

DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *Bacillus sphaericus* PATÓGENOS Y NO PATÓGENOS PARA LARVAS DE MOSQUITOS POR AMPLIFICACIÓN AZAROSA DEL ADN

DIFERENTIATION OF MOSQUITO-PATOGENIC AND NONPATHOGENIC COLOMBIAN STRAINS OF *Bacillus sphaericus* BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

Lucía Cristina Lozano¹ y Jenny Dussán²

Resumen

Se utilizó la técnica de RAPD para estudiar en el ámbito genético aislamientos colombianos de *Bacillus sphaericus*, de los cuales 19 eran cepas nativas patógenas para larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* y 37 no patógenas para dichas larvas. Se encontró que las primeras presentaron patrones de amplificación similares con bandas únicas que permitirían diferenciarlas de los aislamientos sin actividad larvicida, como son la de 1.800 pares de bases (pb) con OPA-08 y la de 691pb con OPA-17. En el fenograma se observaron dos grupos independientes con disimilitud mayor al 90%, a uno de los cuales pertenecen de las cepas toxigénicas, que presentaron gran similitud entre sí, y en el otro se encuentran las no patógenas, que es un grupo heterogéneo con similitudes que varían entre 15 y 85%.

Palabras clave: *Bacillus sphaericus*, RAPD, diversidad genética.

Abstract

RAPD was used to study genetically Colombian strains of *Bacillus sphaericus*, of which 19 were native stocks pathogenic to the larvae of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, and 37 were non-pathogenic to these larvae. The band patterns were similar among the former, which could be differentiated from the strains with no larvacide activity by the 1.800 base pair (bp) band obtained with OPA-08 and the band of 691 bp with OPA-17. The phenogram showed two independent groups with more than 90% dissimilarity, one of which is formed by the genetically similar mosquito-pathogenic strains, and the other comprised of the nonpathogenic strains as a heterogenic group with levels of similarity which varied between 15 and 85%.

Key words: *Bacillus sphaericus*, RAPD, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Bacillus sphaericus es una bacteria utilizada para el control biológico de mosquitos, como *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* y en menor proporción de *Anopheles* spp. debido a que sus toxinas son altamente específicas, posee bajo impacto ambiental y presenta persistencia mayor frente a otros productos biológicos y a los químicos (Baumann *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1993; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2001). Esta especie comprende

cepas patógenas y no patógenas para larvas de mosquitos; las primeras se han clasificado según su actividad larvicida en alta y baja toxicidad, las altamente tóxicas presentan una concentración letal 50 (CL₅₀) entre 10² y 10³ células por mililitro, mientras que en las cepas con menor toxicidad la CL₅₀ está en un título de 10⁵ células por mililitro (Liu *et al.*, 1996).

B. sphaericus metaboliza una variedad de ácidos orgánicos y aminoácidos, pero no utiliza azúca-

Recibido: agosto de 2002; aprobado para publicación: septiembre de 2002.

¹ Investigadora asociada, Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC), Universidad de los Andes, Bogotá. E-mail: lulozano@uniandes.edu.co.

² Directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC), Universidad de los Andes, Bogotá. E-mail: jdussan@uniandes.edu.co.

res simples como fuente de carbono, dando resultados negativos en la mayoría de características bioquímicas utilizadas para la clasificación del género *Bacillus* (Alexander y Priest, 1990; Priest, 1992; Priest *et al.*, 1994; Woodburn *et al.*, 1995); además presenta una gran diversidad entre sus aislamientos, que se ha demostrado con diferentes métodos como electroforesis de enzimas multilocus (Zahner *et al.*, 1994), fagotipificación, serotipificación, hibridización de ADN y otros (Baumann *et al.*, 1991; Woodburn *et al.*, 1995). Las cepas de *B. sphaericus* se han distribuido en cinco grupos de homología, los cuales presentan una hibridización del ADN bastante baja como para clasificarlos en especies diferentes (Priest, 1992), pero el grupo II se subdivide en IIA y IIB con una homología de 60 a 66% entre éstos, lo que sólo permitiría clasificarlos en subespecies diferentes; en el subgrupo IIA se encuentran todas las cepas patógenas para larvas de mosquitos, mientras que el subgrupo IIB está conformado por cepas no tóxicas (Priest, 1992; Woodburn *et al.*, 1995) y se ha propuesto denominarlo *Bacillus fusiformis* (Priest *et al.*, 1994).

