

Diversidad genético molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con potencial tóxico contra *Aedes aegypti*

Genetic and molecular diversity of *Bacillus thuringiensis* strains and insecticidal activity potential against *Aedes aegypti*

Doris Huerta¹, Oscar Acosta¹, Milagros Chang^{2,3}

¹ Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

² Universidad Nacional Agraria La Molina.

³ Maestría en Bioquímica, Unidad de Posgrado, Facultad de Medicina, UNMSM.

Resumen

Objetivos: Evaluar la diversidad genético molecular de cepas nativas aisladas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *Aedes aegypti*, vector del dengue. **Diseño:** Estudio descriptivo, analítico. **Institución:** Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina, UNMSM. **Material biológico:** Cepas nativas y estándar de *B. thuringiensis*. **Intervenciones:** Se extrajo el ADN genómico de 53 cepas nativas y 10 cepas estándar de *B. thuringiensis* aisladas del suelo de distintas regiones geográficas del Perú. Para el análisis de diversidad, se evaluó secuencias repetitivas de ADN mediante la técnica REP-PCR, siendo visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se hizo el análisis de *clúster* con el dendograma de similaridad de cepas estándares y nativas de *B. thuringiensis*, utilizando programas bioinformáticos. **Principales medidas de resultados:** Diversidad evaluada mediante los perfiles genéticos (bandas de ADN repetitivas) en geles de agarosa y dendograma de cepas *B. thuringiensis*. **Resultados:** Las cepas procedentes de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca tendieron a formar grupos según procedencia, destacándose dos caracterizadas como potencialmente tóxicas contra *Aedes aegypti* (de Ica y de Cajamarca), formando un subgrupo con cepas estándar tóxicas HD-968 y GM 33. **Conclusiones:** Se observa gran diversidad de cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares del país, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similaridad con las cepas *B. thuringiensis* estándares, algunas con potencial para ser utilizadas contra *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, diversidad, genes cry, técnica REP-PCR.

Abstract

Objectives: To determine the molecular genetic diversity of native *B. thuringiensis* strains toxic against *Aedes aegypti*, vector of dengue. **Design:** Descriptive, analytical study. **Setting:** Biochemistry and Nutrition Research Center, Faculty of Medicine, San Marcos University, Lima, Peru. **Participants:** Native and standard strains of *B. thuringiensis*. **Interventions:** Extraction of *B. thuringiensis* genomic DNA from 53 native strains and 10 standard strains isolated from different Peruvian regions soil samples. Diversity was determined by repetitive DNA sequences using REP-PCR technique, visualized in agarose gels stained with ethidium bromide. *B. thuringiensis* standard and native strains cluster analysis was performed by dendrogram of similarity using bioinformatic programs. **Main outcome measures:** Diversity of *B. thuringiensis* strains. **Results:** Strains from Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa, and Cajamarca tended to form groups according to source, highlighting two strains characterized as potentially toxic against *Aedes aegypti* (Ica and Cajamarca), and outlining a subgroup or cluster with toxic standard strains HD-968 and GM 33. **Conclusions:** A great diversity of *B. thuringiensis* native strains coming from different regions of the country have a tendency to form sub-groups according to geographical origin and in relation to standard strains, some of them with a bioinsecticidal potential against *B. Thuringiensis*, vector of dengue.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, diversity, cry genes, REP-PCR.

An Fac med. 2012;73(3):205-10

INTRODUCCIÓN

B. thuringiensis es una bacteria ubicua entomopatogena, gram positiva, aeróbica, de la familia *Bacillaceae*, que se caracteriza por sintetizar un cuerpo paraesporal o cristal de proteínas denominadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, con actividad tóxica contra una variedad de insectos vectores de muchas enfermedades metaxénicas que son

problemas de salud pública en nuestro medio, como *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue.

