

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN UN PASO EN EL CROMOSOMA DE *Bacillus thuringiensis*

HOMOLOGOUS RECOMBINATION TO *Bacillus thuringiensis* CHROMOSOME IN ONE STEP

Estibaliz Sansinenea-Royano^{1*}, Patricia Sánchez-Alonso¹, E. Anastacio Marcelino¹, Jorge Ibarra-Rendón², Gabriela Olmedo-Álvarez², Candelario Vázquez-Cruz¹

¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570, Puebla, Puebla, México (estisan@siu.buap.mx), (canvazq@siu.buap.mx). ²Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Campus Irapuato, Irapuato 36000, Guanajuato, México.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria del suelo gram-positiva utilizada como un bioinsecticida limpio para el ambiente. Aunque se conoce acerca de sus proteínas entomocidas, poco se ha estudiado su genética funcional debido a que la transformación celular es muy difícil. Por tanto, el desarrollo de la recombinación homóloga como herramienta de investigación ayudará a ampliar el conocimiento de su genética, pudiéndose incluso modificarse cepas para el control de plagas. En este trabajo se describe una secuencia cromosomal que funcionalmente sirve como sustrato para la recombinación molecular homóloga en el cromosoma bacteriano de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82. Se secuenció (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Irapuato; Octubre 2007) un fragmento de 1500 pb del locus *ibrI* y la secuencia se depositó en GenBank (número de acceso GQ476797). Su análisis nucleotídico indica que esta región del genoma de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 es muy similar pero no igual a otras secuencias de *Bt*. Esta secuencia está relativamente conservada en varias cepas de *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis* según el análisis informático y experimental.

Palabras clave: bacteria del suelo, integración cromosomal, recombinación homóloga.

INTRODUCCIÓN

B*acillus thuringiensis* es una bacteria de suelo gram-positiva que produce gran cantidad de proteínas entomocidas que se acumulan en el citoplasma para formar inclusiones cristalinas. Las

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2009. Aprobado: octubre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 437-447. 2010.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a gram-positive soil bacterium used as a clean bioinsecticide for the environment. Although its entomocide proteins are known, little has been studied of its functional genetic, due to the fact that the cell transformation is very difficult. Therefore, the development of homologous recombination as a research tool will help to broaden the knowledge of its genetics, even making it possible to modify strains for pest control. In this paper a chromosomal sequence is described, which functionally serves as a substrate for the homologous molecular recombination in the bacterial chromosome of *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82. A fragment of 1500 pb of the locus *ibrI* was sequenced (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y Estudios Avanzados of Irapuato; October, 2007), and the sequence was deposited in GenBank (Access number GQ476797). Its nucleotide analysis indicates that this region of the genome of *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 is very similar but not equal to other sequences of *Bt*. This sequence is relatively conserved in various strains of *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. anthracis* according to the computer and experimental analysis.

Key words: soil bacterium, chromosomal integration, homologous recombination.

INTRODUCTION

B*acillus thuringiensis* is a gram-positive soil bacterium that produces a large amount of entomocide proteins that accumulate in the cytoplasm to form crystalline inclusions. The proteic inclusions of *B. thuringiensis* are toxic to diverse insect vectors of tropical diseases (Goldberg and Margalit, 1977; Höfte and Whiteley, 1989) and crop pests.

inclusiones proteicas de *B. thuringiensis* son tóxicas a diversos insectos vectores de enfermedades tropicales (Goldberg y Margalit, 1977; Höfte y Whiteley, 1989) y plagas de cultivos. Debido a su actividad insecticida, se han usado formulaciones con esporas y cristales para el control de plagas. Esta propiedad ha convertido a este microorganismo en una importante herramienta en la biotecnología de la salud.

La integración cromosomal del ADN plasmídico se ha usado en *B. subtilis* para transformación de fenotipo, regulación de expresión genética o mantenimiento estable de genes. Por ejemplo, Calogero *et al.* (1989) usaron un vector de integración para expresar un gen de una inclusión de proteína cristalífera de *B. thuringiensis* en *B. subtilis*. Sin embargo, la manipulación genética de las cepas de *Bt*, esencial para su desarrollo como biopesticida, es experimentalmente difícil. Una limitante importante es que las bacterias de la especie *B. thuringiensis* son recalcitrantes a la transformación, incluso por el método efectivo de electroporación (Bone y Ellar, 1989; Mahillon *et al.*, 1989; Lereclus *et al.*, 1989). Las eficiencias de transformación reportadas para *Bt* son del orden de 10^1 a 10^4 transformantes μg^{-1} , y para algunas cepas la transformación se ha reportado como imposible.

En contraste con el modelo de *B. subtilis*, donde la recombinación homóloga es fácil y factible (Niaudet *et al.*, 1984; Vázquez *et al.*, 1996), la transformación en *Bt* es un gran problema y la recombinación molecular mucho más. Sólo se han obtenido las transformantes de *Bt* o cepas recombinantes utilizando mutagénesis (Delécluse *et al.*, 1991), secuencias de inserción (Lereclus *et al.*, 1992), y con plásmidos cuya replicación es termosensible (Lereclus *et al.*, 1995; Fedhila *et al.*, 2002).

El presente trabajo forma parte de la construcción de un modelo de estudio de recombinación genética, donde se describe la caracterización de una secuencia cromosomal, como un buen prospecto de ADN sustrato para la recombinación homóloga en *Bt*. Esto podría contribuir a mejorar cepas de *Bt* para el control de plagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación de regiones recombinantes

Se usó la cepa DH5 α -F' de *E. coli* (Invitrogen) para la clonación y la propagación de las nuevas construcciones plasmídicas.

Due to its insecticide activity, formulations with spores and crystals have been used for pest control. This property has converted this microorganism into an important tool in health biotechnology.

