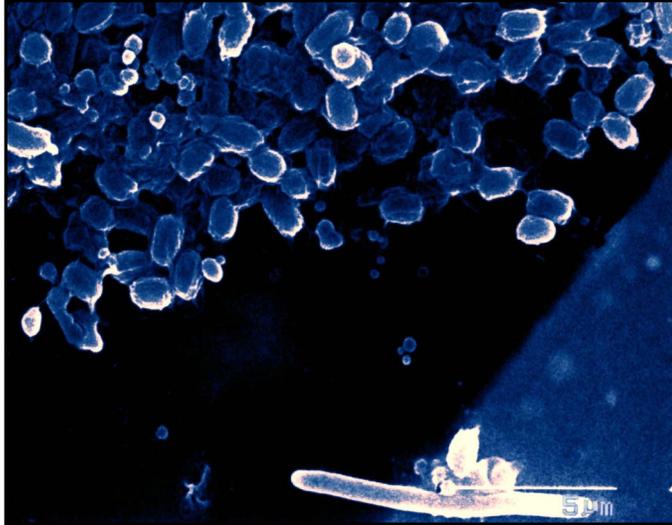


**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Escuela de Biología  
Ingeniería en Biotecnología**



**Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica  
Grupo Ingeniería Genética de Cultivos**

**“Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari)”**

**Proyecto de graduación para optar por el grado de Bachiller en Biotecnología**

Alejandro Hernández Soto

Cartago, 2002

**Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari)**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Ana Mercedes Espinoza, Ph.D.  
Profesora Asesora**

---

**Miguel Rojas, Ph.D.  
Lector**

---

**Johnny Peraza, MSc.  
Lector**

*A mis padres*  
*A mis hermanos*

## *Agradecimientos*

Primeramente a Dios por brindarme salud y fortaleza en cada momento.

A Doña Ana Mercedes Espinoza por la oportunidad de realizar la práctica en el grupo de investigación, por su dedicación, paciencia y labor de dirección que emprendió con sabiduría en este proceso y en especial a la hora de la redacción y evaluación de los resultados.

Al encargado del laboratorio de *Bt* Glen Arrieta por sus enseñanzas, consejo y ayuda incondicional que hicieron posible la presente investigación.

A Rebeca Mora, Adriana Obando, Griselda Arrieta y Erwin Gamboa por su ayuda durante las giras y sus estimables observaciones y aportes. Al grupo Ingeniería Genética de Cultivos del CIBCM por su compañerismo y amabilidad.

A los profesores del ITCR quienes han sido no solo formadores de ideas y fuente de conocimiento, sino también amigos y compañeros que tienden la mano en cada instante.

## ***Reconocimiento***

A mi directora de tesis Doña Ana Mercedes Espinoza y a los lectores Miguel Rojas y Jhonny Peraza.

## Resumen

El café es de gran importancia económica y social para Costa Rica. La principal plaga para este cultivo es la broca (*Hypothenemus hampei*). Las medidas de control que existen para esta plaga son ineficientes, costosas y de difícil implementación. La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) representa una nueva estrategia de control sostenible, ya que sintetiza proteínas insecticidas específicas. Esta bacteria se puede utilizar para la producción de bioinsecticidas inocuos para otros seres vivos, o bien para conferir resistencia a plagas mediante la expresión de las proteínas Cry o  $\delta$ -endotoxinas en el genoma de plantas mejoradas por ingeniería genética. Esta estrategia plantea la necesidad de obtener una colección amplia de cepas *Bt*. El objetivo de esta investigación fue el establecimiento de una bacterioteca de *Bt*, aislada a partir de agroecosistemas donde *H. hampei* era abundante. Para ello se colectaron 417 muestras ambientales en 5 fincas ubicadas en el Valle Central y una fuera del mismo, 110 muestras correspondieron a: suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados y 317 a insectos muertos. De las 417 muestras procesadas, se logró aislar 250 cepas con morfología de colonia similar a *Bt*, y de ellas, un total de 162 mostraron cristales. Se presentó una gran diversidad de cristales por cepa y entre las diferentes cepas. Las morfologías más frecuentes fueron la redondeada, irregular y romboidal. En el análisis electroforético de las proteínas Cry, 65 de las 162 cepas, mostraron patrones proteicos prominentes de diversos pesos moleculares entre los 20 y 145 KDa y se seleccionaron para su análisis por PCR de diferentes genes *cry1*, *cry3-cry7*, *cry8*, *cry11*, *cry5-cry12-cry14*, *cyt*, *vip1*, *vip2* y *vip3* (colección base). De las restantes 97 que mostraron patrones tenues, se seleccionaron 40 cepas con  $\delta$ -endotoxinas de pesos moleculares que oscilaran entre los 50-80KDa y se analizaron con los iniciadores *cry3-cry7* (colección complementaria). De la colección base, un 97% amplificaron con los iniciadores para *vip3*, seguido de *cry1* con 47%, *cry3-cry7* con 20%, *cry8* y *vip2* con 6% y *vip1* con 3%. Algunas cepas presentaron combinaciones entre estos genes, detectándose 16 perfiles genéticos diferentes para la subfamilia de genes *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D* y *cry1E*). Un total de 27 de las 40 cepas de la colección complementaria, amplificaron con los iniciadores *cry3-cry7*. En total, se dispone de 38 cepas con genes *cry3-cry7*, dos cepas con genes *cry3-cry7* y *cry8*, dos cepas con los genes *cry8* y cuatro cepas con los genes *cry1B* con potencial para combatir coleópteros.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, *Hypothenemus hampei*, bacterioteca,  $\delta$ -endotoxinas, café.

## Índice general

<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Revisión de literatura.....</b>	<b>12</b>
2.1	El cultivo del café y su influencia en la economía y sociedad costarricense .....	12
2.2	Impacto de <i>Hypothenemus hampei</i> , taladrador del fruto del café .....	13
2.3	Medidas tradicionales de combate .....	14
2.4	Una nueva estrategia de combate sostenible.....	16
2.5	<i>Bacillus thuringiensis</i> como fuente de proteínas bioinsecticidas y genes para la transformación genética de plantas .....	17
<b>3</b>	<b>Objetivo general .....</b>	<b>20</b>
3.1	Objetivos específicos .....	20
<b>4</b>	<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>21</b>
4.1	Localización del estudio.....	21
4.2	Colectas en campo .....	21
4.3	Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
4.4	Análisis de las cepas por microscopía de luz y electrónica.....	24
4.5	Almacenamiento de las cepas .....	25
4.6	Análisis de las proteínas Cry mediante SDS-PAGE .....	25
4.7	Extracción y cuantificación de ADN .....	26
4.8	Amplificación mediante PCR y análisis de los productos en geles de agarosa .....	27
<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
5.1.	Establecimiento de una bacterioteca de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de la broca del café.....	30
5.2.	Caracterización de los aislamientos de <i>Bt</i> según la morfología de los cristales.....	33
5.3.	Determinación de los pesos moleculares de las proteínas Cry de las cepas de <i>Bt</i> .....	35
5.4.	Amplificación por PCR de los genes <i>cry</i> , <i>cyt</i> y <i>vip</i> .....	37
5.5.	Correlación del tipo de muestra ambiental con la caracterización morfológica y molecular de las cepas.....	43
<b>6</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>60</b>
10.1	Microscopía de luz .....	60
10.2	Coordenadas geográficas de los sitios de colecta.....	66
10.3	Medios de cultivo y reactivos .....	67

## Índice de Figuras

Figura 1. Frutos de café ( <i>Coffea arabica</i> ) infestados por la broca ( <i>Hypothenemus hampei</i> ) .....	14
Figura 2. Fotografías al microscopio electrónico de barrido de la espora (e) y el cristal romboidal (c) de <i>Bacillus thuringiensis</i> . .....	17
Figura 3. Muestras ambientales de cafetales utilizadas para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> . En (A) suelo, (B) hojarasca, (C) follaje y (D) frutos infestados con broca .....	22
Figura 4. Insectos de <i>H. hampei</i> que se utilizaron para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> . En A) insectos obtenidos de trampas y en B) adultos y larvas muertas obtenidas a partir de frutos de café infestados.....	23
Figura 5. Morfología de colonia de <i>Bacillus thuringiensis</i> . En A) colonia en fase vegetativa y en B) colonia esporulada.....	24
Figura 6. Almacenamiento de las cepas en: (A) en papel filtro estéril y (B) glicerol al 40%. .....	25
Figura 7. Línea de tendencia exponencial construida a partir de proteínas de peso molecular conocido y utilizada para el cálculo del peso de las $\delta$ -endotoxinas de <i>Bt</i> en geles de poliacrilamida. ....	26
Figura 8. Localización en el mapa de Costa Rica de los sitios de colecta de muestras ambientales para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> . .....	31
Figura 9. Tipos de cristales de las cepas con morfología de colonia similar a <i>Bacillus thuringiensis</i> , observados mediante microscopía de luz. ....	33
Figura 10. Microfotografías tomadas al microscopio electrónico de barrido que muestran la diversidad de cristales de las cepas 79 (A y B) y 220 (C y D) de la colección. En A) espora (e), cristales romboidales (ro) y cuadrados (c), (barra =2 $\mu$ m). En B) esporas (e), cristales redondeados de diversos tamaño (re) y cuadrado (c), (barra = 5 $\mu$ m). En C) irregulares de diversos tamaños (i), (barra =5 $\mu$ m). En D) redondeados de diversos tamaños (re), espora (e) e irregulares (i), (barra = 4 $\mu$ m).....	34
Figura 11. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra las $\delta$ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> . En los carriles 1,4 y 5 se muestran los patrones electroforéticos de las cepas CIBCM 64, 73 y 74 respectivamente, en el carril 8 y 9 las cepas control <i>Btt</i> y CIBCM-97 y en el carril 2, 3, 6 y 7 los marcadores de peso molecular.....	36
Figura 12. Cepas de la colección base de <i>Bacillus thuringiensis</i> que amplificaron por PCR con los iniciadores para <i>cry1</i> , <i>cry3-cry7</i> , <i>cry8</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> y <i>vip3</i> .....	39
Figura 13. Cepas de la colección base de <i>Bacillus thuringiensis</i> que amplificaron por PCR con los iniciadores específicos para la subfamilia <i>cry1</i> . .....	40

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas como controles para las ampliaciones por PCR.....	28
Cuadro 2. Producto de PCR, secuencia y temperatura de desnaturalización de los iniciadores que se utilizaron para la caracterización de genes <i>cry</i> , <i>cyt</i> y <i>vip</i> de las cepas de <i>Bt</i> . .....	29
Cuadro 3. Características de las fincas a partir de las cuales se colectaron muestras para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	30
Cuadro 4. Muestras de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados utilizadas para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> según el sitio de origen .....	32
Cuadro 5. Muestras de insectos obtenidos para el aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> según el sitio de origen a partir de trampas y de la disección de frutos infestados .....	32
Cuadro 6. Análisis de los pesos moleculares de las $\delta$ -endotoxinas de las cepas que presentaron bandas prominentes en geles de poliacrilamida (cepario base). .....	35
Cuadro 7. Análisis de los pesos moleculares de las $\delta$ -endotoxinas del cepario complementario (cepas que presentaron bandas poco prominentes en geles de poliacrilamida). .....	36
Cuadro 8. Cepas de la colección base de <i>Bt</i> que amplificaron por PCR con los iniciadores para familias de genes <i>cry1</i> , <i>cry3-cry7</i> , <i>cry8</i> y <i>vip1</i> , <i>vip2</i> y <i>vip3</i> . .....	37
Cuadro 9. Cepas de la colección base que amplificaron por PCR con los iniciadores específicos de la subfamilia de genes <i>cry1</i> .....	41
Cuadro 10. Distribución y frecuencia del perfil de los genes <i>cry1</i> presentes en la colección base.....	42
Cuadro 11. Resumen de la caracterización de la colección base de cepas de <i>Bt</i> según el tipo de muestra, morfología de los cristales, peso molecular de las $\delta$ -endotoxinas y genes <i>cry</i> y <i>vips</i> . .....	43
Cuadro 12. Resumen de la caracterización de la colección complementaria de cepas de <i>Bt</i> según el tipo de muestras, morfología de los cristales, proteínas Cry y genes <i>cry3-cry7</i> que contienen. ....	46

## 1. Introducción

El café es desde hace más de trescientos años, una de las mercancías más importantes del comercio internacional. Su popularidad se originó desde el siglo XVI, tiempo en el que las casas de café de Constantinopla y Europa se convirtieron en centros de reunión de personas cultas que llegaban a platicar sobre política, ciencia y literatura, estimulados por la aromática bebida (González, 1998).

Las principales zonas mundiales de producción de café son Centroamérica y el Caribe, Suramérica, Asia/Oceanía y África. Costa Rica es un reconocido exportador de café de alta calidad desde mitades del siglo XIX. El cultivo y la comercialización de este producto, son de gran importancia económica y social para nuestro país.

El cultivo del cafeto tiene varias limitantes fitosanitarias, sin embargo, la plaga de mayor importancia económica en el mundo es la broca del fruto del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Le Pelley, 1968). La broca del café fue encontrada por primera vez en granos de café de África por Ferrari en 1867. A principios del siglo XX se le consideró la plaga de más importante del café y de 1902 a 1943 se distribuyó por todo el continente Africano, especialmente en Gabón, Angola, Uganda y Tanganika (Borbón, 1991). *Hypothenemus hampei* apareció por primera vez en el continente Americano en el año 1913, en Brasil. En Centroamérica se detectó en 1971 en Honduras, seguido de México en 1978, El Salvador en 1981, Nicaragua y Colombia en 1988 y Costa Rica en año 2000.

Esta plaga puede causar pérdidas hasta de un 80% de la producción, ocasiona disminución en la calidad y precio del café. Las medidas de control que actualmente existen son costosas, de difícil implementación y no mejoran los rendimientos de producción. Es por ello necesario buscar nuevas estrategias de combate sostenible.

Una de estas estrategias es el control de la plaga mediante la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria sintetiza una gran cantidad de proteínas tóxicas a diversos órdenes de insectos, de manera muy específica. Su utilidad no solo se limita a su potencial

como controlador biológico, sino también a la posibilidad de la expresión de sus toxinas en el genoma de especies vegetales para conferir resistencia a plagas.

Esta estrategia plantea la necesidad de aislar *Bt* y crear una colección amplia de cepas que tengan potencial para controlar *H. hampei*. De tal manera que se disponga de cepas caracterizadas molecularmente para realizar bioensayos en una forma eficiente.

La presente investigación tiene como objetivo la preparación de una colección de cepas 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.

## **2 Revisión de literatura**

### **2.1 El cultivo del café y su influencia en la economía y sociedad costarricense**

El café, como actividad agrícola y empresarial, ha contribuido al desarrollo económico y social de Costa Rica desde la mitad del siglo XIX. Gracias a esta actividad, nuestro país dejó de ser la nación más pobre de Centroamérica en 1832, para convertirse en unos pocos años en una de las repúblicas más desarrolladas en materia de educación, salud e infraestructura en el área (González, 1998). En los años cincuenta, esta labor producía el 50% del total de divisas que recibía el país, y hoy en día, su importancia económica y social se reflejan en las 100 000 hectáreas que se siembran en el país, de las cuales 80 000 están en producción.

La importancia económica del cultivo es incuestionable, en el año 2001 la exportación produjo 162 080 millones de colones en divisas, lo que representó el 3,2 por ciento del PIB (Datos de PROCOMER). Socialmente el cultivo del café juega un papel fundamental en la estabilidad del país, ya que la actividad está en manos de 75000 productores, de los cuales el 90 por ciento son pequeños caficultores, organizados en su mayoría en 20 cooperativas (González, 1998). La recolección, transporte, beneficiado y procesamiento industrial del café, emplea directa e indirectamente a 500 000 personas, incluyendo mano de obra inmigrante como trabajadores agrícolas nicaragüenses y panameños e indígenas (Datos del ICAFE).

El café tiene una amplia distribución, en el país se siembra en las siete provincias de Costa Rica, al norte de la Cordillera Volcánica Central, al sur y suroeste en la Cordillera de Talamanca, al oeste y noroeste en los cerros de La Carpintera, Escazú, Puriscal y el Aguacate. Otras zonas importantes se ubican al sur del país, en los cantones de Pérez Zeledón y Coto Brus, al norte de San Carlos, en algunas zonas de Sarapiquí y en las tierras altas de Guanacaste (López, 1994).