Estos cristales se forman durante la esporulación y en ellos reside su actividad tóxica, cuando son ingeridos por larvas de diferentes órdenes de insectos⁽¹⁻³⁾, como *Lepidóptera* (polillas y mariposas), *Díptera* (moscas y mosquitos), *Coleóptera* (escarabajos) e *Himenóptera* (abejas y avispas), *Homóoptera*, *Ma-*

llophaga⁽⁴⁾, e incluso *Platyhelminthes*, *Sarcomastigophora* y nematelmintos, mites y protozoarios⁽¹⁾, pero no afecta a los mamíferos^(2,3,5).

Dadas las características de *B. thuringiensis* como agente de control biológico y debido a su presencia cosmopolita, sus esporas han sido aisladas de diversas fuentes, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, productos almacenados y telarañas⁽⁶⁾.

La diversidad de *B. thuringiensis* se manifiesta por la variabilidad de los genes cry y sus respectivas proteínas Cry biotóxicas ⁽¹⁸⁾, además de variaciones a lo largo de su genoma, como en las regiones extragénicas repetitivas (REP); por ello, es importante estudiar la diversidad genético molecular para evaluar su potencial bioinsecticida.

La diversidad genética y toxicidad de las cepas de *B. thuringiensis* difieren con las condiciones geográficas de las diferentes regiones donde las cepas fueron aisladas ⁽⁷⁾. Dado que cada región es un hábitat diferente, esta podría contener nuevas cepas con potencial tóxico más efectivo para un amplio espectro de insectos. En el Perú, al igual que en otros países, debe establecerse una colección de cepas nativas de *B. thuringiensis*, porque es importante conocer la distribución de las cepas nativas aisladas de diferentes regiones geográficas de nuestro país, identificar nuevas cepas y evaluar su potencial entomocida, para ayudar al control de vectores de plagas y enfermedades metaxénicas, que en nuestro país aun no han sido controladas. Por lo anterior, nuestro objetivo fue evaluar la diversidad genético molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* que pueden ser tóxicas contra *Aedes aegypti*.

MÉTODOS

Las 53 cepas nativas de *B. thuringiensis* provenientes de muestras de rizósfera de Arequipa, Cajamarca, Cuzco, Lambayeque, Lima (Huaral), Ica, Junín y Tacna, del cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, fueron identificadas por la presencia de inclusiones parasporales observadas con microscopio de contraste de fase.

Las 10 cepas estándar de referencia fueron preparaciones liofilizadas de la colección de la *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL), Peoria, Illinois, EE UU, proporcionadas al laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Cien-

Tabla 1. Cepas estándar de *Bacillus thuringiensis*.

1. <i>B. thuringiensis israelensis</i>	HD-500
2. <i>B. thuringiensis aisawai</i>	HD-130
3. <i>B. thuringiensis monterrey</i>	GM33
4. <i>B. thuringiensis israelensis</i>	WHO-2013-9
5. <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	HD-1
6. <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	HD-2
7. <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	HD-73
8. <i>B. thuringiensis israelensis</i>	HD-968
9. <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	HD-263
10. <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	HD-732

cias Biológicas de la UNMSM, y que aparecen listadas en la tabla 1.

La extracción de ADN genómico de cepas nativas y referenciales de *B. thuringiensis* fue realizada a partir de cultivos bacterianos crecidos en agitación constante toda la noche, en 50 mL de caldo nutritivo; luego, 5 mL de cultivo fue centrifugado a 2 000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante suave y rápidamente para recuperar el precipitado, el cual fue resuspendido en el líquido sobrante y se transfirió 200 uL a un tubo ependorf de 1,5 mL. Para aislar el ADN según metodología estándar, se utilizó un kit comercial de ROCHE para la preparación del molde para PCR.