The chromosomal integration of the plasmidic DNA has been used in *B. subtilis* for phenotype transformation, regulation of genetic expression or stable maintenance of genes. For example, Calogero *et al.* (1989) used an integration vector to express a gene of an inclusion of crystalliferous protein of *B. thuringiensis* in *B. subtilis*. However, the genetic manipulation of the strains of *Bt*, essential for its development as a biopesticide, is experimentally difficult. An important limitation is that the bacteria of the species *B. thuringiensis* are recalcitrant to transformation, even by the effective method of electroporation (Bone and Ellar, 1989; Mahillon *et al.*, 1989; Lereclus *et al.*, 1989). The transformation efficiencies reported for *Bt* are of the order of 10^1 to 10^4 transformants μg^{-1} , and for some strains the transformation has been reported to be impossible.

In contrast with the model of *B. subtilis*, where the homologous recombination is easy and viable (Niaudet *et al.*, 1984; Vázquez *et al.*, 1006), the transformation in *Bt* is a great problem and the molecular recombination even more so. The transformants of *Bt* or recombinant strains have only been obtained using mutagenesis (Delecluse *et al.*, 1991), insertion sequences (Lereclus *et al.*, 1992), and with plasmids whose replication is thermosensitive (Lereclus *et al.*, 1995; Fedhila *et al.*, 2002).

The present work forms part of the construction of a model study of genetic recombination, where the characterization of a chromosomal sequence is described, as a good prospect of DNA substrate for the homologous recombination of *Bt*. This could contribute to the improvement of strains of *Bt* for pest control.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of recombinant regions

The strain DH5 α -F' of *E. coli* (Invitrogen) was used for the cloning and propagation of the new plasmidic constructions. This bacterium grew in the Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C. The plasmids were isolated from *E. coli* by the alkaline extraction method (Birnboim and Doly, 1979). The standard procedures of recombinant DNA were used according to Sambrook *et*

Esta bacteria creció en el medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C. Los plásmidos fueron aislados de *E. coli* por el método de extracción alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Los procedimientos estándar de ADN recombinante se realizaron según Sambrook *et al.* (1989). Para explorar la recombinación homóloga fue necesario utilizar un plásmido no-replicativo el cual debe contener fragmentos de ADN cromosomal de *Bti* para lograr la recombinación molecular. El plásmido suicida pES de 4.6 Kb (Figura 1) se construyó eliminando 2.1 Kb de todo el *ori-Bth* de 2.9 Kb de pHT3101 (Lereclus *et al.*, 1989) con la enzima de restricción *EcoRV*. Los derivados recombinantes de *E. coli* crecieron en medio LB que contenía 100 mg μL^{-1} de ampicilina.

La cepa IPS82 de *B. thuringiensis* var. *israelensis* creció en medio LB a 28 °C y las extracciones de ADN genómico de *Bt* se realizaron con una modificación del método Dubnau y Davidoff-Abelson (1971). El ADN obtenido fue suficientemente puro para electroforesis y digestión por enzimas de restricción. Se usó la enzima *EcoRI* para digerir el ADN genómico y los fragmentos obtenidos se ligaron mediante la enzima T4 ligasa en el plásmido suicida pES. La mezcla de ligación se usó para transformar *E. coli*. Así se obtuvieron diferentes transformantes en *E. coli* con insertos que variaban en tamaño.

Selección de recombinantes

El plásmido pHT3101, conteniendo una región de replicación del plásmido pHT1030 de *B. thuringiensis* (Lereclus *et al.*, 1989) y sus derivados, se usaron para transformar *Bti* por el

al. (1989). To explore the homologous recombination, it was necessary to use a non-replicative plasmid which should contain fragments of chromosomal DNA of *Bti* in order to achieve the molecular recombination. The suicide plasmid pES of 4.6 Kb (Figure 1) was constructed by eliminating 2.1 Kb of all the *ori-Bth* of 2.9 Kb of pHT3101 (Lereclus *et al.*, 1989) with the restriction enzyme *EcoRV*. The recombinant derivatives of *E. coli* grew in LB medium which contained 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ampicillin.

The strain IPS82 of *B. thuringiensis* var. *israelensis* grew in LB medium at 28 °C and the genomic extractions of *Bt* were made with a modification of the method of Dubnau and Davidoff-Abelson (1971). The DNA obtained was sufficiently pure for electrophoresis and digestion by restriction enzymes. The enzyme *EcoRI* was used to digest the genomic DNA and the obtained fragments were linked by means of the enzyme T4 ligase in the suicide plasmid pES. The ligation mixture was used to transform *E. coli*. Thus different transformants were obtained in *E. coli* with inserts that varied in size.

Selection of recombinants

The plasmid pHT3101, containing a replication region of the plasmid pHT1030 of *B. thuringiensis* (Lereclus *et al.*, 1989) and its derivatives, were used to transform *Bti* for the electroporation procedure and to evaluate the efficiency of the process. For this purpose 20 mL of BHI (brain-heart infusion) (Difco) were inoculated along with 100 μL of spores ($5 \times 10^7 - 10^8 \text{ mL}^{-1}$) and were incubated with agitation at 200 rpm at 28 °C to reach

