



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS Cry RECOMBINANTES DE
Bacillus thuringiensis SOBRE LARVAS DE PRIMER INSTAR DE
Hypothenemus hampei Ferrari (Coleóptera: Scolytidae)**

SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

DIRECTOR

JAIRO A. CERÓN S.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Bogotá D.C. 2011

A mi familia

ÍNDICE

	Página
RESÚMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
ANTECEDENTES	9
1. Generalidades	10
2. La broca del café.....	12
3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
4. ICP	18
5. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	21
6. Proteínas Cry recombinantes.....	24
7. <i>Bt</i> y la broca del café	28
OBJETIVO	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
RESULTADOS.....	36
Capítulo 1: Evaluación de la actividad biológica de cepas de referencia de <i>Bt</i> portadoras de genes <i>cry1B</i> , <i>cry3A</i> , <i>cry4</i> y <i>cry9</i>	38
Capítulo 2: Las proteínas Cry1B y Cry3A son activas contra <i>H. hampei</i> Ferrari (Coleóptera: Scolytidae).....	47
Capítulo 3: Actividad de una proteína híbrida de <i>Bt</i> contra un lepidóptero y un coleóptero plagas.....	52
Capítulo 4: Proteínas tipo Cry: implicaciones para el control de la broca del café	59
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	74
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fotografía de contraste de fases de la cepa <i>Bt kustaki</i>	17
Figura 2. Estructura teórica tridimensional de la toxina Cry16Aa	20
Figura 3. Análisis de las cepas de referencia de <i>Bt</i>	44
Figura 4. <i>H. hampei</i> en dieta IBUN.....	46
Figura 5. Alineamiento de la estructura primaria de las proteínas Cry1B y Cry3A.	77
Figura 6. Estructuras tridimensionales superimpuestas de las proteínas Cry1B (azul) y Cry3A (rojo), en base al carbono α	78
Figura 7. La toxinas Cry en <i>H. hampei</i>	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cultivos transgénicos resistentes a fitopatógenos	13
Tabla 2. Cepas bacterianas, genes <i>cry</i> identificados, órdenes de insectos susceptibles y oligonucleótidos utilizados.	42
Tabla 3. Tiempo de desarrollo de las diferentes fases de la broca del café en la dieta IBUN.	46

RESÚMEN

INTRODUCCIÓN: La biología de la conservación propone aplicaciones para evitar la pérdida de biodiversidad. La agricultura de conservación es un modelo de producción agrario que ahorra en recursos para alcanzar beneficios satisfactorios, producción alta sostenida, y la protección del medio ambiente. El Manejo Integrado de Plagas es un plan fundamental en la agricultura de conservación que armoniza los métodos químicos y biológicos afín de proteger los ecosistemas agrícolas y sus recursos naturales (agua, suelo, aire). *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae) es el problema entomológico más importante en los cultivos de café del mundo. Se ha estimado que en Colombia se cultivan 800000 hectáreas de café, y esta plaga causa un gran perjuicio (pérdidas 8-50%). Se utilizan estrategias de control de esta plaga tales como técnicas culturales, enemigos naturales, entomopatógenos y agentes químicos. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria entomopatógena ampliamente utilizada en el control de insectos-plaga de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera. El factor de virulencia de *Bt* más importante son las proteínas Cry. Varias proteínas Cry tienen actividad letal contra los insectos coleópteros como Cry1B, Cry1I, Cry3 y Cry9. Se ha encontrado que cepas de *Bt* tipo *israelensis* son activas contra coleópteros. OBJETIVO: Evaluar la actividad biológica de proteínas Cry contra larvas de primer instar de *H. hampei*. RESULTADOS: Se construyeron las proteínas recombinantes Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry4, Cry9 y la proteína híbrida SN1917 (dominio II es una fusión de los correspondientes de Cry1I y Cry1B). Los bioensayos mostraron que Cry1B (mortalidad 43,5%) tiene un poco más de actividad que Cry3A (mortalidad 30,2%) contra el insecto. Desafortunadamente Cry1I, Cry4, Cry9 y SN1917 no poseen actividad hacia *H. hampei*. Las pruebas de western blot indican reconocimiento entre Cry1B, Cry1I o Cry3A y una proteína (140 kDa) de la membrana apical del epitelio del intestino medio del insecto. Un enfoque bioinformático señala la posible presencia de toxinas tipo Cry en genomas microbianos y ambientales con potencial contra coleópteros como *H. hampei*. CONCLUSIÓN: Se logro identificar proteínas Cry con potencial para el control biológico de larvas de la broca del café.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Conservation biology propose applications to avoid biodiversity loss. Conservation agriculture is a model for resource-saving farming production to reach satisfactory profits together, high and sustained production and environmental protection. Integrated Pest Management is a key plan in conservation agriculture to pest control that joins chemical and biological methods to protect crop ecosystem and surrounding natural resources (water, soil, air). *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae) is the most important entomological problem in coffee crops around the world. It has been estimated that 800000 Ha of coffee are cultivated in Colombia, and this pest causes an important damage (losses 8-50%). Several management strategies are used in their control such as cultural techniques, natural enemies, entomopathogens and chemical agents. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is an entomopathogenic bacteria used widely in pest insect control of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. The most important virulence factor of *Bt* are Cry proteins. Several Cry proteins have lethal activity against coleopteran insects such as Cry1B, Cry1I, Cry3 and Cry9. It has been found that *Bt israelensis*-like strains are active against coleopterans. OBJECTIVE: To evaluate the biological activity of Cry proteins against first instar larvae of *H. hampei*. RESULTS: Recombinant Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry4, Cry9 and Hybrid protein SN1917 (domain II is a combination of corresponding Cry1I and Cry1B) were constructed. Bioassays showed that Cry1B (mortality 43.5%) is somewhat more active than Cry3A (mortality 30.2%) against the pest. Unfortunately, Cry1I, Cry4, Cry9 and SN1917 not possess activity on *H. hampei*. Binding tests indicate an interaction between Cry1B, Cry1I or Cry3A and a 140 kDa protein from apical membrane of epithelial midgut of this insect. A bioinformatics approach could be a sign of Cry-like toxins presence in microbial and environmental genomes with potential against Coleoptera order, such as *H. hampei*. CONCLUSION: In this work, it was possible to identify Cry proteins with potential to CBB biological control.

ANTECEDENTES

1. Generalidades.

Los insumos agrícolas abarcan los recursos utilizados en la generación de productos agrícolas tales como semillas, fertilizantes, irrigación, productos químicos para la protección de cultivos y promoción de su crecimiento, combustible y electricidad. Entre estos insumos existen algunos que son causantes de contaminación tales como los pesticidas sintéticos, diversos químicos utilizados como fertilizantes o las aguas residuales. Pesticidas organoclorados (como el Dicloro Difenil Tricloroetano o DDT) afectan las cadenas tróficas y el aumento de concentración esta en correlación con niveles tróficos superiores ya que se han observado efectos negativos con poblaciones de aves rapaces que se alimentaban de otras aves, que a su vez habían consumido insectos, los cuales habían sido expuestos a pesticidas (Primack, 1995). Como una respuesta a esta problemática se ha planteado la agricultura de conservación, la cual es una metodología de producción agrícola sostenible que consiste en prácticas agronómicas adaptadas a las condiciones especiales de cada región y a las exigencias del cultivo, cuyas técnicas de labranza y de manejo de suelo evitan su erosión y degradación, mejoran su calidad y biodiversidad, contribuyen al buen uso de los recursos naturales, sin menoscabar los niveles de producción (<http://www.fao.org/ag/ca/es/index.html>).

Uno de las principales dificultades en los cultivos comerciales son las plagas, organismos que compiten con el hombre por agua y alimentos, incluyendo los vectores que conllevan la transmisión de enfermedades; estas invaden los espacios en los que desarrollan sus actividades y cuya presencia causa el daño de estructuras o bienes (FIFRA, 2002). Se estima que entre el 35 al 40% de la producción agrícola mundial es destruida por plagas, y que los insectos contribuyen aproximadamente con 15% de este daño (Oerke, 2006; Krattiger, 1997). Las pérdidas en la agricultura por causa de insectos se estiman en \$10 billones de dólares/año (www.cgiar.org). La eficacia del control de plagas animales alcanza únicamente un 39% si se compara con el 75% correspondiente a malezas (Oerke, 2006). El Manejo Integrado de Plagas (MIP)

consiste en una estrategia para la solución de este problema, ya que considera la dinámica de estas poblaciones en el medio ambiente y armoniza los métodos químicos y biológicos, incluyendo varios beneficios:

- Reduce los riesgos, que podrían causar las estrategias del manejo de plagas, a la población, propiedad privada o recursos naturales.
- Involucra una comprensión de la plaga, con una eliminación de las condiciones que la favorecen, ahorrando tiempo y recursos.
- Favorece el manejo de las plagas utilizando una aproximación basada en la ciencia.
- Genera una acción participativa que conlleva a programas exitosos, estables en el tiempo y con altos rendimientos en la producción.
- Disminuye o elimina el innecesario uso de pesticidas sintéticos.

La agricultura de conservación forma parte de los mismos principios que el MIP, favoreciendo los procesos biológicos, la gestión de los cultivos y las plagas y el tratamiento general de las tierras. Sin aplicar el MIP no es posible la acumulación de la biota del suelo (Dumansky et al., 2006). El control biológico es un término que acuña la utilización de organismos vivos, o sus productos, para reducir las poblaciones de organismos dinámicos aminorando sus efectos perjudiciales. De esta forma, muchas poblaciones de plagas son mantenidas a bajos niveles por sus enemigos naturales, debido a la interacción de ambos grupos poblacionales, lo cual implica una supresión debida a la densidad, resultando en el mantenimiento de dichas poblaciones en equilibrio. Esta estrategia respeta el medio ambiente, debido a que no se emplean productos químicos, no elimina la plaga totalmente conservando el equilibrio natural, conserva a los insectos benignos (entre los que están los enemigos de la plaga) y evita la pérdida de altos niveles de producción (Pal and McSpadden, 2006).

Muchas enfermedades, causadas por diferentes organismos y que suceden naturalmente en los insectos, pueden utilizarse como pesticidas biológicos. A estos

organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos, estos últimos conocidos como bioinsecticidas e incluyen a diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nematodos y virus. Estos microorganismos, denominados entomopatógenos, son específicos: afectan sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos, otros organismos superiores y el medioambiente (Hajek et al., 2007; Lacey et al., 2001). Se han desarrollado productos a base de patógenos microbianos de insectos, que se utilizan para la protección de la agricultura comercial, cuyas ventas aumentan aunque solo representan entre 1 a 1.5% del mercado relacionado con protección de cultivos (Lacey et al., 2001). Recientemente la información genética de estos microorganismos se viene utilizando en la producción de cultivos transgénicos resistentes a enfermedades (Tabla 1) (Castle et al., 2006).

2. La broca del café.

Pocas bebidas han llegado a ser tan populares y apreciadas como el café. Los expertos coinciden en que el café está en capacidad de ofrecer un sabor y experiencias complejas, más allá de ser una simple bebida estimulante o que satisface la sed. El aroma y sabor del café ofrecen una variedad de sensaciones que reconfortan el estado físico y mental de quienes lo consumen (Capel y Pérez, 2010).

El cultivo del café en Colombia representa el corazón de la sociedad rural colombiana ofreciendo una oportunidad de trabajo, de ingreso y de subsistencia a millones de colombianos en áreas en donde su mayoría no existe alternativa viable (Observatorio Agrocadenas Colombia, 2005). Se han obtenido importantes avances en su cultivo, que van desde buenas prácticas de cosecha, pasando por proyectos de genómica y el desarrollo de plantas transgénicas de café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*, mediada por *Agrobacterium*) (Etienne et al., 2002).

Tabla 1. Cultivos transgénicos resistentes a fitopatógenos (Tomado de Castle et al., 2006).

Cultivo	Fenotipo	Genes	Compañía y año	Nombre comercial
Algodón	Resistencia a lepidópteros	<i>cry1Ac</i>	Monsanto 1996	Bollgard®, Ingard®
		<i>cry1Ac, cry2Ab2</i>	Monsanto 2003	Bollgard® II
		<i>cry1Fa, cry1Ac, pat</i>	Dow AgroSciences 2005	WideStrike™
Maíz	Resistencia a lepidópteros	<i>cry1Ab, pat</i>	Syngenta 1996	YieldGard®, Attribute®
		<i>cry1Ab</i>	Monsanto 1997	YieldGard® Corn Borer
		<i>cry1F, pat</i>	Dow AgroSciences; Pioneer Hi-Bred Intl 2003	Herculex® I
	Resistencia al gusano de la raíz del maíz	<i>cry3Bb1</i>	Monsanto 2003	YieldGard® rootworm
		<i>cry1Ab, cry3Bb1</i>	Monsanto 2005	YieldGard® Plus
Calabazín	Resistencia a CMV, WMV2 y ZYMV	Genes de la cubierta proteica de CMV, WMV2 y ZYMV	Monsanto 1998	Destiny III, Conquerer III, Liberator III
	Resistencia a WMV2 y ZYMV	Genes de la cubierta proteica de WMV2 y ZYMV	Monsanto 1995	Prelude II, Patriot II, Declaration II, Independence II
Papaya	Resistencia a PRSV	Gen de la cubierta proteica 55-1 de PRSV	Universidad de Cornell; Universidad de Hawaii; USDA 1998	SunUp, Rainbow

Abreviaciones: CMV, virus del mosaico del pepino cohombro; PRSV, virus del anillo de la papaya; WMV2, virus del mosaico de la sandía; ZYMV, virus del mosaico amarillo del zapallo.

La broca del fruto del café *H. hampei* (Ferrari) (Coleóptera; Scolytidae) es una plaga que afecta el cultivo del café en todo el mundo. Al parecer la plaga ingreso a nuestro país por Nariño hacia 1988 (Bustillo, 2006; Vélez y Benavides, 1990). La broca desarrolla su ciclo de vida al interior de los frutos, lo cual dificulta su control con insecticidas y con el uso de enemigos naturales por lo cual su manejo es costoso (Bustillo, 2006; Damon, 2000). La broca reduce la cosecha en más de un 50%, con una pérdida de peso de café pergamino del 18.1%, afectando su precio según el grado de infestación, lo cual depende de la velocidad de maduración de la cereza, el ciclo de vida del insecto, temperatura y humedad. Del total de costos de producción, un promedio de 8.7% corresponde al control de la plaga, siendo los costos por hectárea aproximadamente de 221.355 pesos colombianos, donde el 80% corresponde a mano de obra (Bustillo, 2006; Camilo et al., 2003; Duque-Orrego et al., 2002).

La alteración fisiológica que el insecto ocasiona a los granos origina pérdidas en la productividad y el deterioro de la calidad del café con diferentes repercusiones económicas, sociales y ambientales (Ramírez, 2009; Gama *et al.*, 2006). El insecto se encuentra aproximadamente en 860000 hectáreas de la zona cafetera de Colombia (90% de la zona cafetera). Los costos en el manejo de la plaga se sitúan aproximadamente en 221355 pesos/ha/año (8.7% de los costos de producción) (Ramírez, 2009; Bustillo, 2006; Duque et al., 2002). Según Salazar (1993), el momento apto en el cual la broca puede instalarse en el fruto y servir de alimento para su progenie ocurre a los 119 días post-floración para la variedad Colombia, en Chinchiná, Caldas, a 1400 msnm. Los frutos de café empiezan a ser susceptibles al ataque de la broca, cuando su peso seco es igual o mayor al 20%, lo cual se logra cuando los frutos alcanza entre 100 y 150 días de desarrollo después de la floración, dependiendo de la latitud (Bustillo, 2006).

Este insecto posee escasa variabilidad genética, ya que al aplicar marcadores moleculares sobre varias poblaciones solo se han determinado dos clados, muy probablemente debido a su alta endogamia en combinación al mecanismo de

haplodiploidia funcional (Andreev et al., 1998). Se considera que en el futuro el cambio climático podría afectar la supervivencia de la plaga (Jaramillo et al., 2009). Actualmente se realiza un proyecto para determinar su secuencia genómica, donde los resultados preliminares indican presencia de genes relacionados con la resistencia, alimentación, desarrollo y reproducción (Cadena, 2007).

El control de la broca se debe realizar a través de un programa de manejo integrado, conformado por varios componentes de control como son: los entomopatógenos y los parasitoides, control cultural (como el re-re) y control químico que se debe tener como última opción debido a su costo alto y riesgos para el agroecosistema (Ramírez, 2009; Damon, 2000). Dentro de los entomopatógenos se destaca el hongo *Bauveria bassiana*, que ha sido utilizado para controlar las poblaciones del insecto (Rehner et al., 2006). Otros organismos que se han utilizado en su control son:

- Hongos: *Hirsutella eleutheratorum*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum* (que puede ser patógeno de humanos o plantas) y *Paecilomyces lilacinus* (Díaz et al., 2003; Bustillo, 2006; Damon, 2000).
- Bacterias: *Bacillus sp.* y *Serratia sp.* (Damon, 2000).
- Microsporidios: *Mattesia sp.* (Damon, 2000).
- Parasitoides: *Cryptoxilos sp.* (Himenóptera: Braconidae) (Damon, 2000)
- Predadores: miembros de las familias Formicidae (Himenóptera), Anthocoridae (Hemíptera) y Cucujidae (Coleóptera) (Damon, 2000; Bustillo, 2006).
- Competidores: familias de los ordenes Díptera (Lonchaeidae y Sciaridae), Lepidóptera (Pyralidae) y Coleóptera (Staphylinidae y Nitidulidae). (Damon, 2000; Bustillo, 2006).
- Nemátodos: *Sphaerulariopsis sp.* (Castillo et al., 2002).

Se ha identificado estrategias promisorias de control. Por ejemplo, se encontró que la cepa 549 del hongo *M. anisopliae*, expresando la toxina AaIT del escorpión *Androctonus australis*, causó una mortalidad aproximada de 96% (Pava-Ripoll et al.,

2008). Por otro lado, se determinó la utilidad factible del predador *Karnyothrips flavipes* ((Thysanoptera: Phlaeothripidae) para el control de poblaciones de la broca del café (Jaramillo et al., 2010). Además, se encontró actividad de inhibidores específicos de las α -amilasas de *H. hampei* provenientes de *Phaseolus coccineus* (Valencia-Jiménez et al., 2008). Desafortunadamente aún no existe una alternativa para el control biológico de la plaga con los resultados esperados, por lo cual aún se utiliza la aplicación de pesticidas químicos tales como los medianamente tóxicos (categoría toxicológica III) conocidos comercialmente como Simithion, Lorsban y Actellic (Pirimifos metil) así como Thiodan y Thionil (categoría toxicológica I), con ingrediente activo de endosulfan, más tóxicos y difíciles de manipular de manera segura. El insecticida de mayor uso en los años noventa fue Thiodan 35 EC, a pesar de haber sido autorizado por el Ministerio de Salud sólo desde 1997 (Ramírez, 2009). Estos productos son dañinos para el ambiente y la salud humana, con lo cual la plaga sigue causando grandes pérdidas en la caficultura nacional (Ramírez, 2009), además favorecen la aparición de fenómenos de resistencia como el registrado en Nueva Caledonia, asociado al gen Rdl que codifica para una subunidad del receptor del ácido α -aminobutírico (neurotransmisor GABA) que activa canales de cloro durante la sinapsis (Bustillo, 2006). Ya que la broca vive dentro del fruto es difícil aplicar medidas de control químicas, biológicas o culturales y por esto la transgénesis es una alternativa promisoriosa (Méndez-López et al., 2003).

3. *Bacillus thuringiensis*

Uno de los entomopatógenos más destacados es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), un bacilo Gram positivo ubicuo, esporulador, aerobio facultativo, que oscila entre 1 a 1.2 micrómetros de ancho, y de 3 a 5 micrómetros de largo, nativo del suelo, ampliamente distribuido en el ambiente, perteneciente al orden Eubacteriales, familia Bacillaceae, grupo I del género *Bacillus* (Porcar y Juárez-Pérez, 2004). La observación al microscopio de contraste de fases de un cuerpo paraesporal refringente, durante la fase de esporulación, permite su diferenciación de otras especies del complejo *Bacillus* (Figura 1) (Porcar y Juárez-Pérez, 2004).

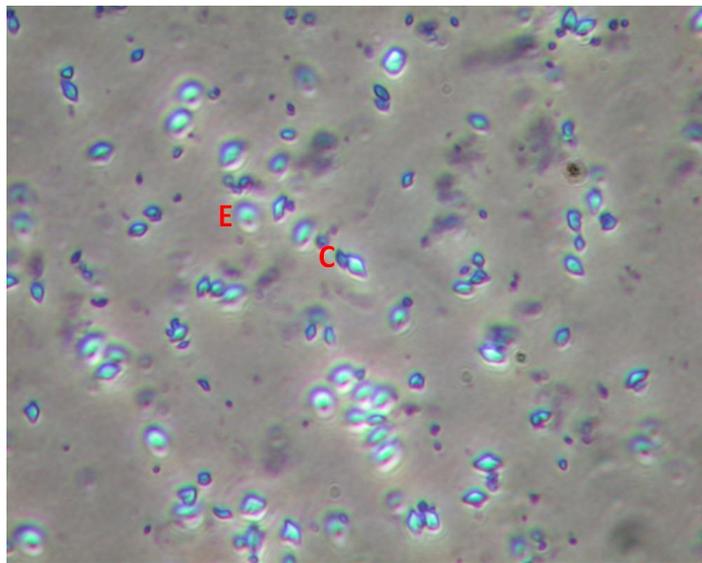


Figura 1. Fotografía de contraste de fases de la cepa *Bt kustaki*. E = espora; C = cristal. (Por el autor).

Esta inclusión paraesporal proteica (ICP), ó δ -endotoxina, resulta del ensamblaje de unidades polipeptídicas de varios pesos moleculares (Roh et al., 2007; Schnepf et al., 1998). La actividad de *Bt* es atribuida, amplia o completamente (dependiendo del insecto), a las ICPs y su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos-plaga de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera y Hemíptera (van Frankenhuyzen, 2009). *Bt* es la bacteria entomopatógena más usada como biopesticida, sola o en combinación con pesticidas químicos, en la protección de especies vegetales, agricultura comercial y contra vectores de enfermedades humanas (malaria, dengue, fiebre amarilla, filariasis).

Bt tiene diversas ventajas que se derivan principalmente de su alta especificidad contra los insectos susceptibles, su inocuidad hacia el medio ambiente, la entomofauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo el hombre, además de una incidencia escasa de fenómenos de resistencia (Schnepf et al., 1998). *Bt* representa aproximadamente 90% del mercado de biopesticidas el cual asciende a 600 millones de dólares (Sanchis and Bourget, 2009). Por otro lado, la ingeniería genética se ha utilizado para la introducción de genes de *Bt* en cultivos afín de conferir resistencia a insectos-plaga (Castle et al., 2006). Los genes que codifican para las δ -endotoxinas han sido transferidos y expresados en más de 26 diferentes especies de plantas (Cerón, 2004). Estos cultivos han causado una disminución importante en uso de plaguicidas químicos, que se estima entre 60 a 80% aproximadamente 21000 toneladas (Bale et al., 2008; Roh et al., 2007).

4. ICP.

La δ -endotoxina es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 kDa, que se han denominado Cry (del inglés crystal) o Cyt (del inglés cytotoxic). Una proteína Cry es una inclusión parasporal proteínica de *Bt* que presenta efectos tóxicos verificables experimentalmente sobre un organismo susceptible, o bien una proteína que posee una obvia similaridad

de secuencia con alguna proteína Cry conocida (Crickmore *et al.*, 1998). El resultado final de la manera en que la proteína Cry ejecuta su actividad letal conlleva la formación de poros líticos en la membrana apical del intestino medio del insecto susceptible mediada por el reconocimiento de un receptor proteico (Roh *et al.*, 2007).

La estructura tridimensional de las toxinas Cry presentan una organización biológicamente relacionada con su actividad, con tres dominios funcionales (Figura 2). El dominio I consiste de un paquete de siete α -hélices antiparalelas (hidrofóbicas y anfipáticas), donde la quinta hélice está rodeada por las demás. Se considera que este dominio es responsable de la formación de poros en el epitelio intestinal del organismo susceptible, donde una horquilla helicoidal hidrofóbica (α 4- α 5) inicia la generación de una estructura que envuelve las hélices anfipáticas, con las caras hidrofílicas formando el lumen del canal iónico, aunque también podría deberse a la unión de las hélices hidrofóbicas α 5 y α 6 para formar un loop en el extremo de la estructura abriendo espacio a manera de navaja e insertándose en la superficie de la membrana (López-Pazos y Cerón, 2007; Pigott y Ellar, 2007; Roh *et al.*, 2007; Schnepf *et al.*, 1998). El dominio II tiene tres láminas antiparalelas β distribuidas en una topología tipo “llave griega”, acomodada a manera de un β -prisma. Este dominio presenta similitud a los sitios de unión antígeno-anticuerpo, y a moléculas tipo lectina, debido a los loops de superficie expuestos en los ápices de las tres β láminas, por ello se considera como la sección que reconoce el receptor (Schnepf *et al.*, 1998). El último dominio funcional consiste de dos láminas β antiparalelas dobladas formando un β sándwich. Esta sección está involucrada en el mantenimiento de la integridad estructural de la toxina ante la proteólisis en el intestino del organismo susceptible, participa en la unión al receptor, penetración en la membrana celular y en la formación de canales iónicos que generan desbalance osmótico (Aronson y Shai, 2001; López-Pazos y Cerón, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).



Figura 2. Estructura teórica tridimensional de la toxina Cry16Aa. Los dominios funcionales están indicados con números romanos. El dominio I está conformado por α -hélices (negro), el dominio II está abajo (gris claro) y el dominio III arriba a la derecha (gris oscuro). La flecha indica un loop que quizás esté involucrado en el reconocimiento del receptor. (Tomado de López-Pazos y Cerón, 2007).

