

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CON ACTIVIDAD HACIA EL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ (*Spodoptera frugiperda*) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Ana Martha Cruz-Avalos✉ y María Cristina del Rincón-Castro

¹Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato Ex Hacienda El Copal, Km 7 Apdo. Postal: 36500, Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Guanajuato, México.

✉Autor de correspondencia: cruz20_5@hotmail.com

RESUMEN. Se aislaron e identificaron a nivel molecular seis cepas de hongos entomopatógenos a partir de suelos de maíz, provenientes de las comunidades de Irapuato, Cuerámara y León, Guanajuato. Para la recuperación de hongos entomopatógenos se emplearon larvas de (*Galleria mellonella* L.). Los hongos se sembraron en medio de cultivo Agar Dextrosa Soboraud hasta obtener un cultivo puro. La extracción de DNA se realizó a partir del micelio. Para la PCR, se emplearon los oligonucleótidos universales ITS4 e ITS5, con los cuales se obtuvieron amplicones de 650 y 850 Kb. Estos fueron secuenciados y comparados en la base de datos del GeneBank. Se evidenció que los seis amplicones secuenciados de los diferentes aislados de hongos tenían un porcentaje de identidad del 99 % con respecto a los hongo *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, maíz, DNA y PCR.

Isolation and molecular identification of entomopathogenic fungal strains with activity toward armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT. In this work were isolated and identified at the molecular level six strains of entomopathogenic fungi from agricultural soils corn, using as bait to detect and entomopathogenic fungi multiply *Galleria mellonella* larvae (L.). These fungi were isolated from Irapuato, Cueramaro y Leon, Guanajuato, Mexico. Each one the isolates were plated on Dextrose Agar culture medium Soboraud until a completely pure culture. DNA extraction was performed from the mycelium. With this PCR were performed, using universal oligonucleotides ITS4 and ITS5 fungi with which amplicons of between 650 and 850 Kb were obtained. These amplicons were sequenced and compared in the GenBank database. We demonstrated that six sequenced amplicons of different fungal isolates have a 99% percent identity with respect to *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*.

Keywords: Fungi entomopathogenic, corn, DNA and PCR.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo del maíz es el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith). En México el monitoreo como método de estudio se inició en 1989, y en años recientes se ha realizado en regiones productoras de maíz de Chiapas y Michoacán, se alimenta dentro del cogollo del maíz (parte apical y de crecimiento de la planta), dañando los tejidos que formarán la mazorca, afectan el desarrollo de la planta (Cruz, 2009), y en infestaciones severas causando pérdidas totales en la producción (Cardona *et al.*, 2013). Para controlar las poblaciones se utilizan insecticidas de origen sintético (químicos) DDT, Sevin, Malathion (Zapata y Kossau 1965), pero su uso indiscriminado puede generar resistencia de *S. frugiperda* (Nascimento *et al.*, 2015; León-García, 2012). Este tipo de productos favorece la muerte de enemigos naturales y contamina fuentes de agua superficial y subterránea. Por lo que el uso de bioinsecticidas es una alternativa ecológica amigable al medio ambiente, puede ayudar a evitar resistencia en los insectos y no representa una amenaza a la salud de personas que laboran en el

cultivo (Badii y Abreu, 2006), al no haber contacto con agentes tóxicos y además los productos alimenticios están libres de residuos químicos. En los últimos años la utilización de hongos entomopatógenos como control de plagas (*Spodoptera frugiperda*), ha ido en aumento, principalmente debido a su modo de acción y por la búsqueda de nuevas estrategias que eviten los casos de resistencia a insecticidas; ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. Los hongos entomopatógenos tiene una distribución mundial y es un importante enemigo natural de especies de lepidópteros plaga, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue Aislar y caracterizar a partir de muestras de suelo y larvas del gusano cogollero del maíz, cepas de hongos entomopatógenos con actividad bioinsecticida hacia *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

MATERIALES Y MÉTODO

Colectas de muestras de suelos de maíz. La colecta de suelos se realizó en sembradíos de maíz, en comunidades del municipio de: Irapuato Abasolo, Cuerámara y Salamanca, la recolección se realizó con la técnica de cinco de oros (Rendón, 1994), que consistió en seleccionar cinco puntos. En cada uno de los sitios seleccionados se recolectaron cuatro muestras de suelo, considerando la superficie de la parcela y a una distancia no mayor de 100 m entre cada sitio de recolecta, la muestra fue tomada de los primeros 10 cm de profundidad. Para la toma de muestra se empleó una pala, con la que se realizó un hoyo de 25 cm de diámetro y 10 cm de profundidad, la tierra obtenida fue mezclada y de esta se tomaron 300 g de cada sitio, después de tomar cuatro muestras de la parcela, se mezclaron para formar una mezcla compuesta de 1 kg de suelo (García *et al.*, 2011).