La técnica de RAPD (amplificación azarosa de ADN polimórfico) es un método basado en el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero se reduce la astringencia al paso del anillaje del cebador, para que un oligonucleótido corto (al cual no se le conoce la homología con el genoma) se una en secuencias donde el apareamiento de bases puede ser imperfecto. Algunos de estos apareamientos se encuentran en cadenas contrarias y a una cierta distancia que permite que regiones no conocidas del ADN se amplifiquen dando un patrón de bandeo característico (Johansson *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1990).

En el género *Bacillus* la técnica de RAPD se ha utilizado para subtipificar *Bacillus licheniformis* (Stephan *et al.*, 1994), tipificar *Bacillus cereus* (Nilsson *et al.*, 1998), diferenciar entre *B. cereus* y productos comerciales de *Bacillus thuringiensis* (Brousseau *et al.*, 1993) y para determinar la relación genética entre cepas de *B. sphaericus* (Woodburn *et al.*, 1995; Miteva *et al.*, 1999).

Debido a la importancia de *B. sphaericus* en el control biológico de vectores de enfermedades tropicales con incidencia en Colombia, como lo son el dengue y la malaria, es importante desarrollar metodologías que permitan un análisis rápido de los aislamientos, ya que menos de 1% de las colonias que se obtienen en las muestras de suelos o insectos presentan actividad larvicida y para determinararlo es necesario realizar bioensayos que demoran más de tres días (Priest *et al.*, 1994). Por tanto, el desarrollo de una técnica molecular permitiría reducir el número de bioensayos a aquellos aislamientos con potencial biocontrolador. También es de interés determinar la relación genética entre las cepas nativas con actividad larvicida y sin ella, ya que se ha reportado que los aislamientos patógenos forman un grupo independiente de los que no poseen actividad larvicida en mosquitos (Woodburn *et al.*, 1995).

En este trabajo se estudiaron diferentes aislamientos colombianos patógenos y no patógenos para larvas de *Culex quinquefasciatus* utilizando la técnica de RAPD (amplificación azarosa del ADN polimórfico) con el fin de diferenciarlos y de determinar su relación genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de referencia. Las cepas de *B. sphaericus* de los grupos de homología I (ATCC 14577), IIA (1593), IIB (ATCC 7055), III (NRS 592), IV (NRS 400) y V (NRS 1198) fueron donadas por A. Youssten, y la cepa 2362 (grupo IIA) por A. Delecluse.

Cepas nativas. Se utilizaron 19 cepas nativas de *B. sphaericus* que presentaron 100% de mortalidad a las veinticuatro horas en larvas de tercer estadio de *C. quinquefasciatus* aisladas en un estudio realizado por Andrade *et al.* (1996), y 37 aislamientos que no presentaron letalidad en estas larvas (tabla 1), de los cuales tres fueron aisladas de muestras de tierra de diferentes lugares del país, tres de larvas de coleópteros (Dussán *et al.*, 1995) y 31 de tierra de un bosque de vegetación homogénea del Parque Chicaque (Lozano, 1998).

Tabla 1. Cepas nativas de *B. sphaericus* utilizadas en este estudio

Lugar	Tipo de muestra	Cepas	Actividad larvicida* en <i>Culex quinquefasciatus</i>
Colonia del CIMIC	Larva de <i>C. quinquefasciatus</i>	OT4a.2	+
Chocó	Tierra	CH2.17	+
Sabana de Bogotá	Larva de coleóptero (Chiza)	OT4b.2, OT4b.20, OT4b.25, OT4b.26, OT4b.28, OT4b.30, OT4b.32, OT4b.34, OT4b.35, OT4b.39, OT4b.49, OT4b.51, OT4b.56, OT4b.58	+
Tenjo	Tierra	SB2.15, SB2.94, SB2.124	+
Neusa	Tierra	NE2.1, NE2.2 -	
Parque Chicaque	Tierra	III (1)11, III (2)2, III(2)3, III(2)4, III(2)7, III(2)9, III(2)13, III(3)7, III(3)8, III(4)2, III(4)8, III(4)13, III(5)1, III(9)13, IV(1)8, IV(2)7, IV(3)5, IV(3)10, IV(3)13, IV(3)15, IV(4)2, IV(4)3, IV(4)10, IV(4)12, IV(4)13, IV(4)14, IV(5)6, IV(5)12, IV(6)3, IV(7)11, IV(10)14	-
Sabana de Bogotá	Larva de coleóptero (Chiza)	OT4b.22, OT4b.31, OT4b.48	-
Sasaima	Tierra	SA2.4	-