Hay cinco bloques de secuencias de aminoácidos conservados entre las proteínas Cry (Schnepf et al., 1998). El bloque 1 contiene cinco hélices del dominio I y su estructura altamente conservada hace pensar que está implicado en la formación del poro. La localización central de estas hélices dentro del dominio I sugiere un papel esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del haz (Aronson y Shai, 2001). El bloque 2 incluye siete hélices de dominio I y la primera lámina β del dominio II, estas dos estructuras comprenden la región de contacto entre estos dos dominios. Hay tres puentes salinos entre los dominios I y II en las toxinas Cry1Aa y Cry3A, esto puede ser importante si el dominio I cambia su orientación relativa para la interacción con el receptor y para mantener la forma globular de la proteína (Schnepf et al., 1998). Los bloques 3, 4, y 5 están en cada una de las tres cadenas dentro del dominio III (Bravo, 2004). El bloque 3 contiene la última lámina β del dominio II, una estructura involucrada en las interacciones entre los dominios I y III. Las dos argininas centrales del bloque 4 estarían envueltas en los puentes salinos, afectando el cristal o la agregación oligomérica. La primera y última arginina son solventes expuestos y están implicados en la función del canal (Schnepf et al., 1998).

5. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.

La toxina Cry logra su efecto formando poros líticos sobre las células del intestino medio del insecto susceptible. El conjunto de reacciones que se llevan a cabo para que una toxina Cry ejerza su efecto han sido estudiadas primordialmente en el contexto Lepidóptera. Se han propuesto tres modelos que explicarían este fenómeno biológico (Pigott y Ellar, 2007).

El modelo de Bravo propone que posterior a la ingestión de la espora y el cristal de *Bt*, estos últimos se solubilizan bajo la fisiología alcalina del intestino medio de la larva susceptible, liberándose la protoxina que a su vez es clivada por proteasas (tripsinas o quimiotripsinas) dejando un fragmento activo de aproximadamente 60-70 kDa; la toxina activa reconoce un receptor tipo caderina (CADR) en la microvellosidad apical intestinal.

CADRs son una clase de proteínas transmembrana con un dominio citoplasmático y un ectodominio extracelular que consiste de varias repeticiones (~12), donde las repeticiones 7, 11 y 12 interactuarían con el dominio II de la proteína Cry. Luego la hélice α -1 es clivada por proteasas asociadas a vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) con lo cual se forman oligómeros que interactúan con otros receptores de la membrana apical, tales como:

- Aminopeptidasa N (APN): es una exopeptidasa anclada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). En lepidópteros se han clasificado en cuatro grupos. Se ha observado que una región de 63 residuos está implicada en el reconocimiento del dominio III de las proteínas Cry1, dependiente de su unión con el azúcar N-acetilgalactosamina (Gal-Nac) de la APN (Bravo et al., 2007; Pigott y Ellar, 2007).
- Fosfatasas alcalinas (ALP): son proteínas ancladas a GPI de ~65 kDa. Similar a APN, parece ser dependiente del reconocimiento de un oligosacárido de terminación Gal-Nac unido a esta proteína (Bravo et al., 2007; Pigott y Ellar, 2007).
- Glicolípidos, glicoconjugados de 270 kDa y proteínas de 252 kDa (Bravo et al., 2007; Pigott y Ellar, 2007).

Esto lleva a generar poros líticos en las balsas lípidicas de la membrana celular que permiten el paso de iones y agua causando hinchazón, lisis y la posterior muerte del hospedero ya que se genera un ambiente para la germinación de las esporas con una subsecuente septicemia (Pigott y Ellar, 2007).

Un segundo modelo planteado por Zhang especula que la interacción de las toxinas Cry con el receptor CADR esta acoplada a una vía de señalización dependiente de iones Mg^{+} : la vía adenilciclase (AC)/Proteína quinasa A (PKA). Básicamente, la unión de la proteína Cry con el receptor activa esta vía de señalización que incluye la estimulación de la proteína G y a su vez de AC, con el subsiguiente incremento de los niveles de AMP cíclico y la activación de PKA que activaría una vía de señalización intracelular.

Esto tendría como consecuencia la desestabilización del citoesqueleto y los canales de iones con la subsiguiente muerte celular (Pigott y Ellar, 2007).

Jurat-Fuentes aporta una propuesta donde la proteína Cry reconoce un receptor CADR, se forman oligómeros que interactúan con APN y con ALP, luego se generan poros iónicos con lo cual se activaría una cascada de señalización que estaría regulada por fosfatasas. Esta cascada de señalización incluye el reconocimiento de la toxina con actina que a su vez interactúa con el dominio citosólico de la CADR a través de tirosin-fosfatasas, catenina y actinina. Esta combinación de factores llevaría a la muerte celular (Pigott y Ellar, 2007).

Obviamente, las características fisiológicas y bioquímicas en el intestino medio de un determinado insecto pueden alterar el proceso bajo el cual la proteína Cry desarrolla su actividad. Aunque se considera que el modo de acción de las toxinas Cry es similar en lepidópteros y coleópteros-plaga se han identificado varias particularidades en estos últimos:

- Para Cry3A, y otras toxinas de actividad anticoleóptera es necesario cortes por enzimas tipo quimiotripsinas para su solubilización (Carroll et al., 1997).
- El procesamiento proteolítico de la protoxina en coleópteros se da por cisteín y aspartato proteasas (Michaud et al., 1995). También se encuentran termolisinas y catepsinas (Bravo, 2004).
- Unión de la toxina activada a receptores específicos sobre VMMA de insectos susceptibles que facilitaría su agregación y posterior inserción en la membrana apical intestinal (Bravo, 2004; Rausell et al., 2004). Los receptores de toxinas Cry que se han descrito en coleópteros son CADR, ALP y ADAM metaloproteasa. Una vez se ha dado la inserción dentro de la membrana apical, la toxina se vuelve insensible a las proteasas y anticuerpos monoclonales e induce canales de iones o poros no específicos con un diámetro de 1 a 2 nanómetros (nm) en la membrana celular que rompen el potencial de membrana; muy probablemente la

agregación previa de toxinas a manera de oligómeros influye en este proceso, mediada por el reconocimiento del receptor CADR (Martins et al., 2010; Fabrick et al., 2009; Bravo, 2007; Ochoa-Campuzano et al., 2007; Schnepf et al., 1998).

Se han descrito algunas proteínas Cry con actividad hacia insectos del orden Coleóptera. Las más utilizadas son las proteínas Cry3. Las toxinas Cry7, Cry8 y Cry9 que muestran relación biológica cercana, mientras que Cry14 y Cry18 presentan una baja homología entre ellas y con las demás toxinas. Cry22 y Cry23 se relacionan más cercanamente con Cry37 y Cry38 respectivamente. Además se han descrito proteínas con actividad dual Lepidóptera-Coleóptera (Cry1B y Cry1I), e incluso se conoce la acción de proteínas binarias (Cry34 y Cry35, cuya acción letal resulta de una combinación de ambas toxinas) hacia este orden de insectos,. Otras toxinas que afectan este orden de organismos incluyen Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 y Cry55 (Crickmore et al., 2010; van Frankenhuyzen, 2009). El análisis filogenético de los dominios de estas proteínas, utilizando la secuencia de aminoácidos, ha llevado a proponer que Cry9 puede ser activa contra coleópteros debido a que su dominio II esta relacionado más cercanamente con los dominios II de toxinas anticoleópteras; además se conoce la actividad de la proteína Cry9D hacia coleópteros (van Frankenhuyzen, 2009; Bravo, 1997).

6. Proteínas Cry recombinantes.

La ingeniería genética, o tecnología del ácido dextrribunucleico (DNA) recombinante, abarca un conjunto de metodologías mediante la cual se aíslan y transfieren secuencias de DNA altamente específicas de un organismo y se recombinan con el DNA de otro. Esta tecnología ha sido reconocida en todo el mundo como uno de los avances científicos más significativos del último siglo. El método modifica las características hereditarias de un organismo en un sentido predeterminado mediante la alteración de su material genético. Básicamente, consiste en aislar y reproducir secciones específicas de la hélice del DNA, así se pueden obtener secciones deseadas de la cadena del

DNA, como por ejemplo un gen de interés, que puede ser aislado e insertado en células diferentes a la fuente natural y de esta forma programar al receptor para que produzca la correspondiente proteína (Dale y von Schantz, 2002). Para su aplicación se siguen cuatro pasos básicos:

- Identificación de un segmento de DNA de interés (Madigan et al., 2004; Dale y von Schantz, 2002).
- Corte del DNA, mediante enzimas de restricción (Madigan et al., 2004; Murray et al., 2003; Dale y von Schantz, 2002).
- Unión de los fragmentos de DNA creados a un segundo segmento de DNA llamado vector. De esta forma se obtiene una molécula de DNA recombinante. Los vectores incluyen los plásmidos, fagos y cosmidos entre otros (Madigan et al., 2004; Murray et al., 2003; Dale y von Schantz, 2002).
- La molécula de DNA recombinante se introduce en una célula huésped (transformación) que a su vez, mediante su maquinaria biológica de replicación, hace muchas copias exactas de la molécula. Las células huésped más utilizadas son bacterias, levaduras o células de mamífero (Madigan et al., 2004; Murray et al., 2003; Dale y von Schantz, 2002).
- La eficacia del procedimiento se evalúa identificando la presencia del segmento de DNA, o de su producto de codificación en caso de que se haya insertado un gen, por medio de anticuerpos, amplificación o hibridación (Madigan et al., 2004; Murray et al., 2003; Dale y von Schantz, 2002).

Las enzimas de restricción reconocen una secuencia nucleotídica determinada, y cortan en dicha localización. Los fragmentos de DNA que se obtienen se pueden unir con el vector mediante enzimas llamadas ligasas. Los vectores se pueden autorreplicar con independencia del DNA genómico de la célula huésped, así estos permiten generar copias múltiples de un fragmento específico de DNA. Todo el proceso que lleva a desarrollar e introducir la molécula recombinante en un hospedero para que se produzcan copias de esta se denomina clonación (Murray et al., 2003).

El modelo investigativo basado en los métodos del DNA recombinante ha permitido lograr grandes adelantos en las aplicaciones de las posibilidades de *Bt* para el control de insectos perjudiciales. Se ha conseguido la clonación de muchos de estos genes para evaluar su actividad toxica contra varias especies de lepidópteros, coleópteros y dípteros utilizando varios hospederos de expresión (cepas acristalíferas de *Bt*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* o *Bacillus* diferentes a *Bt* entre otros), metodologías variadas de preparación de la toxina (solubilización y activación) y su cuantificación, y pruebas diversas de actividad biológica (contaminación en superficie e incorporación en la dieta, ingestión forzada, etc.) (van Frankenhuyzen, 2009). Varias estrategias han permitido modificar proteínas Cry recombinantes con la finalidad de conseguir un espectro de actividad mayor, o una letalidad mejorada. A la adición de factores de potenciación, tales como quitinasas, inhibidores de serino-proteasas, péptidos tipo receptor CADR (CADR12) o toxinas Cyt, se destaca las modificaciones realizadas en la proteína Cry *per se*, tales como la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida con la cual se han modificado residuos específicos en los tres dominios proteicos, con un interés mayor en los loops del dominio II que presumiblemente interactúan con receptores de membrana en la plaga. Estas mutaciones han permitido aumentar la toxicidad hasta 36 veces con respecto a la toxina parental. Otro método que ha coadyuvado en alcanzar proteínas Cry de mejor actividad toxica es el intercambio de dominios funcionales, con lo que se optimizó toxinas cuya letalidad mejoro notablemente, es el caso del híbrido Cry1Ab-Cry1C que aumento la actividad 10 veces hacia *Spodoptera exigua* (de Maagd et al., 1996). Otras modalidades de modificación incluyen la adición de sitios específicos de clivaje, por ejemplo la adición de un sitio quimiotripsina/catepsina G incremento tres veces la letalidad de la proteína Cry3A hacia *Diabrotica virgifera* (Pardo-López et al., 2009). Las delecciones se han visto que pueden mejorar proteínas previamente inactivas, donde se destaca el caso de las toxinas CryMod, en las cuales se ha realizado la delección de la hélice α -1, que resultaron en un aumento de afinidad hacia receptores CADR (Pardo-López et al., 2009). Otras aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante en el caso de *Bt* incluye el desarrollo de biopesticidas utilizando

cepas modificadas genéticamente con genes *cry* de otras cepas, la transformación de bacterias de suelo con genes *cry* (por ejemplo *Pseudomonas sp.*) para mejorar el control de plagas ya que estos microorganismos habitan en el ecosistema planta (Cerón, 2004) y la transformación genética que ha producido cultivos resistentes a insectos (Schnepf et al., 1998). Otros avances a destacar incluyen:

- El realizar mutagénesis sitio-dirigida en el loop 1 del dominio II de la proteína Cry3A (R345A, Y350F, Y351F, Δ Y350 y Δ Y351) con lo que se consiguió aumentar la toxicidad hacia *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleóptera: Chrysomelidae) y *Chrysomela scripta* (Coleóptera: Chrysomelidae) (Pardo-López et al., 2009).
- La determinación de la estructura tridimensional de la proteína Cry8Ea1 con toxicidad hacia *Holotrichia parallela* (Coleóptera: Scarabaeidae) (Guo et al., 2009).
- La transformación genética de una cepa de *Bt*, portadora del gen *cry8Ca2*, con el gen *cry3Aa7* con lo cual se logro actividad hacia miembros de las familias Scarabaeidae and Chrysomelidae (Yan et al., 2009).
- A las cepas bacterianas *Brevibacillus brevis* Ag12 y *Bt* Ag13, procedentes del intestino de *Apriona germari* (Coleóptera: Cerambycidae), se les introdujo el gen *cry3A* para colonizar el insecto y lograr su control (Zhongkang et al., 2008).
- Introducir una modificación en la proteína Cry3A para que posea el sitio de reconocimiento de las proteasas quimiotripsina/catepsina para lograr toxicidad hacia *D. virgifera virgifera* (Coleóptera: Chrysomelidae) (Walters et al., 2008).
- La modificación genética de plantas de papa con el gen que codifica la proteína híbrida SN19, resultado del intercambio de los dominios II de las toxinas Cry1B y Cry1I, con actividad letal hacia el coleóptero *L. decemlineata* (Naimov et al., 2003).

7. *Bt* y la broca del café.

Existe poca investigación sobre los prospectos de *Bt* en el cultivo del café. Se ha descrito actividad de las cepas *Bt israelensis*, *Bt morrisoni* PG-14, *Bt thompsoni* y *Bt malaysiensis* sobre larvas de la broca del café (Méndez-López et al., 2003). Se han caracterizado aislamientos de la bacteria, provenientes de cultivos de café en Costa Rica, donde se encontró la presencia de genes *vip3*, *cry2*, *cry1*, *cry3* y *cry7* en orden de mayor a menor abundancia (Arrieta et al., 2004). También se ha logrado la transformación de plantas de café (*Coffea arabica* y *canephora*) con el gen *cry1Ac* que otorga resistencia a *Perileucoptera coffeella* (Lepidóptera: Lyonetiidae), insecto que ataca las hojas en esta variedad (De Guglielmo-Cróquer et al., 2010; Ettienne et al., 2002).

OBJETIVO

El Grupo de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) sede Bogotá D.C. tiene un amplio cepario de aislamientos nativos de *Bt*, con más de 1000 cepas provenientes de diferentes medioambientes de Colombia, las cuales han sido caracterizadas molecular, bioquímica y biológicamente. A partir de este importante recurso biológico pueden provenir conclusiones importantes en el marco del MIP. El propósito del grupo ha sido buscar proteínas Cry con mayor potencia, que presenten amplio espectro de acción contra insectos-plaga de los órdenes Lepidóptera y Coleóptera que atacan cultivos económicamente importantes. Recientemente se ha hecho énfasis en el cultivo del café, el cual constituye una base social, cultural y política que ha servido para la estabilidad democrática y la integración nacional. La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera; Scolytidae) es una plaga de carácter mundial y difícil de controlar debido a su hábito de permanecer oculta dentro del fruto. La alteración fisiológica que el insecto ocasiona a los granos origina pérdidas en la productividad y el deterioro de la calidad con repercusiones económicas, sociales y ambientales (Damon, 2000). El control de la broca se debe realizar a través de un programa de MIP, conformado por varios componentes de control. Los costos en el manejo de la plaga se sitúan aproximadamente en 200.000 pesos colombianos/ha (Duque et al., 2002).

Han sido descritas algunas proteínas Cry con actividad hacia insectos del orden Coleóptera. Las más utilizadas son las proteínas Cry3. Las toxinas Cry7, Cry8 y Cry9 están relacionadas, mientras que Cry14 y Cry18 presentan una baja homología entre ellas y con las demás toxinas. Cry22 y Cry23 se relacionan más cercanamente con Cry37 y Cry38 respectivamente. Además se han descrito proteínas con actividad dual Lepidóptera-Coleóptera (Cry1B y Cry1I), e incluso se conoce la acción de proteínas binarias (Cry34 y Cry35) hacia este orden de insectos. Otras toxinas que afectan este orden de organismos incluyen Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 y Cry55 (Crickmore et al., 2010; van Frankenhuyzen, 2009). De acuerdo al análisis filogenético de los dominios de estas proteínas se ha propuesto que Cry9 puede ser activa contra coleópteros (Bravo, 1997).

Alternativamente, se ha publicado la actividad de cepas de *Bt* con actividad hacia larvas de la broca del café (Méndez-López et al., 2003). Los bioensayos con estas cepas fueron realizados utilizando mezclas de espора-cristal, con una dosis de 100 µg del complejo espора-cristal/cm² de dieta. Las cepas activas fueron *israelensis*, *thompsoni*, *morrisoni*, y *malaysiensis*. Se encontró que cristales purificados de un aislamiento nativo tipo *israelensis* (IPS-82) tuvo una concentración letal 50 (CL50) de 219.5 ng de cristal/cm² de dieta (Méndez-López et al., 2003). La serovariedad *israelensis* de *Bt* produce proteínas Cry4, Cry10, Cry11 y Cyt (Schnepf et al., 1998).

Existen varios métodos de tamizaje para la determinación de la efectividad de *Bt* sobre un determinado insecto, por ejemplo el uso de preparaciones espора-cristal o purificación de los cristales insecticidas. Sin embargo, el factor que limita el uso de este tipo de metodologías es el consumo de tiempo y esfuerzo en preparar muestras de proteínas activadas bajo idénticas condiciones, que permitan realizar evaluaciones comparativas, además de la presencia de fenómenos de competencia que impide determinar con certeza aquella proteína que causa el efecto biológico (Haffani et al., 2001). La tecnología del DNA recombinante puede ayudar a elevar los niveles de expresión de los genes que codifican para toxinas, si se combinan con promotores fuertes, sitios de unión al ribosoma y apropiadas secuencias iniciadoras y terminadoras, y permite identificar fenómenos de competencia (Ben-Dov et al., 1995). Aunque se llegó a considerar que el hospedero de expresión de una proteína Cry (la mayoría de hospederos utilizados son cepas acristalíferas de *Bt* y *E. coli*) podía alterar su actividad tóxica, debido a que quizás se afectaban sus propiedades de solubilización, los datos obtenidos no soportan la tesis de que este pudiera ser un factor importante cuando se realiza un ensayo biológico con la toxina recombinante (van Frankenhuyzen, 2009).

Actualmente en el Grupo de Biopesticidas del IBUN la evaluación de la actividad de *Bt* se lleva a cabo mediante varias aproximaciones. Se inicia con la caracterización de aislamientos nativos recuperados de ecosistemas con relación a la plaga que se desea

controlar: este trabajo se ha llevado a cabo utilizando herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el contenido de genes *cry*, perfiles de proteínas aplicando electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayos biológicos diseñando dietas naturales o artificiales. Aunado a esto se realiza construcción de proteínas recombinantes y modificación de estas por medio de mutagenesis sitio-dirigida e intercambio de dominios. Estos proyectos han derivado en resultados de utilidad para programas de MIP. Así se ha evaluado la diversidad biológica de *Bt* en Colombia y su potencial para el control de *Spodoptera frugiperda* (plaga del maíz), la identificación de genes activos hacia la polilla guatemalteca y el gusano blanco que atacan los cultivos de papa y el establecimiento de alternativas para el control de *Heliothis virescens* entre otros. En este contexto, y dado que el control biológico de la broca del café aún depende de insecticidas químicos, se considera importante para el grupo identificar estrategias nuevas que contribuyan con el manejo integrado de la plaga.

Esto nos lleva a plantear el siguiente interrogante: ¿Es posible encontrar proteínas Cry de *Bt* con potencial actividad biológica contra el coleóptero-plaga *H. hampei*?

Para responder a esta pregunta se planteo como objetivo: Determinar la actividad biológica de las proteínas recombinantes Cry1B, Cry3, Cry4 y Cry9 sobre larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* (Ferrari).

Con este objetivo en mente se postula la producción de proteína Cry activa de las cepas de referencia *Bt aizawai*, *Bt san diego*, *Bt israelensis* y *Bt galleriae*, y la obtención de las proteínas Cry recombinantes funcionales, de tal manera que permita establecer la presencia de actividad biológica, para las cepas de referencia de *Bt* y las proteínas Cry recombinantes, sobre larvas de primer instar de *H. hampei*. Posteriormente se amplió el estudio a las proteínas Cry11 y la híbrida SN1917 y se buscaron otras proteínas anticoleópteras candidatas para el control de la broca del café.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de este trabajo primero se propuso emplear una metodología que permitiese obtener proteínas Cry recombinantes. Para este fin se utilizó cepas de referencia que fueron donadas por el Dr. Zeigler del *Bacillus* Genetic Stock Center (The Ohio State University, Columbus OH, USA) (en negrilla los genes de este estudio): *Bt aizawai* HD-137 (*cry1Aa*, ***cry1Ba***, *cry1Ca*, *cry1Da*), *Bt san diego* (***cry3Aa***), *Bt israelensis* (***cry4Aa***, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*) y *Bt galleriae* (*cry9Aa*), y como control la cepa *Bt kurstaki* HD-1 (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ba*). Para obtener el gen *cry1I* se usó la cepa *Bt mexicanensis* donada por la Dra. Bravo (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México-Cuernavaca, Morelos, México). Estas cepas se evaluaron por métodos moleculares para contenido de genes. La producción de las toxinas de referencia se realizó después de que las cepas esporularon lo cual se evaluó por métodos bioquímicos.

Los genes *cry* se aislaron a partir de las cepas de referencia, a excepción del gen *cry9* que se recuperó de la cepa de *E. coli* recombinante ECE130, igualmente donada por el Dr. Zeigler del *Bacillus* Genetic Stock Center. Estos genes se clonaron en *E. coli* utilizando oligonucleótidos específicos para la región codificante, con sitios de restricción que generan extremos cohesivos que facilitaron su ligación en el vector pQE30. Para la proteína híbrida se tomó un plásmido que codifica la quimera 1B/1I/1B (SN19) y se intercambiaron una región N-terminal de su dominio II con su correspondiente del gen *cry1B*, resultando el híbrido SN1917 (1B/1I-1B/1B). Como control positivo se usó el gen *cry1Aa* de *Bt kurstaki* HD-1, y agua estéril como negativo. Todas las cepas de *E. coli* recombinantes se analizaron por secuenciación (Macrogen). Para confirmar que esta metodología fuese válida para alcanzar proteínas funcionales se probaron las toxinas Cry1B, Cry1I y la híbrida SN1917 sobre el insecto-plaga de la papa *Tecia solanivora* Povolny (Lepidóptera: Gelechiidae). Esta metodología permitió obtener las proteínas recombinantes necesarias para los experimentos biológicos.

En segundo lugar, se desarrolló una cría de la plaga que fuese útil para identificar la posible actividad biológica de las proteínas recombinantes sobre esta. Para ello se

recolectaron frutos del café, infectados naturalmente por *H. hampei*, en terrenos afectados en Nariño donde no se hubiese aplicado medidas químicas para el manejo del cultivo. Posteriormente, se llevo a cabo la estandarización de una dieta artificial que soportara la supervivencia del insecto, para la cual se monitoreo el porcentaje de supervivencia, duración del ciclo de vida del insecto, porcentaje de huevos que eclosionan, duración de cada estado y fecundidad de las hembras. Una vez se tuvo este sustrato se paso a realizar ensayos biológicos, contaminando la superficie con cada proteína Cry. Se utilizo dosis no mayores a 10000 ng/cm² de dieta, parámetro que permitiría determinar aquellas toxinas que fuesen una opción válida de control para este insecto. El control negativo llevo agua y el control positivo consistió de una suspensión de toxinas de referencia. Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes.

Se utilizó el análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias para determinar los tratamientos que presentaban diferencias. Paralelamente, se deseaba identificar la presencia de alguna interacción entre las toxinas Cry y proteínas de la microvellosidad apical del intestino medio del insecto, para esto se marcaron las toxinas recombinantes y se colocaron a interactuar con las VMMA's purificadas a partir del intestino medio del insecto, usando el sistema biotina-estreptavidina. Finalmente, se identificaron proteínas tipo Cry en genomas microbianos y medioambientales, mediante aproximaciones bioinformáticas, con posible actividad hacia coleópteros-plaga y que podrían ser útiles para el control de larvas de la broca del café.

Lo más importante de la metodología planteada es que permite evaluar las posibilidades de *Bt* como una alternativa en programas de MIP sobre la broca del café, y generar perspectivas encaminadas a su optimización mediante manipulación genética.

RESULTADOS

Este trabajo investigativo fue realizado en el Laboratorio de Biopesticidas y en el Laboratorio de Entomología, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) sede Bogotá D.C. Los resultados de este trabajo serán presentados en cuatro capítulos:

1. Evaluación de la actividad biológica de cepas de referencia de *Bt* portadoras de genes cry1B, cry3A, cry4 y cry9.
2. Las proteínas Cry1B y Cry3A son activas contra *H. hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae). Publicado en la revista Journal of Invertebrate Pathology, año 2009, volumen 101, páginas 242 a 245.
3. Actividad de una proteína híbrida de *Bt* contra un lepidóptero y un coleóptero plagas. Divulgado en la revista FEMS Microbiology Letters, año 2010, volumen 302, páginas 93 a 98.
4. Proteínas tipo Cry: implicaciones para el control de la broca del café. Enviado para que sea considerado a publicación en una revista indexada.