En el análisis de diversidad se evaluó secuencias repetitivas de ADN mediante amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR) con modificaciones ⁽⁸⁾. Se utilizó 53 muestras nativas y 10 estándar de ADN genómico de *B. thuringiensis*. La reacción de amplificación fue realizada con 2,0 uL de *buffer* 10X, 8,0 uL de dNTPs 2,5 mM, 2 mM MgCl₂, 2 uM *primers* REP-1 y REP-2, 2 U Taq, 1 uL ADN 100 ng/uL, agua Mili Q para completar 20 uL de mezcla de reacción. La secuencia de los *primers* REP fue la siguiente:

REP1R-1 5' IIIICgICgICATCIggC 3'

REP2 I5' ICgICTTATCIggCCTAC 3'

Los elementos REP son regiones de ADN extragénicas repetidas y esparcidas en el genoma de bacterias, de 21-65 pb ⁽⁹⁾. El REP-PCR emplea oligonucleótidos que reconocen secuencias conservadas REP y las regiones amplificadas corresponden a los segmentos que separan dichas secuencias. Así, el polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias REP dentro del genoma ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

La PCR fue realizada siguiendo el siguiente programa: 4 min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72°C.

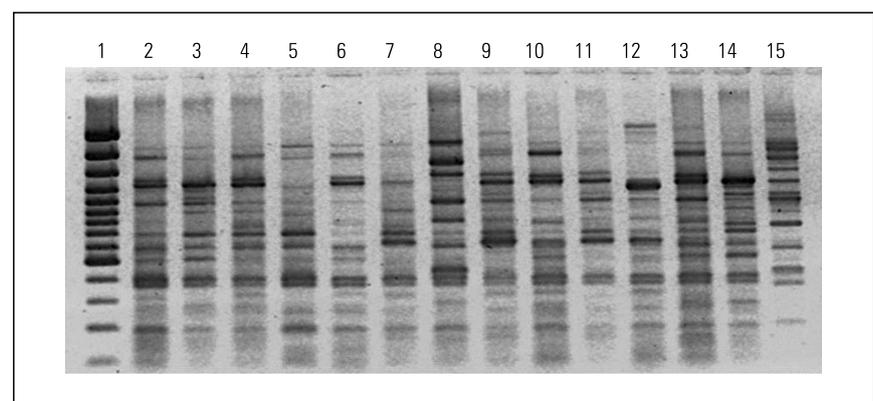


Figura 1. Análisis de diversidad de cepas según REP-PCR. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos PCR obtenidos con el primer REP para las cepas de *B. thuringiensis* analizadas. Los números corresponden a: 1. Lader 100pb; 2. HD-1 (estándar); 3. Hua 14; 4. Jun10; 5. Hua10; 6. Ica8; 7. HD-2; 8. Ica9; 9. Ica10; 10. Cuz8; 11. Hua11; 12. Jun11; 13. Ica11; 14. HD-73; 15. HD-968.

Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizadas las bandas en un transiluminador UV.

El análisis de los patrones de bandas REP-PCR obtenidos fueron identificados por sus velocidades de migración específicas en el gel. Se construyó matrices binarias (0/1) para ser comparadas con los patrones; la presencia de una banda fue indicada por uno (1) y la ausencia como cero (0). Una vez obtenida la matriz binaria, se construyó una matriz de distancias genéticas empleadas para construir un dendograma con el algoritmo UPGMA (método de agrupamiento de pares no ponderados con significancia aritmética) ⁽¹⁷⁾.

La similitud entre las cepas fue determinada empleando los coeficientes de Jaccard. El análisis de clúster o agrupamiento fue evaluado en el dendograma generado por el algoritmo UPGMA y representado con el dendograma de similitud de cepas estándar (n=10) y nativas (n=53) de *B. thuringiensis*, estimado con los patrones de bandas REP-PCR, utilizando el programa NTSYS ^(13,17).

RESULTADOS

Se evaluó un total de 63 cepas, 10 estándar y 53 nativas, de *B. thuringiensis*. Los amplificadores obtenidos de las secuencias REP contiguas generaron patrones electroforéticos distintivos entre las diversas cepas evaluadas, describiendo un patrón polimórfico; la mayoría de patrones presentó un promedio de 13 a 15 bandas, como se observa en el gel de agarosa (figura 1), y tal como ha sido comunicado ^(8,12-14,16). Estos resultados fueron corroborados cuando se analizó la matriz binaria y se generó el dendograma de similitud (UPGMA).

El análisis de clúster representado con su dendograma de similitud de cepas nativas y estándares de *B. thuringiensis* basado en los patrones electroforéticos REP, y evaluado con el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA,

nos muestra, en general, tres grandes agrupamientos o clúster (tabla 2).