* +: 100% de mortalidad a las 24 horas de posinoculación; -: 0% de mortalidad a las 72 horas de posinoculación.

Adicionalmente se emplearon dos aislamientos nativos de especies diferentes del género *Bacillus* para la determinación de la relación genética, los cuales fueron *B. pulvifaciens* (CU2.2) y *B. globisporus* [III(1)2]. La primera presenta actividad larvicida en *C. quinquefasciatus* y la segunda no presenta toxicidad para dichas larvas, pero es una especie relacionada con *B. sphaericus*; lo anterior con el fin de presentar aislamientos fuera del grupo (“outgroup”) tanto para las cepas patógenas como para las no patógenas.

Amplificación azarosa del ADN (“Random Amplified Polymorphic DNA”, RAPD). Para la reacción de RAPD se hicieron extractos crudos de ADN total de los bacilos con una modificación del protocolo reportado por Brousseau *et al.* (1993). Se sembró cada cepa en SPC, el cultivo se incubó por dieciséis horas a 37 °C, se resuspendió una colonia en 100 µl de agua destilada estéril, después se colocó en baño de agua hir-

viendo por diez minutos, se centrifugó a 12.000 rpm durante tres minutos y se tomaron 5 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación.

Para la reacción de RAPD se evaluaron veintiséis cebadores comerciales de diez nucleótidos cada uno (marca OPERON), de los cuales se seleccionaron para la amplificación de ADN de los aislamientos los cebadores OPA-08 (5'-GTGACGTAGG-3'), OPA-17 (5'-GACCGCTTGT-3'), OPA-19 (5'-CAACGTCGG-3'), OPF-04 (5'-GGTGATCAGG-3') y OPO-09 (5'-TCCCACGCAA-3'). Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron una modificación del protocolo reportado por Williams *et al.* (1990): cebador 0.39 µM, desoxinucleótidos 200 µM de cada uno, cloruro de magnesio 2.5 mM, Taq polimerasa 2.5 U, buffer (cloruro de potasio 50 mM, Tris HCl pH 9,0 10 mM, Tritón X-1001%, BSA 1%). El programa utilizado fue: 92 °C por cinco minutos para la denaturación inicial, 45 ciclos de 92 °C por un minuto, 34 °C por un minuto

para el alineamiento del primer, extensión a 72 °C por dos minutos y una extensión final por quince minutos a 72 °C (Williams *et al.*, 1990).

Electroforesis de los productos de amplificación. Doce μ l de cada producto de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, y buffer TAE 1X (Maniatis *et al.*, 1982). Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador y se fotografiaron los geles con el sistema de documentación "standard gel Polaroid" (marca BIO-RAD).

Determinación de la relación genética. Para los productos de amplificación obtenidos con cada cebador se realizó una matriz indicando presencia o ausencia de las bandas para cada una de las cepas (1/0), la cual se analizó por el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de agrupación de características entre parejas con promedios aritméticos (UPGMA), utilizando el programa SYN-TAX-pc, versión 5.0 (Podani, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del ADN de las cepas patógenas de *B. sphaericus*. Se amplificó el ADN total de las 19 cepas nativas patógenas para larvas de mosquito, de las dos de referencia del grupo IIA y de *B. pulvifasciens* (CU2.2), utilizando los cinco cebadores y realizando como mínimo dos reacciones de RAPD para garantizar que las bandas fueran reproducibles.