Capítulo 1: Evaluación de la actividad biológica de cepas de referencia de *Bt* portadoras de genes *cry1B*, *cry3A*, *cry4* y *cry9*.

INTRODUCCIÓN

La bacteria entomopatógena *Bt* ha sido ampliamente utilizada en el control de insectos-plaga de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera. Su actividad toxica se debe a los cristales tóxicos, o δ -endotoxinas, que produce durante la fase de esporulación y que están compuestos de proteínas Cry y Cyt (Crickmore et al., 1998). Las proteínas Cry son las toxinas más utilizadas en el control de insectos (Roh et al., 2007). Su amplia diversidad genética ha sido la base de muchos programas enfocados en el aislamiento y caracterización de cepas que puedan poseer actividad letal novedosa (Schnepf et al., 1998). En este contexto, se ha identificado 78 cepas de referencia (*Bacillus* Genetic Stock Center- <http://www.bgsc.org/>). Estos aislamientos tienen variadas especificidades que han sido aplicadas en el desarrollo de biopesticidas y de plantas transgénicas (Schnepf et al., 1998).

La broca del café *H. hampei* (Ferrari) (Coleóptera; Scolytidae) es uno de los mayores problemas entomológicos en la caficultura mundial, ya que se desarrolla dentro de la cereza del café lo cual hace difícil su control (Damon, 2000). La plaga disminuye las cualidades físicas y organolépticas del grano y afecta la inocuidad de la bebida debido a la presencia de ocratoxinas (Camilo et al., 2003). Los frutos de café empiezan a ser susceptibles cuando su peso seco es igual o mayor al 20%, entre 100 y 150 días de desarrollo después de la floración (Bustillo, 2006). El control de la broca se debe realizar a través de un programa de manejo integrado formado por varios componentes de control: entomopatógenos y parasitoides, control cultural (como el re-re) y control químico como última opción debido a su costo y riesgos para el agroecosistema (Bustillo, 2006). Existe poca investigación sobre la actividad de toxinas Cry sobre *H. hampei*. Se ha descrito actividad de mezcla espора-cristal de las cepas *Bt israelensis*, *Bt morrisoni* PG-14, *Bt thompsoni* y *Bt malaysiensis* a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta. Un aislamiento denominado IPS-82, que fue clasificado dentro del grupo *israelensis*, posee una letalidad importante con una CL50 de 219.5 ng de cristal/ cm^2 de dieta (Méndez-López et al., 2003). Se evaluó la posible actividad biológica de cepas de

referencia de *Bt* sobre larvas de primer instar de la plaga broca del café y que albergaran los genes *cry1Ba*, *cry3Aa*, *cry4* y *cry9*, objeto de este estudio.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Se utilizó cepas de referencia de *Bt* que fueron donadas por el Dr. Zeigler del *Bacillus* Genetic Stock Center (The Ohio State University, Columbus OH, USA). La cepa *Bt mexicanensis* fue donada por la Dra. Bravo (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México-Cuernavaca, Morelos, México). Las cepas se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 1.3%) y se evaluaron por microscopía de contraste de fases. Las cepas se conservaron en papel filtro impregnado de una suspensión de esporas, dentro de ampollitas de vidrio ámbar previamente esterilizadas y selladas al calor.

Caracterización de las cepas y bioensayos

Se llevó a cabo la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para tipificar la presencia de cada gen *cry* de interés. El gen *cry9* fue amplificado a partir de la cepa de *E. coli* ECE130 donada por el Dr. Zeigler del *Bacillus* Genetic Stock Center (The Ohio State University, Columbus OH, USA). La extracción de DNA plásmidico se realizó con el protocolo de He y Kaderbhai, 1990). Las condiciones de PCR consistieron en una mezcla de reacción con 50 ng de DNA plásmidico, buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100), dNTPs 200 mM, MgCl₂ 2.0 mM, 0.5 µM de cada oligonucleótido (Tabla 2) y 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) en un volumen de 25 µL. El programa de PCR consistió en un ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, luego 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente se realizó un paso final de extraextensión a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en agarosa al 1.2%.

Las cepas de *Bt* de referencia se dejaron esporular por 20 días en medio LB. Las células se centrifugaron y el pellet celular se lavó con agua destilada. Los cristales se

solubilizaron por incubación a 37°C por 2 horas en búfer de carbonato de sodio 50mM, pH 10.0 suplementado con ditioneitol (DTT) 10mM y se evaluó por medio de SDS-PAGE al 12%. La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951)

Para el establecimiento del pie de cría de *H. hampei* en laboratorio, se recolectó frutos infestados procedentes de fincas cafeteras en Nariño. Los frutos fueron colocados en recipientes plásticos con grano de café pergamino (Benavides y Portilla, 1991), para la multiplicación de los individuos. Los recipientes se mantuvieron cerrados con tela a temperatura de 28°C ± 2°C, 65% de humedad relativa y fotoperiodo 23:1 oscuridad-luz. Se estandarizó una dieta denominada IBUN (de Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia) (agar 1.2%, germen de trigo 2.5%, caseína 0.24%, café molido 12.5%, levadura activa 1.2%, metil ester-p-hidroxibenzoato 0.14%, ácido ascórbico 0.24%, ácido sorbico 0.08%, tetraciclina 0.004, vitamina del complejo B 0.08%, aceite de maíz 0.6%, formaldehído 0.2%) para cría y ensayos biológicos. En cuanto a los bioensayos se distribuyó 0.5 ml de dieta en placas con pozos de 1.5 cm de diámetro y se permitió su solidificación a temperatura ambiente. Sobre la superficie de la dieta se dispensó una serie de 5 concentraciones (2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 ng/cm²) de proteína soluble de cada cepa de referencia diluidas en 50 µl de agua desionizada estéril. Cada pozo se infestó con una larva de primer instar de *H. hampei*. Las placas se sellaron e incubaron en condiciones de insectario. Se evaluaron 72 larvas por tratamiento y la mortalidad fue determinada a los 6 días. Se usó como control negativo agua desionizada estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas fueron analizadas para evaluar su pureza, viabilidad, contenido del gen *cry* a evaluar y producción del cristal insecticida. Con estas pruebas se logró concluir que las cepas eran viables, no existía contaminación por otras cepas de *Bt* u otros microorganismos, poseían los genes *cry* de interés y sintetizaban el cristal paraesporal.

Tabla 2. Cepas bacterianas, genes *cry* identificados (negrilla), órdenes de insectos susceptibles y oligonucleótidos utilizados.

Cepa	Genes	Especificidad	Oligonucleótidos 5'-3'*
<i>Bt aizawai</i>	<i>cry1Aa</i> <i>cry1Ba</i> <i>cry1Ca</i> <i>cry1Da</i>	Lepidóptera, Coleóptera	Directo:TCAAATAGGATCCATGAGA ATGAAATTATAAAT Reverso:TTCTTCCATGAGGAGTC GACCCACGCTATCTACAAT
<i>Bt galleriae</i>	<i>cry1Cb1</i> <i>cry9Aa1</i>	Lepidóptera	Directo:ATGGGTACCAATAAACAC GGAATTATTGGC Reverso:TTACTGCAGTGTTTCAAC GAATTCAATACT
<i>Bt san diego</i>	<i>cry3Aa</i> <i>Cry3Ca</i>	Coleóptera	Directo:CTGGATCCATGAATCCGA ACAATCGA Reverso:TAGTCGACTTAATTCACT GGAATAAA
<i>Bt israelensis</i>	<i>cry4Aa</i> <i>cry4Ba</i> <i>cry10Aa</i> <i>cry11Aa</i>	Díptera	Directo:ATGGGATCCTATCAAATA AAAATGAATAT Reverso:TCACTCGTTCATGCCTGC AGATTCAATGCT
<i>Bt mexicanensis</i>	<i>cry1I</i>	Lepidóptera	Directo:AATATGGGATCCAAGAAT CAAGATAAGCATCAAAG Reverso: AATCTCTGCAGGTTACGCTCAATA TGGAGTTG
<i>E. coli</i> ECE130	<i>cry9Aa</i>	---	Directo:ATGGGTACCAATAAACAC GGAATTATTGGC Reverso:TTACTGCAGTGTTTCAAC GAATTCAATACT

Se observó la presencia de esporas y cristales característicos para cada cepa (Figura 3). La PCR permitió concluir que todas las cepas tenían los genes *cry* esperados, a excepción de la cepa *Bt galleriae* que no amplificó para el gen *cry9*, como si sucedió con el control de *E. coli* ECE130 (Figura 3, Tabla 2). Las concentraciones de proteína soluble que se obtuvo fue de 3.1, 2.7, 3.6 y 5.4 mg/ml de proteína soluble para *Bt aizawai*, *Bt san diego*, *Bt galleriae* y *Bt israelensis* respectivamente.

El análisis de electroforesis indicó la presencia de bandas que mostraban la expresión de los genes *cry* correspondientes a cada cepa (para la cepa *Bt israelensis* se observan dos bandas (~110-130 kDa y ~70 kDa) que corresponden a las proteínas Cry4, Cry10 y Cry11, en la cepa *Bt san diego* se observa una banda de aproximadamente 65 kDa que corresponde a toxinas Cry3, la cepa *Bt aizawai* contiene una banda mayor de 130 kDa que se correlaciona con proteínas Cry1, en la cepa *Bt galleriae* se determinó la presencia de una banda de 130 kDa, probablemente corresponde a proteínas Cry1C (Figura 3).

En cuanto a la cría de la broca se encontró que los frutos infestados contenían todos los estados del insecto. Se encontró que el huevo dura cerca de 7 días, la larva aproximadamente 15 días, la pupa 8 días, y los adultos alrededor de 35 días para los machos y las hembras tienen un periodo más largo, que supera los 100 días, todo lo cual concuerda con otros estudios (Bustillo, 2006; Damon, 2000). Los adultos obtenidos fueron alimentados con una dieta artificial. Inicialmente, se utilizó la dieta desarrollada por Villacorta y Barrera (1995), pero se observó un rendimiento poblacional inferior al que necesitaba la investigación, lo que concuerda con otros reportes (Portilla, 2000). Se ha descrito una serie de ingredientes necesarios para la elaboración de dietas de insectos tales como proteínas, caseína, albúmina, aminoácidos, carbohidratos, azúcar, fécula, sustancias lipídicas, aceites vegetales, fosfolípidos, ácidos grasos, esteroides, mezclas de sales, mezclas de vitaminas, celulosa y agar (Portilla, 2000).

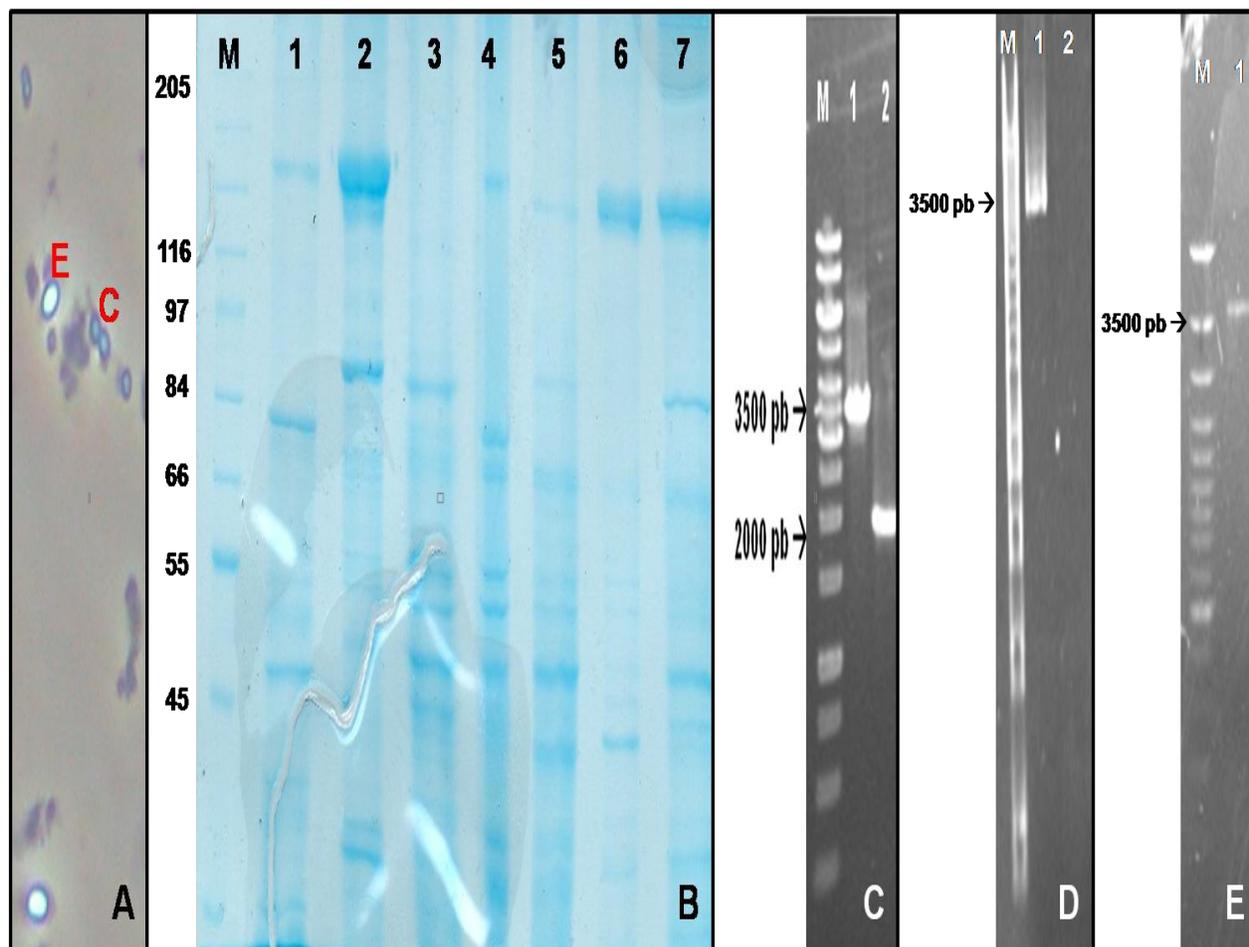


Figura 3. Análisis de las cepas de referencia de *Bt*. A. Microscopía de contraste de fases de la cepa *Bt san diego*, E=espora y C=cristal. B. SDS-PAGE 12% de las cepas de referencia, M. Marcador de peso (kDa). 1. *Bt kustaki*. 2. *Bt aizawai*. 3. *Bt san diego*. 4. *Bt israelensis*. 5. *Bt kumamotoensis*. 6. *Bt sotto*. 7. *Bt galleriae*. C. Genes *cry* de las cepas *Bt israelensis* y *Bt san diego*, M. Marcador de tamaño. 1. Gen *cry4* de *Bt israelensis*. 2. Gen *cry3A* de *Bt san diego*. D. Tipificación del gen *cry9*, M. Marcador de tamaño, 1. Gen *cry9* clonado en *E. coli*. 2. Amplificación con oligonucleótidos para el gen *cry9* en la cepa *Bt galleriae*. E. Identificación del gen *cry1B* en la cepa *Bt aizawai*, M. Marcador de tamaño, 1. Gen *cry1B* de *Bt aizawai*.

Dada la necesidad de elaborar una dieta que soportará el desarrollo del insecto, cuya estandarización podría resultar engorrosa, y que las dietas usadas para este insecto son modificaciones de la dieta estándar para lepidópteros (Navón, 2000) la cual puede adaptarse a otros modelos biológicos e imita la textura de las plantas sin sus efectos nocivos (como microorganismos y aleloquímicos). Así, se decidió utilizar la dieta estandarizada para lepidópteros del Laboratorio de Entomología del IBUN que incluye estimulantes de alimentación y preservantes suplementada con polvo de café logrado mediante la molienda de granos sanos previamente desinfectados. Buenas prácticas de manipulación permitió reducir significativamente la degradación por contaminación y mantener su consistencia, con lo cual se obtuvo buenos niveles de todos los estadios de la progenie de *H. hampei* (López-Pazos et al., 2009). La dieta soporta la sobrevivencia de la broca del café (Figura 4, Tabla 3). Los huevos debían recogerse de la dieta y colocarse en papel servilleta estéril húmedo hasta la eclosión de las larvas que se trasladaban a la dieta. El ciclo de vida del insecto involucra los estados de huevo, larva (con dos instares), pupa y adulto, encontrando que en la dieta IBUN la duración de cada estadio fue similar a lo observado en otros trabajos y en campo (Tabla 4) (Fernández y Cordero, 2007; Romero y Cortina, 2007).

Aunque para la cepa *Bt galleriae* no se identificó que portara el gen *cry9*, se incluyó en el bioensayo con las cepas de referencia de *Bt* de todas maneras. Mediante el ensayo biológico, involucrando la dieta IBUN, se determinó que la proteína soluble obtenida a partir de las cepas de referencia de *Bt* alcanzo porcentajes de actividad biológica inferiores al 10% en larvas de primer instar de la broca del café, y en el control con agua se determinó una mortalidad del 6%.

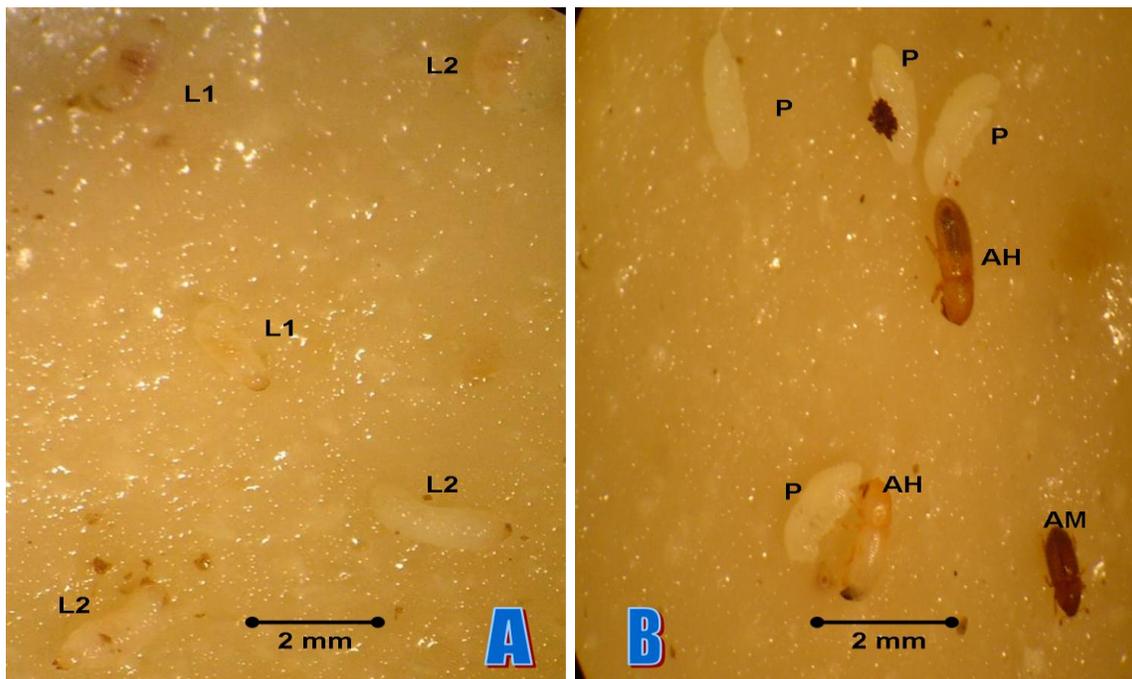


Figura 4. *H. hampei* en dieta IBUN. A. Larvas de primer (L1) y segundo instar (L2). B. Pupas (P) y adultos hembras (AH) y un adulto macho (AM) recién emergidos.

Tabla 3. Tiempo de desarrollo de las diferentes fases de la broca del café en la dieta IBUN.

Estado	Duración promedio (días)	Desviación estándar	Intervalo de confianza (95%)
Huevo	4.00	0.86	3.60-4.40
Larva	15.20	1.70	14.40-16.00
Pupa	4.65	1.04	4.16-5.14
Adulto	93.95	2.46	92.80-95.10

Capítulo 2: Las proteínas Cry1B y Cry3A son activas contra *H. hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjipa

Short Communication

Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae)

Silvio Alejandro López-Pazos, Jorge Eduardo Cortázar Gómez, Jairo Alonso Cerón Salamanca*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, AA 14-490, Santafé de Bogotá DC, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2008
 Accepted 17 May 2009
 Available online 22 May 2009

Keywords:

Bacillus thuringiensis
 Cry1B
 Cry3A
Hypothenemus hampei
 Artificial diet

ABSTRACT

Cry1B and Cry3 proteins from *Bacillus thuringiensis* are toxic to beetles such as the colorado potato beetle and the cottonwood leaf beetle. We report the development of a suitable rearing, bioassay method and the toxicity of these Cry proteins to coffee berry borer first instar larvae.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), is one of the most serious economic pests of commercial coffee in the world (Romero and Cortina, 2007). Annual losses caused by this insect have been estimated at over \$500 million annually (Durham, 2004). The seeds are attacked by both larvae and adults of *H. hampei*, which are thus capable of decreasing the quality and the flavor of the grain and reducing the commercial value (Romero and Cortina, 2007). Because most of the CBB's life cycle is inside the berry, it is notoriously difficult to control (Posada and Vega, 2005). Adults of CBB's damage coffee berries when reproducing inside the endosperm (Romero and Cortina, 2007). Adult females make a chamber and start laying egg in groups of 2–3/day for 20 days. Eggs' hatching occurs after 8 days and the larvae feed inside the berry for 19 days. Adults emerge after eight days of pupae stage (Jaramillo et al., 2006). Insect-pest control largely depends on application of organochloro insecticides (such as endosulfan), which have low efficiency and high toxicity to humans and some insect populations evolved resistance against some of the most frequently used synthetic insecticides. Biocontrol agents are also used against this insect (Pava-Ripoll et al., 2008). The full potential of biological control strategies has never been approached (Lacey et al., 2001). *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a rod shaped, Gram positive, spore forming bacterium (Cerón, 2004). The activity of *Bt* is attributed principally to the insecticidal crystal protein encoded by *cry* genes. Insect species within Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders are susceptible to different bacterial toxins (Schnepf et al., 1998). *Bt* δ -endotoxins such as Cry1B and

Cry3A exhibit coleopteran specific activity (McPherson et al., 1988; Bradley et al., 1995). The aim of this work was to test if recombinant Cry1Ba and Cry3Aa proteins have toxic activity against the CBB.

The lack of a suitable laboratory rearing method was a major constraint to our research. Artificial diets have been described for CBB rearing, but the formulation includes components difficult to obtain in many countries (Villacorta, 1989; Brun et al., 1993). We developed a diet (named IBUN) to provide the necessary quantities of *H. hampei* of consistent quality and physiological status necessary for bioassays in this work (Table 1). Adult *H. hampei* were obtained from infested berries, exhibiting the characteristic entry hole bored by the insect, collected randomly from Nariño (Colombia). No commercial pesticide product had been used in any of the sampled areas. Adults were obtained by cutting open berries in the laboratory to determine the number of coffee berry borers within the grain. To determine survival and fecundity of insects, these were individually disinfected in 0.5% sodium hypochlorite and placed individually in plastic vials (5 × 2 cm) containing IBUN artificial diet with 27 °C and 70% relative humidity.

Feeding occurred within a few hours after females were put onto the diet. Egg-laying started within the first 2 weeks. Relative humidity was an important factor in rearing *H. hampei*, excess humidity often led to contamination, and dry conditions to mortality. Rearing was done in the dark. Females were transferred to fresh diet every month to begin a new cycle. Observations on egg laying, larval development, pupae and adult emergence were made by stereoscopic inspection, at 20, 30 and 60 days. At 60 days the test was terminated by cutting open the media to count all

* Corresponding author. Fax: +57 1 3165415.
 E-mail address: jacerons@unal.edu.co (J.A. Cerón Salamanca).

Table 1
IBUN diet components, progeny of CBB and bioassays results.

IBUN diet		CBB offspring				
Ingredients	%	Stages			Total population (%)	
<i>Group I</i>						
Agar	1.2	Total offspring (female × ml/10 ml of media) after 60 days			328	
<i>Group II</i>						
Wheat germ	2.5	Eggs			3.84	
Casein	0.24	Larvae			19.23	
Coffee bean powder	12.5	Pupae			15.61	
Active yeast	1.2					
<i>Group III</i>						
Methyl ester-p-hydroxy benzoate	0.14	Adults female			52.15	
Ascorbic acid	0.24	Adults male			9.17	
Sorbic acid	0.08					
Tetracycline	0.004					
Complex B vitamins	0.08					
Corn oil	0.6					
Formaldehyde	0.2					
Recombinant protein	Dose (ng/cm ²)	% Mortality (protoxin)	ANOVA (F)	% Mortality (toxin)	ANOVA (F)	t-Test
<i>Variability of mortality of H. hampei first instar larvae</i>						
Cry1Ba	500	24.5 ± 2.07	77.05 ^a	23.7 ± 2.91	50.84 ^a	0.1857 ^b (protoxin–toxin)
	1000	25.4 ± 2.22		25.0 ± 1.83		
	1500	30.0 ± 2.36		30.2 ± 1.81		
	2000	30.9 ± 2.51		34.9 ± 3.07		
	2500	35.2 ± 2.82		35.8 ± 2.57		
	3000	36.9 ± 2.85		36.5 ± 2.12		
	3500	40.2 ± 2.74		37.5 ± 2.59		
	4000	41.8 ± 2.20		35.9 ± 2.33		
	4500	41.3 ± 2.63		37.5 ± 1.84		
	5000	43.5 ± 2.46		40.1 ± 3.03		
Cry3Aa	1000	22 ± 2.00	22.54 ^a	20.1 ± 1.91	15.53 ^a	0.6498 ^b (protoxin–toxin)
	2000	22.3 ± 1.49		21.7 ± 2.00		
	3000	23.2 ± 1.40		23.6 ± 1.90		
	4000	23.6 ± 1.84		23.2 ± 2.53		
	5000	25.2 ± 1.14		25.0 ± 1.33		
	6000	25.2 ± 2.3		25.7 ± 1.83		
	7000	26.3 ± 1.83		25.7 ± 2.41		
	8000	26.0 ± 2.71		26.0 ± 2.71		
	9000	28.7 ± 1.57		26.9 ± 2.73		
	10,000	30.2 ± 0.63		29.3 ± 1.42		

^a The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.000 (95% confidence interval).