El consumo mundial del café está orientado mayoritariamente hacia las variedades de café arábigo de alta calidad por su buen aroma, sabor y por su menor cantidad de cafeína en

comparación con el robusta. En este sentido, Costa Rica es reconocida globalmente como suplidor de café de calidad, y tiene una mejor aceptación que la mayoría de café del grupo suave y los arábigos brasileños (González, 1998). Es por ello que, aspectos que alteren la calidad del café nacional, incidirán en la imagen internacional de nuestro café y por ende en su mercado.

El cultivo del café tiene varios inconvenientes fitosanitarios, sin embargo el de mayor potencial de daño y repercusión económica es la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, orden Coleoptera: Curculionidae, Familia Scolytidae) que constituye la plaga de café más importante en el mundo (La Pelley, 1968).

## **2.2 Impacto de *Hypothenemus hampei*, taladrador del fruto del café**

*H. hampei* tiene una amplia distribución y actualmente es una plaga del café en más de 60 países en las regiones tropicales de Asia, África, América y Oceanía. La plaga fue introducida al continente americano desde África Ecuatorial por América del Sur, a través de Brasil en 1913 y se estableció en Centroamérica desde las décadas de los 70 y 80. En Costa Rica se pudo evitar su entrada gracias a medidas cuarentenarias, sin embargo, el insecto apareció por primera vez en el país en el año 2000 (MAG, 2000) y actualmente se distribuye en 139 focos en el Valle Central (ICAFE, 2002).

El comportamiento y la ausencia de enemigos naturales de importancia en las zonas de introducción, permiten que *H. hampei* se adapte rápidamente a diversas zonas agroecológicas e incrementa aceleradamente su población (Guharay y Monterrey, 1997). *H. hampei* se alimenta de frutos del café en todas las fases de maduración, utilizándolos como sitios de reproducción, desarrollo y refugio durante la mayor parte de su ciclo de vida (Fig.1) (Le Pelley, 1968). Esto ocasiona importantes pérdidas en el rendimiento como lo es el aumento en la cantidad de frutos vanos, la caída de los frutos inmaduros y la disminución en el peso de los granos (Guharay y Monterrey, 1997).



**Figura 1.** Frutos de café (*Coffea arabica*) infestados por la broca (*Hypothenemus hampei*).

La broca puede provocar reducciones de hasta un 80 por ciento de la producción y en algunos casos producir pérdidas totales. Los frutos vanos se separan al flotar en el sifón de recibo de los beneficios, y se les considera como café de inferior calidad, lo que se refleja en un precio menor al productor. Además, a los granos perforados les penetra humedad, lo que facilita el ataque de hongos y en consecuencia su oxidación y pudrición, afectando la calidad de la bebida, y disminuyendo el precio en \$15 por saco de 46 kilogramos (López, 1994).

Por otra parte, el combate de la broca aumenta los costos de producción debido a las prácticas adicionales para el manejo de esta plaga. Estas labores no aumentan el rendimiento del cafeto, por el contrario, en el mejor de los casos, únicamente se recuperan los niveles de rendimiento obtenidos antes de la llegada de la broca (Guharay y Monterrey, 1997).

### **2.3 Medidas tradicionales de combate**

Para el control de la broca se utilizan varias estrategias, principalmente prácticas culturales. Por ejemplo, la medida más recomendable es la recolección manual de frutos caídos y los dejados en la planta después de la cosecha (Guharay y Monterrey, 1997). Sin embargo es una estrategia costosa y de difícil adopción, particularmente en cafetales abandonados y en plantaciones con pendientes pronunciadas, topografía que es prevalente en la mayoría de las zonas cafetaleras del país. Otras prácticas culturales como podas, coberturas,

manejo de la sombra y control de malezas, pueden crear un ambiente desfavorable para el insecto.

Una estrategia alternativa es el control biológico con depredadores y parasitoides (Portilla y Bustillo, 1995), esta última práctica representa un alto costo de producción y tendría inconvenientes cuarentenarios porque requiere la introducción y establecimiento de parasitoides exóticos al país. Existe además, la dificultad del establecimiento de la cría de la broca y del parasitoide, actividad se dificulta, primero por la cosecha de los frutos infestados, después, por la escasez de frutos infestados durante el período intercosechas (Muñoz, 2001; Castillo *et al.*, 2001). Otra limitante en este sistema de control radica en que solamente se produce un impacto significativo sobre las poblaciones de la broca en el corto plazo si se liberan masivamente parasitoides (ECOSUR, SA).

La broca puede además, ser parasitada por los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* siempre y cuando esta no haya taladrado profundo en el fruto y si existe humedad excesiva, la viabilidad del hongo disminuye (Castillo *et al.*, 2001). Algunos bioinsecticidas basados en este hongo, han mostrado un efecto inconsistente principalmente debido a que depende de condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa, así como por otros factores como el grado de incidencia de la broca, equipo de aspersión, dosis y calidad de la cepa utilizada (Muñoz, 2001).

La alternativa más inmediata para el agricultor es la aplicación de insecticidas sintéticos organoclorados como el endosulfán. Sin embargo, este insecticida es altamente tóxico (LD50 160mg/Kg) y mutagénico, contamina suelos y fuentes de agua (Nivia *et al.*, 2001), es dañino a la vida silvestre, genera resistencia y favorece el surgimiento de plagas secundarias como los minadores foliares (Información SANINET). Es importante indicar que el caficultor nacional tradicionalmente no utiliza insecticidas y su aplicación indiscriminada podría eventualmente provocar graves problemas en el ecosistema sobre organismos

benéficos. Por lo tanto los insecticidas sintéticos deberían ser utilizados como último recurso y únicamente en focos de alta infestación (Bustillo *et al.*, 1998).

## **2.4 Una nueva estrategia de combate sostenible**

Debido al impacto económico que esta plaga ocasionará a la caficultura y a la economía del país, se debe combatir integralmente el problema con un plan nacional. Esto ha despertado el interés de los sectores involucrados con la actividad cafetalera y por parte de las instituciones públicas de investigación por encontrar nuevas alternativas que protejan el ambiente y que disminuyan los efectos perjudiciales que produce el uso de insecticidas sintéticos. Dos métodos de combate que el país estaría en capacidad de realizar a mediano plazo es el control de la plaga mediante insecticidas biológicos inoos, y a largo plazo, desarrollar variedades de café resistentes a la broca mediante ingeniería genética.

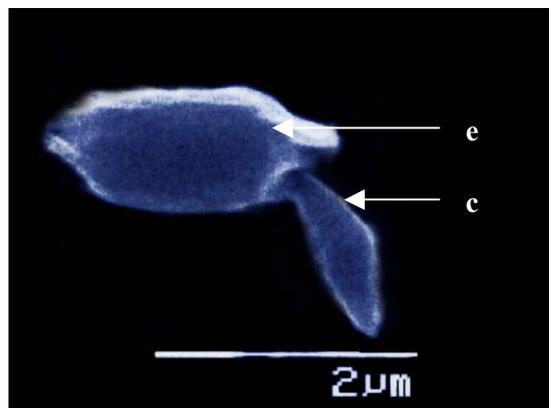
Una estrategia que ha mostrado proteger los ecosistemas agrícolas y naturales es el uso de bioinsecticidas formulados a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Gustafson *et al.*, 1997, Dulmage 1971). Estos productos se han utilizado en el control biológico de diversas plagas, principalmente larvas de lepidópteros (Aronson *et al.* 1986), tanto en sistemas de agricultura tradicional, como orgánica.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, aerobia y formadora de endosporas (Aronson, 1994) (Fig. 2). Durante la fase de esporulación, sintetiza  $\delta$ -endotoxinas que son depositadas como inclusiones intracelulares de diversa geometría (bipiramidales, circulares, cuadrados, irregulares) y que son potencialmente tóxicas para más de 18 especies de insectos (Audtho *et al.*, 1999). Debido a la abundancia de cepas con diferentes especificidades, ofrece posibilidades de control para diferentes insectos plagas. Su uso como bioinsecticida tiene varias ventajas como lo es la posibilidad de mezclar cepas con  $\delta$ -endotoxinas que reconozcan receptores diferentes, de tal forma que la probabilidad de surgimiento de resistencia a largo plazo se reduce considerablemente (Sivasupramaniam *et al.*, 2000). Contrario a los insecticidas sintéticos, son muy específicos contra un grupo de insectos

o plagas invertebradas, por lo que las endotoxinas son inocuas a mamíferos, anfibios, pájaros, aves y reptiles (Schnepf *et al.*, 1998; Ballester, *et al.*, 1999).

### **2.5 *Bacillus thuringiensis* como fuente de proteínas bioinsecticidas y genes para la transformación genética de plantas**

La efectividad de *Bt* como bacteria entomopatógena radica en su capacidad de sobrevivir en ambientes desfavorables mediante la producción de estructuras de resistencia conocidas como esporas, en sincronía con proteínas bioinsecticidas. Las proteínas bioinsecticidas se conocen como  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry. Estas proteínas se acumulan en un cristal, el cual, conjuntamente con la espora (Fig. 2), tienen un efecto tóxico específico en diversas especies de insectos (Schnepf *et al.*, 1998). Al ingerir el cristal, las proteínas Cry provocan la lisis en las células de la pared del epitelio intestinal del insecto susceptible (Pietrantonio y Gill, 1996), lo que conlleva a una disminución o inhibición de la alimentación del insecto hasta provocar su muerte por inanición o septicemia (Knowles, 1994). Las proteínas Cry representan una forma de control sostenible debido a que no afectan insectos benéficos como depredadores y parasitoides (Samsonov *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Fotografías al microscopio electrónico de barrido de la espora (e) y el cristal romboidal (c) de *Bacillus thuringiensis*.

Las  $\delta$ -endotoxinas se han estudiado debido a su uso potencial para el control de insectos y el desarrollo de plantas resistentes mediante la introducción y expresión de los genes que codifican por dichas proteínas en las plantas hospederas de los insectos. Actualmente se conoce la secuencia de aproximadamente 100 genes *cry* los cuales se han clasificado en 22 grupos y diferentes subgrupos de acuerdo con su similitud en la secuencia de aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998). Las proteínas Cry1, Cry2 y Cry9 son tóxicas a lepidópteros; Cry3, Cry7 y Cry8 son efectivas contra coleópteros, mientras que las CryIB y CryII tienen un efecto dual contra coleópteros y lepidópteros. Las proteínas Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14 actúan contra nemátodos mientras que las Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt son tóxicas a dípteros (Bravo *et al.*, 1998). Los pesos moleculares de estas proteínas van de 140 a 60 KDa.

Se ha relacionado la morfología de los cristales con los genes *cry* que contienen: los cristales bipiramidales para *cry1*, cuboidales para *cry2*, rectangulares aplanados para *cry3A*, irregulares para *cry3B*, esféricos para *cry8* y *cry4Ay B* y romboidales planos para *cry11A* (Schnepf *et al.*, 1998 y *B thuringiensis* Pesticidal Crystal Protein Nomenclature Comité, 2002).

Existen además otras proteínas bioinsecticidas de *Bt* que se expresan y secretan durante la fase vegetativa y de esporulación y no presentan homología con las toxinas Cry y Cyt; estas proteínas se conocen como Vips (Estruch *et al.*, 1996). Hasta el momento, se han encontrado tres tipos de proteínas Vip en *Bt*: las Vip1A de 80 KDa (Schnepf *et al.*, 1998), las Vip2 y Vip3A que presentan una amplia actividad contra lepidópteros y tienen un peso molecular de 88 KDa (Yu *et al.*, 1997).

Ahora bien, para la mayoría de insectos plaga, el método de control más efectivo es el uso de variedades resistentes, sin embargo en el caso de café todas las variedades de *Coffea arabica* que se siembran en Costa Rica (Caturra, Catuaí y Catimor), así como el germoplasma que se siembra en América Tropical, incluidas las variedades brasileñas de *Coffea canephora* son susceptibles a la infestación por *H. hampei*. Se hace necesario entonces buscar fuentes no convencionales de resistencia para el mejoramiento genético de variedades comerciales o líneas élite de café.

Una de estas fuentes no tradicionales de resistencia son los genes *cry* de *Bt*. Como resultado de la caracterización y aislamiento de algunos estos genes, se ha conferido resistencia contra diferentes plagas de importancia económica, al introducirlos mediante ingeniería genética en el genoma de tomate, tabaco, algodón, maíz, soya, entre otros (Betz *et al.*, 2000). El café se transformó con genes *cry1A* para incorporar resistencia contra el minador de la hoja *Perileuoptera coffeella* (LE CIRAD, 2001; Hatanaka *et al.*, 1999). De igual manera, si se encuentran proteínas Cry tóxicas contra broca es posible la introducción de sus respectivos genes *cry* en el café para conferir resistencia. En este sentido, la búsqueda de cepas de *Bt* efectivas contra broca se perfila como el inicio de una estrategia a largo plazo de mejoramiento por ingeniería genética para combatir dicha plaga, así como una opción a mediano plazo para el desarrollo de bioinsecticidas.

### **3 Objetivo general**

Establecer una colección de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, aisladas a partir de muestras ambientales de cafetales infestados con la broca del caféto (*Hypothenemus hampei*), para utilizarlas en un futuro en el combate de esta plaga. Se realizará además, la caracterización morfológica y molecular de las cepas.

#### **3.1 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de esta investigación son los siguientes:

- 1) Establecer una colección de *Bacillus thuringiensis* mediante el aislamiento de cepas a partir de muestras ambientales.
- 2) Caracterizar la colección utilizando como criterio la morfología de los cristales mediante microscopía.
- 3) Caracterizar las  $\delta$ -endotoxinas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.
- 4) Caracterizar algunas familias de los genes *cry*, *cyt* y *vip* mediante amplificación por PCR, utilizando iniciadores específicos.
- 5) Correlacionar los resultados obtenidos mediante la caracterización morfológica y molecular.

## **4 Materiales y métodos**

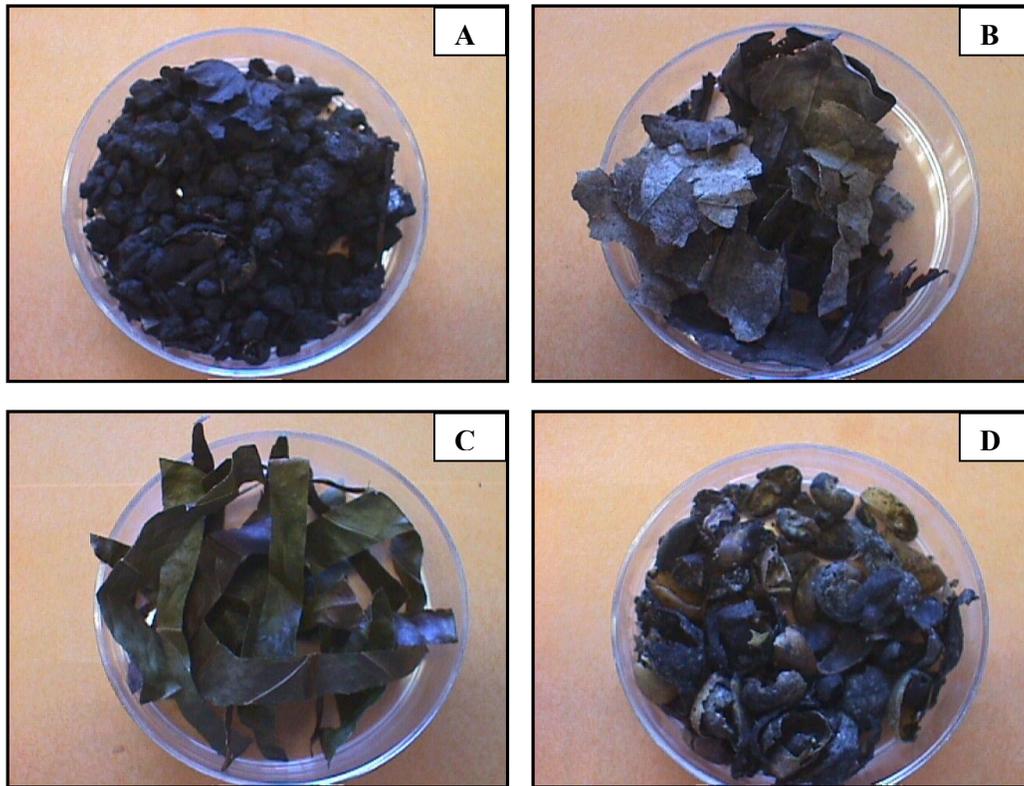
### **4.1 Localización del estudio**

El estudio se realizó en los laboratorios del Programa de Ingeniería Genética de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, ubicado en la Ciudad de la Investigación, Sabanilla, San José.