En general los aislamientos de *B. sphaericus* patógenos presentaron un patrón de amplificación conservado entre sí y con las cepas de referencia (figuras 1 y 2). Con el cebador OPA-08 se presentaron dos bandas comunes que son de 1.150 pares de bases (pb) y de 1.800 pb (figura 1); a su vez en las amplificaciones con el iniciador OPA-17 (figura 2), las 19 cepas nativas y las de referencia (1593, 2362) presentan dos bandas comunes, una de 2.100 pb y otra de 691 pb; adicionalmente se encuentra una banda de 1.300 pb que comparten once de las cepas colombianas.

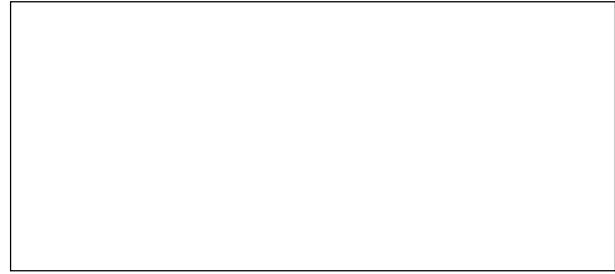


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de las cepas de *Bacillus sphaericus* patógenas para larvas de mosquitos obtenidos por RAPD, utilizando el cebador OPA-08
Carriles: 1. CH2.17, 2. CU2.2 (*B. pulvifasciens*), 3. OT4a.2, 4. OT4b.2, 5. OT4b.20, 6. OT4b.25, 7. OT4b.26, 8. OT4b.28, 9. OT4b.30, 10. OT4b.32, 11. Φ 174H ϵ III (1353pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb), 12. OT4b.34, 13. OT4b.35, 14. OT4b.39, 15. OT4b.49, 16. OT4b.51, 17. OT4b.56, 18. OT4b.58, 19. SB2.15, 20. SB2.94, 21. SB2.124, 22. 1593, 23. 2362, 24. control del cebador

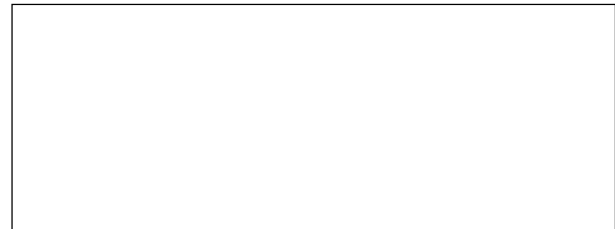


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de las cepas de *Bacillus sphaericus* patógenas para larvas de mosquitos obtenidos por RAPD, utilizando el cebador OPA-17

favor en disquete mandarme los pie de foto de fig. 2

Al amplificar el ADN de las cepas patógenas con los iniciadores OPA-19, OPF-04 y OPO-09 también se obtuvieron patrones de bandeo conservados (datos no mostrados).

Amplificación del ADN de las cepas no patógenas de *Bacillus sphaericus*. Se amplificó el ADN total de los 37 aislamientos nativos que no presentaron actividad larvicida en *C. quinquefasciatus*, así como el de las cepas de referencia pertenecientes a los grupos de homología I, IIB,

III, IV y V y el de *B. globisporus*, utilizando los cinco cebadores y realizando como mínimo dos reacciones de RAPD para garantizar que las bandas fueran repetitivas.

En la figura 3 se presentan los patrones de amplificación obtenidos con OPA08 de 31 cepas nativas, las cepas de referencia (grupos I, IIB, III, IV y V) y *B. globisporus* y se observa un patrón homogéneo (con cinco bandas en común) entre 21 de los aislamientos del Parque Chicaque; los otros aislamientos presentaron bandas adicionales a diferentes alturas. Adicionalmente se observa que algunas de las bandas presentan mayor intensidad que otras del mismo peso molecular, que puede ser causado por diferencias puntuales en las secuencias del ADN complementarias a la del cebador, lo cual permite mayor o menor grado de hibridación entre los ácidos nucleicos causando diferencias en la concentración de los productos de amplificación (Permaul *et al.*, 1996).