^b By conventional criteria, this difference is considered to be not statistically significant (95% confidence interval).

organisms present in the diet. Measurements were done in triplicate. The first eggs laid were observed after 15 days. Eggs hatched after 5 days, while larvae pupated after about 3 weeks. Pupae stage had a duration of 5 days. Sexual differences were not found in larval duration and pupal weight. Life cycle was 5–6 weeks. These observations compare closely with previous reports (Villacorta, 1989; Villacorta and Barrera, 1993; Portilla-Reina, 1999). The proportion of female:male was 10:1 as reported by Baker and Barrera (1993). After 60 days, just half of the progeny had reached adult stage, due in part to the prolonged period of oviposition. The bulk of the accessible diet was consumed during this period. CBB offspring on IBUN diet (Table 1) is less than the fecundity recorded by previous studies (Portilla-Reina, 1999), probably limited by the dimension of containers, lacking possibility of new locations for oviposition, and the time of our observations. Sorbic acid has been used as a mould inhibitor in diets (Khalifa et al., 1973) but it causes deformity of pupae and adults (Hirai, 1976). Since the effects of sorbic acid depend on the species, and symbiotocidal and embryocidal effects on insects have also been reported (Levinson, 1975), care is needed in using sorbic acid as a mould inhibitor in artificial diets. We used a 0.08% concentration of sorbic acid according to Navon (2000), lower than in other studies (Hirai, 1976). Tetracycline and methyl ester-p-hydroxybenzoate were added to minimize the risk of microbial contamination (Navon,

2000). The other diet ingredients provide nutrients with necessary phagostimulants to induce insect feeding. The F1 generation and the succeeding generations were also able to sustain on IBUN diet. The cost of IBUN diet is approximately six dollars per kg, excluding personnel expenses.

Molecular cloning methods employed in this work were performed as described in Sambrook et al. (1989). The *cry1Ba* gene of *Bt* strain *aizawai* (4J1) and *cry3Aa* gene of *Bt* strain *san diego* (4AB1) both from the *Bacillus* Genetic Stock Center (The Ohio State University, Columbus, OH), were amplified by PCR using the primers Cry1BF (5'-TCAAATAGGATCCATGAGAATGAAATATAAAT-3') with Cry1BR (5'-TTCTTCCATGAGGAGTCGACCCACGCTATCTACAAT-3'), and Cry3AF (5'-CTGGATCCATGAATCCGAACAATCGA-3') with Cry3AR (5'-TAGTCGACTTAATTCCTGGAATAAA-3'), respectively. BamH1 (sense) and Sal1 (antisense) restriction sites were added to sequence of the primers (underlined). Wild-type *cry* genes were expressed in *Escherichia coli* XL-1-Blue into pQE30-Xa vector (Qiagen). Protein purification was done following the procedure of Herero et al. (2004). We did not carry out any additional purification applying chromatographic test. Recombinant proteins were treated with Factor Xa protease (Qiagen) which is then removed. When necessary, activation of protoxin was performed by adding trypsin at a ratio of 0.5:10 (trypsin:protoxin, w/w) and incubating for 1 h at 37 °C. Protoxin and toxins were analyzed by 12% SDS-PAGE

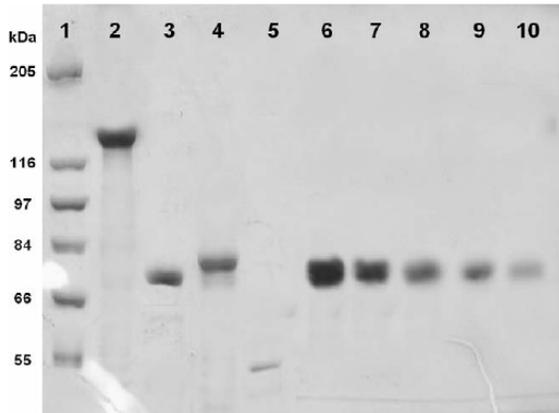


Fig. 1. Analysis of the Cry recombinant proteins in polyacrylamide gel electrophoresis. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, protoxin Cry1Ba (9106 ng/μl); 3, toxin Cry1Ba (7910 ng/μl); 4, protoxin Cry3Aa (8426 ng/μl); 5, toxin Cry3Aa (3680 ng/μl); 6, albumin (10,000 ng/μl); 7, albumin (8000 ng/μl); 8, albumin (6000 ng/μl); 9, albumin (4000 ng/μl); and 10, albumin (2000 ng/μl). Protein volume: 5 μl/well (lane).

gel (Fig. 1) and protein concentration was determined using the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin (BSA) as the standard (Fig. 1). Crystals of *Bt* strains (*aizawai* and *san diego*) were solubilized, activated and analyzed in an identical fashion to that described for recombinant proteins (Herrero et al., 2004) to a final concentration of 3 mg/ml.

A total of 0.5 ml of IBUN diet was distributed in a well (plate × 24 wells) and allowed to solidify at room temperature. Diet was surface contaminated with a series of ten Cry protein concentrations (Cry3Aa dose range: 1000–10,000 ng/cm²; Cry1Ba dose range: 500–5000 ng/cm²) diluted in 50 μl deionized water (Table 1). Bioassays with pure crystals were conducted in the same way. Each well was infested with one CBB first instar larvae. Plates were sealed and incubated under insectary conditions. In bioassay 72 neonate larvae per treatment (concentration tested) were used and mortality was recorded after 6 days. Ten independent replications were performed. Méndez-López et al. (2003) reported evidence about biological activity of mosquitocidal strains of *Bt* against CBB, specially isolate IPS-82. We did not include any Dipteran-active Cry protein for bioassays because there is insufficient toxicity data, or IPS-82 crystals by availability. Water alone and sodium carbonate resulted in 6% background mortality. Data were expressed in percentages of the mean number of active and dead CBB larvae and analyzed by nonlinear regression, using ANOVA and *t*-test statistics analysis.

Assessments of recombinant proteins in bioassays indicated that Cry1Ba and Cry3Aa were toxic to CBB larvae when administered in feeding assays, whereas solubilized crystals were nontoxic to the insect. For larvae exposed to Cry3Aa protoxin treated media the mortality increased from 22 ± 2.00% (1000 ng/cm²) to 30.2 ± 0.63% (10,000 ng/cm²) (Table 1). For trypsin treated form the results were basically the same (mortality at 1000 ng/cm² = 20.1 ± 1.91%; mortality at 10,000 ng/cm² = 29.3 ± 1.42%) (Table 1). It appeared that Cry1Ba is somewhat more active to 6-day-old larval beetle than Cry3Aa (Protoxin mortality at 500 ng/cm² = 24.5 ± 2.07%, protoxin mortality at 5000 ng/cm² = 43.5 ± 2.46%; activated toxin mortality at 500 ng/cm² = 23.7 ± 2.91%, activated toxin mortality at 5000 ng/cm² = 40.1 ± 3.03%). Unfortunately, higher doses (20,000 and 30,000 ng/cm²) had little additional effect on mortality (Cry1Ba toxicity was reduced from ~40% to ~25%; Cry3Aa mortality always occurred in the same range) and produced higher variability

it; it is coherent with a physiological meaning (pH, proteases or changes in toxin–receptor interaction on the apical brush border of the midgut microvillae). Some of the proteins with coleopteran activity are only toxic after *in vitro* solubilization, probably because the protoxin can not be solubilized from the crystals at the neutral to weakly acidic gut pH of Coleoptera (de Maagd et al., 2001). For the midgut and the hindgut of CBB, it was consistently observed values between pH 4.5 and 5.2 (Valencia et al., 2000). Coleoptera toxicity of Cry1B protein is generally enhanced by truncation with trypsin prior to administration (Bradley et al., 1995) but not in this case. Differences in proteolytic activity among sensitive insects can lead to different characteristics in specificity. Specific features in gut physiology of the different organisms might have a role in this aspect. There is many evidence for the involvement of midgut proteases in determining the susceptibility of an insect to *Bt* toxins, for example the digestive proteases of target Lepidoptera and Diptera are mainly serine proteases, whereas those of Coleoptera are mainly cysteine and aspartic proteases (de Maagd et al., 2001). Moreover, *H. hampei* has an unusual reproductive behaviour that involves fraternal crossing, functional haplodiploidy and low genetic variability; these features provide to this insect particular biological characteristics such as increasing of insecticide resistance allele proportion through of selection mechanisms and their fast adoption (Benavides, 2005). The rapid increase in genome sequence information and the development of genomic and proteomic technologies have enabled researchers to investigate the more subtle interactions between *Bt* toxin and host. Currently, *H. hampei* genome is being decoded (P. Benavides, personal communication; Ministerio de Agricultura de Colombia, 2008). The study can give more knowledge about the CBB genetic back-up will facilitate a deeper understanding of dynamic physiological mechanisms relevant for adaptation and integration, and thus provide the knowledge in order to generate active proteins, increasing their toxicity and thereby the relationship between Cry protein and CBB midgut. In conclusion, the present investigation provided evidence that both Cry1Ba and Cry3Aa have biological activity against *H. hampei* first instar larvae and calls attention to the wide range of special physiological conditions (which probably prevail in the CBB midgut) that must be considered to improve insecticidal activity.

References

- Baker, P., Barrera, J., 1993. A field study of a population of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in Chiapas, Mexico. *Trop. Agric.* 70, 351–355.
- Benavides, P., 2005. Aspectos genéticos de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. In: *Memorias XXXII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología* (Socolen), pp. 23–26.
- Bradley, D., Harkey, M.A., Kim, M.K., Biever, K.D., Bauer, L.S., 1995. The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to Coleopteran and Lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 162–173.
- Brun, L.O., Gaudichon, V., Wigley, P.J., 1993. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Sci. Appl.* 14, 585–587.
- Cerón, J., 2004. Caracterización bioquímica y molecular. In: Bravo, A., Cerón, J. (Eds.), *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Editorial Buena Semilla, Bogotá-Colombia, pp. 177–196.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Gene.* 17, 193–199.
- Durham, S., 2004. Stopping the coffee berry borer from boring into profits. *Agric. Res. Mag.* 52, 10–11.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P.L., deMaagd, R.A., 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384, 507–513.
- Hirai, K., 1976. A simple artificial diet for mass rearing of the armyworm, *Leucania separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Ent. Zool.* 11, 278–283.
- Jaramillo, J., Borgemeister, C., Baker, P., 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bull. Entomol. Res.* 96, 223–233.

- Khalifa, A., Salama, H.S., Elsharaby, A.F., 1973. Rearing the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Böld., on a semi-artificial diet. *Z. Angew. Ent.* 73, 129–132.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents, do they have a future? *Biol. Control* 21, 230–248.
- Levinson, H.Z., 1975. Possibilities of using insecticides and pheromones in pest control. *Naturwissenschaften* 62, 272–282.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, M.A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- McPherson, S., Perlak, F., Fuchs, R., Marrone, P., Lavrik, P., Fischhoff, D., 1988. Characterization of the Coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Bio/Technology* 6, 61–66.
- Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R., Ibarra, J.E., 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 73–77.
- Ministerio de Agricultura de Colombia, 2008. Experiencias en la inversión en ciencia y tecnología en el sector agropecuario Colombiano, estrategias y resultados alcanzados. Memorias. <www.minagricultura.gov.co>.
- Navon, A., 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis*. In: Navon, A., Ascher, K.R.S. (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International Publishing, Wallingford, UK, pp. 1–24.
- Pava-Ripoll, M., Posada, F.J., Momen, B., Wang, C., Leger, R.S., 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 220–226.
- Portilla-Reina, M., 1999. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 50, 24–38.
- Posada, F., Vega, F., 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *J. Insect. Sci.* 5, 37.
- Romero, J.V., Cortina, H.A., 2007. Life tables of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on three coffee accessions. *Rev. Col. Entomol.* 33, 10–16.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold-Spring Harbor Laboratory Press, Cold-Spring Harbor, NY.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E., Chrispeels, M.J., 2000. Alfa-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 207–213.
- Villacorta, A., 1989. Dieta méridica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). *Am. Soc. Entomol. Bras.* 14, 315–319.
- Villacorta, A., Barrera, J., 1993. Dieta Meridica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 14, 316–319.

Capítulo 3: Actividad de una proteína híbrida de *Bt* contra un lepidóptero y un coleóptero plagas.

Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest

Silvio Alejandro López-Pazos, Adriana Carolina Rojas Arias, Sonia A. Ospina & Jairo Cerón

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá DC, Colombia

Correspondence: Jairo Cerón, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A 14-490, Santafé de Bogotá DC, Colombia. Tel.: +571 3165450 fax: +571 316 5415; e-mail: jacerons@unal.edu.co

Received 27 July 2009; accepted 28 September 2009.

Final version published online 1 December 2009.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01821.x

Editor: André Klier

Keywords

Bacillus thuringiensis; *Tecia solanivora*; *Hypothenemus hampei*; hybrid Cry protein.

Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) is a entomopathogenic bacterium, often used in agriculture and widely distributed in the world ecosystems (Schnepf *et al.*, 1998; Soberón *et al.*, 2009). Bt produces an endoplasmic crystal-shaped inclusion during sporulation, which contains one or more insecticidal δ -endotoxins, or Cry proteins (Soberón *et al.*, 2009). These protoxins are ingested by a target insect, and then solubilized and processed in the midgut by proteases, resulting in a three-domain characteristic conformation. Domain II binds to specific receptors located in the microvilli of the apical membrane of midgut epithelial cells. In this site, domain I is involved in membrane insertion, forming a pore that disrupts ion channel function, leading to cellular lysis (Bravo 2004). Domain III has also been implicated in receptor binding and protein molecular stability (Bravo *et al.*, 2007). So far, > 450 varieties of these proteins have been described, with specificities toward insects of different orders (Crickmore *et al.*, 2009). It is possible to obtain Cry hybrid proteins with improved activity, with regard to the original toxin, by exchanges between the domains of different toxins (Karlova *et al.*, 2005).

The Guatemalan moth *Tecia solanivora* (Povolny) (*Lepidoptera: Gelechiidae*) has been considered to be an

Abstract

The use of Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are an important strategy for biological control. Recently it has been demonstrated that Cry hybrid proteins (by domain swapping) resulted in improved toxicities in comparison with parental proteins. Here, an SN1917 hybrid toxin was constructed and tested against Colombian pest insects *Tecia solanivora* (*Lepidoptera: Gelechiidae*), a severe potato pest, and *Hypothenemus hampei* (*Coleoptera: Scolytidae*), which attacks coffee crops. The SN1917 protoxin had a concentration causing 50% mortality (LC_{50}) of 392 ng cm^{-2} , and SN1917 toxin showed an LC_{50} of 201 ng cm^{-2} against *T. solanivora* first instar larvae. The two parental toxins (Cry1B and Cry1I) used to make this new hybrid protein caused a mortality of 60% and 52%, respectively. Unfortunately, *H. hampei* first instar larvae proved to be resistant to the toxin. We conclude that SN1917 is an option for biological control and resistance management of *T. solanivora*. Implications for *H. hampei* are discussed.

important pest in the Colombian potato crops. It is estimated that it causes losses of > 20% in both, stored and harvested tubers (Herrera, 1998), being an important problem in agricultural development. Insect larvae penetrate the tuber, forming galleries inside, which leads to a loss in the quality of the product (Herrera, 1998). Another important Colombian pest that directly attacks coffee crops is the coffee berry borer (CBB) *Hypothenemus hampei* Ferrari (*Coleoptera: Scolytidae*). CBB have a severely detrimental effect on fruit quality from 8 weeks past flowering to 32 weeks. When the insect enters, it builds galleries in the endosperm, where the eggs are deposited. Shady and moist areas in the crops are the worst affected areas (Damon, 2000).

It has been demonstrated that Cry1 proteins present toxic activity against the first instar larvae of lepidopteran pests (Bravo *et al.*, 2007). Cry1Ac protein specifically presents a high toxicity against *T. solanivora* larvae compared with other Cry1 proteins (Martínez *et al.*, 2003). Although Cry1Ba and Cry1Ia toxins are generally active against lepidopterans, there are few reports showing their bioactivity against coleopterans (Tailor *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1995; Van Frankenhuyzen, 2009). There is evidence about toxic activity of mosquitocidal strains of Bt against *H. hampei*, particularly Bt IPS-82 (Méndez-López *et al.*,

2003). Recently, it was found that Cry1Ba has a minor activity against CBB (López-Pazos *et al.*, 2009). The objective of this study is to evaluate the biocidal activity of the chimerical protein SN1917 (a derivative of Cry1Ba and Cry1Ia proteins), obtained by ligation/cloning, starting from SN19 and SN17 hybrids (Naimov *et al.*, 2001) of Guatemalan moth and CBB first instar larvae.

Materials and methods

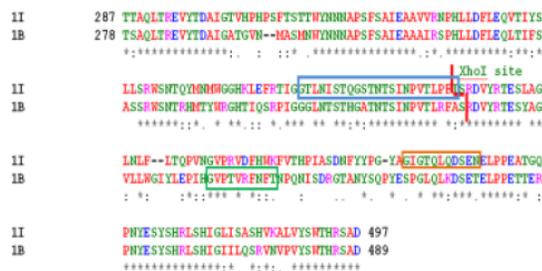
Recombinant and hybrid proteins

Plasmids were kindly donated by Dr R.A. de Maagd (Plant Research International, the Netherlands). The Cry1Ac and Cry1Ba expression vectors (pB03 and pMH19) have been described previously (Bosch *et al.*, 1994; de Maagd *et al.*, 2000). Briefly, an NcoI–KpnI fragment of *cry1Ab* in pBD140 was replaced with the corresponding fragment of *cry1Ac*, resulting in *cry1Ac* expression vector. The Cry1Ba expression vector pMH19 was prepared by replacing an NcoI–BstXI fragment of *cry1Ca* in pBD150 with the corresponding fragment of *cry1Ba* (nucleotides 1–2037). Site-directed mutagenesis to create RsrII sites in *cry1Ba*, resulting in plasmid pSN17, and substitution of an NcoI–MunI fragment (encoding domain I of Cry1Ia) from plasmid pSN15 by the corresponding bases (1–869) that encoded domain I of Cry1Ba from pSN16 were used to generate a plasmid encoding the 1Ba/1Ia/1Ba mosaic (pSN19) (Naimov *et al.*, 2001). *Escherichia coli* strain XL-1 carrying the plasmid pSN1917, containing a *cry1Ia–cry1Ba* hybrid region in domain II, was formed by replacing the XhoI–BstXI fragment of pSN19 with its counterpart XhoI–BstXI fragment of *cry1Ba* (pSN17) to obtain a plasmid encoding the hybrid protein 1Ba/1Ia-1Ba/1Ba (Fig. 1).

The *cryII* gene of Bt strain *mexicanensis* from the A. Bravo laboratory (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México-Cuernavaca, Morelos, Mexico) was amplified by PCR using the primers Cry1IF (5'-AATATGGGATC CAAGAATCAAGATAAGCATCAAAG-3') and Cry1IR (5'-AA TCTCTGCAGGTTACGCTCAATATGGAGTTG-3'). BamHI (sense) and PstI (antisense) restriction sites were added to sequence of the primers (underlined). Wild-type *cry* gene was expressed in *E. coli* XL-1-Blue into pQE30-Xa vector (Qiagen).

Protein isolation

The protoxins Cry1Ba, Cry1Ac and SN1917 were produced in *E. coli* strain XL-1. Protoxin isolation, solubilization, trypsin treatment and purification were performed as described earlier (Bosch *et al.*, 1994). CryII purification was performed following the procedure of Herrero *et al.* (2004); we did not carry out any additional purification by applying the chromatographic test. When necessary, activation of CryII protoxin was performed by adding trypsin at a ratio



AVFPMILW	RED	Small (small+ hydrophobic (incl aromatic -Y))
DE	BLUE	Acidic
RK	MAGENTA	Basic
STYHCNGQ	GREEN	Hydroxyl + Amine + Basic - Q
Others	Gray	

Fig. 1. Representation of 1Ba/1Ia-1Ba/1Ba (SN1917) domain II construction. Amino acid alignment was carried out with CLUSTALW2. Location of 1Ia-1Ba domain II border is indicated by a red line. Residues characteristics are showed with asterisks, dots and color. Asterisk means that the residues in that column are identical in both sequences in the alignment. Two points means that conserved substitutions have been observed (according to the color table). One point means that semi-conserved substitutions have been observed. The blue square is a similar region for GVLTLLNFQ in Cry1Ia; the orange square is a similar region for NITHITDTNN in Cry1Ia; and the green square is a similar region for GVLTLLNFQ in Cry1Ba.

of 0.5 : 10 (trypsin : protoxin w/w) and incubating for 1 h at 37 °C. Protein concentrations were estimated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Sambrook & Russell, 2001) and the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) using a standard curve of bovine serum albumin.

Insect bioassays

The biopesticidal activity of SN1917 protein was evaluated on Guatemalan moth first instar larvae from a laboratory colony. Polystyrene plates with 24 wells were used. Potato cubes were surface-contaminated with several protoxin and toxin concentrations (60, 125, 250, 500 and 1000 ng cm⁻²) diluted in sodium carbonate. Cubes were distributed in plate wells and each infested with one *T. solanivora* first instar larvae. Plates were sealed and incubated into a 18 °C, 60 ± 5% relative humidity and 12 : 12 h light : dark photoperiod room. Per treatment, 72 larvae were used; mortality was recorded after 7 days. The concentration causing 50% mortality (LC₅₀) and its 95% fiducial limits were determined by Probit analysis of results from three independent experiments with the POLO-PC program (Russel *et al.*, 1977). Cry1Ac was used as a positive control at the same doses; water and sodium carbonate were negative controls (5% nonspecific mortality). Cry1Ba trypsin-activated and Cry1I protoxin and activated toxin were biologically evaluated as well (72 larvae per treatment) (Table 1).

Table 1. Toxicities of wild-type and hybrid proteins for *Tecia solanivora*

Toxin/dose [†]	% Mortality	P-value		
<i>Parental proteins</i>				
Prototoxin Cry1B/4370 (Martínez <i>et al.</i> , 2003)	4.16	< 0.0001*		
Activated Cry1B/500 (this work)	60.8 ± 2.77			
Prototoxin Cry1V/1000 (this work)	42.6 ± 2.88	0.0042*		
Activated Cry1I/1000 (this work)	52.2 ± 2.59			
LC ₅₀ (95% fiducial limits) for [‡]				
Protein	Prototoxin	Relative	Activated toxin	Relative
<i>Positive control and hybrid protein</i>				
Cry1Ac	392 (277.9–639.5)	100	389 (212.7–1925)	100
SN1917	201 (130.3–324.9)	195	225 (152.7–331.4)	173

*By conventional criteria, this difference is considered to be statistically significant.

[†]Dose in ng cm⁻².

[‡]Toxicity is indicated as LC₅₀ (ng cm⁻²).

The column of data labeled 'Relative' gives toxicities relative to that of Cry1Ac on a per-mole basis: (molecular weight of protein/molecular weight of Cry1Ac) × (LC₅₀ of Cry1Ac/LC₅₀ of protein) × 100.

CBB rearing was obtained from affected coffee crops (no chemical insecticides were been used) in Nariño (Colombia). SN1917 were tested against CBB first instar larvae using IBUN diet (López-Pazos *et al.*, 2009) in a range of 1000–10 000 ng cm⁻². Cry1Ba and Cry1I (prototoxin and toxin) were used as controls; water alone and sodium carbonate were used as negative controls (6% background mortality). In bioassays, 72 larvae per treatment were used and mortality recorded after 7 days. The average percentages of mortality were determined from the results of three independent experiments.

Results

SN1917 hybrid was constructed through replacement of a *cryIIa* domain II section from pSN19 with the corresponding fragment of *cry1Ba* from pSN17 (Fig. 1). Expression analysis of transformants confirmed that most of them represented a successful swapping event in the specific area to produce the soluble prototoxin (130 kDa) selected for toxicity studies (Fig. 2). The purified SN1917 prototoxin showed a higher activity against *T. solanivora* first instar larvae in comparison with recombinant Cry1Ac prototoxin (Table 1). Trypsin treatment of Cry1Ac and SN1917 hybrid prototoxins resulted in the production of a stable product of approximately 65 kDa (Fig. 2). Hybrid SN1917 toxin was more toxic than Cry1Ac-activated protein (Table 1). When the size differences are taken into consideration, SN1917 prototoxin is potentially 1.95 times more toxic than wild-type Cry1Ac, and SN1917-activated hybrid protein is 1.73 times more active than Cry1Ac toxin on a per-mole basis (Table 1). Cry1Ba toxin caused 60% of mortality at a 500 ng cm⁻²

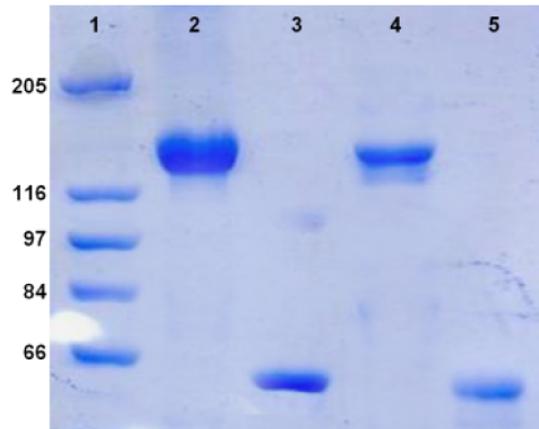


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of SN1917 and Cry1Ac proteins. Purified prototoxins and activated toxins were pooled and resolved on 10% gel and stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, SN1917 prototoxin; lane 3, SN1917 toxin; lane 4, Cry1Ac prototoxin; lane 5, Cry1Ac toxin. Proteins were activated with trypsin.

dosage. Cry1I prototoxin and Cry1I toxin produced 42% and 52% of mortality, respectively (1000 ng cm⁻²) (Table 1).