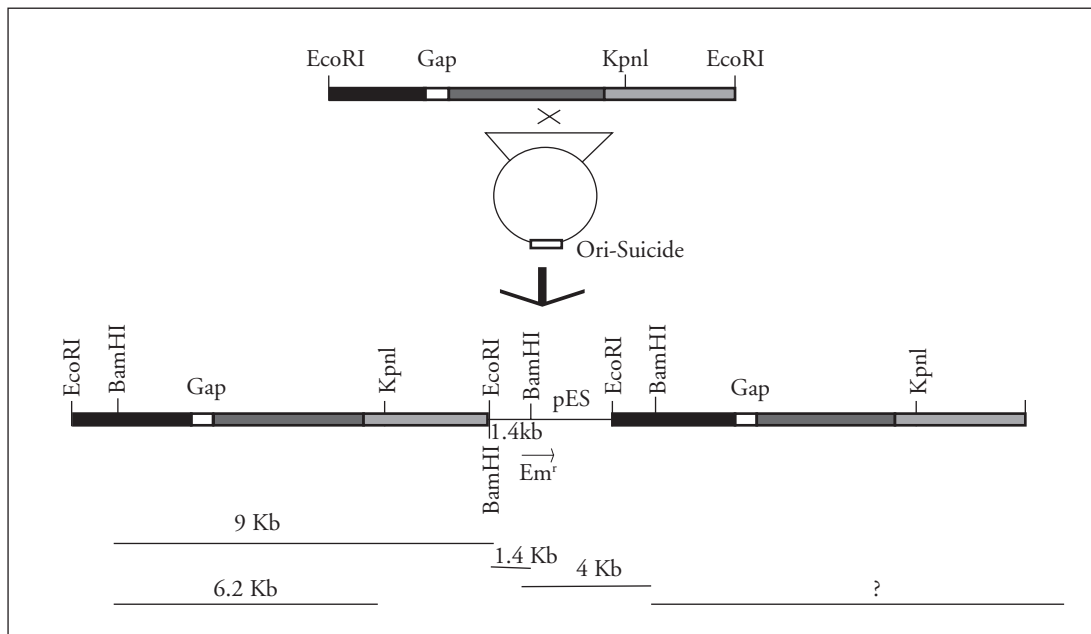


Figura 1. Construcción de la cepa recombinante IPS82 de *Bti* por recombinación.
Figure 1. Construction of the recombinant strain IPS82 of *Bti* for recombination.

procedimiento de electroporación y evaluar la eficiencia del proceso. Para ello se inocularon 20 mL de BHI (infusión de cerebrocorazón) (Difco) con 100 μL de esporas ($5 \times 10^7 - 10^8 \text{ mL}^{-1}$) y se incubaron con agitación a 200 rpm a 28 °C para alcanzar $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.30-0.40$. Las células se recuperaron por centrifugación durante 5 min a 4000 rpm y a 4 °C; se lavaron dos veces con 20 mL de agua destilada estéril a 4 °C y una vez con 10 mL de una solución estéril de glicerol al 10 %. Finalmente, se resuspendieron en 400 μL de glicerol al 10 %. Esta suspensión celular se usó inmediatamente después de su preparación. La electroporación se realizó con un Gene Pulser II (Bio-Rad®) acoplado a un selector de resistencia paralelo (controlador de pulso Bio-Rad®). Para la electroporación se mezclaron 200 μL de células de *Bti* a 4 °C con ADN plasmídico y se transfirieron a cubetas de plástico de electroporación (0.2 cm ancho). Se aplicaron 1400 V, 25 μF y 400 Ohms, en un pulso. Después de la electroporación las células se recuperaron con 1 mL de BHI y se incubaron 3 h a 28 °C con agitación suave. Alícuotas de 200 μL de estas células se colocaron en placas con LB más eritromicina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Las transformantes de *Bt* formaron colonias después de una noche (12 h) de incubación a 28 °C. Las transformantes resistentes a eritromicina se seleccionaron y se midió la eficiencia de transformación.

Caracterización de recombinantes

Para corroborar la recombinación homóloga, el ADN total de las transformantes de *Bt* fue extraído y digerido con enzimas de restricción como *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI y *Hind*III. Los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa al 0.8 % por electroforesis, se transfirieron a una membrana de nylon; éstas fueron hibridadas con una sonda marcada con ^{32}P y se obtuvo la autoradiografía usando películas de rayos X de Kodak®, según Sambrook *et al.* (1989).

Se evaluaron algunos efectos secundarios en las recombinantes. Se midió el porcentaje de esporulación creciendo las recombinantes y la cepa silvestre en un medio Tris-G para inducir la esporulación a 28 °C por 3 d. Las esporas fueron contadas como unidades formadoras de colonia (ufc) realizando diluciones y sembrándolas en placas de LB. También se comprobó el efecto de la integración sobre la producción de proteínas realizando geles SDS-PAGE (electroforesis desnaturante con dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida) de proteínas cristalíferas (Thomas y Ellar, 1983).

Caracterización del fragmento que promueve la recombinación

El fragmento de ADN que promueve la recombinación se mapeó usando diferentes enzimas de restricción, de acuerdo con las instrucciones de cada proveedor. Luego se eliminó un

$\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.30-0.40$. The cells were recovered by centrifugation during 5 min at 4000 rpm and at 4 °C; they were washed twice with 20 mL of sterile distilled water at 4 °C and once with 10 mL of a sterile solution of glycerol at 10 %. Finally, they were resuspended in 400 μL of glycerol at 10 %. This cellular suspension was used immediately after its preparation. The electroporation was made with a Gene Pulser II (Bio-Rad®) coupled to a parallel resistance selector (Bio-Rad® pulse controller). For the electroporation, 200 μL of cells of *Bti* were mixed at 4 °C with DNA plasmids and they were transferred to electroporation plastic containers (0.2 cm width). One pulse was applied at 1400 V, 25 μF and 400 Ohms. After the electroporation the cells were recovered with 1 mL of BHI and incubated 3 h at 28 °C with slow agitation. Aliquots of 200 μL of these cells were placed on plates with LB plus erythromycin ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). The transformants of *Bt* formed colonies after one night (12 h) of incubation at 28 °C. The transformants resistant to erythromycin were selected and the transformation efficiency was quantified.

Characterization of recombinants

To corroborate the homologous recombination, the total DNA of the transformants of *Bt* was extracted and digested with restriction enzymes such as *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI and *Hind*III. The DNA fragments were separated in an agarose gel at 0.8 % by electrophoresis, were transferred to a nylon membrane, and were hybridized with a probe marked with ^{32}P and the autoradiography was obtained using Kodak® X-ray films, according to Sambrook *et al.* (1989).

Some secondary effects in the recombinants were evaluated. For this purpose the percentage of sporulation was measured by growing the recombinants and the wild strain in a Tris-G medium to induce sporulation at 28 °C for 3 d. The spores were counted as colony-forming units (cfu) by making dilutions and sowing them on plates of LB. The effect of the integration on protein production was also tested by making SDS-PAGE gels (denaturalizing electrophoresis with sodium dodecyl sulphate in polyacrylamide gel) of crystalliferous proteins (Thomas and Ellar, 1983).