### **4.2 Colectas en campo**

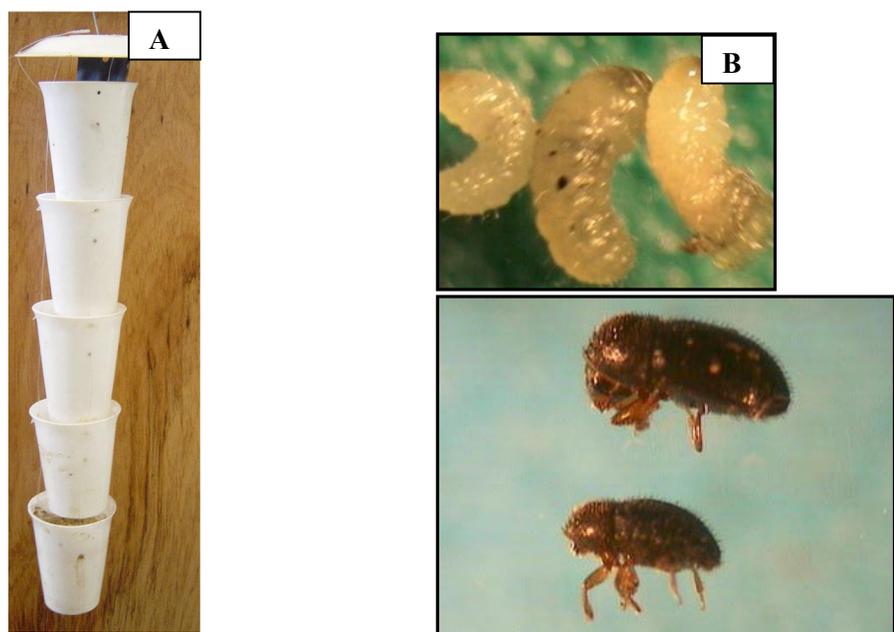
Se realizaron colectas de muestras ambientales entre los meses de mayo a octubre del 2002 en seis fincas infestadas con broca, a saber: la Argentina, Tabacos de la Cordillera, El Hoyo y las fincas de Nelson Vargas y los Ulate. Se llevó un registro de la localización de la finca mediante un sistema de posicionamiento geográfico (GPS), las fechas de muestreo, el área sembrada, edad de la plantación, topografía y algunos métodos de control utilizados.

Se tomaron varios tipos de muestras ambientales: suelo, hojarasca, follaje, frutos infestados (Fig. 3) e insectos obtenidos a partir de trampas (Fig. 4). El suelo, la hojarasca, el follaje y frutos se secaron a 50°C por 24 horas y posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente. También se analizaron muestras de 10 a 15 adultos, obtenidos mediante trampas con atrayente (metanol-etanol) que fueron suministradas por el ICAFE en las fincas la Argentina, finca de Nelson Vargas y la finca el Hoyo. Los insectos se almacenaron a una temperatura de 5°C en tubos Eppendorf con etanol al 70%.



**Figura 3.** Muestras ambientales de cafetales utilizadas para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*. En (A) suelo, (B) hojarasca, (C) follaje y (D) frutos infestados con broca .

También se disecaron frutos infestados frescos con el propósito de identificar tanto larvas y adultos muertos. Los insectos de *H. hampei* se agruparon en muestras de 10 a 15 adultos muertos, mientras que las larvas muertas se analizaron individualmente (Fig. 4).

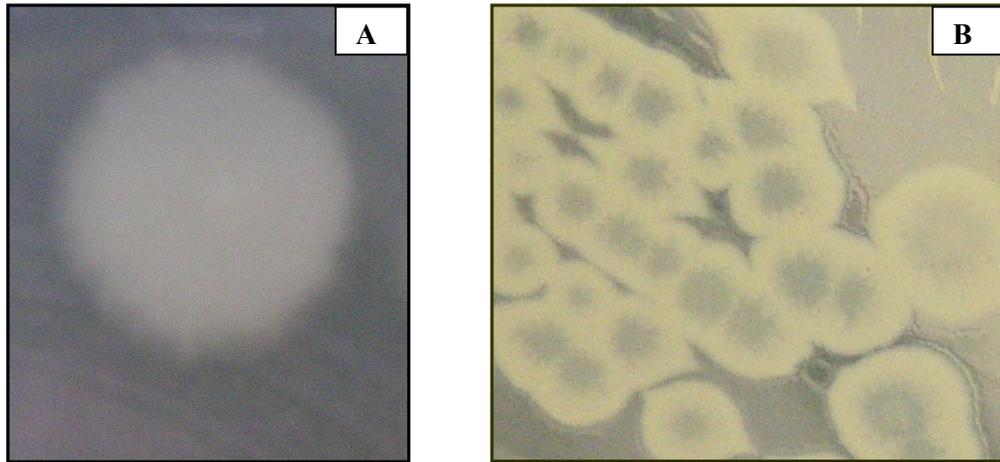


**Figura 4.** Insectos de *H. hampei* que se utilizaron para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*. En A) trampas y en B) larvas y adultos muertos obtenidas a partir de frutos de café infestados.

### 4.3 Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

Las muestras ambientales se procesaron siguiendo el protocolo adaptado de Travers y colaboradores (1987), en el cual se inoculó un gramo de muestra en medio Luria y Bertani (LB, anexo 9.3) con 2M acetato de sodio y se incubó a 30°C en un agitador orbital a 300 rpm durante 4 horas. Seguidamente, se calentó a 60°C por 60 min y se inoculó una asada en tubos de ensayo con 2 ml de medio líquido T3 (3g triptona, 2 g triptosa, 1.5 g extracto de levadura, 0.05M de fosfato de sodio y 0.005 g de cloruro de manganeso por litro). Transcurridas 24 horas, los aislamientos se rayaron en medio LB, se incubaron a 29°C por 24 horas, seleccionándose aquellas con morfología similar a *Bt* (colonia blanca opaca, de borde irregular que al esporular presenta un halo hialino en el centro de la colonia) (Fig. 5).

Los insectos se esterilizaron superficialmente mediante dos lavados con etanol de 70%; las larvas se maceraron individualmente y los adultos en grupos de 15 a 20 en tubos Eppendorf con 300 µl de medio líquido LB estéril. El macerado se incubó por 24 horas a 29°C y se rayó en placas Petri con medio LB sólido. Después de 24 horas a 29°C, se replicaron aquellas cepas con morfología similar a *Bt*.



**Figura 5.** Morfología de colonia de *Bacillus thuringiensis*. En A) colonia en fase vegetativa y en B) colonias esporuladas.

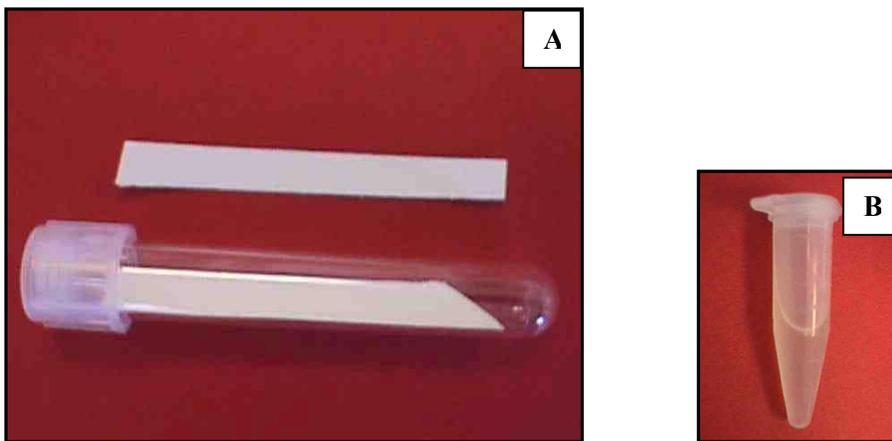
#### **4.4 Análisis de las cepas por microscopía de luz y electrónica**

Una vez esporuladas las cepas obtenidas en los diferentes procedimientos, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se disolvió una asada de las bacterias, posteriormente se fijó con calor por 10 segundos y se añadió azul de Coomassie (0.25 g de Coomassie blue R- 250; 225 ml de metanol; 46 ml de ácido acético y 230 ml de agua) por un minuto. Por último, se eliminó el exceso de azul de Coomassie, se realizó un lavado con agua destilada y se observaron los frotis a 1000 aumentos en un microscopio Nikon Eclipse E 200.

Se seleccionaron las cepas CIBCM-79 y CIBCM-220 para analizarlas al microscopio electrónico de barrido y se fijaron en solución de Karnousky (glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en tampón 0.1M fosfato, pH 7.4), por una hora. Posteriormente se colocaron sobre una rejilla con membrana de Fomvar al 1% en cloroformo, se tiñeron con 0.5% ácido fosfotúngstico, pH 7.0 por 15 segundos. Las rejillas se colocaron sobre bases de aluminio con cinta adhesiva de doble cara, se cubrieron con 30 nanómetros de platino y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S - 2360N), a 15 kv.

#### 4.5 Almacenamiento de las cepas

Se utilizaron dos metodologías para almacenar las bacterias esporuladas: en glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en papel filtro. Para ambos casos, se inoculó una asada de las cepas esporuladas identificadas como *Bt* en 2 ml de medio LB. Para almacenar las cepas en glicerol, se tomó 600  $\mu\text{l}$  del medio líquido inoculado con *Bt* y se añadió 400  $\mu\text{l}$  de glicerol (Fig. 6B). Las muestras se rotularon y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En la metodología del papel filtro, se sumergieron papeles filtro estériles en el medio líquido inoculado, se secaron en una cámara de flujo laminar y se almacenaron en tubos de plástico estériles (Fig. 6A).

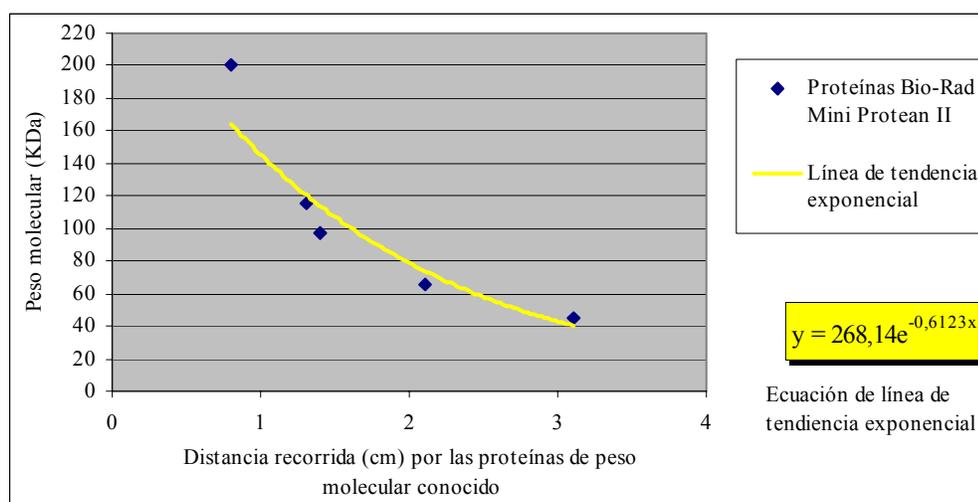


**Figura 6.** Almacenamiento de las cepas en: (A) en papel filtro estéril y (B) glicerol al 40%.

#### 4.6 Análisis de las proteínas Cry mediante SDS-PAGE

Se tomó una asada del centro de la colonia esporulada y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de amortiguador para electroforesis de proteínas (10mM Tris-HCl, pH 7.2) en tubo Eppendorf. Seguidamente se añadió 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador muestra 4X (2% SDS, 40% glicerol, 5% mercaptoetanol, 0,001% azul de bromofenol, 0,0625M Tris-HCl, pH 8) y se agitó en vortex. Se calentó la muestra por 3 min en un baño de agua hirviendo. Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la muestra en los pocillos del gel de poliacrilamida al 10%. Se utilizó el marcador de peso molecular marca BIO-RAD 161-0304. Los geles de poliacrilamida al 10% se colocaron en cámaras verticales BioRad Mini Protean II, con el amortiguador tanque Tris-Glicina-SDS. Las muestras se corrieron a 120 voltios los primeros 5 min y posteriormente a 100 voltios por aproximadamente 120 min. Por último, las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0.25% en 60% etanol y 7% de ácido acético).

El cálculo del peso molecular de las proteínas de los geles de poliacrilamida se realizó midiendo la distancia de migración a partir del origen del gel tanto de los marcadores de peso molecular conocido, así como las de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Se estableció una línea de tendencia exponencial y su respectiva ecuación. Los cálculos se realizaron en Excel (office 2000), al sustituir x en la ecuación resultante por los centímetros recorridos por las proteínas utilizadas (Fig. 7).



**Figura 7.** Línea de tendencia exponencial construida a partir de proteínas de peso molecular conocido y utilizada para el cálculo del peso de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* en geles de poliacrilamida.

#### 4.7 Extracción y cuantificación de ADN

Se utilizaron dos protocolos de extracción de ADN. El primero se utilizó para el análisis rápido de cepas (Bravo *et al.*, 1998), para el cual se crecieron las estirpes en platos Petri con medio LB por 12 horas a 29°C. Posteriormente, se inoculó una asada de las bacterias en Eppendorf con 100µl de agua estéril. La mezcla se incubó por 20 min a -70°C y seguido de 10 min a temperatura de ebullición en baño maría. Por último, se centrifugó 10 segundos a 10 000 rpm, utilizándose 5 µl de ADN del sobrenadante para cada reacción de PCR.

El segundo protocolo de extracción de ADN que se utilizó fue el de Chen y Kuo (1993). Para ello, se crecieron las bacterias en 2ml de medio líquido LB durante 24 horas a 29°C, se centrifugó a 13 000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Se añadió 200 µl de tampón de lisis (40mM Tris-acetato pH 7.8; 20 mM acetato de sodio, 1mM EDTA y 1% SDS), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se añadió 66 µl de 5M cloruro de sodio, se incubó en hielo 10 min y luego se centrifugó 15 min a 13 000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se le añadió igual volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó por 15 min a 13 000 rpm. Se colectó el sobrenadante y el ADN se precipitó añadiendo un tercio de volumen de 1,5M NaCl, un tercio de 0,5M NaOAc y dos volúmenes de etanol absoluto, incubándose una hora a -20°C. Finalmente, se lavó con 100µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min y el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril BioRad. Se tomaron 5 µl de la solución y analizaron en un gel de agarosa al 0,7%. La concentración de ADN se estimó mediante un fluorómetro marca Quantech, modelo FM1 109535.

#### **4.8 Amplificación mediante PCR y análisis de los productos en geles de agarosa**

Debido a la gran cantidad de genes *cry* (más de 100 diferentes genes), para la amplificación por PCR, se seleccionaron iniciadores que amplifican con las familias de genes: *cry1*, *cry3* y 7, *cry8*, *cry11*, *cry* para nemátodos (*cry5*, 12 y 14); y para las familias de genes *cyt* y *vip1*, *vip2* y *vip3*. Se utilizaron iniciadores para los genes de la subfamilia *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E* y *cry1F*). Para cada una de las reacciones se utilizaron cepas control. Las cepas Hd1, Hd137 y Hd916 fueron suministradas por el *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) y las cepas Btt, IB-209, IB-217, IB-27 por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca. En la Cuadro 1 se muestran las cepas control utilizadas, con los genes que contienen.

**Cuadro 1.** Cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas como controles para las amplificaciones por PCR

<b>Cepas Control</b>	<b>Subespecie</b>	<b>Genes</b>
Hd1	Kurstaki	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc</i> <i>cry2A</i>
Hd137	Aizawai	<i>cryIAa, cryIB, cryIC, cryID</i>
Hd916	Israelensis	<i>cry4A, cry4B</i> <i>cryIIA</i> <i>cyt</i>
Btt	tenebrionis	<i>cry3A</i>
CIBCM-97		<i>cry3</i>
IB-209		<i>cry8C</i>
IB-217		<i>cryIF</i>
IB-27		<i>cryIE</i>

Para la reacción de PCR se utilizó una mezcla de los siguientes reactivos: 5 µl a una concentración de ADN de 25ng; 12,55 µl de agua estéril; 2,5µl de amortiguador 10x; 2,5µl de 225 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5µl de 10mM dNTP; 20 µM de cada iniciador y 2,5U de Taq polimerasa.

