (Anexo 6)

Teniendo en cuenta que el estadístico de Log Rank (Mantel-Cox), es usada frecuentemente para establecer la eficacia de nuevos tratamientos en relación a otros cuando la variable relevante es el tiempo transcurrido establece. Si la significancia es <0.05 se puede decir que hay diferencias entre las curvas.

Diagrama de supervivencia

Figura N° 08: Supervivencia de la media del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”, frente a los diferentes tratamientos.



Obsérvese en la figura 08, que el tiempo medio de supervivencia es de 24 horas, indicando que el tratamiento combinados a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*) es el bioinsecticida de mayor efectividad que las otras soluciones preparadas para incrementar la mortalidad del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”

Contrario a lo observado para los tratamientos individuales *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* indujeron menor mortalidades durante las horas de exposición.

7. Discusión

El uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causen daño (plagas) está ampliamente documentado en diversos estudios (Nicholls C.I., 2008; Flores, 2000; Sarmiento y Rázuri, 1978) como una estrategia de reducción de plagas a una proporción que no cause daño económico. Esta estrategia de control se desarrolló en el presente estudio con el propósito de determinar el efecto de las concentraciones de los Bioinsecticidas a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* de manera individual y combinada.

Esta estrategia se desarrolló en un ambiente de laboratorio para evaluar ese efecto en el gusano perforador (*Heliothis Virescens* F.) del espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.); por lo tanto, se observa que al exponer a los gusanos perforadores “*Heliothis Virescens* F” al bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, la tasa de mortalidad es de un 40%; con *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, la tasa de mortalidad es de un 60%; con *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* la tasa de mortalidad es de un 60%; sin embargo, cuando se emplea la combinación de Bioinsecticidas (*Bacillus thuringiensis*: *Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*), la tasa de mortalidad se incrementa a 95%. Los resultados coinciden con los obtenidos por Gallegos et al. (2003), quienes informaron correlaciones similares con los datos de 48 h (94% de mortalidad) y 72 h (98 de mortalidad) de ensayo.

Estas variaciones porcentuales a la exposición del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*), demuestra que este control biológico es altamente efectivo, al demostrarse que las tasas de mortalidad tienen una tasa porcentual de 40% a 95% en un tiempo mínimo inicial de 3 horas. Nuestros resultados, evidencian que esta efectividad presentada es reportada por autores para sostener que el aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* es de mucho interés biotecnológico en suelo agrícolas peruanos, teniendo en cuenta que su potencial entomotóxico es convenientemente útil para producir insecticidas biológicos o, en su defecto que las variaciones horarias de la curva y crecimiento de los bioformulados líquidos de *Bacillus thuringiensis* va en fases de crecimiento entre 40 horas hasta concentraciones constantes de 160 horas con una fase de muerte a las 624 Horas, además de destacarse el interés agronómico que adquirió este Bioinsecticida a fines de la década del 70 en el valle de Huaral (Flores et al, 2009; Carreras Cabezas, 2009; Sauka & Benidende, 2008 y Sarmiento y Rázuri, 1978 respectivamente).

Estos reportes coinciden también con el análisis que hace Nicholls Estrada (2008), al postular que un manejo agroecológico adecuado permite que el hábitat con la biodiversidad permite que se conlleve a un establecimiento de una infraestructura conveniente y apropiada para controlar los

enemigos naturales del espárrago verde (*Asparagus Officinalis F.*), favoreciendo con ello que el éxito del cultivo mantenga las condiciones de crecimiento y desarrollo, así como el aseguramiento que el producto se colocará en el mercado nacional o, cumpla con las exigencias del mercado internacional, cuando de exportación, al exigirse un producto que se valore por su calidad, frescura, inocuidad y abastecimiento (Shimizu, 2008; citado por León Castillo J.V., 2011). Desde esta perspectiva, se encuentra que el uso de este tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)* genera un efecto de mortalidad sobre *Heliothis virescens F.* “gusano perforador” controlando su ciclo biológico y evitar los daños al *Asparagus officinalis L.* “espárrago verde” especialmente a los turiones y el tallo, además de evitar la absorción de productos químicos y tóxicos que pudieran llegar al ser humano quien lo consume.