Characterization of the fragment that promotes recombination

The DNA fragment that promotes recombination was mapped using different restriction enzymes, according to the instructions of each supplier. Then a fragment of 2.8 Kb of pES8 (clone with an insert of 10 Kb) was eliminated, located in the end next to the multiple cloning site of the vector plasmid, with the enzyme *Kpn*I to obtain the minimum region necessary for the homologous recombination. With this new clone denominated

fragmento de 2.8 Kb de pES8 (clona con un inserto de 10 Kb), localizado en el extremo próximo al sitio de clonación múltiple del plásmido vector, con la enzima *KpnI* para obtener la región mínima necesaria para la recombinación homóloga. Con esta nueva clona denominada pES8 Δ *KpnI* se transformó la cepa IPS82 de *Bti* como ya se describió, introduciendo pHT3101 como testigo positivo, pES como testigo negativo y pES8. La eficiencia de transformación fue similar a la obtenida con la clona pES8. Para corroborar la recombinación homóloga de estas nuevas transformantes se hizo un Southern blot usando un marcador de ADN (1 Kb plus, Invitrogen).

Para analizar la presencia de este locus *ibr* en diferentes cepas, se extrajo el ADN total de la cepa silvestre de *B. thuringiensis* var. *israelensis* y de la recombinante, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, se separó con un gel de agarosa por electroforesis, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridizó con el plásmido pES8 (tamaño \approx 15 Kb) en un análisis Southern blot. Después se efectuaron pruebas de transformación de algunas cepas de *Bt* con pES8. Finalmente, se detectó la presencia de un fragmento interno de 1500 pb del locus *ibr* en cepas de *Bt* por PCR. Este fragmento se secuenció en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Irapuato, la secuencia se analizó con BLAST (herramienta de búsqueda de alineamientos básicos locales) y se comparó usando secuencias provenientes de los genomas con números de acceso AE016877, AE017355, AE016879, CP000485 y CP000903.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *Bacillus thuringiensis* y recombinación homóloga

La transformación en *Bt* es un proceso difícil a pesar de métodos efectivos como la electroporación que ha permitido introducir plásmidos recombinantes en *Bt* (Wang *et al.*, 2008). Sin embargo muchos plásmidos introducidos muestran inestabilidad segregacional, por lo que la recombinación homóloga representa una revolucionaria técnica de ingeniería del ADN para el mejoramiento de cepas de manera estable.

Sin embargo la dificultad de transformar *Bt* ha causado que esta técnica haya sido poco estudiada en *Bt* (Xia *et al.*, 2009) e incluso la integración de nuevos genes al cromosoma de *Bt* (Thamthiankul *et al.*, 2004) se realiza por el método de Lereclus *et al.* (1992). Por ello la recombinación homóloga en vivo en un solo paso es una propuesta prometedora para introducir nuevos genes en el ADN cromosomal de

pES8 Δ *KpnI*, the strain IPS82 of *Bti* was transformed as described above, introducing pHT3101 as positive control, pES as negative control and pES8. The transformation efficiency was similar to that obtained with the clone pES8. To prove the homologous recombination of these new transformants, a Southern blot analysis was made using a DNA weight marker (1Kb plus, Invitrogen).

To analyze the presence of this *ibr* locus in different strains, the total DNA of the wild strain of *B. thuringiensis* var. *israelensis* and of the recombinant was extracted, digested with the restriction enzyme *EcoRI*, separated by an agarose gel through electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized with the plasmid pES8 (size \approx 15Kb) in a Southern blot analysis. Then transformation tests were made of some strains of *Bt* with pES8. Finally, the presence of an internal fragment of 1500pb of the *ibr* locus was detected in strains of *Bt* by PCR. This fragment was sequenced in the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad of the Centro de Investigación y Estudios Avanzados of Irapuato, the sequence was analyzed with BLAST (basic local alignments search tool) and it was compared using sequences from the genomes with Access numbers AE016877, AE01355, AE016879, CP000485 and CP000903.

RESULTS AND DISCUSSION

Transformation of *Bacillus thuringiensis* and homologous recombination

The transformation in *Bt* is a difficult process despite effective methods such as electroporation, which has made it possible to introduce recombinant plasmids in *Bt* (Wang *et al.*, 2008). However, many introduced plasmids show segregational instability, thus the homologous recombination represents a technical revolution of DNA engineering for the improvement of strains in a stable manner.

However, as a result of the difficulty of transforming *Bt*, few studies of this technique have been made in *Bt* (Xia *et al.*, 2009) and even the integration of new genes to the chromosome of *Bt* (Thamthiankul *et al.*, 2004) is made by the method of Lereclus *et al.* (1992). Therefore, the *in vivo* homologous recombination in one step is a promising proposal for introducing new genes in the chromosomal DNA of *B. thuringiensis* in a stable form, and the strain IPS82 is the organism selected for developing a molecular model. This opens the possibility for modifying strains of soil *Bt* for its improvement in the treatment of crop pests.

B. thuringiensis de forma estable, y la cepa IPS82 es el organismo seleccionado para desarrollar un modelo molecular. Esto abre la posibilidad de modificar cepas de *Bt* de suelo para su mejoramiento en el tratamiento de plagas de cultivos.

Para ello varias secuencias genómicas de *Bti* fueron clonadas en pES para obtener clonas con insertos de tamaño que variaban entre 4 y 10 Kb. Algunas de estas clonas fueron transformadas en *B. thuringiensis* var. *israelensis* por electroporación, incluyendo pHT3101 como testigo positivo y pES como testigo negativo. La eficiencia de transformación de pHT3101 fue 4.8×10^4 transformantes μg^{-1} ADN. Sólo una clona con un inserto de 10 Kb, llamada pES8, produjo transformantes (fenotipo de resistencia a eritromicina) con una eficiencia de transformación de 2×10^2 transformantes μg^{-1} ADN, es decir 100 veces inferior a la del testigo positivo, correspondiente a una inserción cromosomal de pES8. La frecuencia de transformación tan baja observada por la integración de un plásmido no-replicativo es el resultado de la internalización del ADN en la célula y el evento de la recombinación homóloga entre dos fragmentos cromosomales homólogos.