Se utilizó el termociclador PTC-100 de la casa comercial MJ Research INC. El programa de PCR de Bravo y colaboradores (1998), con un primer ciclo de desnaturalización de dos min a 95°C; treinta ciclos de: a) un minuto de desnaturalización a 95°C, b) un minuto de anillaje según la temperatura de desnaturalización (T<sub>m</sub>) según el iniciador (Cuadro 2), c) un minuto de extensión a 72°C; y un último ciclo de cinco min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 1x (10,8 g TRIZMA-Base, 5.5g de ácido bórico y 4ml de 0.5M EDTA pH 8.0 por litro).

**Cuadro 2.** Producto de PCR, secuencia y temperatura de desnaturalización de los iniciadores que se utilizaron para la caracterización de genes *cry*, *cyt* y *vip* de las cepas de *Bt*.

Gen	Producto de PCR (En pares de bases)	Secuencia del iniciador en dirección 5' - 3'	Temperatura de desnaturalización (T <sub>m</sub> ) °C
general <i>cry 1</i> ( <i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1Ad</i> , <i>cry1Ae</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1D</i> , <i>cry1E</i> , <i>cry1F</i> )	727	TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (Derecho) TATCGGTTTCTGGGAAGTA (Inverso)	52
<i>cry1Aa</i>	246	TTATACTTGGTTCAGGCC (Derecho) TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA (Inverso)	53
<i>cry1Ab</i>	216	AACAACATCTGTTCTTGAC (Derecho) CTCTTATTATACTTACCATAC (Inverso)	53
<i>cry1Ac</i>	180	GTTAGATTAAATAGTAGTGG (Derecho) TGTAAGCTGGTACTGTATTG (Inverso)	53
<i>cry1B</i>	367	CTTCATCACGATGGAGTAA (Derecho) CATAATTTGGTCGTTCTGTT (Inverso)	54
<i>cry1C</i>	130	AAAGATCTGGAACACCTTT (Derecho) CAAACCTCTAAATCCTTTCAC (Inverso)	54
<i>cry1D</i>	290	CTGCAGCAAGCTATCCAA (Derecho) ATTTGAATTGTCAAGGAATG (Inverso)	54
<i>cry1E</i>	147	GGAACCAAGACGAACTATTGC (Derecho) GGTTGAATGAACCCTACTCCC (Inverso)	57
<i>cry1F</i>	177	TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC (Derecho) CGGTTACCAGCCGTATTTTCG (Inverso)	57
general <i>cry 3</i> y <i>cry 7</i> ( <i>cry3A</i> , <i>cry3B</i> , <i>cry3C</i> , <i>cry7A</i> , <i>cry7B</i> )	703	TTAACCGTTTTTCGCAGAGA (Derecho) TCCGACTTCTATGTGTCCAAG (Inverso)	48
general para <i>cry 8</i> ( <i>cry8A</i> , <i>cry8B</i> , <i>cry8C</i> )	376	ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (Derecho) TTTGATTAATGAGTCTTCCACTCG (Inverso)	49
general para <i>cry 11</i> ( <i>cry11A</i> , <i>cry11B</i> )	304	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (Derecho) CATTTGTAAGTTGTAATCCC (Inverso)	51
general para nemátodos ( <i>cry5A</i> , <i>cry5B</i> , <i>cry12A</i> , <i>cry14A</i> )	474	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAA (Derecho) AAGACCAATTCAATACCAGGGTT (Inverso)	50
general para <i>cyt</i> ( <i>cyt1A</i> , <i>cyt2A</i> )	500	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG (Derecho) GGTACACAATACATAACGCCACC (Inverso)	51
<i>vip1</i>	588	AATAGTGTAGAGTCTCATTTCATCC (Derecho) TCATCCACAATAATAGACGC (Inverso)	50
<i>vip2</i>	720	TAATAAATCTTTAACAGAAGGTAATACG (Derecho) GCAAGAAGTTCACTCGATAAGC (Inverso)	50
<i>vip3</i>	360	CTGAAAAGGAAGATGAACATGAAC (Derecho) AAGCATCGTATTTATCGCATCG (Inverso)	50

## 5 Resultados

### 5.1. Establecimiento de una bacterioteca de *Bacillus thuringiensis* para el control de la broca del café

Todas las fincas, donde se colectó muestras ambientales, presentaban un manejo de la plantación con sombra, sin aplicaciones de insecticidas y en la mayoría se realiza algún tipo de control cultural para combatir la broca como podas, repela y trampas. Las fincas presentan condiciones diversas en cuanto a tamaño, topografía, variedades de café sembradas y edad de la plantación (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Características de las fincas a partir de las cuales se colectaron muestras para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

Finca	Fechas de colecta	Área sembrada	Variedades	Edad de plantación	Topografía	Medidas de control de broca
La Argentina (Grecia)	16 y 24 mayo 4, 7, 13 y 25 junio 4 y 18 julio	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Quebrada	Ninguna (Finca abandonada)
Nelson Vargas El Rosario, Naranjo	16 y 24 mayo 4, 7, 13 y 25 junio 4 y 18 julio	2 Ha	Catuai	5 a 6 años	Quebrada	Con repela y trampas
Los Hoyos El Rosario, Naranjo	25 junio 4 y 18 de julio	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Plana	Podas
Tabacos de la Cordillera, Puriscal	28 agosto	20 Ha	Caturra	3 años	Quebrada/ Muy Quebrada	Repela y trampas
Los Ulate Palmares	6 setiembre	14,8 Ha	Caturra Híbrido	De 3 a 10 Años	Plana	Con repela, poda anual y trampas.

En la Figura 8, se indican los sitios de muestreo (las coordenadas se indican en el Anexo 9.2), todos ellos ubicados en el Valle Central, con excepción de la finca Tabacos la Cordillera en Puriscal (zona sur).



Figura 8. Localización en el mapa de Costa Rica de los sitios de colecta de muestras ambientales para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*.

Se obtuvo un total de 427 muestras ambientales. Las muestras de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados se muestran en el Cuadro 4, mientras que las muestras de larvas y adultos en el Cuadro 5.

**Cuadro 4.** Muestras de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados utilizadas para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* según el sitio de origen

Sitio de origen	Suelo	Hojarasca	Follaje	Frutos infestados	Total
Grecia	6	6	7	22	41
Naranjo (El Rosario)	5	5	6	3	19
Naranjo (Hoyos)	4	4	4	18	30
Puriscal	6	1	1	-	8
Palmares	5	2	2	-	9
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>43</b>	<b>110</b>

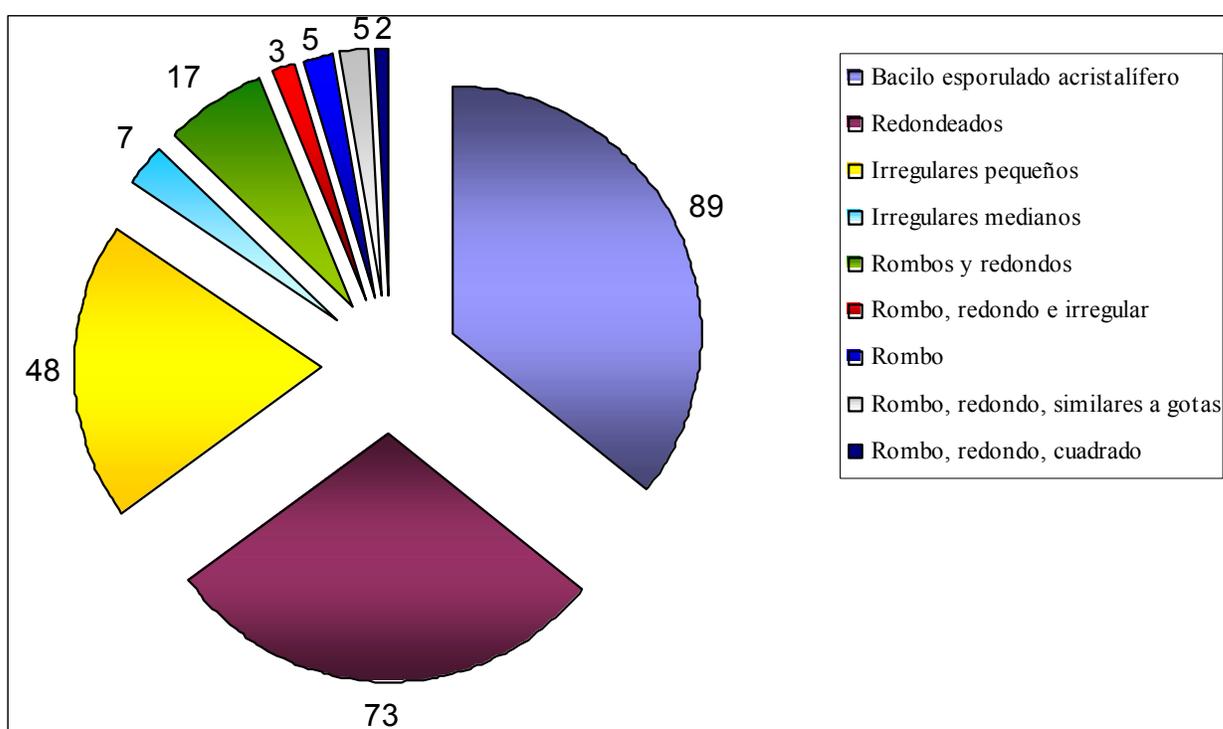
**Cuadro 5.** Muestras de insectos obtenidos para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* según el sitio de origen a partir de trampas y de la disección de frutos infestados

Sitio de origen	Adultos de trampas	Adultos muertos de frutos	Larvas muertas de frutos	Total
Grecia	29	14	6	49
Naranjo	64	-	-	64
Hoyos	39	122	17	178
Puriscal	-	26	-	26
<b>TOTAL</b>	<b>132</b>	<b>162</b>	<b>23</b>	<b>317</b>

De los 110 aislamientos de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados, un total de 59 presentaron morfología de colonia similar a *Bacillus thuringiensis*, a saber: 21 de 29 muestras de suelo (72%), 12 de 18 muestras de hojarasca (66%), 7 de 23 muestras follaje (35%) y 19 de 43 muestras de frutos infestados (44%). De los 317 muestras de insectos (adultos y larvas) se aislaron un total de 184 cepas, a saber: 86 de 132 muestras de adultos de trampas (65%), 87 de 162 muestras de de adultos muertos de frutos (53%) y 10 de 23 muestras de larvas muertas individuales (43%).

## 5.2. Caracterización de los aislamientos de *Bt* según la morfología de los cristales

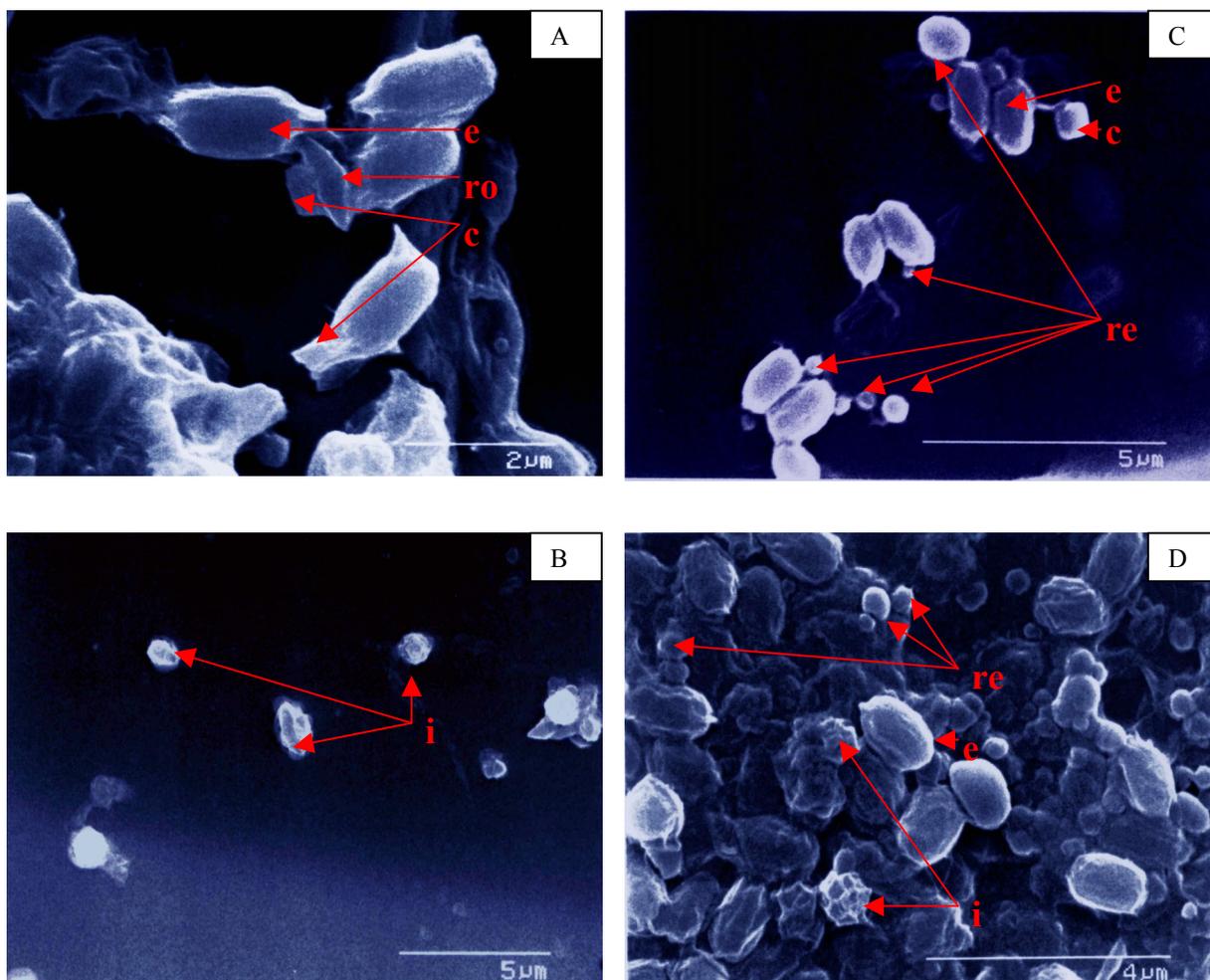
De las 250 cepas con morfología de colonia similar a *Bt*, un total de 88 resultaron bacilos esporulados acristalíferos, 74 aislamientos presentaban cristales redondeados de diferentes tamaños, 48 pequeños irregulares, 8 irregulares medianos y 5 romboidales. Otras cepas mostraron varios tipos de cristales: 17 cepas con cristales romboidales y redondeados, 3 cepas tenían cristales romboidales, redondeados y similares a gotas y 2 cepas con cristales romboidales, redondeados y cuadrangulares (Fig. 9, Anexo 9.1).



**Figura 9.** Tipos de cristales de las cepas con morfología de colonia similar a *Bacillus thuringiensis*, observados mediante microscopía de luz.

Un 60-70% de las cepas provenientes de adultos, suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados presentaban algún tipo de cristal, mientras un 90% de las cepas aisladas de larvas muertas mostraron cristales.

En la Figura 10 se muestra la gran diversidad de morfologías de cristales observados mediante microscopía electrónica de barrido: cristales romboidales, cuadrangulares y redondeados de diversos tamaños e irregulares de diverso tamaño. También se observan las esporas que en ocasiones están adheridas a los cristales.



**Figura 10.** Microfotografías tomadas al microscopio electrónico de barrido que muestran la diversidad de cristales de las cepas 79 (A y B) y 220 (C y D) de la colección. En A) espora (e), cristales romboidales (ro) y cuadrados (c), (barra =2μm). En B) esporas (e), cristales redondeados de diversos tamaño (re) y cuadrado (c), (barra = 5μm). En C) irregulares de diversos tamaños (i), (barra =5μm). En D) redondeados de diversos tamaños (re), espora (e) e irregulares (i), (barra = 4μm).

### 5.3. Determinación de los pesos moleculares de las proteínas Cry de las cepas de *Bt*

El análisis mediante SDS-PAGE de las  $\delta$ -endotoxinas reveló que un total de 65 de las 162 cepas con cristales mostraron bandas proteicas prominentes de diversos pesos moleculares que oscilaron entre los 20 y 145 KDa (Fig. 11, Cuadro 6), mientras que un total de 40 cepas mostraron un patrón de bandas poco prominente que oscilaron entre los 50 y los 70 KDa. (Cuadro 7). El primer grupo de 65 cepas constituyó el cepario base, mientras que las restantes 40 estirpes la colección complementaria.