No obstante, nuestro estudio no se limitó a observar la tasa de mortalidad y la eficacia de los diferentes tratamientos empleado, también se observa en la Figura (N°07) que el tiempo mínimo en que tarde en evidenciarse la acción de los diferentes tratamientos es de 3 horas, teniendo al final un promedio de mortalidad de 95% de eficacia en la mortalidad en los de los *Heliothis virescens F.* “gusano perforador” que fueron sometidos al tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)*. De igual manera, al probar nuestra hipótesis general, está ampliamente demostrado que la mortalidad observada se hace más notable en la exposición del *Bacillus Thuringiensis (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)* C., con una tasa de mortalidad de 60% en un periodo de 24 a 48 horas de exposición (Tabla N° 02).

Así mismo, cuando realizamos un análisis comparado de la supervivencia del *Heliothis virescens F.*, la acción del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)*, se observó que el tiempo medio de supervivencia es de 24 horas (Tabla N° 04) y, en el análisis de supervivencia con el Kaplan Meyer, las diferencias son de 29,400 de estimación porcentual (Tabla N° 05), lo que indica que desde la tabla N° 02 a hasta esta tabla N° 04 evidencia que nuestros objetivos específicos relacionados con la eficacia de los Bioinsecticidas combinados es más efectivo que en el uso individual del insecticida pero que ya se demuestra la bondad del producto que se usa para el control de plagas en la siembra del Espárrago Verde (*Asparagus Officinalis L.*) esta diferencia se expresa en el figura N°07 con un tasa media de supervivencia de 29.400 horas; por último se destaca al utilizar el estadístico Mantel-Cox (Log Rank) demostrando la eficacia de los diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus Thuringiensis* es estadísticamente significativa p-valor 0.028 ($p \leq 0.05$). (Tabla N°05)

A partir de este planteamiento, el objetivo específico N°1 destaca la necesidad de establecer la eficacia de la mortalidad del *Heliothis virescens* F, por la acción de las esporas y cristales, considerando que el tratamiento combinada del Bioinsecticida de las diferentes variedades obtenidas por el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMS, producto que esta institución los obtiene directamente del ámbito natural y agrícola y procesados por sus laboratorios, evidencian que la tasa de mortalidad del *Heliothis virescens* F., es alta en un 95% cuando se utiliza el tratamiento combinada a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*).

Para nuestro objetivo N°02 se logró determinar el nivel significatividad de esa eficacia; al observarse que las diferencias en análisis del Log Rank (Mantel-Cox), es altamente significativo al obtener un p-valor de 0.028, lo que implica que al ser este dato menor que 0.05, confirman la eficacia del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*), sobre los tratamientos individuales *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var *Aizawai*. En cambio, en el grupo control al no haberse expuesto al *Heliothis virescens* F “gusano perforador” a ningún tipo de tratamiento ya sea individual o combinado; éstos mantienen su ciclo biológico normal; estos resultados también pueden observarse en condiciones de campo, al sostenerse que un uso de 0.9 a 1.5 kg/ha., dosis en dilución de 300 a 350 (gr/200 lts) es efectivo para el *Heliothis virescens* F. (MiPerú, manejos integrados SAC., 2004)

8. Conclusión

- Se puede observar que los *Heliothis virescens* F. “gusanos perforadores” pequeños son los que mueren mucho más rápido, no pasando el primer día de exposición a los diferentes tratamientos.
- La acción del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*), presenta una tasa de mortalidad altamente significativa en el gusano perforador (*Heliothis virescens* F.) del espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.), evidenciándose un 50% de larvas muertas en un tiempo de 0 – 24, de 60% en un tiempo de 24 – 48 horas y de un 95% en un tiempo de 48 – 72 horas. A diferencia de los tratamientos individuales en donde se observa que *Bacillus thuringiensis* var *Israelensis* y *Bacillus thuringiensis* var *Aizawai* tiene una tasa de moraliidad parecida de 40% y 30% de 0 – 24 horas respectivamente, de 55% de 24 – 48 horas y de 60% 48 – 72 horas mientras que *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* solo se observó 25% de larvas muertas en un tiempo de

0 – 24 horas, de 0% en un tiempo de 24 – 48 horas y de un 40% en un tiempo de 48 – 72 horas, siendo el tratamiento con el índice de mortalidad más bajo.