En la Figura 1 se muestran los mapas de restricción simplificados de las regiones seleccionadas del ADN cromosomal de *Bti* IPS82 después de su integración. El vector pES se representa por una línea discontinua; el ADN cromosomal se muestra como una caja abierta.

Caracterización de las recombinantes

La integración del plásmido pES8 al cromosoma se verificó molecularmente por medio de digestión con diferentes enzimas y electroforesis del ADN total con posterior hibridación Southern blot usando la sonda del replicón pHT3101. La digestión *Bam*HI fue elegida para verificar la integración al cromosoma (Figura 2). Como se esperaba, un fragmento *Bam*HI de 1.4 Kb fue encontrado en la transformante de pES8 (Figura 2A, carril 6) como resultado de la inserción de una parte del plásmido. La sonda también hibridizó con otros dos fragmentos *Bam*HI de tamaño aproximado de 4.0 Kb y 9.0 Kb (Figura 2A, carril 6), indicando que el fragmento contenía un sitio de restricción *Bam*HI. Las bandas de 1.4 Kb y 4.0 Kb provienen de la integración del plásmido suicida pES, no aparecen en la cepa silvestre (Figura 2A carril 7) e

For this purpose various genomic sequences of *Bti* were cloned in pES to obtain clones with inserts of a size varying from 4 to 10 Kb. Some of these clones were transformed in *B. thuringiensis* var. *israelensis* by electroporation, including pHT3101 as positive control and pES as negative control. The transformation efficiency of pHT3101 was 4.8×10^4 transformants μg^{-1} DNA. Only one clone with an insert of 10 Kb, called pES8, produced transformants (phenotype of resistance to erythromycin) with a transformation efficiency of 2×10^2 transformants μg^{-1} DNA, that is, 100 times lower than that of the positive control, corresponding to a chromosomal insertion of pES8. The low transformation efficiency observed for the integration of a non-replicative plasmid is the result of the internalization of the DNA in the cell and the event of the homologous recombination between two homologous chromosomal fragments.

In Figure 1 it is shown the simplified maps of restriction of the selected regions of the chromosomal DNA of *Bti* IPS82 after its integration. The vector pES is represented by a discontinuous line; the chromosomal DNA is shown as an open box.

Characterization of the recombinants

The integration of the plasmid pES8 to the chromosome was molecularly verified by means of digestion with different enzymes and electrophoresis of the total DNA with posterior Southern blot hybridization using the probe of the replicon of pHT3101. The digestion *Bam*HI was selected to verify the integration to the chromosome (Figure 2). As was expected, a *Bam*HI fragment of 1.4 Kb was found in the transformant of pES8 (Figure 2A, lane 6) as a result of the insertion of a part of the plasmid. The probe also hybridized with two other *Bam*HI fragments of an approximate size of 4.0 Kb and 9.0 Kb (Figure 2A, lane 6), indicating that the fragment contained a *Bam*HI restriction site. The bands of 1.4 Kb and 4.0 Kb originate from the integration of the suicide plasmid pES, do not appear in the wild strain (Figure 2A lane 7) and indicate chromosomal integration. The control DNA was the plasmid pHT3101 which contained two *Bam*HI restriction sites; therefore, the digestion with this enzyme generated two fragments with a size of 3.3 and 3.4 Kb (Figure 2A, lane 8). The digestion was partial, thus the band of 6.7 Kb product of pHT3101 appears undigested.

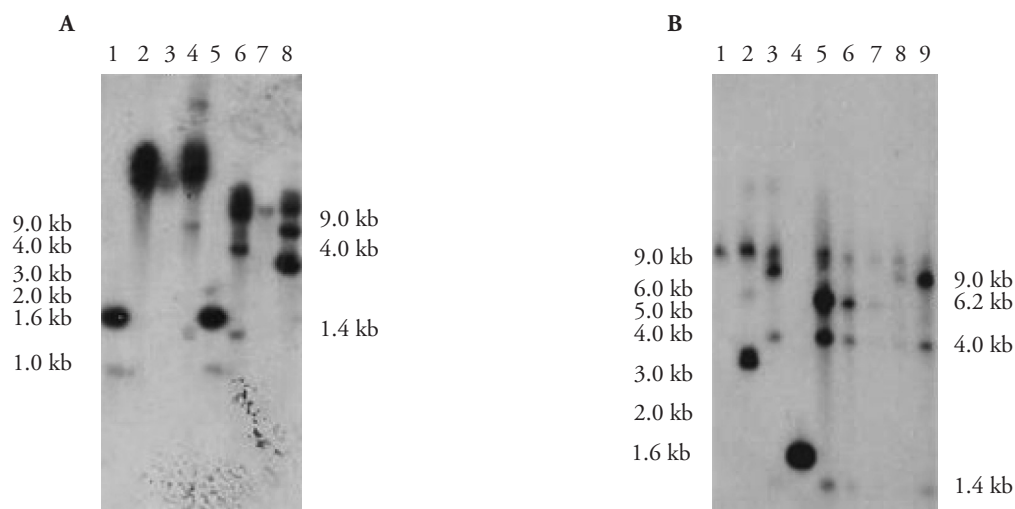


Figura 2. Evidencia mediante Southern blot de la recombinación en *B.thuringiensis*. A) Verificación de la integración del plásmido pES8 (sonda pES8). Carriles; 1, 5, marcador de peso molecular 2, 6 transformantes de *Bti* con pES8 sin digerir y digerido con *Bam*HI; 3 y 7 *Bti* IPS82 digerido y sin digerir con *Bam*HI; 4 y 8 transformantes de *Bti* con pHT3101 sin digerir y digerido parcialmente con *Bam*HI. B) Verificación de la integración del plásmido pES8Δ*Kpn*I (sonda pES8) Carriles; 1, *Bti* IPS82; 2, *Bti*+pHT3101; 3, 8 y 9, transformantes de *Bti* con pES8; 4, y marcador de peso molecular; 5-7, transformantes de *Bti* con la clona pES8Δ*Kpn*I.