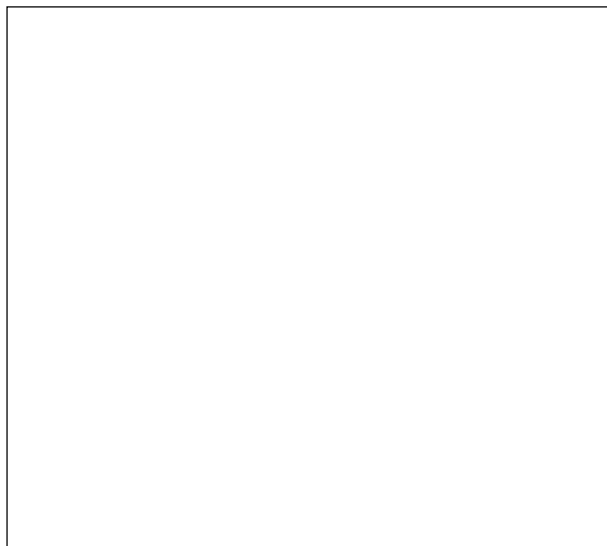


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de 31 cepas nativas de *Bacillus sphaericus* no patógenas para larvas de mosquitos y las de referencia pertenecientes a los grupos I, IIB, III, IV y V obtenidos por RAPD utilizando el cebador OPA-08

favor en disquete mandarme los pie de foto de fig. 3

En la figura 4 se presentan los patrones de bandeo característicos que se obtuvieron con el iniciador OPA-17, los cuales indican que hay polimorfismo entre los aislamientos; aun así 25 cepas nativas y la ATCC 7055 (grupo de homología IIB) comparten una banda de 500 pb y 17 cepas aisladas del Parque Chicaque comparten una de 2.100 pb, mientras que la cepa IV(4)10 no amplificó con este cebador. Con los cebadores OPA-19, OPF-04 y OPO-09 se obtuvieron patrones de bandeo heterogéneos entre los diferentes *B. sphaericus* no patógenos (datos no mostrados).



Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de 31 cepas nativas de *Bacillus sphaericus* no patógenas para larvas de mosquitos y las de referencia pertenecientes a los grupos I, IIB, III, IV y V obtenidos por RAPD utilizando el cebador OPA-17

favor en disquete mandarme los pie de foto de fig. 4

Comparación de los productos de amplificación de las cepas nativas de *B. sphaericus*. Los datos obtenidos de las amplificaciones del ADN total de las cepas patógenas de *B. sphaericus* con los cinco cebadores indican que se presentó un patrón de bandeo conservado entre los aislamientos patógenos y que difiere de *B. pulvifasciens*, por lo que se puede afirmar que a nivel genotípico las cepas entomopatógenas de *B. sphaericus*

forman un grupo homogéneo, a pesar de ser aislados de diferentes sustratos (larva de *C. quinquefasciatus*, chiza, tierra) y de dos lugares de Colombia (sabana de Bogotá y Chocó).

Las cepas nativas de *B. sphaericus*, patógenas y no patógenas para larvas de mosquito, presentaron bandas en común con algunos de los iniciadores, como son la de 1150 pb, con OPA-08 (figura 1) y la de 2.100 pb con OPA-17 que está presente en las cepas tóxicas para larvas de mosquito y 17 aislamientos sin actividad larvicida (figuras 2 y 4), las cuales pueden corresponder a regiones conservadas del genoma de la especie.

Las cepas patógenas presentaron unas bandas conservadas que no comparten con las cepas no patógenas, que son la de 1.800 pb con OPA-08 (figura 1) y la de 691 pb con OPA-17 (figura 2). Estos productos de amplificación se podrían utilizar como sondas para diferenciar y detectar las cepas patógenas en campo, sin que sea necesario aislarlas y realizar ensayos de actividad larvicida, aunque es importante llevar a cabo ensayos de hibridización previos con el ADN de cepas no patógenas para corroborar que la sonda sea específica. También sería interesante poder secuenciarlas para determinar si corresponden a una parte de los genes que codifican para las toxinas o a otra región del genoma de los *B. sphaericus* entomopatógenos.

Los patrones de bandeo obtenidos con cuatro de los cinco cebadores evaluados (OPA-17, OPA-19, OPF-04 y OPO-09) no permiten diferenciar fácilmente las cepas con actividad larvicida y sin ella debido a la heterogeneidad en los productos de amplificación presentados por las no patógenas, aunque la presencia de las bandas conservadas no compartidas podría ayudar en el caso de OPA-17. Las amplificaciones obtenidas con el otro iniciador (OPA-08) presentaron bandeos más conservados entre las cepas no patógenas, lo que sí permitiría distinguir los aislamientos entomopatógenos.