- La acción del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*), es más efectivo, para incrementar la tasa de mortalidad de los *Heliothis virescens* F. “gusano perforador”, confirmando que la tasa media de sobrevivencia del *Heliothis virescens* F. “gusano perforador”, es de 29,400 hora.
- La significatividad de los cuatro diferentes tratamientos a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*, confirma las diferencias en las tasas de sobrevivencia de los gusanos ante el tratamiento combinado teniendo X^2 10,913 p-valor $0.028 < 0.05$.
- El análisis inferencial confirma la significativas de la mortalidad sobre el *Heliothis virescens* F. “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”, confirmandose la capacidad del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* (*Kurstaki* + *Israelensis* + *Aizawai*).

9. Recomendaciones

- Trasladar los resultados del tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* al campo agrícola para confirmar la calidad de los datos obtenidos en esta investigación.
- Realizar estudios experimentales con la finalidad de evaluar si existe la posibilidad de que los *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del espárrago verde (*Asparagus officinalis* L.) genere resistencia frente a al Bioinsecticida *Bacillus thuringiensis*.
- Buscar nuevos tratamientos naturales con la finalidad de reducir el uso de insecticidas químicos en los cultivos agrícolas evitando así su absorción, los cuales son tóxicos al ser consumidos por el ser humano

10. Referencias Bibliográficas

1. Agraria.pe. (2019). Exportaciones de espárragos crecen en volumen 15% el 2018. Disponible en: www.agraria.pe/noticias/exportaciones-de-esparragos-crecen-en-volumen-15-el-2018-18443
2. Cañedo V, Alfaro A, Kroschel J. (2011). Manejo integrado de las plagas de insectos en hortalizas principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP).
3. Carrera Cabezas MdeL. (2009). Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. [Tesis de grado]. Escuela de Bioquímica y estadística. Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador.
4. Cisneros Fausto. (2007). Programa MIP de Espárrago en Chavimochic, Perú. Disponible en: www.avocadosource.com.
5. Flores, R (2000). Efecto de la variedad de maíz sobre el desarrollo y susceptibilidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae) a *Bacillus thuringiensis*. Apartado Postal No. 36, C.P. 28100. Tecomán, Colima, México.
6. Flores A, Egúsqüiza RM, Alcarraz M, Woolcott JC, Benavides E, Godoy J, Huerta D, Jesús M., Y, Patiño G, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial Bioinsecticida. Ciencia e Investigación 14 (1): 29-34 Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM
7. Gallegos, G.; M. Cepeda; E. Aranda; L. O. Tejeda; D. Enkerlin. (2003): Evaluación del efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre larvas del segundo estadio de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrociencia* 37:405-411, México.
8. Gómez R., Flores F (2015). Agricultura y servicios ecosistémicos: el caso del espárrago en Ica. Centro de Investigación de la Universidad del Pacifico. Vol. XLII, N°77, segundo semestre: páginas 9-55.
9. Hernández Soto A (2002). Aislamiento y caracterización de cepas de las bacterias entomopatógena *Bacillus Thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con Broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari. [Tesis de grado]. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica.

10. Hortalizas.Com. (2010). Un enfoque bioracional de los Insecticidas. Disponible en: <http://www.btbioracional.com/>.
11. Hussien A. (2012), Evaluación de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa*, que expresa la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*, como bioinsecticida y biofertilizante en algodón. Universidad de Cordova.
12. León Castillo J.V. Agro exportación, Empleo y Género en el Perú: Un estudio de Caso. Consorcio de Investigación Económica y Social, Programa Comercio y Pobreza en Latinoamérica, págs., 2011. 111. Disponible en: www.cop-la.net.
13. León Sánchez M, Samaniego Fernández LM., Rodríguez Barrera RC., Liriano González R (2006). Utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita*. Centro Agrícola, año 33, no. 4, oct.-dic.
14. Malo J, Nicolás JA, Fernández AI, Villaverde Probelte M. Desarrollo de un Bioinsecticida basado en un nuevo aislado de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. (s/f) Murcia, España.
15. Margalit J (1989). Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* (B.T.I); history and presents status- Israel Entomol 23:3-8.
16. Delgado N (2005). Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Vol. 20(3): 213 - 233.
17. O'Brien TM, Díaz Rodríguez A. Mejorando la competitividad y el acceso a los mercados de exportaciones agrícolas por medio del desarrollo y aplicación de normar de inocuidad y calidad: El ejemplo del espárrago peruano. Prompex, Costa Rica, Lima, Perú.
18. Ruiz de Escudero I, Ibáñez I, Padilla M.A., Carnero A, Caballero P (2004). Aislamiento y Caracterización de nuevas cepas de *Bacillus Thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Bol.San. Veg. Plagas, 30:703-712.
19. Sarmiento J, Rázuri R, V (1978). *Bacillus Thuringiensis* en el control de *Spodoptera frugiperda* y de *diatraea saccharalis* en maíz. Rev. Per. Ent. 21: 121-124.
20. Sauka, D H (2008)., Benintende, Graciela B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol e insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología, vol. 40, núm. 2. Pp.124-140.