Figure 2. Evidence by means of Southern blot of recombination in *B. thuringiensis*. A) Verification of the integration of the plasmid pES8 (probe pES8). Lanes 1, 5 molecular weight marker; 2, 6 transformants of *Bti* with pES8 non-digested and digested with *Bam*HI; 3 and 7 *Bti* IPS82 digested and non-digested with *Bam*HI; 4 and 8 transformants of *Bti* with pHT3101 non-digested and partially digested with *Bam*HI. B) Verification of the integration of the plasmid pES8Δ*Kpn*I (probe pES8) Lanes 1, *Bti* IPS82; 2, *Bti*+pHT3101; 3, 8 and 9, transformants of *Bti* with pES8; 4; 5-7, transformants of *Bti* with the clone pES8Δ*Kpn*I.

indican la integración cromosomal. El ADN control fue el plásmido pHT3101 que tenía dos sitios de restricción *Bam*HI; por tanto, la digestión con esta enzima generaba dos fragmentos con tamaño de 3.3 y 3.4 Kb (Figura 2A, carril 8). La digestión fue parcial, por lo que aparece la banda de 6.7 Kb producto de pHT3101 sin digerir.

Las cepas silvestre y recombinante fueron probadas para determinar alguna posible alteración en la formación de la spora; sin embargo, no se observó alteración alguna en la eficiencia de esporulación en la cepa recombinante. Un análisis mediante geles SDS-PAGE (datos no mostrados) indicó que la cepa recombinante producía las mismas proteínas cristalíferas que la cepa silvestre; por tanto, el fragmento que promovía la recombinación no afectaba la esporulación ni la producción de cristales.

Análisis de restricción del locus *ibr* y recombinación con el fragmento *Kpn*I

La clona transformante contiene un inserto de aproximadamente 10 Kb que presenta pocos sitios de

The wild and recombinant strains were tested to determine some possible alteration in the spore formation; however, no alteration was observed in the sporulation efficiency in the recombinant strain. An analysis using gels SDS-PAGE (data not shown) indicated that the recombinant strain produced the same crystalliferous proteins as the wild strain; therefore, the fragment that promoted the recombination did not affect sporulation nor the production of crystals.

Restriction analysis of the locus *ibr* and recombination with the fragment *Kpn*I

The transformant clone contains an insert of approximately 10 Kb that presents few cutting sites for enzymes of frequent use, but contains one *Eco*RV site, three *Sty*I sites and one *Kpn*I site. The sequence of nucleotides of the DNA segment of *Bti* IPS82 that permits the integration to the DNA by homologous recombination is called *ibr*I and is present in other type strains of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

corte para enzimas de uso frecuente, pero contiene un sitio *EcoRV*, tres sitios *StyI* y un sitio *KpnI*. La secuencia de nucleótidos del segmento de ADN de *Bti* IPS82 que permite la integración al ADN por recombinación homóloga se denominó *ibrI* y está presente en otras cepas tipo de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Para localizar la región mínima en el fragmento, esencial para la recombinación homóloga y para valorar la posibilidad de que la recombinación pudiera ser dependiente del tamaño del inserto, se probaron algunas supresiones específicas con algunas enzimas de restricción presentes en el locus. Sin embargo, sólo fue posible realizar una supresión *KpnI* de 2.8 Kb en un extremo del fragmento (Figura 1). La supresión de un segmento de 2.8 Kb con la enzima *KpnI* produjo una clona con un inserto de 7.2 Kb (pESΔ*KpnI*) que retiene la capacidad para transformar a *Bti*, lo que confirma que la clona consistentemente lleva a cabo recombinación con el mismo ADN cromosomal de *Bti* y que la recombinación no es dependiente del tamaño del inserto.

En la Figura 2B se muestra la diferencia en tamaño del ADN cromosomal de la clona completa y la suprimida (Figura 2B, carriles 3 y 5) relacionada a los fragmentos de 9.0 y 6.2 Kb, mientras que los fragmentos *BamHI* de 1.4 y 4.0 Kb mostraron señal con la parte de la sonda que corresponde al plásmido vector (Figura 1). El ADN testigo fue el plásmido pHT3101 que tenía dos sitios de restricción *BamHI*; por tanto, la digestión con esta enzima generaba dos fragmentos de 3.3 y 3.4 Kb (Figura 2B, carril 2).

Secuenciación del locus *ibrI* y su comparación con genomas conocidos

El ADN del locus recombinante fue sujeto a una secuenciación de nucleótidos parcial. Para ello se secuenció la clona pES8Δ*KpnI*, por el extremo *KpnI* y luego en una región interna de 1500 pb (ver Figura 3B) cuya secuencia se depositó en el GenBank (número de acceso GQ476797). Esta secuencia se analizó mediante BLAST y ClustalW y se determinó que tiene 99 % de identidad con una sección incompleta del cromosoma de *Bti* (número de acceso NZ_AAJM01000054), 93 % de identidad con *Bt* var. *Kurstaki* (número de acceso NZ_ACND01000049), 93 % con *Bt* var. *Konkukian* (número de acceso AE017355), y 90 % con *Bt Al Hakam* (número de acceso CP000485). Además muestra 90-97 % de

To locate the minimum region in the fragment, essential for the homologous recombination and to evaluate the possibility that the recombination could depend on the size of the insert, were tested some specific deletions with some restriction enzymes present in the locus. However, it was only possible to make a *KpnI* deletion of 2.8 Kb in one end of the fragment (Figure 1). The deletion of a segment of 2.8 Kb with the enzyme *KpnI* produced a clone with an insert of 7.2 Kb (pESΔ*KpnI*) that still maintains the capacity to transform to *Bti*, which confirms that cloning consistently carries out recombination with the same chromosomal DNA of *Bti* and that recombination is not dependent on the size of the insert.

In Figure 2B it is shown the difference in size of the chromosomal DNA of the complete and the deleted clone (Figure 2B, lanes 3 and 5) related to the fragments of 9.0 and 6.2 Kb, while the *BamHI* fragments of 1.4 and 4.0 Kb showed signal with the part of the probe that corresponds to the vector plasmid (Figure 1). The control DNA was the plasmid pHT3101 that has two *BamHI* restriction sites; therefore, digestion with this enzyme generated two fragments of 3.3 and 3.4 Kb (Figure 2B, lane 2).