Determinación de la relación genética. En la realización de las reacciones de RAPD se incluyeron

CU2.2 (*B. pulvifaciens*) y III(1)2 (*B. globisporus*) con el fin de utilizarlas como aislamientos fuera del grupo en la determinación de la relación genética. La primera es una cepa nativa que presenta actividad larvicida en *C. quinquefasciatus*; la segunda no es patógena para dichas larvas y pertenece a una especie que comparte la morfología microscópica de *B. sphaericus* que se diferencia por ser glucosa positiva y crecer a 4 °C, mientras que *B. sphaericus* no utiliza carbohidratos simples como fuente de carbono (Sneath, *et al.*, 1989).

Se realizaron las matrices correspondientes a los productos de amplificación con los iniciadores OPA-08, OPA-17, OPA-19, OPF-04 y OPO-19, tanto para los aislamientos de *B. sphaericus* patógenos como para los no patógenos, con el fin de realizar el fenograma utilizando el programa SYN-TAX-pc y poder determinar la relación genética entre las cepas nativas de *B. sphaericus* (figura 5).

En la figura 5 se observan dos grupos independientes con una disimilitud mayor de 90% formados por las cepas de *B. sphaericus* patógenas y las no patógenas, respectivamente. Los aislamientos con actividad larvicida presentaron entre 90 y 100% de similitud formando dos subgrupos, de los cuales uno contiene las dos cepas de referencia y tres cepas nativas (OT4b.58, SB2.94, y SB2.194) y el otro las dieciséis cepas nativas restantes. Adicionalmente, CU2.2 sólo presentó 12% de similitud, que era lo que se esperaba, porque a pesar que este bacilo presenta actividad larvicida en *C. quinquefasciatus*, pertenece a la especie *B. pulvifaciens*.

Al reunir los datos de los productos de amplificación con los cinco iniciadores de las cepas no patógenas (figura 5) se observa un grupo heterogéneo con similitudes que varían entre 15 y 85%, patrón presentado aun entre los aislamientos de un mismo lugar y fuente como son los del parque Chicaque. La cepa IV(3)5 es la más alejada de todas (85% de disimilitud), lo cual puede estar relacionado con la parte fisiológica ya que esta cepa crece y esporula más lentamente.