El primer grupo incluyó cepas nativas de Junín (Jun6, Jun7, Jun8, Jun12), Huaral e Ica y cepas estándar HD-500 y Bti-WHO.

El segundo grupo, el más grande y con mayor número de subgrupos, incluyó otras cepas nativas de distinta procedencia, principalmente de Junín, Huaral, Ica y Cusco y las cepas estándar, formando tres subgrupos: el subgrupo HD-130/HD-263/HD-732; subgrupo HD-73; y el subgrupo HD-2.

El tercer grupo incluyó cepas nativas principalmente de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, y las cepas estándar HD-968 y GM33, existiendo la particularidad de que el subgrupo más grande solo estaba conformado por cepas nativas; las cepas Are1 y Hua5 fueron las más disímiles entre ellas, y las cepas Jun1 y Jun9 fueron muy similares, así como Ica11, Cuz6 y Hua4, y Cuz3

y Jun10. La cepa Hua10 (Huaral) es la que más se alejó de la similitud de las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas, conformando una sola rama aislada de los tres grandes agrupamientos.

Destacaron dos cepas caracterizadas como potencialmente tóxicas contra *Aedes aegypti* (una de Ica y otra de Cajamarca). Formaron un subgrupo o clúster con las cepas estándar tóxicas HD-968 y GM 33, que contienen el gen cry2, y las nativas presentaron los genes cry2 y cry4 (resultados no presentados).

DISCUSIÓN

B. thuringiensis es una bacteria estrechamente relacionada con las bacterias *B. anthracis* (agente del ántrax) y *B. cereus* (patógeno oportunista del humano). El descubrimiento de la actividad biocida de *B. thuringiensis* sobre larvas de muchos lepidópteros sugirió su uso poten-

Tabla 2. Agrupamientos derivados del dendograma de similitud de cepas nativas y estándar evaluadas.

Grupo	Subgrupo	Cepas nativas	Cepas estándar
I	-	Jun 6,7,8,12 Hua 6 Ica 7	HD-500 BtiWHO
II	S1 Sub Grupo 2.1	Jun 3 Hua 8,1,13,7 Ica 6 Cuz 10,7	HD-130 HD-263 HD-732
	S2 Sub Grupo 2.2	Hua 3,14 Ica 14,9 Cuz 10,7	HD-73 HD-1
	S3 Sub Grupo 2.3	Cuz 4,9 Ica 1,12 Hua 2 Jun 5	HD-2
III	Sub Grupo 3.1	Jun 7,9,1,11,4 Hua 9,4,12,11 Ica 11,4,3,8,5 Cuz 6,5	-
	Sub Grupo 3.2	Cuz 3,2 Jun 10,12 Ica 10,13,2 Caj 1 Hua 5,10 Are 1	GM 33 HD-968