Sequencing of the locus *ibrI* and its comparison with known genomes

The DNA of the recombinant locus was subjected to a partial sequencing of nucleotides. For this purpose the clone pES8Δ*KpnI* was sequenced, at the *KpnI* end and later in an internal region of 1500 pb (see Figure 3B) whose sequence was deposited in the GenBank (access number GQ476797). This sequence was analyzed by means of BLAST and ClustalW and it was determined that it has 99 % of identity with an incomplete section of the chromosome of *Bti* (access number NZ_AAJM01000054), 93 % identity with *Bt* var. *Kurstaki* (access number NZ_ACND01000049), 93 % with *Bt* var. *Konkukian* (access number AE017355), and 90 % with *Bt Al Hakam* (access number CP000485). Besides it shows 90-97 % identity with the sequenced chromosomes of strains of *B. cereus*, being more similar to the strain 14579 (access number AE016877). Similarly, it has 90 % identity with a section of 6.4 Kb of *B. anthracis* Ames (access number AEO16879) and 88 % with a short segment of the chromosome

identidad con los cromosomas secuenciados de cepas de *B. cereus*, siendo más similar a la cepa 14579 (número de acceso AE016877). Asimismo, posee 90 % de identidad con una sección de 6.4 Kb de *B. anthracis Ames* (número de acceso AE016879) y 88 % con un segmento corto del cromosoma de *B. weihenstephanensis* KBAB4 (número de acceso CP000903). La comparación de las secuencias analizadas pone de manifiesto que está altamente conservada con variaciones puntuales, incluso con una inserción adicional de 5 Kb presente en el cromosoma de *B. anthracis Ames*. La organización transcripcional teórica de la secuencia de *Bti* mostró que un marco de lectura grande está interrumpido; esto sugiere que puede tener relación con la recombinación homóloga en el locus *ibrI*.

Ubicuidad y recombinación del locus *ibrI* completo en otras cepas de *Bt*

Considerando la ventaja de una exitosa transformación en un solo paso observada para *B. thuringiensis* var. *israelensis* mediante un locus recombinante, parecía

of *B. weihenstephanensis* KBAB4 (access number CP000903). The comparison of the analyzed sequences shows that it is highly conserved with punctual variations even with an additional insertion of 5 Kb present in the chromosome of *B. anthracis Ames*. The theoretical transcriptional organization of the sequence of *Bti* showed that a large open reading frame is interrupted; this suggests that it could be related to the homologous recombination in the locus *ibrI*.

Ubiquitousness and recombination of the complete locus *ibrI* in other strains of *Bt*

Considering the advantage of a successful transformation in a single step observed for *B. thuringiensis* var. *israelensis* through a recombinant locus, it seemed promising to expand the strategy to other varieties of *B. thuringiensis*. First, it was necessary to determine the presence of the complete locus *ibrI* in the chromosome of the strains selected for the transformation, because the homologous recombination needed a similar DNA as substrate to achieve the

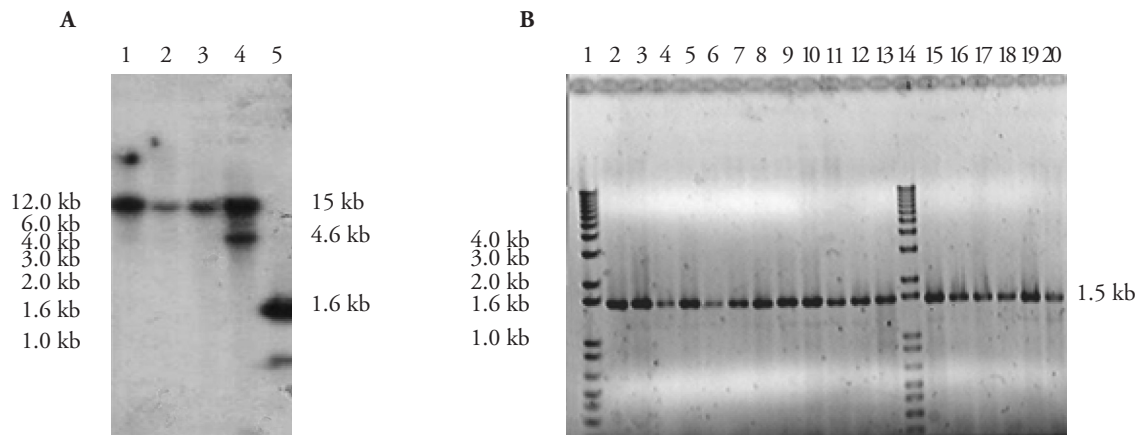


Figura 3. Determinación de la presencia del locus *ibrI* en los cromosomas de las cepas de *Bt*. mediante Southern blot. A) Presencia del locus completo digerido con *EcoRI* de cepas usando pES8 como sonda. Carriles: 1 HD-73; 2, HD-1; 3, *Bti*; 4, cepa recombinante Cromo:pES8; 5, marcador de peso molecular de ADN 1 Kb plus (Invitrogen). B) Presencia de un fragmento interno de 1500 pb del locus *ibrI* en diferentes cepas de suelo de *Bt*. Carriles: 1 y 14, marcador de peso molecular de ADN 1 Kb plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 cepas de *Bt* de suelo; 15, IPS82; 16, 47 IV; 17, 102-III; 18, HD-1; 19, Cromo:pES8; 20, HD-73.

Figure 3. Determination of the presence of the locus *ibrI* in the chromosomes of the strains of *Bt* by means of Southern blot. A) Presence of the complete locus digested with *EcoRI* of strains using pES8 as probe. Lanes: 1HD-73; 2, HD-1; 3, *Bti*; 4, recombinant strain Cromo:pES8; 5, molecular weight marker of DNA 1Kb plus (Invitrogen). B) Presence of an internal fragment of 1500 pb of the locus *ibrI* in different soil strains of *Bt*. Lanes: 1 and 14, molecular weight marker of DNA 1 Kb plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 and 13 strains of soil *Bt*; 15, IPS82; 16, 47 IV; 17, 102-III; 18, HD-1; 19, Cromo:pES8; 20, HD-73.

prometedor expandir la estrategia a otras variedades de *B. thuringiensis*. Primero fue necesario determinar la presencia del locus completo *ihrrI* en el cromosoma de las cepas elegidas para la transformación, debido a que la recombinación homóloga necesitaba un ADN similar como sustrato para lograr el intercambio molecular. Este análisis se centró en las cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, HD-1 y HD-73. Los patrones de hibridación resultantes se muestran en la Figura 3A y el locus fue detectado en ambas cepas, confirmando su presencia en ellas.

