

**Identificación Molecular y Actividad Patogénica
de Aislamientos de *Beauveria bassiana* contra
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)**

Author(s): Cipriano García Gutiérrez, Ninfa María Rosas García,
Cosme Bojórquez Ramos y Jorge Soto Alcalá

Source: Southwestern Entomologist, 40(3):539-544.

Published By: Society of Southwestern Entomologists

<https://doi.org/10.3958/059.040.0312>

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.3958/059.040.0312>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

Identificación Molecular y Actividad Patogénica de Aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**Molecular Identification and Pathogenic Activity of *Beauveria bassiana* Isolates against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**

Cipriano García Gutiérrez¹, Ninfa María Rosas García², Cosme Bojórquez Ramos¹, y Jorge Soto Alcalá³

Abstract. Twenty two monosporic *Beauveria bassiana* isolates obtained from maize soil were identified by molecular techniques. Genomic DNA was amplified by PCR using the primers pair ITS1 and ITS4. These primers amplified for 550 bp fragment that includes part of the 18 S subunit, ITS1, 5.8 S subunit, ITS2, and 28 S subunit of the ribosomal DNA. The DNA was cloned with *E coli* JM 109, and then a new PCR was carried out using the M13F and M13R primers. After that, the DNA product was sequenced it was assessed by the NCBI BLAST program, resulting a homology of 99% with other species of *B. bassiana* in the GeneBank. Ten monosporic *B. bassiana* isolates were evaluated at 1.2×10^6 conidia/ml against neonate larvae of fall armyworm *S. frugiperda*. The better isolate of *B. bassiana* code CIDDB02 with assessed number KP860298 had LC_{50} of 2.3×10^7 conidia/ml, with 100% of insect mortality 72 h after conidia inoculation. This study allowed us to identify fast and reliably one *B. bassiana* isolated with highest pathogenic activity against the fall armyworm.

En Sinaloa se producen 3.6 millones de toneladas de maíz al año, con un rendimiento promedio de 7.3 ton/ha (SAGARPA 2013). En este cultivo el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es la plaga principal, ya que los daños que ocasiona causa pérdidas significativas en este cultivo (García et al. 2011). Debido a esto es controlado con insecticidas sintéticos, por lo que se ha calculado que en México se utilizan más de 3,000 ton de ingrediente activo insecticida para controlar a *S. frugiperda* (Blanco et al. 2014).

Los hongos entomopatógenos (HE) *Beauveria bassiana* (Vuill) y *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) son una alternativa viable para desarrollar bioinsecticidas para el control de esta plaga (Kaur y Padmaja 2008, García et al. 2011). Por lo que el objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente aislamientos de *B. bassiana* y evaluar su actividad patogénica en laboratorio contra larvas del gusano cogollero.

Veintidós aislamientos identificados como *Beauveria bassiana*, provenientes de suelo cultivado con maíz en Durango y Sinaloa fueron proporcionados por el

¹Instituto Politécnico Nacional, COFAA-CIIDIR Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave Sinaloa. C.P.81101. cgarciag@ipn.mx.

²Instituto Politécnico Nacional, COFAA-CBG. Blvd. del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710, Cd. Reynosa, Tamps, México.

³Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Carret. a la Brecha y México 15, Guasave, Sinaloa.

CIIDIR IPN Unidad Sinaloa. Los aislamientos fueron propagados a partir de cultivos monospóricos en medio PDA para su análisis genético en el Centro de Biotecnología Genómica IPN de Reynosa, Tamaulipas.