In spite of the use of a high dose of 10 000 ng cm⁻², SN1917 did not show significant toxicity against CBB (mortality percentage < 10% for prototoxin and activated toxin). Even higher doses (20 000 and 30 000 ng cm⁻²) were not toxic for CBB. Neither Cry1I prototoxin or toxin (10 000 ng cm⁻²) were active against CBB.

Discussion

Cry1 toxins bind to specific receptors in the microvilli of midgut epithelial cells of the target insect. At least four different protein receptors have been described: a cadherin-like protein (CADR), aminopeptidase-N (APN), an alkaline phosphatase and a 270-kDa glycoconjugate (Gómez *et al.*, 2007). Both domains II and III of the Cry proteins are more varied and have been shown to be main determinants of activity against specific organisms; there is evidence that both can be involved in binding to receptors (Bravo, 2004). Several studies have demonstrated that exchange of domains II and III between Cry proteins can result in substantially improved toxins in terms of toxicity or target spectrum (de Maagd *et al.*, 2001). Similarly, the proper combination of domains II and III may optimize the binding steps and thus increase toxicity, probably due to the fact that domain II and domain III confer separate steps in binding to midgut receptors and that one step may be rate-limiting for the binding (de Maagd *et al.*, 2000; Naimov *et al.*, 2001; Karlova *et al.*, 2005). Specifically, the mosaic 1Ba/IIa/1Ba (SN19) results in increased toxicity against Colorado potato beetle

(*Leptinotarsa decemlineata* Say) (CPB), whereas plasmid pSN17, encoding a Cry1Ba toxin, is less active against this insect (Naimov *et al.*, 2001, 2006). The hybrid SN19 gene was transformed for potato plants to confer resistance to the lepidopteran potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Ziller), CPB and the lepidopteran European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner), resulting in complete protection (Naimov *et al.*, 2003). Both parental proteins, Cry1Ba and Cry1Ia, are toxic for lepidopterans and coleopterans (Van Frankenhuyzen, 2009).

In previous studies, Cry1Ac protein has been shown to be the most active Cry1 toxin against *T. solanivora* (Martínez *et al.*, 2003). Furthermore, three transgenic lines of Andean potato plants (Diacol Capiro, Parda Pastusa and Pandeazúcar) with this gene have been produced (Valderrama *et al.*, 2007). Bioassays of *T. solanivora* larvae on these transgenic potato tubers showed 83.7–100% mortality, with one to four copies of *cry1Ac* per genome and expression levels of corresponding protein varying from 0.02 to 17 µg g⁻¹ fresh tuber tissue, whereas the mortality levels on nontransgenic lines was 0–2.67% (Valderrama *et al.*, 2007). Cry1Ba protoxin had minor activity against *T. solanivora* first instar larvae (Martínez *et al.*, 2003) but the activated form was very toxic and could be an option for control of Guatemalan moth (Table 1). SN1917 was more toxic than Cry1Ac or parental Cry proteins. This finding indicates that domain II of Cry1Ba or Cry1Ia, or both domains, are important determinants of the higher toxicity of SN1917 relative to that of Cry1Ac against *T. solanivora*. We therefore conclude that, for lepidopterans, hybrid proteins resulting from domain swapping may have improved properties. The molecular interactions underlying this phenomenon are not well understood, although studies suggested that domain II and domain III confer separated interactions in binding to CADR and APN receptors in the microvilli of midgut epithelial cells, respectively (Gómez *et al.*, 2007). Several regions in CADR receptors have been shown to recognize domain II loop regions. Cry1Ab loop 2 interacts with CADR residues ⁸⁶⁵NITIHITDTNN⁸⁷⁵ (repeat 7), whereas loops α-8 and α-2 join with CADR region ¹³³IPLPASILTVTV¹³⁴² (repeat 11). A Cry1Ac loop 3 binding region to residues ¹⁴²³GVLTLN¹⁴³¹ was also located in CADR (Gómez *et al.*, 2007). With this evidence, it is possible to speculate that both Cry1Ba and Cry1Ia recognize the same receptor (CADR) in the target insect, especially in *T. solanivora*. It was shown earlier for Cry1 proteins that processing before testing was necessary for high activity against lepidopterans (Schnepf *et al.*, 1998). Recently, it was observed that the presence of the carboxy-terminal extension on SN19 did not negatively affect activity of these crystals (Naimov *et al.*, 2006). In this study, we tested solubilized protoxins and activated toxins. Activated SN1917 toxicity was slightly decreased in *T. solanivora* (Table 1). The more homologous

Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac show a high degree of overlap of binding specificities in many insects (Naimov *et al.*, 2003). The *cry1Ba* gene has a high homology with *cry1Ia* gene (Yamamoto & Dean, 2000); this suggests that SN1917 may bind to midgut receptors that are different from those for Cry1Ac. SN1917 has CADR-binding regions similar to those of Cry1Ab and Cry1Ac, i.e. a few similar regions for GVLTLN¹⁴²³FQ in Cry1Ia section and a closer similar region for GVLTLN¹⁴²³FQ in Cry1Ba section, respectively; these regions may be important in receptor recognition (Fig. 1). Changes in toxin-binding sites are the most commonly occurring resistance mechanism against Cry proteins in insects (Ferré & Van Rie, 2002). For this reason, SN1917 could be an important alternative for resistance management.

It has been reported that of 22 insect pest species for coffee crops, 12 correspond to the coleopteran order. No other crop contains more than six species of coleopteran insects (Saldarriaga *et al.*, 1987; Vélez, 1997). CBB is the most important pest in this crop. *Hypothenemus hampei* has an unusual reproductive behavior that involves fraternal crossing, functional haplodiploidy and low genetic variability; these features provide this insect with particular biological characteristics such as an increased proportion of insecticide resistance allele through selection mechanisms and their fast adoption (Benavides, 2005). Interestingly, Cry1Ba was partly active against the insect, as reported previously (López-Pazos *et al.*, 2009), whereas SN1917 was inactive. SN1917 has 36 changes with respect to Cry1Ba; 15 conserved substitutions and seven semi-conserved substitutions between 1Ia and 1Ba middle domains were observed, but the primary sequence is very similar (Fig. 1). During site-directed mutagenesis experiments, it was observed that several mutations located in domains II and III showed increased toxicity to some insects, for example mutants N372A and N372G of Cry1Ab (loop 2 of middle domain), resulted in an eightfold increase in toxicity against *Lymantria dispar*, and the mutant N372A, A282G and L283S (loops 2 and α-8) showed a 36-fold increase in activity (Pardo-López *et al.*, 2009). For Cry3A protein (the most important coleopteran-specific Cry toxin), loop 1 has an important function in biological activity: the mutations R345A, Y350F, Y351F, ΔY350 and ΔY351 showed higher levels of toxicity against *Tenebrio molitor* (Coleoptera) (Pardo-López *et al.*, 2009). SN1917 has several changes related to these observations, with respect to the parental Cry1Ba (R345Q, Y349M and ΔY350). It may be that these residues are important factors of activity, for example arginine has a positive charge because the guanido group is ionized over the entire pH range in which proteins exist naturally, and the hydroxyl group of the phenolic ring of tyrosine residues makes this aromatic ring relatively reactive in electrophilic substitution reactions (Creighton, 1993). On the other hand, anticoleopteran Cry proteins are only toxic after

in vitro solubilization, probably because the protoxin cannot be solubilized at the neutral to weakly acidic gut pH of *Coleoptera* (de Maagd *et al.*, 2001). For the midgut and the hindgut of CBB, values between pH 4.5 and 5.2 were consistently observed (Valencia *et al.*, 2000). This result suggests that there is an important activity determinant in domain II of Cry1Ba, although it may be a nonspecific binding. For this reason, further study of CBB physiological conditions and mutagenesis site-directed in this toxin and other related Cry proteins is necessary.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Ruud A. de Maagd for his participation to this project and the critical discussion of this paper. This work was supported by Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Colombia). S.A.L.-P. gratefully acknowledges Colciencias for his PhD fellowship.

References

- Benavides P (2005) Aspectos genéticos de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. *Memorias XXXII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen), Ibaque-Colombia* pp. 23–26.
- Bosch D, Schipper B, Van Der Kleij H, de Maagd RA & Stiekema W (1994) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* **12**: 915–918.
- Bradley D, Harkley MA, Kim MK, Biever K & Bauer LS (1995) The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J Invertebr Pathol* **65**: 162–173.
- Bravo A (2004) Mecanismo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis en el control biológico* (Bravo A & Cerón J, eds), pp. 69–100. Editorial Buena Semilla, Bogotá.
- Bravo A, Gill SS & Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423–435.
- Creighton T (1993) Chemical properties of polypeptides. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn., pp. 2–20. W.H. Freeman and Company, New York.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A & Dean DH (2009) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available at http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- Damon A (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull Entomol Res* **90**: 453–465.
- de Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W & Bosch D (2000) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1–Cry1C hybrids. *Appl Environ Microb* **66**: 1559–1563.
- de Maagd RA, Bravo A & Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* **17**: 193–199.
- Ferré J & Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Entomol* **47**: 501–533.
- Gómez I, Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Fernández LE, Pérez C, Sánchez M, Soberón M & Bravo A (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* **28**: 169–173.
- Herrera F (1998) *La polilla guatemalteca de la papa: biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado*, 2nd edn. Programa Regional Agrícola CORPOICA Regional Uno/ Ministerio de Agricultura y desarrollo rural/ICA/FEDEPAPA, Boyacá –Cundinamarca.
- Herrero S, González-Cabrera J, Ferré J, Bakker PL & de Maagd RA (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J* **384**: 507–513.
- Karlova R, Weemen-Hendriks M, Naimov S, Ceron J, Dukiandjiev S & de Maagd RA (2005) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1–Cry1Ac hybrids. *J Invertebr Pathol* **88**: 169–172.
- López-Pazos SA, Cortazar JE & Cerón J (2009) Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). *J Invertebr Pathol* **101**: 242–245.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.
- Martínez W, Uribe D & Cerón J (2003) Efecto tóxico de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Rev Colomb Entomol* **29**: 89–93.
- Méndez-López I, Basurto-Ríos R & Ibarra JE (2003) *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol Lett* **226**: 73–77.
- Naimov S, Weemen-Hendriks M, Dukiandjiev S & de Maagd RA (2001) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl Environ Microb* **67**: 5328–5330.
- Naimov S, Dukiandjiev S & de Maagd RA (2003) A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnol J* **1**: 51–57.
- Naimov S, Martens-Uzunova E, Weemen-Hendriks M, Dukiandjiev S, Minkov I & de Maagd RA (2006) Carboxy-terminal extension effects on crystal formation and insecticidal properties of Colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Mol Biotechnol* **32**: 185–196.
- Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Porta H, Rodríguez-Almazán C, Soberón M & Bravo A (2009) Strategies to improve the

- insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* **30**: 589–595.
- Russel RM, Robertson JL & Savin NE (1977) POLO: a new computer program for Probit analysis. *Bull Entomol Soc Am* **23**: 209–213.
- Saldarriaga A, Polania IZ, Cardenas R, Posada L & García F (1987) *Guía para el control de plagas*, 4th edn. Instituto Colombiano Agropecuario, Sociedad Colombiana de Entomología, Bogotá.
- Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR & Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol R* **62**: 775–806.
- Soberón M, Gill SS & Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* **66**: 1337–1349.
- Taylor R, Tippet J, Gibb G, Pells S, Pike D, Jordan L & Ely S (1992) Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol* **6**: 1211–1217.
- Valderrama AM, Vásquez N, Rodríguez E, Zapata A, Zaidi MA, Altosaar I & Arango R (2007) Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis* CryIAC protein. *J Econ Entomol* **100**: 172–179.
- Valencia A, Bustillo AE, Ossa GE & Chrispeels MJ (2000) Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem Molec* **30**: 207–213.
- Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* **101**: 1–16.
- Vélez R (1997) *Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: Bionomía y manejo integrado*, 2nd edn. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.
- Yamamoto T & Dean DH (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field* (Charles J-F, Delecluse A & Nielsen-Le Roux C, eds), pp. 81–100. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Capítulo 4: Proteínas tipo Cry: implicaciones para el control de la broca del café.

TITLE: Cry-like proteins: implications for coffee berry borer control

AUTHORS: Silvio Alejandro López-Pazos*, Jairo Alonso Cerón Salamanca*¹

¹ Corresponding author

* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A 14-490, Santafé de Bogotá DC, Colombia. Fax: +571-3165415, E-mail: jacerons@unal.edu.co

ABSTRACT

INTRODUCTION: Insecticidal toxins are an important option in the integrated pest management programs around the world. *Hypothenemus hampei* is the most important pest of coffee crops affecting more than 20 million rural families in the tropics. Previously, we identified *Bacillus thuringiensis* Cry proteins with biological activity against the pest. **OBJECTIVE:** In this paper, analysis of Cry toxins activity, binding test on insect gut surface and search of coleoptera-specific toxin candidates in microbial and environmental sequences was developed. **RESULTS AND DISCUSSION:** Some gut proteins recognizing Cry1B and Cry3A toxins were identified. Anticoleopteran aminoacid sequences were detected in *Acaryochloris marina*, *Bacillus weihenstephanensis* and marine metagenome. Coleopteran-specific candidates have a Cry protein-like structure. Alignment check of Cry toxins and anticoleopteran candidates indicate that several important regions are implicated in insecticidal activity. **CONCLUSION:** The present research could be an useful start to new strategies to coffee berry borer control based in Cry toxins.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*; Coleoptera-specific toxin; *Hypothenemus hampei*; Three-dimensional model; Brush border membrane vesicle.

BACKGROUND

Beetles (Coleoptera order) are the most varied group between the eukaryotes, and contain numerous economically significant species of crop pests causing major agricultural losses (Wang et al. 2007). Several members, among others, of the families Curculionidae, Scarabaeidae, Scolytidae, Chrysomelidae and Coccinilidae are present in many countries of Latin American and the Caribbean (Hill 1987). Coffee crops are severely affected by a coleopteran pest: the coffee Berry Borer (CBB) *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). Female insects do drill fissures into the berry and lay their eggs causing severe losses in the grains production and quality; the whole metamorphosis (egg, larvae, pupa, and adult) is always present into the fruit. Female adults leave the berry to looking for new coffee berries. Control of this insect is difficult because the pest has a particular life cycle (Damon 2000). CBB was registered for the first time in Colombia in 1988, and it is present nowadays in more than 600 thousand hectares (90% of the planted area). CBB control costs in Colombia represent approximately US100 million/year, in the order of 10% of the full amount of crop production (Bustillo 2006; Ramírez 2009).

Many nucleotide sequences are used to produce plant resistance such as venoms, insect pathogens, plant lectins, protease inhibitors or ribosome inactivating proteins, hormones and neuropeptides, biotin-binding proteins, chitinases, viral enhancers, antimicrobial peptides and others (Whetstone and Hammock 2007). Whole-genome sequencing projects are a resource of biological functions and their annotation allows detection of proteins through orthologous sequences (common ancestry) searching and primary and tertiary structure correlation, process named comparative genomics (Lee et al. 2007; Ellegren 2008). Therefore, it is possible to find candidate toxins in completely sequenced genomes utilizing this theoretical approach. Importantly, Colombia represents an unique biological environment that supports distinctive species that continue to be the focus of toxinologists.

Entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* has been used as an important alternative in insect-plant resistant development by means of cry genes codifying lethal toxins against pest larvae. Some Cry proteins have biological activity against coleopteran organisms such as Cry1B, Cry1I, Cry3, Cry7, Cry8, Cry9, Cry14 and Cry18 (van Frankenhuyzen 2009). Four proteins have been described as most important Cry membrane bound receptors in Coleoptera. First, aminopeptidase N (APN) has been characterized as receptor in lepidopteran, although it is possible that APNs do not have this function in coleopteran (Loseva et al. 2002; Pigott and Ellar 2007). Cadherin proteins (CADR) are important receptors for Cry proteins and its functionality was demonstrated in coleopteran species (Sayed 2007; Fabrick et al. 2009; Park 2009). ADAM metalloprotease was identified as receptor of Cry3Aa toxin (Ochoa-Campuzano et al. 2007). Evidence suggests that alkaline phosphatase (ALP) may act as a Cry1B receptor in coleopteran organisms (Martins et al., 2010). It was found that various strains of *B. thuringiensis* are toxic against CBB larvae specially strain IPS-82 (Méndez-López et al. 2003). Recently, research in our laboratory focuses on the study of the Cry proteins for biological control of CBB. Although Cry1B and Cry3A proteins showed a minor activity against the pest (López-Pazos et al. 2009) the results appear offer support to hypothesis that noxious condition could be due to physiological factors, rather than just the toxicity of this molecules, in the insect. For this reason, we wish to analyze results of biological assays of Cry toxins on CBB larvae and to find new possibilities of CBB control identifying coleopteran-specific toxins candidates guide by the "guilt by association" principle (Aravind 2000; Gabaldon and Huynen 2004) in the completed archaeal and bacterial genomes, and environmental samples database.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant proteins and biological assays

Recombinant Cry1B, Cry3A, Cry4 and Cry9 proteins were done as described previously (López-Pazos et al. 2009). Specifically, Cry4 and Cry9 were built using the primers Cry4F (5'-ATGGGATCCTATCAAATAAAAATGAATAT-3') with Cry4R (5'-TCACTCGTTCATGCCTGCAGATTCAATGCT-3') and Cry9F (5'-ATGGGTACCAATAAACACGGAATTATTGGC-3') with Cry9R (5'-TTACTGCAGTGTTTCAACGAATTCAATACT-3') respectively from *B. thuringiensis*

serovar *israelensis* and *cry9* gene cloned in *Escherichia coli* donated by *Bacillus* Genetic Stock Center (The Ohio State University, Columbus OH, USA). BamH1 and KpnI (sense) restriction sites were added to sequence of the Cry4 and Cry9 forward primers (underlined) in that order. PstI restriction site were added to both Cry4 and Cry9 reverse primers (underlined). Brush border membrane vesicles (BBMVs) from the midgut of *H. hampei* fourth instar larvae were prepared according to the method of Wolfersberger et al. (1987). Brush border membrane protein resolved on SDS-PAGE (10%) was transferred onto Immobilon-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for immunoblotting (Sigma). The PVDF membrane was incubated with biotin-labelled activated Cry toxin, followed by washing with PBS/Tween (phosphate-buffered saline, pH7.4, containing 0.05% Tween-20) and incubation with streptavidin/peroxidase. The blot was developed by diaminobenzidine (Sigma) as a substrate. Cry4 and Cry9 (protoxin and activated toxin) bioassays were realized as described elsewhere (López-Pazos et al. 2009) with a series of ten Cry protein concentrations (dose range: 1000–10000 ng/cm²) using CBB first instar larvae of a laboratory colony from Nariño (Colombia).

Bioinformatics

Four anticoleopteran aminoacid sequences from different organisms deposited in RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) were used in this study. Sequences were selected by a meticulous bibliographical revision, using the criteria of established coleopteran-specific toxicity. Exhaustive BLAST (tblastn) searches, from National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were performed, using each toxin as query. The iterative searches were performed, for protein larger than 100 aminoacids with inclusion threshold 0.001 or for protein smaller than 100 aminoacids with inclusion threshold 0.01 until the convergence or until the last iteration before the first known false positives appear, against 703 completely sequenced bacterial and archaeal genomes available on the NCBI Microbial Genomes website at the time of this analysis (November 2009) and the whole NCBI environmental samples database (1.66 million Whole Genome Shotgun reads) (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Significant hits to proteins encoded in these genomes were further classified as anticoleopteran toxins; in case of multiple matches to different candidate families, the protein was assigned according to the highest-scoring match to a toxin query.

Tertiary structures of candidate insecticidal sequences were constructed by homology modeling using the crystal structure of homologous protein from Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) using SWISS-MODEL (Arnold et al. 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>) for the identification of templates. The structural alignments were generated using DeepView-Swiss-PdbViewer 4.0 software (Guex and Peitsch 1997) (<http://spdbv.vital-it.ch/>). The energy minimisation was realized using GROMOS 43B1 (Gunsteren et al. 1996) (<http://www.igc.ethz.ch/GROMOS/>).

RESULTS AND DISCUSSION

We wanted to know the possible interaction between Cry toxins and receptors in coleopteran species described in literature and the correlation with the biological activity. We use Cry1B, Cry1I and Cry3A from our previous works (Lopez-Pazos et al. 2009; López-Pazos et al. 2010) with Cry4 and Cry9 developed in this research. Each Cry protein (as protoxin and toxin) appeared as a single band on SDS-PAGE gel (Figure 1). BBMV's divided by protein electrophoresis showed bands between 20–220 kDa (Figure 1). Blotting test was prepared to categorize the weight of Cry binding proteins in BBMV's isolated from whole CBB larvae. Cry1B recognized proteins of ~190, 140, 80, 75, 60, 50 and 40 kDa (Figure 1). A signal for Cry1I is also visible at 140 kDa (Figure 1). Cry3A binding proteins were detected at ~140 kDa, 120 kDa and 70 kDa (Figure 1). Cry4 and Cry9 were not detected by any protein on BBMV's (Figure 1). There appear to be several Cry1B and Cry3A toxins binding sites and/or receptors in the midgut epithelia of CBB. It thus seems likely that our data confirm the existence of a high affinity binding site (140 kDa protein), and others are recognized with low affinity.

APN is an N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)-bearing glycoprotein, with a molecular weight between 90-170-kDa; it was proposed that this Cry-APN interaction have two steps: carbohydrate recognition and irreversible protein-protein interaction (Pigott and Ellar 2007). More than 60 different APNs have been registered in databases; APNs have a similarity level ranging from 26% to 65% (Herrero et al. 2005, Nakanishi et al. 1999). Regions of amino acid sequences of the 11 APN from several insects were compared with the *Bombix mori* APN Cry1Aa toxin-binding region and 64 N-terminal residues were detected as important for Cry1 toxin binding; the region includes highly conserved and variable regions (Nakanishi et al. 1999). CADR receptors have been studied in lepidopteran and dipteran insects, and they are highly variable, with a molecular weight between 175 to 210 kDa. An important binding site is contained in CADR repeat number 12 (Pigott and Ellar 2007; Hua et al. 2004). CADRs were isolated from coleopterans *Diabrotica virgifera virgifera* (191 kDa) and *Tenebrio molitor* (179 kDa) (Sayed 2007; Fabrick et al. 2009). In essence, the 140 kDa protein is consistent with APN. We do not know if multiple Cry binding polypeptides, with similar mass detected in CBB, are different proteins or the same possible APN glycosylated in a different way. On the other hand, CADR is susceptible to proteolytic digestion, producing a ~120 kDa fraction and for this reason CADRs are confused with APNs in protein-protein interaction blots (Martínez-Rámirez et al. 1994). Cry proteins have multiple binding determinants possibly specified independently by domains II and III. Also, Cry toxins interrelate with other class of proteins in Coleoptera order, such as ALP (molecular weight ~65 kDa), V-ATPase or Heat-Shock Cognate protein (~ 80 kDa) and ADAM metalloprotease (~30 kDa) (Hua et al. 2001; Ochoa-Campuzano et al. 2007; Martins et al. 2010; Nakasu et al. 2010). Any signals in ligand blot for Cry1B and Cry3A would be related with this proteic groups. Previously, we identified a minor biological activity of Cry1B and Cry3A proteins on CBB larvae (López-Pazos et al. 2009). Unfortunately, Cry4 and Cry9 were not active against CBB (highest mortality was 7%). In this sense, there is correlation of our data with ligand blot observations.

The toxic effect of Cry proteins is due to their ingestion by susceptible larvae and solubilization by the alkaline pH and reducing conditions of the midgut. The Bravo model proposes that activated Cry monomer binds to CADR and the toxin suffers an alteration that facilitates oligomerization and binding to APN or ALP leading membrane insertion and lytic pore development. The Zhang model suggests that monomeric Cry toxin binds to CADR and initiates an Mg²⁺-dependent signaling cascade leading to destabilization of the cytoskeleton and ion channels and cell lysis. The Jurat-Fuentes model explains that activated monomeric protein binds to the CADR with activation of a signaling pathway regulated by phosphatases and dependent on the interaction toxin-actin, subsequently Cry toxin oligomerizes, binds to APN and ALP and as result cause lytic pore (Pigott and Ellar 2007). Little is known about the mechanism involved in the activity by coleopteran-specific Cry toxins. The similarity among Cry proteins implies a similar mode of action. So, singular factors are critical for toxicity. Specific conditions in CBB gut physiology (acidic pH, type of proteases or high insecticide resistance allele proportion) are not favourable for mode of action of Cry proteins (López-Pazos et al. 2009). The presence of candidate receptors in CBB is a proof of Cry proteins potential by control of this pest. Lately, it was possible improve the toxicity of Cry3 proteins by means of a CADR fragment (repeat 8-10) against coleopteran species (Park et al. 2009). Recently it was proposed that Cry proteins without α -helix 1 of domain I (CryMod toxins) form oligomeric structures and are active in insects with CADR modified or silenced (Soberón et al. 2009). Because CADR has a high variability (maybe CADR CBB lacks of repeat 8-10) and is a critical step in all mechanism action models, perhaps this strategies would be an option in CBB management.

Available data, from bibliographical search, shows anticoleopteran protein sequences from different organisms (Table 1). AaIT from Sahara scorpion showed an important biological activity against CBB, through of its expression in *Metarhizium anisopliae*, because the recombinant strain significantly increased mortality of this pest (Pava-Ripoll et al. 2008). Unfortunately, there is not an AaIT solved structure yet, so we included 1WWN because it have a high similarity ($E=7e-23$) with AaIT (Table 1). BLAST analysis showed three microbial sequences with high similarity to coleopteran-specific queries (Table 1). Two organisms mainly have relevant candidate sequences for coleopteran-specific toxins according to this analysis. First, *Acaryochloris marina* is a unicellular cyanobacterium containing chlorophyll d as a major pigment (Ohashi et al. 2008). Second, *Bacillus weihenstephanensis* is a Gram-positive, facultatively anaerobic, spore-forming bacterium. This organism have food poisoning potential and is able to grow aerobically at 7°C in agitated liquid culture, absence of growth at 43°C, by the presence of the 16s rDNA signature sequence 1003TCTAGAGATAGA and the signature sequence 4ACAGTT of the major cold shock gene *cspA* (Lechner et al. 1998). On the other hand, there is an environmental sequence with anticoleopteran potential (Table 1) from Venter et al. (2004) project; this initiative consisted in a measurement of the Sargasso Sea genetic diversity by means of genomics technology.