21. Serrano, M., Gusano Bellotero o Heliothis Virescens 2015. Disponible en: <http://www.croplifela.org/>
22. Silva, M., Furigo, A., Junior, S., Souza O (2011). Production of bio-inseticide *Bacillus thuringiensis var. israelensis* in semicontinuous processes combined with batch processes for sporulation. Braz. Arch. Biol. Tech., 54: 45–52.
23. Vega R. Manejo Integrado y Uso de Semilla Certificada F1 en el Cultivo de Espárrago. Agrobanco 2013. Disponible en: www.agrobanco.com.pe
24. [World Health Organization. Informal Consultation on Bacterial Formulations for Cost-Effective Vector Control in Endemic Areas, Pondicherry, India 1989. Disponible en: http://www.who.int/iris/handle/10665/59197](http://www.who.int/iris/handle/10665/59197)

ANEXOS

Anexo 1. Descripción de la planta

La planta de espárrago está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea constituida por raíces y yemas, que es lo que se denomina comúnmente “garra”.



-Tallo: el tallo principal es único, subterráneo y modificado en un rizoma. En el terreno se desarrolla horizontalmente en forma de base o plataforma desde la cual se producen hacia la tierra, las raíces y hacia fuera los tallos herbáceos.

-Raíces: Las raíces principales nacen directamente del tallo subterráneo o rizoma y son cilíndricas, gruesas y carnosas teniendo la facultad de acumular reservas, base para la próxima producción de turiones; de estas raíces principales nacen las raicillas o pelos absorbentes cuya función es la de absorción de agua y elementos nutritivos.

Las raíces principales tienen una vida de 2 a 3 años; cuando estas raíces mueren son sustituidas por otras nuevas, que se sitúan en la parte superior de las anteriores, con ello las yemas van quedando más altas; de esta forma la parte subterránea va acercándose a la superficie del suelo a medida que pasan los años de cultivo.

-Yemas: Las yemas son los órganos de donde brotan los turiones, parte comestible y comercializable de este producto, que cuando se dejan vegetar son los futuros tallos ramificados de la planta.

-Flores: Son pequeñas, generalmente solitarias, acampanadas y con la corola verde amarillenta. Su polinización es cruzada con un elevado porcentaje de alogamia, entiéndase la fecundación de la flor con otra flor.

-Fruto: Es una baya redondeada de 0.5 cm. de diámetro; Son de color verde al principio y rojos cuando maduran. Cada fruto tiene aproximadamente de 1 a 2 semillas.

-Semillas: Son de color pardo oscuro o negras, y con forma entre poliédrica y redonda, teniendo un elevado poder germinativo.

La planta de espárrago es dioica; es decir, hay plantas hembras que solamente dan flores femeninas y plantas machos que únicamente dan flores masculinas.

-Cladodios: Son tallos con el aspecto de hojas. Aparecen porque las hojas son muy pequeñas y ya no pueden cumplir con su función.

Anexo 2: Límite máximo de residuos de plaguicidas del espárrago verde (*Asparagus officinalis L.*) – Perú.