Manejo de las muestras de suelo en laboratorio. Las muestras de suelo se tamizaron con un cedazo de 2 mm de separación de malla y de él se tomaron 300 g, mismos que se colocaron en un recipiente de plástico de 1 l. El suelo fue humedecido a capacidad de campo, se le colocaron cinco larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) y se taparon. Cada recipiente fue invertido e incubado por siete días a 25 °C.

Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas de maíz. Cuando se detectaron hongo entomopatógenos en la superficie de las larvas de *G. mellonella* (esporas del hongo), con la ayuda de un asa bacteriológica se tomaron esporas del insecto y se sembró en cajas de Petri que contenían Agar Dextrosa Saboraud (Bioxon®). Las cajas fueron incubadas a 25 °C, en completa obscuridad de cuatro a seis días (Hatting *et al.*, 1999). Lo anterior se repitió hasta obtener cultivos puros (limpio) de cada hongo. El material aislado y purificado, fue cultivado Agar Dextrosa Saboraud (Pereira y Stimac, 1992). Una vez que el micelio se desarrolló en el medio durante tres días se procedió a extraer DNA.

Extracción DNA. Para realizar la extracción de DNA todo el material empleado fue esterilizado previamente. En primera instancia se colocó el amortiguador de extracción (200 mM Tris HCl pH:8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5 % SDS) en el termoblock a 70 °C, el micelio fue recuperado con una espátula, misma que se colocó en un mortero de capacidad de 80 ml para su posterior maceración, adicionando 500 µl de buffer de extracción caliente, para que el micelio se pudiera macerar con mayor facilidad, el micelio macerado se recuperó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se colocaron en el termoblock a 70 °C durante una hora, pasado este tiempo se agregó 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) agitándolos suavemente por 10 minutos, se centrifugo a 14000 rpm durante 20 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (500 µl aproximadamente), la mezcla se agitó por un minuto y se centrifugaron nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol

frío, mezclándose por inmersión un minuto, se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla, se resuspendió la pastilla de DNA en una solución de resuspensión (EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH:8) en un volumen de 20 µl. Una vez realizadas las extracciones, se corrieron en geles de agarosa 0.7 % (0.7 g Agarosa/100 ml TAE 1x), se corrieron a 90 volts por 40 minutos aproximadamente.

Cuantificación de DNA. Una vez realizadas las extracciones, se realizó la cuantificación de DNA en Nanodrop (Thermo Scientific, modelo 1815), el equipo primero se calibró, agregando un µl de agua destilada estéril (ADE), se realizó la lectura correspondiente, esperando que la pantalla del nanodrop marcara ingresar muestra, este paso se puede repetir más de una vez, una vez calibrado se tomó un µl de DNA y se realizó la lectura correspondiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para realizar la PCR de las muestras se siguió la técnica propuesta por Mullis y Faloona (1987), bajo las siguientes condiciones: 94 °C para desnaturalización inicial durante 4 minutos, 94 °C por 4 segundos, con una temperatura de alineamiento de 55 o 65 °C dependiendo la especie de hongo entomopatógenos durante 40 segundos y una temperatura de extensión de 72 °C por 40 segundos, finalmente 72 °C por 10 minutos. Los iniciadores universales utilizados fueron los ITS 4 (directo) 5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' e ITS 5 (reverso) 5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3' (White *et al.*, 1990). Se utilizaron tubos para PCR con la reacción de amplificación con un volumen final de 25 µl cada uno, conteniendo un µl de cada primer; 2.5X de buffer de amplificación; 2.5 mM MgCl₂; 1 mM de cada desoxinucleotido (dATP, dCTP, dGTP and dTTP); 1 U Taq DNA polimerasa; y 1 µl de DNA genómico. Finalizado el proceso, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % por 90 V por un tiempo de 45 minutos. Una vez que se obtuvieron los amplicones por PCR se mandaron secuenciar la empresa Macrogen, en Korea del Sur por el método de pirosecuenciación, los resultados se analizaron en el GenBank y por el programa Blast.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de hongos. Se aislaron y purificaron seis cepas de hongos entomopatógenos recuperados a partir de suelos de diferentes comunidades de los municipios de: Irapuato Cueràmara y León Guanajuato (Cuadro 1). Los aislamientos presentaron esporas con la morfología típica de las especies de *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium. anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Figs. 1a, b y c).