Dentro de las cepas que tenían bandas proteicas prominentes, aquellas que se aislaron de muestras de insectos muertos presentaron una mayor diversidad en los pesos moleculares de las proteínas Cry en comparación con las cepas aisladas de muestras de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados. En ambos casos se presentó una gran número cepas con proteínas con pesos entre los 60 y los 79 KDa. Se presentó además, un mayor número de cepas con pesos moleculares altos entre los 140-145 KDa en las estirpes provenientes de aislamientos de insectos (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Análisis de los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas de las cepas que presentaron bandas prominentes en geles de poliacrilamida (cepario base).

Muestras	Peso molecular (KDa)												Total de cepas	
	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	130-139		140-145
Suelo, hojarasca, follaje y frutos	1	-	3	-	2	10	1	1	-	-	-	1	1	20
Insectos	1	3	3	4	9	4	3	4	1	2	2	2	7	45
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>65</b>

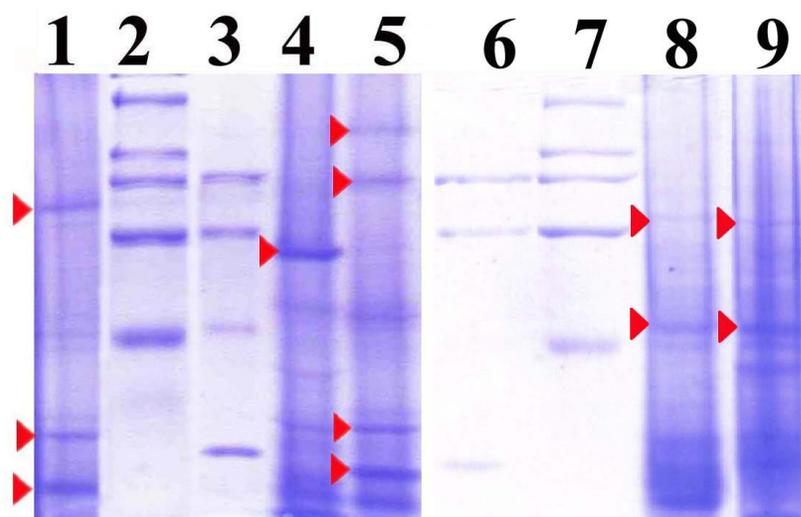
Fuente: Datos experimentales

Cabe resaltar que la colección base tiene cepas con proteínas en todos los rangos de peso molecular, principalmente entre los rangos de 40-90 y 140-145KDa (Cuadro 6).

**Cuadro 7.** Análisis de los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas del cepario complementario (cepas que presentaron bandas poco prominentes en geles de poliacrilamida).

Muestras	Peso molecular (KDa)											Total de cepas	
	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129		130-139
Suelo, hojarasca, follaje y frutos				6		4	1						
Insectos				19	6	3	1						
<b>Total</b>				<b>25</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>2</b>						<b>40</b>

La diversidad de los pesos moleculares de las proteínas Cry de la colección base, se aprecia en la Figura 11. En el carril 1 la cepa CIBCM-64 muestra tres proteínas prominentes de 85, 30 y 24 KDa, en el carril 2 y 7 marcadores de alto peso molecular de 200, 116, 97, 66 y 45 KDa, en el carril 3 y 6 marcadores de bajo peso molecular de 97, 66, 45 y 31 KDa, en el carril 4 la cepa CIBCM-73 muestra una banda principal de 66 KDa y en el carril 5 la cepa CIBCM-74 muestra 145, 98, 30 y 24 KDa.



**Figura 11.** Gel de poliacrilamida al 10% que muestra las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En los carriles 1, 4 y 5 se muestran los patrones electroforéticos de las cepas CIBCM 64, 73 y 74 respectivamente, en el carril 8 y 9 las cepas control *Btt* y CIBCM-97 y en el carril 2, 3, 6 y 7 los marcadores de peso molecular.

Es importante señalar que las cepas con proteínas Cry3: Btt y la cepa CIBCM-97 en los carriles 8 y 9, presenta bandas proteicas poco prominentes, de peso molecular de 76 y 53 KDa.

#### 5.4. Amplificación por PCR de los genes *cry*, *cyt* y *vip*

Las amplificaciones por PCR con las familias de genes *cry1*, *cry3-cry7*, *cry8*, *vip1*, *vip2* y *vip3* de la colección base de 65 cepas que presentaron bandas prominentes en los geles de poliacrilamida, se presenta en la Cuadro 8. Como se puede observar, las cepas contienen generalmente más de un gen *cry* y con frecuencia también genes *vips*.

**Cuadro 8.** Cepas de la colección base de *Bt* que amplificaron por PCR con los iniciadores para familias de genes *cry1*, *cry3-cry7*, *cry8* y *vip1*, *vip2* y *vip3*.

Cepa	<i>cry1</i>	<i>cry 3 y 7</i>	<i>cry8</i>	<i>vip1</i>	<i>vip2</i>	<i>vip3</i>
2	-	-	-	+		+
6	-	-	-	+		+
9	-	-	-	-		+
10	-	-	-	-		+
14	-	-	-	-		+
16	-	-	-	-		+
178	-	-	-	-		+
18	-	-	-	-		+
23	-	-	-	-		+
24	+	-	-	-		+
26	+	-	-	-		+
28	-	-	-	-		+
32	-	-	-	-		+
34	-	-	-	-		+
35	-	-	-	-		-
36	-	-	-	-		+
43	+	-	-	-		+
53		+	-	-		+
59	-	-	-	-		+
64	-	-	-	-		+
65	-	-	-	-		+
66	-	-	-	-		+
67	-	-	-	-		+
68	+	-	-	-		+
73	+	-	-	-		+
74	-	-	-	-		+
77	+	-	-	-		+
79	+	-	-	-		+
80	-	-	-	-		+

-continúa en la siguiente página-

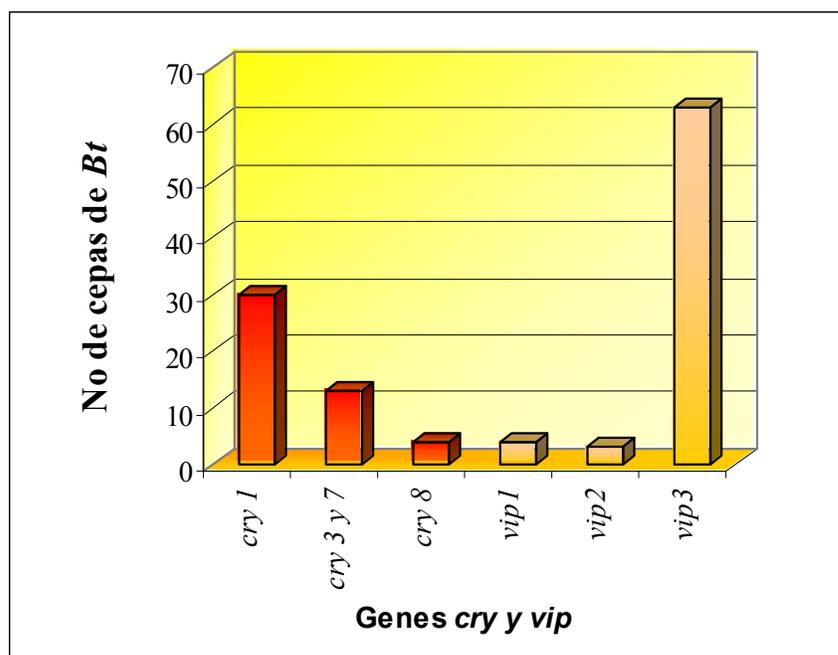
Continuación de la Cuadro 11

Cepa	<i>cry1</i>	<i>cry 3 y 7</i>	<i>cry8</i>	<i>vip1</i>	<i>vip2</i>	<i>vip3</i>
81	+	+	-	-		+
84	+	+	+	-		+
85	+	-	-	-		+
86	+	+	-	-		+
87	+	-	-	-		+
97	+	-	-	-		+
102	+	-	-	-		+
105	+	-	-	-	+	+
107	-	-	-	-	+	+
132	-	-	-	+		+
133	-	-	-	+		+
138	-	-	-	-		+
139	-	-	-	-		-
148	+	-	-	-		+
149	+	+	-	-		+
150	+	-	-	-		+
151	+	-	-	-		+
164	+	-	-	-		+
165	-	-	-	-		+
166	+	-	-	-		+
167	+	-	-	-		+
168	-	-	-	-		+
169	+	-	-	-		+
170	+	-	+	-		+
171	+	-	-	-		+
172	+	-	-	-		+
174	+	-	+	-		+
175	+	+	+	-		+
179	+	+	-	-		+
201	-	+	-	-		+
209	+	+	-	-		+
220	-	+	-	-		+
240	-	+	-	-		+
242	-	+	-	-		+
247	-	-	-	-		+
250	-	+	-	-	+	+

\*= producto de PCR de menor peso que el esperado 588 KDa.

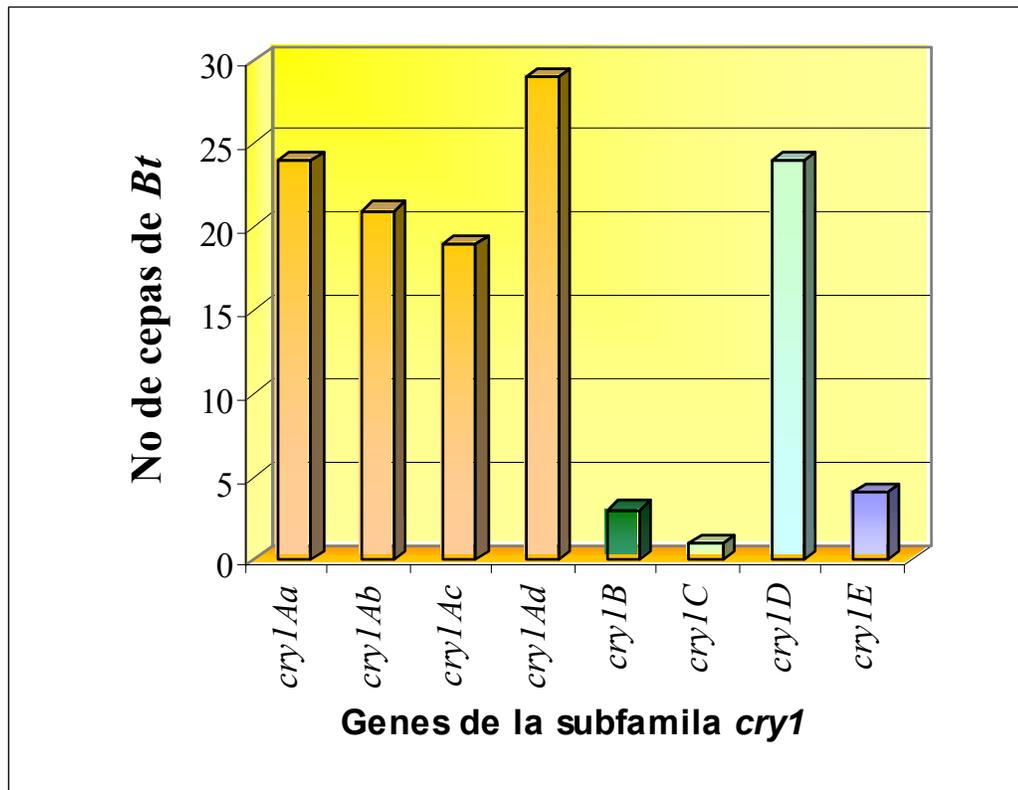
Cabe resaltar que las cepas CIBCM-84 y CIBCM-175 presentan los genes *cry1*, *cry 3-cry7*, *cry8* y *vip3*. Además, la mayoría de las cepas presentan los genes *vip3* con excepción de las cepas CIBCM-35 y CIBCM-139 que no amplificaron con ninguno de los iniciadores utilizados, se presentaron además, bandas de menor peso que al esperado en las amplificaciones con *vip1* (588 bp) de las cepas CIBCM-132 y y CIBCM-133 (Cuadro 8).

La información anterior se puede resumir en el siguiente gráfico (Fig. 12), en donde 63 cepas amplificaron con genes *vip3* (97%), seguido de 30 cepas con la familia de genes *cry1* (47%), trece con *cry3-cry7* (20%), cuatro con *cry8* (6%), cuatro con *vip1* (6%) y tres con *vip2* (3%). Ninguna cepa amplificó con genes *cyt*, *cry11*, ni *cry nem* (*cry 5,10,12*).



**Figura 12.** Cepas de la colección base de *Bacillus thuringiensis* que amplificaron por PCR con los iniciadores para *cry1*, *cry3-cry7*, *cry8*, *vip1*, *vip2* y *vip3*.

Las 30 cepas que amplificaron con la familia de genes *cry1*, se evaluaron con iniciadores específicos para *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1E*, *cry1F*, de los cuales el 80% amplificaron con *cry1A* y *cry1D*, el 13% con *cry1E*, el 10% con *cry1B* y el 3% con *cry1C*. Dentro de la subfamilia de los genes *cry1A*, el 97% presentaron los genes *cry1Ad*, el 80% los genes *cry1Aa*, el 70% los genes *cry1Ab* y el 63% los genes *cry1Ac* (Fig. 13). Ninguna cepa amplificó con *cry1F*.



**Figura 13.** Cepas de la colección base de *Bacillus thuringiensis* que amplificaron por PCR con los iniciadores específicos para la subfamilia *cry1*.

En todas las cepas analizadas se presentaron al menos dos genes *cryI*; 15 cepas tienen todos los genes de la subfamilia *cryIA*, de estas 15, un total de 6 tienen además el gen *cryID* y 2 tienen también los genes *cryID* y *cryIB*. Ninguna cepa tiene más de dos combinaciones de los genes *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, y *cryIE* (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Cepas de la colección base que amplificaron por PCR con los iniciadores específicos de la subfamilia de genes *cryI*.

Cepa	<i>cryIA</i>				<i>cryIB</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>	<i>cryIE</i>
	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIAc</i>	<i>cryIAd</i>				
24	+	-	-	+	-	-	+	-
26	+	+	+	+	-	-	-	+
43	+	-	-	-	-	-	+	-
66	+	-	-	+	-	-	+	-
73	+	-	-	+	-	-	+	-
77	+	-	-	+	-	-	+	-
79	-	+	+	+	-	-	-	+
81	+	+	+	+	-	-	-	-
84	+			+	-	-	+	-
85	-	+	-	+	-	-	+	+
86	-	+	-	+	-	-	-	+
92	+	-	-	+	-	+	+	-
97	+	+	+	+	+	-	+	-
102	+	+	+	+	+	-	+	-
105	-	-	-	+	-	-	-	-
148	+	+	+	+	-	-	+	-
149	+	-	-	-	-	-	+	-
150	+	+	+	+	-	-	+	-
151	+	+	+	+	-	-	+	-
164	+	+	+	+	-	-	+	-
166	+	+	+	+	-	-	+	-
167	+	+	+	+	-	-	+	-
169	+	+	+	+	+	-	+	-
170	+	+	+	+	-	-	+	-
171	+	+	+	+	-	-	-	-
172	+	+	+	+	-	-	+	-
174	+	+	+	-	-	-	+	-
175	+	+	+	+	-	-	+	-
179	+	+	+	+	-	-	+	-
209	+	+	+	+	-	-	+	-
242	+	-	-	+	-	-	+	-

La distribución y frecuencia del perfil de los genes *cryI* presentes en la colección base se muestra en la Cuadro 10. Existen 16 perfiles diferentes de genes *cryI*, el perfil más común contiene los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIAd* y *cryID* (23%). Fueron frecuentes cepas con combinaciones de genes *cryIA* con *cryIB* y *cryID* (13%), así como mezclas de genes *cryIA* con *cryID* de forma individual (16%) y con genes *cryIE* (12%). Perfiles con los genes *cryIC* fueron poco frecuentes (3%). Además, muchas de las cepas presentan otros genes *cry* como *cry3-cry 7*, y *cry 8* (30%).