Principio Activo	Uso	LMR(ppm)
Alfa Cipermetrina	Insecticida	0.1
Azocyclotin	Ácaros	0.05
Carbaryl	Insecticida	15
Carbendazim	Fungicida	0.2
Carbosulfan	Insecticida	0.05
Chlorfluazuron	Insecticida	2
Chlorothalonil	Fungicida	0.1
Chlorpyrifos	Insecticida, Ácaros	0.05
Clofentezine	Ácaros	0.02
Cyhexatin	Ácaros	0.05
Cipermetrina	Insecticida	0.1
Deltametrina	Insecticida, Ácaros	0.05
Diazinon	Insecticida	0.5
Diflubenzuron	Insecticida	0.05
Dimetoato	Insecticida	0.05
Etofenprox	Insecticida	0.01
Fenpyroximate	Insecticida	0.05
Fenthion	Insecticida	0.01
Fipronil	Insecticida	0.05
Imazalil	Fungicida	0.02
Imifacloprid	Insecticida	0.05
Metomil	Insecticida	2
Metoxifenocide	Insecticida	0.02
Metiram	Fungicida	0.05
Pendimethalin	Herbicida	0.05
Permetrina	Insecticida, Ácaros	1
Phenthoate	Insecticida	0.05
Rotenone	Insecticida	0.01
Spinosad	Insecticida	0.2
Spiromesifen	Insecticida	0.02
Tebufenozide	Insecticida	0.05
Tiabendazol	Larvicida	0.05
Thiamethoxam	Insecticida	0.05

NTS N°739-MINSAIDIGESA V.01. Norma sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano.

Anexo 3: Matriz descriptiva de los *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas.

Cualidades	Formas de Actuación
<p>A. Microorganismo con forma cilíndrica (bacteria) que produce proteínas tóxicas durante la esporulación (proceso de producción de esporas)</p> <p>B. Crea toxinas letales para muchas especies de insectos plaga y enfermedades, tales como larvas de lepidópteros, escarabajos/tortuguillas y larvas de mosquito.</p> <p>C. Es inofensivo en humanos, aves y otros miembros de la flora y fauna silvestre.</p> <p>D. Proporciona propiedades insecticidas a través de productos comerciales a base de Bt. Estos productos comerciales de Bt contienen cristales de proteínas tóxicas o una mezcla de cristales y esporas de Bt.</p>	<p>A. Actúan como un veneno estomacal</p> <p>B. Las esporas contribuyen a su toxicidad al causar envenenamiento de la sangre y proporcionando persistencia ambiental.</p> <p>C. Cuando un insecto plaga ingiere los cristales de proteínas de las hojas tratadas, interrumpe su alimentación en cuestión de minutos, después que los cristales se disuelven en su interior y dañen las células intestinales.</p> <p>D. En minutos, las esporas atraviesan la pared y germinan rápidamente en el interior del cuerpo, causando envenenamiento de la sangre.</p> <p>E. Las larvas interrumpen su alimentación en minutos y perecen en un intervalo de 1 a 3 días.</p> <p>F. Lentificación, decoloran y muerte.</p>

Anexo 4. Análisis de tiempos medios de la mortalidad.

Tabla de mortalidad Ensayo 2

Controles de primer orden	Hora de inicio del intervalo	Vivos	Muertos	% de muertos	% de vivos
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki	0 - 24	20	5	,25	,75
	24 - 48	15	0	,00	1,00
	48 - 72	15	3	,33	,67
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Israelensis	0 - 24	20	8	,40	,60
	24 - 48	12	3	,25	,75
	48 - 72	9	1	,20	,80
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Aizawai	0 - 24	20	6	,30	,70
	24 - 48	14	5	,36	,64
	48 - 72	9	1	,20	,80
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Kurstaki + Israelensis + Aizawai)	0 - 24	20	10	,50	,50
	24 - 48	10	2	,20	,80
	48 - 72	8	7	,93	,07

Anexo 5. Análisis Inferencial (SPSS v.22)

Comparaciones por parejas

	Insecticida	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki		<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Iraelensis		<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Aizawai		<i>Bacillus thuringiensis</i> (Kurstaki + Iraelensis + Aizawai)	
		Chi- cuadrado	Sig.	Chi- cuadrado	Sig.	Chi- cuadrado	Sig.	Chi- cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	Bacillus thuringiensis var. Kurstaki			2,653	,103	,918	,338	10,195	,001
	Bacillus thuringiensis var. Iraelensis	2,653	,103			,411	,521	2,667	,102
	Bacillus thuringiensis var. Aizawai	,918	,338	,411	,521			5,278	,022
	Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Iraelensis + Aizawai)	10,195	,001	2,667	,102	5,278	,022		
Breslow (Generalized Wilcoxon)	Bacillus thuringiensis var. Kurstaki			2,848	,091	,900	,343	9,319	,002
	Bacillus thuringiensis var. Iraelensis	2,848	,091			,481	,488	2,029	,154
	Bacillus thuringiensis var. Aizawai	,900	,343	,481	,488			4,725	,030
	Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Iraelensis + Aizawai)	9,319	,002	2,029	,154	4,725	,030		
Tarone-Ware	Bacillus thuringiensis var. Kurstaki			2,757	,097	,916	,339	9,818	,002
	Bacillus thuringiensis var. Iraelensis	2,757	,097			,443	,506	2,361	,124
	Bacillus thuringiensis var. Aizawai	,916	,339	,443	,506			5,019	,025
	Bacillus thuringiensis (Kurstaki + Iraelensis + Aizawai)	9,818	,002	2,361	,124	5,019	,025		