Cuadro 1. Especies de hongos entomopatógenos aislados de suelos en cultivo de maíz de municipios del estado de Guanajuato

Muestra	Clave del aislado	Municipio	Origen	Especie
8	Mr8	Irapuato	Suelo agrícola	<i>Metarhizium robertsii</i>
9	Bb9	Irapuato	Suelo agrícola	<i>Beauveria bassiana</i>
19	Bb19	Cueràmara	Suelo agrícola	<i>Beauveria bassiana</i>
21	Bb21	Irapuato	Suelo agrícola	<i>Beauveria bassiana</i>
22	Ma22	León	Suelo agrícola	<i>Metarhizium anisopliae</i>
23	Bb23	León	Suelo agrícola	<i>Beauveria bassiana</i>

Extracción de DNA. Como se puede observar en la figura 2, se logró extraer DNA total de buena calidad en los seis aislamientos de hongos entomopatógenos. Todos los aislamientos mostraron una banda por arriba de los 12,000 pares de bases observándose una banda compacta en los carriles 2 al 7

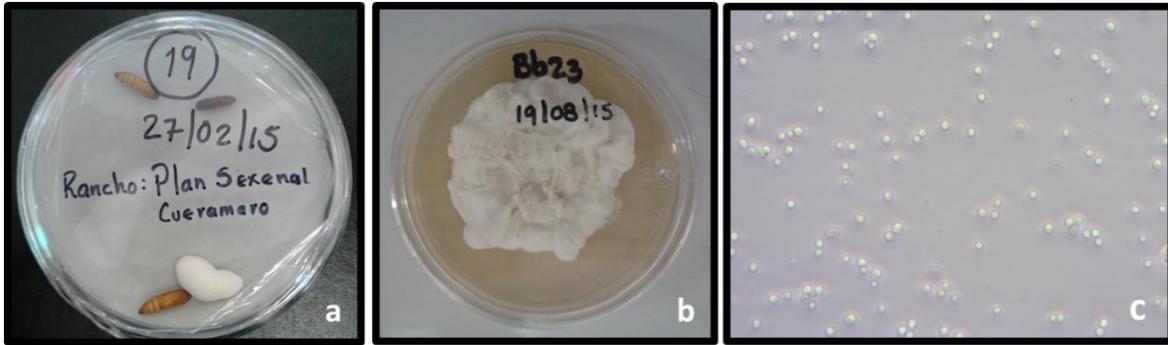


Figura 1. a) Aislado Bb19, larva de *Galleria mellonella* en cámara húmeda totalmente micosada con *Beauveria bassiana*. b) Aislamiento puro de *B. bassiana*. c) Esporas de *B. bassiana* observadas con el objetivo 40X en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss, modelo axio Lab A1).

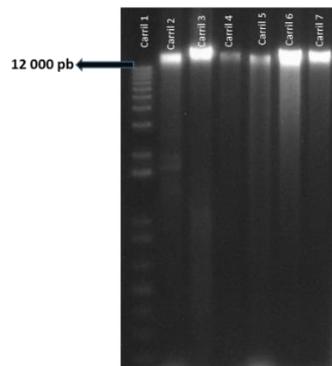


Figura 2. Extracción de DNA total de aislamientos de hongos. Carril 1: marcador de peso molecular Ladder 1kb Plus (Invitrogen), carril 2: Mr8, carril 3: Bb9, carril 4: Bb19, carril 5: Bb21, carril 6: Ma22, carril 7: Bb23

Cuantificación de DNA. Para la muestra Mr8 se obtuvieron 37.9 ng/ μ l de DNA, muestra Bb9= 34.7 ng/ μ l de DNA, muestra Bb19= 31.9 ng/ μ l de DNA, muestra Bb21= 32.0 ng/ μ l de DNA, muestra Ma22= 27.0 ng/ μ L de DNA, muestra Bb23= 25 ng/ μ L de DNA.

PCR. Se obtuvieron diferentes amplicones al realizar los PCR con los oligonucleótidos ITS4 e ITS5. Como puede observarse en el aislamiento Mr8 se obtuvo un amplicón cercano a los 650 pb, para los aislamientos Bb9, Bb19 y Bb21 fue de 850 pb aproximadamente, mientras que para Ma22 se pudo observar un tamaño de 650 pb, y, para el aislado Bb23 se obtuvo un amplicón de 650 a 850 pb (Fig. 3).

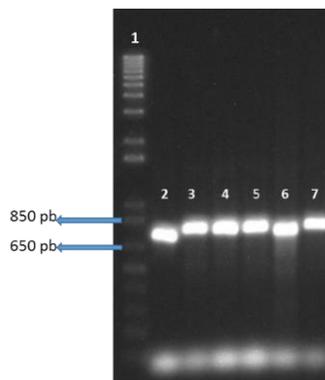


Figura 3. PCR de los diferentes aislamientos de hongos. Carril 1: marcador de peso molecular Ladder 1kb Plus DNA (Invitrogen), Carril 2: aislado Mr8, carril 3: Bb9, carril 4: Bb19, carril 5: Bb21, carril 6: Ma22, carril 7: Bb23.