**Cuadro 10.** Distribución y frecuencia del perfil de los genes *cryI* presentes en la colección base

No de cepas	Perfil de genes <i>cry</i>	Porcentaje (n=31)
4	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cryIB, cryID</i>	13
7	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cryID</i>	23
1	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cryID, cry3, cry8</i>	3
2	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cryID cry 3 y 7</i>	6
2	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cryID, cry 8</i>	6
1	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd, cry 3 y 7</i>	3
1	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIAd</i>	3
1	<i>cryIAa, cryIAd, cryIC, cryID</i>	3
4	<i>cryIAa, cryIAd, cryID</i>	13
2	<i>cryIAb, cryIAd, cryID, cryIE</i>	6
1	<i>cryIAa, cryAd, cryID, cry 3 y 7</i>	3
1	<i>cryIAb, cryIAd, cryIE</i>	3
1	<i>cryIAb, cryIAd, cryIE, cry 3 y 7</i>	3
1	<i>cryIAa, cryID, cry 3 y 7</i>	3
1	<i>cryIAa, cryID cry 8, cry 3 y 7</i>	3
1	<i>cryIAa, cryID</i>	3

Se realizó además un PCR de las 40 cepas de *Bt* que presentaban un patrón de bandas tenue (colección complementaria) en los gels de poliacrilamida similares a las cepas control que contenían *cry3*, con iniciadores específicos para la familia de genes *cry3-cry7*, de las cuales 27 amplificaron por PCR (67,5%).

### 5.5. Correlación del tipo de muestra ambiental con la caracterización morfológica y molecular de las cepas

En el siguiente cuadro se resume los resultados obtenidos de la caracterización microscópica y molecular de las 65 cepas de la colección base de *Bt*.

**Cuadro 11.** Resumen de la caracterización de la colección base de cepas de *Bt* según el tipo de muestra, morfología de los cristales, peso molecular de las  $\delta$ -endotoxinas y genes *cry* y *vips*.

Cepa	Tipo de muestras	Morfología de los cristales	Peso molecular de las $\delta$ -endotoxinas (Kda)		Genes <i>cry</i> y <i>vips</i>
			Principal	Otras	
2	Follaje	Redondeados	23	52	<i>vip1, vip 3</i>
6	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	79 y 40		<i>vip1, vip 3</i>
9	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	80		<i>vip3</i>
10	Adultos de trampas	Pequeños irregulares y redondeados	38	72, 68, 57, 53, 32	<i>vip3</i>
14	Adultos de trampas	Pequeños irregulares y medianos redondeados	50, 32	56, 52, 38, 25	<i>vip3</i>
16	Adultos de trampas	Pequeños y medianos redondeados	50, 32	58, 54, 27	<i>vip3</i>
178	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	42	68, 58, 54, 50, 35	<i>vip3</i>
18	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	58, 42	68, 54, 50	<i>vip3</i>
23	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	77		<i>cry1Aa, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
24	Insectos de trampas	Pequeños y medianos redondeados	128, 96, 59		<i>cry1Ab, cry1Ad, cry1E, vip3</i>
26	Larva muerta de grano	redondeados y romboidales	146		<i>vip3</i>
28	Larva muerta de grano	Redondeados e irregulares	103		<i>vip3</i>
32	Adultos de trampas	redondeados medianos	32	63, 57, 53, 49, 36	<i>vip3</i>
34	Adultos de trampas	Redondeados medianos	136		<i>ninguno</i>
35	Adultos de trampas	Redondeados medianos	86		<i>vip3</i>
36	Adultos de trampas	Redondeados medianos y grandes	98	65, 34	<i>cry1Aa, cry1D, vip3</i>

-continúa en la siguiente página-

Continuación de la Cuadro 11

Cepa	Tipo de muestras	Morfología de los cristales	Peso molecular de las $\delta$ -endotoxinas (Kda)		Genes <i>cry</i> y <i>vips</i>
			Principal	Otras	
43	Adultos de trampas	Redondeados grandes	44		<i>cry 3 y 7, vip3</i>
53	Adultos de trampas	Redondeados medianos y pequeños	52	57,62,66, 70	<i>vip3</i>
59	Adultos de trampas	pequeños redondeados	95		<i>vip3</i>
64	Hojarasca	Romboidales, irregulares y redondeados	85, 30, 24		<i>vip3</i>
65	Suelo.	Redondeados	46		<i>vip3</i>
66	Suelo	Pequeños redondeados e irregulares	46		<i>vip3</i>
67	Hojarasca.	medianos redondeados	49	22	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
68	Hojarasca.	medianos redondeados y romboidales	66	22	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
73	Adultos de trampas	Redondeados y romboidales	66	22	<i>vip3</i>
74	Adultos de trampas	Redondeados	110	85, 49, 32	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
77	Adultos de trampas	Romboidales, redondeados e irregulares	66	22	<i>cry1Ab, Cry1Ac, cry1Ad, cry1E, vip3</i>
79	Larva muerta de grano	Romboidales, redondeados e irregulares	138 y 65	34	<i>vip3</i>
80	Larva muerta de grano	Romboidales y redondeados	145, 114		<i>cry 3 y 7, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, vip3</i>
81	Adultos muertos de grano	Romboidales y redondeados	64		<i>cry 8, cry 3 y 7, cry1Aa, cry1D, vip3</i>
84	Larva muerta de grano	Pequeños redondeados y romboidales	64		<i>cry1Ab, cry1Ad, cry1D, cry1E, vip3</i>
85	Larva muerta de grano	Romboidales y redondeados	146		<i>cry 3 y 7, cry1Ab, cry1Ad, cry1E, vip3</i>
86	Larva muerta de grano	Romboidales y redondeados	146		<i>cry1Aa, cry1Ad, cry1C, cry1D, vip3</i>
87	Adultos muertos de grano	Romboidales y redondeados	127		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B, cry1D, vip3</i>
97	Adultos muertos de grano	Romboidales	64		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B, cry1D, vip3</i>
102	Adultos muertos de grano	Pequeños romboidales e irregulares	64		<i>cry1Ad, vip2, vip3</i>
105	Hojarasca.	Pequeños irregulares	134		<i>vip2, vip3</i>
107	Suelo	Pequeños irregulares	143		<i>vip3</i>
132	Adultos de trampas	Pequeños redondeados e irregulares	94,2		<i>vip3</i>
133	Adultos de trampas	Pequeños redondeados e irregulares	94		<i>vip3</i>
138	Adultos de trampas	medianos irregulares	145		<i>ninguno</i>
139	Adultos de trampas	medianos irregulares	145		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B, cry1D, vip3</i>
148	Suelo	Romboidales	73		<i>cry 3 y 7, cry1Aa, cry1D, vip3</i>
149	Suelo	Cristales pequeños irregulares	73		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
150	Follaje	Romboidales y medianos redondeados	62		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>

-continúa en la siguiente página-

Continuación de la Cuadro 11

Cepa	Tipo de muestras	Morfología de los cristales	Peso molecular de las $\delta$ -endotoxinas (Kda)		Genes <i>cry</i> y <i>vips</i>
			Principal	Otras	
151	Follaje	Romboidales y medianos redondeados	70		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
164	Adultos muertos de grano	Romboidales y medianos redondeados	64		<i>vip3</i>
165	Adultos muertos de grano	Romboidales, redondeados y cuadrangulares	73		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
166	Adultos muertos de grano	Romboidales, redondeados y cuadrangulares	61	128	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
167	Adultos muertos de grano	Romboidales	61	128	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
168	Granos infestados	Pequeños redondeados e irregulares	98		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B, cry1D, vip3</i>
169	Granos infestados	Romboidales y medianos redondeados	75		<i>cry 8, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
170	Granos infestados	Romboidales y medianos redondeados	75		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, vip3</i>
171	Granos infestados	Romboidales y medianos redondeados	75		<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
172	Granos infestados	Romboidales y medianos redondeados	75	99	<i>cry 8, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
174	Suelo	Romboidales y medianos redondeados	75	99	<i>cry 8, cry 3 y 7, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
175	Granos infestados	Romboidales y medianos redondeados	75		<i>vip3</i>
179	Granos infestados	Romboidales, pequeños redondeados e irregulares	75		<i>cry 3 y 7, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
201	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	37		<i>cry 3 y 7, vip3</i>
209	Adultos muertos de grano	Romboidales e irregulares	71		<i>cry 3 y 7, cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1D, vip3</i>
220	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	44	53	<i>cry 3 y 7, vip3</i>
240	Adultos muertos de grano	medianos redondeados	115		<i>cry 3 y 7, vip3</i>
242	Adultos muertos de grano	Romboidales e irregulares	83	146	<i>cry 3 y 7, cry1Aa, cryAd, cry1D, vip3</i>
247	Adultos muertos de grano	Redondeados y pequeños irregulares	27		<i>vip3</i>
250	Adultos muertos de grano	Redondeados	144,6		<i>cry 3 y 7, vip 2, vip3</i>

Las cepas que amplificaron con los iniciadores *vip3* y no amplificaron con ninguno de los iniciadores utilizados, presentan cristales y pesos moleculares típicos de genes *cry*, como por ejemplo la cepa CIBCM-9, 10, 14, 16, 18 y 35. Por el contrario, cepas como la CIBCM-73, 77, 150, 151, 167, 171 y 172 muestran cristales romboidales y presentan genes de la subfamilia *cry1*. Sin embargo, las cepas CIBCM-165, 80 y 64 presentaron cristales romboidales, pero no amplificaron con los iniciadores para *cry1*.

Es interesante destacar que la mayoría de las cepas que contienen *cry3-cry7* (CIBCM-53, 81, 86, 201, 209, 220, 240, 242 y 250) fueron aisladas a partir de insectos muertos de *H. hampe*. En la Cuadro 12 se resume los resultados obtenidos de la caracterización microscópica y molecular de las 27 cepas de *Bt* que presentaron patrones de proteicos poco promientes y que amplificaron con los iniciadores para *cry3-cry7* (colección complementaria). De estas 27 cepas, 21 (77%) provenían de aislamientos de insectos: 15 de adultos muertos de granos y 6 de adultos de trampas; mientras que solamente 6 (23%) provenían de muestras ambientales: 3 de suelo, una de hojarasca, una de follaje y una de granos infestados. Además, 11 tenían cristales redondeados y 17 cristales irregulares. Los pesos moleculares de sus proteínas oscilan entre los 50 y los 70 KDa, con excepción de las cepas 180 y 231 que tienen proteínas de alrededor de 88 KDa (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Resumen de la caracterización de la colección complementaria de cepas de *Bt* según el tipo de muestras, morfología de los cristales, proteínas Cry y genes *cry3-cry7* que contienen.

Cepa	Tipo de muestra	Morfología de los cristales	Peso molecular de las proteínas Cry (Kda)	Amplificaciones por PCR con <i>cry3-cry7</i>
49	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	56 y 37	+
50	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	50	+
51	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	57;51;44;39;30 y 26	+
54	Adultos de trampas	Pequeños redondeados e irregulares	53 y 37	+
55	Adultos de trampas	Pequeños redondeados e irregulares	53	+
56	Adultos de trampas	Pequeños redondeados e irregulares	57;51;44;37 y 26	+
90	Suelo	Irregulares	50	-
93	Hojarasca	Pequeños redondeados e irregulares	74;66 y 48	+
94	Suelo	Pequeños redondeados e irregulares	72, 58 y 55	+
95	Suelo	Pequeños redondeados e irregulares	70;66,62,54 y 46	+
98	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	67;63;52;49;46 y 31	+
112	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	47	-
116	Adultos de trampas	Irregulares	57	-
121	Suelo	Pequeños irregulares	79	-
122	Follaje	Medianos redondeados	55, 32 y 23	+
123	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	70	-
147	Suelo	Pequeños irregulares	52; 47 y 19	+
140	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	77	-
145	Adultos de trampas	Irregulares	50	-
152	Adultos de trampas	Irregulares	50	-

-continúa en la siguiente página-

Continuación de la Cuadro 12

Cepa	Tipo de muestra	Morfología de los cristales	Peso molecular de las proteínas Cry (Kda)	Amplificaciones por PCR con cry3-cry7
151	Adultos de trampas	Pequeños redondeados	50	-
154	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	56	-
157	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	68 y 55	+
161	Adultos de trampas	Pequeños irregulares	56	-
162	Adultos muertos de granos	Pequeños irregulares	76	-
175	Granos infestados	Pequeños irregulares	59	-
180	Granos infestados	Pequeños redondeados	88;77;62 y 50	+
189	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	59;56,32 y 26	+
190	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	59 y 41	+
191	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	59 y 40	+
196	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	64,56,52 y 35	+
197	Adultos muertos de grano	Medianos redondeados	61;53;32 y 26	+
218	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	59;38 y 26	+
221	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	61;52;42;39 y 27	+
222	Adultos muertos de grano	Pequeños irregulares	61;53;50;44 y 29	+
225	Adultos muertos de grano	Medianos y pequeños redondeados	55 y 42	+
228	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	57;53 y 25	+
231	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	87, 74 y 49	+
239	Adultos muertos de grano	Pequeños redondeados	57;52 y 27	+
241	Adultos muertos de grano	Medianos y pequeños redondeados	51 y 25	+

## 6 Discusión

La presente investigación permitió establecer una colección de 162 cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, aisladas a partir de muestras ambientales de cafetales infestados con broca, que se utilizará en la búsqueda de proteínas Cry tóxicas al coleóptero *Hyphotenemus hampei*. Un total de 105 cepas se caracterizaron morfológicamente y molecularmente, encontrándose una gran diversidad en cuanto a la morfología de los cristales, los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas y de las familias *cry1*, *cry 3-cry 7*, *cry8*. También se analizaron en detalle los diferentes subfamilias de *cry1* y los genes *vip1*, *vip2* y *vip3*.

Se utilizaron dos estrategias de aislamiento dirigido hacia la búsqueda de *Bacillus thuringiensis* a partir de cafetales en donde *H. hampei* estaba presente abundantemente. La primera estrategia consistió en el aislamiento a partir de muestras ambientales de suelo, hojarasca, follaje y frutos infestados, mientras que la segunda estrategia, se basó en la interacción hospedero patógeno, para lo cual se aisló *Bt* a partir de larvas e insectos muertos de *H. hampei*.

El porcentaje de aislamiento de la bacteria fue del 72% a partir de suelo, 66% de hojarasca, 43% de frutos infestados y 35% de follaje. El mayor porcentaje de cepas de *Bt* aisladas a partir de muestras de suelo y hojarasca se podría explicar por la prevalencia común de *Bt* en el suelo (Martin y Travers, 1989; Claus, 1986) y del contacto del suelo con la hojarasca. La menor proporción de cepas aisladas a partir de muestras de follaje del café y de frutos infestados, puede explicarse por su menor contacto con suelo. La presencia de cepas con morfología similar a *Bt* en estos últimos tipos de muestras se debe a la naturaleza ubicua de las esporas de la bacteria, esto quiere decir que existen reportes de aislamientos de *Bt* a partir de todo tipo de muestras ambientales (Schnepf *et al.*, 1998).

En la segunda estrategia de aislamiento, el porcentaje fue del 65% a partir de insectos muertos de trampas, del 53% a partir de insectos muertos de frutos y del 43% de larvas muertas individuales. El mayor porcentaje de cepas encontradas en los adultos provenientes de trampas podría atribuirse a una infección con *Bt* previa a su caída en la trampa, o bien, a la

interacción del insecto con el ambiente durante el vuelo hasta llegar a la trampa. Es posible que algunas esporas se haya adherido a la superficie del insecto. Por otra parte, la menor proporción de aislamientos a partir de adultos y larvas muertas de granos con respecto a las anteriores, puede deberse a la muerte de los insectos por razones no atribuidas a infecciones con *Bt*. Sin embargo, el porcentaje de aislamiento de cepas es alto, si se considera que *H. hampei* pasa la mayor parte de su ciclo de vida dentro de los frutos, en un hábitat de poca interacción con el ambiente externo, en especial en el caso de las larvas que nunca salen del fruto.

El aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de insectos muertos data desde su descubrimiento en 1901 por Ishiwata, quien aisló esta bacteria a partir de larvas muertas flácidas y suaves del gusano de seda. Debido a la especificidad con que actúan las toxinas de *Bt*, existe más probabilidad de encontrar cepas patógenas a *H. hampei* a partir de aislamientos de insectos muertos. A pesar de que los insectos pueden morir por otros factores no relacionados a *Bt*, o bien, se pueden aislar cepas de *Bt* adheridas a la superficie de los insectos, existe la posibilidad de una búsqueda dirigida de cepas de *Bt* basándose en la interacción directa con el hospedero-patógeno, en contraposición de una búsqueda al azar a partir de otros tipos de muestras ambientales.