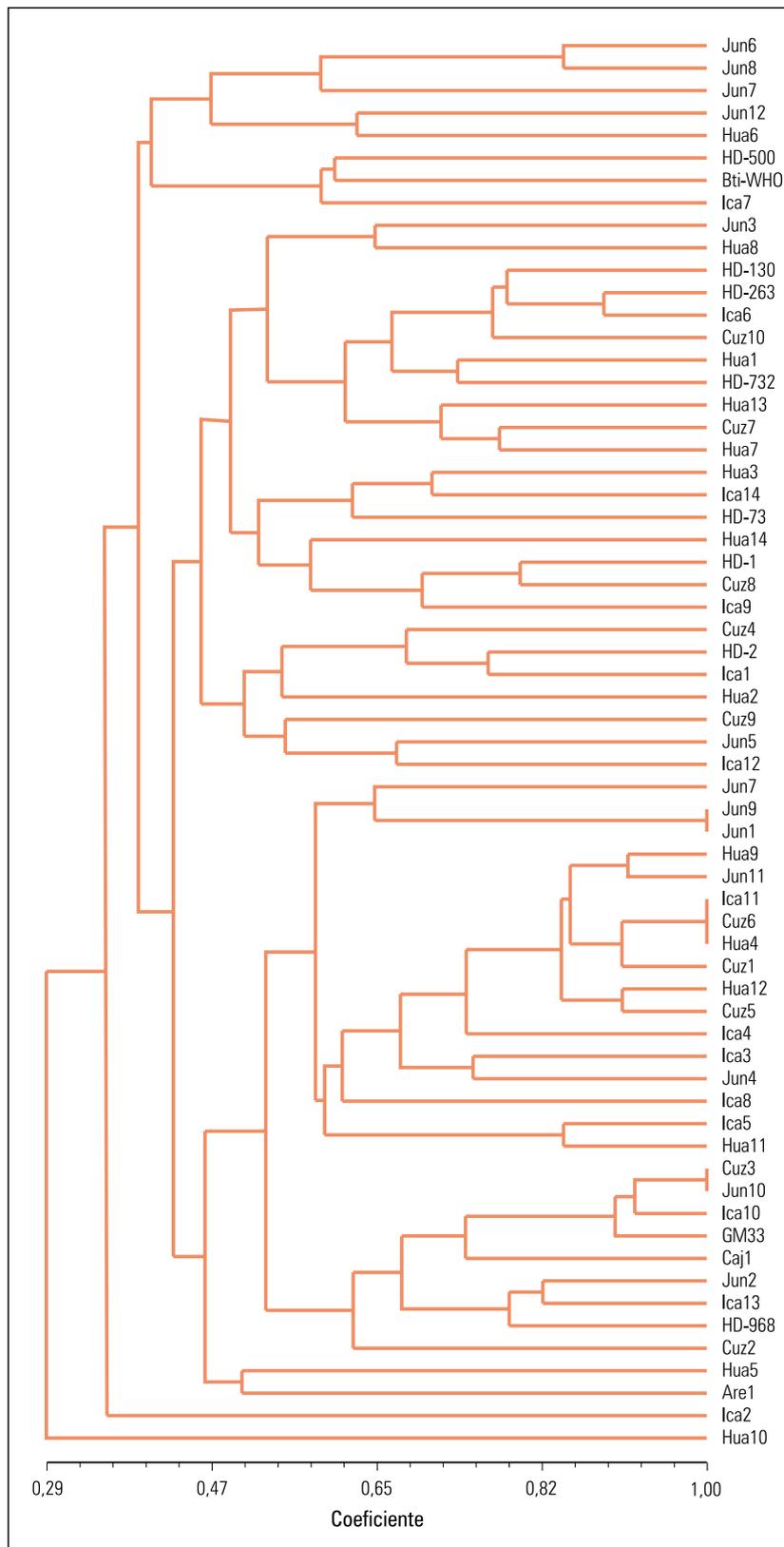


Figura 2. Análisis de *clúster* (agrupamiento) representado con el dendrograma de similaridad de cepas estándar ($n=10$) y nativas ($n=53$) de Bt, estimado con los patrones de bandas REP-PCR. Se utilizó el coeficiente de similaridad de Jaccard y el método UPGMA (siglas de *unweighted-pair group method with arithmetic means*).

cial en el control biológico de insectos plaga; y, más adelante, el hallazgo de *B.thuringiensis israelensis* (1978) capaz de matar mosquitos, amplió su margen de utilidad en el control de insectos vectores de enfermedades de interés en salud pública. En las siguientes décadas se descubrió nuevas subespecies, encontrándose una gran diversidad, las cuales se han caracterizado por su serotipo H flagelar, o sea por las proteínas presentes en el flagelo, en más de 45 serotipos y 58 serovariedades ⁽⁴⁾.