Anexo 6: Definición del estadístico de Log Rank (Mantel-Cox) y de la curva de supervivencia.

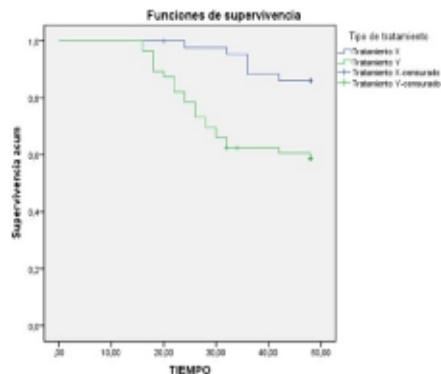
2. Tabla con el Estadístico Log Rank (Mantel-Cox) que establece si hay diferencias entre las curvas de supervivencia. Si la significación es $< 0,05$ podemos decir que hay diferencias entre las curvas.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,924	1	,002

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Tipo de tratamiento.

En esta tabla se representa el valor del estadístico Log Rank, los grados de libertad y la significación estadística. La H_0 establece que ambas curvas son iguales, por lo tanto si $p < 0,05$ indicaría que hay diferencias entre las curvas. En este ejemplo como $p=0,002$, se rechaza la hipótesis nula y podemos decir que hay diferencias entre las curvas.

3. En la figura "funciones de supervivencia" se representa una curva de supervivencia por cada curva.



En este ejemplo se puede observar como la curva de supervivencia del tratamiento X es superior a la del tratamiento Y, por lo que podemos decir que con el tratamiento X existen menos fracasos que con el tratamiento Y.

¿Cómo expresar en un artículo un análisis de supervivencia?

En el apartado de material y métodos.

Por ejemplo si queremos describir la supervivencia de un cáncer a los 5 años tras un tratamiento con quimioterapia podemos decir: "se ha utilizado el método de Kaplan-Meier para describir la supervivencia de los pacientes a los 5 años".

Si lo que queremos es comparar el efecto en la supervivencia de dos tratamientos, podemos decir: "se ha utilizado el método de Kaplan-Meier para analizar la supervivencia tras el inicio de los tratamientos y la prueba de log-rank para comparar la supervivencia de ambos grupos"

En el apartado de resultados. Siempre que podamos es conveniente que representemos la figura de la función de supervivencia, el impacto visual que genera es muy elevado. El método de Kaplan-meier calcula la probabilidad de no padecer el evento, así que si por ejemplo el evento es mortalidad tendríamos que poner que la supervivencia de los pacientes a x tiempo ha sido %. Si por ejemplo estamos evaluando el éxito terapéutico de un tratamiento a 48 semanas, el evento será fracaso al tratamiento y si al final obtenemos un resultado de un 95%, podremos escribir que el tratamiento x presenta un éxito del 95% a las 48 semanas.

Si lo que estamos haciendo es comparar dos tratamientos por ejemplo para el VIH tendremos que reflejar el resultado de las comparaciones globales por Log Rank (Mantel-Cox). Si por ejemplo obtenemos que la Chi cuadrado ha sido 9,924 con 1 grado de libertad y la significación estadística 0,002, tendremos que decir lo siguiente: "se han apreciado diferencias en cuanto a los fracasos entre el tratamiento X y el tratamiento Y para el control del VIH, $X^2(1) = 9,924$, $p=0,002$ ". También podríamos decir: "Hubo diferencias estadísticamente significativas en los fracasos de los pacientes que habían sido tratados con los tratamientos X e Y mediante estudio de supervivencia de Kaplan-Meier (log-rank $p = 0,002$)".