Uno de los requisitos fundamentales para la identificación de cepas de *Bt*, consiste en la detección de cristales mediante microscopía de luz, debido a que esta característica es útil para diferenciar a *Bt* de otras especies relacionadas como *Bacillus cereus*. Estos cristales varían mucho en su forma y tamaño según la cepa. En algunas ocasiones se ha relacionado la morfología de los cristales con el tipo de  $\delta$ - endotoxinas que contienen. La gran cantidad de cristales redondeados e irregulares que se presentaron en las cepas aisladas sugirió la posibilidad de encontrar genes *cry3* y *cry 8*, tóxicos para coleóteros como *H. hampei*, así como los genes *cry1B* de toxicidad dual para coleópteros y lepidópteros, en el caso de cepas con cristales romboidales. Además, cabe la posibilidad encontrar  $\delta$ -endotoxinas novedosas y efectivas codificados por otros genes *cry*, diferentes a los evaluados por PCR.

La relación que se ha descrito para los cristales romboidales y los genes *cryI* se presentó en las cepas CIBCM-73, 77, 150, 151, 167, 171 y 172. Sin embargo, en el caso de las cepas CIBCM-165, 80 y 64 mostraron cristales romboidales, pero no amplificaron con los iniciadores para *cryI*. Por otra parte, el vínculo entre las proteínas Cry 3 y la morfología de cristales irregulares se presentó en las cepas CIBCM-49, 50, 51, 54, 55, 56, 93, 94, 95, 147, 189, 190, 191, 218, 220, 221 y 222 (ver Cuadro 16). Sin embargo, las cepas CIBCM-14, 28, 77, 105, 107, 138, 139 y 149 presentaron cristales irregulares pero no amplificaron con *cry3-cry7*. Es importante señalar que la estructura tridimensional que adoptan las  $\delta$ -endotoxinas en cristales no está dada solamente por las protoxinas que contiene, sino por su interacción con otras proteínas de *Bt* conocidas como chaperoninas durante el proceso de ensamblaje del cristal (Aronson, 2002). Además, hay que considerar que la amplificación por PCR de una secuencia parcial de un gen determinado, no distingue entre aquellos que se expresen y los silenciados (Bravo, 1998).

La gran diversidad de morfologías de cristales que se observaron al microscopio para la cepa individual como la cepa CIBCM-79 (cristales romboidales, cuadrangulares y redondeados) puede relacionarse con la presencia de otras  $\delta$ -endotoxinas novedosas, en especial si se considera que esta estirpe no amplificó con ninguno de los iniciadores evaluados para  $\delta$ -endotoxinas, excepto para *vip3*, cuyas proteínas no forman inclusiones celulares.

La eficiencia del aislamiento de cepas de *Bt* con cristales por encima del 60% con respecto a los bacilos acristalíferos esporulados, es similar a lo reportado por Thenus y colaboradores (1998) de un 57% para diversos tipos de muestras. Cabe mencionar que el alto porcentaje de cepas con cristales en las muestras de larvas (90%), podría sugerir la muerte de las mismas por *Bt*.

Los cristales de *Bt* consisten de la acumulación en forma cristalina de miles de moléculas de proteínas Cry. La gran cantidad de estas proteínas hace posible la visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de patrones proteicos característicos entre los 20-140 KDa según la cepa. La diversidad de pesos moleculares observados en el análisis por SDS-PAGE de la colección en general, es una evidencia clara de que se cuenta con cepas que

expresan proteínas Cry diferentes. La gran diversidad de los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas observada en cepas aisladas de insectos muertos, sugiere la posibilidad de que alguna de ellas sea efectiva para el control de la broca.

La abundancia de cepas con proteínas Cry de pesos moleculares entre los 60-79 KDa, podría relacionarse con la presencia de  $\delta$ -endotoxinas, o bien de protoxinas truncadas como Cry11, Cry2, Cry3, Cry6, Cry10, Cry11, Cry13, Cry15, Cry16, Cry17; mientras que la otra agrupación de cepas con proteínas Cry entre los pesos de 140-145 Kda, posiblemente corresponden a protoxinas como las Cry1, Cry4, Cry5, Cry8, Cry9, Cry12, Cry14.

Para determinar el potencial tóxico de las cepas de una colección de *Bt*, es necesario conocer el perfil de los genes *cry*, *cyt* y *vips* que contienen. La amplificación por PCR de genes *vip3* de la mayoría de las cepas evaluadas (97%), es un hallazgo novedoso, si se compara con el 15% reportado por Estruch y colaboradores (1996). Debido a que estas proteínas tienen poco tiempo de haberse descubierto, solamente existen reportes de toxicidad contra lepidópteros, sin embargo, deben probarse en bioensayos para *H. hampei*. Los porcentajes de amplificación para *vip1* y *vip2* fueron bajos (6 y 3%), sin embargo, cabe destacar el producto de PCR de menor peso molecular para *vip1* de las cepas CIBCM-132 y CIBCM-133 es un indicio de que se podría tratarse de genes novedosos.

Las proteínas Vip no forman inclusiones proteicas, y son secretadas al medio (Cao-Guo, I *et al.*, 1996 y Estruch *et al.*, 1996), por lo que a la hora de realizar el SDS-PAGE, no se detecta la banda de 88 KDa que caracteriza a estas proteínas debido a que las mismas se encuentran en el medio de cultivo en concentraciones muy bajas y no en la asada de bacterias que se toma para realizar el análisis proteico. De ahí que las proteínas de diversos pesos moleculares que se presentaron en los geles de poliacrilamida podrían ser algún otro tipo de proteína Cry, especialmente si se considera que existen alrededor de 30 familias de genes *cry* y solamente se analizaron 9 de ellas.

Los segundos genes más abundantes después de los *vip3* fueron los genes *cry1*, que representaron el 47% lo cual concuerda con lo reportado por Bravo y colaboradores (1998).

Esta familia de genes es una de las más estudiadas y frecuentes. En la familia *cryI*, existen subfamilias que van de la *cryIA* a la *cryIK*, y dentro de las subfamilias existen otras subdivisiones, por ejemplo en el caso de *cryIA*, de la *cryIAa* a la *cryIAf*. La gran cantidad de combinaciones de genes es una característica de esta colección que podría representar la actividad tóxica contra diferentes órdenes de insectos plaga. Es importante en esta colección la presencia de genes *cryIB* debido a su reconocida actividad contra coleópteros, aunque no se puede descartar la actividad tóxica de otros genes *cry*, contra el insecto en estudio. Los perfiles de las cepas que contienen muchos de los genes *cryI*, puede explicarse debido a la presencia de grupos de genes en plásmidos, o bien a la presencia de varios plásmidos en una misma cepa.

Por otra parte, la cepas con genes *cry3-cry7* y *cry8*, son importantes en esta colección debido a la actividad que los mismos tienen contra coleópteros. El porcentaje de aislamiento de estos genes concuerdan con lo reportado por Bravo y colaboradores (1998), sin embargo, es bajo si se considera el enfoque dirigido de esta investigación.

El bajo porcentaje de cepas con genes *cry3-cry7* de la colección base, despertó la duda con respecto al criterio de selección de cepas según la presencia de bandas prominentes en los análisis por SDS-PAGE, por lo que no se incluyeron aquellas cepas con patrones proteicos tenues. Se encontró que la mayoría de las cepas que tenían genes *cry3-cry7* de la colección base contenían las bandas proteicas prominentes correspondían a otras proteínas Cry y no a las Cry3-Cry7. El patrón de bandas tenue de las cepas control Btt y CIBCM-97 que contienen los genes *cry3-cry7*, mostró la necesidad de incluir a aquellas cepas que presentaban un patrón proteico tenue en el análisis (colección complementaria).

El alto porcentaje de las cepas de la colección complementaria que amplificaron con los iniciadores *cry3-cry7* (67,5%), denota la importancia de la caracterización genética a la hora de establecer una colección. La razón de las bajas intensidades de bandas en los análisis de SDS-PAGE aún en el control, pueden explicarse por bajos niveles de expresión de los genes *cry3* por factores externos desconocidos. Esto debido a que contrario a las proteínas Cry1 cuya expresión depende exclusivamente de los factores  $\sigma$  de esporulación, las proteínas Cry3 se

expresan al final de la fase logarítmica de crecimiento bacteriano y son regulados por genes que hasta el momento no han sido identificados (Agaisse y Lereclus, 1995).

Las 27 cepas que amplificaron con los genes *cry3-cry7*, son cepas potencialmente tóxicas para coleópteros, incluido *H. hampei*, en especial si se considera que en su mayoría provienen de insectos muertos y podría existir una relación directa de patogenicidad. Esto, además, plantea la necesidad de terminar su análisis por PCR con otros genes como *cry8*, *vip3*, y *cry1B*.

Además, existe la posibilidad de que muchas de las restantes cepas con patrones de bandas tenues que no fueron consideradas en el análisis por PCR, presenten genes interesantes como *cry3*, y serán evaluadas en un futuro. Por otra parte, cabe destacar que existen genes importantes de *Bt* tóxicos para coleópteros que no fueron evaluados en este trabajo debido a la que no se disponía de los iniciadores, como lo es el caso de los genes *cryII*.

En total, se dispone de 46 cepas con potencial tóxico para *H. hampei*: 38 cepas con los genes *cry 3-cry7*, dos cepas con genes *cry3-cry7* y *cry 8*, dos cepas con los genes *cry8* y cuatro cepas con los genes *cry1B*. Sin embargo, la efectividad real de otras cepas no se puede descartar y debe probarse mediante bioensayos.

## 7 Conclusiones

- Se cuenta con una colección de 159 cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas a partir de muestras ambientales de cafetales donde la broca era abundante. La estrategia incluyó el aislamiento de cepas a partir de larvas y adultos muertos de *H. hampei*.
- El cepario se caracterizó desde el punto de vista de la diversidad de los cristales, de los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas y los genes que contiene cada estirpe de *Bt*.
- Es indispensable hacer el análisis por PCR, para correlacionarlo con la morfología de cristal y el perfil proteico de los pesos moleculares de las  $\delta$ -endotoxinas.
- La bacterioteca presenta una gran diversidad entre cepas y dentro de una misma cepa en cuanto a la morfologías de cristales, de las  $\delta$ -endotoxinas y los genes *cry* y *vips* que contienen.
- La colección tiene 46 cepas con  $\delta$ -endotoxinas que son potencialmente tóxicas coleópteros incluido *H. hampei*: 38 con genes *cry3-cry7*, dos con *cry 3-cry7* y *cry8*, dos con *cry 8* y cuatro cepas con *cry1B*.
- La colección en sí no solamente es útil para el insecto en estudio *H. hampei*, sino también para otras plagas de interés económico como lepidópteros debido a la presencia de los genes *cry1A*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E* y *vips*.
- Debido a que la realización de bioensayos es laboriosa, un primer criterio de selección es posible gracias a que se cuenta con el perfil genético y molecular de las cepas potencialmente tóxicas.
- La efectividad real de las diversas cepas debe de probarse mediante bioensayos con *H. hampei*.

## 8 Recomendaciones

- Se debe de realizar el análisis genético de 57 cepas de *Bt* que forman parte de la colección, pero que quedaron fuera del análisis por presentar un patrón de bandas proteicas poco prominentes en los geles de acrilamida.
- Se debe de completar la caracterización genética de las 40 cepas que se analizaron únicamente con el iniciador para los genes *cry3-cry7*.
- Se debe incluir el análisis por PCR para toda la colección para los genes *cryII*, ya tiene el mismo tiene un efecto dual para lepidópteros y coleópteros.

## 9 Bibliografía

- Agaisse, H. y Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. *Journal of Bacteriology* 177: 6027-6032.
- Audtho, M; Valaitis, A; Alzate, O y Dean, D. 1999. Production of Chymotrypsin-Resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1  $\delta$ -Endotoxin by Protein Engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4601-4605.
- Aronson, A. 2002. Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and molecular Life Sciences* 59: 417-425.
- Aronson, A. I. 1994. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide. *Plant Breeding Review* 12:19-45.
- Aronson, A.I. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Review* 50:1-24.
- B. thuringiensis* Pesticidal Crystal Protein Nomenclature Committee. 2002. Información en línea disponible en: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Visitado el 5 de diciembre 2002.
- Betz, F; Hammond, B; Fuchs, R. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pest. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 156-173.
- Ballester, V; Granero, F; Tabashnik, B; Malvar, T y Ferré J. 1999. Integrative Model for Binding of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Susceptible and Resistant Larvae of the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1413-1419.
- Borbón, O. 1991. La broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). Programa cooperativo ICAFE-MAG. San José, Costa Rica. 50p.
- Bravo, A; Sarabia, S; López, L; Ontiveros, H; Abarca, C; Ortiz, A; Ortiz, O; Lina, L; Villalobos, F; Peña, G; Nuñez, M; Quintero, R. 1998. Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4965-4972.
- Bustillo, A. E., Cárdenas, R., Villalba, D. A., Benavides, P., Orozco, J. y Posada, F. J. 1998. Manejo integrado de la broca del café. CENICAFE, Caldas, Colombia. 134 p.
- Castillo, A; Infante, F; de la Rosa, W; Gómez, J y Barrera, F. 2001. Investigación sobre la broca del café realizadas por ECOSUR. Memorias I Seminario Latinoamericano sobre broca. ICAFE-PROMECAFE. Costa Rica. 51p.

- Cao-Guo ,Y; Mullins, M; Warren, G; Koziel, M y Estruch, J. 1996. The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 532-536.
- Claus, D. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 182. En: Smith PHA(ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. pp 1105-1139.
- Crickmore, N; Zeigler, D; Feitelson, J; Schnepf, E; Van Rie, J; Lereclus, D; Baum, J y Dean, H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62:807-813.
- Dulmage, H.T. 1971. Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3 fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 353-358.
- ECOSUR. S.A. Proyecto Broca del café. Visitado el 20 de abril del 2002. Disponible en [http://www.tap-ecosur.edu.mx/proyectos/entomo/broca/proyecto\\_broca\\_del\\_caf%C3%A9.htm](http://www.tap-ecosur.edu.mx/proyectos/entomo/broca/proyecto_broca_del_caf%C3%A9.htm)
- Estruch, J. J; Warren, G.W.; Mullins, M; Nye, J; Craig, J y Kozuel, M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceeding of National Academy Sciences* 93: 5389-5394.
- Gustafson M.E., Clayton R.A., Lavrik P.B., Johnson G.V., Leimgruber R.M., Sims S.R., y Bartnicki D.E. 1997. Large-scale production and characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* insecticidal protein from *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology Biotechnology* 47: 255-261.
- González, A. 1998. Diagnóstico de la competitividad de la industria del café en Costa Rica. INCAE. Disponible en: [www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IIICA/productos/cafe\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IIICA/productos/cafe_mag.pdf).
- Guharay, F y Monterrey, J. 1997. Manejo ecológico de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*) en América Central. *Manejo Integrada de plagas Hoja Técnica* 22: I-VII.
- Hatanaka, T; Choi, Y.E; Kusano, T; Sano, H. 1999. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 19: 106-110.
- Heierson, A., I. Sidén, A. Kivaisi, and H. G. Boman. 1986. Bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus thuringiensis* with decreased virulence in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Journal of Bacteriology* 167:18-24.
- Heimpel, A. M. 1955. Investigations of the mode of action of strains of *Bacillus cereus* Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Htg.). *Canadian Journal of Zoology*. 33:311-326.

- Helgason, E; Caugant, D; Lecadet, M; Chen, Y; Mahillon, J. 1998. Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Current Microbiology* 37: 80-87.
- Información SANINET. Sa. La Broca del Café *Hypothenemus hampei* Medidas Generales de Combate de la Broca. Quito, Ecuador. Visitado el 20 de abril 2002. Disponible en <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/broca/control.html>.
- Le CIRAD, 2001. Coffee genetic transformation. Francia. Visitado el 8 de Agosto del 2002. Disponible en <http://www.cirad.fr/presentation/programmes/biotrop/resultats/biositecirad/coffee.htm>
- Le Pelley, R.H. 1968. Pest of coffee. London, Longman. 590.
- López, M. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades de café. M.A.G. 97p.
- Portilla y Bustillo, 1995. Nuevas investigaciones en la cría masiva de *Hypotenemus hampei* y se sus parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*. *Revista Colombiana de Entomología* 21: 25-33.
- Prieto-Samsonov, D; Vázquez, R, Ayra,C; Gonzáles, J; De la Riva, G. 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 1367-5435.
- MAG.2000. *Declaratoria Oficial de Plaga*. Sitio electrónico visitado el 20 de abril 2002. Disponible en: <http://www.protecnet.go.cr/declara.htm>.
- Martin PAW y Travers RS. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2437-2442.
- Muñoz, R. 2001. La broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei* ) en Honduras. Memorias I seminario Latinoamericano sobre broca. ICAFE-PROMECAFE. Costa Rica. 51.
- Nivia, E; Gómez, E; Sierra, P; Vergaria, R; Restrepo, J; Polo, C; Soledad, C y Soto, A. 2001. Comunicado para la publicación del consejo del Estado: El Endosulfan es peligroso y está prohibido en Colombia. Bogotá, Colombia. Red de Acción en plaguicidas y sus Alternativas de América Latina RAP-AL. Disponible en [www.rap-al.org/acciones/Campanaendosulfan.html](http://www.rap-al.org/acciones/Campanaendosulfan.html)
- Sivasupramaniam, S., Kabuye, VT., Malvar, T., Baumja Gilmer, A.J., Peters, A., Coyle D., Mohan K.S., Deebea F. y Ravi, K.C., 2000. Hybrid *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin provide enhanced spectrun of activity on Lepidopteran pest of cotton. In: Dugger P, Richter D, editors. Beltwide Cotton Conference Proceedings, pp. 837-840. Memphis; National Cotton Council.