Our three dimensional models were built based on the coordinates from SWISS-MODEL analysis. PDB identification codes for templates and corresponding residues in

theoretical models are given in Table 1 (footnotes). It is considered that, as sequence identity decreases, measures of model quality disimprove. Approximately, 30% sequence identity in primary sequence is required for generating useful structures (Forster 2002; Paramasivan et al. 2006). Final models have a range of 33% to 37% identity (Table 1 footnotes). The ϕ and ψ angles predominantly occupy allowed regions in all theoretical structures. Models of targets for selected aminoacid sequences are shown in Figure 2. To start, the most striking feature of the predicted structure of candidate insect toxin from *A. marine* genome consists in two large β -pleated sheets that form a scaffold on which a possible carbohydrate binding region (Figure 2). This architecture and topology is found in a wide variety of carbohydrate recognizing proteins such as the plant lectins, galactins or serum amyloid protein (Loris et al. 1998). Recognition between proteins and carbohydrates is of key importance in microbial infections. Model is structurally related to the jelly-roll topology which facilitates viral entry into bacterial cells, mediated through interactions with sugar-modified proteins on the cell surface (Petrey and Honig 2009); also, lectin recognizing both the epithelial surface of the gut and/or the peritrophic membrane and sugar in glycosylated digestive enzymes is a critical factor for insecticidal activity (Peumans and Van Damme 1995 (a), 1995 (b)). In a second place, structural comparison of the candidate *B. weihenstephanensis* toxin with the theoretical structure of the Cry8Ea1 indicates correspondence to the general model for a Cry protein. The toxin has three domains. Domain I (residues 64-287) consists of a bundle of seven antiparallel α -helices in which helix 5 is encircled by the remaining helices; domain II (residues 288-498) is composed of three antiparallel β -sheets joined in a typical "Greek key" topology; C-terminal domain (residues 499-648) consists of two twisted, antiparallel β -sheets forming a β -sandwich topology (Figure 2). The last structure corresponds to a sequence from marine metagenome and it was built by homology with a possible transferase of *Aquifex aeolicus*, a hyperthermophilic eubacterium, which grows at 85-100°C. It has been suggested that this organism may be the earliest diverging eubacterium (Deckert et al. 1998). Model is composed by three α -helices and a large β -sheet, in which the first and second β -strands are arranged in parallel and third and fourth are antiparallel. Interestingly, the model is some similar to Aminoacyl-tRNA synthetase editing domain (Naganuma et al. 2009; Guo et al. 2009) whose phylogenetic relationships amongst these enzymes are clustered around substrate specificity, and not around species groups (Ribas de Pouplana and Schimmel 2000). Due to the fact that this aminoacid sequence from an ancient bacterium has identity with a Cry protein, and besides it is comparable to aminoacyl-tRNA synthetase editing domain and helices with sheets conformation, could suggest a possible origin of these crystal toxins and its specificity.

Comparison of Cry proteins and anticoleopteran candidate primary sequences (Figure 3) allowed us to observe differences in all residues implicated in activity for Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry4, Cry9 and coleopteran-specific candidates. This diversity could to generate clues to new mutation experiments. Because this is the first report on the cry gene products interacting with CBB gut proteins and identification of new toxin possibilities by control of this insect, it would be interesting to extend our ligand blot analyses of *H. hampei* BBMV proteins through the use of mutated toxins and/or

expressed binding proteins and isolating coleopteran-specific candidates by biological assays in CBB respectively. So, we would to understanding the relationship between toxin-receptor interaction and *H. hampei* *in vivo* toxin potency.

Acknowledgments

López-Pazos S.A. is grateful to Colciencias for a doctoral fellowship.

REFERENCES

1. Aravind L (2000) Guilt by association: contextual information in genome analysis. *Genome Res* 10: 1074–1077
2. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201
3. Bustillo AE (2006) Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Rev Colomb Entomol* 32: 101-116
4. Damon A (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull Entomol Res* 90:453-465
5. Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG, Lenox AL, Graham DE, Overbeek R, Snead MA, Keller M, Aujay M, Huber R, Feldman RA, Short JM, Olsen GJ, Swanson RV (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358
6. Ellegren H (2008) Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. *Mol Ecol* 17:4586-4596
7. Fabre C, Causse H, Mourey L, Koninkx J, Rivière M, Hendriks H, Puzo G, Samama JP, Rougé P (1998) Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. *Biochem J* 329: 551-560
8. Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL (2009) A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J Biol Chem* 284: 18401-18410
9. Forster MJ (2002) Molecular modeling in structural biology. *Micron* 33: 365–384
10. Gabaldon T, Huynen MA (2004) Prediction of protein function and pathways in the genome era. *Cell Mol Life Sci* 61: 930–944
11. Guex N, Peitsch MC, (1997) Swiss-model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723
12. Gunsteren WF van, et al, (1996) In Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag ETHZ
13. Guo M, Chong YE, Beebe K, Shapiro R, Yang XL, Schimmel P (2009) The C-Ala domain brings together editing and aminoacylation functions on one tRNA. *Science* 325:744-747
14. Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6: 96

15. Hill DS (1987) Agricultural insect pests of temperate regions and their control. Ed. Cambridge University Press. Cambridge UK, pp 258-437
16. Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2004) Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and toxicity. *J Biol Chem* 279: 28051–28056
17. Hua G, Masson L, Jurat-Fuentes JL, Schwab G, Adang MJ (2001) Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 872-879
18. Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1373-1 382
19. Lee D, Redfern O, Orengo C (2007) Predicting protein function from sequence and structure. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 995-1005
20. Li J, Carroll J, Ellar DJ (1991) Crystal Structure of Insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution. *Nature* 353:815-821
21. Liu YJ, Cheng CS, Lai SM, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins* 63:777-786
22. López-Pazos SA, Cerón JA (2007) Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: a review. *Acta Biol Colomb* 12: 19-32
23. López-Pazos SA, Cortázar JE, Cerón JA (2009) Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). *J Invertebr Pathol* 101: 242-245
24. López-Pazos SA, Rojas Arias AC, Ospina SA, Cerón J (2010) Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. *FEMS Microbiol Lett* 302:93-98
25. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L (1998) Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta* 1383: 9–36
26. Loseva O, Ibrahim M, Candas M, Koller CN, Bauer LS, Bulla Jr LA (2002) Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 567–577
27. Martínez-Ramírez AC, González-Nebauer S, Escriche B, Real MD (1994) Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 782–787
28. Martins ES, Monnerat RG, Queiroz PR, Dumas VF, Braz SV, de Souza Aguiar RW, Gomes AC, Sánchez J, Bravo A, Ribeiro BM (2010) Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 138-145
29. Méndez-López I, Basurto-Ríos R, Ibarra JE (2003) *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol Lett* 226: 73–77

30. Mourey L, Pédelacq JD, Birck C, Fabre C, Rougé P, Samama JP (1998) Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem* 273:12914-12922
31. Naganuma M, Sekine S, Fukunaga R, Yokoyama S (2009) Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8489-8494
32. Nakanishi K, Yaoi K, Shimada N, Kadotani T, Sato R (1999) *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. *Biochim Biophys Acta* 1432: 57-63
33. Nakasu EY, Firmino AA, Campos Dias S, Lima Rocha T, Batista Ramos H, Ramos de Oliveira G, Lucena W, Ribeiro da Silva Carlini CR, Grossi de Sá MF (2010) Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol* *In press*
34. Ochoa-Campuzano C, Real MD, Martínez-Ramírez AC, Bravo A, Rausell C (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 362: 437-442
35. Ohashi S, Miyashita H, Okada N, Iemura T, Watanabe T, Kobayashi M (2008) Unique photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynth Res* 98:141-149
36. Paramasivan R, Sivaperumal R, Dhananjeyan KJ, Thenmozhi V, Tyagi BK (2006) Prediction of 3-dimensional structure of salivary odorant-binding protein-2 of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, the vector of human lymphatic filariasis. *In Silico Biol* 7: 1-6
37. Park Y, Abdullah MA, Taylor MD, Rahman K, Adang MJ (2009) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb Toxicities to Coleopteran Larvae by a Toxin-Binding Fragment of an Insect Cadherin. *Appl Environ Microbiol* 75: 3086-3092
38. Pava-Ripoll M, Posada FJ, Momen B, Wang C, St Leger R (2008) Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *J Invertebr Pathol* 99: 220–226
39. Petrey D, Honig B (2009) Is protein classification necessary? Toward alternative approaches to function annotation. *Curr Opin Struct Biol* 19:363–368
40. Peumans WJ, Van Damme EJ (1995a) Lectins as plant defence proteins. *Plant Physiol* 109: 347–352
41. Peumans WJ, Van Damme EJM (1995b) Role of lectins in plant defense. *Histochem J* 27: 253–271
42. Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 255–281
43. Ramírez R (2009) La broca del café en Líbano. Impacto socioproductivo y cultural en los años 90. *Revista de Estudios Sociales* 32: 158-171
44. Ribas de Pouplana L, Schimmel P (2000) A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases *Cell Mol Life Sci* 57: 865–870
45. Sayed A, Nekl ER, Siqueira HA, Wang HC, French-Constant RH, Bagley M, Siegfried BD (2007) A novel cadherin-like gene from western corn rootworm,

- Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. *Insect Mol Biol* 16: 591–600
46. Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* 66:1337-1349.
 47. van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101: 1–16
 48. Venter, J.C., et.al. (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74
 49. Wang L, Wang S, Li Y, Paradesi MSR, Brown SJ (2007) BeetleBase: the model organism database for *Tribolium castaneum*. *Nucleic Acids Res* 35: D476–D479
 50. Whetstone PA, Hammock BD (2007) Delivery methods for peptide and proteín toxins in insect control. *Toxicon* 49: 576–596
 51. Wolfersberger MG, Luethy P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, Giordana B, Hanozet GM (1987) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol* 86:301–308
 52. Zlotkin E, Fishman Y, Elazar M (2000) AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie* 82: 869-881

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Recombinant toxins (SDS-PAGE) and ligand blot of Cry proteins to CBB BBMV. (A) Cry4 protoxin; (B) Cry9 protoxin; (C) Cry4 and Cry9 activated toxins; (D) BBMV proteins from CBB. Cry-binding proteins (E-I) are indicated by the arrows, (E) Cry1B; (F) Cry1I; (G) Cry3; (H) Cry4; (I) Cry9. The numbers on the left of each panel are molecular masses (kDa).

Figure 2. Models of candidate toxins: (A) insect toxin from *A. marina* genome, β -pleated sheets are in yellow; (B) aminoacid sequence of the *B. weihenstephanensis* genome wherein domain I is red, blue represents domain II and domain III is dyed of green; and (C) model of marine metagenome, helices are green and β -sheet is yellow.

Figure 3. Cry toxins (domains I, II and III) and theoretical coleopteran-specific aminoacid sequences alignment. Vertical lines are the domain limits. Squares indicate residues or regions with important role in Cry protein toxicity, square brackets are representing the counterparts in *A. marina*, *B. weihenstephanensis*, and marine metagenome sequences. In the same way, ovals are the corresponding residues or regions in Cry4 and Cry9 (Pigott and Ellar 2007; Soberon et al. 2009). Sequence Viewer software was used (www.clcbio.com)

TABLES

Table 1. Coleoptera-specific toxins identified from bibliographical exploration and results of BLAST search, in Microbial Database (Blosum 62, E threshold 0.001) and Environmental Sample Database (Blosum 62, E threshold 0.1), by coleopteran-specific toxins.

TOXIN IDENTIFICATION				
ID PDB	Toxin	Source	Order target	References
1AVB	Arcelin 1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Coleoptera	Fabre et al. 1998; Mourey et al. 1998
1DLC	Cry3A	<i>B. thuringiensis</i>	Coleoptera	Li et al. 1991; López-Pazos and Cerón 2007
1TI5	VrD1	<i>Vigna radiata</i>	Coleoptera	Liu et al. 2006
1WWN	BmK-βIT	<i>Buthus martensii</i> Karsch	It has toxicity against Diptera and is related with AaIT from <i>Androctonus australis</i> Hector active against Blattaria, Orthoptera, Diptera and Coleoptera	Pava-Ripoll et al. 2008; Zlotkin et al. 2000
BLAST RESULTS				
Insecticidal toxin (ID PDB)	Organism target genome/environmental source	ID NCBI	E-value	Region
Microbial Database				
1AVB ^A	<i>A. marina</i> MBIC11017	NC_009925.1	3e-10	1669294-1669911
1DLC ^B	<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 plasmid pBWB401	NC_010180.1	2e-101	139641-137689
Environmental Database				
1DLC ^C	hypothetical protein GOS_5670768 marine metagenome	gb ECH33518.1	0.014	12-142

^A PDB template: 1G7Y chain C (lectin from the legume *Dolichos biflorus*), 33% identity. Model residues: 72-289.

^B PDB template: 3EB7 (Cry8Ea1) 37% identity. Model residues: 64-648.

^C PDB template: 2E58 (MnmC2 from *Aquifex aeolicus*) 33% identity. Model residues: 38-136.

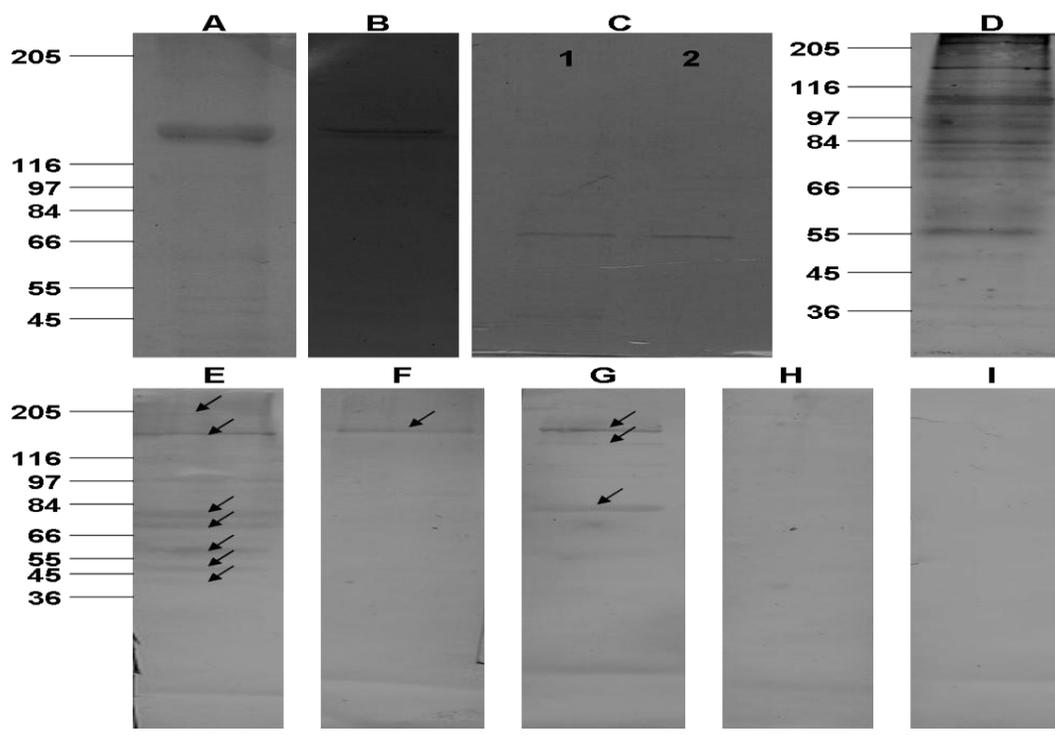


Figure 1.

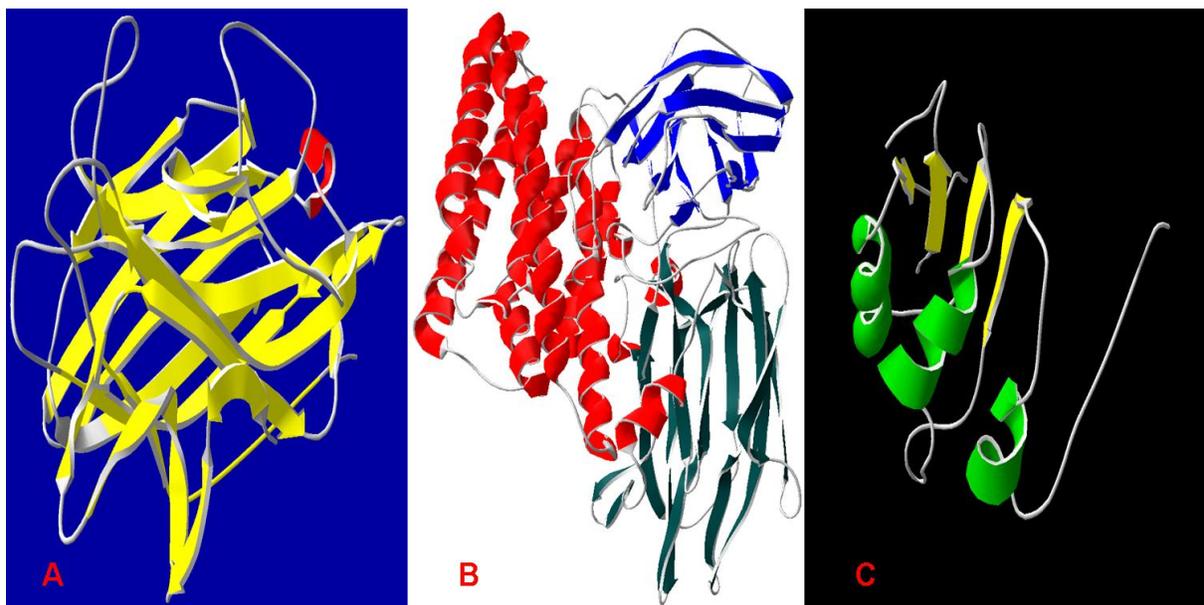


Figure 2.

Cry1B MT-S-----NRKNE-----NEIINAVSN---HSAQMDL---LPDARIEDSLCIAEGN-----NIDPFVSA-STVQTGGINIAGRILGLVLPFAGQLASF-YSF 79
 Cry1I MK-L-----KQDKHQSFSSNAKVDKIST---DSLKNEDTIELOINIHEDCLKMSYE-----NVPEFVSA-STVQTGGINIAGRILGLVLPFAGQVASF-YSF 88
 Cry9 MN-Q-----NKHGIIGASNCGCASDDVAK---YPLANNPYSSALNLSQNSISLNIWI-----NI---IG-DAAKVSVIGTIVSLFAPSITGLTSTI-VYD 84
 Cry4 MNPY-----QKNIYEETLNASQKLNISNNYTRYPIENSQKLLQSTNYKDWLNMCQQNQYGGDFETFIDS-GELSAITIVVGVTVLTFGGTTPPLGLALIGFGT 99
 Cry3 MIRKGRKMPNPNRS EHDITKTEN-NEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADNNEA--LDSSTTK-DVIQKGISVYQGLVGVGPFPGALVSF-YTN 102
 B. weihenstephanensis MN-----SNNKTNPNVIGTSSD-QSLLTNSVYKKT LANDQSNPLQHRSDIDLCLSVSEGNRD-SLNHDVFISAPGLVDTANITSAILSALG/PMLGTVVKL-YSK 96
 Acaryochloris marina SN-----SNNKTNPNVIGTSSD-QSLLTNSVYKKT LANDQSNPLQHRSDIDLCLSVSEGNRD-SLNHDVFISAPGLVDTANITSAILSALG/PMLGTVVKL-YSK 96
 Marine metagenome M-----SNNKTNPNVIGTSSD-QSLLTNSVYKKT LANDQSNPLQHRSDIDLCLSVSEGNRD-SLNHDVFISAPGLVDTANITSAILSALG/PMLGTVVKL-YSK 16

Cry1B LVGELW--PRGRDQWEIFLEHVEQLINQITENARNALARLQGLGDSFRAYQSLLEWLNRRDAR---TRSVLYTQYIALELDFLNAMP-----LFAIRNQ- 172
 Cry1I IIGELW--PKGKNQWEIFMEHVEEIIINQIKSTYARNKALIDLKGLGDALAYHDSLESWVGNRRNTR---ARSVVKSQYIALELDFVQKLP-----SFAVSGE- 181
 Cry9 LIGKVLGGSSGQISDLSICDLSIIDLRVSCSTLNYADFNQSVLLYRTEALDSWKNPNAS---AEE-LTRFRFIADSEFDRIITRGSITNGGSLARQNA- 186
 Cry4 LIPVLFPAQDQSNWSDFTQTKNIKKEIASTYISANVILNRSFNVISYVNHKLTWENNPNQN---TQD-VRTQIQLVHYHFQNVIPELVNSCPPNNSDCDY 202
 Cry3 FLNTIWP---SEDPWKAQMEQVEALNDQKIADYANAKALAEQLQGNVYEDVYSALSWOKNPSVSRNPHSQGRIRELFSQAESHFRNNSMP-----SFAISG-Y 197
 B. weihenstephanensis LFGFLWGSTPGQDPWKEIMDRVEVLIDQKLEAYARKALAELEGLQNVMKYVDALESWQNN--SRNSQTRLLVQQLVVADSQFKQAMP-----SFAIKD-Y 191
 Acaryochloris marina LFGFLWGSTPGQDPWKEIMDRVEVLIDQKLEAYARKALAELEGLQNVMKYVDALESWQNN--SRNSQTRLLVQQLVVADSQFKQAMP-----SFAIKD-Y 191
 Marine metagenome LFGFLWGSTPGQDPWKEIMDRVEVLIDQKLEAYARKALAELEGLQNVMKYVDALESWQNN--SRNSQTRLLVQQLVVADSQFKQAMP-----SFAIKD-Y 24

Cry1B EVPLLMVYAQAANHL LLLRDA SLFGSEFGL-TSQEI-----QRYYERQVERTRDYSDYCVWEYNTGLNSLR--GTNAA---SWVRYNQFRRLTLGVLDLV 263
 Cry1I EVPLLPYAQAANHL LLLRDA SLFGSEFGL-TSQEI-----QRYYERQVERTRDYSDYCVWEYNTGLNSLR--GTNAA---SWVRYNQFRRLTLGVLDLV 272
 Cry9 QILLPSFAAANHL LLLRDA TRYGTWGLYNATPF-----INQSKLVELIELYDYCVWYRNGFNELRQRGTSAT---AWLEFHRYRREMTLVLDIV 280
 Cry4 NILVLSYAQAANHL TVLNQAVKF--EAYLKNRQFDYLEPLTAIDYVPLTKALIEDYTNYPVLTYYKGLNLIKTTPDSNLDGNIWNTYNTYRKMTTAVLDIV 307
 Cry3 EVLFLTTYAQAANHL FLLKDAQIYGEWGYEKED-----IAEYKRLKLTQYEDHCWYNYVGLDKLR--GSSYE---SWWNFRYRREMTLVLDIV 288
 B. weihenstephanensis EVSLLPVYTAQAANHL LLLRDSQIFGKDWGMPQHE-----IDLFYKEHLCEIEKYSDHCVWEYHTGLNKLKSSTAK----DWIDYRFRREMTVAVLDIV 282
 Acaryochloris marina EVSLLPVYTAQAANHL LLLRDSQIFGKDWGMPQHE-----IDLFYKEHLCEIEKYSDHCVWEYHTGLNKLKSSTAK----DWIDYRFRREMTVAVLDIV 282
 Marine metagenome EVSLLPVYTAQAANHL LLLRDSQIFGKDWGMPQHE-----IDLFYKEHLCEIEKYSDHCVWEYHTGLNKLKSSTAK----DWIDYRFRREMTVAVLDIV 61

Cry1B ALFPSYDTRTYPINTSAQLTREYVYDAIGATGVN--MAS--MNWY---NN-NAPSFAIEAAIRSPHLDFLEQLTIFSSASRW---SNTRHMTYWRGHTIQRRFI 359
 Cry1I ALFPSYDTRTYPINTSAQLTREYVYDAIGATGVN--MAS--MNWY---NN-NAPSFAIEAAIRSPHLDFLEQLTIFSSASRW---SNTRHMTYWRGHTIQRRFI 370
 Cry9 ASFSLDTITNYPIETDFQLSRVIYTDPIGFVH-RSSLRG--ESWF---SFMNRANFSDLENA-IPNPRPSWFLNMMII TGS TLP SPSTDRARVWYGRDRISA 380
 Cry4 ALFPNYDVGKYPYIQSELTREIY-QVLNF-----E--ESPY---KYD---FQYQEDSLTRRPHLFTWLDLSLNFYKQTPPTSHYNTMFHYTLDNISQ 396
 Cry3 ALFPLVDVRLYPKEMKTELTRDVLTDPIVGVN-----N--LRGY--GT---TFSNIENY-IRKPHLFDYLRHIFQHTIRIQ--PEEYGNDSFNWYSGNYVSTRPS 377
 B. weihenstephanensis ALLPKYDVHMYPMPIHAE LTRREIYTDPIVGSYLPYKGNFKDVMWYEMTKAYRQPTFQDLLEN-LILKPSRFTWLKDLKMYTRRQ--NGEYEEYNYWVGHQLE-KAL 384
 Acaryochloris marina ALLPKYDVHMYPMPIHAE LTRREIYTDPIVGSYLPYKGNFKDVMWYEMTKAYRQPTFQDLLEN-LILKPSRFTWLKDLKMYTRRQ--NGEYEEYNYWVGHQLE-KAL 384
 Marine metagenome ALLPKYDVHMYPMPIHAE LTRREIYTDPIVGSYLPYKGNFKDVMWYEMTKAYRQPTFQDLLEN-LILKPSRFTWLKDLKMYTRRQ--NGEYEEYNYWVGHQLE-KAL 92