El serotipaje ha sido la técnica mejor conocida para identificar y caracterizar cepas de *B. thuringiensis*, habiéndose identificado 69 serotipos y 82 variedades serológicas ⁽²⁰⁾. Sin embargo, se presentan algunas restricciones, como la incapacidad de procesar cepas no flageladas y diferenciar cepas de *B. thuringiensis* de algunas *B. cereus*, impidiendo encontrar relaciones filogenéticas entre los serotipos. Debido a las incongruencias y discrepancias observadas con este método, se hace esfuerzos hacia el desarrollo de técnicas moleculares basadas en la diversidad de su genoma. Técnicas como los PFGE, RFLP, AFLP, PAPDE, REP-PCR, ribotipificación y secuenciación de genes específicos, han mostrado diversos grados de eficiencia en la diferenciación de cepas, además de establecer posibles grupos filogenéticos ^(8,12-14,18,19). REP-PCR ha sido ampliamente usado en una variedad de especies bacterianas y no bacterianas para identificarlas, caracterizarlas y evaluar su diversidad ⁽¹⁴⁾.

El polimorfismo de elementos repetitivos (REP-PCR *fingerprint*) es un método frecuentemente usado para tipificar bacterias ⁽⁶⁾, mediante el análisis de la distribución de secuencias de ADN repetitivas en diversos genomas procariontas. El análisis genético de estas secuencias puede revelar distancias y patrones específicos para especies. Las secuencias REP, específicamente, han sido utilizadas en diversos estudios para clasificar y relacionar taxonómicamente especies de *B. cereus* y ayudar a aclarar la relación genética entre poblaciones de *B. cereus* y *B. thuringiensis* ⁽¹³⁾,

así como, para identificación de nuevos aislados de *B. thuringiensis* ⁽¹²⁾. Se ha demostrado que esta técnica de REP-PCR es altamente discriminatoria, reproducible, rápida, fácil y capaz de identificar serotipos de *B. thuringiensis*, que puede convertirse en un procedimiento de caracterización ⁽¹⁴⁾.

El análisis REP-PCR de las diversas cepas nativas evaluadas en este estudio mostró patrones de bandas distintivas, como se observa en el gel de agarosa (figura 3), con resultados similares a los encontrados en otras investigaciones ^(8,12,13).

El análisis de clúster representado en el dendograma de similaridad, tanto de cepas nativas como estándares de *B. thuringiensis* (figura 4), basado en los patrones REP y evaluado con el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA, mostró, en general, tres grandes agrupamientos o clúster.

El primer grupo incluyó a cepas nativas principalmente de Junín (Jun6, Jun7, Jun8, Jun12), Huaral 6 e Ica 7 y las cepas estándar HD-500 y Bti-WHO, relacionadas con actividad tóxica contra dípteros y lepidópteros.

El segundo grupo, el más grande y con mayor número de subgrupos, incluyó a otras cepas nativas de distinta procedencia, principalmente de Junín 3, Huaral (Hua1, Hua2, Hua3, Hua7, Hua8, Hua13 y Hua14), Ica (Ica1, Ica6, Ica9, Ica12 e Ica14) y Cusco (Cuz4, Cuz7, Cuz8, Cuz9, y Cuz10), junto con las cepas estándar que forman el subgrupo HD-130/HD-263/HD-732 -relacionadas con actividad biocida contra dípteros y lepidópteros, exceptuando las cepas HD-130 que por su contenido de gen Cry 8 puede ser tóxica para coleópteros ⁽³⁾-, el subgrupo HD-73 relacionado con toxicidad frente a dípteros, y el subgrupo HD-1 relacionado con lepidópteros principalmente, pero también tendría actividad frente a mosquitos ⁽⁷⁾.

El tercer grupo incluyó cepas nativas principalmente de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, y

las cepas estándar HD-968 y GM33, relacionadas con actividad frente a una variedad de insectos, existiendo la particularidad de que el subgrupo más grande solo estaba conformado por cepas nativas; las cepas Are1 y Hua5 fueron las más disímiles entre ellas, y las cepas Jun1 y Jun9 fueron muy similares, así como Ica11, Cuz6 y Hua4, y Cuz3 y Jun10. La cepa Hua10 (Huaral) fue la que más se alejó de la similaridad de las cepas nativas estudiadas, conformando una sola rama aislada de los tres grandes agrupamientos.

En general, utilizando el análisis REP-PCR, en el presente trabajo se observó una gran diversidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similaridad con las cepas *B. thuringiensis* estándares, tal como se comunica en otros trabajos de América ^(3,14,16).