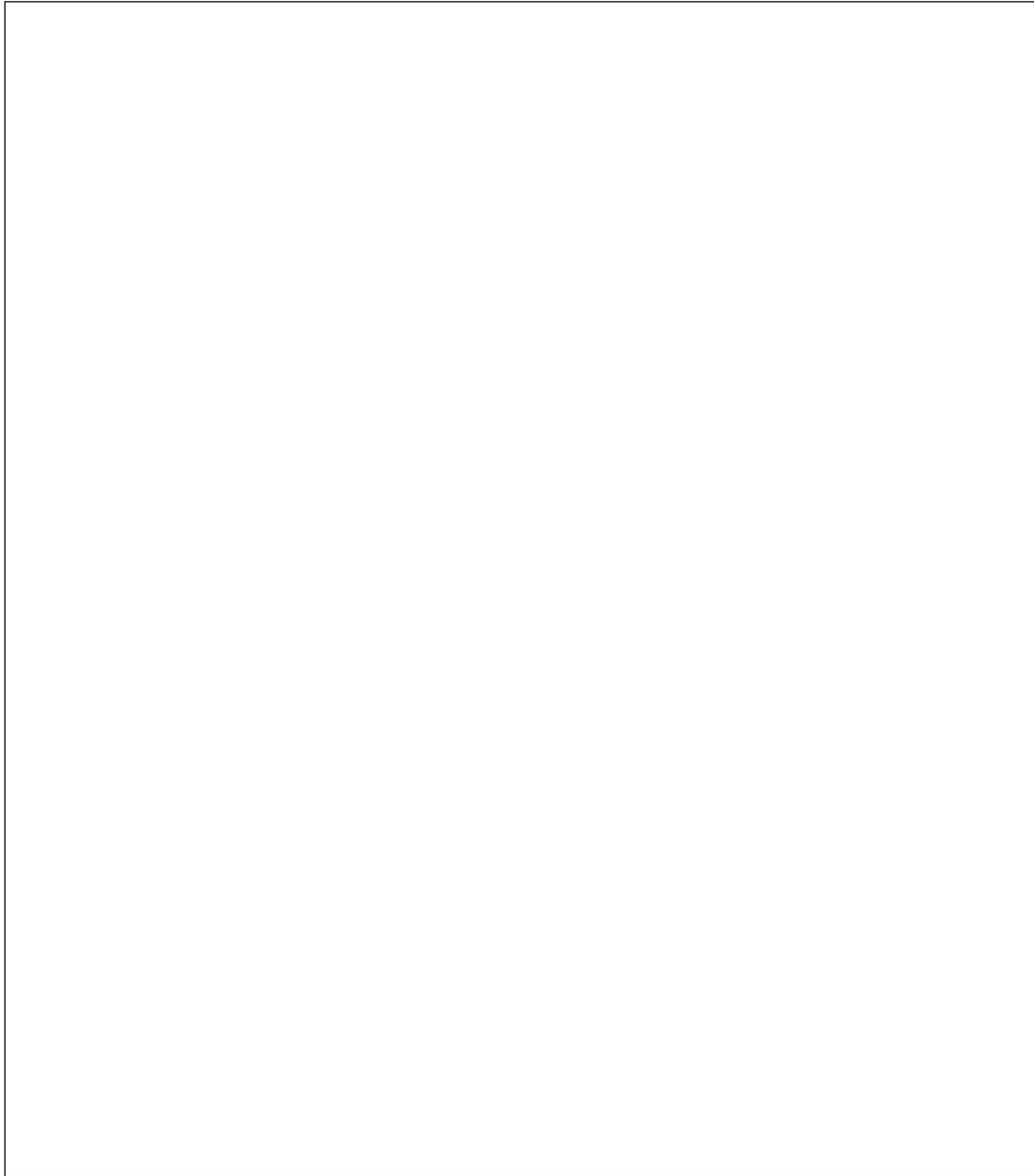


Figura 5. Fenograma de los productos de RAPD de las cepas de *Bacillus sphaericus* patógenas y no patógenas para larvas de mosquito utilizando los cebadores OPA-08, OPA-17, OPA-19, OPF-04, OPO-09, basado en el coeficiente de similitud de Jaccard y en UPGMA

En cuanto a la relación genética entre las cepas nativas y las de referencia, en la figura 5 se observa una gran similitud (90-100%) entre las cepas de referencia del grupo IIA, 1593 (originaria de Indonesia) y 2362 (originaria de Nigeria) con las cepas nativas, lo que está de acuerdo con lo reportado por Woodburn *et al.* (1995), quienes

encontraron una similitud mayor a 75% entre las cepas de este grupo de homología. Por el contrario, con las condiciones y cebadores utilizados no se observó una relación clara entre los aislamientos nativos no patógenos y las cepas de referencia pertenecientes a los grupos de homología I, IIB, III, IV ni V. Woodburn *et al.* (1995) repor-

taron un agrupamiento entre las cepas pertenecientes a estos grupos, aunque con una similitud entre 15 y 40%; además, Miteva *et al.* (1999), utilizando las técnicas de RAPD y rep-PCR, encontraron un bajo nivel de homología entre las cepas pertenecientes a los grupos de homología I y III, mientras que entre aislamientos de los grupos IIA, IIB y IV presentaron una similitud mayor a 80%.

Aunque se ha reportado que las cepas de los subgrupos IIA y IIB poseen una homología de ADN entre 60 y 66% (Priest, 1992; Priest *et al.*, 1995), con los cebadores evaluados se encontró que las cepas de referencia que pertenecen a estos grupos están alejadas genéticamente, lo que concuerda con el estudio realizado por Miteva *et al.* (1999), que reportan un bajo nivel de similitud entre estos dos subgrupos y uno alto entre los aislamientos de cada uno; además, en el trabajo de Woodburn *et al.* (1995) la similitud entre IIA y IIB fue de 5.2%.