Se determinó la presencia del fragmento interno de 1500 pb secuenciado y aislado dentro del locus recombinante en nuestra colección de cepas. Se realizaron reacciones de PCR utilizando el ADN genómico de varias cepas de *Bt* como templado, e inesperadamente el fragmento de 1500 pb se amplificó para todas las cepas (Figura 3B).

Esto indica que las cepas se podrían transformar con el plásmido recombinante por poseer el ADN sustrato. Por tanto se usó el plásmido recombinante pES8 para electroporarlo en las cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y otras cepas de *Bacillus* de suelo. El plásmido pHT3101 se usó como testigo positivo y el plásmido pES como testigo negativo. Sólo HD-1 y una cepa de suelo, denominada 47-IV, pudieron ser transformadas con el vector de testigo positivo pHT3101 en un número de transformantes inferior, comparado con la cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82, y no se pudo transformar la cepa HD-73. A pesar de obtener transformantes con el testigo positivo, pES8 no se pudo transformar. Por tanto, es posible que cambios de nucleótidos en la secuencia del locus *ihrrI* fueran decisivos para la recombinación.

CONCLUSIONES

Se logró la recombinación homóloga cromosomal de *B. thuringiensis* var. *israelensis* en un solo paso.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del locus *ihrrI* indicó que esta región del genoma de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 es semejante a otras secuencias reportadas de *Bt*. Pero un cambio puntual provoca que la organización transcripcional teórica de la secuencia de *Bti* muestre un marco de lectura grande interrumpido, lo cual sugiere que puede tener relación con la recombinación homóloga en el locus *ihrrI*.

molecular exchange. This analysis was centered on the strains of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, HD-1 and HD-73. The resulting hybridization patterns are shown in Figure 3A and the locus was detected in both strains, confirming its presence in them.

The presence of the internal fragment of 1500 pb sequenced and isolated within the recombinant locus was determined in our collection of strains. Reactions of PCR were made using the genomic DNA of various strains of *Bt* as template, and unexpectedly the fragment of 1500 pb was amplified for all of the strains (Figure 3B).

This indicates that the strains could be transformed with the recombinant plasmid because of having the substrate DNA. Therefore the recombinant plasmid pES8 was used to electroporate it in the strains of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* and other strains of soil *Bacillus*. The plasmid pHT3101 was used as positive control and the plasmid pES as negative control. Only HD-1 and a soil strain, called 47-IV, could be transformed with the positive control vector pHT3101 in a smaller number of transformants compared with the strain of *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82, and the strain HD-73 could not be transformed. Although transformants were obtained with the positive control, pES8 could not be transformed. Therefore, it is possible that changes of nucleotides in the sequence of the locus *ihrrI* were decisive for the recombination.

CONCLUSIONS

The chromosomal homologous recombination of *B. thuringiensis* var. *israelensis* in one step was achieved.

The analysis of the sequence of nucleotides of the locus *ihrrI* indicated that this region of the genome of *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 is similar to other sequences reported for *Bt*. But, a punctual change causes the theoretical transcriptional organization of the sequence of *Bti* to show an interrupted large open reading frame, which suggests that it could be related to the homologous recombination in the locus *ihrrI*.

—End of the English version—

---*---

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de México, Secretaría de Relaciones Exteriores y al CONACyT SEP-2004-C01-47120 por las becas y los recursos otorgados para la realización del proyecto. A Alberto Chantes Guerra por su asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bone, E. J., and D. J. Ellar. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 171-178.
- Calogero, S., A. M. Albertini, C. Fpgher, R. Marzari, and A. Galizzi. 1989. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 446-453.
- Delécluse, A., J.-F. Charles, A. Klier, and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* 173: 3374-3381.
- Dubnau, D., and R. Davidoff-Abelson. 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56: 209-221.
- Fedhila, S., P. Nel, and D. Lereclus. 2002. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J. Bacteriol.* 184: 3296-3304.
- Goldberg, L. H., and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex inuitattos*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37: 355-358.
- Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux, and M.-M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 211-218.
- Lereclus, D., M. Vallade, J. Chaufaux, O. Arantes, and S. Rambaud. 1992. Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. *Biotechnology* 10: 418-421.
- Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, and J. Chaufaux. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Biotechnology* 13: 67-71.
- Mahillon, J., W. Chungjatupornchai, J. Decock, S. Dierickx, F. Michiels, M. Peferoen, and H. Joos. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 205-210.
- Niaudet, B., L. Janniere, and S. D. Ehrlich. 1984. Recombination between repeated DNA-sequences occurs more often in plasmids than in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Mol. General Genet.* 197: 46-54.
- Sambrook, J., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1659 p.
- Thamthiankul, S., W. J. Moar, M. E. Miller, and W. Panbangred. 2004. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 183-192.
- Thomas, W. E., and Ellar, D.J. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: effects on insects and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.* 60: 181-197.
- Vázquez, C.C., S. J. C. Ochoa, and A. G. Olmedo. 1996. Pulse-field gel-electrophoretic analysis of the amplification and copy-number stability of an integrational plasmid in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 55-60.
- Wang, G., J. Zhang, F. Song, A. Gu, A. Uwais, T. Shao, and D. Huang. 2008. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting non-target species in the field. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1536-1543.
- Xia, L., Z. Zeng, X. Ding, and F. Huang. 2009. The expression of a recombinant cry1Ac gene with subtilisin-like protease CDEP2 gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* by Red/ET homologous recombination. *Curr. Microbiol.* 59: 386-392.