El ADN fue extraído de acuerdo a Hoffman y Winston (1987). De cada cultivo monospórico se tomaron 100 mg de micelio y se colocaron en tubos de 1.5 ml. A cada tubo se le agregó agua miliQ estéril y se agitó en el vórtex a velocidad máxima por 10 s. Posteriormente cada tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 5 s y se descartó el sobrenadante. A cada tubo se añadieron 0.2 ml de solución de lisis (TrisHCl 10 mM, pH 8.0; NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, SDS al 1% y Tritón X-100 2%) y el contenido se maceró con un pistilo de plástico. Cada tubo se agitó en el vórtex a velocidad máxima por 2 min y luego se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se colectó en un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 0.2 ml cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se agitó por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 3 µl de RNasa A (Sigma, St. Louis, MO) y la mezcla se incubó a 37°C por 15 min. Se adicionó 1 vol de isopropanol al 100 % y se incubó por 1 h a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla de ADN. Finalmente se lavó con 1 vol de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se re-suspendió la pastilla de ADN en 30 µl de agua ultra pura estéril y se almacenó a 4°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T 100 JB Lab (Life Science, Hercules, CA), con los iniciadores universales ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White et al. 1990) que amplifican un fragmento de 550 pb que abarca la secuencia parcial de la subunidad 18 S, el ITS1, la subunidad 5.8 S, el ITS2, y la secuencia parcial de la subunidad 28 S del ADN ribosomal. La mezcla de reacción para PCR fue preparada en un volumen final de 25 µL, con 2 µL de cada iniciador, 2.5 µL de MgCl₂ 5X, 1 µL de dNTPs 2.5 mM, 0.5 µL de *Taq* polimerasa y 1 µL de ADN. Las amplificaciones fueron realizadas con un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 2 min, extensión a 72°C por 1 min) y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. La electroforesis de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 0.8%, con un tiempo de corrida de 60 min a 90 V y después se visualizaron en luz UV.

El ADN obtenido en la reacción de PCR, se ligó a un vector de clonación (PGEMTeasy) (Promega, Life Tech. Mex.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de ligación se clonó en células competentes de *E. coli* JM 109 (Promega). El inserto de interés fue sometido a una reacción de PCR con los primers M13F y M13R (Invitrogen, Carlsband, CA) y las bandas obtenidas fueron secuenciadas. Las secuencias se alinearon con el programa BLAST del GenBank, a fin de determinar los porcentajes de homología con las especies previamente reportadas y confirmar con esto su identidad. Estas se analizaron mediante el software DNA-STAR con la opción Clustal W-Method (DNASTAR, Inc., Madison, WI).

Para las pruebas de patogenicidad primero se estableció la colonia del gusano cogollero en laboratorio a 28°C, 70% HR, y fotoperiodo de 16:8 L:O, alimentando a las larvas con la dieta artificial reportada por Hernández et al (1989). Se hizo un bioensayo para determinar la actividad patogénica de 10 aislamientos de *B. bassiana* a una concentración de 1.2 x 10⁶ conidios/ml contra larvas del gusano cogollero de la siguiente manera. Se realizó una aplicación tópica con 100

µl de la suspensión de conidios de manera individual sobre 25 larvas de 3 a 5 días de desarrollo. Posteriormente éstas se colocaron en vasos de plástico de 30 ml con 5 ml de dieta artificial para que se alimentaran. La mortalidad de larvas se registró a los 7 días. Para cada aislamiento se probaron tres repeticiones y un control. Se seleccionó el aislamiento más patogénico, y se determinó a este la CL₅₀ mediante otro bioensayo utilizando 5 concentraciones diferentes (1.8x10⁵ a 1.3x10⁹) conidios/ml, los datos de mortalidad de larvas por concentración fueron analizados en el programa PROBIT (Finney1952).

Los resultados de la caracterización molecular de cepas indicó que las secuencias analizadas de la región ribosomal de seis aislamientos puros corresponden a *B. bassiana* con una homología del 99%, estas secuencias fueron registradas en el Genbank (Fig. 1). Se seleccionó de estas a la cepa de *B. bassiana* clave CIDDB02 con código de acceso al GenBank KP860298, debido a que mostró la mayor mortalidad de larvas 51.3% en el bioensayo de patogenicidad a 1.2 x 10⁶ conidios/ml. La CL₅₀ de esta cepa fue de 2.3x10⁷ conidios/ml, con límites de confianza inferior y superior de 3.0 x 10⁶ a 4.4 x 10⁷ conidios/ml. La infección de las larvas con esta cepa inició a las 24 h, luego los insectos cesaron de alimentarse presentando inactividad, y el 100% murió a las 72 h después de la inoculación de conidios; no obstante, la emergencia de los conidios sobre el insecto se presentó a los 8 días después de la inoculación. Este estudio permitió identificar con rapidez y confiabilidad, aislamientos de *B. bassiana*, y mediante los bioensayos se hizo la selección de una cepa altamente patogénica con potencial para el desarrollo de una formulación para el control del gusano cogollero del maíz.