B. thuringiensis constituye una especie genéticamente diversa. El uso de secuencias de ADN repetitivas, tal como REP para clasificación bacteriana, sigue siendo útil y ofrece una alternativa para tipificar cepas de *B. thuringiensis* y para reconocer las relaciones filogenéticas entre subgrupos, comparando la posible similitud genética entre diferentes genomas bacterianos ⁽⁸⁻¹³⁾. En esta investigación con cepas peruanas se ha podido correlacionar la similaridad según procedencia geográfica.

El estudio basado en las secuencias REP es realizado para complementar la caracterización molecular de genes cry de cepas nativas peruanas de *B. thuringiensis* (datos no mostrados); además, se puede comparar los resultados obtenidos con otras características de *B. thuringiensis* ya conocidas, como la forma del cristal ^(3,15), pero sobre todo por el contenido de genes, lo cual nos permite identificar preliminarmente la actividad y el potencial larvicida que presentan estas cepas nativas.

Utilizando los marcadores moleculares REP, se observó una gran diversidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares del país, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similaridad con las cepas *B. thuringiensis* estándares, y algunas con potencial biotóxico para ser utilizadas contra *Aedes aegypti*, vector del dengue, que constituye un problema de salud pública en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feitelson JS, Payne J, Kim L. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. *Nature Biotech.* 1992;10:271-5.
2. Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A. Specific PCR primers directed to identify Cry I and Cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* collection. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(11):3826-31.
3. Ibarra J, Del Rincón M, Orduz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal againts different mosquito species. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5269-74.
4. Schnepf E, Crickmore N, Vanrie J, Leredus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:775-806.
5. Maduel P, Armengol G, Llagostera M, Lindow S, Orduz S. Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. *J Appl Microbiol.* 2007;102(6):2593-600.
6. Jiménez N, Muñoz C, Gómez I, Saab G, Damian J, Gill S, Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21222-9.
7. Thomas DJ, Morgan JA, Whipps JM, Saunders JR. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis strains in laboratory culture, river, water and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):330-8.
8. Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6823-31.
9. Tobes R, Pareja E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics.* 2006;7:62.
10. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enf Infec Microbiol Clin.* 2004;22:355-60.
11. Vilchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009;29(1):6-12.
12. Lima ASG, Guidelli AM, Abreu IL, Lemos MVF. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genet Mol Biol.* 2002;25(2):225-9.
13. Peruca AP, Vilas-Boas GT, Arantes OMN. Genetic relationships between sympatric populations of

- Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):497-500.
14. Reyes-Ramirez A, Ibarra J. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* Type Strains and Isolates by using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Analysis. Appl Environ Microbiol. 2005;71(3):1346-55.
 15. Flores A, Woolcott J, Egúsqüiza R, Patiño A, Huerta D, García F. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* patotipos II y IV *Bacillus sphaericus* aislados de suelos agrícolas peruanos. Biotempo. 2010;10:57-70.
 16. Sauka D, Basurto-Ríos R, Ibarra J, Benintende G. Characterization of an Argentine Isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain. Neurotrop Entomol. 2010;39(5):767-73.
 17. Backeljau T, De Bruyn L, De Wolf H, Jordaens K, Van Dongen S, Winnepenninckx B. Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages. Mol Biol Evol. 1996;13(2):309.
 18. Ibarra J. Diversidad de *Bacillus thuringiensis* y su implicación en el rango de toxicidad. (Conferencia inaugural) Memorias del XXV Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología. Talca, Chile 2003:1.
 19. Lyndsay R, Agron P, Hill K, Jackson P, Ticknor L, Keim P, Andersen G. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 2003;69(5):2755-64.
 20. Xu D, Coté JC. Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* sensu lato flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity. Appl Environ Microbiol. 2006;72(7):4653-62.
-

Fuente de financiamiento:
Recursos propios e infraestructura del CIBN.

Correspondencia:
Magister Doris Huerta Canales
Laboratorio de Biología Molecular
Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición
Facultad de Medicina, UNMSM, Lima, Perú.
Correo: dorishuerta@yahoo.com