- Schnepf, E; Crickmore,N; Van Rie, J; Lereclus,D; Baum,J; Feitelson,J; Zeigler, D y Dean, D.1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- Thenus, W; Aguda, R, Cruz,W; Decok,C; Peferoen,M; Lambert, B; Bottrell, D; Gould, F; Litsinger, J y Cohen, M. 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution,  $\delta$ -endotoxin diversity and toxicity o rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research* 88: 335-342.
- Travers, R.; Martin, P. and Reichelderfer, C. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1263-1266.
- Yu, C; Mullins, M; Warren, G; Koziel, M y Estruch, J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative Insecticidal Protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 532-536.

## 10 Anexos

### 10.1 Microscopía de luz

Las características microscópicas la totalidad de las cepas aisladas con morfología de colonia similar a *Bt* se muestran en la Cuadro 1A.

**Cuadro 1A.** Características microscópicas de las estirpes que presentaron morfología similar a *Bt*

Número de cepa	Características microscópicas
1	Bacilo esporulado
2	Cristales redondeados y unidos a esporas
3	Cristal irregular
4	Bacilo esporulado
5	Cristales pequeños e irregulares
6	Cristales pequeños redondeados
7	Bacilo esporulado
8	Bacilo esporulado
9	Cristales pequeños redondeados
10	Cristales pequeños irregulares y cristales redondeados
11	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
12	Cristales mediano irregulares
13	Cristales pequeños e irregulares
14	Cristales pequeños e irregulares y medianos redondeados
15	Cristales alargados y pequeños redondeados
16	Cristales irregulares pequeños
17	Cristales pequeños redondeados
18	Cristales pequeños redondeados
19	Bacilo esporulado
20	Cristales irregulares y alargados cortos
21	Cristales irregulares medianos
22	Bacilo esporulado
23	Cristales pequeños redondeados
24	Cristales pequeños y medianos redondeados
25	Cristales redondeados y similares a gotas
26	Cristales redondeados y romboidales
27	Cristales redondeados y romboidales
28	Cristales redondeados e irregulares
29	Cristales redondeados
30	Bacilo esporulado
31	Cristales redondeados
32	Cristales redondeados
33	Bacilo esporulado
34	Cristales redondeados
35	Cristales redondeados
36	Cristales redondeados medianos y grandes
37	Cristales redondeados unidos a esporas

Continuación de Cuadro 1A

Número de cepa	Características microscópicas
38	Cristales redondeados unidos a esporas
39	Bacilo esporulado
40	Bacilo esporulado
41	Cristales redondeados grandes
42	Cristales redondeados grandes
43	Cristales medianos redondeados
44	Bacilo esporulado
45	Cristales medianos redondeados
46	Bacilo esporulado
47	Bacilo esporulado
48	Cristales pequeños redondeados
49	Cristales pequeños irregulares
50	Cristales pequeños irregulares
51	Cristales pequeños irregulares
52	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
53	Cristales pequeños y medianos redondeados
54	Cristales medianos redondeados
55	Cristales pequeños irregulares
56	Cristales pequeños irregulares
57	Bacilo esporulado
58	Bacilo esporulado
59	Cristales pequeños redondeados
60	Bacilo esporulado
61	Cristales pequeños redondeados
62	Cristales irregulares
63	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
64	Cristales romboidales, irregular, redondeados
65	Cristales redondeados
66	Cristales pequeños redondeados, amorfos y similares a gotas
67	Cristales medianos redondeados
68	Cristales similares a gotas, redondeados y romboidales
69	Bacilos largos y diferentes a <i>Bt</i>
70	Cristales irregulares mediano
71	Bacilo esporulado
72	Cristales redondeados y rombos
73	Cristales romboidales, redondeados y similares a gotas
74	Cristales redondeados
75	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
76	Cristales Irregulares mediano
77	Cristales romboidales, redondeados e irregulares
78	Bacilo irregular y diferente a <i>Bt</i>
79	Cristales redondeados, romboidales y similares a gotas
80	Cristales romboidalesy redondeados
81	Cristales romboidalesy redondeados
82	Cristales pequeños redondeados
83	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
84	Cristales pequeños redondeados, romboidales y similares a gotas
85	Cristales romboidales y redondeados

*Continuación de Cuadro 1A*

Número de cepa	Características microscópicas
86	Cristales romboidales y redondeados
87	Cristales romboidales y redondeados
88	Cristales pequeños redondeados
89	Bacilo esporulado
90	Cristales pequeños irregulares
91	Cristales pequeños irregulares
92	Bacilo esporulado
93	Cristales pequeños irregulares
94	Cristales pequeños irregulares
95	Cristales pequeños irregulares
96	Bacilos largos y diferentes a <i>Bt</i>
97	Cristales romboidales
98	Cristales pequeños redondeados
99	Bacilo esporulado
100	Bacilo esporulado
101	cristales pequeños redondeados
102	Cristales pequeños romboidales y similares a gotas
103	Bacilo esporulado
104	Bacilo esporulado
105	Cristales pequeños irregulares
106	Cristales irregulares mediano
107	Cristales pequeños irregulares, pequeños redondeados
108	Bacilo esporulado
109	Bacilo esporulado
110	Bacilo esporulado
111	Cristales pequeños irregulares
112	Bacilo esporulado
113	Cristales pequeños irregulares
114	Cristales redondeados
115	Bacilo esporulado
116	Bacilo esporulado
117	Bacilo esporulado
118	Bacilo esporulado
119	Bacilo esporulado
120	Bacilo esporulado
121	Bacilo esporulado
122	Cristales medianos redondeados
123	Bacilo esporulado
124	Cristales pequeños irregulares
125	Cristales pequeños irregulares
126	Bacilo esporulado
127	Cristales pequeños irregulares
128	Bacilo esporulado
129	Bacilo esporulado

*Continuación de Cuadro 1A*

Número de cepa	Características microscópicas
130	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
131	Bacilo esporulado
132	Cristales pequeños irregulares y pequeños redondeados
133	Cristales pequeños irregulares
134	Bacilo esporulado
135	Cristales pequeños irregulares
136	Bacilo esporulado
137	Cristales pequeños redondeados
138	Cristales medianos irregulares
139	Cristales medianos irregulares
140	Bacilo irregular y diferente a <i>Bt</i>
141	Cristales pequeños irregulares
142	Bacilo irregular y diferente a <i>Bt</i>
143	Bacilo esporulado
144	Bacilo esporulado
145	Cristales pequeños irregulares
146	Cristales pequeños redondeados
147	Cristales pequeños redondeado
148	Cristales romboidales
149	Cristales pequeños irregulares
150	Cristales romboidales y cristales medianos redondeados
151	Cristales romboidales y cristales medianos redondeados
152	Cristales pequeños redondeados
153	Bacilo esporulado
154	Cristales pequeños irregulares
155	Bacilo esporulado
156	Cristales medianos redondeados
157	Cristales pequeños redondeados
158	Bacilo esporulado
159	Bacilo esporulado
160	Cristales redondeados del tamaño de la espora
161	Cristales pequeños irregulares
162	Bacilo esporulado
163	Bacilo esporulado
164	Cristales romboidales, redondeados
165	Cristales romboidales, redondeados y cuadrangulares
166	Cristales romboidales, redondeados y cuadrangulares
167	Cristales romboidales
168	Cristales pequeños redondeados
169	Cristales romboidales, redondeados
170	Cristales romboidales, redondeados
171	Cristales romboidales, redondeados
172	Cristales romboidales, redondeados y pequeños redondeados
173	Bacilo esporulado
174	Cristales romboidales, redondeados
175	Cristales romboidales

*Continuación de Cuadro 1A*

Número de cepa	Características microscópicas
176	Cristales pequeños irregulares
177	Cristales pequeños irregulares
178	Bacilo esporulado
179	Cristales romboidales, pequeños y irregulares
180	Cristales pequeños redondeados
181	Bacilo irregular y diferente a <i>Bt</i>
182	Cristales pequeños redondeados
183	Bacilo esporulado
184	Bacilo esporulado
185	Cristales pequeños irregulares
186	Cristales pequeños y redondeados
187	Bacilo esporulado
188	Cristales pequeños irregulares
189	Cristales pequeños irregulares
190	Cristales pequeños irregulares
191	Cristales pequeños irregulares
192	Bacilo esporulado
193	Bacilo esporulado
194	Bacilo esporulado
195	Bacilo esporulado
196	Cristales pequeños redondeados
197	Cristales medianos redondeados
198	Cristales pequeños redondeados
199	Cristales pequeños redondeados
200	Bacilo esporulado
201	Cristales pequeños irregulares
202	Cristales pequeños redondeados
203	Cristales pequeños redondeados
204	Bacilo esporulado
205	Bacilo esporulado
206	Bacilo esporulado
207	Cristales pequeños redondeados
208	Bacilo esporulado
209	Cristales romboidales e irregulares
210	Bacilo esporulado
211	Bacilo esporulado diferente a <i>Bt</i>
212	Bacilo esporulado
213	Bacilo esporulado
214	Cristales pequeños irregulares
215	Cristales pequeños irregulares
216	Cristales pequeños irregulares
217	Cristales pequeños irregulares
218	Cristales pequeños irregulares
219	Bacilo esporulado

Continuación de Cuadro 1A

Número de cepa	Características microscópicas
220	Cristales pequeños redondeados
221	Cristales pequeños irregulares
222	Cristales pequeños irregulares
223	Bacilo esporulado
224	Bacilo esporulado
225	Bacilo esporulado
226	Cristales pequeños irregulares
227	Bacilo esporulado
228	Cristales pequeños irregulares
229	Cristales pequeños irregulares, cristales pequeños redondeados
230	Bacilo esporulado
231	Cristales pequeños irregulares
232	Cristales pequeños irregulares, cristales pequeños redondeados
233	Cristales pequeños irregulares, cristales pequeños redondeados
234	Bacilo esporulado
235	Cristales pequeños redondeados
236	Bacilo irregular y diferente a <i>Bt</i>
237	Cristales redondeados
238	Cristales pequeños redondeados
239	Cristal pequeño irregular
240	Cristales medianos redondeados
241	Cristales medianos redondeados
242	Cristales romboidales
243	Cristales pequeños irregulares
244	Cristales pequeños redondeados
245	Cristales pequeños irregulares
246	Cristales pequeños irregulares
247	Cristales redondeados y cristales pequeños irregulares
248	Cristales redondeados
249	Cristales redondeados
250	Cristales redondeados

## 10.2 Coordenadas geográficas de los sitios de colecta

En el siguiente cuadro se detallan las coordenadas y altitud de los sitios de colecta de muestras, así como los sitios en los que se colocaron trampas.

Lugar	Sitio	Localización	Altitud (msnm)
Finca	0	10° 01' 26.5 Latitud Norte; 84° 21' 25 Long. Oeste	737
La Argentina (Grecia)	1	10° 01' 27.2 Latitud Norte; 84° 21' 25.4 Long. Oeste	727
	2	10° 01' 27.1 Latitud Norte; 84° 21' 25.3 Long. Oeste	724
	3	10° 01' 26.7 Latitud Norte; 84° 21' 25.6 Long. Oeste	727
	4	10° 01' 26.5 Latitud Norte; 84° 21' 25 Long. Oeste	728
Finca	0	10° 02' 38.1 Latitud Norte; 84° 22' 44.7 Long. Oeste	880
Nelson Vargas (Naranjo, El Rosario)	1	10° 02' 38.1 Latitud Norte; 84° 22' 44.7 Long. Oeste	880
	2	10° 02' 42,4 Latitud Norte; 84° 22' 46 Long. Oeste	882
	3	10° 02' 41,2 Latitud Norte; 84° 22' 45,6 Long. Oeste	883
Finca	1	10° 02' 32,7 Latitud Norte; 84° 23' 13,3 Long. Oeste	915
Los Hoyos (Naranjo, El Rosario)	2	10° 02' 33 Latitud Norte; 84° 23' 14,5 Long. Oeste	935
	3	10° 02' 33,8 Latitud Norte; 84° 23' 14,6 Long. Oeste	931
	4	10° 02' 34 Latitud Norte; 84° 23' 14,4 Long. Oeste	933
Finca	0	09° 48' 19.7 Latitud Norte; 84° 23' 09.3 Long. Oeste	756
Tabacos de la Cordillera (Puriscal)			
Finca	0	10° 03' 00 Latitud Norte; 84° 25' 41.1 Long. Oeste	1070
Los Ulate Palmares			
Barrial de Heredia	0	10° 05' 46.4 Latitud Norte; 84° 30' 46.7 Long. Oeste	1068

### 10.3 Medios de cultivo y reactivos

#### **Medio LB con acetato al 0.2 M (1 Litro)**

10gr. Triptona  
5 gr. extracto de levadura  
5 gr. de cloruro de sodio  
100 ml de 2M acetato de sodio  
pH:6.8 diluir en agua destilada hasta 1 litro y autoclavar

#### **Medio T3 (1 Litro)**

3 gr. Triptona 2 gr. Triptosa  
1.5 gr. extracto de levadura  
0.05M de fosfato de sodio,  
pH 6.8  
0.005 gr. de cloruro de manganeso  
Aforar con agua destilada hasta 1 litro y autoclavar

#### **Medio Agar LB (1 Litro)**

10gr. de triptona  
5 gr. de extracto de levadura  
5 gr. de cloruro de sodio  
14 gr. de agar diluir en agua destilada hasta 1 litro y autoclavar

#### **Colorante Coomassie Blue R- 250:**

0.25 g de Coomassie blue R- 250;  
225 mL de metanol;  
46 mL de ácido acético,  
230 mL de agua;  
Disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

**Acrilamida al 30%:** 29,2 g acrilamida, 0,8g de bis-acrilamida, disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración en botella ámbar.

**Amortiguador del gel separador (1.5M TRIS-pH 8.8):** 18,15g Tris, disolver en 60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml.

**Amortiguador de gel compactador (1,0M TRIS-pH 6.8):** 3,0g de Tris disolver en 60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml.

**Solución de SDS al 10%:** 1g de dodecilsulfato de sodio, disolver en 10 ml de agua.

**Persulfato de amonio al 10%:** 1g de persulfato de amonio, agregar 10 ml de agua. Preparar alícuotas de aprox. 200 µl y mantener a -20C.

**Amortiguador de la cámara (Tris-glicina 10X):** 12g de Tris, 57,6g de glicina, 4g de SDS, disolver en 300 ml de agua, el pH debe estar cerca de 8,3-8,4 en caso necesario ajustarlo. Aforar a 400 ml.

**Decolorante:** 200 ml metanol, 100 ml etanol, 50 ml de ácido acético, 650 ml de agua.

## **Localización de Autores**

### **Alejandro Hernández Soto**

Teléfono: 292-86-87, celular: 352-0512, Fax: 294-0495.

Dirección: San Francisco de Coronado, frente a la plaza de balompié ASODECO.

Correo electrónico: alehs@hotmail.com

### **Ana Mercedes Espinoza, Ph.D.**

Investigadora y coordinadora del Grupo de Ingeniería Genética de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica.

Correo electrónico amespino@racsa.co.cr

### **Johny Peraza, MSc.**

Profesor e investigador del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Escuela de Biología del ITCR: 550-2285.

Correo electrónico: jperaza@itcr.ac.cr

### **Miguel Rojas, Ph.D.**

Profesor e investigador del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Escuela de Biología del ITCR: 550-2285