Se encontró mayor distancia genética de los aislamientos de *B. sphaericus* patógenos con *B. pulvificiens* (12% de similitud), que de los no

patógenos con *B. globisporus* (80% de similitud con III(2)4 y 43% con las otras cepas), lo cual concuerda con lo referenciado por Priest *et al.* (1994), que por secuenciación del ARN ribosomal 16S encontraron que los bacilos de espora circular tienen dos linajes, uno el de los *B. sphaericus* patógenos y otro el de los *Bacillus* psicrófilos, y la propuesta de varios autores de clasificar a las cepas entomopatógenas de *B. sphaericus* como una nueva especie (Baumann *et al.*, 1991; Miteva *et al.*, 1999; Priest *et al.*, 1994; Woodburn *et al.*, 1995).

Las cepas colombianas de *B. sphaericus* con actividad larvicida en *C. quinquefasciatus* presentaron a nivel genético una gran similitud entre sí sin importar su origen, mientras que las no patógenas son heterogéneas, aun las provenientes de una misma fuente (tierra del parque Chicaque). Los aislamientos nativos con actividad larvicida en *C. Quinquefasciatus* se diferencian de las no patógenas por su patrón de bandeado homogéneo y por sus bandas únicas producto de amplificación con los cebadores OPA-08 y OPA-17, y en el fenograma formó un grupo con baja similitud con las cepas no patógenas.

REFERENCIAS

- Alexander B, Priest F.** 1990. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *J Gen Microbiol* 136:367-376.
- Andrade D, Lozano L, Dussán J.** 1996. Caracterización de ADN plasmídico de bacterias nativas útiles en el control biológico de mosquitos transmisores de malaria. *Rev Col Entomol* 22:131-135.
- Baumann F, Clark M, Baumann L, Broadwell A.** 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Properties of the organism and its toxins. *Microbiol Rev* 55:425-436.
- Brousseau R, Saint-Onge A, Préfontaine G, Masson L, Cabana J.** 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *App Environ Microbiol* 59:114-119.
- Dussán J, Andrade D, Lozano L.** 1995. Microbiología aplicada II: caracterización de ADN plasmídico de cepas nativas útiles en control biológico. Informe presentado a Colciencias.
- Johansson ML, Quednau M, Molin G, Ahré S.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett App Microbiol* 21:155-159.
- Liu J, Porter A, Wee B, Thanabalu T.** 1996. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. *App Environ Microbiol* 21:106-108.
- Lozano LC.** 1998. Diferenciación de cepas nativas de *Bacillus sphaericus* patógenas y no patógenas para larvas de mosquitos por amplificación azarosa del ADN. Tesis de maestría, Universidad de los Andes.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** 1982. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Miteva V, Selenska-Pobell S, Mitev V.** 1999. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. *J App Microbiol* 86:928-936.
- Nielsen-LeRoux C, Rao R, Murphy J R, Carron A, Maani T R, Hamon S, Mulla M S.** 2001. Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) colonies resistant to *B. sphaericus* strain 2362. *App Environ Microbiol* 67:5.049-5.054.
- Nilsson J, Svensson B, Ekelund K, Christiaansson A.** 1998. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Lett App Microbiol* 27:168-172.
- Permaul K, Pillay D, Pillay B.** 1996. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis show a intraspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Lett App Microbiol* 23:307-311.
- Podani J.** 1993. *SYN-TAX-pc, Computer programs for multivariate analysis in ecology and systematics, version 5.0*. Scientia Publishing, Hungría.

- Porter AG, Davison EW, Liu JW.** 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev* 57:838-861.
- Priest FG.** 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J App Bacteriol* 72:357-369.
- Priest FG, Cormenzana AR, Tindal, BJ (ed.).** 1994. *Bacterial diversity and systematics*. Plenum Press, USA.
- Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt J (ed.).** 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Stephan R, Scharft H, Untermann F.** 1994. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (Randomly Amplified Polymorphic DNA). *Lett App Microbiol* 18:260-263.
- Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:212-217.
- Woodburn M, Yousten A, Hilu K.** 1995. Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Int J Syst Bacteriol* 45:212-217.
- Zahner V, Rabinovitch L, Cavados C, Momen H.** 1994. Multilocus enzyme electrophoresis on agarose gel as an aid to the identification of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* strains. *J App Bacteriol* 76:327-335.