KP860298 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860299 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860300 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860301 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860302 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860303 1 TAG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC CGA GTT TTC AAC
TCC CTA ACC CTT CTG TGA ACC TAC CTA TCG TTG CTT CGG 78

KP860298 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860299 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860300 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860301 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860302 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860303 79 CGG ACT CGC CCC AGC CCG GAC GCG GAC TGG ACC AGC GGC
CCG CCG GGG ACC TCA AAC TCT TGT ATT CCA GCA TCT TCT 156

KP860298 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATT AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234
KP860299 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATC AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234
KP860300 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATT AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234
KP860301 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATT AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234
KP860302 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATT AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234
KP860303 157 GAA TAC GCC GCA AGG CAA AAC AAA TGA ATT AAA ACT TTC
AAC AAC GGA TCT CTT GGC TCT GGC ATC GAT GAA GAA CGC 234

KP860298 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGC 312
KP860299 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGC 312
KP860300 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGC 312
KP860301 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGT 312
KP860302 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGC 312
KP860303 235 AGC GAA ACG CGA TAA GTA ATG TGA ATT GCA GAA TCC AGT
GAA TCA TCG AAT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC GCC AGC 312

KP860298 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGG GGT CGG CGT TGG GGA CCG GCA 390
KP860299 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGA GGT CGG CGT TGG GGA CCG GCA 390
KP860300 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGG GGT TGG CGT TGG GGA CCG GCA 390
KP860301 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGG GGT CGG CGT TGG GGA CCG GCA 390
KP860302 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGG GGT CGG CGT TGG GGA CCG GCA 390
KP860303 313 ATT CTG GCG GGC ATG CCT GTT CGA GCG TCA TTT CAA CCC
TCG ACC TCC CCT TGG GGG GGT TGG CGT TGG GGA CCG GCA 390

KP860298 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468
KP860299 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468
KP860300 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468
KP860301 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468
KP860302 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468
KP860303 391 GCA CAC CGC CGG CCC TGA AAT GGA GTG GCG GCC CGT CCG
CGG CGA CCT CTG CGC AGT AAT ACA GCT CGC ACC GGA ACC 468

KP860298 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC TTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546
 KP860299 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC TTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546
 KP860300 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC CTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546
 KP860301 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC TTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546
 KP860302 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC TTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546
 KP860303 469 CCG ACG CGG CCA CGC CGT AAA ACA CCC AAC CTC TGA ACG
 TTG ACC TCG AAT CAG GTA GGA CTA CCC GCT GAA CTT AAG 546

KP860298 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563
 KP860299 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563
 KP860300 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563
 KP860301 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563
 KP860302 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563
 KP860303 547 CAT ATC AAG AAG CGG AG 563

Fig. 1. Alineamiento de secuencias del ADN ribosomal de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* obtenidos con los primers ITS1- ITS4.

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of ribosomal DNA from six isolates of *Beauveria bassiana* obtained with the ITS1- ITS4 primers.

Referencias Citadas

- Blanco, C. A., J. G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Terán-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of an integrated pest management program. *J. Int. Pest Manag.* 5: DOI:<http://dx.doi.org/10.1603/IPM14006>.
- DNASTAR. Madison, Wisconsin. Dnasatr.com. <http://www.dnastar.com/t-about.aspx>
- Finney, D. J. 1952. *Biological Method in Biological Assay*. Griffin & Co, London.
- García, G. C., M. B. González, y M. N. Bautista. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 37: 217-222.
- Hernández, D., F. Ferrer, y B. Linares. 1989. Introducción de *Telenomas remus* Nixon (Hym.: Scelionidae) para controlar *Spodoptera frugiperda* (Lep.: noctuidae) en Yaritagua, Venezuela. *Agronomía Trop.* 39: 45-61 http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3946/Arti/hernandez_d.htm
- Hoffman, C. S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Kaur, G., and V. Padmaja. 2008. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2: 299-307.

- SAGARPA. 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinsky, and T. J. White [eds.], PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.