Secuenciación y análisis de los amplicones de PCR. Al realizar una búsqueda de identidad para cada una de las secuencias obtenidas, como se observa en la cuadro 2, se pudo observar que cuatro de las muestras (Bb9, Bb19, Bb21 y Bb23) presentaron un 99 % de identidad con *Beauveria bassiana*, mientras que la muestra Ma22 presentó un 99 % de identidad con *Metarhizium anisopliae*, y Mr8 presentó un 99 % de identidad con *Metarhizium robertsii*.

Cuadro 2. Identidad de los aislamientos obtenidos a partir de suelos agrícolas de maíz basado en la amplificación del espacio interno ITS de la región del DNA ribosomal, según BLAST en NCBI.

Nombre de la cepa	Puntuación más alta	Puntuación Total	Cobertura	Valor de E	Identidad	Género/Especie
Ma8	976	976	99 %	0.0	99 %	<i>Metarhizium robertsii</i>
Bb9	1040	1040	99 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>
Bb19	1051	1051	99 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>
Bb21	1057	1057	98 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>
Ma22	1035	1035	100 %	0.0	99 %	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Bb23	1064	1064	100 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>

La importancia del uso de técnicas moleculares en la patología de insectos, lo representa el trabajo de Glare *et al.*, (1996), quienes encontraron que la morfología de las fiálides de un solo aislado de *M. anisopliae* podía variar dentro del mismo cultivo, así como entre diferentes sustratos. Además, ellos concluyeron que la morfología de las conidias era el único carácter morfológico útil para la identificación. Sin embargo, en el caso de la diferenciación entre *M. anisopliae*, inclusive este carácter resultaba limitado. De ahí la trascendencia de las actuales técnicas moleculares de identificación, ya que, para la epidemiología, ecología y el manejo integrado de plagas es importante identificar las especies de entomopatógenos con exactitud. En el presente trabajo se pudieron identificar a tres especies distintas de hongos entomopatógenos a nivel morfológico y molecular, empleando éstas mismas técnicas. Con esto, se puede inferir que los hongos entomopatógenos se pueden aislar con relativa facilidad del suelo, pero aún es necesario realizar bioensayos para determinar su nivel de patogenicidad contra el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*.

CONCLUSIÓN

Los hongos entomopatógenos aislados de suelos agrícolas de maíz de los municipios de Irapuato, Cueràmaro y León Guanajuato fueron: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium robertsii*

El aislado más abundante de los hongos entomopatógenos procedentes de suelos agrícolas de maíz fue *Beauveria bassiana*.

Se extrajo ADN cromosómico de buena calidad de los tres géneros de hongos aislados.

Se obtuvieron amplicones de los ITS (650 a 850 pb) de los hongos entomopatógenos cuya secuencia permitió identificar las especies de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *M. robertsii*.

Mediante secuenciación de los fragmentos ITS de los aislados y comparando éstas con lo reportado en el banco del NCB, se logró determinar la homología del 99 % para *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium robertsii*.

Literatura Citada

- Cardona, W., Kattan, G. and P. C. De Ulloa. 2013. Nonpollinating Fig Wasps Decrease Pollinator and Seed Production in *Ficus andicola* (Moraceae). *Biotropica*, 45: 203–208.
- García, C., González, M. B. y N. Bautista. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37: 217–222.
- Hatting, J. L., Humber, R. A., Poprawski, T. J. and R. M. Miller. 1999. A survey of fungal pathogens from South Africa with special reference to cereal aphids. *Biocontrol*, 16: 1–12.
- Hernández, A. A. y A. M. Hansen. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27: 115–127.
- León-García, I., Rodríguez-Leyva, E., Ortega-Arenas, L. D., y J. F. Solís-Aguilar. 2012. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a insecticidas asociada a Césped en Quintana Roo, México. *Agrociencia*, 463: 279–287.
- Mullis, K. H. and F. A. Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335–350.
- Nascimento, A. R. B. D., Farias, J. R., Bernardi, D., Horikoshi, R. J. and C. Omoto. 2015. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest management science*, 72(4): 810–815.
- Vanninen, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland effect of geographical location, habitat and soil type. *Mycological Research*, 76: 1198–1204.
- Zapata, M. y E. Kossau. 1965. *Una contribución al estudio del control químico del "Cogollero" del maíz Laphygma frugiperda*. Departamento de Entomología, Universidad Agraria. Boletín Técnico Control de Plagas del Maíz.