Cry1B GGG--LNTSTHGATNTSINPVTLRFA SRDYRTESYAGVLLWGIYLEPIGVPTVRFNF---TN--PQNI SDRGTANYEQ-YE SPGL---QLKDSETELPEITER 455
 Cry1I GGT--LNTSTGATNTSINPVTLPF SRDYRTESYAGVLLWGIYLEPIGVPTVRFNF---TN--PQNI SDRGTANYEQ-YE SPGL---QLKDSETELPEITER 463
 Cry9 ASQ--FITELISGQHTATQTIL--GRNI FRVDSQA---CNLNDTTVGNRAVFTYH---DASEGSRVSYEYETGIDNPRVQNTINTPGEISDI 468
 Cry4 ---KSSVFGNHNVTDKLKSGLAT-NIY-IFLNLVLSLNDNKYLNDRYNNKSMKDFFITNGRLEKELTAGSGQITVDNNTTEGL--PILKRRFN--GNPTLF 491
 Cry3 IGSNDITSPFYGKRSSEPVQNLFE NGEKVRAVANTNLAVWPSAV--YSGVTKEVFPQYN-----DQTEASTQYDSKRNVGVAVSW---DSTIQLPPEITDE 471
 B. weihenstephanensis IGEKYVRETTISGEITSEE-DTFTFDYDIHRVLCNYI---GRYDNLVGVNVEFHLDNNTPRKKE-----YKDRVNTQSQKII-DSEEL----- 469
 Acaryochloris marina GSRPKLKGRYLGLFNTT-----FDTVNRRIEDVNSIRPI-ATESCNFGH-----NNGEKAERITVYDSP-KN 109
 Marine metagenome GSRPKLKGRYLGLFNTT-----FDTVNRRIEDVNSIRPI-ATESCNFGH-----NNGEKAERITVYDSP-KN 100

Cry1B PNYESYSHRLSHI-----GI--ILQSRVN---VPV-YSWTHRSADRNTIGPNRITQIPVVKASELPQGTTVVRGPGFTGGDILRRTNTGGFGPILRVTV-NQPLVQ 549
 Cry1I PNYESYSHRLSHI-----GI--ISASHVK---ALV-YSWTHRSADRNTIEPNSITQIPVVKAFNLSSGAAYVRGPGFTGGDILRRTNTGTGDLRVTV-NPPFAQ 557
 Cry9 PTPEDYTHLSTTINLTGGLRVASNRRS---SLVMYQWTHKSLRNTINPDRITQIPVTKVDRGTGVSYVNDPGFISGALLQRTDHGSLGLRVQF-PLHLRQ 570
 Cry4 PTYDNYSHL SFIKLSL---IPATYTK--QVYTFAWTHSSVDRNTIYTHLITQIPVVKANS LGTASKVVQGPHTGGDILDFKDH---KLTICHSNFEQ 584
 Cry3 PLEKGYSHQLNYV---MCFLMQSGRG---TIPVLTWTHKSVDFNNDISKKITQIPLVKAYKLGSGAVVAGPRFTGGDIQCTENGSAATIVT-PDVSYSQ 567
 B. weihenstephanensis ---LSHRLSYVESFD---LYWNHKNKGGTIPVFGWTHSVAPNI IYEDKITVIVATKASGYFT-SEVIQGGYSGGLIKGSK--SMGNLPTPPRDAHNR 563
 Acaryochloris marina NYDRDAHTVAVV---FDTVNRRIEDVNSIRPI-ATESCNFGH-----NNGEKAERITVYDSP-KN 165
 Marine metagenome ---SHSV-----HQNLE-----AAGWVYRIPGFA-----HGRS 126

Cry1B RYRIGFRYAS--TVDFDFVSRG-GTVNFRFRRTMN-SGDE---LKYGNVRRRAFTTPTFTQIQDI-IRTSIQGLSGNGEVYIDKIEIPVATFEAEYD---L 645
 Cry1I RYRIRIRYAS--TTDLQFHTSIN-GKATNQGNFSATMN-RGED---LDYKTRTGVGFTTFFSFLDVQST-FTIGAWNFSSNGEVYIDRIEFVPEVTEYAEYD---F 653
 Cry9 QYRIRIRYAS--TTNIRLSVNGS-FGTISQ-NLPSTMR-LGED---LRYGSAIFRENTSIRPTASPDQ-IRLTIEPSFIRQEVYVDRIEFIPVNPTRAKED---L 665
 Cry4 SYRIRIRYASNGSANTRAVINLS-IPGVAELGMALNPTFSGTDYTNLKYKDFQYLEFSNEVKFAPQNI SLVFNRSVDYVNTTVLIDKIEFLPITRSIREDREKQKL 690
 Cry3 KYRARIHYAS--TSQITFTLSLD-GAPFNQYFDKTI-N-KGDT---LTYNSFNLASFTPFELSGNN---LQIGVTGLSAGDKVYIDKIEIPVNP----- 652
 B. weihenstephanensis NYRIRIRYADSDDLLKMTFTSGIGPAKYQTPYQATMK-KGDS---FKYNSFYQYVEKVVITISS-----INGINFSAAGSGFYLDKVEFIPVNP----- 646
 Acaryochloris marina DLKRVSLYPS-----SEKCHVSATVPLEKE-----VEDWVSVGFSATSGSKKETETHNVL SWSFSSN-----FI----- 226
 Marine metagenome STKATLK-----SEKCHVSATVPLEKE-----VEDWVSVGFSATSGSKKETETHNVL SWSFSSN-----FI----- 142

Figure 3.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los coleópteros plaga se encuentran entre los insectos que causan un mayor grado de perjuicio en agricultura, horticultura y la industria forestal, causando reducciones en la producción y pérdidas económicas y obviamente el uso de pesticidas químicos para su control no es eficiente (Potter et al., 1996). ***H. hampei* es la principal plaga del cultivo del café y fue interesante evaluar su posible susceptibilidad a *Bt*.** En este sentido, se estandarizó una cría de la plaga en laboratorio, priorizando en el hecho de que en los cafetales de donde provenía el material biológico no se hubiese aplicado medidas químicas de manejo. De esta forma, se recogieron frutos infestados de zonas rurales del departamento de Nariño, en fincas donde se produce café orgánico. Inicialmente, se mantuvo el insecto en granos de café, pero luego se desarrolló una dieta artificial que fue útil para estimar la actividad biológica de proteínas Cry. Se inició evaluando la actividad de las cepas de referencia de *Bt* sobre larvas de *H. hampei*. Posteriormente, se construyeron las proteínas recombinantes Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry4A, Cry9A y la proteína híbrida SN1917 para medir su actividad sobre larvas de primer instar de *H. hampei*. Las razones que llevaron a utilizar larvas neonatas incluyen la voracidad con que eclosionan, es el estadio en el cual los insectos-plaga son generalmente susceptibles a *Bt* (Martínez, 2004), su mayor disponibilidad debido a que constituyen la mayor población en la colonia del insecto y por ende necesitan menos gasto de materiales y tiempo de trabajo, el periodo del bioensayo es corto, la precisión es más alta debido a que su mortalidad es más uniforme y por tanto los límites de confianza son más pequeños (Navon, 2000).

Únicamente se identificó actividad letal de las proteínas recombinantes Cry1B y Cry3A. Las cepas de referencia de *Bt* obtuvieron resultados de mortalidad inferiores al 10% (mortalidad del 6% en el control de agua) presumiéndose interferencia con otros factores de la bacteria que afectaron la acción de las proteínas Cry1B y Cry3A, que de manera recombinante fueron activas, quizás por fenómenos de competencia homóloga y heteróloga ya que estas cepas contienen más de un gen *cry* (Haffani et al., 2001; Ben-Dov et al., 1995). La protoxina Cry1B tuvo un desempeño ligeramente mayor que su contraparte toxina activada y que las dos formas para la proteína Cry3A. Ninguna de las

otras toxinas Cry fue activa. Estas proteínas son letales hacia el orden Coleóptera (van Frankenhuyzen, 2009). En la estructura primaria de estas proteínas se observan varias regiones que se han caracterizado como importantes para la actividad toxica, y su similaridad entre ellas (Figura 5) (Soberón et al., 2009; Pigott y Ellar, 2007). El alineamiento presenta regiones conservadas. Cuando se observa zonas que han sido descritas como importantes en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1, se encuentra que sus contrapartes en la proteína Cry3A son similares en los tres dominios, más no es así al analizar la correspondencia en residuos de importancia toxica de Cry3A en el producto toxico del gen *cry1B*; si se examina las franjas de los loops del dominio II, que se han correlacionado con el reconocimiento del receptor, hay correspondencias. Al superponer las estructuras terciarias de ambas toxinas podemos observar que las principales diferencias estructurales se ubican en los loops del dominio II (Figura 6) (Schnepf et al., 1998). En este contexto, sería útil conocer el efecto de mutaciones en ambas toxinas teniendo como base estas observaciones. Teniendo en cuenta estos resultados cabe la pregunta **¿por qué las proteínas Cry de Bt, incluyendo aquellas toxicas hacia otros coleópteros, tienen una letalidad pequeña o ausente hacia las larvas de *H. hampei*?** La respuesta involucra probablemente la participación combinada de varios factores, que incluirían:

a. **Genética:** El insecto posee un ciclo de vida inusual que causa una endogamia elevada debido a que la descendencia está compuesta mayoritariamente por hembras. En esta investigación se encontró una proporción de 10:1, similar a otros reportes (Bustilo, 2006), así los machos permanecen en la cereza ya que no pueden volar y las hembras salen fertilizadas a buscar nuevos frutos (Bustillo, 2006). Asimismo, se debe considerar que el radio elevado de determinación sexual se debe al mecanismo de haplodiploidia funcional, donde los dos sexos son diploides, pero la expresión de los cromosomas derivados del padre en tejidos somáticos se ve interrumpida. Además, durante la espermatogénesis se produce la condensación de estos cromosomas en la profase, y quizás en la meiosis se genera una modificación en ellos, y por ende no se transmiten a la descendencia (Brun et al., 1995).

Cry1B M - - - - - TSNRKNENEI I - - - - - NAVSNHSAQMDL - - - - - LPDARIEDSLCI 36
 Cry3 MIRKGGGRKMNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRM 56
 Cry1B AEGNNIDPFVSAST - - - VQTGINIAGRILGVLGVPPFAGQLASFYSFLVGELWPRGR 89
 Cry3 TADNNTAALDSSTTKDVIQKGISVVGDLLGVGFPFGGALVSFYTNFLNTIWP - SE 111
 Cry1B DQWEIFLEHVEQLINQQITENARNTALARLQGLGDSFRAYQQSLEDWLENRDDAR - 144
 Cry3 DPWKAFMEQVEALMDQKIADYAKNKALAEALQGLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRN 167
 Cry1B - - TRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVP LLMVYAQAANLHLLLLRDASLFG 198
 Cry3 PHSQGRIRELFSQAESHFRNSMPSFAISGYEVFLTTAYAQAANTHLFLLKDAQIYG 223
 Cry1B SEFGLTSQEIQRYYERQVERTRDYSDYCVWEYNTGLNSLRGTNAASWVRYNQFRRD 254
 Cry3 EEWGYEKEDIAEFYKRQLKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRRE 279
 Cry1B LTLGVLDLVALFPSYDTRTYPINTSAQLTREVYTD AIGATGVNMASMNWYNNNAPS 310
 Cry3 MTLTVLDLIALFPLYDVRLYPKEVKTELTRDVLTDPI - - VGVN - - NLRGYGT - - - T 328
 Cry1B FSAIEAAAIRSPHLLDFLEQLIFSA - SSRWSNTRHMTYWRGHTIQSRP - IGGG - 362
 Cry3 FSNIEY - IRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYGND SFNYWSGNYVSTRPSTGSDT 383
 Cry1B LNTSTHGATNTSINPV - TLRFASRDVYRTESYAGVLLW - - GIYLEPIHGVPTVRFN 415
 Cry3 TTSPFFYG - - NKSSEPVQNLEFNGEKVYRAVANINLAVWPSAVY - - - SGVTKVEFS 433
 Cry1B FTNPQNI SDRGTANYSPYESPGLQLKDSETELPETTERPNYESYSHRLSHIGI 471
 Cry3 QYNDQT - DEASTQTYDSK - RNVGAVSWDSIDQLPETTDEPLEKGYSHQLNYVMCF 487
 Cry1B LQ - SRVNPVYSWTHRSADRTNIGPNRITQIPMVKASELPQGTTVVRGPGFTGG 525
 Cry3 LMQGSRGTIPVLTWTHKSDVDFNMIDSKKITQLPLVKAYKLQSGASVVAGPRFTGG 543
 Cry1B DILRRNTNGGFGPIRVTVNGPLTQRYRIGFRYASTVDFDFVSRGGTTVNNFRFLR 581
 Cry3 DIIQCTENGSAAT IYVTPDVSYSQKYRARIHASTSQITFTLSLDGAPFNQYYFDK 599
 Cry1B TMNSGDELKYGNFVRRRAFTTPTFTQIQDIIRTSIQGLSGNGEVYIDKIEIIPVTA 637
 Cry3 TINKGDLTYNSFNLSAFSTPFELSG - - NNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN - 652

Figura 5. Alineamiento de la estructura primaria de las proteínas Cry1B y Cry3A.

En negrilla se presentan los residuos conservados. Los cuadros azules encierran aminoácidos relacionados con la toxicidad en las proteínas Cry1 con su correspondencia en la toxina Cry1B. Los cuadros rojos denotan la contraparte para Cry3A (Soberón et al., 2009; Pigott y Ellar, 2007). Los cuadros morados y amarillos representan los loops de superficie del dominio II para los productos de codificación de los genes *cry1B* y *cry3A* respectivamente. La línea vertical anaranjada presenta los límites de los dominios para la toxina Cry1B, mientras que la verde indica lo mismo para la proteína Cry3A.

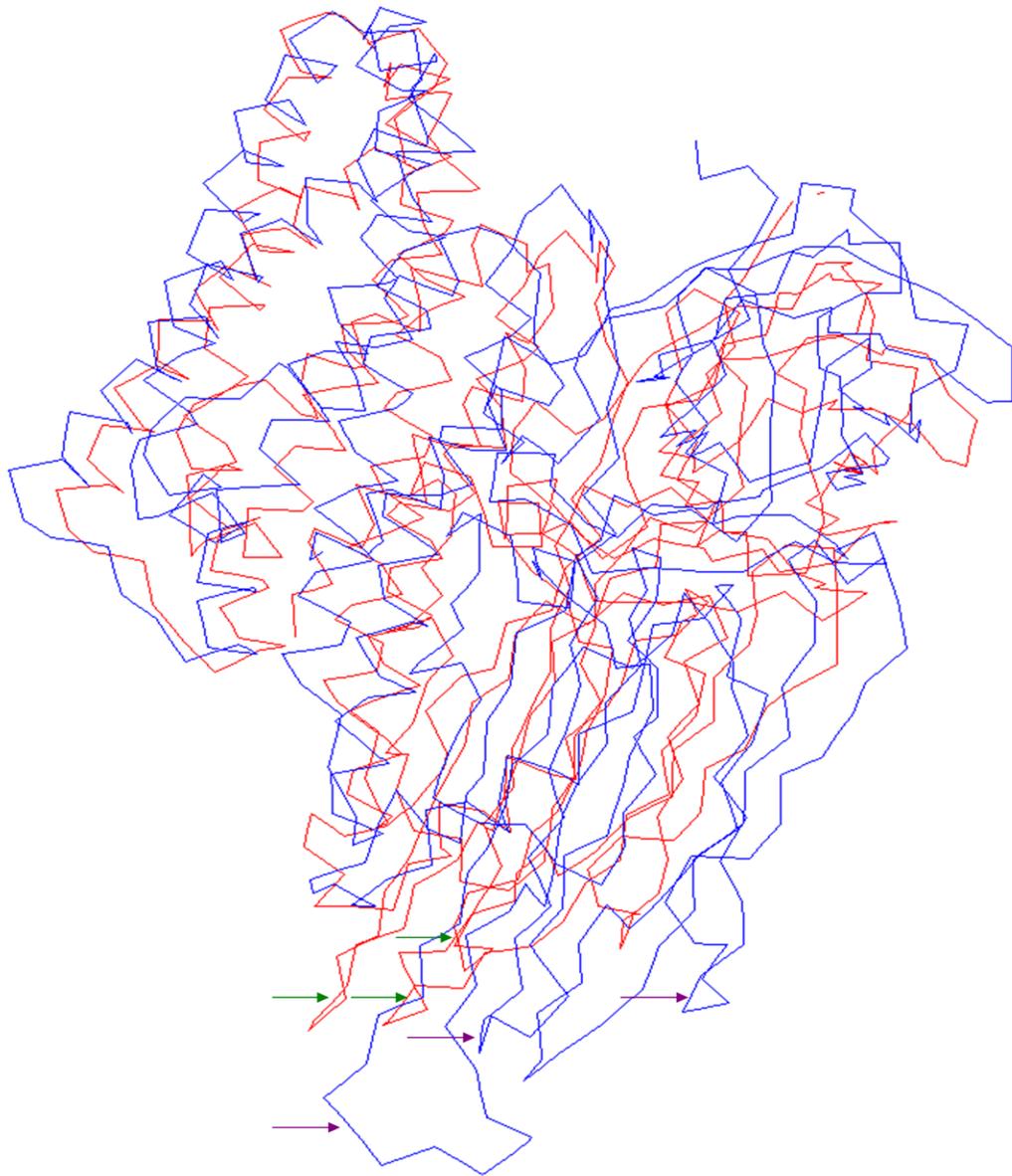


Figura 6. Estructuras tridimensionales superimpuestas de las proteínas Cry1B (azul) y Cry3A (rojo), en base al carbono α . Las flechas moradas y verdes indican los loops del dominio II para Cry1B y Cry3A respectivamente. La figura se construyo con el programa Deep View- Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997).

En este fenómeno se ha involucrado a la proteobacteria *Wolbachia*, debido a que se ha observado que la causa es citoplasmática. El microorganismo ejercería su efecto sobre los cromosomas removiendo selectivamente proteínas del hospedero que están involucradas en la condensación cromosomal, y en su descondensación, antes y después de la formación del cigoto (Vega et al., 2002). Así, la endogamia y la haplodiploidía funcional implican una variabilidad genética baja lo que llevaría a pensar que *H. hampei* sería incapaz de defenderse de estrategias de control biológico novedosas. El efecto más importante que está relacionado a la haplodiploidía funcional corresponde la eliminación de mutaciones que podrían colocar en riesgo su supervivencia, y el afianzamiento de aquellas que favorecen su reproducción y supervivencia lo cual tendría lugar en pocas generaciones debido a que la selección natural incrementaría la proporción de estos alelos en las generaciones posteriores, como se determinó en el caso de la resistencia a organoclorados (French-Constantino et al. 1994).

b. **Fisiología:** Se ha identificado que proteasas asociadas con las VMMA, en lugar que con el jugo intestinal, rompen la proteína Cry3Aa generando un fragmento de 38 kDa, evidenciando que ciertas proteasas actúan específicamente sobre las toxinas Cry y que se localizan en la membrana celular epitelial (Loseva et al., 2002). En cuanto a las proteasas identificadas en coleópteros se ha encontrado que el tipo predominante corresponden a las cisteíno-endopeptidasas (catepsina L, papaina, catepsina B, y catepsina H), que generalmente se combinan con aspartato-endopeptidasas (pepsina). Otra clase la constituyen serino-endopeptidasas (tripsina, quimiotripsina, catepsina G, trombina, plasmina y elastasa) con elevada actividad digestiva. También se ha encontrado metalo-endopeptidasas (sacarolisina), exopeptidasas (aminopeptidasas), y la omegapeptidasa acilaminoacilpeptidasa. En la mayoría de insectos el procesamiento proteolítico es llevado a cabo por serino-endopeptidasas, por lo que se considera que el pH ácido de los coleópteros puede estar involucrado en la diferencia en cuanto al tipo de proteasa predominante. La mayoría de proteínas Cry desarrollan su potencial tóxico bajo condiciones de pH alcalino en el intestino, pero la broca del café posee un pH

entre 4.5 y 5.2 (Valencia et al., 2000). Es posible que componentes de membrana afecten la conformación estructural de la proteína exponiendo al solvente los sitios de clivaje para la acción de la proteasa, por ejemplo la observación de bandas proteolíticas adicionales en el extracto intestinal de cepas resistentes de insectos ha llevado a postular que estos cambios se relacionen con dicha resistencia (Forcada et al., 1999). Las proteasas están involucradas en la respuesta innata en el intestino de insectos debido a la modulación y amplificación que ejercen en las cascadas de señalización lo cual conlleva a la activación de mecanismos específicos de defensa tales como el reconocimiento de patógenos, melanización, coagulación e inducción de péptidos antimicrobianos (Hoffmann et al., 1999; Barillas-Mury et al., 2000; Jiang y Kanost, 2000; Dimopoulos et al., 1997; Han et al., 2000). Se podría pensar que el perfil particular de proteasas en el intestino de la broca juega un papel determinante en su susceptibilidad a las proteínas Cry.

c. **APN:** Las aminopeptidasas constituyen un alto porcentaje de las proteínas de la membrana apical del intestino medio en insectos coleópteros (Cristofolletti y Terra 1999, 2000), se han visto implicadas en la degradación de péptidos terminales y eliminación de los aminoácidos, transducción de señales, clivaje de péptidos de señalización y modulación de sus actividades. En individuos resistentes se ha encontrado que su transcripción aumenta bajo la exposición a las toxinas Cry (Loseva et al., 2002). Aunque en intestinos de insectos se ha observado que las aminopeptidasas requieren un pH alcalino, mientras que bajo un pH ácido su actividad se ve disminuida, la presencia de compartimientos alcalinos harían posible niveles de actividad altos (Kaiser-Alexnat et al., 2009). En coleópteros se ha identificado concentración elevada de aminopeptidasas con actividad incrementada, lo que llevaría a pensar que en este orden de insectos estas moléculas no sirven como receptores de las proteínas Cry, a diferencia de lo que se ha descrito en lepidópteros (Loseva et al., 2002).

También se ha postulado que la resistencia se puede deber a:

- Caída en la afinidad de las toxinas hacia el receptor (Bravo y Soberón, 2008).
- Reducción de sitios de unión para la molécula toxica en el receptor (Bravo y Soberón, 2008).
- Disminución en el número de receptores (Bravo y Soberón, 2008).
- Unión débil en el complejo toxina-receptor (Bravo y Soberón, 2008).
- Excreción aumentada de las moléculas Cry (Bravo y Soberón, 2008).
- Alteraciones en los sitios de reconocimiento en el receptor (Bravo y Soberón, 2008).
- Respuesta inmune elevada, con producción de procoagulantes (tipo hexamerina o lioporina) que forman agregados sobre las proteínas Cry, y actividad esterasa con probable secuestro de las mismas toxinas (Bravo y Soberón, 2008).
- El papel que juega la microbiota asociada al intestino del insecto, ya que se ha asociado una carga bacteriana elevada (determinada en huevos e intestino) a un estado inmune activo en el invertebrado, y cuya transmisión esta ligada maternalmente, a una tolerancia mayor a *Bt* (Hernández-Martínez et al., 2010).

Con estos argumentos podemos considerar un proceso particular para las toxinas Cry en la broca del café, donde uno o más factores pueden influir. Entonces **¿Cómo utilizar la tecnología de proteínas Cry para el control biológico de larvas de *H. hampei*?**

Los modelos que se han propuesto para describir el mecanismo de acción de las proteínas Cry involucran como paso clave el reconocimiento del receptor CADR. Según nuestros datos, aparentemente las proteínas Cry no reconocen este tipo de receptor en el intestino de larvas de *H. hampei*, ya sea porque carece de este, o en este insecto se presenta una isoforma de menor peso molecular que quizás no tiene, o disponga de una versión diferente de una región crucial para la interacción proteína Cry-receptor (por ejemplo la repetición CR12) que se ha ubicado en la región proximal al sitio de inserción en la membrana celular (Fabrick et al., 2009). Se ha descrito que la utilización de un fragmento del receptor CADR correspondiente a CR12 (repetición CR8 a CR10) de *D. virgifera virgifera* aumentó la actividad toxica de las proteínas Cry3Aa y Cry3Bb

para los coleópteros *L. decemlineata*, *D. undecimpunctata howardi*, y *D. virgifera virgifera*, entre ~ 2 a 13 veces (Park et al., 2009). La identificación del receptor CADR en *T. molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae) llevó a comprender que la región proximal CR9-11, similar a CR8-10, es importante en el reconocimiento de la proteína Cry (Fabrick et al., 2009). En otros estudios se encontró que la delección de la hélice α -1 de toxinas Cry1 (CryMod) generó estructuras oligoméricas, y por ende efectuar su capacidad lítica, sin el previo reconocimiento del receptor CADR, en insectos resistentes a este tipo de proteínas (Soberón et al., 2009).

Según los dos modelos propuestos, las proteínas Cry1B y Cry3A reconocerían un receptor CADR en larvas de *H. hampei*. Los análisis de interacción llevan a pensar que probablemente esta CADR es una isoforma de menor masa molecular a otras que se han descrito previamente (Fabrick et al., 2009), y quizás el reconocimiento de este receptor sea de baja afinidad, o en una tasa de tiempo menor, probablemente por diferencias en los residuos de la región proximal al sitio de inserción en la membrana celular de la CADR o a las condiciones de pH intestinal (ácido). En este sentido, estas toxinas Cry solo podrían realizar su actividad tóxica en aquellos compartimientos del intestino medio con un pH alcalino que les permitiese interactuar con receptores de la membrana apical intestinal (APN o ALP). Es posible que exista interacción con el receptor ADAM metaloproteasa bajo pH ácido, ya que se ha descrito que esta clase de proteínas (tipo ADAM10) tienen actividad prolyl-endopeptidasa a pH 6.5 (Carty et al., 1999). La mayor actividad de la protoxina Cry1B se debería a que bajo esta forma sería más resistente al ataque de proteasas intestinales, lo que llevaría a que una mayor concentración de esta alcanzaría sitios alcalinos para su interacción con proteínas tipo receptor de superficie. El hecho de que dosis altas de toxina Cry no aumenten significativamente la mortalidad puede ser causado por una saturación de los receptores, dado que aquellos que podrían interactuar están limitados por las condiciones de pH, o que factores genéticos asociados a resistencia en *H. hampei* entren en juego debido al estímulo tóxico. Así la toxina sobrante sería excretada o degradada. Estos planteamientos se presentan en la Figura 7.

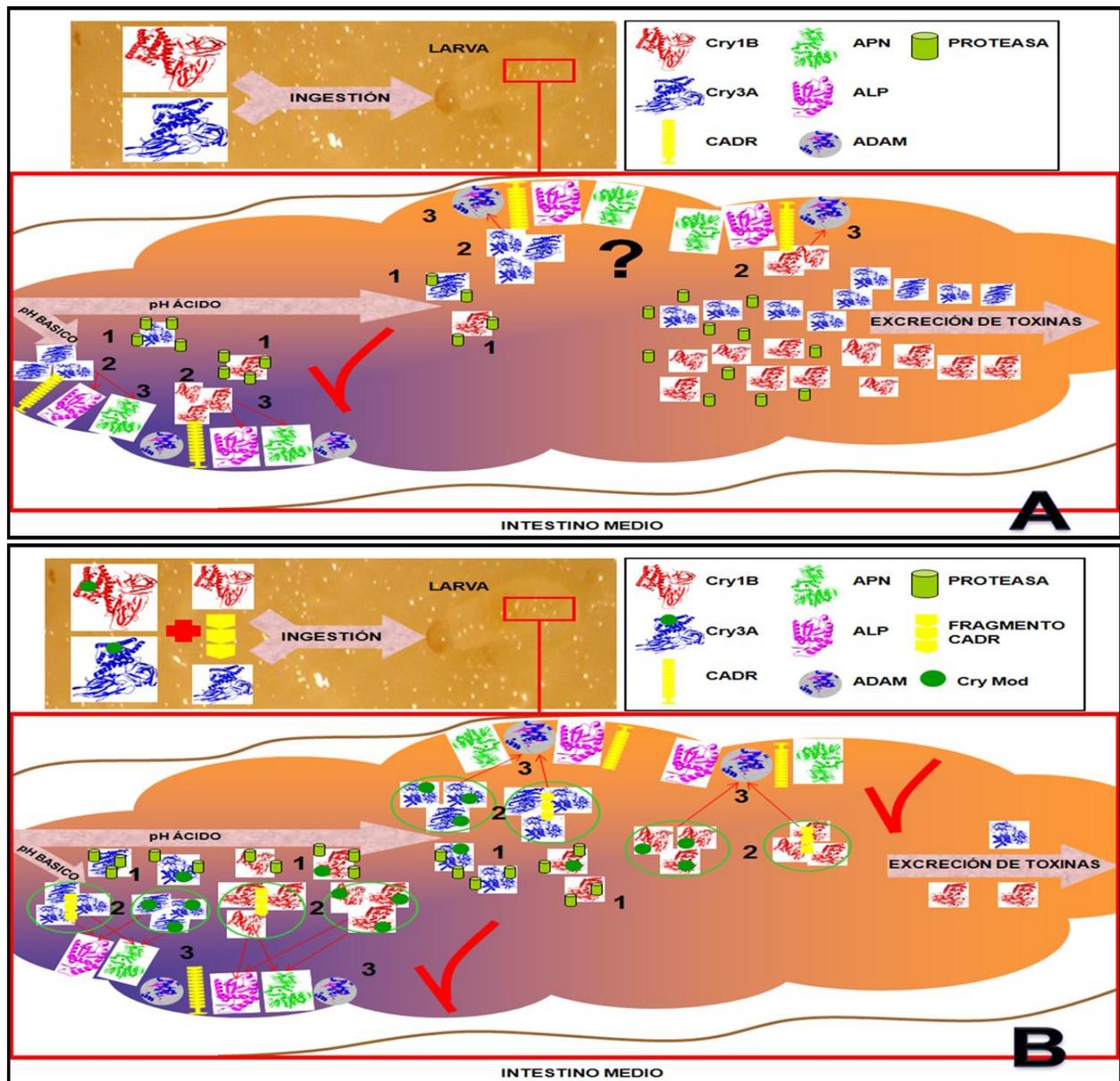


Figura 7. La toxinas Cry en *H. hampei*. A. Probable mecanismo de la proteína Cry según los resultados de este trabajo. La toxina ingerida llega al intestino medio (abajo) de pH ácido (naranja), con compartimientos básicos (azul). A pH básico la proteína Cry sería activada por proteasas (1), reconocería a CADR y quizás oligomeriza (2), interactuando con ALP, y talves APN (3); en áidez la interacción Cry-CADR, con la subsecuente oligomerización, es menos probable y la toxina sufriría el ataque de proteasas, así la mayor parte se excretaría. B. Alternativas de perfeccionamiento de la actividad de la proteína Cry. La larva ingiere proteínas CryMod, o un fragmento de CADR con la proteína Cry estándar, y estas alcanzan compartimientos básicos formando oligómeros resistentes al ataque proteolítico (2) post-activación por proteasas intestinales (o quizás por activación pre-ingestión) (1) logrando interactuar con ALP, y quizás con APN (3); en la región ácida sucedería igual comportamiento, pero los oligómeros interactuarían con receptores tipo ADAM metaloproteasa. La concentración de toxina no eficiente y excretada sería mucho menor. Los símbolos “V” rojos indican actividad biológica positiva, el signo “?” significa que no es claro si existe algún tipo de interacción biológica. Figuras de receptores se diseñaron con el programa Deep View- Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997).

La evidencia de esta investigación apunta a dificultades con el reconocimiento del receptor CADR y la formación de oligómeros que reconozcan proteínas de membrana, lo cual se encuentra de acuerdo con lo propuesto por el modelo de Bravo (Pigott y Ellar, 2009). Sería interesante utilizar las estrategias que coadyuvan con la actividad de las proteínas Cry, ya sea empleando fragmentos del receptor CADR de la región proximal al sitio de inserción en la membrana celular o generando toxinas CryMod (Figura 7) capaces de formar oligómeros que interactúen con receptores de membrana, probablemente con la proteína tipo ADAM metaloproteasa que requiere un pH ácido para su actividad prolyl-endopeptidasa (Carty et al., 1999) y con ALP cuyo pH óptimo es alcalino, a diferencia de APN. Actualmente se trabaja en el genoma de la broca del café (Ministerio de Agricultura de Colombia, 2008), lo cual puede ayudar a conocer los mecanismos hereditarios de mutaciones paternas y maternas y la identificación de genes deletéreos asociados con resistencia a insecticidas. Esto unido al diseño de mejores toxinas Cry, por medio de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida o de intercambio de dominios, y la identificación de nuevas toxinas anticoleópteras en otros organismos, podría repercutir en una estrategia efectiva de control biológico de este coleóptero aplicando la tecnología basada en *Bt*.

Méndez-López et al. (2003) evaluaron varias cepas de *Bt* para controlar larvas de primer instar de la broca del café. La investigación inicia con la valoración de la toxicidad de cepas nativas de *Bt* sobre larvas de primer instar de *H. hampei*, encontrando 32 cepas que producían mortalidades entre 90 a 100%, con una dosis de 2 mg/ml de suspensión espora-cristal dispensada en la superficie de una dieta artificial. Posteriormente, los autores evaluaron 37 cepas, incluyendo aquellas de actividad insecticida identificadas en el primer bioensayo, a una dosis de 100 µg del complejo espora-cristal/cm² de dieta, obteniendo 18 cepas serotipo *israelensis* con alta toxicidad (la mayoría causaron más de 90% de mortalidad). Acto seguido, se realizan bioensayos con cepas de referencia del Instituto Pasteur, donde se encuentra que las cepas tipo *israelensis* (alberga los genes *cry4*, *cry10* y *cry11*), *thompsoni* (contiene el gen *cry15*) y *morrisoni* PG-14 (posee el gen *cry1K*) causaron mortalidades superiores al 90% (el

contenido de genes *cry* se describe según el catalogo del *Bacillus* Genetic Stock Center-<http://www.bgsc.org/>). Finalmente, los cristales de IPS-82 (cepa de *Bt* serotipo *israelensis* distribuida por el Instituto Pasteur) produjeron una letalidad elevada hacia larvas de la broca del café, donde los autores del artículo de investigación determinaron una CL50 de 219 ng/cm² de dieta.

Este trabajo aporta nuevas alternativas a los hallazgos descritos por Mendez-López et al. (2003), ya que la estrategia que aquí se utilizó permitió evaluar el efecto de toxinas Cry recombinantes sobre *H. hampei*:

- Mendez-López et al. (2003) utilizaron altas dosis para las cepas nativas (2 mg de complejo espora-cristal/ml de dieta) y cepas de referencia (100 µg complejo espora-cristal/cm² de dieta). En la presente investigación se manejaron dosis menores para las cepas de referencia de *Bt* (hasta 10000 ng extracto proteico-proteína recombinante/cm² de dieta).
- Para los bioensayos con cepas nativas y de referencia Mendez-López et al. (2003) utilizaron mezcla de esporas y cristales, por lo que no es posible determinar si fue alguna proteína Cry, u otro factor toxico de la bacteria (proteasas, quitinasas, proteínas de la fase vegetativa o proteínas Cyt), la causa del efecto insecticida. En esta investigación se utilizó proteínas Cry recombinantes con lo que se asegura que el efecto biológico observado es principalmente causado por estas.
- Méndez-López et al. (2003) no reportan la forma en que cuantificaron la proteína presente en los complejos espora-cristal y los cristales purificados. El uso de diferentes métodos para la cuantificación de toxina en preparaciones de pureza variable exacerba el problema de la comparación de mortalidades, ya que su agudeza depende de la pureza de la muestra. En preparaciones no purificadas el contenido de toxina varía entre 20 a 90%, y puede diferir hasta en un 50% en las muestras que son purificadas (van Frankenhuyzen, 2009). En esta investigación se utilizó el método de Lowry et al. (1951) el cual ha sido utilizado ampliamente

para este tipo de estudios, que junto al empleo de proteínas recombinantes purificadas, permite asegurar una adecuada evaluación de la actividad biológica.

- Los cristales purificados de la cepa IPS-82 (tipo *israelensis* distribuida por el Instituto Pasteur análoga al tipo de referencia) alcanzaron una CL50 importante (Méndez-López et al., 2003). A las dosis utilizadas en la presente investigación, el extracto proteico de la cepa de referencia *Bt israelensis* (proveniente del *Bacillus* Genetic Stock Center) no causo ningún efecto letal sobre *H. hampei*. La marcada diferencia entre los dos resultados podría explicarse mediante el fenómeno de la “domesticación” donde una bacteria bajo condiciones de laboratorio tienden a perder sus atributos multicelulares. Se ha observado que pequeñas variaciones en la composición del medio, temperaturas de incubación o contenido de agar puede tener profundos efectos en las morfologías de las colonias y en la producción de compuestos inherentes al grupo bacteriano, p. ej. *B. subtilis* sufre mutaciones en los promotores de genes reguladores involucrados en la producción de ácido poli- γ -DL-glutámico (un exopolimero necesario en la morfología colonial) donde se ha visto implicado el factor Spo0A que activa la transcripción del gen *sinI* cuyo producto de codificación se cree que afecta directamente la producción de los agentes necesarios en la producción de este exopolisacarido (Aguilar et al., 2007). En este sentido, la manipulación constante en el laboratorio de las cepas de referencia de *Bt*, y en concreto de *Bt israelensis*, podría llevar a un fenómeno de mutaciones en promotores, análogamente a lo que ocurre en *B. subtilis*, con un papel importante de Spo0A, SpoIIID o factores parecidos que se encuentran relacionados con la transcripción de genes *cry* dependientes de la esporulación (como los que posee el serotipo *israelensis*) afectando los niveles de producción de las toxinas.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se recurrió a la tecnología del DNA recombinante para desarrollar proteínas Cry de actividad anticoleóptera, utilizando genes estándar provenientes de cepas de referencia de *Bt*. Este conjunto de técnicas fue adecuado para lograr toxinas recombinantes funcionales.
2. Se desarrollo un método de cría y una dieta artificial capaz de soportar la sobrevivencia de la plaga, lo cual sirvió para mantener la disponibilidad constante del material biológico necesario para las pruebas de interacción *Bt-H. hampei* y asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados.
3. Es la primera vez que se identifica actividad biológica de las proteínas Cry1B y Cry3A sobre larvas de primer instar de la broca del café. Se encontró que otras toxinas (Cry1I, Cry4, Cry9 y el híbrido SN1917) no poseen actividad sobre la plaga. El análisis de interacción entre las toxinas Cry y las VMMA del insecto indica que Cry1I, Cry1B y Cry3A reconocen probables receptores.
4. Los resultados obtenidos por bioinformática permiten pensar en una diversidad de proteínas anticoleópteras que podrían evaluarse en el control de la broca del café, u otros insectos del orden.
5. La información experimental, contrastada con los datos teóricos y la bibliografía existente, permite un esbozo preliminar del posible mecanismo biológico de las proteínas Cry en este insecto. Esto lleva a forjar prospectos que lleven a mejorar la tecnología *Bt* con la finalidad de que pueda servir para la implementación de un esquema de control biológico basado en toxinas Cry, que pueda coadyuvar a los programas de MIP de esta plaga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current opinion in Microbiology*. 10: 638-643.
2. Andreev D., Breilid H., Kirkendall L., Brun L., ffrench-Constant R. 1998. Lack of nucleotide variability in a beetle pest with extreme inbreeding. *Insect Molecular Biology*. 7: 197-200.
3. Aronson, A.I., and Y. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 195: 1-8.
4. Arrieta G, Hernández A, Espinoza AM. 2004. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Rev. Biol. Trop.* 52:757-764.
5. Bale J. S., van Lenteren J. C. Bigler F. 2008. Biological control and sustainable food production. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 363: 761–776.
6. Barillas-Mury C., Wizel B., Han Y.S. 2000. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 429–442.
7. Ben-Dov E., Boussiba S., Zaritsky A. 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *Journal of Bacteriology*. 177: 2851–2857.
8. Benavides, M., Portilla, M. 1991. Uso del café pergamino para la cría de *Hypothenemus hampei* y de sus parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* en Colombia. *Cenicafe*. 41: 114-116.
9. Bravo, A. 1997. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793–2801.
10. Bravo, A. 2004. Mecanismo de acción de las proteínas bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.
11. Bravo A., Gill S.S., Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49: 423-435.
12. Bravo A, Soberón M. 2008. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? *Trends Biotechnol.* 26: 573-579.
13. Brun L. O. Stuart J. Gaudichon V. Aronstein K. Ffrench-Constant R. H. 1995. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 9861-9865.
14. Bustillo A.E. 2006. Una revisión sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en Colombia. *Rev. Col. Entomol.* 32: 101-116.
15. Cadena G. 2007. Resumen del informe anual de actividades. *Cenicafe*. P. 24-25. <http://www.cenicafe.org/modules/News/documents/resumenejecutivo2006-2007.pdf>
16. Camilo J. E., Olivares F.F. y Jiménez H.A. 2003. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. *Agronomía Mesoamericana*. 14: 59-63.

17. Capel J.C., Pérez J. 2010. Café, placer y salud. En: Café y estilo de vida saludable. Edimsa eds. Centro de Información Café y salud (CICAS). P.P. 15-30.
18. Carroll J., Convents D., Van Damm J., Boets A., Van Rie J., Ellar D.J. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity, *J. Invertebr. Pathol.* 70: 41- 49.
19. Carty T. J., LoPresti-Morrow L. L., Mitchell P. G., McNiff P. A., McClure K. F. 1999. New Insights into Disintegrin Metalloproteases. *Inflamm. res.* 48: 229–231.
20. Castillo A., Infante F., Barrera J., Carta L., Vega F. 2002. First field report of a nematode (Tylenchida: Sphaerularioidea) attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 199–202.
21. Castle L. A., Wu G., McElroy D. 2006. Agricultural input traits: past, present and future. *Current Opinion in Biotechnology.* 17: 105–112.
22. Cerón, J. 2004. Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 123-147.
23. Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.
24. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum. and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
25. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. and Dean, D.H. Abril 12 de 2010. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
26. Cristofolletti P.T., Terra W.R. 1999. Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 807–819.
27. Cristofolletti P.T. Terra W.R. 2000. The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1479: 185–195.
28. Dale J. W., von Schantz M. 2002. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. John Wiley & Sons, Ltd. West sussex, England. P. 21-98.
29. Damon A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull. Entomol. Res.* 90:453-465.
30. De Guglielmo-Cróquer Z., Altosaar I., Zaidi M., Menéndez-Yuffá A. 2010. Transformation of coffee (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) with the *cry1Ac* gene by biolistic, without the use of markers. *Braz J Biol.* 70: 387-393.
31. deMaagd R. A., Kwa M. S. G., van der Klei H., Yamamoto T., Schipper B., Vlak J. M., et al. 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537–1543.

32. Díaz, P.A., Gómez, Y.A., De Polania I.Z. y Vargas, A. 2003. Evaluación de una cepa nativa de *Fusarium sp.* para el manejo de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 29: 71-76.
33. Dimopoulos G., Richman A., Muller H., Kafatos, F.C. 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 11508–11513.
34. Dumanski J., Peiretti R., Benetis J., McGarry D., Pieri C. 2006. The paradigm of conservation tillage. *Proc. World Assoc. Soil and Water Conserv.*, P1: 58-64.
35. Duque-Orrego H., Marquez-Q A., Hernandez-S M. 2002. Estudio de caso sobrecostos de manejo integrado de la broca del café en el departamento del Risaralda. *Cenicafé*. 53: 106-118.
36. Environmental Protection Agency, EPA. 2002. Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) Inspection Manual. Chapter Two: Pesticide Law and Definitions. P. 22.
37. Etienne H., Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P., Bertrand B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica L.*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 38: 129-138.
38. Fabrick J., Oppert C., Lorenzen M.D., Morris K., Oppert B., Jurat-Fuentes J.L. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284: 18401-18410.
39. Fernández S., Cordero J. 2007. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en condiciones de laboratorio. *Bioagro*. 19: 35-40.
40. Forcada C., Alcacer E., Garcera M.D., Tato A., Martínez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42: 51–63.
41. French-Constant R.H., Steichen J.C., Brun L. 1994. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull. Entom. Res.* 84: 011-016.
42. Gama F.de C., Teixeira C.A., Garcia A., Costa J.N., Lima D.K. 2006. Diversity of filamentous fungi associated with *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) and its galleries in berries of *Coffea canephora* (Pierre). *Neotrop. Entomol.* 35:573-578.
43. Guo S., Ye S., Liu Y., Wei L., Xue J., Wu H., Song F., Zhang J., Wu X., Huang D., Rao Z. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168: 259-266.
44. Guex N., Peitsch M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18: 2714-2723. <http://spdbv.vital-it.ch/>
45. Haffani Y.Z., Cloutier C., Belzile F.J. 2001. *Bacillus thuringiensis* cry3Ca1 protein is toxic to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biotechnol. Prog.* 17:211-216.

46. Hajek A. E., McManus M. L., Delalibera Júnior I. 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* 41: 1–13.
47. Han Y. S., Thompson J., Kafatos F.C., Barillas-Mury C. 2000. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J.* 19: 6030–6040.
48. He, M. and Kaderbhai, M. 1990. A simple single-step procedure for small scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.* 18: 1660.
49. Hernández-Martínez, P., Naseri B., Navarro-Cerrillo G., Escrache B., Ferré J., Herrero S. 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Microbiology. In press.*
50. Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A., Ezekowitz R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284: 1313–1317.
51. Jaramillo J., Chabi-Olaye A., Kamonjo C., Jaramillo A., Vega F.E., Poehling H.M., Borgemeister C. 2009. Thermal tolerance of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*: predictions of climate change impact on a tropical insect pest. *PLoS One.* 4: e6487.
52. Jaramillo J., Chapman E.G., Vega F.E., Harwood J.D. 2010. Molecular diagnosis of a previously unreported predator-prey association in coffee: *Karnyothrips flavipes* Jones (Thysanoptera: Phlaeothripidae) predation on the coffee berry borer. *Naturwissenschaften.* 97(3):291-298.
53. Jiang H., Kanost M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 95–105.
54. Kaiser-Alexnat R. 2009. Protease activities in the midgut of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *J. Invertebr. Pathol.* 100: 169–174.
55. Krattiger A. F. 1997. Insect Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries. ISAAA Briefs No. 2. Ithaca, New York: International Service for the Acquisition of Agrobiotech Applications. P. 42.
56. Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K., Vail P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control.* 21: 230–248.
57. López-Pazos y Cerón. 2007. Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: a review. *Acta Biol. Colomb.* 12: 19-32.
58. López-Pazos S.A., Cortázar J.E., Cerón J.A. 2009. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). *J Invertebr Pathol* 101: 242-245
59. Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, M.A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
60. Loseva O., Ibrahim M., Candas M., Koller C. N., Bauer L. S., Bulla Jr L. 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 567–577.

61. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2004. Brock "Biología de los microorganismos". Prentice Hall, Madrid, 10. Edición. P. 986-1011.
62. Martínez, W. 2004. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 207-232.
63. Martins E.S., Monnerat R.G., Queiroz P.R., Dumas V.F., Braz S.V., de Souza Aguiar R.W., Gomes A.C., Sánchez J., Bravo A., Ribeiro B.M. 2010. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 40: 138-145.
64. Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R., Ibarra, J.E. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters.* 226: 73-77
65. Michaud D., Bernier-Vornais N., Overney S., Yelle S. 1995. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25: 1041-1048.
66. Ministerio de Agricultura de Colombia, 2008. Experiencias en la inversión en ciencia y tecnología en el sector agropecuario Colombiano, estrategias y resultados alcanzados. Memorias. www.minagricultura.gov.co.
67. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., Bender D. A., Botham K. M., Davis J. C., Keeley F. W., Kennelly P. J., Rand M. L., Weil P. A. 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America. P.p. 396-414.
68. Naimov S., Dukiandjiev S., de Maagd R.A. 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant. Biotechnol. J.* 1:51-57.
69. Navon, A. 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests. CAB International. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (eds. A. Navon and K.R.S. Ascher). pp. 1-24.
70. Observatorio Agrocadenas Colombia. 2005. La cadena del café en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica (1991-2005). Bogotá D.C. (Colombia). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Documento de trabajo No. 59. 28 p.4-5. Recurso en línea: <http://www.agrocadenas.gov.co>
71. Ochoa-Campuzano C., Real M.D., Martínez-Ramírez A.C., Bravo A., Rausell C. 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 362: 437-442.
72. Oerke E.-C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science.* 144: 31-43.
73. Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor.* 1-25.
74. Pardo-López L., Muñoz-Garay C., Porta H., Rodríguez-Almazán C., Soberón M., Bravo A. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides.* 30: 589-595.

75. Park Y., Abdullah M. A., Taylor M. D., Rahman K., Adang M.J. 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb Toxicities to Coleopteran Larvae by a Toxin-Binding Fragment of an Insect Cadherin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3086-3092.
76. Pava-Ripoll M., Posada F.J., Momen B., Wang C., St Leger R. 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 220-226.
77. Pigott C.R., Ellar D.J. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255–281.
78. Porcar, M. y V. Juárez-Pérez. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.
79. Portilla M. 2000. Development and evaluation of new artificial diet for mass rearing *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Colombiana de Entomología.* 26: 31-37.
80. Potter D.A., Powell A.J., Spicer P.G. et al. 1996. Cultural practices affect root-feeding white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* 89:156–164.
81. Primack R. 1995. A primer of conservation biology. Sinauer- Sunderland. USA, 277 pp.
82. Ramírez R., 2009. La broca del café en Líbano. Impacto socioproductivo y cultural en los años 90. *Revista de Estudios Sociales.* 32: 158-171.
83. Rausell C., García-Robles I., Sánchez J., Muñoz-Garay C., Martínez-Ramírez A.C., Real M.D., Bravo A. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochimica et Biophysica Acta.* 1660: 99– 105.
84. Rehner S.A., Posada F., Buckley E.P., Infante F., Castillo A., Vega F.E. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 93:11-21.
85. Romero J. V., Cortina H. A. 2007. Tablas de vida de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) sobre tres introducciones de café. *Rev. Col. Entomol.* 33: 10-16.
86. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 547–559.
87. Salazar G., M.; Arcila R, J.; Riano H., N.; Bustillo P., A. E. 1993. Crecimiento y desarrollo del fruto de café y su relación con la broca. Chinchina (Colombia). *Avances Técnicos Cenicafe* No. 194. Cenicafe.
88. Sanchis V., Bourguet D. 2009. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management-a review. In *Sustainable Agriculture*. Lichtfouse et al. (eds.). Pp. 243-255.

89. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
90. Soberón M., Gill S.S., Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1337-1349.
91. Valencia A., Bustillo A. E., Ossa G.E., Chrispeels M. J. 2000. Alfa-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 207–213.
92. Valencia-Jiménez A., Arboleda Valencia J. W., Grossi-De-Sá M. F. 2008. Activity of alpha-amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive alpha-amylases of the coffee berry borer. *J. Agric. Food. Chem.* 56: 2315-2320.
93. van Frankenhuyzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 101: 1-16.
94. Vega F. Benavides P. Stuart J. J. O'neil S. 2002. *Wolbachia* infection in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Annals Entomological Society of America.* 95: 374-378.
95. Vélez P., Benavides M. 1990. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuyá, departamento de Nariño. *Cenicafé* 41: 50-58.
96. Villacorta, A., Barrera, J. 1995. Dieta verídica para criação de sucesivas gerações de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *An. Soc. Entomol. (Brasil)* 14: 316-319.
97. Walters F.S., Stacy C.M., Lee M.K., Palekar N., Chen J.S. 2008. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against Western corn rootworm larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 367-374.
98. Yan G., Song F., Shu C., Liu J., Liu C., Huang D., Feng S., Zhang J. 2009. An engineered *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against Scarabaeidae (*Anomala corpulenta*) and Chrysomelidae (*Leptinotarsa decemlineata* and *Colaphellus bowringi*). *Biotechnol. Lett.* 31: 697-703.
99. Zhongkang W., Wei H., Guoxiong P., Yuxian X., Qiang L., Youping Y. 2008. Transformation and expression of specific insecticide gene *Bt cry3A* in resident endogenous bacteria isolated from *Apriona germari* (Hope) larvae intestines. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 48: 1168-1174.